



UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di scienza medico-veterinarie
Corso di Laurea Magistrale a Ciclo unico in Medicina Veterinaria

**DALL'ASCIUTTA TRADIZIONALE ALL'ASCIUTTA SELETTIVA
NELLE BOVINE DA LATTE, ESPERIENZA IN CAMPO**

**FROM TRADITIONAL DRY TO SELECTIVE DRY IN DAIRY COWS, FIELD
EXPERIENCE**

Relatore:
Chiar.mo Prof. Sandro Cavarani

Laureanda:
Sara Goisis

Anno Accademico 2022-2023

RIASSUNTO.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUZIONE.....	5
CAPITOLO 1 – LA MASTITE BOVINA	6
1.1 INTRODUZIONE E CLASSIFICAZIONE DELLA MASTITE.....	6
1.2 GLI AGENTI EZIOLOGICI DELLA MASTITE	9
1.3 I FATTORI PREDISponentI	12
1.3.1 CARATTERISTICHE DELLA BOVINA	12
1.3.2 L'AMBIENTE.....	14
1.3.3 IL CLIMA E LA STAGIONE.....	17
1.3.4 LA MUNGITURA.....	19
1.3.5 L'ALIMENTAZIONE E IL MICROBIOMA INTESTINALE.....	24
1.4 DIAGNOSI DI MASTITE.....	26
1.4.1 ANALISI IN CAMPO E IN LABORATORIO.....	26
1.4.2 DIAGNOSI DELL'AGENTE EZIOLOGICO	27
CAPITOLO 2 - L'USO PRUDENTE DEGLI ANTIBIOTICI NELLA TERAPIA DELLA MASTITE	30
2.1 I CIA: ANTIBIOTICI DI IMPORTANZA CRITICA	31
2.2 I PROTOCOLLI TERAPEUTICI DELLA MASTITE	33
2.2.1 TERAPIA DELLE MASTITI CLINICHE.....	35
2.2.2 TERAPIA DELLE MASTITI SUBCLINICHE	36
2.2.3 TERAPIA DELLE MASTITI CRONICHE.....	37
CAPITOLO 3 – LA MESSA IN ASCIUTTA	38
3.1 INTRODUZIONE ALL'ASCIUTTA	38
3.2 IL PERIPARTO E LE PROBLEMATICHE SANITARIE DELLA MAMMELLA	40
3.3 L'ASCIUTTA TRADIZIONALE E L'ASCIUTTA SELETTIVA	41
CAPITOLO 4 – ESPERIENZA DI CAMPO	48
CAPITOLO 5 – MATERIALI E METODI	48
5.1 DESCRIZIONE DELL'AZIENDA.....	48
5.1.1 ALIMENTAZIONE.....	52
5.1.2 LA MUNGITURA.....	55
5.1.3 PROTOCOLLI DELLA MESSA IN ASCIUTTA	58
5.1.4 LA GESTIONE DELLA MASTITE IN AZIENDA.....	61
5.2 CRITERI DI INCLUSIONE	64
5.3 METODI.....	64
5.3.1 RACCOLTA DATI.....	64
5.3.2 ANALISI STATISTICA	64
CAPITOLO 6 - RISULTATI.....	65
CAPITOLO 7- CONCLUSIONI	70
BIBLIOGRAFIA.....	71

RIASSUNTO

La mastite è una delle patologie più frequenti dell'allevamento bovino da latte ed essa rimane un punto critico da dover gestire a causa della complessa identificazione sia dei fattori di rischio sia degli interventi correttivi da applicare. Essa richiede trattamenti terapeutici e profilattici durante la lattazione e nel periodo di asciutta. Per questo motivo la terapia antibiotica ha un ruolo fondamentale, ma attualmente è oggetto di grande interesse, a causa della significativa resistenza agli antimicrobici nell'ambito della medicina veterinaria e umana. La WHO e l'AMEG hanno proposto una classificazione degli antibiotici ad uso veterinario definendo le molecole di importanza critica per la salute umana, inoltre dal 2020 è stato promulgato il Regolamento CE 2019/6 che impone dei limiti all'uso dei farmaci e antibiotici in ambito veterinario. Questo regolamento ha sancito il passaggio dalla terapia antibiotica routinaria alla messa in asciutta, all'asciutta selettiva. Lo scopo di tale studio è stato quello di monitorare la prevalenza delle mastiti cliniche in allevamento passando da un protocollo di asciutta tradizionale a quello di asciutta selettiva. È stato possibile eseguire una statistica, mediante la distribuzione del Chi-quadrato, per verificare se la variabile "mastite" fosse associata oppure indipendente dall'asciutta selettiva.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'asciutta selettiva effettuata razionalmente, mantenendo livelli di igiene adeguata, non determina un peggioramento complessivo della salute della mandria e che la percentuale delle bovine che rimangono sane a seguito del parto rimane elevata. La prevalenza delle mastiti, seppur aumentando a partire dal 2021 rispetto all'anno 2020, non varia di molto durante il tempo e la differenza tra le vacche sottoposte ai due protocolli di asciutta non è significativa. In conclusione, l'applicazione dell'asciutta selettiva deve essere fatta con criteri razionali e deve essere sempre accompagnata da una valutazione delle bovine a seguito del parto.

ABSTRACT

Mastitis is one of the most frequent pathologies in dairy cattle and it is a critical point to be managed due to the complex identification of both the risk factors and the corrective measures to be applied. It requires therapeutic and prophylactic treatments during lactation and in the dry period. For this reason, antibiotic therapy plays a fundamental role but is currently the subject of great interest, due to the significant resistance to antimicrobials in veterinary and human medicine. The WHO and the AMEG have proposed a classification of antibiotics for veterinary use by defining the molecules of critical importance for human health, furthermore, since 2020 the EC Regulation 2019/6 has been promulgated which imposes limits on the use of drugs and antibiotics in veterinary field. The aim of this study was to monitor the prevalence of clinical mastitis in breeding by switching from a traditional dry-off protocol to a selective dry-off protocol. It was possible to perform a statistic, using the Chi-squared distribution, to verify the "mastitis" variable was associated or independent of the selective dryness.

The results obtained have shown that selective dry-off carried out rationally while maintaining adequate levels of hygiene does not cause an overall deterioration in the health of the herd and that the percentage of cows that remain healthy following calving remains high. The prevalence of mastitis, although increasing from 2021 compared to 2020, it does not vary much over time and the difference between the cows subjected to the two dry protocols is not significant. In conclusion, the application of selective dry-off must be done with rational criteria and must always be accompanied by an evaluation of the cows following calving.

INTRODUZIONE

La mastite è una delle patologie maggiormente rappresentate all'interno dell'allevamento del bovino da latte. Essa è determinata da differenti fattori predisponenti, strettamente correlati tra loro, che in una situazione di disequilibrio determinano la manifestazione della patologia. La mastite è causata principalmente da batteri, che possono essere classificati come contagiosi, ambientali e opportunisti, ma anche da muffe, alghe e lieviti. Per poter gestire in maniera adeguata le mastiti è necessario effettuare la corretta diagnosi valutando l'agente eziologico, ma soprattutto le caratteristiche di sensibilità e resistenza dei batteri agli antimicrobici.

I trattamenti terapeutici e profilattici, per gestire la seguente patologia, sono eseguiti durante la lattazione e nel periodo di asciutta, e sono caratterizzati dall'utilizzo di una terapia antibiotica. Attualmente, a causa dell'antibiotico resistenza nell'ambito della medicina veterinaria e umana, gli antimicrobici sono stati classificati, dalla World Health Organization (WHO) e dall'AMEG, in relazione alle molecole di importanza critica per la salute dell'uomo. Nel 2020, inoltre, è stato promulgato il Regolamento CE 2019/6 che impone dei limiti all'uso dei farmaci, in particolare quello degli antibiotici in ambito veterinario. Questo regolamento ha determinato un forte impatto nell'allevamento bovino, infatti la terapia antibiotica routinaria alla messa in asciutta non può essere applicata, se non in presenza di batteri contagiosi. Per far fronte a questa situazione, si è suggerito di utilizzare la terapia antibiotica in asciutta solo per gli animali ammalati. Nonostante numerosi studi abbiano dimostrato come la terapia antibiotica durante l'asciutta sia utile nel sanare le infezioni mammarie presenti ma soprattutto a impedire l'insorgenza di nuove infezioni a seguito del parto (Halasa, Osteras, Hogeveen, van Werven, & Nielsen, 2009) (Halasa, Nielsen, Whist, & Osteras, 2009), diversi lavori scientifici rendono dubbia la necessaria applicazione della terapia antibiotica a tappeto in quanto gli allevamenti hanno mostrato, nel tempo, numerosi progressi riguardo il loro stato igienico-sanitario. Indubbiamente, però, l'approccio terapeutico deve essere effettuato in relazione alle caratteristiche dell'allevamento preso in considerazione, definendo i criteri di scelta degli animali da sottoporre ai diversi sistemi di messa in asciutta e valutando gli animali a seguito del parto per evitare il rischio di eventuali reazioni infiammatorie (Robert, Seegers, & Bareille, 2006) (Rajala-Schultz, Torres, & DeGraves, 2011) (Farre, Zecconi, & Kelton, 2022).

CAPITOLO 1 – LA MASTITE BOVINA

1.1 INTRODUZIONE E CLASSIFICAZIONE DELLA MASTITE

La mastite è uno dei principali problemi sanitari dell'allevamento della vacca da latte e, nonostante gli innumerevoli sforzi compiuti da veterinari e allevatori, questa patologia rimane ancora una fra le malattie più costose sia nella fase di prevenzione sia nella fase di gestione dei casi clinici. Gli aspetti preventivi di questa patologia riguardano l'igiene dell'ambiente, il management della mungitura e il trattamento in asciutta. Per gestire i casi clinici è necessario affrontare delle tematiche come la terapia farmacologia, la perdita delle produzioni dei soggetti colpiti, il peggioramento della qualità del latte, la minore resa casearia per riduzione dell'attività presamica della cagliata ed infine l'eliminazione degli animali con mastiti croniche e degli animali compromessi dal punto di vista sistemico. Per questi motivi la mastite è tuttora una delle cause più importanti di riforma in un allevamento di vacche da latte (Bertocchi, 2012).

La mastite dal punto di vista patologico è l'infiammazione della ghiandola mammaria determinata, nella maggior parte dei casi, da agenti infettivi quali batteri e in minor parte anche da lieviti, muffe ed alghe unicellulari che sono in grado di attivare nella mammella una reazione infiammatoria utile all'eliminazione o neutralizzazione degli stessi per poter tornare alla normale funzionalità. La causa primaria della mastite è quindi determinata dall'introduzione, moltiplicazione e diffusione dei patogeni all'interno della mammella con conseguente infiammazione ed infezione (Bertocchi, 2012).

Questo processo infiammatorio determina delle alterazioni a carico del tessuto secretorio, alterazione del latte dal punto di vista quali-quantitativo e può portare alla compromissione dell'animale. La produzione di latte tende a calare e si ha un peggioramento della percentuale di grasso e proteina con un incremento delle cellule somatiche.

L'aumento delle cellule somatiche è un utile indicatore della salute della mammella anche se non vi è la presenza di patogeni. Queste cellule sono per lo più costituite dai leucociti (neutrofilo, macrofagi e linfociti) di derivazione ematica, superiori al 90%, mentre una parte minore è costituita da cellule epiteliali che derivano dal tessuto mammario. Recentemente è stato possibile segnalare una particolarità riguardante le cellule epiteliali predisposte alla produzione di latte, esse infatti producono sostanze pro-infiammatorie e antibatteriche e per questo motivo sono importanti strumenti di difesa per le infezioni della ghiandola mammaria.

I leucociti sono presenti nel latte in maniera dipendente alla salute della mammella, sinora si è sempre pensato che in una situazione sanitaria adeguata i linfociti fossero i maggioritari mentre i polimorfonucleati fossero compresi tra il 4 e il 20% ma, attualmente, attraverso la misurazione delle cellule somatiche differenziali (misurazione della percentuale di polimorfonucleati e linfociti sul totale delle cellule somatiche), i dati hanno subito un cambiamento (Sarıkaya, 2006). È stato possibile constatare che i linfociti, indipendentemente dalla condizione sanitaria della bovina, si aggirano tra l'1 e il 19% e i polimorfonucleati sono all'incirca il 50% delle cellule totali (Zecconi A. Z., 2020 Jun 6).

Per argomentare questi dati è necessario tener presente che lo spostamento dei meccanismi di difesa cellulare verso un'autentica reazione flogistica si verifica già a 100.000 cell/ml di latte (Krömker, 2008,), infatti una vacca può essere considerata in salute se ogni quarto mammario contiene, nel latte prelevato ad inizio mungitura, un numero di cellule somatiche al di sotto di questo valore e inoltre deve avere una batteriologia negativa. Nel caso in cui vi sia una mastite, le cellule somatiche aumentano e di conseguenza avremo anche l'aumento dei polimorfonucleati, tuttavia, se il processo infiammatorio tende a cronicizzare, avremo una diminuzione dei polimorfonucleati che verranno ad essere sostituiti dai macrofagi.

Attualmente, mettendo in relazione la conta delle cellule somatiche e la conta delle cellule differenziali (DSCC), si sono potute classificare le bovine, in base alla fase di lattazione (fresche fino a 100 giorni, da 101 a 200 giorni e oltre i 200 giorni), in quattro classi:

- Vacche sane: bovine con cellule somatiche inferiori a 200.000 e cellule differenziali inferiori ai valori individuati per ogni categoria, come indicato nella tabella seguente.
- Vacche a rischio: bovine con cellule somatiche inferiori a 200.000 e cellule differenziali maggiori rispetto ai valori individuati per ogni categoria, come indicato nella tabella seguente.
- Vacche a rischio di cronicizzazione: bovine con cellule somatiche superiori a 200.000 e cellule differenziali minori rispetto ai valori individuati per ogni categoria, come indicato nella tabella seguente.
- Vacche con mastite subclinica: bovine con cellule somatiche superiori alle 200.000 e cellule differenziali maggiori rispetto ai valori individuati per ogni categoria, come indicato nella tabella seguente (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

Fase di lattazione (gg)	Conta cellule totale	DSCC	Stato sanitario
Giorni di lattazione ≤ 100	≤ 200.000 u/ml	≤ 66,3	Sane
		> 66,3	A rischio
	> 200.000 u/ml	≤ 66,3	Subcliniche a rischio cronicità
		> 66,3	Mastite subclinica
100 < giorni di lattazione ≤ 200	≤ 200.000 u/ml	≤ 69,2	Sane
		> 69,2	A rischio
	> 200.000 u/ml	≤ 69,2	Subcliniche a rischio cronicità
		> 69,2	Mastite subclinica
Giorni di lattazione >200	≤ 200.000 u/ml	≤ 69,3	Sane
		> 69,3	A rischio
	> 200.000 u/ml	≤ 69,3	Subcliniche a rischio cronicità
		> 69,3	Mastite subclinica

Figura 1. Valori soglia per la conta differenziale e interpretazione per definire lo stato sanitario. (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020)

Per quanto riguarda le cellule somatiche è necessario avvalersi anche del Reg. CE 853/2004, che stabilisce le norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, il quale ha posto dei limiti per quanto riguarda il contenuto di queste ultime. Le cellule somatiche devono essere inferiori alle 400.000 cell/ml e la carica batterica totale deve essere inferiore a 100.000 ufc/ml (Moroni, 2007).

La classificazione della mastite si basa sul ritrovamento dei patogeni all'interno del latte, sull'eventuale presenza di segni clinici dell'animale e sul contenuto cellulare del latte stesso. L'infezione può essere rilevata precocemente ma anche durante gli stati patologici più gravi come nella mastite subclinica o clinica. L'infezione latente è presente quando si verifica una mancata risposta cellulare; infatti, le cellule somatiche sono inferiori alle 100.000 cellule/ml, vi è l'assenza di alterazioni del secreto mammario, l'animale non è compromesso, ma l'esame batteriologico risulta positivo. Una reazione infiammatoria, tipica delle fasi iniziali o finali di una forma subclinica o clinica, è caratterizzata dalla presenza di cellule somatiche tra le 100.000 e le 200.000 per ml di latte, ma la batteriologia risulta essere negativa.

La mastite si può definire subclinica, quando l'esame colturale batteriologico è positivo o negativo, ed è presente un contenuto di cellule somatiche superiore alle 200.000 per ml di latte. In presenza di segni clinici, saremo di fronte a una mastite clinica che si manifesta con l'alterazione dell'aspetto macroscopico del latte e/o della mammella. La mammella presenta le caratteristiche tipiche di una infiammazione, appare più voluminosa, arrossata, presenta una secrezione ridotta e inoltre risulta dolorante per l'animale. Il latte conterrà frustoli di fibrina, fiocchi oppure potrà presentare un aspetto di tipo sieroso.

La mastite clinica si classifica in tre diverse forme, in relazione alla gravità delle manifestazioni che si presentano nell'animale. La forma lieve è caratterizzata dalla presenza di alterazioni a livello del secreto mammario e il quarto mammario colpito si presenta normale. La forma lieve si differenzia dalla forma moderata in quanto quest'ultima può dimostrare un risentimento a livello del quarto mammario colpito con la manifestazione di eventuale edema e più frequentemente con dolore e rossore. In alcune evenienze è possibile riscontrare la presenza dell'alterazione solo a livello della mammella, in particolare nel quarto colpito, ma senza che vi sia una modificazione del secreto mammario. La forma più grave si manifesta quando, oltre ai sintomi precedentemente citati, si presenta un problema di ordine generale e la vacca può avere un calo della produzione latte, può manifestare inappetenza ed infine anche la febbre. Generalmente questa tipologia di forma si manifesta improvvisamente.

Le mastiti cliniche e subcliniche possono, inoltre, evolvere in un quadro ben peggiore ossia, nel caso in cui gli animali non vengano adeguatamente trattati oppure non si abbia la guarigione completa, si avrà la tendenza al manifestarsi di una mastite cronica.

La mastite cronica si verifica quando l'infezione mammaria è persistente, cioè quando è presente per un periodo superiore alle quattro settimane, oppure quando vi è un costante aumento delle cellule somatiche, sempre superiore alle quattro settimane. Il quadro di mastite cronica si associa anche alla presenza dell'alterazione del parenchima mammario, presentando noduli o indurimenti del tessuto (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

1.2 GLI AGENTI EZIOLOGICI DELLA MASTITE

I batteri sono la causa principale della mastite e si ritiene che le specie coinvolte in questo processo siano almeno 130. Generalmente le infezioni sono sostenute principalmente da Gram positivi, tuttavia anche i Gram negativi sono coinvolti nel determinismo della patologia e, in misura minore, anche i micoplasmi. Negli ultimi anni sono state riscontrate delle infezioni da *Prototheca Spp.*, alghe unicellulari che instaurano una reazione flogistica importante nelle bovine, e anche delle infezioni determinate da lieviti e muffe. Questi ultimi agenti patogeni sono generalmente di natura iatrogena in quanto vengono ad essere inoculati attraverso l'ausilio di sospensioni intramammarie, utilizzate per i trattamenti fitoterapici. La reazione flogistica che avviene a livello della mammella è determinata dalla traslocazione dell'agente patogeno dal capezzolo alla mammella; tuttavia, vi sono alcune eccezioni rappresentate da infezioni sistemiche causate da salmonelle, da micoplasmi oppure nel caso di listeriosi, la quale può avere anche una

localizzazione a livello della ghiandola mammaria. Attualmente, alcuni studi, hanno ipotizzato la possibilità che ci possa essere una traslocazione batterica dall'intestino verso la mammella, ma non si hanno ancora delle conferme a riguardo.

I batteri responsabili della mastite sono classificati, in relazione al loro serbatoio, in:

- Contagiosi
- Ambientali
- Opportunisti

I batteri contagiosi come *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis* e micoplasmi hanno come reservoir l'animale infetto a livello mammario e non solo; infatti, nel caso dei micoplasmi, il serbatoio viene ad essere la bovina infetta anche a livello di altri apparati ed organi come nel caso della trasmissione attraverso secreti dell'apparato respiratorio. La via di trasmissione di questi patogeni è molteplice, a partire dalle mani dell'operatore addetto alla mungitura sino all'utilizzo degli stracci o carta, per la pulizia delle mammelle di vacche diverse prima della mungitura, ma la principale via è rappresentata dall'impianto di mungitura. È stato dimostrato come lo *S. aureus* possa determinare infezione a livello mammario attraverso l'atteggiamento di suzione di mammelle sane da parte di bovine infette a livello mucosale. Anche le sale parto contaminate da questo batterio possono essere una fonte di infezione per le bovine sane, in quanto avremo la perdita di colostro dalle mammelle delle bovine infette che si stanno preparando al parto. Secondo studi americani questo patogeno può essere anche veicolato dalle mosche. Il target di questi patogeni sono sicuramente tutti gli animali che non presentano già l'infezione e benché ci sia una risposta anticorpale da parte dell'animale non vi è la dimostrazione che questa sia adeguata a proteggere la bovina dall'infezione.

I batteri ambientali coinvolti nel processo patologico che danno origine alla mastite possono essere Gram positivi oppure Gram negativi. Tra i Gram positivi sono presenti gli streptococchi differenti da *Str. agalactiae* come *Str. uberis*, *Str. bovis*, *Str. faecalis*, *Str. dysgalactie*, *Str. canis*, mentre tra i Gram negativi si annoverano gli *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.* e altri. Il serbatoio di questi batteri è rappresentato dall'intestino degli animali, dalle aree contaminate da feci e quindi dalla stabulazione delle bovine. L'igiene è fondamentale in quanto la via di trasmissione è determinata dall'imbrattamento e deturpamento del capezzolo da parte delle feci e successivamente, a seguito della risalita batterica a livello della mammella, si determinerà l'infezione.

Anche la mungitura può essere considerata una via di trasmissione dei patogeni descritti in precedenza ma, in questo caso, vi deve essere una condizione igienica precaria. Le bovine che presentano delle modificazioni a carico del capezzolo, in particolare a livello dello sfintere, sono maggiormente sensibili alle infezioni, a causa della mancanza della barriera protettiva offerta da questa struttura anatomica, così come le bovine che nella loro carriera produttiva abbiano avuto una mastite clinica, a causa dei danni procurati all'epitelio mammario.

Le mastiti causate dai batteri opportunisti invece, si caratterizzano per il fatto che colpiscono generalmente gli animali che hanno modificazioni a carico della cute del capezzolo, determinate dai sistemi di mungitura inadeguati che alterano e riducono le difese messe in atto dal capezzolo stesso. A seguito della mungitura delle bovine, l'impianto deve essere sottoposto a lavaggio e disinfezione, tuttavia, se durante questa operazione l'agente disinfettante non è efficace oppure non viene ad essere svolta correttamente la procedura utile alla sanitizzazione, si può incorrere in queste mastiti. I batteri protagonisti sono il *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e altri stafilococchi coagulasi negativi.

Come esposto precedentemente, anche i lieviti e le muffe possono determinare la mastite e talora, questi patogeni, si sono potuti isolare dai campioni di latte. Per quanto riguarda le muffe è riconosciuta la loro patogenicità mentre per quanto riguarda i lieviti le opinioni sono ancora contrastanti. Le muffe possono essere introdotte all'interno della mammella in combinazione ai trattamenti fitoterapici endomammari a base di antibiotici, soprattutto alla messa in asciutta, se le procedure sono eseguite senza le più elementari prassi igieniche. Le muffe danno origine a gravi patologie, difficili da eliminare, in quanto, essendo presenti in concomitanza al principio attivo utile alla cura delle mastiti, risultano esserne naturalmente resistenti. I lieviti, invece, sono rinvenuti maggiormente nelle vacche sottoposte a trattamenti ripetuti a causa di mastiti cliniche, talvolta è anche vero che effettuando una valutazione poco precisa riguardo i lieviti si può incorrere in errore perché essi possono essere confusi con *Prototheca*. La *Prototheca* è un genere di alghe unicellulari eterotrofe, saprofite che all'interno della mammella si comportano da agente patogeno opportunisto determinando la produzione di immunoglobuline e anticorpi, esse inoltre si riproducono nei polimorfonucleati e nei macrofagi.

Prototheca spp. causa la cosiddetta prototecosi nell'uomo caratterizzata da lesioni cutanee e sottocutanee di tipo ulcerativo e in minore misura si può avere una borsite dell'olecrano, mentre nella bovina determina la mastite con un rialzo evidente delle cellule somatiche, senza dare

origine però ad una manifestazione clinica. Generalmente queste mastiti evolvono successivamente in forme croniche. Purtroppo, l'infezione è dipendente dalle caratteristiche dell'allevamento e dalle caratteristiche del patogeno, un ambiente umido con scarsa igiene determina la proliferazione di questi microrganismi. Il tratto intestinale delle bovine è il luogo ideale dove *Prototheca* si moltiplica e quindi le feci risultano essere il mezzo principale per la veicolazione del patogeno. Per questo tipo di microrganismo non sono disponibili terapie e, per questo motivo, l'unica soluzione è la riforma delle bovine che presentano l'infezione. Il riconoscimento dell'agente causale della mastite è necessario al fine di effettuare il controllo delle infezioni e soprattutto per predisporre terapie adeguate alle normative e che rispettino la sostenibilità degli allevamenti e la sicurezza degli alimenti (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

1.3 I FATTORI PREDISPONENTI

L'interazione tra animale, ambiente e microrganismo è essenziale per il determinismo della mastite ma, affinché si instauri il processo flogistico, devono verificarsi alcune condizioni che possono indurre l'evasione dei sistemi di protezione messi in atto dalla ghiandola mammaria (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

1.3.1 CARATTERISTICHE DELLA BOVINA

La prima protezione contro l'accesso dei patogeni è l'attività di immunocompetenza svolta dalla ghiandola mammaria, la quale è determinata dall'insieme dei fattori anatomici, umorali e cellulari. Essa varia nel corso della lattazione ed ha una depressione durante il periodo del parto, in relazione all'avvio della produzione latte, allo stress ormonale e metabolico che la vacca subisce nel medesimo periodo (Bronzo, et al., 2020).

L'anatomia dell'apparato mammario viene ad essere determinata dalla genetica. Animali con apparati mammari sbilanciati, con legamenti lassi e che tendono a portarsi verso il terreno, presentano maggiore rischio di sviluppare una reazione flogistica. In particolar modo, è importante l'anatomia del capezzolo, dipendente non solo dalla genetica, ossia la predisposizione di un soggetto ad una particolare risposta, ma anche dal legame con altri caratteri come la correlazione genetica con la produzione di latte o con le cellule somatiche, ma anche dall'ambiente, dalle condizioni climatiche, dall'igiene della stalla ma soprattutto dalla mungitura. Normalmente l'epitelio del dotto del capezzolo ha la funzione di produrre la cheratina, che blocca fisicamente i batteri e possiede un'attività batteriostatica (Bronzo, et al., 2020).

Qualora la mungitura avvenga in maniera scorretta, come nel caso della sovramungitura, l'epitelio del dotto del capezzolo può andare incontro ad una ipercheratosi con eccessiva produzione di cheratina che, a livello dello sfintere, compromette la sua funzionalità. L'ipercheratosi viene valutata utilizzando un punteggio che va da 1 a 4 come indicato nell'immagine, dove il punteggio minimo di 1 indica un capezzolo normale, mentre il punteggio massimo di 4 indica che il capezzolo è compromesso.

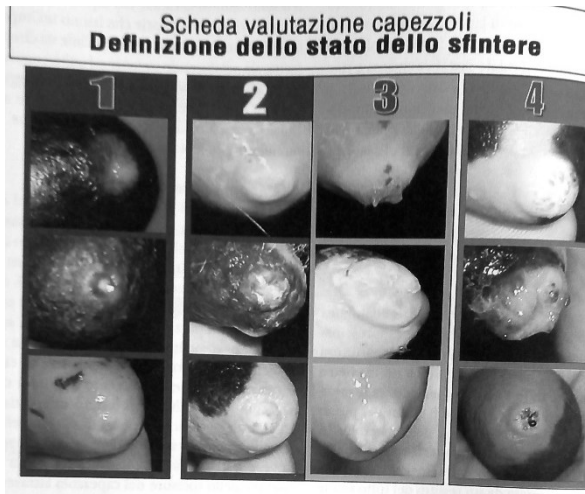


Figura 2. (punteggio 1: capezzolo a punta liscia e piccola; punteggio 2: capezzolo con lieve anello attorno all'orifizio con screpolature assenti; punteggio 3: capezzolo con la presenza di un anello con screpolature e parti di cheratina sulla punta; punteggio 4: capezzolo con anello abbondante di cheratina con evidenti screpolature e fessurazioni (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

Lo stato della vacca, perciò, è un elemento di fondamentale importanza. L'ordine di parto e lo stadio della lattazione hanno dimostrato un impatto notevole sulle condizioni del capezzolo, confermato dallo studio in campo citato nell'articolo "Heritability of Teat Condition in Italian Holstein Friesian and Its Relationship with Milk Production and Somatic Cell Score", di Francesco Tiezzi, Antonio Marco Maisano, Stefania Chessa, Mario Luini e Stefano Biffani. Nello studio si è potuto constatare che le primipare mostravano un'incidenza del 75% del punteggio 1, mentre le pluripare scendevano al 50%. Si evince che solo metà delle vacche, a metà carriera produttiva, avrebbe mostrato punteggi equivalenti a 1 (assenza di callosità), mentre il restante 50% avrebbe mostrato qualche forma di callosità. Tuttavia, il peggioramento non sembrava andare oltre il punteggio 2 (presenza di lieve callosità), dal momento che l'incidenza dei punteggi aggregati 3 e 4 si aggirava sempre intorno al 10%, su tutte le lattazioni. I capezzoli anteriori mostravano più alta incidenza dei punteggi 3 e 4 rispetto ai capezzoli posteriori.

Durante la progressione della lattazione, sembra esserci un peggioramento delle condizioni del capezzolo che inizia al nono mese della prima lattazione e, a inizio seconda lattazione si nota la stessa incidenza di ipercheratosi che si trovava alla fine della prima lattazione.

Si potrebbe pensare che l'effetto cumulativo della mungitura possa determinare questa condizione e che raramente viene poi risolta durante l'asciutta (Tiezzi, 2020 Dec 2,).

Le altre componenti principali che vanno a costituire l'immunocompetenza della ghiandola mammaria sono l'espressione di recettori per le componenti invariate dei batteri all'interno dell'epitelio del dotto. Questi recettori riconoscono i batteri, attivano i geni della risposta infiammatoria e inducono la secrezione di citochine, peptidi antibatterici. Anche i fattori umorali antibatterici, quali lisozima, lattoferrina, transferrina, defensine, catelicidine e mieloperossidasi, sono una linea di difesa importante insieme all'attività fagocitaria dei macrofagi (fisiologicamente presenti) e dei granulociti neutrofilici (provenienti per lo più dal sangue in seguito a stimoli chemiotattici). Sono presenti anche linfociti B, pochi linfociti T e anticorpi (IgG1, IgG2, IgA, IgM). Va sottolineato soprattutto il ruolo delle cellule epiteliali della ghiandola mammaria, perfettamente in grado di riconoscere i batteri infiltrati e di montare una risposta basata su mediatori flogistici e peptidi antimicrobici (defensine, catelicidine, calprotectina) (Bronzo, et al., 2020).

1.3.2 L'AMBIENTE

Oltre al fattore animale, la correlazione tra la mastite e l'ambiente non è un fattore da sottovalutare. Le mastiti ambientali sono causate da batteri come *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, che vivono e si replicano nell'ambiente di stabulazione delle bovine. La patologia si viene a manifestare quando, all'interno dell'ambiente, aumenta il numero di batteri o nel caso in cui venga a mancare la difesa immunitaria determinata dalla ghiandola mammaria e dalla bovina stessa. Molto spesso, questo tipo di infezione può essere provocata anche dagli insetti, tra cui i ditteri più comunemente presenti nell'allevamento che danno origine alla cosiddetta mastite estiva.

La carenza di igiene fa da capo saldo in questo tipo di affezione per cui risulta essere di particolare importanza il numero di animali e la loro densità sulla superficie dell'allevamento, la tipologia delle strutture presenti nell'allevamento (lettiera, pavimentazione, sistemi di rimozione delle feci, sistemi di raffrescamento,) la loro condizione igienica e di conseguenza quella delle bovine ma anche la gestione di queste strutture. L'ambiente che ospita gli animali li può esporre in maniera differente all'azione degli agenti patogeni, influenza il benessere degli animali e le loro produzioni. L'ambiente non è altro che l'insieme delle condizioni fisiche (stabulazione, temperatura, umidità, ventilazione, vettori) che influenzano lo sviluppo dei microrganismi presenti in allevamento.

Gli agenti patogeni classificati come ambientali, solitamente, non sono in grado di sopravvivere per molto tempo sulla cute della mammella perché hanno la necessità di materiale organico che funge da substrato per la loro crescita, e il loro sviluppo è implementato dalle temperature elevate e dall'umidità. Queste caratteristiche non sono difficili da riscontrare nella stabulazione degli animali, la lettiera infatti costituisce un ottimo pabulum di crescita per i patogeni ambientali. Inizialmente, i materiali utilizzati per costituire la lettiera (paglia lunga o trinciata, segatura, trucioli, deiezioni disidratate, sabbia, materassini in gomma) non sono un problema perché in essi sono poco presenti i microrganismi patogeni, soprattutto se si tratta delle lettiere inorganiche (materassini in gomma) ma è solo successivamente che, contaminandosi con le feci ed urine degli animali, determineranno l'esponenziale aumento della crescita dei microrganismi (Mariani, 2004) (Schreiner, 2003 Nov).

Le lettiere tradizionali, costituite prevalentemente da paglia o segatura, sono caratterizzate da proprietà fisiche che possono influenzare l'igiene degli animali, esponendoli ad una forte contaminazione della mammella. La paglia lunga, ad esempio, è un elemento di comfort per la bovina ma, se ci si trova in un contesto di una lettiera permanente, dove paglia e deiezioni permangono per lungo tempo e vi è un ambiente umido e poco ventilato, avremo uno stato sanitario della mandria che sarà precario (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020). *Str. uberis* si trova molto spesso nella paglia con elevata umidità e che è andata incontro ad ammuffimento, mentre nel letame vi è il ritrovamento di enterococchi e coliformi (Krömker, 2008,).

La segatura e i trucioli possono essere costituiti da legni "duri" oppure da legni "teneri", questi ultimi possedendo al loro interno resine ed oli che non favoriscono la crescita dei batteri sono sicuramente migliori per costituire la lettiera (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020). I batteri del genere *Klebsiella* sono comuni nelle lettiere costituite da questi materiali, soprattutto se sono di cattiva qualità (Krömker, 2008,).

Per la costituzione delle lettiere può essere utilizzato il cosiddetto "separato", ossia un materiale ottenuto dalle deiezioni animali che subiscono un processo di essiccamento e riciclo, e che presentano un contenuto di sostanza secca tra il 30% e il 40% in relazione al tipo di separazione che viene ad essere effettuata. Il "separato" deve rispettare anche il Regolamento UE 1069/2009, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale. La problematica principale di questo materiale è che, se l'umidità raggiunge livelli elevati, si ha un incremento della carica

batterica. Il digestato, proveniente dai biogas per la produzione di energia, può essere considerato molto simile al “separato”, tuttavia, considerando che i patogeni, i quali possono dare origine a mastiti, vengono abbattuti in maniera limitata e vi è una mancanza di dati relativa alla sicurezza di questo materiale, non è facile effettuare una corretta valutazione di quest’ultimo se utilizzato come lettiera (Costa, 2017).

La sabbia sarebbe il materiale più appropriato per la costituzione di una lettiera perché ha l’attitudine a drenare i liquidi, è inorganica e per questo non favorisce la moltiplicazione dei batteri ed inoltre è correlata a minori lesioni agli arti. Questa tipologia di lettiera è utilizzata maggiormente in USA e nel Nord Europa ma per ragioni di costi e per una maggiore difficoltà al suo impiego, viene ad essere poco utilizzata nel nostro Paese. L’utilizzo delle lettiere inorganiche, come ad esempio i materassini, ha il vantaggio di poter adoperare minor materiale per la propria copertura anche se una minima quantità di paglia o segatura deve essere necessariamente impiegata, per evitare abrasioni agli arti e per determinare un buon utilizzo da parte delle bovine (Godden, 2008).

La gestione della stabulazione, per questi motivi, è fondamentale e si può incorrere facilmente in errore valutando idonea una lettiera dove in realtà vi è un quantitativo innumerevole di patogeni che continueranno a moltiplicarsi. Più il materiale che è utilizzato come fondo per la lettiera è trinciato finemente, più si offre superficie di utilizzazione ai batteri ed inoltre si avrà una maggiore adesione del materiale alla mammella. Se si parla di lettiera è utile considerare anche il ruolo degli insetti che fungono da vettori dei microrganismi, per questo motivo sarebbe utile avvalersi di un’ottima pulizia per limitarne la presenza evitando il loro ingresso nell’ambiente ed eliminare gli insetti presenti, soprattutto in estate, mediante l’utilizzo di trattamenti adeguati che ne determinano la disinfestazione (Schreiner, 2003 Nov).

Gli insetti svolgono un ruolo fondamentale soprattutto per quanto riguarda le mastiti nelle vacche primipare. La prevenzione delle mastiti in questi animali è basata sul controllo delle mosche durante la vita da manza e bisogna evitare che altri animali della stessa categoria vadano a determinare il fenomeno di suzione reciproca. È necessaria un’ottima alimentazione ed è utile implementare il livello di igiene e il confort degli animali soprattutto nel periodo vicino al parto (De Vlieghe, 2012 Mar).

Per prevenire questo tipo di situazione è necessario determinare un controllo sul THI (Temperature-Humidity Index) della stalla e implementare la ventilazione in modo da creare un

ambiente più asciutto e meno adatto ad ospitare dei microrganismi. I materiali utilizzati per il rifacimento della lettiera devono essere tenuti nelle migliori condizioni, evitando il loro inquinamento. Non devono essere esposti alle piogge o all'eccessiva umidità e non dovrebbero rimanere a contatto con il terreno umido (Krömker, 2008,). In questa situazione, per ridurre la carica batterica della lettiera può essere utile l'intervento della calce in polvere o di altri disinfettanti aggiunti due volte al giorno sulla lettiera (Mariani, 2004).

Un altro strumento utile al monitoraggio della pulizia degli animali è lo schema di "hygiene score", ideato da un gruppo di ricercatori americani che prevede l'assegnazione a tre diverse aree anatomiche (arti, fianchi e mammelle) di un punteggio da 1 a 4, dove il punteggio 1 indica una pulizia ottima mentre il punteggio 4 indica un imbrattamento molto esteso.

Nel 2003, gli ideatori di questo schema effettuarono uno studio con l'obiettivo di determinare il legame tra il valore dell'hygiene score degli arti e delle mammelle di bovine, in lattazione, e la presenza della mastite subclinica. La ricerca si avalse di un elevato numero di campioni; infatti, vennero prese in considerazione 1250 bovine provenienti da otto allevamenti. Nella relazione sono stati comparati i livelli di carica batterica dei campioni di latte con il punteggio dell'igiene delle mammelle e degli arti ed inoltre questo ultimo è stato ragguagliato mensilmente ai valori delle cellule somatiche. Il tipo di lettiera, la fase della lattazione e la consistenza delle feci, possono concorrere a questo punteggio. È stato utile constatare che la carica batterica era decisamente più elevata negli animali con punteggio tra 3 e 4, mentre gli animali con un punteggio di 1 e 2 presentavano una minore contaminazione microbica del latte. La cura della stabulazione degli animali è fondamentale per garantire il benessere e di conseguenza anche per evitare di incorrere nella presenza di infezioni mammarie (Schreiner, 2003 Nov).

1.3.3 IL CLIMA E LA STAGIONE

Altri fattori che incidono notevolmente sulla presenza delle infezioni mammarie sono il clima e la stagione. La bovina si trova in una condizione di comfort termico se le temperature si aggirano tra i 5 e i 25°C, al di sotto di queste temperature ma soprattutto quando la temperatura supera i 25°C, la bovina si troverà in una situazione di stress termico. L'ambiente dovrebbe essere gestito correttamente per evitare il più possibile queste variazioni di temperatura per non compromettere il benessere degli animali ma anche per evitare, come detto in precedenza, la crescita esponenziale dei microrganismi. L'aumento delle temperature induce la bovina ad entrare in una condizione di stress da caldo ma bisogna ricordare che questo parametro viene ad

essere influenzato dall'umidità, per questo motivo viene ad essere preso in considerazione un indice più preciso che è il THI (Temperature-Humidity index). Se il THI supera il valore di 72 avremo una condizione di stress, se i valori aumentano fino ad arrivare a 79 avremo una condizione pericolosa per l'animale. È necessario ricordare che lo stress è una fonte potenziale di soppressione immunitaria in senso lato, infatti, in presenza di stress da caldo, vi è una modificazione del metabolismo della vacca e una ridotta assunzione di cibo che determinano un risentimento generale, ma questo fattore non è in grado di determinare, da solo, un aumento della frequenza delle mastiti. Se a questa condizione si aggiunge l'aumento della crescita dei batteri nell'ambiente, che è ottimale al superare dei 32°C, il sovraffollamento e l'ammassamento degli animali nelle zone della stabulazione più fredde come, ad esempio, le corsie di passaggio o nella zona di esercizio dove gli animali si coricano all'interno del liquame e la mancata attenzione da parte dell'allevatore, avremo le condizioni ottimali per il manifestarsi della patologia. È fondamentale che le bovine siano raffrescate durante il periodo di stress da caldo attraverso l'utilizzo di ventilatori e attraverso l'aspersione o nebulizzazione dell'acqua, molto spesso però si osserva che l'acqua in eccesso sia negli ambienti, sia sull'animale aumenta la probabilità di incorrere nella mastite. È utile a tal proposito, verificare che l'acqua non percoli sulla mammella delle vacche e che l'acqua presente sul dorso perduri per un tempo limitato. Si è potuto osservare come negli allevamenti si abbia un aumento delle mastiti subcliniche e delle infezioni latenti nei mesi di maggio e giugno e che queste condizioni precedano l'infezione clinica che si osserva successivamente a luglio e ad agosto (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

Secondo uno studio effettuato su 300 aziende da latte olandesi, eseguito per analizzare la corrispondenza tra la stagione e la mastite, si è potuto notare che nel latte di massa ad agosto e settembre vi era un picco di cellule somatiche, mentre in agosto aumentavano le cellule somatiche individuali e queste si mantenevano elevate anche a maggio. Nel periodo di agosto, inoltre, si è potuto constatare un aumento delle mastiti sostenute da *Streptococcus uberis* associate alla possibilità degli animali di accedere al pascolo, le mastiti sostenute da patogeni diversi da *Str. uberis* si sono riscontrate, invece, nei mesi di dicembre e gennaio. Per quanto riguarda la mastite da *Escherichia Coli* il picco di maggiore incidenza si è rilevato in estate (Olde Riekerink, 2007 Apr).

Secondo lo studio effettuato presso il laboratorio del DIVET dell'università di Milano in cui sono stati presi in considerazione circa 160.000 quarti mammari, si è potuto osservare che la frequenza

della mastite durante l'anno è circa del 15% ma vi sono dei rialzi nei periodi estivi concomitanti alle infezioni cliniche e infezioni latenti. Si può giungere quindi alla conclusione che le mastiti cliniche siano maggiormente rappresentate nel periodo estivo (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

1.3.4 LA MUNGITURA

La mungitura è il fattore di rischio più significativo per la salute della mammella e il mantenimento di una adeguata procedura è essenziale per assicurare il benessere delle bovine e una valida qualità igienico sanitaria del latte. La gestione sanitaria della mammella è un compito fondamentale che dovrebbe essere intrapreso dal medico veterinario, il quale è in grado di valutare i problemi legati alla mungitura compresa la funzionalità delle macchine che effettuano questo processo.

Ovviamente per poter parlare di mungitura bisogna soffermarsi sul meccanismo di eiezione del latte. Tramite stimoli visivi, uditivi e tattili avviene l'attivazione della parte posteriore dell'ipofisi la quale permette il rilascio in circolo dell'ossitocina. Essa raggiunge la ghiandola mammaria e attiva i recettori delle fibre muscolari che si trovano attorno agli alveoli mammari, eseguendo in questo modo un'azione di spremitura del latte verso i dotti alveolari e grossi dotti per poi finire nella cisterna della mammella. Questo meccanismo ha una durata di 60 secondi e di conseguenza tutte le azioni svolte dall'operatore addetto alla mungitura, a partire dalla detersione del capezzolo fino all'attacco della macchina mungitrice, devono essere eseguite in almeno 60 secondi. L'attacco del gruppo di mungitura, però, non può essere posticipato eccessivamente in quanto l'emivita dell'ossitocina è all'incirca di 90-120 secondi e una volta superato questo tempo potremmo incorrere in una difficoltà maggiore nella mungitura delle bovine. La presenza di una situazione stressante, che determina paura nell'animale, oppure un'inadeguata preparazione della mammella e condizioni di dolore, come ad esempio in presenza di una mastite subclinica, inducono un minor rilascio di ossitocina che non permette un'eiezione adeguata del latte. Per questo motivo è utile avere un'idonea preparazione della mammella e che successivamente l'impianto di mungitura esegua le procedure in maniera corretta.

Le fasi della mungitura sono quattro:

- Fase di apertura
- Fase di flusso
- Fase di chiusura

- Fase di massaggio

Nella prima fase viene ad essere applicato il vuoto nella camera di pulsazione, in questo modo la guaina del capezzolo si allontana favorendo la fuoriuscita del latte in quanto il vuoto presente nel tubo corto del latte arriva allo sfintere del capezzolo. Nella fase di flusso, invece, si ha la massima espansione della guaina e il latte viene allontanato procedendo dal tubo corto del latte, dove vi è presente il vuoto, al collettore, al tubo lungo del latte e successivamente convogliato nel lattodotto. Il vuoto, se il flusso di latte è insufficiente, andrà ad operare sullo sfintere del capezzolo causandone delle modificazioni a lungo e a breve termine. Nella terza fase ossia quella di chiusura, il vuoto viene ad essere interrotto a livello della camera di pulsazione e in questo modo la guaina, al di sotto del capezzolo, si viene ad avvicinare. In questa fase, se i capezzoli sono molto lunghi oppure hanno delle forme inadeguate non permettono l'adesione della guaina e di conseguenza il capezzolo viene esposto continuamente al vuoto. L'ultima fase è caratterizzata dalla compressione del capezzolo da parte della guaina, utile per ristabilire la sua microcircolazione mediando, in questo modo, l'azione del vuoto effettuata in precedenza. Questa fase è molto rischiosa perché, se mal eseguita, può alterare il tessuto del capezzolo riducendone le difese immunitarie aspecifiche, esponendo l'animale a una maggiore probabilità di avere infezioni mammarie. Il problema è maggiormente rappresentato negli animali che hanno i capezzoli piccoli, come nelle bovine primipare, ma questo può essere ovviato utilizzando guaine di dimensioni adeguate agli animali presenti in mandria.

Il tessuto del capezzolo è irrorato da vasi sanguigni che risentono del vuoto che viene ad essere applicato con la mungitura e, come citato in precedenza, le difese e il tessuto stesso si possono alterare fino alla totale compromissione, soprattutto se la frequenza della pulsazione è superiore a 60 pulsazioni al minuto e/o nel caso in cui il rapporto delle fasi di mungitura sia pari o superiore a 70:30 e quindi estremamente a favore delle prime fasi. Un altro fenomeno che deve essere evitato è il cosiddetto "arrampicamento" dato dal maggiore inserimento del capezzolo nella guaina quando il vuoto non viene ad essere ostacolato da un flusso di latte sufficiente. Si può notare, a seguito di questo fenomeno, la presenza di un anello alla base del capezzolo.

Le alterazioni del tessuto possono essere a breve termine oppure a lungo termine. Per quanto riguarda le alterazioni a breve termine, si vedono generalmente a seguito della mungitura, sono transitorie e dovute principalmente a modificazioni del sistema circolatorio della zona interessata; infatti, i vasi sanguigni, a livello dell'entrata della guaina, risultano parzialmente

obliterati. Si avranno inoltre dei fenomeni di accumulo di liquido a livello del tessuto interstiziale, causati dall'aumento della permeabilità dei capillari, indotti dallo stiramento del capezzolo che talvolta raggiunge anche il 35%. La chiusura dei vasi, anche se incompleta, a livello della base del capezzolo, diminuisce il drenaggio dei vasi linfatici e delle vene causando un aumento dello spessore del capezzolo e mancanza di ossigeno ai tessuti. Molto spesso a seguito della mungitura si possono notare capezzoli di colore bluastrò, indicanti la cianosi del tessuto, possono anche essere arrossati, tumefatti e con la presenza di petecchie emorragiche.

È possibile visualizzare, non solo modificazioni a lungo termine esterne ma anche interne, l'alterazione maggiormente visibile, però, è l'eccessiva produzione di cheratina a livello dell'apice del capezzolo causata generalmente da una sovrampungitura, sia per insufficiente stimolazione della mammella sia per il distacco del gruppo di mungitura che avviene in maniera ritardata. Questo problema è facilmente visibile tramite i grafici messi a disposizione dai software collegati alla macchina mungitrice che indicano il flusso di mungitura.

Per poter prevenire tutte le condizioni descritte in precedenza è utile ricorrere a una routine di mungitura che comprenda la pulizia dei capezzoli, l'eliminazione dei primi getti di latte, l'attacco del gruppo di mungitura, lo stacco dei gruppi di mungitura ed infine la disinfezione dei capezzoli. Vi sono inoltre delle regole che dovrebbero essere rispettate per poter affrontare al meglio queste fasi; infatti, la macchina mungitrice dovrebbe essere revisionata periodicamente e l'ambiente in cui sostano gli animali, prima e durante la mungitura, deve essere tranquillo. Per motivi sanitari dovrebbero essere munte per prime le bovine sane, di seguito quelle sospette e infine le bovine infette, se nell'allevamento non vi è la presenza di gruppi sanitari si effettua prima la mungitura degli animali più giovani e con meno giorni di lattazione. Gli operatori che svolgono l'attività di mungitura devono essere dotati di guanti in lattice facilmente lavabili e disinfettabili per evitare il passaggio di batteri da una bovina all'altra.

La prima operazione da intraprendere è la pulizia dei capezzoli che è effettuata in modo tale da ridurre la probabilità di contrarre mastiti, soprattutto quelle causate dagli agenti ambientali, ma è anche un'azione utile per stimolare la produzione di ossitocina da parte della bovina. Vengono utilizzati degli schiumogeni che hanno il compito di allontanare lo sporco e presentano al loro interno basse concentrazioni di disinfettante. Purtroppo, la concentrazione dell'agente disinfettante deve essere bassa per evitare il ritrovamento di residui nel latte e inoltre il tempo di contatto del prodotto, durante la routine di mungitura, non è sufficiente ad avere un'azione

efficacie. È sconsigliato l'utilizzo dell'acqua soprattutto nel caso in cui le mammelle siano inzaccherate di feci in quanto si avrebbe un aumento del rischio di mastite. La detersione deve rispettare un tempo minimo di 30 secondi per poter permettere allo schiumogeno di agire efficacemente e successivamente la rimozione dello sporco deve essere eseguita attraverso l'utilizzo di carta monouso. In alcune aziende sono utilizzate delle salviette in tessuto riutilizzabili, lavabili a 90°C con disinfettanti adeguati, e ognuna di queste è adoperata su un singolo capo. Il capezzolo, in questo modo, risulterà pulito e asciutto, dunque pronto per lo stripping. L'eliminazione dei primi getti di latte, detto anche stripping, è una pratica eseguita su tutti i capezzoli per poter osservare il latte e la sanità di ogni singolo quarto. Generalmente il controllo può essere eseguito dirigendo i getti di latte sul pavimento oppure in appositi contenitori controllando la presenza di eventuali frustoli o fiocchi, i quali sono indicatori di una mastite clinica lieve.

L'operazione successiva è l'attacco del gruppo di mungitura che, come detto in precedenza, deve essere eseguito rispettando un tempo di attesa, cioè il tempo utile per far sì che l'ossitocina raggiunga la mammella. Se non viene rispettata questa condizione si verificherà la comparsa della mungitura bimodale dove inizialmente si avrà la sovrampungitura, infatti verrà prelevato il latte presente nella cisterna della mammella, di seguito non si avrà flusso di latte, per mancanza di ossitocina, e infine avremo il vero e proprio picco di flusso del latte. La bimodalità della mungitura è associata maggiormente a mastiti subcliniche. Per effettuare un corretto attacco del gruppo di mungitura è essenziale svolgere questa azione velocemente evitando, in questo modo, l'introduzione di aria nella fase di attacco. Lo stacco del gruppo, alla fine della mungitura, è automatico, grazie alla presenza dei flussometri che chiudono il vuoto se vi è la presenza di un flusso di latte inferiore a 400 g/min, ossia quando il flusso è basso. Anche in questa fase può avvenire il fenomeno della sovrampungitura se la macchina determina lo stacco automatico con flussi eccessivamente bassi e quando vi è un ritardo tra il momento in cui la macchina riceve il segnale di stacco e lo stacco effettivo. Il tempo adeguato allo stacco del gruppo di mungitura è pari a 20 secondi. Nelle sale di mungitura, il flusso di latte è calcolato considerando il latte proveniente da tutti e quattro i quarti ed è per questo motivo che, se un quarto o più quarti hanno un flusso inadeguato, mentre i rimanenti hanno un flusso superiore, non avremo lo stacco del gruppo e di conseguenza avremo la sovrampungitura. Nel robot di mungitura, l'operazione di mungitura è effettuata quarto per quarto e di conseguenza anche lo stacco dei bossoli è impostato in relazione al flusso di ogni quarto, in questo modo la sovrampungitura avviene

solamente in maniera irrilevante. In passato si mantenevano flussi più bassi per lo stacco (inferiori a 300 g/min) e tempi di stacco più elevati (circa 30 secondi) in quanto si riteneva che un quantitativo di latte residuale in mammella, pari a 300-500g, fosse un fattore importante per l'instaurarsi di una mastite ma attualmente è stato dimostrato che gli effetti negativi a carico del capezzolo dovuti alla sovrampungitura siano maggiormente correlati alla mastite rispetto alla presenza di latte residuale.

L'ultima azione della routine di mungitura è la disinfezione dei capezzoli, procedura di particolare importanza per l'eliminazione dei patogeni, presenti a livello dell'apice, cute e canale del capezzolo, che potrebbero causare la mastite. Questa procedura, se eseguita immediatamente, a seguito dello stacco del gruppo di mungitura, è molto efficace, tuttavia, è stato stimato che la persistenza del disinfettante a livello della cute del capezzolo è relativamente breve in quanto la permanenza di tale prodotto è di circa 60 minuti. Il disinfettante ha lo scopo di proteggere le mammelle delle bovine da eventuali contaminazioni batteriche che avvengono durante e successivamente la mungitura. Va da sé che nelle bovine maggiormente esposte alla sostanza organica, come nel caso in cui esse abbiano una zona di riposo ricca di deiezioni, il disinfettante sia meno efficace. Indipendentemente dal disinfettante utilizzato, l'applicazione corretta è fondamentale per garantire l'efficacia del prodotto. La disinfezione deve essere effettuata coprendo due terzi della lunghezza del capezzolo. Anche la scelta del disinfettante è importante, infatti i prodotti utilizzati devono essere registrati e l'efficacia può essere valutata mediante la consultazione delle prove in campo eseguite per poter registrare il prodotto. Spesso viene ad essere suggerito l'utilizzo dei prodotti filmanti rispetto ai prodotti non filmanti perché si crede abbiano una maggiore efficacia a parità di concentrazione del principio attivo, ma in realtà i disinfettanti, che hanno la proprietà di essere filmanti, hanno una maggiore propensione a trattenere il colorante e non il principio attivo e quindi hanno lo scopo di verificare con facilità la correttezza dell'applicazione da parte degli operatori. La sensazione degli operatori sulla maggiore efficacia dei prodotti è data dal fatto che il filmante, permettendo di verificare le modalità di applicazione con maggiore facilità, induca gli stessi ad applicare il prodotto con regolarità diminuendo in questo modo gli effetti dettati da una applicazione non regolare e poco costante (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

1.3.5 L'ALIMENTAZIONE E IL MICROBIOMA INTESTINALE

La nutrizione è ampiamente legata al funzionamento del sistema immunitario in quanto un animale che va incontro a carenze alimentari è più sensibile alle infiammazioni ed infezioni. Si pensa che l'eccesso di nutrienti o la carenza possano determinare la modificazione della risposta immunitaria umorale e cellulomediata. Molto spesso, nonostante vengano rispettate le norme igieniche, il patogeno può penetrare all'interno del capezzolo ed è in questa situazione che il sistema immunitario deve essere efficiente. Purtroppo, l'eccesso o la carenza dei nutrienti non è di facile valutazione nelle bovine in quanto, essendo ruminanti, svolgono processi fermentativi a carico degli alimenti all'interno del rumine e il quantitativo di alimento che oltrepassa questa barriera, per poter entrare nello stomaco ghiandolare e nell'intestino, è dipendente da numerosi fattori intrinseci all'alimento stesso. Ciononostante, i modelli matematici attualmente presenti consentono di definire abbastanza precisamente la crescita del microbiota del rumine e il quantitativo degli alimenti in grado di arrivare all'intestino. Tra gli alimenti forniti alle bovine vi è la presenza di macroelementi e microelementi minerali che hanno un ruolo fondamentale per le difese immunitarie e di conseguenza per i meccanismi di difesa messi in atto dalla mammella. Tra i macro-minerali è possibile ritrovare il fosforo, il calcio, il magnesio, il sodio e il cloro mentre tra i micro-minerali è possibile trovare il rame, lo zinco, lo iodio, il manganese, il ferro, il selenio e il molibdeno (Fantini, 2016).

Nelle bovine con carenze minerali vi può essere, inoltre, la presenza di problemi metabolici, tra cui l'ipocalcemia peripartum, l'ipofosfatemia e l'ipomagnesemia e come descritto in precedenza, a causa di queste carenze si avrà un'immunosoppressione. Il calcio è utile per numerose funzioni, è fondamentale per garantire la contrazione dei muscoli striati e i muscoli lisci, tra cui lo sfintere del capezzolo che a seguito della mungitura determina la sua chiusura evitando in questo modo l'invasione microbica del capezzolo stesso. Per questo motivo è stato dimostrato che le vacche Holstein che presentano una situazione di ipocalcemia sono più suscettibili alle infezioni mammarie (Libera, 2021 Aug 7).

Le fasi più critiche per il sistema difensivo del capezzolo della bovina sono il periodo durante la messa in asciutta, perché molto spesso vi è una diminuzione degli alimenti forniti alle bovine tra cui anche i minerali, di seguito avremo gli ultimi giorni precedenti il parto, dove la mammella è edematosa e spesso questo è determinato da un eccesso di sodio e potassio nel sangue. Infine, durante i primi giorni di lattazione l'ingestione è minore e a causa della montata latte si avrà la

perdita dei minerali con il latte, tra cui circa 60-70 g di calcio in una giornata. A causa dell'ipocalcemia vi è una minore attività di chemiotassi dei neutrofili, ovvero essi hanno una minore capacità di raggiungere l'alveolo mammario seguitamente alla produzione di molecole chemio-attraenti da parte dei macrofagi della mammella. La situazione viene peggiorata successivamente dal fatto che durante il parto vi è un quadro parafisiologico in cui vi è una minore attività fagocitaria da parte dei neutrofili (Fantini, 2016).

Per quanto riguarda il fosforo, Eisenberg et al. hanno dimostrato che la sua carenza, all'interno del circolo sanguigno, influisce in maniera negativa sulla fagocitosi e sul numero di granulociti nelle vacche Holstein in epoca di transizione, tuttavia, secondo Mullarky et al., non si sono potute notare modificazioni sull'attività fagocitica e sulla proliferazione dei linfociti. Studi su altre specie hanno potuto evidenziare, come negli individui con ipofosfatemia, il contenuto di ATP dei leucociti fosse più basso e di conseguenza ci fosse minore proliferazione e minore attività di fagocitosi. Il magnesio, invece, fa parte del sistema del complemento, ma ad oggi non vi sono ancora certezze se agisca come fattore pro-infiammatorio oppure possa determinare immunosoppressione (Libera, 2021 Aug 7).

I macrofagi e i neutrofili hanno il compito di fagocitare il patogeno e distruggerlo attraverso molecole dove è presente l'ossigeno come i ROS. Normalmente questo tipo di reazione si ha all'interno dei leucociti e per la protezione delle membrane cellulari vi sono enzimi come la glutatione-perossidasi, selenio dipendente, la superossidodismutasi, la quale è dipendente dallo zinco, dal rame e dal manganese e infine la vitamina A, E, C e i carotenoidi. Le carenze di questi microelementi possono portare a una minore attività di uccisione da parte dei leucociti e possono determinare anche la diffusione dei ROS nell'epitelio alveolare della mammella con un continuo richiamo, dal torrente circolatorio, dei neutrofili determinando in questo modo leucocitosi persistenti tipiche delle mastiti croniche. I linfociti e leucociti, i quali sono attivati dalle citochine pro-infiammatorie, hanno dei tassi di crescita elevati e per questo hanno la necessità di nutrienti, tra cui glucosio, amminoacidi e acidi grassi. Molto spesso, per far fronte a questa situazione, il fegato, il sistema immunitario e il sistema muscolare stimolano la glicogenolisi e il catabolismo amminoacidico aumentando il fabbisogno alimentare della bovina, che nella fase di transizione, si trova già in una condizione di bilancio energetico negativo. Il bilancio energetico negativo si presenta poco prima e dopo il parto in quanto vi è una richiesta elevata di nutrienti da parte del feto e successivamente dalla mammella e questa condizione viene ad essere peggiorata dalle

importanti patologie metaboliche che si presentano durante il periodo di transizione. La chetosi, sia nella sua forma clinica che quella subclinica determina la diminuzione della generazione delle citochine pro-infiammatorie e riduzione dell'attività neutrofilica. Anche l'acidosi ruminale, presente nel periodo di transizione, attraverso la produzione di endotossine che passano nel torrente circolatorio, consente un aumento notevole delle citochine pro-infiammatorie. In questa situazione viene a modificarsi anche l'epitelio delle papille del rumine alterando il profilo dell'espressione genica (Fantini, 2016) e si ha una disbiosi digestiva con un aumento della permeabilità intestinale che, secondo lo studio condotto da Hu e coll., può indurre la mastite. È stato possibile, inoltre, verificare che i più bassi livelli di cellule somatiche all'interno del latte siano interdipendenti alla presenza di batteri che aumentano la quota di acidi grassi volatili a livello del rumine e alla presenza di popolazione di batteriche benefiche commensali. (Wang e coll., 2021; Urakawa e coll., 2022). La mucosa ruminale e intestinale, essendo esposta ogni giorno e continuamente a delle sostanze, è l'organo che è maggiormente sollecitato immunologicamente, ricordando inoltre che circa il 75% delle cellule immunitarie si trova a livello intestinale (Roberti, 2023).

1.4 DIAGNOSI DI MASTITE

1.4.1 ANALISI IN CAMPO E IN LABORATORIO

Per gestire al meglio il problema delle mastiti è necessario ricorrere alla sua diagnosi e questo comporta anche il riconoscimento degli agenti patogeni e la loro sensibilità agli antibiotici. Sia in campo che in laboratorio vengono ad essere disponibili molteplici metodi per diagnosticare tale patologia, ovviamente ogni test presenta le sue caratteristiche di specificità e sensibilità. Non sempre è garantita l'identificazione dello stato sanitario della ghiandola mammaria e questo può essere un problema per gli eventuali interventi terapeutici che possono essere intrapresi e che possono portare a una mancanza del controllo delle infezioni mammarie. Con la diagnosi si possono ottenere diversi obiettivi, ad esempio, l'individuazione dell'agente patogeno e l'eventuale terapia efficace, il riconoscimento delle bovine a rischio e definizione dello stato di salute delle bovine.

Per la diagnosi dello stato di salute delle bovine è necessario classificare la tipologia di mastite, ossia clinica e subclinica. È utile ricordare che la mastite clinica è facilmente riconoscibile in quanto concomitante a segni clinici. In questo tipo di situazione il prelievo di latte è utile solamente per l'individuazione dell'agente eziologico. Per poter eseguire l'indagine eziologica è

necessario prelevare il latte dai quarti delle bovine interessate dalla sintomatologia. Successivamente la mastite sarà classificata in lieve, moderata e grave.

Per quanto riguarda la mastite subclinica è doveroso valutare la conta delle cellule somatiche per poter effettuare una diagnosi, anche in questo caso è possibile ricercare l'agente eziologico. Per poter definire o meno la presenza di mastite non è necessario rilevare il patogeno; infatti, è la conta delle cellule somatiche il parametro da valutare, ed esse devono essere inferiori a 200.000 cellule/ml di latte. In questa situazione è utile effettuare dei prelievi per diagnosticare la mastite subclinica che possono essere eseguiti dall'associazione regionale allevatori per il controllo funzionale, oppure si può eseguire un prelievo dei quattro quarti in pool di una bovina oppure si può effettuare un campione di latte per singolo quarto. Il prelievo effettuato per il controllo funzionale presenta un'accuratezza bassa, infatti, il costo è relativamente contenuto. Se il latte di una bovina presenta un contenuto cellulare superiore a 200.000 cellule/ml si è sicuramente in presenza di mastite, ma se il contenuto cellulare è inferiore a questo valore non è detto che un quarto o più quarti non siano infetti, in quanto vi può essere un effetto diluizione del latte mastitico con il latte proveniente dagli altri quarti che sono sani. Anche il campionamento in pool soffre di questa problematica anche se è minore l'effetto che si viene a creare. Il miglior metodo per il campionamento è sicuramente quello effettuato quarto per quarto.

Nonostante alcune limitazioni, il metodo più economico e maggiormente utilizzato per il controllo della mandria, per le mastiti subcliniche, è sicuramente il prelievo effettuato per il controllo funzionale. Molto spesso negli allevamenti, dove vi è la presenza di mastiti subcliniche, sono eseguiti dei test con metodi indiretti come, ad esempio, il CMT (California Mastitis Test) per poter discriminare gli animali che dovranno essere sottoposti a una diagnosi eziologica ma è utile tener presente che, se questo criterio viene ad essere utilizzato per poter prevenire l'evento della mastite, esso risulterà inefficiente. In questo tipo di situazione sarebbe utile introdurre il conteggio delle cellule differenziali, il quale aumenterebbe l'accuratezza della procedura (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

1.4.2 DIAGNOSI DELL'AGENTE EZIOLOGICO

Per poter individuare gli agenti patogeni presenti in allevamento, in particolar modo i batteri che possono infettare la mammella, è utile eseguire l'analisi microbiologica del latte. Questa pratica permette, non solo il riconoscimento dell'agente eziologico ma è utile per poter impostare una terapia corretta al fine di ridurre l'utilizzo dell'antibiotico.

Per effettuare questa analisi è necessario eseguire dei prelievi come, ad esempio, il prelievo del latte di massa, il prelievo in pool dei quattro quarti della bovina ed infine prelievo del singolo quarto. Ogni tipologia di prelievo presenta differenti caratteristiche che possono aumentare la precisione dell'analisi. Il prelievo del latte di massa permette l'individuazione degli agenti contagiosi come *Mycoplasma spp*, *S. aureus*, *Str. agalactie*. In questo tipo di situazione anche il latte di massa permette il loro ritrovamento e la positività del campione indica che almeno una bovina, in allevamento, è positiva. La presenza di altri batteri può essere dovuta a una contaminazione.

Se l'analisi del latte di massa determina un esito negativo per quanto riguarda i batteri contagiosi, non si può affermare che essi non siano presenti in allevamento, infatti per poter avere una diagnosi certa è utile effettuare un prelievo di latte di massa 3 volte, uno ogni 2-3 giorni (prelievo in triplicato). Per quanto riguarda il prelievo in pool dai quattro quarti della bovina, questo è utile per ridurre i costi e tempi, ma in questo caso ci possono essere dei falsi negativi. Il prelievo di latte effettuato sul singolo quarto ci può indicare i quarti realmente colpiti dal problema, abbassa il numero dei falsi negativi, che invece si potrebbero avere con il latte prelevato da tutti e quattro i quarti, e infine può identificare la specie batterica presente, valutandone il profilo di resistenza agli antibiotici.

L'analisi microbiologica è il metodo ideale per identificare l'agente eziologico. Generalmente, per questa patologia, è necessaria un'analisi rapida; tuttavia, non è estremamente necessario avere un responso entro una giornata. Frequentemente è possibile riscontrare delle forme lievi o moderate di mastite dove il primo trattamento consigliato è un antinfiammatorio, indipendentemente dalla tipologia di mastite, e in questo caso vi è la possibilità di attendere 24-48 ore per avere la risposta dell'analisi batteriologica. Oltre alla tipologia di analisi, anche il campione deve essere eseguito in maniera corretta in modo tale da non inquinare il latte prelevato. Generalmente è necessario utilizzare quattro provette con tappi di colore diverso, per differenziare ogni quarto, e numerare in maniera progressiva le provette, ad esempio le prime quattro provette, una per ogni quarto di una bovina, saranno numerate con il numero 1. Successivamente, si dovrà proseguire con la detersione e disinfezione del capezzolo attraverso l'utilizzo di un batuffolo di cotone immerso in alcool oppure attraverso una salvietta imbevuta di disinfettante. Il prelievo deve essere eseguito mungendo il capezzolo ed eliminando i primi 3-4 getti di latte senza bagnarsi le mani, successivamente deve essere stappata la provetta relativa al

quarto da prelevare cercando di evitare di sporcare e contaminare il tappo. Le provette verranno poi riposte in un contenitore apposito e di seguito messe in frigorifero.

A seguito del prelievo dei campioni, possono essere eseguite differenti analisi:

- Analisi microbiologica classica (con terreni selettivi o non selettivi)
- Analisi microbiologica molecolare
- Analisi microbiologica con kit pronti all'uso senza l'utilizzo dell'analisi di laboratorio

La classica analisi microbiologica è effettuata attraverso la semina di latte su piastre contenenti agar-sangue, il quale determina la crescita di moltissimi batteri tranne i micoplasmi, mentre la *Prototheca* cresce maggiormente su terreni come il Sabouraud o PIM. L'utilizzo dell'agar-sangue permette di rilevare la crescita sia dei batteri contenuti nel latte ma anche dei batteri contaminati il campione. Si possono utilizzare anche dei terreni selettivi per identificare coliformi, streptococchi ecc., in questo modo viene ad aumentare la sensibilità della diagnosi. Le analisi microbiologiche con metodi molecolari sono basate sulla PCR quantitativa.

Per quanto riguarda le analisi effettuate in assenza di laboratorio, sono utili per l'allevatore e al veterinario per effettuare una diagnosi on farm e si avvalgono dell'utilizzo di terreni selettivi inseriti in piastre o piastre multi-terreno che contengono, talvolta, terreni cromogeni. Purtroppo, questa tipologia di indagine ha un costo simile alle analisi effettuate dal laboratorio ed inoltre, molto spesso, non vi è la giusta interpretazione del test da parte dell'allevatore e per questo motivo l'accuratezza del test viene a mancare.

A seguito del ritrovamento dell'agente eziologico è utile effettuare una terapia adeguata, ovviamente per poter raggiungere il successo terapeutico è utile perseguire una corretta diagnosi che comprenda il corretto campionamento, la scelta di una tecnica di diagnosi adeguata e una interpretazione adeguata dei dati da parte del veterinario (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

CAPITOLO 2 - L'USO PRUDENTE DEGLI ANTIBIOTICI NELLA TERAPIA DELLA MASTITE

Attualmente si sta intraprendendo il cosiddetto approccio "One Health", considerato ideale per poter raggiungere l'obiettivo di una salute globale. Per raggiungere questo scopo vi è la necessità che le varie discipline professionali, tra cui la medicina veterinaria e umana, cooperino tra loro per raggiungere i tre obiettivi fondamentali:

- Prevenire e ridurre le infezioni
- Promuovere e garantire l'uso prudente degli antibiotici
- Ridurre al minimo il fenomeno dell'antibiotico resistenza.

Per questo motivo si sta parlando sempre di più del fenomeno dell'antibiotico resistenza sia nell'ambito umano che animale. Vi sono numerose linee guida necessarie all'uso degli antibiotici in modo prudente; tuttavia, le informazioni che vi sono indicate spesso non sono coerenti in quanto la diversità culturale dei protocolli, rispetto alle aree in cui devono essere intrapresi, e le diverse conoscenze tecniche e scientifiche rendono questo problema più difficile da contenere.

Molto spesso si ritiene, erroneamente, che il fenomeno dell'antibiotico resistenza nell'uomo sia causato direttamente dall'utilizzo degli antimicrobici in ambito veterinario ma in realtà non vengono presi in considerazione i passaggi utili all'ottenimento di batteri resistenti che verranno, a seguito, a contatto con l'uomo. Per poter arrivare all'infezione dell'uomo, determinata da un batterio resistente, vi sono numerosi passaggi da seguire partendo dall'animale malato che viene trattato con antimicrobici, successivamente vi deve essere la materia prima contaminata dall'antibiotico, (la materia prima generalmente è miscelata con altre materie prime e in questo caso avremo un effetto diluizione) avremo la produzione dell'alimento dove questo potrà essere cotto, fermentato, avremo l'ingestione da parte dell'uomo, il quale ha dei meccanismi antibatterici di difesa, e infine l'infezione da parte del batterio resistente. Bisogna tenere conto anche dei controlli effettuati dai veterinari ufficiali, soprattutto considerando il latte, il quale è l'alimento maggiormente ispezionato in Italia. Considerando tutti i livelli di controllo descritti in precedenza si può constatare come il fenomeno dell'antibiotico resistenza nell'uomo, a partire dall'animale, non avvenga con un passaggio diretto ma bensì indiretto. Ovviamente il rischio è sempre presente e per questo motivo, sono di fondamentale importanza il tempo di sospensione per l'alimento di origine animale e il MRL ossia il limite massimo dei residui. Gli MRL sono dettati

da severi studi scientifici che prendono in considerazione la farmacocinetica, la farmacodinamica in specifici animali con specifiche patologie e per questo assicurano un ampio margine di sicurezza per la salute dell'uomo. Pensare di arrivare ad avere un residuo pari a zero è utopistico, se invece si vuole raggiungere questo obiettivo attraverso il mancato utilizzo di trattamenti negli animali che presentano una patologia, a quel punto ci troveremmo in una situazione che precluderebbe il benessere degli animali. Il trattamento delle mastiti assume un ruolo di limitata importanza rispetto al consumo complessivo degli antimicrobici in Europa. Secondo l'EMA, in riferimento ai dati disponibili del 2019, gli antibiotici intramammari occupano lo 0,4% delle vendite e considerando anche quelli iniettabili utilizzabili per la mastite, la loro percentuale non è molto superiore visto che la quota totale degli antibiotici iniettabili si aggira attorno al 9% delle vendite. Di fondamentale importanza sono anche le modalità di valutazione del consumo degli antibiotici, le quali sono oggetto di discussione, viste le differenze tra le tipologie di allevamenti e alle dimensioni degli animali trattati (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

2.1 I CIA: ANTIBIOTICI DI IMPORTANZA CRITICA

L'organizzazione mondiale della sanità ha definito con la sigla CIA, le molecole di importanza critica per la salute dell'uomo. All'interno di questa classificazione sono presenti tre gruppi di antimicrobici, tra cui i *Critical Important Antimicrobials* (CIA), *Highly Important Antimicrobials* (HIA) e *gli Important Antimicrobials* (IA). Tra i CIA sono annoverati anche gli *Highest Priority Critically Important Antimicrobials* rappresentati dalle cefalosporine dalla terza generazione in poi, i chetolidi, i glicopeptidi, i chinoloni ed infine le polimixine. Questo tipo di classificazione è stata sviluppata per la medicina umana e ovviamente è ricaduta anche sul mondo veterinario tuttavia, successivamente, OIE, FAO e WHO, in accordo con esperti del settore dei vari Paesi aderenti, hanno redatto un registro degli antibiotici considerati critici proprio per la medicina veterinaria. L'Unione Europea, non soddisfatta dei criteri scelti, tramite l'AMEG (*Antimicrobial Advice ad hoc Expert Group*), ha provveduto alla stesura di parametri per la classificazione degli antibiotici ad uso veterinario in relazione alla classe degli antibiotici, alle condizioni d'uso, alla prevalenza della resistenza, diffusione ambientale. Le categorie sono le seguenti:

- Categoria A: evitare
- Categoria B: limitato
- Categoria C: attenzione
- Categoria D: prudenza

Nella prima categoria sono compresi gli antimicrobici, classi e sottoclassi comprese, non registrati per l'uso veterinario, proibiti per gli animali da reddito e utilizzabili, in alcune circostanze documentate, per gli animali d'affezione. Nella categoria B vi sono gli HPCIA, ossia vi sono i fluorochinoloni, polimixine e le cefalosporine di terza e quarta generazione ma non sono presenti i macrolidi. In questo caso il loro utilizzo deve essere mirato ai casi in cui non vi siano altre soluzioni, dimostrate con l'utilizzo dei test di sensibilità per gli antimicrobici. Nella categoria C sono raggruppati gli antibiotici che sono utilizzati solamente se il rischio di antibiotico resistenza è al di sotto delle molecole inserite nella categoria D o se sia presente il fenomeno di antibiotico resistenza verso le molecole inserite nella categoria D. Tra gli antibiotici della categoria C, usati per il trattamento delle mastiti, abbiamo gli aminoglicosidi, aminopeniciline in combinazione agli inibitori di beta-lattamasi, florfenicolo e tiamfenicolo, cefalosporine di prima e seconda generazione. Gli antibiotici inseriti nell'ultima categoria sono quelli che non possono indurre lo sviluppo di resistenza verso molecole della categoria A, sono gli antibiotici di prima scelta (deve essere valutata la sensibilità dei microrganismi).

Oltre alla categorizzazione degli antibiotici è stato attuato, a partire dal 2022, anche il regolamento UE 2019/6 sui medicinali veterinari che pone dei limiti all'utilizzo di alcuni farmaci, in particolar modo, parlando dell'allevamento bovino sono state date indicazioni relative alla terapia antibiotica che non può essere più effettuata seguendo una routine, ma soprattutto non deve controbilanciare le difficoltà causate dalla scarsità di igiene e dall'incapacità gestionale dell'allevamento. Per far fronte all'antibiotico resistenza viene anche limitato l'utilizzo profilattico degli antibiotici, che potrà essere adoperato solamente su soggetti singoli e in circostanze particolari come nella chirurgia. Gli stati membri determinano le severe circostanze per l'utilizzo dell'antibiotico, ulteriormente condizionate dalla valutazione dei profili di resistenza del batterio. Per questi motivi il trattamento in asciutta non può essere effettuato su tutte le bovine presenti in stalla in quanto sarebbe un trattamento routinario e profilattico. Va ricordato che per la terapia antibiotica in asciutta non è mai stato ritrovato un riscontro certo che sia effettivamente legata all'insorgenza di antibiotico resistenza mentre sono numerosi gli studi che confermano l'utilità di questa pratica per prevenire e contrastare le mastiti durante il periodo di asciutta (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

2.2 I PROTOCOLLI TERAPEUTICI DELLA MASTITE

La scelta della terapia antibiotica adeguata è di fondamentale importanza per l'ottenimento del successo terapeutico. L'antibiotico in prima istanza deve contrastare il patogeno e quindi il batterio deve essere sensibile alla molecola, deve arrivare nel sito dell'infezione a concentrazioni adeguate che devono superare la MIC (minima concentrazione inibente), ma al contempo è utile preoccuparsi per i tempi di sospensione riguardanti il latte che devono essere ridotti al minimo per evitare eccessive perdite economiche.

L'antibiotico, essendo un farmaco, può essere somministrato attraverso differenti vie (endovenosa, intramuscolare, sottocutanea, intramammaria). I farmaci iniettati in vena richiedono delle soluzioni acquose, il principio attivo essendo nel torrente circolatorio è immediatamente disponibile e il picco della concentrazione è prontamente ripartito ed il farmaco viene eliminato velocemente dal circolo. Per quanto riguarda la somministrazione attraverso iniezioni sottocutanee o intramuscolari, si utilizzano sia delle sospensioni che soluzioni, il picco della concentrazione è minore rispetto a quello determinato dalla somministrazione endovenosa ed inoltre bisogna tener conto della fase di assorbimento che non permette una distribuzione repentina del farmaco. Nel caso della terapia delle mastiti è utile considerare la barriera emato-mammaria, la quale non permette a molte molecole di dirigersi dal sangue verso la mammella, infatti, le cefalosporine e le penicilline, ad eccezione del penetamato, se somministrate attraverso la via parenterale, non riescono ad oltrepassare questa barriera. Le molecole che si sono dimostrate abili nell'oltrepassare questa barriera sono i macrolidi, fluorochinoloni, e le tetracicline (solo a basse concentrazioni). Ovviamente i fluorochinoloni sono inseriti, all'interno della classificazione AMEG, in classe B, mentre i macrolidi sono di classe C e quindi considerati CIA. Purtroppo per quanto riguarda le tetracicline, non sono utilizzate per le mastiti per via del loro tempo di sospensione, piuttosto prolungato, e perché essendo state ampiamente adoperate per patologie diverse dalla mastite, essendo ad ampio spettro, i batteri patogeni che colpiscono la mammella sono resistenti a questo antibiotico.

Al giorno d'oggi le bovine possono essere munte più di due volte al giorno e per questo motivo viene ad essere ridotto il tempo alla molecola per poter rimanere alla minima concentrazione inibente adeguata al trattamento stesso, per questo motivo potremmo avere problemi riferibili al successo terapeutico.

Per poter scegliere il miglior antibiotico per far fronte alla patologia è necessario effettuare una valutazione della sensibilità del patogeno all'antibiotico, per questo motivo si possono utilizzare due metodiche ossia:

- Antibiogramma con metodo Kirby-Bauer
- Valutazione della minima concentrazione inibente (MIC)

Entrambe le metodiche giungono allo stesso risultato ossia identificano se un microrganismo è sensibile, intermedio oppure resistente ad un determinato antimicrobico, ovviamente tenendo conto dell'animale e della patologia che dobbiamo trattare, in quanto i valori soglia sono differenti. Un patogeno è sensibile se c'è una probabilità elevata di avere successo mediante la terapia effettuata, utilizzando la posologia adeguata dell'antibiotico scelto. Un patogeno è considerato intermedio quando, aumentando la concentrazione o il tempo di trattamento con uno specifico antibiotico, diventa sensibile all'antimicrobico (in questa situazione viene effettuata una somministrazione in deroga). Quando vi è la presenza di una improbabilità di avere successo terapeutico utilizzando qualsiasi posologia allora siamo di fronte a un microrganismo resistente.

Il trattamento per la mastite viene differenziato in relazione allo stadio produttivo dell'animale, possiamo eseguire terapie durante il periodo della lattazione ma anche durante il periodo dell'asciutta. La terapia si differenzia anche in base alla classificazione della mastite, ovvero se sono classificate come cliniche oppure come subcliniche. Alla base del protocollo terapeutico però bisogna eseguire diverse valutazioni riguardanti i costi, i tempi della terapia e soprattutto il tipo di animale sottoposto al trattamento (es. animali con mastiti croniche, animali che difficilmente riprendono la curva di lattazione, animali che necessitano di un periodo di trattamento prolungato).

Le possibilità di guarigione dipendono da fattori legati all'animale come il numero di parti, il numero di quarti infetti, ma dipendono anche da fattori legati al patogeno e all'antibiotico, e infine fattori legati all'allevamento come il tasso di incidenza di nuove mastiti e la conta delle cellule somatiche del latte di massa. Il trattamento terapeutico è utile all'eliminazione dei patogeni ma il sistema immunitario della bovina deve essere efficiente in modo da poter instaurare una risposta adeguata al patogeno (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

2.2.1 TERAPIA DELLE MASTITI CLINICHE

Il trattamento terapeutico viene impostato considerando tutti i fattori descritti nei capitoli precedenti e i protocolli di intervento saranno specifici per ogni allevamento al fine di raggiungere gli obiettivi prefissati. Generalmente, in caso di mastite clinica si può agire in modo diverso in relazione allo stato di salute dell'animale. Se la bovina si presenta con mastite clinica ed è febricitante, è utile trasferire l'animale nell'apposito box infermeria in modo da poter somministrare fluidi, antinfiammatorio e per poter monitorare l'animale in maniera adeguata. La bovina con mastite clinica in assenza di piressia dovrà comunque essere trasferita nella zona infermeria e dovrà essere eseguito l'esame batteriologico del latte per poter individuare i batteri responsabili della patologia. Se nel campione di latte non vi sarà nessuna crescita si proseguirà con una terapia antinfiammatoria e monitoraggio dell'animale, mentre se vi è la presenza di batteri contagiosi si proseguirà con l'antibiotico, adatto alla specie batterica ritrovata, e il trattamento sarà eseguito su tutti e quattro i quarti mammari. Per quanto riguarda le infezioni determinate da stafilococchi coagulasi negativi (CNS) si dovrebbe procedere attraverso l'utilizzo di antinfiammatorio e antibiotico, in caso di aggravamento della patologia.

In presenza di Streptococchi ambientali la terapia sarà effettuata solo sul quarto colpito dalla mastite attraverso l'utilizzo di un antibiotico, adatto alla specie ritrovata, e antinfiammatorio. La combinazione tra antinfiammatorio, somministrato attraverso la via intramuscolare, e antibiotico, formulato come sospensione intramammaria, è una procedura estremamente utile per contrastare queste forme di mastite causate dagli Streptococchi ambientali (Zecconi A. , 2000).

In caso di mastite da *Escherichia Coli* l'utilizzo della terapia antibiotica è ancora dibattuto, studi recenti hanno mostrato risultati contrastanti a seguito dell'utilizzo dell'antibiotico in presenza di mastite acuta da *E.Coli* e mastite sostenuta da *Klebsiella*, due batteri Gram negativi. Questa tipologia di mastite è legata soprattutto alla presenza delle endotossine che vengono a liberarsi a seguito della lisi dei batteri ed è per questa ragione che è meno indicato l'utilizzo dell'antibiotico in quanto favorendo la distruzione dei batteri, viene ad aumentare anche la quota di lipopolisaccaride (LPS) liberato dalle cellule batteriche. Il motivo per il quale l'antibiotico viene ad essere utilizzato, in questa tipologia di mastite, è sicuramente per la prevenzione di uno stato di batteriemia che si può sviluppare a seguito della mastite, evento che si verifica quando la patologia è in atto da tempo (Soujola, 2013) (Fuenzalida, 2019 Jun).

2.2.2 TERAPIA DELLE MASTITI SUBCLINICHE

Diversamente da quello che accade per la mastite clinica, dove la terapia viene ad essere sempre eseguita, nel caso della mastite subclinica è più difficile capire se effettuare la terapia e in quale momento è utile applicarla. In prima istanza bisogna considerare l'agente eziologico che ha dato origine alla patologia, nel caso in cui ci fossero dei batteri contagiosi, l'antibiotico terapia è fondamentale per il controllo della mastite e a maggior ragione l'utilizzo dell'antibiotico è utile per l'eradicazione del microrganismo. In questa condizione è utile valutare la possibilità di guarigione degli animali; infatti, le bovine che hanno superato la terza lattazione hanno una probabilità di guarigione minore così come le bovine che si trovano nelle ultime fasi della produzione lattea perché la possibilità di guarigione è inversamente proporzionale al numero dei giorni in lattazione. Per le mastiti subcliniche di origine ambientale, molto spesso, viene ad essere effettuata una terapia per evitare l'evoluzione da mastite subclinica a mastite clinica. Questa scelta è dettata da diversi aspetti specifici per ogni azienda (prevalenza ed epidemiologia) e per ogni bovina. La conta delle cellule somatiche totali e la conta delle cellule differenziali può essere un valido aiuto per intraprendere questa decisione. Le bovine con cellule somatiche basse e che presentano un valore inferiore al 75% di neutrofilo sono suggestive del fatto che la bovina sarà in grado di contrastare il patogeno e di superare l'infiammazione senza l'utilizzo di un supporto terapeutico. Nel caso in cui vi sia la presenza di stafilococchi coagulasi negativi, riscontrati maggiormente rispetto ad altri patogeni, è utile ribadire che non vi sono evidenze scientifiche che la terapia antibiotica sia vantaggiosa per questa tipologia di mastiti. La terapia è del tutto sconsigliata nei casi in cui vi sia positività per batteri Gram negativi come *E. Coli* e nel frattempo non vi sia un rialzo delle cellule somatiche all'interno del latte. Molto spesso le positività riscontrate, riguardanti *E. Coli*, sono causate dalla contaminazione continua della mammella con lettiere inadeguate, infatti, per sua natura questa tipologia di microrganismo non aderisce facilmente all'epitelio della mammella (Bexiga, 2011 Aug).

2.2.3 TERAPIA DELLE MASTITI CRONICHE

L'unica terapia che è possibile effettuare su questi animali è la terapia antibiotica alla messa in asciutta. Ovviamente è necessario fare alcune considerazioni sulla tipologia dell'animale da trattare, se quest'ultimo può mirare alla guarigione durante il periodo di asciutta come, ad esempio, le bovine primipare o secondipare che hanno presentato per soli 4 mesi un livello di cellule somatiche moderato (tra 300 mila e 500 mila cellule/ml) allora si potrà eseguire la terapia antibiotica in asciutta, altrimenti l'animale verrà riformato. Gli animali che saranno trattati alla messa in asciutta ma anche quelli in attesa di riforma, continueranno a produrre latte con caratteristiche pessime sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. In condizioni di campo, per contrastare gli effetti della mastite sull'animale e sul latte, è possibile effettuare una terapia ciclica con FANS. L'utilizzo della terapia per la mastite è di grande utilità se effettuata con raziocinio e soprattutto se inserita in un programma di gestione della sanità dell'allevamento in quanto, se effettuata con modalità inadeguate, si può incorrere ad un aumento dei costi senza migliorare la produttività dell'allevamento (Zecconi A. F., 2018 Feb).

CAPITOLO 3 – LA MESSA IN ASCIUTTA

3.1 INTRODUZIONE ALL'ASCIUTTA

Il periodo dell'asciutta è un momento piuttosto delicato dove avvengono diverse modificazioni a carico della ghiandola mammaria, utili ad affrontare il periodo successivo che sarà quello della lattazione, e dove è necessario porre attenzione ai problemi metabolici e sanitari che possono ostacolare questi cambiamenti. Mediante meccanismi endocrini avviene la ricostituzione del parenchima mammario. Ovviamente se l'epitelio della mammella non sarà adeguatamente ricostituito, la produzione lattea sarà compromessa. Nelle settimane precedenti il parto, ma anche nelle successive, vi sarà un calo della produzione lattea e il parenchima mammario presenterà dei meccanismi di difesa alterati rendendo le bovine particolarmente suscettibili alle infezioni.

La ghiandola mammaria subirà cambiamenti rilevanti dal punto di vista immunitario; infatti, durante la procedura della messa in asciutta avviene una fase che ha la durata di circa due settimane dove i leucociti polimorfonucleati neutrofili aumentano notevolmente per poter neutralizzare i batteri patogeni che eventualmente hanno colonizzato la mammella. Di seguito, le cellule macrofagiche si attiveranno per poter eliminare i residui cellulari, determinando in questo modo la ricostruzione dell'epitelio della mammella. In questa fase aumenta anche la presenza di un'importante glicoproteina come la lattoferrina, utile per la sua funzione antibatterica durante il periodo dell'asciutta. Questa fase deve svolgersi in maniera adeguata perché l'eventuale presenza di batteri all'interno della mammella impedisce il normale rinnovamento dell'epitelio ghiandolare, ostacolando la produzione della lattazione seguente. Se tutto avviene in maniera corretta, l'asciutta proseguirà fisiologicamente senza presentare problemi rilevanti fino alle due settimane precedenti il parto. Questo periodo deve essere accompagnato da un'alimentazione adeguata e la stabulazione deve essere gestita con elevati standard igienici.

La durata dell'asciutta deve essere idonea per poter permettere il normale rinnovamento dell'epitelio ghiandolare della mammella. Se questo periodo viene eccessivamente ristretto, ci possono essere problemi che andranno a riflettersi, successivamente, sulla lattazione. Attraverso uno studio effettuato in Lombardia, valutando 3.579 lattazioni, si è potuto constatare come il periodo dell'asciutta sia variabile in termini di tempo. Gli allevamenti sono stati suddivisi in relazione al numero di capi presenti (inferiore a 100 capi in lattazione, tra i 100 e 199 capi e

superiore a 200 capi), inoltre sono state stilate sette categorie di asciutta in relazione al numero dei giorni.

La prima categoria è caratterizzata da una durata inferiore o uguale a 30 giorni di asciutta, di seguito avremo la seconda categoria con una durata che va dai 31 ai 45 giorni, la terza con una durata tra 46 e 60 giorni, la quarta da 61 a 75 giorni, la quinta dai 76 ai 90 giorni ed infine dai 90 ai 120 giorni di asciutta. È stato effettuato anche il conteggio delle cellule somatiche all'asciutta attraverso l'utilizzo di un linear score suddiviso nelle classi 2, 3, 4, 5, e maggiore di 5. È stata valutata la produzione di latte calcolando l'intera lattazione della bovina.

È stato possibile constatare come all'aumentare del numero delle lattazioni, il numero dei giorni in asciutta aumentino e quindi la frequenza delle vacche con periodo di asciutta lungo, tra i 75 e 120 giorni, è maggioritaria. I periodi di asciutta al di sotto dei 45 giorni sono rilevabili frequentemente nelle primipare. È utile anche osservare che circa meno della metà delle bovine di qualsiasi categoria affronta un periodo di asciutta tra i 45 e i 60 giorni. Nello studio effettuato si è potuto notare come la metà rimanente delle bovine facesse parte delle "asciutte lunghe" superando i 60 giorni di asciutta. Gli animali che affrontano un periodo di asciutta così prolungato sono maggiormente predisposti alle infezioni mammarie in quanto vi è la presenza di modificazioni di natura metabolica e non vi è più la presenza dell'azione dell'antibiotico.

In relazione alle dimensioni dell'allevamento si è potuto constatare che negli allevamenti più piccoli, vi è una maggiore presenza di vacche che svolgono un periodo di asciutta maggiore di 60 giorni e questo ha dimostrato che le asciutte molto brevi, con una durata inferiore a 35 giorni, siano correlate a una produzione minore nella lattazione seguente. Il massimo livello di produzione di latte, da parte delle bovine, si è potuto osservare negli allevamenti di grandi dimensioni e in presenza di una asciutta tra i 45 e i 60 giorni, mentre negli altri allevamenti si è potuto osservare che le bovine con un'asciutta tra i 36 e i 45 giorni avessero delle produzioni maggiori nella lattazione successiva. I dati riscontrati vanno a confermare la situazione osservata in USA, ossia che una asciutta di breve durata è sconsigliata in quanto, dal punto di vista economico, risulta essere controproducente perché viene recuperato il latte nella lattazione in corso ma vi è una perdita ingente di latte nella lattazione successiva (Church, 2008 Nov).

3.2 IL PERIPARTO E LE PROBLEMATICHE SANITARIE DELLA MAMMELLA

Il periodo di asciutta fa parte della fase di transizione della bovina ed in particolare comprende la prima parte del periparto. Generalmente, durante le ultime due settimane prima del parto, la mammella e il capezzolo subiscono delle modificazioni che possono aumentare il rischio di infezione come, ad esempio, aumenta il grado di apertura del capezzolo. Come descritto in precedenza, anche la stabulazione deve essere in condizioni igieniche adeguate; infatti, le lettiere eccessivamente contaminate, in compartecipazione alla minore efficacia delle difese immunitarie della vacca durante questo periodo, possono causare un aumento delle infezioni. Lo stato dell'anatomia del capezzolo è importante non solo durante la lattazione, ma soprattutto durante l'asciutta in quanto non si viene a formare correttamente il tappo cheratinico nel canale del capezzolo e per questo motivo la mammella rimane sicuramente più esposta ai patogeni. Le bovine che hanno produzioni elevate di latte rischiano che, durante il periodo di asciutta, non avvenga mai la chiusura del capezzolo e quindi siano maggiormente esposte al rischio di mastite. Per far fronte a questa situazione, ovviamente bisogna migliorare gli standard igienici della lettiera, adeguare l'impianto di mungitura agli animali, in modo che non si creino alterazioni anatomiche del capezzolo, ed inoltre si possono utilizzare delle sostanze sigillanti, inerti, che permettono la chiusura del capezzolo, durante l'asciutta, evitando in questo modo l'entrata dei patogeni.

Il sigillante è considerato indispensabile se si è in presenza di lesioni a livello del capezzolo, se vi è la presenza di una incidenza elevata di mastiti durante il post-parto, oppure nel caso in cui l'asciutta sia prolungata oltre i 60 giorni. Il ruolo del sigillante è di fondamentale importanza anche durante l'attuazione dei protocolli di asciutta selettiva. Purtroppo, durante le ultime due settimane prima dell'asciutta anche le difese immunitarie della bovina subiscono una riduzione del tutto fisiologica e questa diminuzione ha una durata diversa in funzione dell'allevamento preso in considerazione. Se il periodo di asciutta è organizzato correttamente e le condizioni igieniche sono ottimali, l'effetto di riduzione dell'immunità è trascurabile.

L'eventuale presenza di infezione, derivante dalla lattazione precedente o dal periodo di asciutta, peggiora la quantità e la qualità del latte prodotto e quest'ultima viene influenzata a sua volta da un aumento notevole del contenuto cellulare rispetto ai quarti sani. Questo aspetto non è direttamente visibile in quanto viene mascherato dall'aumento fisiologico della produzione lattea ma è evidente che la produzione da parte del quarto infetto sarà sicuramente inferiore al suo

potenziale in assenza di infezione. È stato dimostrato che le infezioni da Streptococchi ambientali, circa il 50%, si manifestano durante l'asciutta e a seguito del parto, mentre il 20% di queste si trasformeranno in infezioni croniche, se non trattate adeguatamente. A questo proposito viene in aiuto il trattamento in asciutta, il quale permette di prevenire le infezioni che subentrano nella medesima fase (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

3.3 L'ASCIUTTA TRADIZIONALE E L'ASCIUTTA SELETTIVA

Il momento della messa in asciutta è piuttosto delicato e deve essere attuato con modalità ben precise. Oltre alla durata, che deve essere di almeno 45 giorni, prima che avvenga il parto, è utile verificare la produzione di latte almeno dieci giorni prima del raggiungimento del limite soglia per effettuare la messa in asciutta. Generalmente le bovine che hanno una produzione inferiore a 10 kg al giorno, dovrebbero essere asciugate anticipatamente per poter evitare la sovramungitura legata al basso flusso del latte. Per quanto riguarda le bovine che producono un quantitativo di latte che si aggira tra i 10 kg e i 25 kg, il protocollo di asciutta standard può essere effettuato. Se la produzione supera i 25 kg di latte al giorno, si devono intraprendere delle misure utili alla riduzione del latte prodotto, come il cambio di alimentazione.

La messa in asciutta deve essere effettuata seguendo i seguenti passaggi:

- Mungitura completa della bovina
- Disinfezione post mungitura del capezzolo
- Eventuale terapia in asciutta (inoculazione intramammaria, in ogni capezzolo, del prodotto da utilizzare, assicurando elevati standard di igiene)
- Massaggio del quarto mammario per aumentare la diffusione del prodotto
- Applicazione di eventuali prodotti sigillanti, eseguendo la procedura in maniera igienica
- Disinfezione del capezzolo
- Introduzione dell'animale nel box predisposto alle asciutte

Molto spesso, in alcuni allevamenti, è possibile che sia presente la pratica di evitare una mungitura o addirittura più mungiture prima di sottoporre all'asciutta una bovina. Questa tecnica può portare a numerosi problemi, altera la normale fisiologia della mammella, determina un aumento cospicuo della carica microbica e di conseguenza il rischio di infezione durante il medesimo periodo, e nel caso in cui l'animale fosse trattato con l'antibiotico si assisterebbe a una riduzione della funzionalità dello stesso. Attraverso vari studi si è potuto constatare che i metodi

differenti dall'asciutta drastica come, ad esempio, le mungiture alternate e la riduzione della quota di cibo fornita agli animali oppure entrambe le soluzioni possono portare a problematiche legate al benessere degli animali.

La terapia alla messa in asciutta è stata effettuata a partire dal 1960 mediante l'introduzione da parte del NIRD (National Institute for Research in Dairying) del Five Point Mastitis Control Plan che proponeva caldamente il trattamento antibiotico di tutti i quarti mammari in modo da sottoporre a terapia qualsiasi tipo di mastite, sia clinica che subclinica. La cosiddetta BDCT, ossia la terapia totale in asciutta, è caratterizzata dall'effettuazione della terapia antibiotica alla messa in asciutta su tutte le bovine con uno scopo terapeutico, determinando l'eliminazione delle eventuali mastiti, e uno scopo preventivo sulle eventuali mastiti che andranno a svilupparsi nella lattazione successiva. Tale pratica ha avuto successo raggiungendo gli obiettivi appena descritti. Attualmente non è possibile effettuare questo tipo di terapia a causa del problema dell'antibiotico resistenza. La terapia deve essere effettuata solamente sugli animali malati. Vi sono numerosi studi, inoltre, che dimostrano che la BDCT, la terapia effettuata su tutte le vacche, non riesce ad abbassare sotto ad una determinata soglia l'insorgenza di nuove infezioni mammarie e questo è dovuto al fatto che vi è un calo costante dell'antibiotico all'interno della mammella durante il periodo dell'asciutta. Molto spesso le terapie antibiotiche non permangono abbastanza a lungo da coprire l'intera fase di asciutta ma coprono solamente il primo periodo fino alla metà dell'asciutta. Per quanto riguarda la terapia antibiotica è utile valutare anche il costo che sicuramente è maggiore rispetto alla scelta di una terapia selettiva. Per i seguenti motivi, i Paesi scandinavi, a partire dalla fine degli anni '90 hanno introdotto l'asciutta selettiva a discapito della terapia antibiotica a tappeto.

L'asciutta selettiva (SDCT) prevede la selezione degli animali da trattare, con antibiotico, attraverso criteri ben definiti, mentre il resto degli animali viene eventualmente trattato con dei sigillanti intramammari. Molti animali non presenteranno infezioni mammarie nella loro carriera produttiva e non tutte le bovine presentano infezioni mammarie al momento dell'asciutta, per questo motivo si è deciso di intraprendere un protocollo di asciutta selettiva che determina alcuni vantaggi, tra cui il minor utilizzo di antibiotico e maggiore economicità del trattamento di asciutta. La SDCT, per ottenere i vantaggi descritti, deve essere effettuata solamente in relazione alla situazione presente nell'allevamento preso in considerazione e deve essere effettuata solo se si è in grado di utilizzare questo tipo di strategia. I criteri utilizzati per la scelta degli animali, se errati

o poco precisi, possono portare a dei problemi non indifferenti dettati dalla mancata selezione degli animali eventualmente infetti che non saranno trattati e a seguito si determineranno perdite economiche rilevanti. È importante dire che, secondo alcuni studi, l'utilizzo del trattamento nel periodo di asciutta mostra tassi di guarigione pressochè equiparabili sia che si utilizzi l'asciutta selettiva sia l'asciutta tradizionale, quando è messa in relazione alla mancata presenza di trattamenti in asciutta.

La terapia in asciutta effettuata attraverso l'utilizzo dell'antibiotico, però, riduce in maniera significativa le nuove infezioni rispetto all'asciutta selettiva. Sempre più frequentemente si tenderà ad utilizzare l'asciutta selettiva a seguito del Regolamento (UE) 2019/6 che di fatto impedisce l'utilizzo dell'antibiotico a tappeto su tutte le bovine. Questo approccio porta con sé delle problematiche importanti dal punto di vista economico, dovute al possibile aumento del numero di mastiti in lattazione. Si svilupperanno delle difficoltà riguardanti i criteri di scelta degli animali, che dovranno essere oggettivi, in modo da poter selezionare gli animali correttamente permettendo anche alle Autorità Sanitarie di constatare che gli allevatori applichino la terapia corretta in asciutta.

L'individuazione delle bovine da trattare in asciutta viene effettuata attraverso diversi metodi, tra cui la conta delle cellule somatiche, la quale è un metodo sia pratico che economico, ovviamente bisogna poter individuare una soglia per discriminare le bovine che andranno in asciutta mediante l'utilizzo dell'antibiotico oppure senza antibiotico. Un altro test molto utile è il California Mastitis Test effettuato alla messa in asciutta, questo viene effettuato solamente se la prevalenza della mastite all'interno dell'allevamento è inferiore al 15%, purtroppo questa metodologia riscontra alcuni problemi riguardanti la sua sensibilità perché è stato possibile notare che il 50% dei campioni positivi per la batteriologia aveva un contenuto cellulare inferiore a 100.000 cellule/ml e che il 15% dei campioni, i quali mostravano la presenza di 50.000 cellule/ml erano batteriologicamente positivi. Bisogna ricordare, però, che la scelta delle bovine, su cui viene ad essere effettuata l'indagine eziologica, è determinata dal contenuto delle cellule somatiche all'interno del latte anche se è stato dimostrato che animali con valori di cellule somatiche superiori a 1.000.000 hanno una elevata probabilità di determinare un risultato negativo per quanto riguarda la batteriologia. Se vi è un contenuto cellulare molto elevato significa che il processo infiammatorio è presente e quindi nel latte vengono riversate sostanze antibatteriche naturali che distruggono i batteri, per questo motivo la batteriologia può risultare negativa.

La metodologia più corretta per l'individuazione delle bovine infette è la ricerca dei patogeni attraverso diagnosi convenzionale o con metodi molecolari. Questo tipo di scelta spesso non viene effettuata per i costi molto elevati e per il maggiore lavoro richiesto per eseguire tale pratica. Nei Paesi scandinavi, dove l'asciutta selettiva è ampiamente utilizzata, vi è l'abitudine di adoperare le analisi molecolari, che però non consentono la valutazione della sensibilità agli antibiotici diversamente dalle analisi convenzionali.

Attualmente vi è la proposta per gli allevatori di effettuare la conta delle cellule somatiche differenziali oltre alla conta delle cellule somatiche totali alla fine della lattazione, ma questa tecnologia è da poco utilizzata e la sensibilità e specificità non è in particolar modo elevata. Molto spesso, metodi di selezione combinati tra loro possono essere molto utili come nel caso della conta delle cellule somatiche in presenza di mastite clinica nella bovina.

I criteri di selezione degli animali devono essere accurati, facilmente applicabili ma soprattutto accreditabili ed economici. Per questa ragione è utile selezionare il metodo diagnostico che si adegui alle realtà territoriali valutando tutti gli aspetti pratici ed economici. Ovviamente le possibilità diagnostiche sono molteplici e non si può affermare che una metodologia sia superiore rispetto ad un'altra tranne per l'analisi microbiologica, la quale è la migliore.

Gli allevamenti, nonostante abbiano caratteristiche simili, presentano delle peculiarità legate al clima e al territorio in cui sono situati ma anche in base alla loro gestione e soprattutto in base allo stato sanitario della mandria. Questo concetto è fondamentale se si parla di asciutta selettiva in quanto queste caratteristiche vanno a influire sui risultati che si possono ottenere. Come introdotto in precedenza, è utile avere dei protocolli di selezione delle bovine. Mediante uno studio effettuato da A. Zecconi, con la collaborazione di ARAL, associazione regionale allevatori della Lombardia, e l'UO veterinaria della regione Lombardia, sono stati valutati sia le procedure che i risultati ottenuti a seguito dell'utilizzo dell'asciutta selettiva. Per l'individuazione degli animali infetti all'asciutta, si è deciso di utilizzare la conta delle cellule somatiche provenienti dai controlli funzionali, in quanto la seguente metodologia permette il soddisfacimento dei requisiti scientifici ed economici principali. Di seguito si è stabilito il valore soglia delle cellule somatiche per poter decidere i soggetti da sottoporre all'antibiotico terapia. Per poter stabilire questo parametro sono stati presi in considerazione i dati dei controlli funzionali di 720 allevamenti lombardi costituiti da un totale di 45.682 bovine da latte. I parametri sono stati classificati in relazione alla lattazione. Di seguito è stato quantificato il rischio di mastite subclinica a seguito

del parto e in relazione ai dati raccolti si è potuto constatare che il valore soglia di 100.000 cellule/ml sia ideale per le primipare, mentre per le pluripare il valore soglia è di 200.000 cellule/ml. Per le bovine con più di un parto, la scelta del valore soglia è stata più difficoltosa, poiché la difformità delle frequenze delle mastiti subcliniche non era statisticamente diversa per i valori soglia scelti ed inoltre il valore di 200.000 cellule per ml di latte è il valore utilizzato per constatare, a livello internazionale, la presenza di infezione subclinica. I criteri appena citati sono stati utilizzati per scegliere le bovine e i risultati ottenuti hanno dimostrato una riduzione dell'antibiotico pari al 47%. Sono state eseguite delle indagini microbiologiche sul latte di ogni quarto delle bovine a seguito del parto e queste hanno mostrato che circa il 34% dei quarti non sottoposti a trattamento era positivo sia prima del parto che a seguito del parto, confermando che la conta delle cellule somatiche non è abbastanza adeguata a stabilire se il quarto sia sano oppure no. Nonostante ciò, i batteri normalmente ritrovati all'interno di questi campioni erano CoNS ossia Stafilococchi coagulasi negativi che solitamente non influenzano notevolmente né la produzione né la qualità del latte. La valutazione della tipologia di batteri presenti nel latte prima e dopo il parto è utile in quanto fornisce informazioni riguardanti il protocollo di asciutta selettiva. Se non vi è differenza di frequenza prima e dopo il parto, gli agenti patogeni che andranno ad aumentare notevolmente, a seguito del parto, saranno i batteri ambientali e questo indica la mancata presenza del trattamento antibiotico durante il periodo di asciutta. A seguito dell'utilizzo del protocollo è stato possibile considerare il tasso di guarigione, il quale è influenzato dal numero delle lattazioni, all'aumentare delle lattazioni diminuisce il tasso di guarigione, è influenzato dalla durata dell'asciutta che deve rispettare i 45-60 giorni ed infine dall'utilizzo del sigillante, il quale aumenta il tasso della guarigione. Prendendo in considerazione le bovine trattate con antibiotico, queste presentavano valori di cellule somatiche significativamente inferiori, mentre per le bovine non trattate non vi erano differenze importanti. In relazione ai dati ottenuti è stato possibile offrire una procedura per la messa in asciutta selettiva, utilizzando la conta delle cellule somatiche effettuata durante l'ultimo controllo funzionale oppure calcolando la media delle cellule somatiche durante la lattazione (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

Successivamente a questo studio è stato possibile monitorare per tre anni, tre allevamenti, tra quelli presi in considerazione precedentemente, nell'attuazione della procedura proposta per l'asciutta selettiva. Le bovine trattate con antibiotico risultavano essere il 30% nel primo allevamento mentre negli altri due allevamenti la percentuale si aggirava attorno al 50%. Nel frattempo, è stata valutata anche la prevalenza delle infezioni mammarie nelle due settimane

post-parto e l'azienda che effettuava un minor numero di trattamenti antibiotici durante l'asciutta era quella con il maggiore numero di quarti positivi dal punto di vista microbiologico. Per quanto riguarda invece la prevalenza delle mastiti cliniche, questa risultava bassa e ritenuta nei range ottimali con valori percentuali di mastite inferiori al 2% al mese. Per concludere è stata valutata anche l'eventuale correlazione tra la frequenza dei trattamenti e la mastite subclinica e i risultati ottenuti indicavano che quest'ultima era correlata all'epidemiologia dell'allevamento e non imprescindibilmente dalla frequenza delle bovine sottoposte alla messa in asciutta.

A fronte di ciò non c'è stata un'elevata frequenza di bovine infette, dimostrando in questo modo che l'utilizzo della terapia selettiva non determina il peggioramento dello stato sanitario dell'allevamento se effettuata con raziocinio (Zecconi A. C., L'asciutta selettiva dopo tre anni di applicazione in allevamento, (2023)).

Le linee guida, dell'Emilia-Romagna, per l'uso prudente degli antibiotici negli allevamenti di bovine da latte propongono uno schema, piuttosto flessibile, utilizzabile negli allevamenti in relazione al rischio sanitario. In prima istanza vi è la necessità di classificare l'allevamento in tre categorie:

- Allevamento a basso rischio
- Allevamento a medio rischio
- Allevamento ad alto rischio

Negli allevamenti a basso rischio vi deve essere l'assenza di *S. aureus* e *Str. agalactie*, la conta delle cellule somatiche del latte di massa non deve essere superiore alle 200.000 cell/ml e le terapie effettuate sulle vacche in latte devono essere inferiori al 40%. Negli allevamenti a medio rischio vi deve essere l'assenza di *Str. agalactie* ma può esserci la presenza di *S. aureus*, le cellule somatiche nel latte di massa devono essere tra le 200 e le 300 mila per ml di latte e le terapie delle vacche in latte sono tra il 40 e l'80%. Per quanto riguarda gli allevamenti ad alto rischio ovviamente vi sarà la presenza di *Str. agalactie* e *S. aureus*, le cellule somatiche saranno superiori a 300.000 cell/ml ed infine le terapie effettuate sulle vacche in latte saranno superiori all'80%.

Per ogni categoria vengono ad essere presenti dei criteri per la scelta degli animali da sottoporre ad antibiotico terapia. Di questi criteri, almeno uno deve essere rispettato per poter effettuare l'antibiotico terapia per la messa in asciutta. Negli allevamenti a basso rischio, i criteri sono i seguenti:

- Cellule somatiche maggiori di 200.000 cell/ml in almeno uno tra gli ultimi tre controlli funzionali
- Presenza di mastiti cliniche durante la lattazione
- CMT positivo alla messa in asciutta
- Positività all'esame colturale

Negli allevamenti a medio rischio gli animali da trattare con l'antibiotico alla messa in asciutta sono quelli che soddisfano almeno un criterio dei seguenti citati:

- Cellule somatiche maggiori di 150.000 cell/ml in almeno uno degli ultimi tre controlli funzionali
- Presenza di mastiti cliniche durante la lattazione
- CMT positivo alla messa in asciutta
- Esame colturale positivo

Per quanto riguarda gli allevamenti ad alto rischio viene preso in considerazione almeno un criterio tra i seguenti citati:

- Cellule somatiche maggiori di 100.000 cell/ml in almeno uno degli ultimi tre controlli funzionali
- Presenza di mastiti cliniche durante la lattazione
- CMT positivo alla messa in asciutta
- Esame colturale positivo

Il CMT è consigliato soprattutto per evitare che sfugga un'infezione tra l'ultimo controllo funzionale e l'asciutta stessa. In base alla tipologia di allevamento dovrà essere individuata la procedura più appropriata iniziando gradualmente con l'estensione del protocollo di asciutta selettiva evitando di mettere a repentaglio il benessere delle bovine (Arrigoni, 2018).

È utile ricordare che, in generale, l'asciutta selettiva non può essere applicata in tutti gli allevamenti in quanto negli allevamenti non indenni da batteri contagiosi questa pratica può solo aumentare i problemi sanitari e per questo motivo l'SDCT è effettuata solamente negli allevamenti indenni da contagiosi. L'utilizzo del sigillante è importante ma è altrettanto importante che la procedura sia effettuata in maniera corretta per evitare la contaminazione dei capezzoli. A seguito del parto, all'incirca dopo due settimane, le bovine dovrebbero essere valutate per eventuali accertamenti, idealmente dovrebbe essere eseguita l'analisi microbiologica

oppure la conta delle cellule somatiche. I criteri applicati per la selezione delle bovine devono essere trasparenti e verificati in modo da non incorrere in problematiche riguardanti il benessere dell'animale. L'applicazione dei metodi "alternativi", come l'utilizzo di trattamenti non autorizzati, può portare a differenti problematiche di importanza rilevante dal punto di vista economico (Zecconi A. C., La sanità della mammella nella bovina, 2020).

CAPITOLO 4 – ESPERIENZA DI CAMPO

L'obiettivo che si prefigge lo studio oggetto di tesi è apportare un contributo alla problematica dell'asciutta selettiva in comparazione con quella tradizionale. In particolare, si è preso in considerazione un allevamento di bovine da latte della provincia di Parma, il quale produce latte per Parmigiano Reggiano. È stato condotto un monitoraggio relativo alla prevalenza di mastiti cliniche in allevamento passando da un protocollo di asciutta tradizionale, effettuata con il trattamento antibiotico a tappeto su tutte le bovine al momento dell'asciutta, al protocollo di asciutta selettiva. Tramite i dati rilevati è stato possibile eseguire una statistica, effettuata mediante la distribuzione del Chi-quadrato, per verificare se la variabile mastite fosse associata oppure indipendente dall'asciutta selettiva.

CAPITOLO 5 – MATERIALI E METODI

5.1 DESCRIZIONE DELL'AZIENDA

L'azienda agricola in oggetto è situata nel comune di Coenzo di Sorbolo, in provincia di Parma. Nel 2020 era costituita da un totale di 550 bovine di cui mediamente 250 in lattazione. Successivamente il numero degli animali è aumentato in quanto il proprietario ha acquistato ulteriore quota latte Parmigiano Reggiano e per poterla sfruttare, nel corso del 2021, il numero delle bovine è aumentato fino ad arrivare a 600 capi in totale con circa 260 capi in latte. Nel 2022 e 2023 il numero delle bovine totali si è stabilizzato a 630 capi in totale con una media di 270 vacche in lattazione e circa 60 vacche in asciutta, 175 manze, 60 manzette, 65 vitelle.

Le bovine allevate sono state selezionate mediante un sistema di incrocio a tre vie proposto da Genesi Project S.r.l, azienda fondata dal medico veterinario Dr. Corrado Caroli, per ottenere una maggiore fertilità e longevità degli animali e per poter ridurre i costi dei trattamenti sanitari. Questa tipologia di incrocio è l'unico sistema di cross breeding provato e maggiormente redditizio, ed è effettuato attraverso l'utilizzo delle seguenti razze bovine: VikingHolstein, VikingRed e Coopex Montbéliarde. Queste tra razze non sono imparentate e per questo motivo hanno il

vantaggio dell'eterosi che permette loro di compensare i loro lati positivi e negativi. La VikingHolstein ha una struttura media, produzioni di latte molto elevate e ottimi apparati mammari, la VikingRed ha un'ottima longevità e ha come caratteristica la facilità di parto mentre per quanto riguarda la Coopex Montbéliarde, essa gode di ottima fertilità, forza e ha un buon contenuto di proteine nel latte.

Questo programma di selezione è chiamato ProCROSS, nato in California nel 2002 grazie agli allevatori che iniziarono a effettuare degli incroci su vacche Holstein per poter ottenere degli animali maggiormente adatti alle loro esigenze. Le tre razze citate precedentemente furono considerate le migliori per gli allevatori e queste valutazioni furono confermate dall'università del Minnesota che ha confrontato le performance delle vacche frutto di questo incrocio e le vacche di razza Holstein. Determinando l'utilizzo di questo incrocio l'eterosi che si ottiene è dell'86% rispetto invece all'incrocio a due vie che permette di avere un'eterosi del 67% (Caroli, 2022).

Gli animali sono situati all'interno di tre strutture diverse, le bovine adulte sono stabulate all'interno di una stalla orientata in direzione est-ovest, costituita da una costruzione prefabbricata in ferro, aperta su tutti i lati. La struttura è di 90 metri di lunghezza, 32,8 metri di larghezza ed un'altezza centrale di 9,5 metri mentre ai lati l'altezza è di 4,5 metri. Il tetto è costituito da pannelli sandwich, che permettono una coibentazione termica, composti da poliestere rinforzato con fibra di vetro aventi uno spessore di 60 mm. Sul tetto vi è la presenza di un colmo centrale e di un cupolino, per permettere la fuoriuscita dell'aria. La stalla è a stabulazione libera ed è costituita da due parti disposte a specchio divise dalla corsia centrale di foraggiamento avente una larghezza di 5 metri. Entrambe le parti della stalla presentano differenti zone, tra cui la zona di alimentazione che ha una larghezza di 3,90 metri, la zona di riposo con tre ordini di cuccette di cui due contrapposti, dove gli animali sono "testa a testa". È presente una zona di esercizio che ha una larghezza di 2,50 metri la quale divide le due file di cuccette contrapposte dall'ultima fila di cuccette che è disposta ad un solo ordine.

La tipologia delle cuccette è cosiddetta a buca, esse presentano una lunghezza di 2,50 metri con una larghezza di 1,25 metri, nelle quali viene ad essere inserita una volta a settimana della paglia lunga attraverso l'utilizzo di un lanciapaglia impagliatore e vi è anche l'aggiunta di disinfettante a base di cloro per poter ridurre la carica microbica della lettiera. Una parte di stalla è costituita da 172 cuccette mentre l'altra parte da 154. Le postazioni, nella rastrelliera autocatturante, sono rispettivamente 126 per entrambe le parti di stalla. Nella porzione di stalla costituita da 172

cucette vi è la presenza di 6 passaggi di larghezza variabile tra i 3,75 metri e 5 metri, che permettono agli animali di passare comodamente dalla zona di alimentazione alla zona di riposo e a quella di esercizio. Nell'altra porzione di stalla vi è la presenza di 7 passaggi e 3 postazioni con robot di mungitura. In ogni passaggio sono stati installati abbeveratoi di lunghezza pari a 3,30 metri e larghezza di 0,3 metri. La pavimentazione è costituita da cemento pieno con rigatura romboidale per evitare scivolamenti delle bovine.

Per quanto riguarda la stalla delle manze essa è costituita da un capannone di 40 metri di lunghezza e 32,8 metri di larghezza divisa anche essa a metà da una corsia di foraggiamento di 5 metri. Nella prima metà della stalla sono stabulate le manze e manzette suddivise in vari gruppi in relazione all'età a partire dai 6 mesi di vita fino alla conferma dei 120 giorni di gravidanza. Nell'altra metà di stalla vi è la presenza delle manze gravide a partire dai 120 giorni di gravidanza fino a 20 giorni dal parto presunto. Vi sono anche due box infermeria per le bovine che necessitano per diversi motivi di essere separate dalla mandria. Accanto ai box infermeria è presente la sala di mungitura, con annessa la sala d'attesa, completamente pavimentate con tappetini in gomma per evitare scivolamenti.

Le vitelle a partire da 0 giorni fino a 28 giorni di vita sono disposte singolarmente in box igloo e successivamente dai 28 giorni ai 60 giorni sono inserite in box multipli da 6 posti ciascuno aventi dimensioni di 5 metri di lunghezza e 4 metri di larghezza. Le vitelle a partire da 60 giorni di vita fino ai 6 mesi sono suddivise in relazione all'età in 11 box, da 6 posti ciascuno, all'interno di un altro capannone avente dimensioni di 50 metri di lunghezza e 30 metri di larghezza. Le dimensioni dei box variano in relazione al peso delle bovine garantendo una superficie per capo adeguata al benessere degli animali.

Nella progettazione della stalla delle bovine in lattazione e delle bovine in asciutta è stato incluso anche un sistema di ventilazione forzata mediante l'utilizzo di ventilatori a soffitto, ossia i destratificatori che permettono l'allontanamento dell'aria calda durante i mesi estivi aiutando la dispersione del calore dell'animale, e ventilatori assiali disposti lungo la corsia di alimentazione. È presente anche un sistema di raffrescamento con doccette che erogano acqua a goccia pesante in maniera alternata sugli animali per un tempo di circa due minuti e di seguito spente per poter permettere l'asciugatura delle bovine e consentire in questo modo il loro raffreddamento. L'attivazione di entrambi i sistemi viene ad essere determinata dal livello di THI (Temperature Humidity Index) dell'ambiente.

Lungo il perimetro della stalla sono state installate delle tende frangivento e ombreggianti, mentre per poter mantenere un livello adeguato di pulizia ed igiene, sono stati installati dei raschiatori a cavo che hanno il compito di allontanare le deiezioni con una frequenza di otto volte al giorno.

Per questioni organizzative ma soprattutto in relazione ai fabbisogni nutritivi delle bovine e alla loro alimentazione, nell'anno 2020 la stabulazione degli animali era suddivisa in differenti gruppi:

- Gruppo robot 1: gruppo delle primipare fresche fino a circa 200 giorni di lattazione, munte attraverso l'utilizzo del robot di mungitura. Box con capienza massima di 50 capi.
- Gruppo robot 2: gruppo delle secondipare fresche fino a circa 200 giorni di lattazione, munte attraverso l'utilizzo del robot di mungitura. Box con capienza massima di 50 capi.
- Gruppo robot 3: gruppo delle pluripare fresche fino a circa 200 giorni di lattazione con produzione di latte superiore a 30 kg/giorno, munte attraverso l'utilizzo del robot di mungitura. Box con capienza massima di 50 capi.
- Gruppo stanche 1: gruppo delle vacche cosiddette "stanche" ossia le bovine provenienti dai robot di mungitura con una produzione di latte inferiore a 30 kg al giorno e quelle con un numero di giorni di lattazione superiori a 200. I seguenti animali sono munti in sala di mungitura. Box con capienza massima di 70 bovine.
- Gruppo stanche 2: gruppo delle vacche che hanno un valore di BCS superiore o uguale a 4. I seguenti animali sono munti in sala di mungitura. Box con capienza massima di 50 bovine.
- Gruppo asciutte: gruppo delle vacche asciugate che si trovano a 60 giorni prima del parto. Capienza massima 35 bovine.
- Gruppo close-up: ultimi 20 giorni prima del parto. Box con capienza massima di 20 bovine.
- Gruppo manze gravide: gruppo delle manze con più di 120 giorni di gravidanza, box con capienza massima di 45 manze.
- Gruppo manze: suddiviso ulteriormente in 4 box da 12 posti ciascuno nei quali sono inserite le manzette dai 6 ai 12 mesi, 2 box da 24 posti per le manzette e manze dai 12 ai 16 mesi e 1 box da 50 posti per le manze con età superiore ai 16 mesi fino a 120 giorni di gravidanza.
- Gruppo vitelle svezzate: vitelle dai 60 giorni fino a 6 mesi di età suddivise in 11 box da 6 posti ciascuno in relazione all'età e peso.

- Gruppo vitelle in svezzamento: vitelle dai 28 giorni ai 60 giorni disposte in box multipli
- Gruppo vitelli: vitelli e vitelle da 0 a 28 giorni disposti in box igloo singoli.
- Infermeria 1: animali prevalentemente a terra con traumi muscolo-scheletrici, traumi da scavalcamiento, traumi causati dal raschiatore, ipocalcemia.
- Infermeria 2: mastiti, vacche con zoppia, vacche con traumi di lieve entità.

Successivamente, negli anni seguenti, partendo dall'anno 2021 le bovine sono state suddivise in gruppi differenti infatti è stato eliminato il gruppo denominato "Stanche 2", ossia il gruppo delle bovine che superavano il valore di BCS pari a 4. Il proprietario, in questa situazione, ha deciso di riformare le bovine non gravide, con un BCS elevato e con scarsa produzione a causa dell'aumento dei prezzi delle materie prime. Le bovine vendute non erano in grado di determinare un margine di guadagno adeguato. Le bovine gravide facenti parte del gruppo "Stanche 2" sono state inserite in un unico gruppo insieme al gruppo "Stanche 1".

A seguito dell'introduzione dell'asciutta selettiva, ossia a gennaio del 2021, è stato introdotto un ulteriore gruppo (gruppo pre-asciutta) situato vicino alla sala di mungitura dove, durante la mattina del lunedì vengono inserite le bovine che dovranno essere asciugate il giovedì pomeriggio. Le bovine sono introdotte in questo gruppo in quanto sono alimentate con la stessa razione delle vacche in asciutta per poter ridurre la produzione latte al di sotto dei 20 kg al giorno e per poter asciugare le vacche unitamente, prima della mungitura pomeridiana del giovedì.

5.1.1 ALIMENTAZIONE

Come descritto in precedenza, i gruppi delle bovine sono stati organizzati in relazione alla fase della lattazione degli animali e in relazione alle esigenze alimentari di ogni categoria. Nella seguente azienda l'alimentazione delle bovine è preparata mediante un carro miscelatore, il quale permette di creare una razione più uniforme per le bovine rispetto all'utilizzo dell'alimentazione tradizionale basata principalmente su fieno lungo e mangime. La razione per le bovine, che si trovano nella fase di lattazione, viene ad essere distribuita tutte le mattine a seguito della pulizia della corsia di foraggiamento, mentre per le vacche asciutte e le manze dai 6 mesi in poi, viene preparata la razione a giorni alterni. Per l'avvicinamento dell'alimento alle bovine è presente uno spingiforaggio automatizzato. Per le bovine che sono munte con il robot di mungitura, la razione comprende una formula alimentare di base e un'integrazione di mangime e glicerolo, somministrati attraverso il robot di mungitura. La formulazione comprende:

- Soia bucce: 0,6 kg T.Q.
- Paglia di frumento: 1,5 kg T.Q.
- Medica fieno di primo taglio: 5,5 kg T.Q.
- Medica fieno di secondo/terzo taglio: 3,5 kg T.Q.
- Medica fieno di quarto/quinto taglio: 3,5 kg T.Q.
- Girasole seme: 0,4 kg T.Q.
- Mais fioccato : 1,5 kg T.Q.
- Soia integrale fioccata: 0,4 kg T.Q.
- Mais farina: 2,5 kg T.Q.
- Soia farina d'estrazione 46%: 2,0 kg T.Q.
- Nucleo: 1,5 kg T.Q.
- Nucleo robot: fino ad un massimo di 3 kg T.Q.
- Glicerolo totale: 0,3 kg T.Q.
- Acqua: 10 kg T.Q.

Per quanto riguarda la razione per il gruppo delle vacche "stanche", essa è costituita da:

- Paglia di frumento: 1,4 kg T.Q.
- Medica fieno di primo taglio: 5,0 kg T.Q.
- Medica fieno di secondo/terzo taglio: 4,0 kg T.Q.
- Medica fieno di quarto/quinto taglio: 4,0 kg T.Q.
- Soia bucce: 1,0 kg T.Q.
- Soia integrale fioccata: 0,3 kg T.Q.
- Mais fioccato: 1,7 kg T.Q.
- Mais farina: 5,2 kg T.Q.
- Soia farina d'estrazione: 1,5 kg T.Q.
- Nucleo: 2,4 kg T.Q.
- Acqua: 10 kg T.Q.

L'alimentazione delle vacche che verranno asciugate, quella delle vacche in asciutta e quella delle manze gravide dopo i 120 giorni di gravidanza è costituita dalla medesima formulazione:

- Paglia di frumento: 5 kg T.Q.
- Medica fieno di primo taglio: 3 kg T.Q.
- Medica fieno di secondo taglio: 2,5 kg T.Q.

- Nucleo vacche asciutte: 1,5 kg T.Q.
- Mais farina: 1,0 kg T.Q.
- Soia bucce: 0,5 kg T.Q.

Le vacche che invece fanno parte del gruppo “close-up”, ossia le bovine che si trovano a circa venti giorni prima del parto, hanno una razione di base che è medesima a quella delle vacche in asciutta ma integrata attraverso l’utilizzo di:

- Mais fioccato: 0,6 kg T.Q.
- Glicerolo : 0,3 kg T.Q.
- Soia integrale fioccata: 0,1 kg T.Q.

Le manze dai 6 mesi fino ai 120 giorni di gravidanza hanno la seguente razione:

- Paglia di frumento: 2 kg T.Q.
- Medica fieno di primo taglio: 3 kg T.Q.
- Medica fieno di secondo taglio: 2,7 kg T.Q.
- Integratore per manze: 0,15 kg T.Q.
- Soia farina d’estrazione: 0,4 kg T.Q.
- Mais farina: 0,8 kg T.Q.
- Soia bucce: 0,9 kg T.Q.

I vitelli svezzati, ossia a partire dai 60 giorni fino ai 6 mesi di età vengono alimentati, in relazione ai fabbisogni, attraverso l’utilizzo di fieno di primo taglio a volontà e con un quantitativo di mangime che varia da 1,0 kg T.Q. a 3,0 kg T.Q. Il mangime, specifico per vitelli, viene ad essere distribuito due volte al giorno, generalmente al mattino e alla sera. Per quanto riguarda i vitelli neonati, entro le tre ore dal parto vengono ad essere colostrati con il colostro della madre, il quale viene valutato attraverso un rifrattometro Brix. Esso per essere di qualità accettabile, non deve avere un valore inferiore al 22%. I colostri che purtroppo non raggiungono questo valore sono addizionati con colostro artificiale per evitare eventuale FPT (Failure Passive Transfer) del vitello. Viene ad essere eseguito anche un secondo pasto di colostro. Per i giorni seguenti, sino all’età di 50 giorni, l’alimentazione viene ad essere costituita da latte in polvere ricostituito, derivante da latte magro, distribuito due volte al giorno con un volume pari a 2 litri/capo ed inoltre è distribuito anche il mangime specifico per vitelli ad libitum. Il fieno viene ad essere introdotto solamente a 40 giorni di età.

5.1.2 LA MUNGITURA

La mungitura è un fattore piuttosto significativo per la salute della mammella, per questo motivo deve essere effettuata in maniera adeguata a garantire la salubrità delle bovine e per poter ottenere un latte di elevata qualità dal punto di vista igienico. Nell'azienda agricola in questione, le bovine "fresche" fino a 200 giorni di lattazione vengono munte attraverso la mungitura robotizzata mentre le bovine che superano i 200 giorni di lattazione vengono munte mediante la sala di mungitura. Sono stati installati, nel 2020, tre robot di mungitura Merlin, dell'azienda TDM (Total Dairy Management), i quali mungono in totale 145 bovine. Il robot di mungitura, per la produzione del Parmigiano Reggiano, deve essere necessariamente interrotto per 12 ore, in questo caso le bovine non possono essere munte a partire dalle ore 18.00 sino alle 00.00 e dalle 6.00 sino alle 12.00. Durante il tempo rimanente le bovine possono essere munte, entrano spontaneamente all'interno della gabbia del robot di mungitura e vengono riconosciute dalla macchina mediante i podometri assegnati ad ognuna di esse, posti, mediante una fascia, a livello dell'osso metacarpale destro.

I podometri hanno lo scopo di rilevare il comportamento della mandria e comunicarlo, tramite la tecnologia wireless, ad un'antenna, ogni 15 minuti e infine le informazioni sono trasferite nei software gestionali, inseriti nel computer aziendale, che in questo caso sono "Afifarm™" (Afimilk®, Kibbutz Afikim, Israel) e "Crystal™". "Afifarm™" è il software utilizzato maggiormente per ottenere i dati utili alla gestione di tutti gli animali dell'azienda, ad esempio, vengono registrati tutti gli eventi che accadono per ogni bovina tra cui: terapie, calori e fecondazioni artificiali, diagnosi di gravidanza, conferme di gravidanza, protocolli di sincronizzazione, protocolli vaccinali, eventuali patologie, rimozione o vendita degli animali, nascita e morte delle bovine. Questo software gestionale permette anche la rilevazione della produzione latte della mungitura mattutina e serale, misurata attraverso i lattometri, delle bovine munte nella sala di mungitura costruendo in questo modo, giorno per giorno, i grafici della lattazione corrente indicandone la conducibilità elettrica del latte e il tempo di mungitura. Vengono ad essere rilevate anche le ore di riposo dell'animale e il numero dei passi compiuti durante la giornata.

Il software gestionale utilizzato per la rilevazione dei dati riguardanti le bovine munte attraverso il robot di mungitura è "Crystal™", il quale riceve informazioni sia dal podometro che dal robot. Le informazioni che si possono rilevare sono: i dati principali della bovina (data di nascita, matricola, numero di podometro, razza), il numero di mungiture, le ore dall'ultima mungitura, le

vacche in ritardo per la mungitura prevista, le coordinate per il ritrovamento dei capezzoli della mammella, la produzione giornaliera, la conducibilità elettrica del latte, l'attività giornaliera, il grasso giornaliero nel latte, il sangue presente nel latte, la proteina giornaliera, il lattosio giornaliero, e il riposo. È presente anche una parte di rilevazione dell'usura delle guaine di mungitura e il consumo di mangime.

La bovina una volta entrata all'interno della postazione del robot di mungitura, viene riconosciuta e le viene somministrato immediatamente il mangime e il glicerolo in relazione alla produzione latte prevista. Nel mentre, il braccio robotizzato inizia ad eseguire la pulizia dei capezzoli attraverso due spazzole rotanti, disinfettate ad ogni mungitura con soluzione iodata. In questo modo, oltre alla pulizia dei capezzoli, si ottiene uno stimolo adeguato all'eiezione del latte. Il numero delle spazzolature dei capezzoli viene impostato dall'allevatore a livello del gestionale, valutando la curva di mungitura presente sullo schermo del robot, per poter evitare l'eventuale mungitura bimodale di alcuni animali che hanno la necessità di maggiore stimolazione per il rilascio dell'ossitocina. Di seguito il laser presente nel robot identifica e inizia ad attaccare singolarmente i capezzoli, effettua la mungitura scartando i primi getti di latte di ogni quarto. Durante la mungitura viene illustrato sul monitor touch screen del robot, il flusso di latte di ogni quarto con la relativa curva, indicando l'orario di inizio e fine mungitura di ogni quarto mammario. Quando il robot rileva una diminuzione del flusso di latte, al di sotto di una certa soglia, si determina lo stacco del bossolo relativo al quarto mammario che ha subito la riduzione della produzione e questo avviene mediante sensori appositi che misurano il flusso di latte di ogni singolo quarto. Alla fine della mungitura viene applicato il post-dipping a base di iodio, mediante un nebulizzatore. Successivamente alla fine della mungitura, viene effettuato un lavaggio con acqua e acido peracetico del gruppo di mungitura.

Le bovine che hanno partorito vengono munte e il colostro viene separato in secchi appositi per poterlo somministrare successivamente ai vitelli neonati. Dopo aver recuperato il colostro per i primi due pasti dei vitelli, il latte di transizione viene scartato per altri otto giorni, in quanto inadeguato alla lavorazione del Parmigiano Reggiano e convogliato all'interno del biogas attivo in azienda. Per quanto riguarda il latte mastitico e il latte delle bovine trattate con antibiotico viene anche esso scartato. Il robot di mungitura, in questi casi, non effettua solamente il lavaggio del gruppo di mungitura ma effettua la detersione e disinfezione dell'intera macchina prima di poter effettuare la mungitura di un'altra bovina.

Le bovine denominate “stanche” vengono munte in sala di mungitura, due volte al giorno, nei seguenti orari: dalle ore 2.30 alle 4.30 del mattino e dalle 14.30 alle 16.30 del pomeriggio. La sala di mungitura presente in azienda è una sala di tipo classico dell’azienda TDM, a spina di pesce, la quale prevede la disposizione delle vacche con una angolatura di 33° rispetto alla buca dove avviene la mungitura. Le poste totali, per la mungitura delle bovine, sono 16 e sono disposte su due file parallele da 8 poste ciascuna. La sala di mungitura, di circa 15 anni, è mantenuta in condizioni strutturali ed igieniche adeguate ed è provvista di un’antenna, a livello dei cancelli di entrata delle postazioni di mungitura, che permette la lettura del podometro della bovina. A livello della tastiera del lattometro elettronico appare il numero della bovina e di seguito si potrà eseguire l’attacco dei gruppi di mungitura costituiti da guaine in gomma triangolari e non ventilate (Rite Impulse TDM). Sullo schermo della tastiera sarà visibile, durante la mungitura, anche la produzione di latte della bovina e verranno comunicati i dati relativi alla mungitura al gestionale “Afifarm™”. Lo stacco dei gruppi di mungitura è automatico e avviene mediante la misurazione del flusso di latte, eseguita dal lattometro, che deve essere inferiore a 400 grammi al minuto. Periodicamente vengono ad essere sostituite le guaine, controllato il vuoto, che in questo caso è di 41,8 kPa, l’inverter e i pulsatori, in modo da poter effettuare una mungitura corretta evitando danni al capezzolo, causati da un mal funzionamento della macchina.

La routine di mungitura è impostata sulla manodopera di due operai, i quali indossano un grembiule cerato lavabile e guanti in lattice puliti. Si esegue la mungitura “territoriale” di quattro animali per volta per ogni uomo, sulla stessa fila, e successivamente vengono effettuate le seguenti operazioni:

- Allontanamento dei primi getti di latte per la sua valutazione e applicazione di un disinfettante schiumogeno (pre-dipping).
- Pulizia con carta a perdere pulita, uno strappo per ogni animale
- Attacco rapido, preciso e senza inserimento di aria (eventualmente visibile dai grafici del gestionale)
- Stacco automatico del gruppo di mungitura
- Applicazione del post-dipping in maniera precisa su 2/3 del capezzolo

Tra l’inizio della stimolazione manuale e l’attacco del gruppo di mungitura passa generalmente un tempo tra i 90 e 100 secondi, tempo necessario all’azione dell’ossitocina, per questo motivo durante la mungitura è raro che siano presenti delle curve di mungitura bimodale. Il pre-dipping,

a base di acido lattico, è applicato su tutte le bovine e permane sul capezzolo all'incirca 50 secondi per poter svolgere la sua azione. Per quanto riguarda il post-dipping, a base di iodio, è applicato coprendo i 2/3 del capezzolo. Successivamente al post-dipping le bovine vengono liberate per poter tornare nel gruppo.

Il latte, a seguito della mungitura viene convogliato in due cisterne frigorifere, una per il latte proveniente dai robot e un'altra per il latte proveniente dalla sala di mungitura e portato ad una temperatura non inferiore ai 18°C, come dettato dal disciplinare per Parmigiano Reggiano.

La produzione di latte della seguente azienda nel 2020 era di circa 31 litri/capo/die, mentre negli anni seguenti si è portata a 33 litri/capo/die. I dati, forniti ogni due settimane dal caseificio a cui è conferito il latte, hanno mostrato che negli anni 2020, 2021, 2022 e metà del 2023 il livello di grasso e proteine sono rimasti pressochè invariati dove per il grasso il valore medio è 3,55 g/100g, per le proteine 3,40 g/100g con valori di caseina pari a 2,68 g/100g. Mediante le analisi effettuate dal caseificio sono state valutate anche le cellule somatiche del latte di massa che sono sempre risultate, a partire dal 2020, inferiori a 200.000 cellule/ml. Vengono, inoltre, effettuati due controlli all'anno sul latte di massa per la valutazione di eventuale presenza di batteri come *Str. agalactie*, *S. aureus*, *Mycoplasma spp.* e *Prototheca* ma anche per la valutazione della presenza del virus della BVD.

5.1.3 PROTOCOLLI DELLA MESSA IN ASCIUTTA

La messa in asciutta è una fase molto delicata ed importante per la bovina da latte, è un evento piuttosto stressante a causa dei cambiamenti metabolici e routinari della vacca. Inizialmente, nel seguente allevamento, l'asciutta era basata sul metodo tradizionale; infatti, le bovine venivano asciugate drasticamente e trattate a tappeto attraverso l'utilizzo dell'antibiotico, formulato come sospensione intramammaria, e del sigillante. In questo caso l'antibiotico utilizzato era Rilexine 500 HI intramammario a base di cefalexina benzatinica, appartenente alla categoria delle cefalosporine di prima generazione. Il sigillante utilizzato, facente parte della categoria dei farmaci antinfettivi specifici per la mammella, era l'Orbeseal, a base di bismuto nitrato basico, il quale fornisce una barriera fisica all'entrata dei patogeni.

A partire da gennaio 2021 è stato proposto dal veterinario aziendale, visto il Regolamento (UE) 2019/6 relativo ai medicinali veterinari che mira ad evitare il trattamento sistemico delle vacche in asciutta, un protocollo di asciutta selettiva basato sull'utilizzo del solo sigillante che in questo caso è l'Orbeseal. In relazione alle linee guida dell'uso prudente dell'antibiotico nell'allevamento

bovino da latte, l'allevamento è stato considerato a basso rischio in quanto vi è l'assenza di *Str. agalactiae* e *S. aureus*, le cellule somatiche del latte di massa sono inferiori a 200.000 cellule/ml e le terapie sulle vacche in lattazione durante l'anno sono inferiori al 40%. Sempre in relazione a questo documento, si è deciso che le bovine da trattare con il protocollo di asciutta tradizionale sono quelle che presentano almeno una mastite clinica durante la lattazione e le bovine con un CMT positivo alla messa in asciutta. Il protocollo di asciutta selettiva è applicato solamente alle bovine che presentano un CMT negativo per tutti i quarti mammari e che non abbiano avuto mastite clinica durante la lattazione e quindi, in questo caso, trattate solamente con l'utilizzo del sigillante. L'asciutta selettiva, in questa azienda, viene effettuata adottando il metodo dell'asciutta non drastica, ossia viene utilizzata una strategia utile alla riduzione, in maniera graduale, della produzione di latte, evitando in questo modo la messa in asciutta delle bovine con una produzione maggiore di 20 kg di latte al giorno. La strategia utilizzata è la restrizione alimentare, effettuata almeno tre giorni prima della messa in asciutta della bovina.

Solitamente, per questioni organizzative dell'azienda, la messa in asciutta avviene il giovedì pomeriggio e per questo motivo a partire dal lunedì della stessa settimana, le bovine da asciugare vengono spostate dal gruppo delle "stanche" al gruppo di pre-asciutta, dove viene somministrata la stessa alimentazione che viene distribuita alle vacche in asciutta e quindi meno energetica rispetto alla razione delle vacche in latte. In questo modo le bovine determinano una riduzione della produzione latte arrivando a produrre circa 15-18 kg di latte al giorno o addirittura arrivano a valori inferiori, a questo punto è possibile effettuare la messa in asciutta. Il giorno stesso in cui le bovine vengono inserite nel gruppo di pre-asciutta, viene eseguito il CMT (California Mastitis Test), test considerato utile alla decisione di effettuare l'asciutta selettiva oppure l'asciutta tradizionale. Il California Mastitis Test viene eseguito attraverso l'utilizzo di una padella apposta suddivisa in quattro scomparti, ognuno relativo ad un quarto, e tramite l'utilizzo di un reagente specifico si viene a determinare il contenuto di DNA presente all'interno del latte e di conseguenza il numero delle cellule somatiche.

Per l'effettuazione del CMT si procede con i seguenti passaggi:

- Allontanamento dei primi getti di latte e pre-dipping con agente schiumogeno
- Pulizia dei capezzoli con carta a perdere
- Mungitura dei singoli quarti all'interno dello scomparto apposito della padella
- Svuotamento della padella dal latte eccedente

- Aggiunta del reagente
- Agitazione della padella per poter miscelare il latte con il reagente
- Valutazione dell'eventuale formazione di gel
- Indicare i quarti positivi e negativi al test per poter effettuare l'asciutta

L'eventuale formazione di gel all'interno di uno o più scomparti identifica una positività del quarto. Nel 2021 e 2022, la sola presenza di un quarto positivo indicava che l'animale era da trattare con asciutta tradizionale su tutti e quattro i quarti. A partire dal primo semestre del 2023 si è deciso di effettuare l'asciutta selettiva trattando i quarti singolarmente ossia, se una bovina presentava uno o due quarti positivi, solo questi ultimi venivano asciugati attraverso l'utilizzo dell'antibiotico, mentre i quarti risultati negativi venivano asciugati attraverso l'asciutta selettiva. Nel caso in cui una bovina presentasse una positività riferibile a 3 capezzoli su 4, si applicava il protocollo di asciutta tradizionale su tutti e quattro i quarti mammari. Questa scelta dell'allevatore, in accordo con il veterinario, è stata effettuata per poter ridurre l'utilizzo di antibiotico a fronte del sistema Classyfarm e per poter ricevere contributi PAC in relazione alla riduzione dell'antibiotico.

Una volta segnalati i quarti negativi e positivi delle bovine, il giovedì pomeriggio durante la mungitura pomeridiana, si esegue la vera e propria messa in asciutta. Le bovine seguono la classica routine di mungitura ma prima di effettuare il post dipping deve essere eseguita la disinfezione dei capezzoli e successivamente viene effettuato il trattamento tradizionale oppure selettivo, applicando l'antibiotico e il sigillante oppure il solo sigillante. L'antibiotico ma soprattutto il sigillante deve essere introdotto all'interno del capezzolo in maniera differente, infatti, l'antibiotico deve poter risalire all'interno del quarto mammario e diffondere al suo interno mentre il sigillante deve rimanere all'interno della cisterna del capezzolo senza dirigersi all'interno del parenchima. Per poter inserire il sigillante è utile schiacciare con due dita di una mano la base del capezzolo, in modo tale da bloccare l'eventuale entrata di prodotto all'interno del parenchima mammario, e con l'altra mano viene inserito il sigillante posto all'interno di una siringa apposita per l'utilizzo intracanalicolare. Queste operazioni devono essere eseguite in modo tale che non vi sia l'introduzione di batteri attraverso i beccucci delle siringhe, i quali potrebbero essere contaminati. Successivamente gli animali sono inseriti all'interno del box delle asciutte per circa 40 giorni e spostati successivamente all'interno del box close-up per altri 20 giorni, in totale l'asciutta dura almeno 60 giorni. Gli animali che hanno una produzione giornaliera inferiore ai 10

kg di latte al giorno vengono sottoposti ad un'asciutta anticipata per evitare danni al capezzolo a causa della sovramungitura.

5.1.4 LA GESTIONE DELLA MASTITE IN AZIENDA

All'interno dell'azienda le mastiti cliniche vengono segnalate mediante diverse strategie. All'interno della sala di mungitura l'operatore è in grado constatare visivamente i segni clinici delle mastiti in relazione al loro stato di gravità. Gli animali che hanno una mastite grave presentano dei segni clinici importanti come l'anoressia e la febbre ed inoltre hanno alterazioni a carico della mammella, la quale risulta edematosa, calda ed arrossata. Molto spesso in queste occasioni abbiamo una forte riduzione della produzione con alterazioni del latte. Per quanto riguarda le mastiti moderate, il quarto interessato risulta edematoso con alterazioni del latte, mentre nelle mastiti di lieve entità si ha solamente l'alterazione del latte. Durante le prime fasi della mungitura l'operatore può valutare l'animale a partire dallo stato di salute complessivo fino alla valutazione del quarto mammario, che avviene mediante le operazioni di disinfezione e pulizia dei capezzoli ma soprattutto mediante lo stripping, ossia l'eliminazione dei primi getti di latte. Il latte mastitico può presentarsi di colore diverso rispetto al latte normale; infatti, possono essere presenti al suo interno dei flocculi, dei coaguli, delle tracce di sangue oppure può avere un aspetto acquoso. Il mungitore mediante queste operazioni e l'utilizzo del CMT è in grado di capire se vi è la presenza di mastite. È utile ricordare che durante la mungitura vengono ad essere raccolti molti dati riguardanti il latte prodotto dalle bovine e nel caso in cui vi sia la presenza di mastite è possibile riscontrare l'eventuale riduzione della produzione latte e l'aumento della conducibilità elettrica. Le bovine che hanno la mastite sono spostate all'interno del gruppo "infermeria 2" per poter essere munte per ultime, trattate adeguatamente ed infine per poter scartare il latte inadeguato e con residui di antibiotico.

Le bovine che sono munte con il robot di mungitura, entrando autonomamente all'interno della macchina, non sono visionate come le bovine che vengono munte attraverso la sala di mungitura e soprattutto non è effettuato lo stripping manuale dei capezzoli. La valutazione di eventuale mastite è effettuata dalla macchina che permette di registrare la produzione di latte, che va a diminuire, ma permette anche di rilevare la conducibilità elettrica che si innalza e l'eventuale presenza di sangue all'interno del latte. Questi dati costituiscono il sistema di allerta del robot di mungitura nei confronti delle mastiti. Qualora un animale presenti un'alterazione di questi dati, viene ad essere separato e prontamente effettuato il CMT su tutti i quarti per poter valutare la

presenza di mastite vera e propria, in quanto alterazioni della conducibilità elettrica del latte non sono sempre riferibili alla mastite. Se viene constatata la presenza di mastite, l'animale è spostato nel gruppo "infermeria 2" per poterlo mungere all'interno della sala di mungitura. Questo sistema offre dei vantaggi in quanto l'animale è munto alla fine dell'intera mungitura per evitare la contaminazione dei gruppi di mungitura, viene valutato l'andamento dell'infiammazione mammaria nei giorni successivi e soprattutto viene effettuata più comodamente la terapia adeguata alla tipologia di mastite, scartando il latte, nel pieno rispetto dei tempi di attesa dei farmaci utilizzati e finché idoneo.

La terapia delle mastiti in questo allevamento si differenzia in relazione alla tipologia della mastite stessa. Se gli animali presentano una mastite clinica acuta molto grave, con la presenza di febbre, superiore a 39,5°C, viene ad essere chiamato il veterinario che determina il protocollo terapeutico adeguato alla bovina e viene ad essere effettuato un campione sterile del latte proveniente dai quarti interessati. Generalmente la terapia che viene ad essere effettuata è basata sull'utilizzo di antinfiammatorio, in questo caso a base di ketoprofene, viene effettuata una fluidoterapia adeguata alle esigenze dell'animale e viene eseguito il monitoraggio dell'animale. Nel caso in cui vi sia una mastite clinica moderata o di lieve entità, per evitare il peggioramento del quadro infiammatorio, viene applicato il protocollo formulato dal veterinario, il quale consiglia:

- Antinfiammatorio, Fenleve (Fatro S.p.A) a base di ketoprofene, 20 ml per via intramuscolare
- Antibiotico endomammario, Synulox endomammario (Zoetis Italia S.r.l.), a base di Amoxicillina 200 mg, Acido clavulanico 50mg e Prednisolone 10 mg. Somministrato a seguito della mungitura ogni 12 ore per tre mungiture consecutive (la terapia può essere prolungata a discrezione del veterinario).
- Antibiotico per via parenterale, Permacyl (Divasa Farmavic S.A), a base di Penetacillina Iodidrato, 36 ml ogni 24 ore per 3 giorni.

Ovviamente, viene ad essere eseguito anche il prelievo del campione di latte mastitico per poter effettuare l'analisi batteriologica con relativo antibiogramma, effettuata dall'IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, che permette di avere una fotografia dei batteri circolanti all'interno della mandria e per poter formulare protocolli adeguati ad un intervento tempestivo, in quanto i tempi necessari all'analisi del latte superano il tempo in cui viene a manifestarsi la mastite del singolo animale. Per quanto riguarda gli animali che presentano una recidiva della mastite in tempi

ravvicinati al primo episodio di infiammazione e nonostante venga effettuata la terapia antibiotica di prima scelta, viene controllato il test di sensibilità dei batteri ritrovati nell'analisi batteriologica precedentemente effettuata, e se questo non è possibile, in relazione all'epidemiologia dell'allevamento, viene generalmente indicato l'utilizzo di un altro protocollo terapeutico in seconda battuta:

- Antinfiammatorio, Fenleve (Fatro S.p.A) a base di ketoprofene, 20 ml per via intramuscolare
- Antibiotico intramammario, Ubrolexylin (Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.A.), a base di Cefalexina Monoidrato e Kanamicina, trattando ogni quarto infetto due volte, lasciando trascorrere 24 ore tra i trattamenti.
- Antibiotico per via parenterale, Oextra (Fatro S.p.A), a base di Oxitetraciclina Cloridrato, 40 ml ogni 24 ore per 3 giorni.

Attraverso le analisi batteriologiche svolte, sono stati ritrovati per la maggior parte, durante gli ultimi tre anni, dei batteri Gram positivi in particolare *Streptococcus uberis*, stafilococchi coagulasi negativi e per quanto riguarda i batteri Gram negativi è stata valutata la presenza di alcune mastiti causate dal genere *Serratia*. Il protocollo utilizzato in prima istanza, come descritto negli antibiogrammi ma anche nel foglietto illustrativo relativo agli antibiotici utilizzati, è attivo verso le mastiti cliniche associate alle infezioni determinate dai seguenti patogeni tra cui: Stafilococchi (compresi i ceppi produttori di β -lattamasi), Streptococchi (compresi: *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae* e *S. uberis*), *Escherichia Coli* (compresi i ceppi produttori di β -lattamasi). Per quanto riguarda le infezioni sostenute dal genere *Serratia*, sempre secondo gli antibiogrammi effettuati, l'antibiotico più indicato è risultato essere la Kanamicina. Durante il mese di agosto 2023 è stato introdotto l'utilizzo di un test rapido da effettuare in azienda per poter decidere il trattamento da eseguire entro le 12-14 ore, basandosi sul ritrovamento, all'interno del latte, di batteri Gram positivi, Gram negativi oppure nel caso in cui non vi sia nessuna crescita. Questo test è stato introdotto al fine di trattare in maniera mirata sin dall'inizio una bovina affetta da mastite ma anche per poter ridurre l'utilizzo dell'antibiotico a fronte del sistema Classyfarm.

5.2 CRITERI DI INCLUSIONE

Nel seguente studio, i criteri di inclusione delle vacche per la raccolta dei dati sono stati:

- Bovine che abbiano partorito almeno una volta
- Bovine sottoposte alla messa in asciutta con metodo tradizionale e selettivo, valutate preventivamente attraverso l'utilizzo del CMT
- Bovine che abbiano presentato mastite durante i primi 90 giorni dopo il parto

5.3 METODI

5.3.1 RACCOLTA DATI

Durante gli anni 2020, 2021, 2022 e parte del 2023 (dal 1° gennaio fino al 31 luglio) sono stati raccolti i seguenti dati settimanalmente mediante l'utilizzo delle agende aziendali dei trattamenti e dei parti, ma anche attraverso l'utilizzo del software gestionale "Afifarm™":

- Numero identificativo di stalla della bovina
- Numero di lattazione
- Data dell'asciutta e numero di giorni dal parto per la messa in asciutta
- Quarti positivi e negativi rilevati mediante il CMT alla messa in asciutta
- Trattamento effettuato alla messa in asciutta
- Data del parto avvenuto
- Data della mastite clinica
- Trattamento della mastite

5.3.2 ANALISI STATISTICA

È stata calcolata la percentuale annuale di mastiti, riscontrata nei primi 90 giorni di lattazione, di tutti gli animali che hanno partorito durante gli anni presi in considerazione. È stato effettuato, successivamente, il test del χ^2 (Chi-quadrato), utile al confronto di due percentuali, o più, per poter verificare se la differenza osservata fosse statisticamente significativa oppure no. Per questo test si avanza l'ipotesi nulla, la quale determina che la differenza notata tra le entità considerate sia dovuta al caso. Questa ipotesi può essere considerata falsa oppure vera e di conseguenza può essere accettata oppure esclusa. È stato eseguito questo test per mettere a confronto la messa in asciutta selettiva e tradizionale nella patogenesi della mastite all'interno dell'allevamento preso in considerazione. (Bottarelli, 2011 sept)

CAPITOLO 6 - RISULTATI

Gli animali presi in considerazione nello studio erano bovini da latte frutto dell'incrocio a tre vie tra la razza Holstein, Montbéliarde e Swedish red and white, sia primipare che pluripare. Durante il 2020 gli animali giunti al parto, comprendendo sia le manze diventate primipare che le pluripare, erano 285 ed è stata calcolata la percentuale di mastiti cliniche, evidenziate durante i primi 90 giorni di lattazione dopo il parto, durante tutto l'anno. Sono stati visualizzati 26 casi di mastite clinica e per questo motivo effettuando il calcolo della percentuale si è riscontrata la presenza del 9,12% di mastite clinica. Per gli anni seguenti è stata eseguita la medesima statistica, infatti durante l'anno 2021, gli animali giunti al parto erano 345 ed è stata riscontrata la presenza di ben 56 casi di mastite clinica, raggiungendo una percentuale di mastite pari al 16,23%. Nell'anno 2022, invece, su 363 bovine che avevano partorito, 45 avevano dimostrato la presenza di mastite clinica, determinando un tasso del 12,40%. Durante i primi sette mesi dell'anno 2023, su 243 bovine giunte al parto e quindi in lattazione, 25 hanno avuto un episodio di mastite clinica, in questo modo si è raggiunta una percentuale di mastite clinica del 10,29%. È utile ricordare che a partire dal 1° gennaio 2021 fino alla fine di dicembre del 2022 è stato introdotto il protocollo di asciutta selettiva per quelle bovine che presentavano un CMT negativo, del latte di tutti quattro i quarti mammari, alla messa in asciutta, mentre per le bovine che avevano avuto un episodio di mastite nell'anno precedente e le bovine che presentavano almeno il latte di un quarto mammario positivo al CMT venivano trattate con il protocollo di asciutta tradizionale. A partire da gennaio 2023 fino alla data della fine dello studio, è stato introdotto un nuovo protocollo di asciutta selettiva ossia, se un animale avesse presentato il latte di un quarto oppure di due quarti positivi al CMT, questi sarebbero stati asciugati con il metodo dell'asciutta tradizionale, mentre i quarti negativi asciugati con il metodo dell'asciutta selettiva.

I dati grezzi ottenuti durante gli anni dimostrano un aumento della percentuale di mastite dal momento in cui è stato introdotto il protocollo di asciutta selettiva, rispetto all'anno 2020 dove vi era solamente l'utilizzo del protocollo di asciutta tradizionale.

È altresì vero che la percentuale di mastiti è diminuita negli anni 2022 e 2023, in quanto era rispettivamente del 12,40% e del 10,29%, rispetto all'anno 2021 dove la percentuale raggiungeva il 16,23%. A questo proposito si è deciso di calcolare la percentuale delle bovine sottoposte all'asciutta selettiva rispetto a quelle sottoposte all'asciutta tradizionale. Nell'anno 2021 le bovine sottoposte all'asciutta selettiva erano il 46%, infatti 92 bovine sono state trattate attraverso

l'utilizzo del solo sigillante su un totale di 200 bovine asciugate. Nell'anno 2022 le bovine sottoposte all'asciutta selettiva erano 67 su un totale di 226, ottenendo in questo modo una percentuale di asciugata selettiva pari a circa il 30%, mentre nel 2023 le bovine sottoposte all'asciutta selettiva erano 65 su un totale di 141 bovine sottoposte all' asciugata e per questo motivo la percentuale di asciugata selettiva era del 46% come nell'anno 2020.

Anche in questo caso, valutando i dati grezzi, in particolare dell'anno 2021 e 2022, si può pensare ad un aumento o diminuzione del tasso di mastite in relazione al tasso di asciugata selettiva.

Per poter effettuare un confronto vero e proprio tra le percentuali ottenute si è deciso di effettuare il test del Chi-quadrato relativo ai dati raccolti ogni anno a partire dal 2021, in quanto nel 2020 era presente solamente il protocollo di asciugata tradizionale e non quello dell'asciutta selettiva. Si è deciso di costruire una tabella di contingenza 2 x 2 inserendo nelle colonne il protocollo di asciugata che in questo caso può essere selettivo o tradizionale, mentre nelle righe viene inserito lo stato di salute della bovina ossia che essa possa essere sana oppure possa presentare la mastite.

Nel 2021 le bovine totali sottoposte all'asciutta sono state 200, di cui 108 bovine asciugate attraverso l'asciutta tradizionale e 92 con l'asciutta selettiva. Delle bovine asciugate con il metodo tradizionale 84 non hanno manifestato mastite clinica, mentre 24 l'hanno manifestata. Delle bovine asciugate attraverso l'utilizzo dell'asciutta selettiva, 77 sono rimaste sane mentre 15 hanno presentato la mastite.

Tabella 6.1 - tabella di contingenza, anno 2021

Protocollo asciutta	stato di salute		totale
	vacche sane	vacche con mastite	
tradizionale	<i>a</i> 84	<i>b</i> 24	108
selettiva	<i>c</i> 77	<i>d</i> 15	92
<i>totale</i>	161	39	200

A questo punto è stata realizzata un'ulteriore tabella contenente le frequenze attese in caso di indipendenza e per procedere al completamento di quest'ultima è stato necessario sommare il numero delle bovine sane asciugate con l'asciutta tradizionale (cella a) e le bovine sane asciugate con l'asciutta selettiva (cella c) e successivamente è stata calcolata la percentuale delle vacche

sane (a+c/totale). In questo caso è stato ottenuto il valore di 80,5%. Applicando questo tasso ai gruppi in esame, i risultati ottenuti sono i seguenti:

Tabella 6.2 - tabella di contingenza delle frequenze attese, anno 2021

protocollo asciutta	stato di salute		totale
	vacche sane	vacche con mastite	
tradizionale	a 86,94	b 21,06	108
selettiva	c 74,06	d 17,94	92
totale	161	39	200

Nella cella *a* della tabella, il valore di 86,94 è stato ottenuto assumendo che le vacche sane fossero l'80,5% delle 108 vacche trattate con l'asciutta tradizionale ($108 \times 80,5 / 100$) e analogamente, nella cella *c*, è stato eseguito il calcolo per quanto riguarda le vacche trattate con l'asciutta selettiva, assumendo che l'80,5% delle 92 vacche trattate fossero sane, ossia 74,06 soggetti ($92 \times 80,5 / 100$). I valori ottenuti nelle celle *b* e *d* sono stati ottenuti attraverso l'applicazione di una differenza: $b = (108 - 86,94) = 21,06$; $c = (92 - 74,06) = 17,94$.

In questo modo sono state ottenute due tabelle, la prima fa riferimento ai dati osservati mentre quest'ultima si riferisce ai dati attesi. Applicando la formula del χ^2 si vengono a quantificare le differenze tra i casi osservati e i casi attesi di tutte le celle. La formula utilizzata è la seguente:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-A)^2}{A} = \frac{(84-86,94)^2}{86,94} + \frac{(24-21,06)^2}{21,06} + \frac{(77-74,06)^2}{74,06} + \frac{(15-17,94)^2}{17,94} = 1,11$$

Il valore di 1,11 è stato confrontato con i valori ottenuti dalla tabella dei valori critici per il Chi-quadrato presenti in qualsivoglia libro di statistica. A questo punto è stato calcolato il grado di libertà utilizzando la seguente formula: (numero di righe - 1) x (numero di colonne - 1). Si è proseguito mettendo a confronto il dato ottenuto ossia 1,11 con il valore tabulato riferito ad 1 grado di libertà ossia 3,841. Il valore ottenuto è inferiore a 3,841 e per questo motivo si può concludere che la differenza tra le bovine trattate con l'asciutta tradizionale e l'asciutta selettiva non è significativa a livello di probabilità del 5%. Lo stesso procedimento è stato eseguito per i dati riguardati il 2022 e il 2023 ottenendo le seguenti tabelle:

Tabella 6.3 - tabella di contingenza, anno 2022

protocollo asciutta	stato di salute		totale
	vacche sane	Vacche con mastite	
tradizionale	141	18	159
selettiva	56	11	67
<i>totale</i>	197	29	226

Tabella 6.4 – tabella di contingenza delle frequenze attese, anno 2022

protocollo asciutta	stato di salute		totale
	vacche sane	vacche con mastite	
tradizionale	138,6	20,4	159
selettiva	58,4	8,6	67
<i>totale</i>	197	29	226

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-A)^2}{A} = \frac{(141-138,6)^2}{138,6} + \frac{(18-20,4)^2}{20,4} + \frac{(56-58,4)^2}{58,4} + \frac{(11-8,6)^2}{8,6} = 1,09$$

Confrontando il dato ottenuto con il dato presente nelle tabelle, si può notare come 1,09 sia minore di 3,841 e per questo motivo la differenza tra le vacche trattate con i due diversi protocolli nel 2022 non è significativa con un livello di probabilità del 5%.

I dati riguardanti il 2023 sono riportati nelle seguenti tabelle:

Tabella 6.5 – tabella di contingenza, anno 2023

protocollo	stato di salute		<i>totale</i>
	vacche sane	vacche con mastite	
asciutta			
tradizionale	66	10	76
selettiva	58	7	65
<i>totale</i>	124	17	141

Tabella 6.6 – tabella di contingenza delle frequenze attese, anno 2023

protocollo	stato di salute		<i>totale</i>
	vacche sane	vacche con mastite	
asciutta			
tradizionale	66,84	9,16	76
selettiva	57,16	7,84	65
<i>totale</i>	124	17	141

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-A)^2}{A} = \frac{(66-66,84)^2}{66,84} + \frac{(10-9,16)^2}{9,16} + \frac{(58-57,16)^2}{57,16} + \frac{(7-7,84)^2}{7,84} = 0,19$$

Anche in questo caso a seguito del confronto tra il dato ottenuto e il dato presente nella tabella, si può desumere che il valore ottenuto è inferiore a 3,841. Per questo motivo la differenza tra le vacche trattate con i due diversi protocolli nel 2023 non è significativa con un livello di probabilità del 5%.

CAPITOLO 7- CONCLUSIONI

I risultati ottenuti riguardanti le indagini sull'utilizzo dell'asciutta tradizionale e dell'asciutta selettiva hanno dimostrato che l'applicazione della terapia selettiva, effettuata secondo criteri ragionevoli, non causa un peggioramento complessivo della salute della mandria, ovviamente se accompagnata da livelli di igiene adeguati. È possibile affermare anche che la percentuale delle bovine che rimane sana a seguito del parto e durante l'intera lattazione rimane elevata e la prevalenza delle mastiti, seppur aumentando rispetto all'anno 2020, non varia di molto durante il tempo e non risulta essere significativa la differenza tra le vacche sottoposte ai due protocolli di asciutta. Ovviamente l'applicazione dell'asciutta selettiva deve essere effettuata razionalmente in base alle caratteristiche dell'allevamento e deve essere accompagnata da una valutazione delle bovine a seguito del parto.

BIBLIOGRAFIA

- Arrigoni, N. D. (2018). LINEE GUIDA Uso prudente dell'antibiotico nell'allevamento bovino da latte. *Ministero della salute*, 1-61.
- Bertocchi, L. V. (2012). Evoluzione dell'eziologia della mastite bovina nel Nord Italia dal 2005 al 2011. *Large Animal Review* , 18, 51-58.
- Bexiga, R. E. (2011 Aug). Deterministic model to evaluate the impact of lactation treatment of subclinical mastitis due to coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Res.*, 78(3):318-25. doi:10.1017/S0022029911000483
- Bottarelli, E. O. (2011 sept). *Epidemiologia teoria ed esempi di medicina veterinaria*. Milano: Edagricole.
- Bronzo, V., Lopreiato, V., Riva, F., Amadori, M., Curone, G., Addis, M., . . . Castiglioni, B. (2020). The Role of Innate Immune Response and Microbiome in Resilience of Dairy Cattle to Disease: The Mastitis Model. *Animals*, 10, 1397. doi:https://doi.org/10.3390/ani10081397
- Caroli, C. (2022, luglio 19). *Genesi Project - Riproduzione bovina in purezza e ProCross*. Tratto da Genesi Project Srl: <https://www.genesiproject.it/procross/>
- Church, G. F. (2008 Nov). The effect of a shortened dry period on intramammary infections during the subsequent lactation. *J Dairy Sci.*, 91(11):4219-25. doi:10.3168/jds.2008-1377.
- Costa, A. e. (2017). The effect of anaerobic digestion and storage on indicator microorganisms in swine and dairy manure. *Environmental Science and Pollution Research* , 24135-24146.
- De Vliegher, S. F. (2012 Mar). Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science*, 95(3):1025-40. doi:10.3168/jds.2010-4074
- Fantini, A. (2016, giugno 29). Dubbi e certezze nella gestione della mastite della bovina da latte- La nutrizione può causare e risolvere le mastiti? *La settimana veterinaria*, p. 1-32.

- Farre, M., Zecconi, A., & Kelton, D. (2022). Guidelines for defining quarter and udder health status and cured clinical and subclinical mastitis cases;. *International Dairy Federation: Bruxelles*, p. 34.
- Fuenzalida, M. a. (2019 Jun). Negatively controlled, randomized clinical trial to evaluate intramammary treatment of nonsevere, gram negative clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 102(6):5438-5457. doi:10.3168/jds.2018-16156
- Godden, S. e. (2008). Ability of organic and inorganic bedding materials to promote growth of environmental bacteria. *Journal of Dairy Science* , 151-159.
- Halasa, T., Nielen, M., Whist, A., & Osteras, O. (2009). Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 2. Cure of existing intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 92, 3150-3157. doi:10.3168/jds.2008-1741
- Halasa, T., Osteras, O., Hogeveen, H., van Werven, T., & Nielen, M. (2009). Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 1. Protection against new intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 92, 3134-3149,. doi:10.3168/jds.2008-1740.
- Krömker, V. (2008,). Mastite nelle bovine da latte e analisi dei fattori di rischio, 1° Congresso Europeo Sivar 8-9 febbraio 2008. *Large Animal Review*, 14, 15-19.
- Libera, K. K.-S. (2021 Aug 7). The Association between Selected Dietary Minerals and Mastitis in Dairy Cows-A Review. *Animals (Basel)*., 11(8):2330. doi:10.3390/ani11082330.
- Mariani, G. N. (2004). Le buone pratiche gestionali che aiutano a controllare le mastiti. *L'informatore Agrario*, 60, 43-48.
- Moroni, P. (2007). Problemi sanitari, mastite e mungitura. In A. G. Cavalchini, *La mungitura* (p. 175, 1-243). Bologna : Edagricole.
- Olde Riekerink, R. B. (2007 Apr). The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 90(4):1704-15. doi:10.3168/jds.2006-567
- Rajala-Schultz, P., Torres, A., & DeGraves, F. (2011). Milk yield and somatic cell count during the following lactation after selective treatment of cows at dry-off. *Journal of Dairy Research*, 489-499. doi:10.1017/s0022029911000690

- Robert, A., Seegers, H., & Bareille, N. (2006). Incidence of intramammary infections during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows - a quantitative analysis of published data. *Vet. Res.*, 25-48. doi:10.1051/vetres:2005047
- Roberti, A. (2023, aprile 27). C'è connessione tra microbioma digestivo e mammella. *Allevatori top*, p. 1.
- Sarikaya, H. e. (2006). Leukocyte population and mRNA expression of inflammatory factors in quarter milk fractions at different somatic cells score levels in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2479-2486.
- Schreiner, D. R. (2003 Nov). Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *J Dairy Science*, 86(11):3460-5. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73950-2
- Soujola, L. K. (2013). Treatment for bovine Escherichia coli mastitis-an evidence-based approach . *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* , 521-531.
- Tiezzi, F. M. (2020 Dec 2,). Heritability of Teat Condition in Italian Holstein Friesian and Its Relationship with Milk Production and Somatic Cell Score. *Animals (Basel)*., 10(12):2271. doi:10.3390/ani10122271
- Zecconi, A. (2000). l'impiego dei farmaci antinfiammatori nel trattamento delle mastiti cliniche della bovina, in Farmaci antinfiammatori non steroidei in medicina veterinaria . *Shering-Plough AH*, 57-74.
- Zecconi, A. C. ((2023), aprile). L'asciutta selettiva dopo tre anni di applicazione in allevamento. *Summa animali da reddito* (3), 1-72.
- Zecconi, A. C. (2020). *La sanità della mammella nella bovina*. Milano-Italia: Point Vétérinaire Italie.
- Zecconi, A. F. (2018 Feb). effect of chronic mastitis and its treatment with ketoprofen on the milk ejection curve. *J. Dairy Res.*, 85(1):50-52. doi:10.1017/S0022029917000863
- Zecconi, A. Z. (2020 Jun 6). Factors Affecting the Patterns of Total Amount and Proportions of Leukocytes in Bovine Milk Animals. *Animals (Basel)*, 10, 6-992. doi:10.3390/ani10060992