



# UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

*Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria*

---

PARAMETRI GENETICI DELLE CELLULE SOMATICHE TOTALI E  
DIFFERENZIALI E RELATIVE CORRELAZIONI NELLA RAZZA  
PEZZATA ROSSA ITALIANA

GENETIC PARAMETERS OF TOTAL AND DIFFERENTIAL SOMATIC CELLS IN THE  
ITALIAN SIMMENTAL CATTLE BREED

*Relatore:*

Prof. Andrea SUMMER

*Correlatore:*

Dott. Christos DADOUSIS

Laureando:

Francesco CELLA

# Sommario

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Riassunto.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>Abstract.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>1. INTRODUZIONE.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>1.1 Le mastiti negli allevamenti in lattazione .....</b>                         | <b>6</b>  |
| 1.1.1 Importanza economica della mastite .....                                      | 6         |
| 1.1.2 Tipologie di mastite in allevamento .....                                     | 8         |
| 1.1.3 Principali agenti di mastite .....  | 9         |
| 1.1.4 Difesa immunitaria della ghiandola mammaria .....                             | 13        |
| 1.1.5 Metodi di riscontro di mastite nel latte.....                                 | 16        |
| <b>1.2 Cellule somatiche .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>1.3 Cellule somatiche differenziali.....</b>                                     | <b>19</b> |
| <b>1.4 Effetti della SCC e della DSCC sulla produzione e qualità del latte.....</b> | <b>22</b> |
| <b>1.5 Aspetti genetici delle cellule somatiche .....</b>                           | <b>25</b> |
| <b>1.6 La razza pezzata rossa italiana.....</b>                                     | <b>28</b> |
| <b>2. OBIETTIVI .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>3. MATERIALI E METODI.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>5. CONCLUSIONE.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>Bibliografia .....</b>   | <b>41</b> |

# Riassunto

Nonostante i continui sforzi per combatterle, le mastiti sono, ancora ad oggi, uno dei principali problemi riguardanti le mandrie in lattazione, causando danni all'animale, perdite economiche e costringendo spesso alla riforma delle bovine. La prevenzione delle mastiti assume quindi un ruolo fondamentale non solo per gli allevamenti, ma per tutto il settore lattiero-caseario a causa delle conseguenze che le mastiti hanno sulla qualità del latte.

Le strategie di lotta alle mastiti sono varie e si svolgono su più fronti, andando ad agire sia sulla gestione della mandria in allevamento, sia sui metodi di diagnosi precoce, che sui programmi di selezione genetica. Tra gli innumerevoli metodi di diagnosi di mastite che si basano sull'analisi del latte, la conta delle cellule somatiche (SCC) è il metodo più utilizzato e convalidato, tanto da essere oggetto di norme legislative. Nonostante l'efficacia indubbia della SCC questa non distingue le varie popolazioni cellulari presenti, ma fornisce solo un'analisi quantitativa; per ovviare a questo problema è stato messo a punto un metodo più recente detto conta differenziale delle cellule somatiche (DSCC). La DSCC è data dalla percentuale di leucociti polimorfonucleati (PMN) e linfociti (LYM) sulla totalità delle cellule somatiche, inoltre, sottraendo a 100 la DSCC si può calcolare la percentuale di macrofagi (MAC). La differenziazione di queste popolazioni cellulari e la loro variazione percentuale permette una individuazione precoce delle mastiti permettendo di intervenire prima che queste si manifestino in forma clinica.

Affianco alle metodologie di prevenzione in azienda e analisi del latte, la lotta alle mastiti si esplica anche attraverso il progresso genetico. Difatti sia la SCC che la DSCC sono due caratteri ereditabili e come tali possono essere inclusi nei programmi di selezione genetica dei bovini. La SCC è inclusa da anni nei programmi di selezione sotto forma di un indice chiamato somatic cell score (SCS), ovvero la trasformazione logaritmica in base 2 della SCC. La DSCC non è ancora inclusa nei programmi di selezione e le sue correlazioni genetiche sono state indagate in un numero limitato di studi e solo nella razza Frisona.

Questo studio analizza l'ereditabilità e le correlazioni genetiche della DSCC e di altri parametri ad essa collegati nella razza Pezzata Rossa Italiana, una delle razze italiane più diffuse sul territorio nazionale. Sono stati presi in considerazione 9.596 osservazioni sul latte, di 1.314 vacche di Pezzata Rossa Italiana, da 63 allevamenti. I dati sono stati poi analizzati secondo un modello statistico per stabilire ereditabilità, correlazioni genetiche e fenotipiche di SCS, DSCC,  $\log_2(\text{PMN\_LYM})$  ovvero il logaritmo in base 2 della conta dei linfociti più quella dei leucociti polimorfonucleati,  $\log_2(\text{MAC})$  ovvero il logaritmo in base 2 della conta dei macrofagi, DSCC\_rtr

e  $\log_2(\text{DSCC})$  ovvero due trasformazioni logaritmiche della DSCC fatte per ottenere normalità ai fini statistici.

I risultati hanno dimostrato una ereditabilità della DSCC pari a 0,060 e dell'SCS pari a 0,084, inoltre la correlazione genetica tra questi due parametri è risultata di lunga inferiore rispetto a quella riportata in altri studi effettuati sulla Frisone Italiana, sottolineando come i due caratteri risiedano in tratti differenti del genoma e di come la loro selezione sia possibile in modo indipendente.

# Abstract

Despite continuous efforts the last decades in dairy herds' management and dairy cattle breeding programs, mastitis is still a disease of a great health, welfare and economic importance in dairy cattle. Accurate and early diagnosis of mastitis is fundamental to alleviate these problems. Somatic cell count (SCC) in milk is widely used as an indicator of udder health and intramammary infection, and is highly genetically correlated with clinical mastitis. Despite this, SCC only provides with a quantitative measure, hence it cannot distinguish among the various cell populations present in the milk. To overcome this problem, a new method has been recently proposed (differential somatic cell count; DSCC) that can distinguish among the main cell populations that are present in milk. The DSCC can be routinely recorder at population level as SCC. The DSCC includes the percentage of polymorphonuclear leukocytes (PMN) and lymphocytes (LYM) on the total SCC. Moreover, by subtracting the DSCC from 100 it's possible to calculate the percentage of macrophages (MAC). This differentiation the percentage of each of the three cell populations allow for an early and more accurate detection of mastitis before its clinical form. For breeding purposes, heritability and genetic correlations of DSCC with SCC (or its  $\log_2$  transformation to normality, somatic cell score; SCS) and various production traits (e.g., milk yield, percentage of fat and protein in milk) need to be known. At present, genetic parameters of DSCC have been investigated in a limited number of studies in the Holstein Friesian breed. The objective of this study was to estimate the heritability of SCS, DSCC, the sum of PMN and LYM (PMN\_LYM), and MAC and their phenotypic and genetic correlations in the Italian Simmental cattle breed. In total, 9.596 observations of 1.314 cows reared in 63 farms were analyzed. Similar to SCS, a series of transformations to normality were also tested for all the differential cell measures, namely: rank transformation of DSCC (DSCC\_rtr) and  $\log_2$  transformations of all traits [ $\log_2$ (DSCC),  $\log_2$  (PMN\_LYM) and  $\log_2$  (MAC)]. Results showed a heritability of the DSCC of 0,060 and of the SCS of 0,084, furthermore the genetic correlation between these two parameters was lower compared to that reported in other studies done on the Holstein Friesian, this underlines how these two characters reside in different traits of the genome and how the selection for the two traits is possible independently.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Le mastiti negli allevamenti in lattazione

### 1.1.1 Importanza economica della mastite

Con il termine mastite si intende una infiammazione a livello della ghiandola mammaria. Rappresenta una delle malattie più comuni, lesive e costose dell'allevamento intensivo degli animali in lattazione e, nonostante il continuo progredire delle misure di controllo, ancora ad oggi rimane una delle principali sfide a livello globale.

Oltre alle conseguenze dirette per la salute della vacca e il benessere della stessa, le mastiti hanno delle conseguenze nefaste dal punto di vista economico a causa delle spese ad esse associate, come le perdite produttive, i servizi veterinari, i farmaci, la diagnostica, la perdita di qualità del prodotto e le malattie ad esse correlate (Halasa et al., 2007). Ad incidere per più del 68% sui costi derivanti dalle mastiti è il calo di produzione lattea che è stimato attorno al 10% e che può essere temporaneo o permanente a seconda della gravità della mastite (Berry et al., 2004), inoltre il peggioramento delle qualità organolettiche si riflette in modo negativo sulla resa economica del latte in sede di vendita, mentre per quanto riguarda la resa in sede di lavorazione essa è minore a causa delle proprietà della coagulazione che risultano essere profondamente alterate nel latte mastitico (Bobbo et al., 2016). A tutti questi costi vanno aggiunte le spese per la prevenzione della mastite in allevamento come, ad esempio, il costo degli antibiotici durante la messa in asciutta, i disinfettanti per la mammella, i costi per i controlli degli apparecchi di mungitura e la manodopera extra per l'applicazione delle misure preventive (Yalcin, 2000).

A livello mondiale le stime riguardanti le perdite economiche causate dalle mastiti cliniche variano dai 61€ ai 97€ per singola bovina in allevamento per anno, con un grande divario da allevamento ad allevamento. Per quanto riguarda il singolo capo le perdite sono stimate mediamente attorno ai 210€, variando da 235€ per il primo mese di lattazione dopo il parto, a 164€ per i restanti mesi di lattazione (Hogeveen et al., 2011).

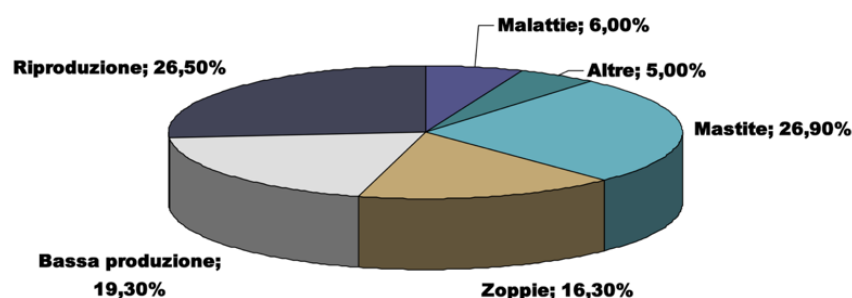
In Italia il costo medio totale di tutte le mastiti è pari a 318€ per capo allevato, mentre il costo medio della mastite clinica è pari a 177€ (Tabella 1); questo dato sottolinea sempre di più l'importanza delle mastiti subcliniche sui costi in allevamento (Zecconi et al., 2013).

**Tabella 1** Costi medi in € per caso di mastite clinica per i suoi diversi livelli di gravità (Zecconi et al., 2013).

| Mastite clinica |       |          |       |             |
|-----------------|-------|----------|-------|-------------|
|                 | Lieve | Moderata | Grave | Costo medio |
| Media           | 96    | 190      | 263   | 177         |
| Minimo          | 26    | 74       | 96    | 65          |
| Massimo         | 287   | 475      | 586   | 447         |

Negli Stati Uniti le perdite annuali causate dalla mastite sono stimate attorno ai 2 miliardi di dollari, rappresentando circa l'11% del valore totale del latte prodotto. Nel Regno Unito si stima un danno economico annuo pari a circa 300 milioni di sterline (Hillerton et al., 2005), mentre a livello mondiale le perdite per l'industria lattiero-casearia sono stimate attorno ai 32 miliardi di euro annui (Seegers et al., 2003).

Le mastiti, inoltre, sono ancora oggi una delle principali cause di riforma negli allevamenti di bovine da latte a causa di un calo della produttività e della longevità delle stesse (Figura 1). Le mastiti sono state riconosciute essere causa del 15% delle bovine riformate, negli Stati Uniti parliamo di ~9 milioni di bovine da latte e in Germania di ~4 milioni di bovine da latte (Schwarz, 2018). Inoltre, la resa delle carcasse degli animali riformati per mastite al macello è più bassa a causa dello stato di deperimento dovuto al malessere e alla conseguente minor ingestione di cibo, che porta ad un calo della copertura di grasso e delle riserve muscolari di glicogeno dell'animale (Hillerton et al., 2005).



**Figura 1** Principali cause di riforma nelle bovine da latte (USDA 2002)

## 1.1.2 Tipologie di mastite in allevamento

Le modalità con cui le mastiti possono manifestarsi sono essenzialmente ascrivibili a tre forme principali: clinica, subclinica e cronica. Nelle mastiti cliniche si osserva una risposta infiammatoria molto evidente sia a livello dei singoli quarti sia a livello della mammella nella sua interezza; si osserva principalmente gonfiore pronunciato, temperatura locale aumentata, arrossamento e dolore. Con il progredire della malattia si osservano anche aumento della temperatura corporea e modificazioni microscopiche e macroscopiche del latte prodotto, il quale può presentare un aspetto acquoso con fiocchi, grumi, pus o sangue. In relazione, dunque, alla gravità delle manifestazioni le mastiti cliniche possono essere a loro volta divise in lievi, moderate o gravi.

Le forme lievi (Tabella 2) rappresentano il 60-90% dei casi totali e constano principalmente in alterazioni a livello di secreto mammario, non si rilevano sintomi o segni né a livello locale né a livello sistemico; il secreto in queste forme risulta ridotto nella quantità e può presentare delle flocculazioni, ovvero presenza di materiale purulento o sieroso-emorragico. Le forme moderate rappresentano circa il 10-30% dei casi e sono caratterizzate da modificazioni a livello del secreto mammario che si associano ad alterazioni della ghiandola mammaria come turgore, indolenzimento, calore, presenza di noduli alla palpazione e ingrossamento dei linfonodi. Le forme gravi rappresentano circa il 5-20% delle mastiti cliniche e associano ai sintomi sopradescritti anche sintomi di carattere sistemico come febbre, anoressia, abbattimento e calo significativo della produzione (Arrigoni et al., 2014).

**Tabella 2** Gradi di mastite clinica e sintomi correlati (Zecconi et al., 2013).

| <b>Definizione</b> | <b>Alterazioni Latte</b> | <b>Alterazioni Quarto</b> | <b>Sintomi Sistemici</b> |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Lieve              | Presenti                 | Assenti                   | Assenti                  |
| Moderata           | Presenti                 | Presenti                  | Assenti                  |
| Grave              | Presenti                 | Presenti                  | Presente                 |



La diagnosi delle mastiti subcliniche è più difficoltosa in quanto il processo infiammatorio non raggiunge un livello tale da dare origine a manifestazioni cliniche macroscopicamente evidenti, né a livello del tessuto mammario, né a livello di secreto. Tuttavia, le alterazioni anche se non evidenti sono presenti e hanno come conseguenza il calo della produzione e anomalie a livello di composizione del latte.

Nelle mastiti croniche si ha una infezione mammaria persistente con una durata di più di quattro settimane accompagnata da un rialzo costante delle cellule somatiche (somatic cell count; SCC) con alterazioni morfologiche di varia gravità e alterazioni composizionali del secreto mammario. Le alterazioni morfologiche rispecchiano a grandi linee quelle viste in precedenza e comprendono la presenza di noduli, l'atrofia o l'ipertrofia della mammella o del singolo quarto colpito, indurimento o turgore. In alcune forme si può anche giungere alla formazione di ascessi multipli nel quarto colpito (Sali, 1980). Sia le mastiti cliniche che quelle subcliniche possono evolvere in mastiti croniche se perdurano troppo a lungo nel tempo o non vengono adeguatamente trattate, e questo chiarisce quale sia l'importanza della tempestività del trattamento.

### **1.1.3 Principali agenti di mastite**

Indipendentemente dal tipo di mastite, il modo con cui i patogeni provocano infezione è simile per tutti (Blowey et al., 2010):

- I. Arrivo di un reservoir dell'infezione
- II. Trasferimento dell'agente infettivo dal reservoir all'epitelio del capezzolo
- III. Penetrazione del patogeno all'interno del dotto papillare
- IV. Risposta dell'ospite
- V. Infezione

Gli agenti mastitogeni sono molteplici e appartenenti a più categorie quali batteri, micoplasmi, lieviti e alghe, tant'è che Watts nel 1988 ha identificato fino a 137 differenti organismi capaci di dare origine a mastite (Bradley, 2002).

Indipendentemente dalla loro natura i patogeni sono classicamente divisi in (Tabella 3) (Zecconi et al., 2013):

**Batteri Contagiosi** (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*, micoplasmi): i batteri contagiosi possono essere definiti come organismi che si sono adattati a vivere all'interno dell'ospite ed in particolare all'interno della mammella, che è il loro reservoir. La loro sopravvivenza nell'ambiente è molto difficile, in quanto estremamente vulnerabili, per cui le vie attraverso cui questi patogeni possono diffondersi sono direttamente da bovina a bovina o attraverso il latte e le procedure di mungitura, soprattutto se eseguite in modo non corretto; si tratta di patogeni che una volta entrati nel tessuto mammario presentano una elevata resistenza e prolificità, e questo li rende propensi allo sviluppo di mastiti anche di carattere sub-clinico che si manifestano attraverso un aumento della SCC (Bradley, 2002).

**Batteri Ambientali:** i batteri ambientali invece riescono a sopravvivere nell'ambiente esterno e sono descritti come invasori opportunisti della ghiandola mammaria non adatti a sopravvivere all'interno dell'ospite (Bradley, 2002). In questo gruppo comprendiamo sia Streptococchi (diversi da *Str. agalactiae*) sia batteri Gram negativi. Gli Streptococchi comprendono le sottocategorie: *Str. uberis*, *Str. bovis*, *Str. faecalis*, *Str. dysgalactiae*, *Str. canis* e diversi altri. I Gram negativi comprendono le sottocategorie: *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., e altri meno frequenti (Zecconi et al., 2013). Il trasferimento di questi agenti infettivi dal reservoir, che in questo caso è rappresentato dall'ambiente esterno, non avviene durante la mungitura, ma piuttosto nel lasso di tempo che intercorre tra due mungiture a seguito del contatto diretta con la mammella. Il loro potere patogeno aumenta quando aumenta la loro concentrazione nell'ambiente o quando si ha un calo delle difese dell'ospite.

**Batteri opportunisti:** I batteri cosiddetti opportunisti (Stafilococchi coagulasi negativi, SCN) fanno parte della normale flora presente sulla cute sana dei capezzoli, tuttavia, questi microrganismi possono sopravvivere e moltiplicarsi anche nelle lettiere. In questo gruppo comprendiamo le numerose specie di Stafilococco che non vengono classificati come *S. aureus*, le più frequenti sono: *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, e *S. haemolyticus*. Questo gruppo di batteri è quello che più frequentemente viene isolato nei campioni di latte, tuttavia la loro importanza come agenti di mastiti subcliniche o cliniche è tutt'oggi limitata ad alcune aziende, probabilmente come conseguenza di impianti di mungitura inadeguati e procedure di mungitura igienicamente non appropriate (es. disinfezione del capezzolo) (Zecconi et al., 2013).

Oltre a queste tre categorie esistono varie tipologie di patogeni in grado di dare origine a mastiti più o meno gravi, tra questi ricordiamo:

**Lieviti e Muffe:** I lieviti e le muffe sono talvolta isolati da campioni di latte. Se per le muffe è nota la patogenicità, per i lieviti la materia è più controversa.

Nel caso delle muffe queste determinano patologie gravi, difficilmente curabili, ma le segnalazioni sono rare, e questi rari focolai, sono spesso riconducibili ad una contaminazione della mammella per procedure non igieniche. In particolare, la maggior parte di queste infezioni avviene in concomitanza con i trattamenti antibiotici endo-mammari, soprattutto alla messa in asciutta, quando vengono fatti senza seguire le più elementari norme igieniche. In questi casi, con il prodotto antibiotico vengono introdotti anche patogeni, naturalmente resistenti ai principi attivi usati per la terapia delle mastiti.

Nel caso dei lieviti, al di là della loro capacità potenziale di dare mastite, si è osservato che gli isolamenti sono molto più frequenti a seguito di ripetuti trattamenti per mastite clinica. In tal caso non si deve ritenere che il “lievito” isolato sia la causa della forma clinica, piuttosto che sia uno dei batteri “sopravvissuto” al trattamento e che ha trovato un ambiente favorevole al suo sviluppo, non essendoci altri competitori. Va inoltre ricordato che i lieviti, con una valutazione diagnostica grossolana, sono facilmente confondibili con *Prototheca* e vi è quindi una concreta possibilità che alcune segnalazioni di mastiti da lieviti del passato fossero errate (Zecconi et al., 2013).

**Prototheca:** *Prototheca* è un'alga di cui esistono cinque diverse specie. Tuttavia, solo *P. wickerhamii* e *P. zopfii* sono ritenute responsabili di infezioni negli animali e nell'uomo. Sebbene siano venuti alla ribalta solo recentemente, questi microrganismi sono molto diffusi negli allevamenti di bovine da latte e sono presenti da tempo. La loro carica ambientale aumenta in presenza di cattiva igiene e di elevati tassi di umidità. Queste alghe possono inoltre vivere e moltiplicarsi nel tratto intestinale del bovino di tutte le età e le feci sono quindi il veicolo principale di diffusione di *Prototheca* nell'allevamento, una volta che vi è entrata.

Le mastiti da *Prototheca* sono caratterizzate da un innalzamento consistente delle cellule somatiche, spesso senza manifestazioni cliniche, ma che evolvono in forme croniche. L'andamento delle infezioni nei diversi allevamenti è variabile e dipende dalle condizioni dell'allevamento, ma anche dalle caratteristiche patogenetiche dei microrganismi. Purtroppo, non sono disponibili terapie efficaci e l'unica soluzione è l'eliminazione dell'animale, anche al fine di ridurre il numero degli animali eliminatori nell'ambiente (Zecconi et al., 2013).

**Tabella 3** Principali agenti di mastite e loro caratteristiche (Zeccoli et al., 2013)

| <b>Gruppo</b> | <b>Specie</b>                                   | <b>Serbatoio Prevalente</b> | <b>Frequenza In Italia</b> | <b>Mastite Prevalente</b>               |
|---------------|---|-----------------------------|----------------------------|---|
| Contagiosi    | <i>Staph. aureus</i>                            |                             | >30%                       | Subclinica                              |
|               | <i>Str. agalactiae</i>                          | Mammella bovina infetta     | 5-20%                      | Subclinica                              |
|               | <i>C. bovis</i>                                 |                             | >20%                       | Latente                                 |
|               | <i>Mycoplasma</i> spp.                          |                             | <1%                        | Clinica                                 |
| Ambientali    | Streptococchi diversi da <i>Str. agalactiae</i> | Ambiente (Lettiera)         | 30% circa                  | Clinica lieve e moderata                |
|               | <i>E. coli</i> e altri Gram-                    |                             | 10% circa                  | Clinica grave                           |
| Opportunisti  | Stafilococchi coagulasi negativi                | Cute capezzolo              | 40% circa                  | Latente                                 |
|               | Muffe e lieviti                                 | Ambiente contaminato        | <1%                        | Clinica                                 |
| Altri         | <i>Prototheca</i>                               | Feci, ambiente              | <5%                        | Subclinica con elevato rialzo cellulare |

È doveroso precisare che lo sviluppo o meno di una patologia e la gravità con cui questa patologia si manifesta non sono determinate unicamente dall'agente eziologico, ma un ruolo molto importante è ricoperto dallo stato dell'ospite. La risposta immunitaria nella ghiandola mammaria è difatti influenzata da una serie di fattori legati all'ospite come il background genetico (Griesbeck-Zilch et al., 2009), lo stato metabolico dell'animale, che è responsabile di rischi particolarmente alti in determinati stadi della lattazione, e anche il livello della SCC prima dell'infezione (Bruckmaier et al., 2017).

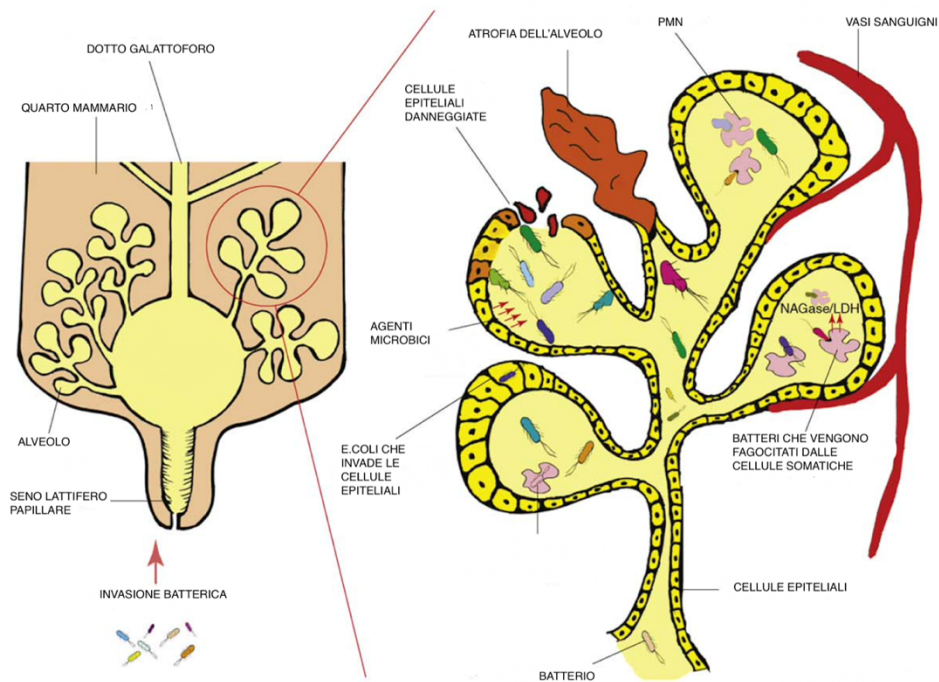
### 1.1.4 Difesa immunitaria della ghiandola mammaria

Nella maggior parte dei casi lo sviluppo di un'infezione a livello della ghiandola mammaria prevede che l'agente causale penetri attraverso il dotto papillare; il primo ostacolo che un patogeno incontra nel suo percorso è dunque di carattere strettamente anatomico. Per questa ragione l'estremità terminale del capezzolo è considerata essere la prima linea di difesa contro i patogeni invasori (Sordillo et al., 1997). L'estremità del capezzolo contiene dei muscoli sfinteri che mantengono una chiusura serrata tra una lattazione e l'altra e ostacola la penetrazione dei patogeni, un aumento di pervietà di questi muscoli è direttamente correlato ad un aumento dei casi di mastite (Murphy et al., 1953).

Il dotto papillare inoltre è rivestito al suo interno di cheratina, cruciale per il mantenimento della funzione di barriera del capezzolo. La rimozione di cheratina è stata correlata ad un incremento della suscettibilità verso le invasioni e le colonizzazioni batteriche (Bramley et al., 1984).

Indipendentemente dal tipo di patogeno, le modalità con cui questi penetrano nella ghiandola attraverso il dotto papillare sono sostanzialmente due: la crescita diretta attraverso il dotto papillare e la propulsione lungo il dotto. Dopo essere giunti sull'estremità del capezzolo gli organismi contagiosi, ed in particolare *Staphylococcus Aureus* e *Streptococcus Agalactiae*, grazie a dei forti fattori di adesione cominciano il loro attacco alla mammella stabilendo prima una colonia sul capezzolo e poi moltiplicando e crescendo letteralmente lungo il canale mammario fino al tessuto ghiandolare (Blowey et al., 2010). I patogeni che non hanno forti proprietà adesive, ed in particolare quelli ambientali come *E. coli*, vengono forzati a procedere lungo il canale, di solito con il flusso retrogrado del latte che avviene per esempio quando l'estremità della mammella impatta contro le superfici (Blowey et al., 2010).

Una volta superata la barriera fisica rappresentata dallo sfintere (Figura 2), i patogeni devono superare i meccanismi di difesa della ghiandola mammaria per poter dare origine alla malattia. La ghiandola mammaria è protetta da una varietà di meccanismi di difesa che possono essere separati in due categorie distinte dell'immunità: i) innata (o non specifica) e ii) adattativa. La loro azione sinergica garantisce una protezione efficace dalle infezioni (Sordillo et al., 1997).



**Figura 2** Rappresentazione schematica dello sviluppo di una mastite in una mammella infetta (Viguiet et al., 2009)

L'immunità innata, o non specifica, comprende l'intervento di cellule come macrofagi, neutrofilo, natural killer (NK) e fattori solubili (Sordillo et al., 1997). I composti solubili sono diretti specificatamente contro i microrganismi patogeni e possono essere di diversa origine: possono essere sintetizzati direttamente dalla ghiandola mammaria (lattoferrina e lisozima) oppure possono essere trasferiti nel latte dal sangue (immunoglobuline e complemento) (Bruckmaier et al., 2017). L'efficacia dell'immunità innata è condizionata dal numero di esposizioni, risulta infatti più efficiente dopo esposizioni ripetute allo stesso agente patogeno e questo grazie alla memoria linfocitaria (Sordillo et al., 1997). Solamente se i patogeni aggirano il sistema dell'immunità innata allora l'immunità adattativa assume importanza: le componenti dell'immunità adattativa riconoscono specifici determinanti antigenici dei patogeni e sono principalmente rappresentate da linfociti e immunoglobuline (Bruckmaier et al., 2017).

L'azione dell'immunità innata inizia quando specifici recettori (pattern recognition receptors) sulle cellule della superficie o dentro specifiche cellule (i macrofagi) riconoscono particolari molecole poste sui microrganismi; queste molecole sono delle sequenze conservate che sono condivise da gruppi di microrganismi [pathogen-associated molecular patterns (PAMP)]. Non appena i pattern recognition receptors incontrano le molecole PAMP inizia un percorso di segnalazione che stimola i meccanismi di difesa dell'ospite (Bruckmaier et al., 2017).

Nell'ambito dell'immunità specifica quindi, i macrofagi rivestono un ruolo fondamentale nella processazione e nella presentazione dell'antigene (Fitzpatrick et al., 1992).

I macrofagi, dunque, insieme alle cellule epiteliali iniziano la risposta infiammatoria necessaria per eliminare i patogeni invadenti; essi rilasciano dei chemioattrattori per il rapido reclutamento dei leucociti neutrofili polimorfonucleati (PMN) nel focolaio di infezione. L'inizio della reazione infiammatoria è innescato dalla produzione e dal rilascio di tumor necrosis factor (TNF), interferone e interleuchine. Il risultato di queste complesse interazioni è l'accumulo dei PMN la cui capacità di fagocitare è il sistema di difesa più efficace contro le infezioni batteriche. Perché la fagocitosi avvenga è necessario il riconoscimento tra i batteri e i PMN che è reso possibile dal complemento e dalle immunoglobuline. Una volta che il batterio viene legato alla superficie dei PMN, dei potenti ossidanti come il perossido di idrogeno, il superossido e radicali ossidrilici sono rilasciati per colpire e uccidere il patogeno. Questi potenti ossidanti non distruggono però solo il batterio ma danneggiano anche i tessuti intorno risultando un'arma a doppio taglio. Dopo il rilascio di queste sostanze la maggior parte dei PMN muore e viene rimossa dai macrofagi per minimizzare il danno ai tessuti (Paape et al., 2002). I PMN rappresentano il tipo cellulare predominante durante le prime fasi dell'infiammazione costituendo anche il 90% del totale dei leucociti presenti nella ghiandola mammaria (Sordillo et al., 1988).

I linfociti sono le uniche cellule del sistema immunitario che riconoscono gli antigeni attraverso recettori di membrana che sono specifici per i vari patogeni. Ci sono due diverse categorie di linfociti che differiscono per funzione e proteine prodotte: i linfociti T e i linfociti B. I linfociti T possono a loro volta essere suddivisi nei linfociti T  $\alpha\beta$ , che includono i linfociti T CD4+ (T-helper) e CD8+ (linfociti T citotossici). A seconda dello stadio di lattazione e della localizzazione tissutale la percentuale di queste cellule può variare notevolmente. I linfociti T-helper producono citochine in risposta al riconoscimento del complesso antigene-MHC sui linfociti B e sui macrofagi; attraverso queste citochine essi giocano un ruolo importante nell'attivare i linfociti T, i linfociti B, i macrofagi e varie altre cellule che partecipano alla risposta immunitaria (Sordillo et al., 1997). Tra i linfociti, i CD8+ sono i più rappresentati sia nei tessuti sia nelle secrezioni delle ghiandole mammarie sane: a differenza del sangue, dove il rapporto CD4+/CD8+ è  $>1$ , nella mammella questo rapporto è  $<1$  (Mehrzhad et al., 2008), questo perché i linfociti T citotossici sono in grado di riconoscere le cellule self alterate tra cui le cellule secretorie alterate la cui presenza potrebbe aumentare la suscettibilità della ghiandola mammaria alle infezioni (Taylor et al., 1994).

### 1.1.5 Metodi di riscontro di mastite nel latte

Per millenni lo stretto contatto fisico comportato dalla mungitura a mano ha permesso il facile riscontro di anomalie del latte e della ghiandola mammaria, ma limitata era la conoscenza sulla causa o sulla gestione delle mastiti (Ruegg, 2017). Ad oggi questo contatto fisico è sempre meno diffuso e il rilevamento delle mastiti è affidato ad analisi microbiologiche, soprattutto sul latte.

Pur continuando ad essere i metodi più precisi ed affidabili, la reazione a catena della polimerasi (PCR) e l'esame batteriologico presentano delle peculiarità per quanto riguarda tempistiche e costi che li rendono inadatti per una rapida e routinaria diagnosi applicabile alla zootecnica odierna. Per ovviare a questo problema sono state sviluppate varie metodologie rapide di modo da portare la diagnosi ad essere sempre più rapida e precoce con l'obiettivo di poter essere sempre più tempestivi nella gestione delle mastiti. I principali metodi utilizzati ad oggi sono riportati nella Tabella 4. Nel corso degli anni sono stati sviluppati vari metodi diagnostici applicabili sul latte abbinando rapidità ed economicità, come la valutazione della conducibilità elettrica o il California Mastitis Test, tuttavia ad oggi il metodo più usato e che offre la maggiore affidabilità è la conta delle cellule somatiche (SCC).

**Tabella 4** Principali metodi per il rilevamento delle mastiti (Viguiet et al., 2009; Bradley et al., 2012)

| Test                                | Sensibilità stimata, % | Specificità stimata, % | Tempo per il risultato | Luogo di esecuzione  |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| Ispezione del latte o della bovina  | 80                     | 100                    | secondi                | In campo             |
| SCC                                 | 75                     | 75                     | minuti                 | In campo/laboratorio |
| California mastitis test (CMT)      | 75                     | 75                     | secondi                | In campo             |
| Conducibilità T° latte              | 80                     | 70                     | secondi                | In campo             |
| Valutazione della produzione lattea | 20-40                  | bassa                  | secondi                | In campo             |
| Proteine di fase acuta              | -                      | -                      | minuti                 | Laboratorio          |
| LDH                                 | -                      | -                      | minuti                 | Laboratorio          |
| Test colturali                      | alta                   | alta                   | giorni                 | Laboratorio          |
| Delaval cell counter                | alta                   | alta                   | minuti                 | Laboratorio          |
| Portachek                           | -                      | -                      | minuti                 | In campo             |



## 1.2 Cellule somatiche

La conta delle cellule somatiche è un metodo quantitativo per la diagnosi e il controllo delle mastiti, che ancora ad oggi sono il maggior problema che interessa gli allevamenti con animali in lattazione sia in termini di costi attivi in farmaci e medicazioni, sia in termini di perdite di produzione, di qualità del latte e di perdita precoce di animali.

Il termine “cellule somatiche” venne elaborato da Prescott e Breed nel 1910, quando si pensava ancora che il rialzo di cellule che si osserva nel latte di un animale con mastite fosse causato da un maggiore sfaldamento delle cellule epiteliali che si staccavano dagli alveoli mammari. Oggi le cellule somatiche vengono ancora chiamate in questo modo ed indicano le componenti cellulari del latte che subiscono un notevole aumento in caso di mastite, nonostante sia stato dimostrato che si tratta prevalentemente di neutrofili provenienti dal sangue (Zecconi, 2007). Le cellule somatiche comprendono in porzioni variabili: i macrofagi, i linfociti, i polimorfonucleati (PMN) e, solo in minima parte, le cellule epiteliali (Paape et al., 2002).

L’infezione mammaria provoca un afflusso di leucociti dal sangue, a cui si affianca l’alterazione della funzionalità secretoria delle cellule mammarie e il conseguente cambiamento nel volume e nella composizione del latte, di cui le cellule somatiche sono un fedele indice (Zecconi, 2007).

La presenza di cellule nel latte è uno dei meccanismi protettivi più importanti della ghiandola mammaria e viene considerata come una sorta di sorveglianza della ghiandola mammaria non infetta. Macrofagi e PMN sono cellule fagocitarie che inglobano e uccidono gli agenti patogeni, i linfociti svolgono invece un ruolo chiave nella reazione immunitaria che segue l’iniziale risposta all’infezione (Harmon, 2001).

Per questo motivo la conta delle cellule somatiche è usata in tutto il mondo come indicatore dello stato di salute della mammella degli animali in lattazione e per controllare indirettamente la qualità del latte (Alhussien et al., 2018), difatti si osserva una correlazione tra la presenza di una elevata SCC e modificazioni fisico-chimiche del latte, conta batterica e stato infiammatorio della ghiandola mammaria (Li et al., 2014). Nelle bovine in lattazione un alto numero di cellule somatiche può essere indicatore di mastiti subcliniche (Alhussien et al., 2018; Sharma et al., 2011), bassa qualità del latte (Auld et al., 1998; Li et al., 2014), scarsa capacità di coagulazione del latte (Ikonen et al., 2004; Stocco et al., 2019), ridotta resa casearia e recupero dei nutrienti del latte nella cagliata (Leitner et al., 2004; Bobbo et al., 2016).

Le cellule somatiche variano con lo stato di lattazione, l'età, lo stress degli animali, il momento e frequenza di mungitura, e la stagione, ma primariamente in risposta ad una infezione della mammella (Dohoo et al., 1982). Il maggior fattore, dunque, che influenza il numero di cellule somatiche (SCC) nel latte è l'insorgenza di infezioni mammarie: un animale sano, infatti, ha un numero di cellule somatiche sicuramente inferiore alle 200.000/mL (Zecconi, 2007). Uno studio (Heberhart et al., 1979) ha stimato che il 50% delle vacche non infette ha un SCC inferiore a 100.000/mL, mentre l'80% inferiore a 200.000/mL. Nel corso di una infezione intra-mammaria, la SCC può subire un notevole incremento raggiungendo anche  $10^6$  per ml di latte nel corso di poche ore (Persson et al., 1992). È comunemente accettato che la soglia oltre la quale i normali processi di difesa cellulare all'interno della ghiandola mammaria danno origine ad una reazione infiammatoria è a livelli di più di 100.000 cellule/ml (Harmon, 1994), mentre quando la SCC è superiore a 200.000 cellule/ml la ghiandola è considerata infetta e quindi mastitica (Li et al., 2014). Possiamo osservare innalzamenti cellulari "puntiformi", ovvero per un giorno o due, in seguito a stimoli infiammatori sulla mammella, ad esempio in relazione ad una mungitura incompleta, traumi lievi, utilizzo di prodotti irritanti ecc., ma tali fenomeni sono di brevissima durata e molto spesso passano inosservati. Al contrario, aumenti cellulari che persistono per più giorni e che sono rilevabili ai normali controlli sul latte individuale o di massa sono un chiaro e inequivocabile segno di infezione mammaria (Zecconi et al., 2013).

Test regolari per le SCC associati a programmi di monitoraggio per la salute della mammella hanno un'influenza positiva sostanziale sul singolo animale così come sull'intera mandria (Barkema et al., 1998). Misurare le cellule somatiche dell'animale significa monitorare il singolo capo e valutare l'eventuale insorgenza di infezione intramammaria. Misurare le cellule somatiche nel latte del tank, invece, può servire per stimare la qualità della produzione aziendale e valutare la necessità di un intervento qualora siano superati i limiti prestabiliti (Zecconi, 2007).

A conferma dell'importanza che la SCC ha assunto nel tempo per via della diffusione e del largo utilizzo vi è il fatto che essa è un parametro utilizzato anche a livello legislativo.

I valori di SCC oltre i quali il latte di massa è considerato idoneo per il consumo umano variano da paese a paese con una forbice piuttosto ampia (Alhussien et al., 2018):

- Unione Europea, Cina, Nuova Zelanda, Australia e Canada < 300.000-400.000 cellule/ml
- Sudafrica e Brasile < 500.000 cellule/ml
- U.S.A < 750.000 cellule/ml

Per quanto riguarda l'Unione Europea nel latte individuale il limite consigliato è di  $2 \times 10^5$ , mentre per il latte di massa quando la SCC, calcolata come media geometrica di almeno un campione al mese per tre mesi successivi, è superiore a  $4 \times 10^5$  cellule/ml il latte è considerato non idoneo al

consumo umano [Regolamento (CE) 853-854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio]. Occorre ricordare che in termini generali ed in particolare per le mandrie di elevate dimensione l'obiettivo reale, e redditizio, per questo parametro è il mantenimento costante nel corso dell'anno al di sotto di 200.000 cellule/ml.

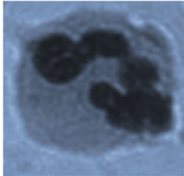
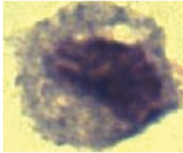
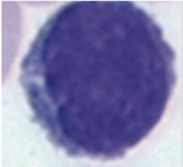
Ricordiamo che è generalmente accettato che la reazione infiammatoria cominci a livelli di SCC > 100.000 cellule/ml e che la International Dairy Federation nel 2013 raccomanda una soglia di SCC pari a 200.000 cellule/ml per differenziare tra una mammella sana e una mastitica, mentre la German Veterinary Society (DVG, 2002) suggerisce un valore < 100.000 cellule/ml per definire un quarto di mammella sano. Tuttavia, un inaspettato numero di patogeni mastitici è stato riscontrato in ghiandole mammarie con SCC < 100.000 cellule/ml, in alcuni casi i patogeni sono stati riscontrati in campioni di latte provenienti da vacche con una SCC di 1.000 cellule/ml (Schwarz et al., 2011).

## **1.3 Cellule somatiche differenziali**

La conta delle SCC rappresenta probabilmente il metodo più pratico e sostenibile per monitorare la salute della mammella nelle vacche in lattazione, tuttavia esso non ha la stessa accuratezza delle analisi microbiologiche (Sargeant et al., 2001; Ferronato et al., 2018) ed in particolare nonostante sia un metodo quantitativo affidabile non divide le cellule presenti nel latte nelle differenti tipologie cellulari (Rivas et al., 2001). Per ovviare a questo problema in aggiunta alla SCC è stato stabilito uno specifico parametro detto conta delle cellule somatiche differenziali (differential somatic cell count; DSCC).

La DSCC è un parametro per il controllo delle mastiti che prevede la proporzione combinata di due delle popolazioni cellulari del latte ovvero i linfociti e i PMN. Inoltre, la proporzione dei macrofagi può essere calcolata sottraendo le DSCC dal 100% (Damm et al., 2017).

Queste tipologie cellulari giocano un ruolo importante nella risposta infiammatoria all'interno della ghiandola mammaria (Paape et al., 1979) e ognuna ha un ruolo diverso (Figura 3): i) i linfociti regolano l'induzione e la soppressione della risposta immunitaria, e ii) i macrofagi sono cellule fagocitiche attive capaci di ingerire batteri, rifiuti cellulari e componenti del latte accumulate (Sordillo et al., 1997), mentre il compito principale dei PMN è la difesa contro i batteri all'inizio di un processo infiammatorio acuto (Paape et al., 1979). Durante le varie fasi dell'infiammazione sia le SCC che le DSCC cambiano (Nickerson, 1989) e le modificazioni riguardo l'entità di queste differenti popolazioni cellulari in base alle condizioni di salute della mammella sono collegate allo stato infiammatorio della ghiandola mammaria in quel momento (Sarikaya et al., 2005; Alhussien et al., 2015).

| PARAMETRI  | NEUTROFILI   | MACROFAGI   | LINFOCITI  |
|--|--|---|--|
| LEUCOCITI NEL LATTE BOVINO A 100X (MICROSCOPIO OLYMPUS IX51) |  |  |  |
| CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE                                 | DIAMETRO 12-15 µm, NUCLEO MULTILOBATO CON PONTI                                    | DIAMETRO 20-30 µm, LA TIPOLOGIA CELLULARE PIÙ GRANDE NEL LATTE                      | DIAMETRO 9-16 µm, NUCLEO DENSO E TONDEGGIANTE CON POCO CITOPLASMA                    |

**Figura 3** Caratteristiche morfologiche dei leucociti nel latte (Alhussien et al., 2018)

A causa delle specifiche funzioni delle singole popolazioni cellulari, la distribuzione dei linfociti tra il latte normale e il latte mastitico cambia (Nickerson, 1989). In una ghiandola mammaria non infetta la SCC è bassa ed è composta soprattutto da macrofagi e linfociti (Schwarz et al., 2011), mentre in caso di risposta infiammatoria si può riscontrare un incrementato trasferimento di PMN dal sangue alla ghiandola mammaria nelle prime fasi dell'infiammazione (Kehrli et al., 1994; Paape et al., 2002) motivo per cui i PMN sono stati descritti come la componente cellulare predominante nelle ghiandole mammarie malate (Paape et al., 1979; Kehrli et al., 1994), difatti nel latte proveniente da bovine mastitiche la proporzione dei PMN può raggiungere il 95% (Paape et al., 1979; Kehrli et al., 1994).

La distribuzione delle varie tipologie linfocitarie varia nel latte normale senza alcun segno di mastite con ampie oscillazioni: la percentuale dei linfociti può andare dal 14% all' 80%, quella dei macrofagi dal 12% al 46% e quella dei PMN tra il 6% e il 50% (Rivas et al., 2001; Merle et al., 2007; Koess et al., 2008). Occorre però ricordare che c'è discordanza di opinioni su quale popolazione cellulare sia la più numerosa nel latte sano, secondo alcuni autori i macrofagi sarebbero la popolazione cellulare predominante (Riollet et al., 2001; Lindmark-Mansson et al., 2006), mentre secondo altri sarebbero i linfociti (Schwarz et al., 2011).

Inoltre, le percentuali delle varie popolazioni cellulari possono variare a seconda di quale frazione del latte escreto è stata campionata, difatti i macrofagi risultano essere più numerosi a livello della cisterna mentre i PMN risultano essere più numerosi a livello alveolare (Sarikaya et al., 2005).

Questa distribuzione rispecchia l'organizzazione difensiva della mammella: la presenza dei macrofagi, che sono potenti fagociti, è a livello di cisterna ovvero la parte più a contatto con l'esterno e dove il latte permane più a lungo, di modo da poter da poter indurre il reclutamento dei PMN dopo il riconoscimento di patogeni invasori, mentre i PMN, molto efficienti in termini di difesa, sono predominanti a livello alveolare (Sarikaya et al., 2005).

Analisi statistiche riguardo alla correlazione tra SCC e DSCC (Schwarz et al., 2011) hanno dimostrato che esiste una correlazione negativa tra la SCC e la percentuale di linfociti, mentre esiste una correlazione positiva tra la SCC e la percentuale di PMN. Sempre la stessa analisi ha rivelato non esserci correlazioni significative tra la SCC e la percentuale di macrofagi. Sostanzialmente l'incremento percentuale di una delle popolazioni cellulari causa il decremento di almeno una delle altre popolazioni (Schwarz et al., 2011).

Sia la SCC che la DSCC crescono in maniera evidente quando viene indotta una mastite. Curiosamente, la DSCC cresce in modo significativo anche quando l'incremento della SCC osservato è moderato (Schwarz, 2018). I valori di DSCC, dunque, permettono di dare una valutazione più dettagliata della salute della mammella soprattutto in quei casi in cui la SCC è bassa e la mammella sarebbe altrimenti considerata sana. Da ciò si evince il potenziale delle DSCC per l'individuazione delle mastiti sub-cliniche.

Uno dei maggiori problemi legati alla diffusione e alla persistenza delle mastiti nelle mandrie in lattazione sono le mastiti sub-cliniche, una condizione in cui la mammella e il latte appaiono normali nonostante la ghiandola mammaria sia infiammata, infetta o entrambe. Le vacche affette da mastiti sub-cliniche agiscono inoltre come reservoir per i batteri divenendo un silente diffusore di mastite nella mandria (Halasa et al., 2007).

Emerge quindi l'importanza che assume la DSCC per individuare la patologia già nelle primissime fasi e prima che diventi manifesta o contagi gli altri membri della mandria, poiché spesso animali classificati come sani tramite la SCC possono essere riconosciuti malati tramite la DSCC.

Il progressivo decremento dei valori medi di SCC negli allevamenti da latte in tutto il mondo compromette ancora di più l'accuratezza della SCC come marker di mastiti subcliniche (Piccinini et al., 2005; Zeconi et al., 2019).

Il numero di cellule disponibile per determinare la DSCC dipende chiaramente dalla SCC, e per ottenere un sufficiente livello di accuratezza, il range dei valori per questo metodo è stato stabilito essere tra 50.000 e 1.500.000 cellule/ml (Damm et al., 2017). Tuttavia, recenti studi hanno analizzato la DSCC in quarti di mammella classificati come sani, ovvero aventi SCC < 100.000 cellule/ml, e hanno dimostrato come la reazione infiammatoria fosse riscontrabile a livelli di SCC > 9.000 cellule/ml in virtù della predominante proporzione dei PMN nel quarto corrispondente (Schwarz et al., 2011).

## **1.4 Effetti della SCC e della DSCC sulla produzione e qualità del latte**

Le mastiti, siano esse clinicamente manifeste o subcliniche, sono prima di tutto delle patologie a carico di un organo deputato alla lattogenesi e alla galattopoiesi, è quindi inevitabile che uno stato patologico della ghiandola mammaria si rifletta sulla produzione e sulla qualità del latte. Le infezioni della ghiandola mammaria da parte di patogeni batterici danno origine a un decremento della produzione lattea e a cambi composizionali (Harmon, 1994) che riflettono il grado di danneggiamento causato dal patogeno alle cellule e al complesso dei capillari sanguigni (Schultz, 1977). Appare dunque evidente come la SCC, parametro direttamente collegato con lo stato di salute della mammella, sia collegato anche alle modificazioni in termini di produzione e qualità del latte: un'elevata SCC nel latte è associata ad una alterata qualità delle proteine, cambiamenti in termini di composizione degli acidi grassi, di lattosio, di concentrazione di ioni e minerali, di incrementata attività enzimatica ed a un pH più elevato nel latte crudo (Auld et al., 1996; Coulon et al., 2002).

Le perdite in produzione latte associate a mastiti clinicamente manifeste sono rapidamente evidenti, non così evidenti sono invece le perdite dovute a mastiti subcliniche o latenti (Schultz, 1977); le mastiti subcliniche difatti sono sempre correlate ad una bassa produzione latte (Bramley, 1992; Harmon, 1994), cambiamenti nella densità del latte, ridotta possibilità di effettuare una corretta lavorazione del latte, basso contenuto di proteine e alto rischio per l'igiene del latte dovuto alla possibile presenza di patogeni (Sharma et al., 2011). La DSCC assume dunque un ruolo fondamentale sia per la individuazione precoce delle mastiti subcliniche sia perché ad essa sono associati cambi composizionali, studi recenti (Stocco et al., 2020) hanno riscontrato infatti che le modificazioni nella composizione del latte sono associate a differenti livelli di DSCC. Esistono due meccanismi che avvengono in caso di eventi patologici per spiegare i cambiamenti nella composizione del latte associati a mastiti ed elevate SCC: il primo è un danno alle cellule della mammella che riduce la sintesi di quelle componenti del latte che vengono sintetizzate direttamente all'interno della mammella; un tipico esempio sono il lattosio e la maggior parte delle caseine. Il secondo è il cambio nella permeabilità dei tessuti, sia dell'epitelio ghiandolare che di quello vascolare, che permettono un aumentato passaggio di componenti dal sangue al latte; un esempio tipico esempio sono il sodio, il cloruro e le immunoglobuline (Schultz, 1977).

La concentrazione totale delle proteine nel latte non cambia in modo significativo al salire dei livelli di infezione della ghiandola mammaria e quindi della SCC (Haenlein et al., 1973). Tuttavia, un quadro diverso emerge quando ciascuna delle diverse proteine è esaminata (Kitchen, 1981).

Al salire della SCC le proteine sintetizzate maggiormente all'interno della ghiandola mammaria ( $\alpha$ -caseina,  $\beta$ -caseina,  $\alpha$ -lattoalbumina e  $\beta$ -lattoglobulina) risultano diminuire, mentre altre proteine apparentemente originanti dal sangue [sieroalbumina bovina (BSA) e immunoglobuline (IgGs)] aumentano (Haenlein et al., 1973). Vi è dunque un approssimativo bilanciamento tra l'incremento di alcune proteine e il decremento di altre per cui la concentrazione finale totale delle proteine rimane indicativamente allo stesso livello (Schultz, 1977).

In aggiunta all'incrementato traffico cellulare attraverso la barriera emato-mammaria, un elevato numero di componenti del siero passa nel latte durante l'infiammazione (Wickstrom et al., 2009).

Le maggiori proteasi tipiche del latte sono la plasmina e il suo zimogeno ovvero il plasminogeno, ed entrambe passano nel latte (Bastian et al., 1996). Nel latte il plasminogeno è attivato in plasmina catalizzando l'idrolisi della  $\beta$ -caseina (Wickstrom et al., 2009). I PMN contengono l'urochinasi e gli attivatori di plasmina tissutale che incrementano l'attività proteolitica (Haddadi et al., 2006). I PMN inoltre contengono una serie di proteinasi intra-cellulari tra le quali l'elastasi, le catepsine (B, D, e G) e le metalloproteinasi di matrice, che possono idrolizzare le caseine (Haddadi et al.,

2006) e compromettere quindi la qualità e la resa dei prodotti dando, oltre a ciò, una ridotta durabilità del latte liquido ed una ridotta resa casearia (Leitner et al., 2008).

Il latte con un'alta SCC ha dunque un contenuto minore in caseina, giustificato sia da una minore sintesi delle componenti specifiche del latte sia da un incremento degli enzimi proteolitici provenienti dal siero e/o dalle cellule somatiche (Wickstrom et al., 2009). È stato inoltre dimostrato che le proteine e le caseine diminuiscono significativamente a livelli di DSCC molto alti (>78,5%), mentre l'indice delle caseine è stato influenzato quando la DSCC era in combinazione con un'alta o bassa SCC (Stocco et al., 2020).

In concomitanza con il sussistere di mastiti subcliniche il contenuto di grasso nel latte cala: le perdite riportate in contenuto di grasso si attestano attorno al 10% e sono generalmente minori di quelle di lattosio e caseina che invece si attestano attorno al 15%. Questo calo nel contenuto di grasso può essere spiegato dalla ridotta sintesi del grasso stesso a causa del danno alle cellule secretorie (Schultz, 1977). In aggiunta al calo nel contenuto totale di grasso, esistono anche dei cambiamenti nella composizione dei grassi stessi associati ad una elevata SCC (Schultz, 1977): gli acidi grassi a catena corta e gli acidi grassi C18:1 (acido vaccenico) aumentano mentre gli acidi grassi C16:0 (acido palmitico) e C18:0 (acido stearico) diminuiscono, è stato inoltre riportato che il contenuto di fosfolipidi nel latte con elevata SCC è alquanto minore, mentre avviene un incremento nell'attività della lipasi e nel contenuto di acidi grassi liberi (FFA) (Randolph et al., 1974; Erwin et al., 1975). L'alta concentrazione degli FFA è stata riconosciuta essere una delle maggiori cause del fatto che in caso di mastite il latte pastorizzato risulta avere una minore conservabilità ed un calo delle qualità sensoriali (Ma et al., 2000). Anche il contenuto di fosfolipidi nella membrana del globulo di grasso risulta minore e questo può ridurre la resistenza del grasso stesso dalla lipolisi (Erwin et al., 1975). La concomitante presenza del calo dei fosfolipidi e dell'incremento della lipasi supporta l'idea che le mastiti possano portare allo sviluppo di rancidità idrolitica nel latte (Schultz, 1977). Il contenuto di grasso e quello di lattosio sono inoltre le componenti del latte più influenzate dagli iniziali rialzi delle DSCC (Stocco et al., 2020).

Un'altra componente fortemente influenzata da mastiti e elevate SCC è il lattosio. Il lattosio nel latte è sintetizzato esclusivamente nella mammella dal glucosio prelevato dal circolo sanguigno (Schultz, 1977), se il glucosio è presente con una disponibilità limitata la concentrazione del lattosio cala con effetti negativi sulla quantità e qualità del latte (Harmon, 1994); questa carenza di disponibilità di glucosio per la ghiandola mammaria può essere data da un ridotto afflusso sanguigno in conseguenza di uno stato generale di stress durante uno stato patologico (Kitchen, 1981). È interessante inoltre notare che in caso di mastite vi è una carenza di  $\alpha$ -lattoalbumina, una



proteina coinvolta nella fase finale nella sintesi del lattosio, il che spiega parzialmente il calo della sintesi di lattosio (Schultz, 1977).

Le mastiti provocano inoltre un cambio marcato negli equilibri ionici e aumentano la conduttività del latte: il sodio e il cloruro aumentano in conseguenza del passaggio dal sangue al latte, il potassio, il minerale normalmente predominante nel latte, diminuisce per il passaggio paracellulare attraverso le cellule epiteliali. Siccome la maggior parte del calcio nel latte è associato alle caseine, il calo di queste comporta un calo anche del calcio totale all'interno del latte (Harmon, 1994).

Anche il pH aumenta dal normale 6,6 a 6,9 o valori maggiori a causa della migrazione di componenti dal sangue al latte (Kitchen, 1981) e questo ha pesanti conseguenze sulle proprietà di coagulazione in sede di lavorazione.

## **1.5 Aspetti genetici delle cellule somatiche**

Nonostante fattori ambientali come la gestione sanitaria della mandria influenzino fortemente la frequenza con cui la malattia si manifesta, la suscettibilità di una bovina nei confronti delle mastiti è determinata anche geneticamente (Miglior et al., 2017). In virtù di questo fatto la selezione genetica per la resistenza alle malattie rappresenta una importante risorsa per il calo dell'incidenza delle mastiti in allevamento (Shook et al., 1994; Ruegg, 2017), il che si traduce in un miglioramento non solo sotto l'ottica del benessere animale e dei costi per l'allevatore, ma anche una importante risorsa nella lotta all'antibiotico-resistenza. Difatti selezionare i riproduttori per la resistenza nei confronti delle mastiti significa diminuire i casi di mastite clinica e subclinica e conseguentemente diminuire in modo significativo l'uso degli antibiotici.

Tradizionalmente la selezione si è concentrata sui tratti produttivi (Carlén et al., 2004), difatti sono molteplici gli aspetti produttivi che possono ricondotti a dei tratti genetici ereditabili; in particolare vari studi effettuati prevalentemente sulle frisone hanno stabilito che la produzione latte ha una ereditabilità attorno allo  $0,08 \pm 0,03$ , e che ciascuna delle componenti del latte ha una specifica ereditabilità (Tabella 5) (Bobbo et al., 2019).

**Tabella 5** Ereditabilità stimata dei caratteri produttive nelle bovine Holstein (Bobbo et al., 2019)

| Tratto                      | $h^2$ (Standard Error) |
|-----------------------------|------------------------|
| Produzione lattea kg/d      | 0.08 <sub>(0.03)</sub> |
| Grasso %                    | 0.17 <sub>(0.03)</sub> |
| Proteine %                  | 0.34 <sub>(0.04)</sub> |
| Caseine %                   | 0.33 <sub>(0.04)</sub> |
| Lattosio %                  | 0.32 <sub>(0.04)</sub> |
| pH                          | 0.35 <sub>(0.04)</sub> |
| Urea nel latte (MUN), mg/dl | 0.10 <sub>(0.02)</sub> |

Come accennato sopra la selezione delle popolazioni bovine si è concentrata soprattutto sugli aspetti produttivi; proprio questi obiettivi di selezione hanno incrementato l'incidenza delle mastiti negli allevamenti in quanto ad oggi è generalmente accettato che esistano delle correlazioni genetiche tra la produzione lattea e l'incidenza di svariate patologie, tra cui appunto le mastiti (Carlén et al., 2004).

L'ereditabilità delle mastiti cliniche è bassa, specialmente se analizzata con modelli lineari, e si attesta attorno a 0,03 per la prima lattazione e 0,01 per le lattazioni successive (Carlén et al., 2004). Tuttavia, vista l'alta ereditabilità della SCC e l'alta correlazione tra questa e le mastiti cliniche la SCC può essere usata come obiettivo di selezione indiretto per migliorare la resistenza verso le mastiti (Mrode et al., 1996). La stima della correlazione genetica tra SCC e mastiti cliniche è stata stabilita essere in un range tra 0,30 e 0,90, con un valore medio di 0,70 (Mrode et al., 1996). Tuttavia, la correlazione genetica non unitaria tra le cellule somatiche e le mastiti cliniche suggerisce che esse non siano nello stesso tratto e che la selezione genetica indiretta basata solo sulle SCC possa essere meno efficace che la selezione diretta (Heringstad et al., 2000).

In questi studi la SCC è stata trasformata su base logaritmica ottenendo il somatic cells score [SCS;  $\log_2(\text{SCC}/100.000) + 3$ ] che nelle analisi genetiche serve per ottenere normalità ed omogeneità della varianza (Ali et al., 1980). L'ereditabilità dell'SCS è stata stimata essere attorno a  $0,04 \pm 0,02$  (Bobbo et al., 2019) tuttavia essa cresce con il numero di parti e i risultati più alti riscontrati nelle bovine pluripare suggerisce che l'SCS negli animali giovani e in quelli più vecchi possa dipendere da tratti geneticamente differenti (Coffey et al., 1985).

Un aumento dell'SCS è associato ad una diminuzione della produzione lattea (correlazione fenotipica negativa) e questo comporta che le bovine ad alta produzione lattea siano più suscettibili alle mastiti (Bobbo et al., 2019). La correlazione fenotipica del SCS con la percentuale di grasso, proteine e caseine è quasi zero, andando da 0,05 a 0,08, e la loro controparte genetica è anch'essa

debole ( $0,11 \pm 0,18$  a  $0,21 \pm 0,20$ ) (Bobbo et al., 2019). La percentuale di lattosio è correlata negativamente all'SCS sia dal punto di vista fenotipico ( $-0,26$ ) che dal punto di vista genetico ( $-0,34 \pm 0,15$ ) (Stoop et al., 2007). In ogni caso dal confronto dei dati emerge come l'SCS sia meno ereditabile rispetto ad altri tratti produttivi.

Anche la DSCC è un tratto ereditabile e lo studio sulla sua ereditabilità ha portato a risultati diversi: in alcuni (Bobbo et al., 2019) l'ereditabilità della DSCC è stata riscontrata essere maggiore di quella della SCS avendo valori attorno allo  $0,8 \pm 0,02$ , altri studi (Pegolo et al., 2021) hanno invece riportato che l'ereditabilità della DSCC è simile a quella dell'SCS.

L'ereditabilità della DSCC risente, così come quella della SCS, del numero di parti della bovina, difatti è minore nelle primipare ( $0,04 \pm 0,04$ ) che nelle pluripare ( $0,14 \pm 0,08$  nelle secondipare e  $0,10 \pm 0,06$  nelle pluripare) (Bobbo et al., 2019).

La correlazione genetica tra la produzione latte, la composizione e i tratti legati alla salute della mammella tende ad essere sfavorevole; anche per quanto riguarda le caratteristiche tecnologiche del latte la correlazione risulta sfavorevole riflettendo la correlazione negativa tra la DSCC e le proporzioni di grasso e caseine nel latte (Pegolo et al., 2021). In ogni caso la correlazione genetica tra la DSCC e i tratti legati alla produzione latte è più debole rispetto alla correlazione tra il suddetto tratto e l'SCS (Pegolo et al., 2021).

La correlazione genetica (Tabella 6) tra l'SCS e la DSCC è stata determinata essere diversa da 1 ( $0,60$ ) e questo conferma che esse non sono localizzate sullo stesso tratto (Bobbo et al., 2019).

**Tabella 6** Correlazioni genetiche ( $r_a$ ) e fenotipiche ( $r_p$ ) tra DSCC, SCS e tratti produttivi (Pegolo et al., 2021)

| Tratti           | DSCC         |       | SCS          |       |
|------------------|--------------|-------|--------------|-------|
|                  | $r_a$ (SE)   | $r_p$ | $r_a$ (SE)   | $r_p$ |
| Produzione latte | 0,15 (0,22)  | 0,03  | 0,25 (0,28)  | -0,14 |
| Grasso %         | 0,06 (0,16)  | -0,03 | 0,21 (0,20)  | 0,08  |
| Proteine %       | 0,02 (0,14)  | -0,02 | 0,17 (0,17)  | 0,08  |
| Caseine %        | 0,03 (0,14)  | -0,02 | 0,11 (0,18)  | 0,05  |
| Lattosio%        | 0,16 (0,15)  | -0,05 | -0,34 (0,15) | -0,26 |
| pH               | -0,14 (0,14) | -0,04 | -0,29 (0,15) | -0,07 |
| MUN              | 0,16 (0,15)  | -0,04 | 0,13 (0,19)  | -0,10 |
| SCS              | 0,66 (0,13)  | 0,66  |              |       |

## 1.6 La razza pezzata rossa italiana



**Figura 4** Bovina di P.R.I. figlia di tori italiani (A.N.A.P.R.I.)

La razza Pezzata Rossa Italiana (P.R.I.) (Figura 4) è una razza bovina appartenente al gruppo delle razze di ceppo Simmental, che prendono il nome dalla valle del fiume Simme nella Svizzera occidentale, le quali sono tra le più numericamente consistenti al mondo, arrivando a contare oltre 40 milioni di animali. La P.R.I. fa parte delle razze bovine dette a duplice attitudine ovvero vocate sia alla produzione di carne che alla produzione di latte, e questo la rende una bovina poliedrica in grado di produrre latte in buona quantità e qualità e contemporaneamente di fornire introiti aggiuntivi importanti con la vendita della carne. Queste caratteristiche, unite alla facilità di adattamento a condizioni ambientali eterogenee, alla semplicità di gestione dovuta anche al basso grado di consanguineità, la rendono una razza redditizia e appetibile per molteplici tipologie di allevamento.

Agli albori la razzata pezzata rossa era una razza a triplice attitudine, dunque essa veniva utilizzata, oltre che per la produzione di carne e latte, anche per il lavoro nei campi, soprattutto in quei contesti dove non era possibile l'acquisto di un cavallo. All'inizio del '900 era dunque il lavoro il principale obiettivo di selezione e questo ha fatto sì che la razza abbia sviluppato delle articolazioni

robuste unite ad un importante sviluppo scheletrico e buone masse muscolari. Con il progresso tecnologico e lo sviluppo della trazione a motore, i bovini vennero sempre meno utilizzati per il lavoro e gli obiettivi di selezione cambiarono, spostandosi sulla produzione di latte e carne, facendo così diventare la razza a duplice attitudine. Nel corso del '900 il processo selettivo ha portato ad un continuo incremento degli aspetti produttivi anche grazie all'introduzione di riproduttori dall'estero appartenenti sempre però a razze del ceppo Simmental. Il continuo processo di selezione ha dato origine, dunque, alla "Pezzata Rossa Friulana" che dal 1986, per effetto del Decreto del Presidente della Repubblica n° 1134/86, è denominata "Pezzata Rossa Italiana".

La razza presenta un mantello pezzato rosso con tonalità di colori che vanno dal fromentino chiaro al rosso mogano, come caratteri particolari della pigmentazione sono da ricordare che tendono al bianco la testa, anche se spesso le orecchie si presentano rosse, le ciglia, la parte inferiore del ventre, le regioni distali degli arti e il fiocco della coda. A volte a livello di spalle e lombi può essere presente una "cintura" di colore bianco. La colorazione delle mucose è rosea, mentre il musello si presenta di colore rosso carnicino, le corna sono corte e di colore giallognolo chiaro, così come gli unghioni. La pelle si presenta morbida, facilmente distaccabile in sede di macellazione e abbastanza sottile.

Per quanto riguarda le dimensioni dei soggetti, queste rispecchiano le caratteristiche comuni a molte delle razze del ceppo Simmental ovvero quelle di bovini di dimensioni medio-alte sia per quanto riguarda il peso sia per quanto riguarda la statura: i maschi hanno un'altezza al garrese di circa 150 cm e un peso che può tranquillamente superare i 1100 kg, le femmine hanno un'altezza al garrese di circa 140 cm e un peso che mediamente si aggira attorno ai 700 kg.

Nonostante l'area di introduzione originale del ceppo Simmental in Italia sia l'area del Friuli e del Triveneto in generale, ad oggi la P.R.I. è diffusa in tutta la penisola italiana (Tabella 7), soprattutto nelle aree montuose e collinari, e in tutte quelle zone dove l'allevamento premia le razze più robuste e che meglio si adattano ai terreni impervi. A riprova di questa adattabilità ai terreni più disagiati vi è il fatto che la maggioranza degli allevamenti siano localizzati in montagna, seguiti da quelli in zone collinari ed infine da quelli in pianura.

**Tabella 7** Localizzazione geografica degli allevamenti e delle bovine P.R.I - Fonte: A.I.A

| <b>Zona</b> | <b>Quota Allevamenti</b> | <b>Quota Bovine</b> |
|-------------|--------------------------|---------------------|
| Montagna    | 57%                      | 43%                 |
| Collina     | 22%                      | 22%                 |
| Pianura     | 21%                      | 35%                 |

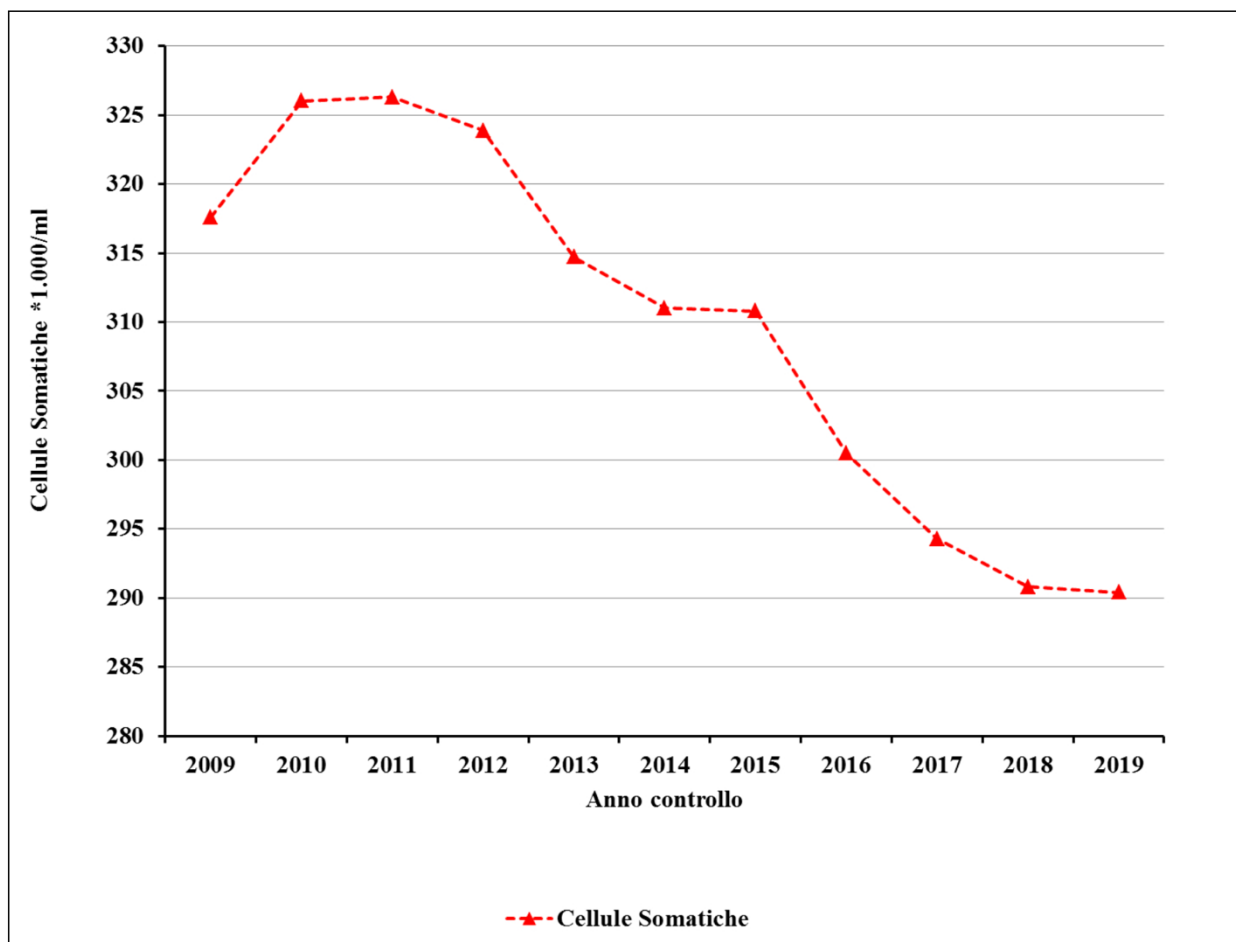
Per quanto riguarda il numero di capi censiti in Italia, i dati della BDN parlano di circa 200.000 soggetti, mentre limitando le considerazioni alle sole bovine iscritte al Libro Genealogico, nel 2019, sono circa 63.000 le vacche controllate per la produzione di latte a cui vanno aggiunte le circa 9.000 fattrici della linea vacca vitello (Tabella 8). Complessivamente le femmine iscritte al Libro Genealogico sono dunque 90.000.

**Tabella 8** Consistenza e produzioni della P.R.I nell'ultimo decennio (A.I.A.)

| <b>Anno</b> | <b>N° Bovine</b> | <b>N° Allevamenti</b> | <b>Latte Kg</b> | <b>Grasso%</b> | <b>Proteine%</b> |
|-------------|------------------|-----------------------|-----------------|----------------|------------------|
| 2009        | 54.743           | 4.781                 | 6.466           | 3,87           | 3,44             |
| 2010        | 58.250           | 5.000                 | 6.530           | 3,88           | 3,44             |
| 2011        | 61.490           | 5.223                 | 6.589           | 3,88           | 3,44             |
| 2012        | 62.160           | 5.255                 | 6.657           | 3,86           | 3,44             |
| 2013        | 62.689           | 5.187                 | 6.670           | 3,89           | 3,44             |
| 2014        | 63.399           | 5.097                 | 6.672           | 3,90           | 3,42             |
| 2015        | 64.554           | 5.163                 | 66.723          | 3,88           | 3,40             |
| 2016        | 64.868           | 5.040                 | 6.811           | 3,89           | 3,40             |
| 2017        | 62.732           | 4.804                 | 6.937           | 3,92           | 3,43             |
| 2018        | 61.420           | 4.566                 | 7.115           | 3,92           | 3,44             |
| 2019        | 62.053           | 4.535                 | 7.146           | 3,91           | 3,44             |

La produzione media della razza al 2019 è di 7.146 kg di latte al 3,91% di grasso e 3,44% di proteine, tuttavia la produzione media può ritenersi sottostimata rispetto alle reali potenzialità produttive della razza, in quanto le bovine P.R.I. sono principalmente allevate in allevamenti medio-piccoli situati in zone montane (Spigarelli, 2021).

Tra gli aspetti più interessanti della P.R.I. vi è la ridotta SCC rispetto ad altre razze e la conseguente minore suscettibilità alle patologie della mammella (Figura 5); riguardo le cellule somatiche nel 2019 per il 79,3% dei controlli funzionali giornalieri la conta cellulare era inferiore alle 300.000 cellule/ml, il 12,7% tra le 300.000-800.000 cellule/ml e per l'8,0% dei controlli funzionali giornalieri la conta cellulare era superiore alle 800.000 cellule/ml (A.N.A.P.R.I, 2021).



**Figura 5** Trend fenotipico del contenuto in cellule somatiche (A.N.A.P.R.I, 2021)

## 2. OBIETTIVI

Il crescente numero di studi riguardanti la DSCC e la sua correlazione con l'SCS ed i tratti produttivi dimostrano l'interesse sempre maggiore per l'importanza che questo parametro può assumere sia all'interno della gestione della mandria in lattazione, sia all'interno dei parametri di selezione genetica, come già avviene per l'SCS.

Il numero di studi sulla DSCC e le sue correlazioni genetiche è tuttavia ancora molto esiguo e limitato a studi effettuati quasi esclusivamente sulla razza Frisona, in quanto razza più diffusa sul territorio italiano, e non ci sono al momento studi che indagano il parametro della DSCC e le sue correlazioni genetiche nelle altre razze bovine.

Questo studio si pone come obiettivo quello di indagare il parametro della DSCC, e delle sue correlazioni, mettendolo in relazione con la SCS, sia dal punto di vista del genotipo che dal punto di vista del fenotipo all'interno di una delle razze italiane più diffuse sul territorio italiano, ovvero la Pezzata Rossa Italiana, al fine poter implementare la conoscenza del parametro per una possibile futura inclusione nei processi di selezione.



### 3. MATERIALI E METODI

Per la realizzazione di questo studio sono stati utilizzati dati ottenuti tramite i controlli funzionali sul latte bovino raccolti in Friuli-Venezia Giulia tra il luglio 2019 e il settembre 2020. Le osservazioni hanno riguardato 1.314 bovine di razza Pezzata Rossa Italiana, distribuite in 63 allevamenti. I dati riguardanti le singole bovine sono stati forniti dall'Associazione Allevatori del Friuli-Venezia Giulia (Codroipo, Udine) e hanno riguardato parametri come l'ID delle bovine, i giorni in lattazione (*days in milk*; *dim\_class*), il numero di parti (*parity of the cow*) e il giorno in cui è stato effettuato il prelievo (*herd-test day*); la stessa associazione ha fornito i dati riguardanti il latte: come la produzione latte, la composizione del latte (grasso, proteine, lattosio, urea, indice caseinico), la SCC e la DSCC.

I campioni sono stati analizzati presso i laboratori dell'Associazione Allevatori del Friuli-Venezia Giulia secondo le procedure dell'International Committee for Animal Recording (ICAR, 2020). Per l'analisi della composizione del latte, come le percentuali di grasso, proteine e lattosio, è stato utilizzato MilkoScan FT7 (FOSS Electric A/S, Hillerød, Danimarca), secondo la norma ISO 9622/IDF 141:2013. Per la determinazione della SCC e della DSCC è stato invece utilizzato un Fossomatic 7DC (FOSS Electric A/S, Hillerød, Danimarca; ISO 13366-2/IDF 148-2:2006).

Il totale delle misurazioni è stato poi scremato attraverso la selezione secondo una serie di parametri per l'analisi statistica. Sono state scartate tutte le misurazioni riguardanti bovine al cui ID corrispondeva solo una misurazione. Sono stati esclusi gli allevamenti che hanno fornito misurazioni da un numero di bovine inferiore a 5. Sono state scartate tutte le misurazioni con le DSCC  $< 20$  e  $> 95$  o quelle in cui questo parametro era mancante. Per essere considerate, le misurazioni dovevano provenire da bovine con una produzione latte  $\geq 5$  e che fossero in lattazione tra i 5 e i 500 giorni. Sono state scartate tutte le misurazioni che non soddisfacevano determinati standard riguardo la composizione dei campioni: la percentuale di grasso doveva essere  $>2$  e  $<8$ , la percentuale di proteine doveva essere  $>2.4$  e  $<4.5$ , la percentuale di lattosio doveva essere  $\geq 4$ , l'urea doveva essere  $\leq 50$ , l'indice caseinico doveva essere  $\geq 4$ .

Questa selezione alla fine ha portato il numero delle osservazioni utilizzate per lo studio a 9.596.

Per quanto riguarda l'analisi statistica sono state eseguite analisi bivariate in un modello di ripetibilità che include un effetto ambientale permanente per le misure ripetute sullo stesso individuo, in questo modo sono state stimate le componenti della varianza, l'ereditabilità ( $h^2$ ), le correlazioni genotipiche e fenotipiche (rispettivamente  $r_g$  e  $r_p$ ) tra l'SCS e cinque tratti legati alla conta delle cellule somatiche differenziali, vale a dire, DSCC,  $\log_2$  (DSCC) ovvero la trasformazione logaritmica in base 2 delle DSCC per ottenere normalità, la trasformazione logaritmica in base 2 dei PMN più i linfociti LYM e la trasformazione logaritmica in base 2 dei macrofagi.

Modello statistico:

$$y = \mu + htd + dim + parity + animal + pe + e$$

dove *htd*, *dim* e *parity* sono gli effetti fissi dell'allevamento, del giorno del test, dei giorni in lattazione e del numero di parti della bovina. Gli effetti permanenti includono l'animale e l'ambiente permanente da considerare per le misurazioni ripetute della bovina.

L'ereditabilità entro allevamento ( $h_{IH}^2$ ) è stata calcolata come segue:

$$h_{IH}^2 = \frac{\sigma_{\alpha}^2}{\sigma_{\alpha}^2 + \sigma_{pe}^2 + \sigma_e^2}$$

Dove  $\sigma_{\alpha}^2$ ,  $\sigma_{pe}^2$  and  $\sigma_e^2$  sono rispettivamente la componente genetica additiva, la componente ambientale permanente e la varianza residua.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

**Tabella 9** Ereditabilità e correlazioni genotipiche ( $r_a$ ) tra SCS e i tratti indagati in questo studio

| Tratto                    | Ereditabilità | $r_g$ | $r_p$ |
|---------------------------|---------------|-------|-------|
| SCS                       | 0,084         |       |       |
| DSCC                      | 0,060         | 0,287 | 0,665 |
| $\log_2(\text{DSCC})$     | 0,057         | 0,194 | 0,611 |
| DSCC_rtr                  | 0,069         | 0,244 | 0,689 |
| $\log_2(\text{PMN\_LYM})$ | 0,492         | 0,993 | 0,989 |
| $\log_2(\text{MAC})$      | 0,122         | 0,942 | 0,948 |

Dall'analisi dei dati (Tabella 9) è emerso che l'ereditabilità per l'SCS nella P.R.I. si attesta ad un valore di 0,084 e questo dato è in linea con quello fornito da A.N.A.P.R.I. che riportava un valore medio di ereditabilità per l'SCS nella P.R.I. di 0,08.

Partendo da un confronto per l'ereditabilità dell'SCS tra specie diverse questo dato si colloca al di sopra del valore medio di 0,06 per le pecore stabilito da Makovický e colleghi nel 2014 (Makovicky et al., 2014), mentre si colloca al di sotto dei valori di 0,255 per il bufalo stabilito da Aspilcueta-Borquis e colleghi nel 2010 (Aspilcueta-Borquis et al., 2010) e di 0,21 per le capre stabilito da Bagnicka e colleghi nel 2016 (Bagnicka et al., 2016).

Facendo un confronto tra razze, invece, questo dato è in linea con il valore medio nella razza Holstein riportato da Kennedy e colleghi nel 1982 (Kennedy et al., 1982), che riportava un valore medio di ereditabilità per l'SCS di 0,08, mentre è leggermente inferiore per la valutazione fatta da Coffey e colleghi nel 1985 (Coffey et al., 1985), che riportava invece un valore oscillante tra 0,09 e 0,29 a seconda del numero di parti, mentre risulta più alto rispetto ai risultati ottenuti sulla Frisone Italiana di  $0,05 \pm 0,01$  ottenuti da Bobbo e colleghi nel 2020 (Bobbo et al., 2020). Nella Tabella 10 sono riportati alcuni valori di ereditabilità dell'SCS per altre razze bovine, in particolare è interessante il confronto con un'altra razza di ceppo Simmental, come la Simmental Austriaca, che ha un'ereditabilità maggiore, corrispondente a 0,12, nonostante la vicinanza sia da un punto di vista genetico che geografico. Da notare come l'ereditabilità di questo carattere sia molto simile in altre due razze a duplice attitudine italiane come la Rendena e la Reggiana con valori attorno 0,08.

**Tabella 10** Ereditabilità dell’SCS in alcune razze bovine indagate in precedenti studi

| Fonte                   | Razza               | Ereditabilità SCS |
|-------------------------|---------------------|-------------------|
| Ikonen et al. (2004)    | Finnish Ayrshire    | 0,06              |
| Sartori et al. (2018)   | Rendena             | 0,088             |
| Negussie et al. (2013)  | Nordic Red          | 0,05-0,10         |
| Mancin et al. (2021)    | Grigio Alpina       | 0,133             |
| Dal Zotto et al. (2007) | Brown Swiss         | 0,06              |
| Koeck et al. (2010)     | Simmental Austriaca | 0,12              |
| Bobbo et al. (2019)     | Jersey              | 0,13              |
| ANABoRaRe               | Reggiana            | 0,082             |

Da questo studio l’ereditabilità della DSCC nelle P.R.I è risultata essere 0,060; questo dato è leggermente più basso di quello riscontrato nella Frisona Italiana da Bobbo e colleghi nel 2020, (Bobbo et al., 2020) che era risultato essere  $0,09 \pm 0,01$ , mentre risulta essere quasi la metà rispetto ai risultati di Pegolo e colleghi nel 2021 (Pegolo, et al., 2021) di 0,11 sulla Frisona Italiana. Risulta invece essere congruo con il risultato di  $0,08 \pm 0,02$  ottenuto sulla Frisona Italiana da Bobbo e colleghi nel 2019 (Bobbo et al., 2019). I risultati portano quindi a pensare che l’ereditabilità della DSCC nella P.R.I sia sovrapponibile o leggermente inferiore a quella riscontrata nella Frisona Italiana. Anche in questo studio come in quello di Pegolo e colleghi del 2021 (Pegolo et al., 2021) l’ereditabilità della DSCC è risultata inferiore a quella dell’SCS, in contrasto con i risultati di Bobbo e colleghi del 2019 (Bobbo et al., 2019) che supportavano la maggiore ereditabilità della DSCC rispetto a quella dell’SCS.

La correlazione genetica tra l’SCS e la DSCC è risultata essere di 0,287, un valore sorprendentemente basso, mentre per quanto riguarda il fenotipo la correlazione è risultata essere più del doppio, attestandosi su 0,665; la correlazione genetica SCS-DSCC è diversa da quella ottenuta sulla Frisona Italiana sia da Bobbo e colleghi nel 2019 (Bobbo et al., 2019), che risultava essere di  $0,66 \pm 0,13$ , sia da Pegolo e colleghi nel 2021 (Pegolo et al., 2021) che riportava un valore di correlazione genetica SCS-DSCC di 0,60.

Per quanto riguarda il fenotipo la correlazione ottenuta da questo studio è molto simile a quella ottenuta da Bobbo e colleghi nel 2019 (Bobbo et al., 2019) sulla Frisona, che riportava un valore di 0,66, mentre è leggermente superiore a quello ottenuto da Pegolo e colleghi nel 2021 (Pegolo et al., 2021), che riportava un valore di 0,44.

Anche in questo studio, così come in quelli di Pegolo e colleghi del 2021 (Pegolo et al., 2021) e Bobbo e colleghi del 2019 (Bobbo et al., 2019), la correlazione genetica tra SCS e DSCC è risultata

diversa da 1, il che conferma che questi due caratteri non si trovano sullo stesso tratto. Il fatto che il valore in questo studio sia risultato molto più basso suggerisce una maggiore differenza dal punto di vista genetico nella P.R.I. rispetto alla Frisona Italiana.

Ai fini di ottenere normalità statistica allo studio sono stati aggiunti due valori legati alla DSCC ovvero la  $\log_2(\text{DSCC})$ , cioè la trasformazione logaritmica in base 2 della DSCC ( $\log_2(\text{DSCC}/100.000)+3$ ), e la  $\text{DSCC\_rtr}$  rappresentante la trasformazione logaritmica della DSCC per la normalità applicata nel pacchetto GenABEL del software R.

Si tratta di due valori che non risultano indagati prima e la cui letteratura scientifica è scarsa o inesistente. La  $\log_2(\text{DSCC})$  (Sartori et al., 2018; Negussie et al., 2013; Mancin et al., 2021; Dal Zotto et al., 2007; Koeck et al., 2010) è risultata avere una ereditabilità leggermente inferiore alla DSCC, ovvero 0,057, mentre la correlazione genetica con l'SCS è risultata essere di 0,194, la controparte fenotipica è risultata di 0,611. La  $\text{DSCC\_rtr}$  è risultata avere una ereditabilità più bassa della DSCC, con un valore di 0,069, mentre la correlazione genetica con la SCS è risultata essere di 0,244, più bassa anch'essa, dal punto di vista fenotipico la correlazione con l'SCS è risultata più alta di quella della DSCC attestandosi a un valore 0,689.

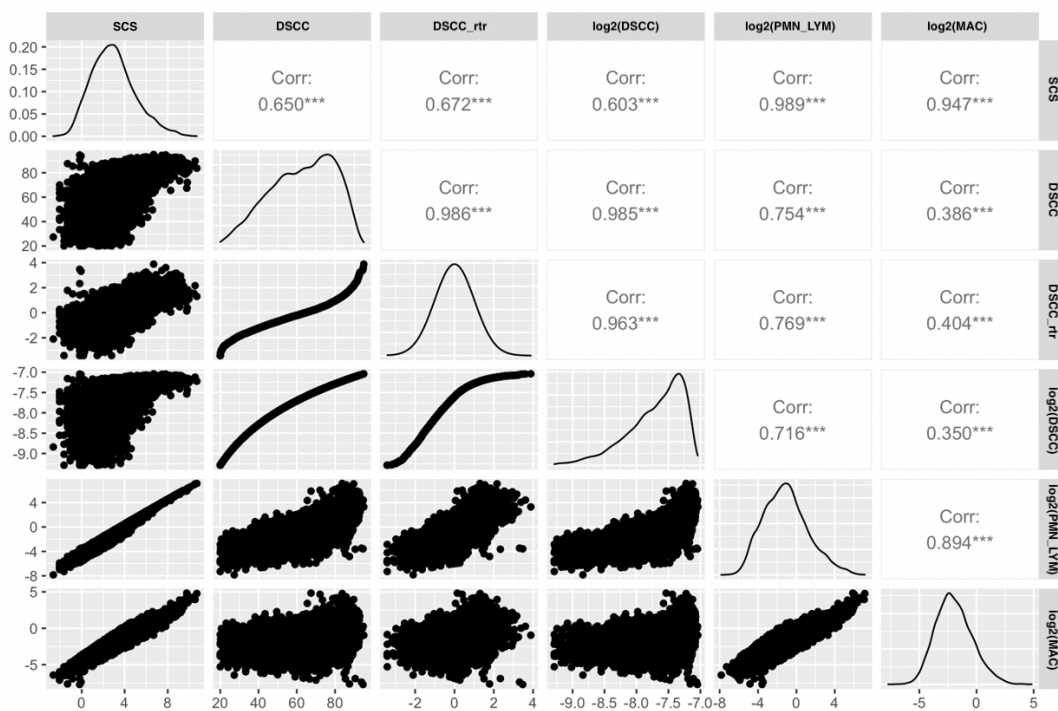
L'ereditabilità della  $\log_2(\text{PMN\_LYM})$  è risultata essere 0,492, si tratta di un valore moderato, ma parecchio maggiore rispetto a quello riscontrato da Pegolo e colleghi nel 2021 (Pegolo et al., 2021) nella Frisona Italiana, quest'ultimo infatti aveva riscontrato una ereditabilità per  $\log_2(\text{PMN\_LYM})$  di 0,10. La correlazione genetica tra  $\log_2(\text{PMN\_LYM})$  e SCS è risultata essere di 0,993, un valore ancora più alto di quello ottenuto da Pegolo e colleghi nel 2021 (Pegolo et al., 2021) che aveva riportato un valore 0,79. Dal punto di vista del fenotipo la correlazione tra  $\log_2(\text{PMN\_LYM})$  e l'SCS è risultata essere di 0,989. L'ereditabilità della  $\log_2(\text{MAC})$  è risultata essere di 0,122, un valore molto basso e che si trova in linea con quello riscontrato sulla Frisona Italiana da Pegolo e colleghi nel 2021 (Pegolo et al., 2021) che riportavano un valore di 0,11. La correlazione genetica tra l'SCS e la  $\log_2(\text{MAC})$  è risultata essere anche in questo caso molto alta, attestandosi su un valore di 0,942, mentre la controparte fenotipica è risultata essere ancora più alta con un valore 0,948. Il valore di correlazione genetica ottenuto in questo studio tra l'SCS e la  $\log_2(\text{MAC})$  è dunque risultato molto più alto di quello riportato da Pegolo e colleghi nel 2021 (Pegolo et al., 2021) che corrispondeva ad un valore di 0,69.

In un recente studio (Pegolo et al., 2021) sulla Frisona Italiana è stata dimostrata sussistere una correlazione genetica negativa tra i due tratti  $\log_2(\text{PMN\_LYM})$  e  $\log_2(\text{MAC})$  e molti tratti legati a parametri produttivi come la produzione latte, le percentuali nel latte di proteine, grasso, caseine, lattosio, indice di caseine e molti parametri relativi alla proprietà tecnologiche del latte, mentre hanno dimostrato esserci una debole correlazione positiva con il pH del latte. Lo studio della

ereditabilità e della correlazione di questi due tratti può dunque essere usato come strumento utile da affiancare per la selezione genetica per il miglioramento della qualità del latte.

È doveroso precisare che i confronti fatti fino a questo punto con altri lavori presenti in letteratura, in particolare quelli di Pegolo e colleghi (Pegolo et al., 2021) e di Bobbo e colleghi (Bobbo et al., 2019), vanno paragonati con le dovute cautele in quanto, pur trattando degli stessi argomenti e parametri, l'elaborazione statistica, i modelli utilizzati e i criteri con cui i dati sono stati scremati, sono differenti e questo è un fatto da tenere presente nel confronto dei dati. Inoltre vengono prese in considerazione due razze differenti, e di conseguenza sono differenti anche la quantità e la qualità del latte prodotto.

In aggiunta ai dati elaborati secondo il modello statistico illustrato in precedenza sono stati elaborati anche i dati grezzi al fine di studiare meglio le correlazioni fenotipiche.



**Figura 6** Correlazioni fenotipiche di Pearson per tutti i confronti a coppie basati sui dati fenotipici grezzi

Dai grafici di densità (Figura 6) si può notare come la trasformazione logaritmica abbia aiutato a ottenere normalità, specialmente nel caso della DSCC\_rtr dove la curva assume un andamento gaussiano quasi perfetto. Anche nel caso di log2(PMN\_LYM) e log2(MAC) l'andamento della curva assume un andamento che tende alla normalità, mentre nel caso della DSCC\_log2 e della DSCC la curva tende ad avere un andamento irregolare e spostato verso destra.

Dal punto di vista delle correlazioni fenotipiche è interessante come sia molto alta la correlazione tra  $\log_2(\text{PMN\_LYM})$  e  $\log_2(\text{MAC})$  con un valore di 0,894, questo dato è molto più alto rispetto a quello ottenuto per lo stesso parametro da Pegolo e colleghi (Pegolo et al., 2021), ovvero 0,65. Osservando inoltre il grafico a dispersione per la correlazione tra questi due parametri si può notare come ci sia una correlazione lineare, anche se non perfetta, tra i due parametri e che questa correlazione sia positiva. Anche il grafico a dispersione per  $\log_2(\text{MAC})$  e SCS mostra una correlazione positiva pressochè lineare con un valore di 0,947. I grafici a dispersione per la correlazione tra  $\log_2(\text{MAC})$  e i parametri relativi alla conta differenziale come DSCC,  $\log_2(\text{DSCC})$ , e DSCC\_rtr mostrano una correlazione positiva molto più debole e irregolare con valori rispettivamente di 0,386, 0,350 e 0,404.

Le correlazioni per il fenotipo riguardanti l'SCS non si discostano molto dai valori ottenuti dai dati selezionati per l'analisi statistica, tuttavia i grafici a dispersione in Figura 6 mostrano come la correlazione con i parametri legati alla conta differenziale abbiano un andamento positivo, ma molto irregolare e con una distribuzione non lineare, ma sparsa. Diverso invece è l'andamento dei grafici relativi alla correlazione con  $\log_2(\text{PMN\_LYM})$  e  $\log_2(\text{MAC})$  dove i valori sono molto alti, rispettivamente di 0,989 e 0,947, e dove l'andamento è pressochè lineare.

Le correlazioni tra  $\log_2(\text{PMN\_LYM})$  e i tra parametri riguardanti la DSCC sono tutte positive e con valori simili: la correlazione con la DSCC è pari a 0,754, la correlazione con  $\log_2(\text{DSCC})$  è pari a 0,716 mentre la correlazione con e DSCC\_rtr è pari 0,404. Osservando i grafici a dispersione per queste correlazioni si può osservare che anche in questo caso nonostante la relazione sia positiva, l'andamento non è lineare, ma molto irregolare.

## 5. CONCLUSIONE

Questo studio ha indagato per la prima volta il parametro della DSCC e delle popolazioni di linfociti, macrofagi e polimorfonucleati nella razza Pezzata Rossa Italiana, sia dal punto di vista del genotipo che dal punto di vista del fenotipo. È stata stimata l'ereditabilità per questi parametri e le correlazioni per genotipo e fenotipo sia tra di loro che con parametro dell'SCS, al fine di indagarne le potenzialità per la selezione della razza.

Il valore molto basso per la correlazione genetica tra SCS e DSCC ottenuto in questo studio suggerisce che questi due parametri non siano posizionati sullo stesso tratto e questo indica delle potenzialità per l'utilizzo del parametro della DSCC per la selezione genetica.

Anche l'ereditabilità e le correlazioni per  $\log_2(\text{PMN\_LYM})$  e  $\log_2(\text{MAC})$  non erano mai stati investigati prima in questa razza. In futuro una maggiore comprensione della correlazione tra i tratti produttivi e questi due parametri potrà essere utile per migliorare la selezione genetica nella razza.

Ulteriori studi sono necessari per indagare la correlazione tra i tratti presi in considerazione in questo studio e i parametri produttivi, in modo da poter includere questi parametri nella selezione della razza e nei programmi di miglioramento genetico.



# Bibliografia

A.N.A.P.R.I. (s.d.). Tratto da A.N.A.P.R.I. Associazione nazionale allevatori pezzata rossa italiana: <https://www.anapri.eu/it/ufficio-tecnico/valutazioni-morfologiche.html>

Alhussien, M., & Dang, A. (2018). Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Vet. World*, 11, 562–577.

Alhussien, M., Kaur, M., Manjari, P., Kimothi, S., Mohanty, A., & Dang, A. (2015). A comparative study on the blood and milk cell counts of healthy, subclinical, and clinical mastitis Karan Fries cows. *Vet. World*(8), 685-689.

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

Arrigoni, N., Garbarino, C., Franco, A., & Battisti, A. (2014). Strumenti diagnostici e test di sensibilità agli antibiotici nell'approccio alla terapia della mastite bovina.

Auldism, M., & Hubble, I. (1998). Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.*

Auldism, M., Coats, S., Sutherland, B., JJ, M., GH, M., & GL., R. (1996). Effects of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition and the yield and quality of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 63(2), 269-80.

Barkema, H. W., Schukken, Y. H., Lam, T. J., Beiboer, M. L., Wilmink, H., Benedictus, G., & Brand, A. (1998). Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *Journal of dairy science*(81(2)), 411-419.

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

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

Blowey, R., & Edmondson, P. (2010). *Mastitis control in dairy herds*.

Bobbo, T., Cipolat-Gotet, C., Bittante, G., & Cecchinato, A. (2016). The non-linear effect of somatic cell count on milk composition, coagulation properties, curd firmness, cheese yield and curd nutrient recovery. *Journal of Dairy Science*.

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), 4275–4279.

Bobbo, T., Penasa, M., & Cassandro, M. (2020). Genetic Parameters of Bovine Milk Fatty Acid Profile, Yield, Composition, Total and Differential Somatic Cell Count. *Animals*(10(12)), 2406.

Bobbo, T., Roveglia, C., Penasa, M., Visentin, G., Finocchiaro, R., & Cassandro, M. (2019). Genetic relationships of alternative somatic cell count traits with milk yield, composition and udder type traits in Italian Jersey cows. *Animal Science Journal*(90(7)), 808-817.

Bradley, A. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *The veterinary journal*, p. 1-13.

Bradley, A., Barkema, H., Biggs, A., Green, M., & Lam, T. (2012). Control of mastitis and enhancement of milk quality. In M. Green, *Dairy herd health*. USA: CAB International ed.

Bramley, A. J. (1992). mastitis. In R. W. (Ed. A. H. Andrews, *Bovine Medicine - Diseases and Husbandry of Cattle* (p. 289-300). Blackwell Scientific Publications: Oxford.

Bramley, A. J., & Dodd, F. H. (1984). Mastitis control: progress and prospects. *Journal of Dairy Science*(51), 481.

Bruckmaier, R., & Wellnitz, O. (2017). Pathogen-specific immune response and changes in the blood-milk barrier of the bovine mammary gland. *Journal of Animal Science*(95), 5720-5728.

Carlén, E., Strandberg, E., & Roth., A. (2004). Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, and production in the first three lactations of Swedish Holstein cows. *Journal of Dairy Science*(87), 3062– 3070.

Coffey, E. M., Vinson, W. E., & Pearson, R. E. (1985). Heritabilities for lactation average of somatic cell counts in first, second, and third or later parities. *Journal of Dairy Science*(68), 3360–3362.

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.

Dal Zotto, R., De Marchi, M., Dalvit, C., Cassandro, M., Gallo, L., Carnier, P., & Bittante, G. (2007). Heritabilities and genetic correlations of body condition score and calving interval with yield, somatic cell score, and linear type traits in Brown Swiss cattle. *Journal of dairy science*(90(12)), 5737-5743.

Damm, M., Holm, C., Blaabjerg, M., Bro, M., & Schwarz, D. (2017). Differential somatic cell count—A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *Journal of Dairy Science*(100), 4926-4940.

Degano, L. (2019). *la pezzata rossa italiana*. Tratto da ruminantia.it.

Dohoo, I. R., & Meek, A. H. (1982). Somatic cell counts in bovine milk. *Can. Vet. J.*

Erwin, R. E., & Randolph, H. E. (1975). Influence of mastitis on properties of milk. XI. Fat globule membrane. *Journal of Dairy Science*(58), 9-12.

Ferronato, J., TC, F., Schneider, M., Pessoa, L., Blagitz, M., Heinemann, M., . . . FN., S. (2018). Diagnosing mastitis in early lactation: use of SomaticellVR , California mastitis test and somatic cell count. *Italian Journal of Animal Science*(17), 723–729.

Fitzpatrick, J., Cripps, P., Hill, A., Bland, P., & Stokes, C. (1992). MHC class II expression in the bovine mammary gland. *Vet Immunol Immunopathol*(32(1-2)), 13-23.

- Griesbeck-Zilch, B., Osman, M., Kühn, C., Schwerin, M., Bruckmaier, R., Pfaffl, M. H.-F., Wellnitz, O. (2009). Analysis of key molecules of the innate immune system in mammary epithelial cells isolated from marker assisted and conventionally selected cattle. *Journal of Dairy Science*(92), 4621–4633.
- Haddadi, K., Prin-Mathieu, C., Moussaoui, F., Faure, G., Vangroenweghe, F., Burvenich, C., & Le Roux, Y. (2006). Polymorphonuclear neutrophils and Escherichia coli proteases involved in proteolysis of casein during experimental E. coli mastitis. *International Dairy Journal*(16), 639-647.
- Haenlein, G., Schultz, H., & Zikakis, J. P. (1973). Composition of protein in milk with varying leukocyte content. *Journal of Dairy Science*(56), 1017-1024.
- Halasa, T., Huijps, K., Osteras, O., & Hogeveen., a. H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet. Q.*, 29, 18–31.
- Harmon, R. J. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*(77), 2103-2112.
- Harmon, R. J. (2001). Somatic cell counts: a primer. *National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings*.
- Heberhart, R. J., Gilmore, H. C., Hutchinson, L. J., & Spencer, S. B. (1979). Somatic cell counts in DHI samples. *Proc. Ann. Mtg. Natl. Mastitis Council*.
- Heringstad, B., Klemetsdal, G., & Ruane., J. (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: A review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livest. Prod. Sci*(64), p. 95–106.
- Hillerton, J. E., & Berry, E. A. (2005). Treating mastitis in the cow- a tradition or an archaism. *J. Appl. Microbiol.*(98), 1250-1255.

- Hogeveen, H., Huijps, k., & Lam, T. (2011). Economic aspects of mastitis: New developments. *New Zealand Veterinary Journal*(59:1), 16-23.
- Ikonen, T., Morri, S., Tyrisevä, A., Ruottinen, O., & Ojala, M. (2004). Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content, and pH of milk. *Journal of Dairy Science*(87), 458-467.
- Kehrli, M. E., & Shuster., D. (1994). Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*(77).
- Kitchen, B. J. (1981). Review of progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res*(48).
- Koeck, A., Heringstad, B., Egger-Danner, C., Fuerst, C., Winter, P., & Fuerst-Waltl, B. (2010). Genetic analysis of clinical mastitis and somatic cell count traits in Austrian Fleckvieh cows. *Journal of dairy science*(93(12)), 5987-5995.
- Koess, C., & Hamann, a. J. (2008). Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *J. Dairy Res*(75), 225-232.
- Leitner, G., Merin, U., & Silanikove, N. (2004). Changes in Milk Composition as Affected by Subclinical Mastitis in Goats. *Journal of Dairy Science*.
- Leitner, G., Silanikove, N., Jacobi, S., Weisblit, L., Bernstein, S., & Merin, U. (2008). The influence of storage on the farm and in dairy silos on milk quality for cheese production. *International Dairy Journal*(18), 109-113.
- 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).
- Lindmark-Mansson, H., Branning, C., Alden, G., & Paulsson., M. (2006). Relationship between somatic cell count, individual leuco- cyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. *Int. Dairy J.*(16), 717-727.

- Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D. M., Galton, D. M., Rudan, M. A., & Boor., K. J. (2000). Effects somatic cell count on quality and shelf life of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*(83), 264-274.
- Mancin, E., Sartori, C., Guzzo, N., Tuliozi, B., & Mantovani, R. (2021). Selection Response Due to Different Combination of Antagonistic Milk, Beef, and Morphological Traits in the Alpine Grey Cattle Breed. *Animals*(11(5)), 1340.
- Mehrzad, J., & Zhao, X. (2008). T lymphocyte proliferative capacity and CD4 /CD8 ratio in primiparous and pluriparous lactating cows. *Journal of Dairy Research*(75(4)), 457-465.
- Merle, R., Schröder, A. C., & Hamann., J. (2007). Cell function in the bovine mammary gland: A preliminary study on interdependence of healthy and infected udder quarters. *Journal of Dairy Research*(74), 174-179.
- Miglior, F., Fleming, A., Malchiodi, F., Brito, L. F., Martin, P., & Baes, C. F. (2017). A 100-Year Review: Identification and genetic selection of economically important traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*(100),10251–10271.
- Mrode, R. A., & Swanson, G. J. (1996). Genetic and statistical properties of somatic cell count and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle. *Anim. Breed. Abstr.*(64), 847–857.
- Murphy, J. M., & M., S. O. (1953). The effect of introducing small numbers of *Streptococcus agalactiae* (Cornell Strain 48) directly into the bovine teat cavity. *Cornell Vet.*(43:290.).
- Negussie, E., Strandén, I., & Mäntysaari, E. A. (2013). Genetic associations of test-day fat: protein ratio with milk yield, fertility, and udder health traits in Nordic Red cattle. *Journal of Dairy Science*(96(2)), 1237-1250.
- Nickerson, S. C. (1989). Immunological aspects of mammary involution. *Journal of Dairy Science*(72), 1665-1678.

Paape, M. J., & . (1979). Leukocytes—Second line of defense against invading mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*(62), 135-153.

Paape, M., Mehrzad, J., Zhao, X., Dettileux, J., & Burvenich, C. (2002). Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*(7(2)), 109-21.

Pegolo, S., Giannuzzi, D., Bisutti, V., Tessari, R., Gelain, M., Gallo, L., Cecchinato, A. (2021). Associations between differential somatic cell count and milk yield, quality, and technological characteristics in Holstein cows. *J Dairy Sci.*(104(4)), 4822-4836.

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.*

Piccinini R, B. E. (2007). Evaluation of milk components during whole lactation in healthy quarters. *Journal of Dairy Reserach*(74), 226-232.

Piccinini, R., Binda, E., Belotti, M., Casirani, G., & Zeconi, A. (2005). Comparison of blood and milk non-specific immune parameters in heifers after calving in relation to udder health. *Vet Res*(36), 747–757.

Randolph, H. E., & Erwin, R. E. (1974). Influence of mastitis on properties of milk. X. Fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*(57), 865-868.

Riollet, C., Rainard, P., & Poutrel., B. (2001). Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic Staphylococ- cus aureus infection. *Journal of Dairy Science*(84), 1077-1084.

Rivas, A. L., & . (2001). Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *J. Vet. Diagn. Invest.*(13), 399-407.

Ruegg, P. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*(100(12)), 10381-10397.

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

Sargeant, J., KE, L., JE, S., BJ, P., & GH., L. (2001). Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. *Journal of Dairy Science*(84), 2018–2024.

Sarikaya, H., Schlamberger, G., & Bruckmaier, R. (2005). Leukocyte populations and cytokine mRNA expression in quarter milk fractions of dairy cows at different SCC levels. *Journal of Animal Science*(83), 297-298.

Sartori, C., Guzzo, N., Mazza, S., & Mantovani, R. (2018). Genetic correlations among milk yield, morphology, performance test traits and somatic cells in dual-purpose Rendena breed. *Animal*(12(5)), 906-914.

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). The new CombiFoss 7 DC. Differential somatic cell count and other advancements in milk testing. *ICAR Technical Series*(22), 41-47.

Schwarz, D., & Diesterbeck, U. S. (2011). 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*, 94, 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, K., & Bhadwal, M. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian- Aust. J. Anim. Sci.*

Shook, G. E., & Schutz., M. M. (1994). Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. *Journal of Dairy Science*(77), 648–658.



- Sordillo, L. M. (1988). Morphometric changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *Am. J. Vet. Res.*(49), 1112–1120.
- Sordillo, L. M., Shafer-Weaver, K., & DeRosa, D. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*(80), 1851-1865.
- Spigarelli, C. (2021). *pezzata rossa e produzione lattiero casearia*. Tratto da ruminantia.it.
- Stocco, G., Pazzola, M., Dettori, M., Cipolat-Gotet, C., Summer, A., & Vacca, G. (2019). Variation in caprine milk composition and coagulation as affected by udder health indicators. *International Dairy Journal*(96), 9-16.
- Stocco, G., Summer, A., Cipolat-Gotet, C., Zanini, L., Vairani, D., Dadousis, C., & Zecconi, A. (2020). Differential Somatic Cell Count as a Novel Indicator of Milk Quality in Dairy Cows. *Animals*.
- Stoop, W. M., Bovenhuis, H., & Arendonk, J. A. (2007). Genetic parameters for milk urea nitrogen in relation to milk production traits. *Journal of Dairy Science*(90), 1981–1986.
- Taylor, B., Dellinger, J., Cullor, J., & Stott, J. (1994). Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. *Cell Immunol.*(156(1)), 245-53.
- USDA. (2002). *Dairy 2002, Part II: Changes in the United States Dairy Industry, 1991–2002*.
- Viguiet, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., & O'Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnology*(27), 486-493.
- 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.
- 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.

Zecconi, A. (2007). Le cellule somatiche nel latte influenzano sanità e qualità. *L'informatore agrario*(8).

Zecconi, A., & Zanirato, G. (2013). *Il controllo delle mastiti per un allevamento sostenibile*. Budrio.

Zecconi, A., Sesana, G., Vairani, D., Cipolla, M., Rizzi, N., & Zanini, L. (2019). Somatic cell count as a decision tool for selective dry cow therapy in Italy. *Italian Journal of Animal Science*(18).