



UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie
Corso di laurea magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

USO DELL'AMILOIDE A NEL LATTE VACCINO COME BIOMARKER PER LA SALUTE DELLE BOVINE

Use of milk amyloid A as a biomarker for the health of cows

Relatore:

Prof. Andrea Summer

Correlatore:

Prof. Claudio Cipolat Gotet

Laureando:

Francesco Noris

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Sommario

Riassunto	4
Abstract	6
1. Introduzione	7
1.1 La mastite nell'allevamento della bovina da latte	7
1.2 La ghiandola mammaria e la risposta immunitaria	12
1.3 Le proteine di fase acuta come biomarkers di infiammazione	15
1.4 La proteina amiloide A del latte (MAA)	17
2. Obiettivi	22
3. Materiali e metodi	23
3.1 Disegno sperimentale	23
3.2 Analisi di laboratorio	24
3.2.1 Composizione del latte e conta cellule somatiche	24
3.2.2 Proteina amiloide A del latte	24
3.3 Analisi statistica	26
4. Risultati e discussione	28
4.1 Statistiche descrittive	28
4.2 Effetto di stagione, ordine di parto, DIM e SCS sulla MAA	29
4.3 Relazioni tra MAA, produzione e composizione del latte	35
5. Conclusioni	37
6. Bibliografia	38

Riassunto

La sieroamiloide A (SAA) è considerata un'importante proteina di fase acuta, sintetizzata principalmente nel fegato, la cui concentrazione è correlata positivamente ai processi infiammatori che si innescano nell'organismo animale. Un'isoforma di questa proteina, nota come proteina amiloide A del latte (MAA), è prodotta dalle cellule epiteliali della ghiandola mammaria ed è presente nel latte e nel colostro della maggior parte dei mammiferi. La MAA svolge un'attività fondamentale nell'immunità innata contro gli agenti patogeni di mastite e, nel colostro, fornisce una funzione protettiva per il tratto gastrointestinale dei vitelli. Tuttavia, un aumento della sua concentrazione nel latte determina un peggioramento della qualità del latte stesso. In corso di infezioni intramammarie, si verifica un aumento significativo della concentrazione dell'amiloide A nel latte ancor prima che nel siero. Tale aumento precede anche l'incremento della conta delle cellule somatiche nel latte, evidenziando il potenziale ruolo della MAA come biomarcatore di salute delle bovine in relazione alla mastite. Le mastiti rappresentano le patologie che causano le maggiori perdite economiche e richiedono un uso rilevante di antimicrobici nell'allevamento delle bovine da latte. L'utilizzo di procedure diagnostiche e sistemi di tracciabilità efficienti può contribuire a ridurre questo fenomeno, consentendo inoltre di limitare il rischio di generare resistenza agli antimicrobici, una delle principali minacce per la salute umana e animale.

L'obiettivo di questa tesi di laurea sperimentale è stato quello di quantificare il contenuto di MAA nel latte vaccino a livello di singola bovina e valutare la sua variabilità in relazione a fattori animali e ambientali, nonché la sua correlazione con i caratteri di qualità del latte. In totale, 1080 campioni di latte individuale di vacche di razza Bruna sono stati prelevati in 54 allevamenti (20 animali/allevamento) del territorio delle regioni Emilia-Romagna, Lombardia e Toscana. Tutti i campioni sono stati analizzati per la composizione (grasso, proteina, caseina e lattosio), la conta di cellule somatiche (SCC) e il contenuto di amiloide A del latte. I risultati hanno dimostrato una notevole variabilità della concentrazione di MAA associata ai fattori animali, tra cui l'ordine di parto, lo stadio di lattazione e la conta totale delle cellule somatiche, mentre questa variabilità è stata meno pronunciata rispetto ai fattori ambientali come l'allevamento di provenienza e la stagione. Inoltre, è emersa una significativa correlazione con il contenuto di lattosio nel latte.

Questo studio ha evidenziato che la MAA può essere considerata un biomarcatore importante ed efficace per la salute della ghiandola mammaria delle bovine, con potenziali implicazioni rilevanti per la gestione della mandria e la produzione di latte nella filiera lattiero-casearia.

Abstract

Serum amyloid A (SAA) is an important acute-phase protein primarily synthesized in the liver. Its concentration is positively correlated with inflammatory processes in the animal organism. An isoform of this protein, known as milk amyloid A protein (MAA), is produced by the epithelial cells of the mammary gland and is present in the milk and colostrum of most mammals. This mammary isoform plays a key role in the innate immunity against mastitis pathogens and provides a protective function for the gastrointestinal tract of calves via colostrum. However, an increase in its concentration in milk can lead to a deterioration in milk quality. During intramammary infections, there is a significant increase in the concentration of amyloid A in milk before it occurs in serum. This increase also precedes an increase of the somatic cell count in milk, highlighting the potential role of MAA as a biomarker of cow health, particularly in relation to mastitis. Mastitis is considered the most common disease leading to economic loss in dairy herds and it requires significant use of antimicrobials in dairy cattle breeding. Efficient diagnostic procedures and traceability systems can help to reduce this phenomenon and limit the risk of generating antimicrobial resistance, a major threat to human and animal health.

The objective of this experimental thesis was to quantify the milk amyloid A content at individual cow level, assess its variability in relation to animal and environmental factors and determine its correlation with milk quality traits. A total of 1080 individual milk samples from Brown Swiss cows were collected from 54 farms (20 animals per herd) in the regions of Emilia-Romagna, Lombardy, and Tuscany. All samples were analyzed for composition (fat, protein, casein, and lactose), somatic cell count (SCC), and milk amyloid A content. The results showed considerable variability of MAA concentration associated with animal-related factors, including parity, stage of lactation and total somatic cell count. In contrast, this variability was less pronounced with respect to environmental factors such as individual herds and season. Additionally, a significant correlation was found with milk lactose content.

This study highlighted that MAA could be considered an important and effective biomarker for the health of the mammary gland in cows, with potential significant implications for herd management and milk production along the dairy chain.

1. Introduzione

1.1 La mastite nell'allevamento della bovina da latte

La mastite è una risposta infiammatoria conseguente all'infezione della ghiandola mammaria, caratterizzata da alterazioni fisiche, chimiche e batteriologiche del latte. Negli allevamenti delle bovine da latte è considerata la principale causa di perdite economiche (Deb et al., 2013). I danni economici derivanti dalla mastite sono correlati a perdite dirette, come i costi dei trattamenti e il latte scartato, e a perdite indirette, tra cui la riduzione della produzione e della qualità del latte (Gomes e Henriques, 2016).

La mastite è comunemente classificata come una patologia multieziologica complessa che presenta vari fattori predisponenti ambientali e microbici (Castañeda Vázquez et al., 2013). È causata principalmente da un'infezione batterica, sebbene possa essere provocata anche da altri microrganismi come funghi, virus e alghe (Libera et al., 2016). La maggior parte delle infezioni include come agenti eziologici una varietà di batteri gram-positivi e gram-negativi. Questi possono essere contagiosi, come *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, oppure ambientali, come *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis* (Cheng e Han, 2020). L'incidenza e la prevalenza sono molto variabili e dipendono da molteplici fattori, primi fra tutti l'igiene dell'allevamento e della fase di mungitura (Verbeke et al., 2014) e possono variare in base al tipo di stabulazione e di lettiera (Constable et al., 2016).

Sulla base dei segni clinici, la mastite può manifestarsi in forma clinica o subclinica. La mastite clinica è la forma facilmente riconoscibile di mastite, caratterizzata dalla presenza evidente dei segni di infiammazione e infezione della ghiandola mammaria. I sintomi includono gonfiore, arrossamento, calore, dolore al tatto e alterazioni del secreto come la comparsa di coaguli, fiocchi o pus. Inoltre, l'animale può mostrare segni sistemici come febbre, depressione e riduzione dell'appetito (Gruet et al., 2001).

Contrariamente alla mastite clinica, la mastite subclinica non presenta anomalie visibili nella mammella o nel latte, ma le performance produttive peggiorano con un aumento della conta delle cellule somatiche nel latte (Abebe et al., 2016). La forma subclinica è da 15 a 40 volte più diffusa della forma clinica e di solito è di lunga durata (Seegers et al., 2003). È importante sottolineare che gli animali colpiti in modo subclinico rimangono una fonte continua di agenti mastitogeni contagiosi che si diffondono all'interno della mandria (Islam et al., 2011). A causa

della mancanza di qualsiasi manifestazione evidente, la diagnosi di mastite subclinica è una sfida nella gestione delle bovine da latte e nella pratica veterinaria (FAO, 2014).

La diagnosi di mastite prevede una combinazione tra esame clinico e analisi di laboratorio dei campioni di latte. Il personale che gestisce la mandria ha un ruolo importante da svolgere nello screening iniziale e nell'osservazione visiva dei sintomi (Lam et al., 1993). La mastite clinica è ben identificabile durante le operazioni di routine in allevamento, mentre la mastite subclinica richiede indagini più approfondite. Seguendo i tradizionali metodi diagnostici, i campioni di latte vengono raccolti per la coltura batterica e la determinazione della conta delle cellule somatiche. L'esame batteriologico del latte rappresenta la tecnica analitica di elezione, essendo esso costituito da un insieme di tecniche di laboratorio volte ad isolare e identificare il microrganismo responsabile di un processo patologico a carico della mammella. Tuttavia, l'isolamento di un patogeno non è necessariamente associato all'infiammazione, poiché possono essere isolati microrganismi di contaminazione esterna, come a livello di cute del capezzolo, oppure di contaminazione interna che non determinano in senso stretto uno stato di infezione mammaria (possono essere indifferentemente agenti di mastite o semplici ospiti contaminanti). Inoltre, va considerato che il tempo a disposizione per l'intervento è spesso limitato in quanto la mastite richiede una cura tempestiva nelle prime fasi di insorgenza. Pertanto, si ritiene che lo scopo principale di queste analisi sia la profilassi delle future mastiti in allevamento, più che la terapia di quelle già in atto (Bolzoni et al., 2006).

La conta delle cellule somatiche (SCC) è utilizzata in tutto il mondo come carattere della salute della mammella e per monitorare indirettamente la qualità del latte (Alhussien e Dang, 2018). Le cellule somatiche sono l'insieme di leucociti che hanno raggiunto la mammella in risposta a lesioni o infezioni e cellule epiteliali di sfaldamento dell'epitelio mammario (Schultz, 1977). In condizioni fisiologiche, le cellule somatiche del latte di una bovina sana sono rappresentate da 65-85% macrofagi, 10-25% linfociti, 1-10% neutrofili e la restante parte da cellule epiteliali (Biggs, 2019). Attualmente nelle bovine da latte, la soglia di 200.000 cellule/mL viene utilizzata per indicare lo stato della malattia, se è presente o meno (Schukken et al., 2003). Di conseguenza, una SCC elevata è indicatore di mastite subclinica (Sharma et al., 2011) e di bassa qualità del latte (Li et al., 2014). Sebbene la SCC sia un tratto quantitativo valido per l'identificazione dello stato infiammatorio della ghiandola mammaria, non fornisce informazioni sulla distribuzione di ciascuna popolazione cellulare (Stocco et al., 2020). Numerosi fattori non correlati alla mastite possono influenzare i livelli di SCC nel latte,

riducendone la specificità, come lo stadio di lattazione, l'ordine di parto e la razza (Bytyqi et al., 2010). Recentemente, la diagnosi indiretta di mastite è stata migliorata grazie all'introduzione della conta differenziale delle cellule somatiche (DSCC), che rappresenta la proporzione percentuale di neutrofili polimorfonucleati (PMN) e linfociti rispetto al totale delle cellule somatiche (Damm et al., 2017). Tale approccio si è rilevato più sensibile, in quanto permette di identificare sia quegli animali che, pur non avendo ancora una SCC elevata, potrebbero essere in procinto di sviluppare un evento infiammatorio (in quanto la conta differenziale inizia ad alzarsi), sia le bovine in stato di cronicità, con SCC elevate e DSCC basse (Bobbo et al., 2020). La DSCC, combinata alla SCC, fornisce quindi una valutazione più accurata della salute di ogni animale, facilitando la scelta di una terapia mirata e prudente nell'uso degli antibiotici (Schwarz, 2018).

Quanto più precocemente viene identificata la malattia, tanto minori possono essere i danni all'animale e all'allevamento; per questo motivo si stanno compiendo numerosi sforzi per proporre nuovi strumenti diagnostici rapidi e affidabili da utilizzare in allevamento. I tradizionali metodi gold standard, ancora in uso, sono in parte sostituiti dalla reazione a catena della polimerasi e dal sequenziamento. Inoltre, stanno ricevendo molta attenzione anche le nanotecnologie e i test basati sulle proteine, alcuni dei quali sono candidati come i futuri test diagnostici per la rapida identificazione della mastite bovina (Ashraf e Imran, 2018).

Il trattamento della mastite prevede in genere l'uso di antibiotici mirati contro i batteri che causano l'infezione, insieme a terapie di supporto con farmaci antinfiammatori e antidolorifici. La mastite rappresenta la patologia che comporta il maggior impiego di antibiotici nell'allevamento bovino da latte. Tuttavia, l'emergere di resistenze e la non reattività dei bovini agli antibiotici è diventata una questione critica anche per la salute pubblica (Gomes e Henriques, 2016). Il metodo più razionale per controllare questo problema è la prevenzione, mentre la terapia può servire, in casi specifici, a coadiuvare la gestione del problema. Il ricorso alla diagnosi eziologica, associato alla conoscenza dei dati anamnestici di conta cellulare, prognostici delle probabilità di guarigione, è fondamentale per una scelta terapeutica consapevole. Se per alcune infezioni mammarie, infatti, la terapia antimicrobica risulta fortemente indicata, come nel caso degli streptococchi, nella maggior parte dei casi di mastite l'uso dell'antibiotico risulta inutile o ingiustificato (Figura 1).

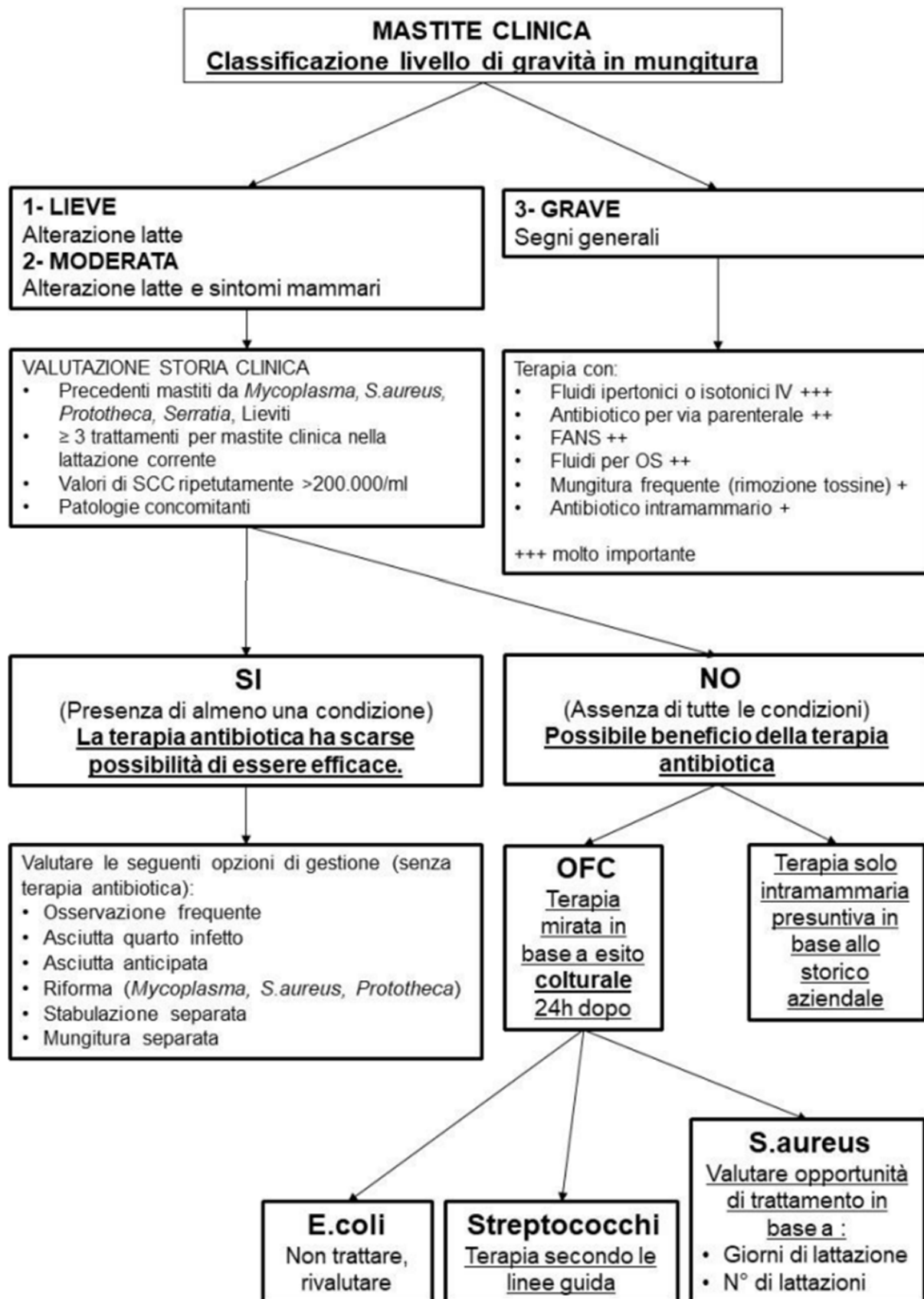


Figura 1. Schema di intervento per la terapia della mastite secondo i principi dell'uso responsabile dell'antibiotico (Arrigoni et al., 2022).

Le informazioni ottenute dall'esame colturale sono essenziali per poter adottare opportuni piani di intervento, modulati ad esempio in base all'epidemiologia degli agenti stessi, siano essi contagiosi o ambientali. Bisogna poi considerare che negli ultimi anni questa rigida distinzione è divenuta sempre più sfumata, in quanto alcuni agenti ambientali, come *Prototheca spp.*, *S. uberis* e *Klebsiella spp.*, hanno dimostrato la possibilità di divenire contagiosi, trasmettendosi da bovina a bovina durante le fasi di mungitura (Arrigoni et al., 2023).

Il trattamento antibiotico sistematico alla messa in asciutta è stato per decenni utilizzato come uno dei principali metodi per prevenire la mastite, specialmente indirizzato alla lotta contro le mastiti contagiose da *S. aureus* e *S. agalactiae*. Negli ultimi decenni, il progresso nel miglioramento delle condizioni sanitarie negli allevamenti e una maggiore consapevolezza riguardo all'uso responsabile degli antibiotici hanno portato l'Unione Europea a sviluppare delle linee guida sull'uso razionale degli antibiotici in campo veterinario. Il Regolamento (UE) 2019/6 stabilisce il divieto ufficiale dell'uso sistematico di antibiotici per scopi profilattici, rendendo obbligatoria l'adozione della terapia selettiva alla messa in asciutta. Pertanto, l'impiego di antibiotici al momento della messa in asciutta deve essere giustificato da una diagnosi di infezione sufficientemente affidabile. Nei casi di mastite lieve o moderata, l'inizio della terapia può essere ritardato di 18-24 ore senza rischi ulteriori per l'animale. Questo consente l'uso di tecniche rapide per diagnosticare direttamente la mastite in allevamento tramite il sistema On Farm Culture (OFC). Quando la terapia antimicrobica è necessaria, la scelta del principio attivo deve essere basata primariamente sull'efficacia terapeutica e sui criteri di uso prudente. È fondamentale effettuare una raccolta costante dei dati relativi agli agenti microbici circolanti in allevamento, valutando la loro sensibilità agli antibiotici tramite antibiogramma, al fine di stabilire protocolli terapeutici appropriati (Arrigoni et al., 2022).

La prevenzione della mastite è fondamentale per la salute delle bovine da latte e l'efficienza produttiva degli allevamenti e implica l'attuazione di pratiche gestionali adeguate. A titolo di esempio, sono necessarie misure stringenti di sicurezza ed un accurato controllo dei nuovi ingressi nella mandria per ridurre al minimo l'introduzione dei microrganismi contagiosi. Considerando che la trasmissione dei microrganismi patogeni avviene soprattutto durante la fase di mungitura, è molto importante seguire un protocollo che miri alla massima igiene durante questa procedura (Fox e Gay, 1993) ed effettuare una manutenzione periodica del gruppo di mungitura. La vaccinazione contro i comuni patogeni della mammella è ampiamente utilizzata per prevenire o ridurre la gravità della mastite clinica. Nonostante i buoni risultati

però il vaccino non è sufficientemente efficace o conveniente da essere utilizzato da solo (Ismail, 2017). La gestione dell'alimentazione, il mantenimento di condizioni di stabulazione pulite e confortevoli, l'applicazione di protocolli specifici per la messa in asciutta, il trattamento dei casi clinici, la segregazione delle bovine infette e l'abbattimento di quelle affette da forme croniche sono altre strategie per il controllo della mastite (El-Sayed e Kamel, 2021).

1.2 La ghiandola mammaria e la risposta immunitaria

Nelle bovine sane, la ghiandola mammaria è caratterizzata da molteplici meccanismi di protezione contro l'ingresso dei patogeni. Il sistema immunitario presenta due principali linee di difesa: l'immunità innata o aspecifica e l'immunità adattativa o specifica (Marshall et al., 2018), che interagiscono strettamente nel tentativo di fornire protezione contro i patogeni responsabili di mastite (Sordillo et al., 1997). Durante la risposta infiammatoria, il sistema immunitario viene attivato per contrastare l'agente patogeno. Questo meccanismo di difesa coinvolge fattori anatomici, cellulari e biochimici che agiscono in sinergia e svolgono un ruolo cruciale nella regolazione della resistenza e della suscettibilità della ghiandola mammaria alle infezioni (Oviedo-Boyso et al., 2007).

Escludendo alcuni rari casi, tutte le infezioni della ghiandola mammaria sono causate da patogeni ascendenti che penetrano attraverso il canale del capezzolo (Blowey e Edmondson, 2010). La risposta immunitaria dell'ospite e il livello di gravità della reazione infiammatoria variano notevolmente in base alle diverse specie batteriche invasive presenti. La principale differenza riguarda *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*: una grande percentuale di infezioni da *E. coli* provoca gravi segni clinici, mentre la maggior parte delle infezioni da *S. aureus* di solito non viene notata e si manifesta soltanto con segni di fluttuazioni persistenti della SCC e diffusione intermittente di batteri. Altri fattori che influenzano la risposta immunitaria dell'ospite sono il numero di batteri a cui la bovina è esposta (pressione infettiva) e la tendenza o predisposizione delle bovine a sviluppare una mastite (Chase et al., 2022). Infatti, la suscettibilità alla mastite può variare tra le bovine a causa di diversi elementi, tra cui lo stato di salute generale, le condizioni di allevamento, la genetica o altri fattori ambientali. Il meccanismo di difesa primario della ghiandola mammaria è rappresentato da componenti anatomiche del capezzolo (Figura 2). Il lume del capezzolo è rivestito internamente da una mucosa pluristratificata cheratinizzata (Liebich, 2010). La cheratina sigilla il canale del

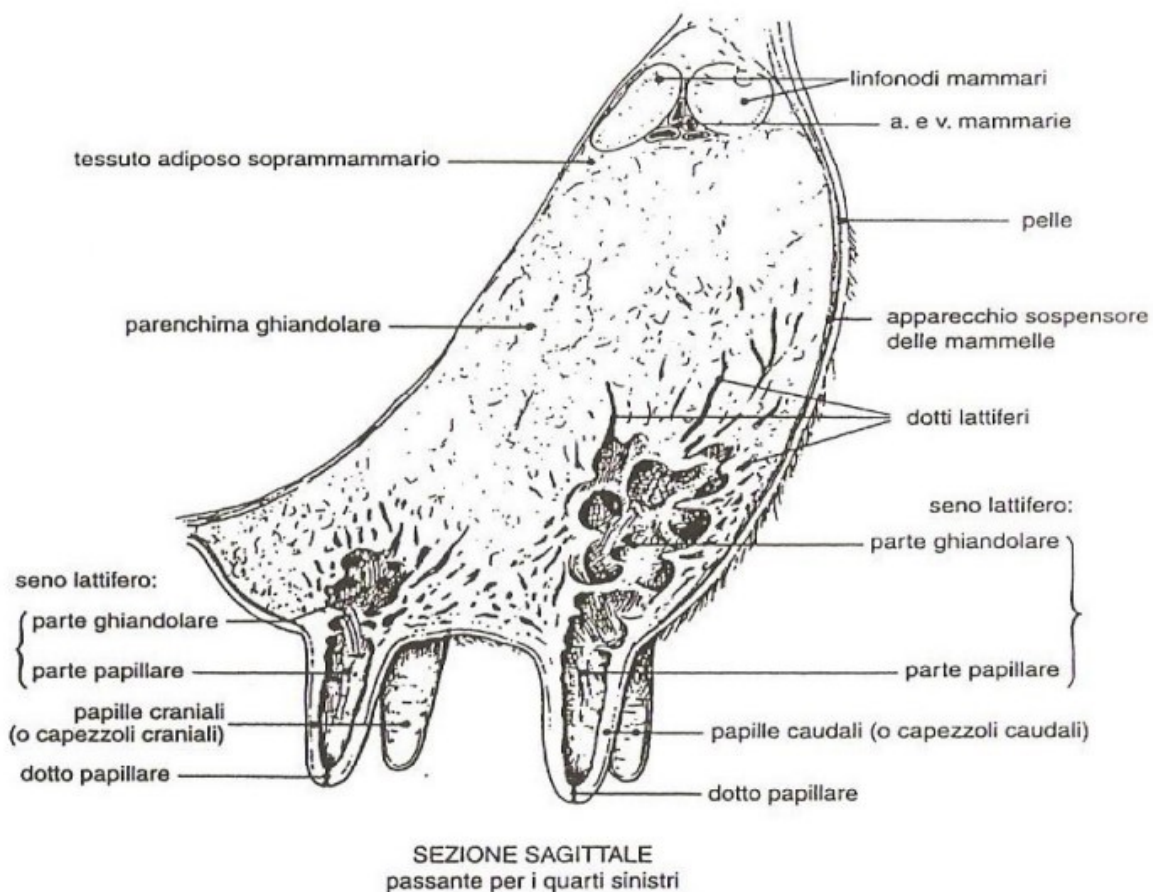


Figura 2. Rappresentazione della ghiandola mammaria di una bovina (Barone et al., 2003).

capezzolo e adsorbe i batteri invasori in una rete simile a una maglia, ostacolando la loro migrazione nella cisterna della ghiandola. La cheratina ha anche un'attività antibatterica (Paulrud, 2005). Il danneggiamento della cheratina, a causa di un'errata infusione di terapia intramammaria (Nickerson, 1987) o di una mungitura difettosa (Capuco et al., 1994), aumenta la suscettibilità del canale del capezzolo all'invasione e alla colonizzazione batterica (Bramley e Dodd, 1984). All'apice del capezzolo si trova lo sfintere, composto da fasci di fibre muscolari lisce, che grazie alla loro capacità contrattile mantengono chiuso il canale del capezzolo, riducendo così il rischio di invasione da parte di agenti patogeni (Zecconi et al., 2002).

Nel latte stesso è stata identificata un'ampia varietà di elementi legati alla risposta immunitaria innata, tra cui il sistema del complemento, la lattoferrina, la lattoperossidasi, alcune specie reattive dell'ossigeno (ROS), proteine di fase acuta (APP) come la proteina amiloide A e l'aptoglobina, e un'ampia gamma di peptidi e proteine antimicrobiche (Ezzat Alnakip et al., 2014). Molti di questi componenti provengono da cellule specializzate che transitano verso la ghiandola mammaria (Stelwagen et al., 2009).

Il sistema del complemento svolge un ruolo fondamentale nell'immunità innata; esso è composto da proteine sieriche che agiscono in un sistema a cascata promuovendo l'opsonizzazione e stimolando il processo di fagocitosi (Rainard, 2003). La lattoferrina è una glicoproteina prodotta dalle cellule dell'epitelio mammario e dai neutrofilo in grado di catturare il ferro presente nel latte rendendolo indisponibile per la crescita di batteri aerobi come i coliformi e gli stafilococchi (Fantini, 2008). La lattoperossidasi è un enzima contenuto nel latte che in presenza di perossido di idrogeno e di tiocianato può inibire la crescita dei batteri gram-positivi ed eliminare quelli gram-negativi (Almehdar et al., 2015).

Quando i batteri invadono la ghiandola mammaria e provocano un'infezione intramammaria, grandi quantità di leucociti migrano nell'area, avviando la risposta infiammatoria. Tutti i patogeni hanno pattern molecolari specifici (PAMP) che sono riconosciuti dai recettori per il riconoscimento del patogeno (PRR) presenti sulle cellule ospiti, di cui i recettori toll-like (TLR) sono la famiglia più nota e più comune. L'interazione dei PAMP e dei TLR determina l'attivazione del complesso di trascrizione NF- κ B, che a sua volta stimola l'espressione di geni che codificano per il rilascio di citochine infiammatorie e derivati dell'acido arachidonico, i quali sono spesso responsabili degli effetti macroscopici locali e sistemici della mastite. Inoltre, questi mediatori inducono un significativo afflusso di neutrofilo (Ezzat Alnakip et al., 2014).

Nella ghiandola mammaria sana, i macrofagi rappresentano il tipo cellulare predominante, svolgendo un ruolo di sentinella. In caso di infezione batterica, i macrofagi individuano la presenza dei batteri e, insieme ai linfociti, richiamano un numero elevato di neutrofilo nel sito di infezione (Blowey e Edmondson, 2010). I neutrofilo migrano dal sangue tramite diapedesi e vengono attivati da citochine pro-infiammatorie, come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) e l'interleuchina 1 beta (IL-1 β). La principale funzione dei neutrofilo consiste nell'eliminare i microrganismi attraverso la fagocitosi.

Per massimizzare l'immunità innata di una bovina da latte è importante adottare misure preventive per minimizzare l'incidenza di malattie virali, carenze nutrizionali, stress e disturbi metabolici. Le bovine anziane sono a maggior rischio di mastite clinica rispetto agli animali più giovani. Inoltre, bisogna considerare che la maggior parte delle infezioni intramammarie viene contratta negli ultimi mesi di gravidanza, durante il periodo di asciutta (Chase et al., 2022).

Nel caso un microrganismo riesca a penetrare nella ghiandola mammaria e superare i meccanismi di difesa dell'immunità aspecifica, viene attivato il sistema dell'immunità specifica. I macrofagi, oltre all'azione fagocitica (Kehrli e Harp, 2001), lavorano insieme alle cellule

dendritiche per processare e presentare l'antigene, mezzo essenziale per avviare la risposta citochinica e attivare sia i linfociti B, che producono gli anticorpi, che i linfociti T citotossici. Questi ultimi rilasciano sostanze come perforine e granzimi, che causano la morte delle cellule bersaglio attraverso l'induzione dell'apoptosi o la necrosi (Poli, 2017).

L'immunità umorale è mediata dagli anticorpi, anche definiti immunoglobuline. In risposta ad un'infezione intramammaria si innesca un rapido aumento di anticorpi dovuto alla produzione locale e soprattutto all'aumento della permeabilità endoteliale che consente l'afflusso di immunoglobuline plasmatiche. Gli anticorpi intervengono nell'opsonizzazione batterica utile ad agevolare l'attività battericida dei fagociti, neutralizzano le tossine batteriche, causano l'agglutinazione dei batteri e prevengono l'adesione dei microrganismi alle cellule endoteliali (Smith, 2015).

1.3 Le proteine di fase acuta come biomarkers di infiammazione

Nei mammiferi, ogni qual volta l'organismo venga sottoposto ad un insulto di origine infiammatoria, traumatica, neoplastica o immunomediata si scatena una reazione, definita risposta di fase acuta (APR), volta a ristabilire l'omeostasi e a rimuovere la causa del disturbo. Si tratta di un complesso sistema di difesa precoce, appartenente al sistema immunitario innato, che prevede una serie di cambiamenti fisiopatologici sia locali che sistemici. La risposta coinvolge barriere fisiche e molecolari e attiva meccanismi per prevenire le infezioni, eliminare potenziali agenti patogeni, avviare processi infiammatori e contribuire alla risoluzione e al processo di guarigione. Le proteine di fase acuta sono parte integrante della risposta di fase acuta (Cray et al., 2009).

Le proteine della fase acuta (APP) sono un gruppo di proteine plasmatiche considerate componenti del sistema immunitario innato non specifico, la cui concentrazione è influenzata da infezioni, infiammazioni, traumi e stress (Murata et al., 2004). Sono generalmente coinvolte nel ripristino dell'omeostasi prima che l'animale sviluppi una risposta immunitaria acquisita o ritrovi il suo equilibrio fisiologico. Quantificarne la concentrazione per il tipo specifico può essere di grande aiuto nella pratica veterinaria per la diagnosi, la prognosi e il monitoraggio dell'efficacia della terapia. Pertanto, queste proteine vengono considerate dei biomarkers utili per effettuare screening nelle popolazioni di animali. Tuttavia, bisogna tenere presente che le APP sono scarsamente specifiche per determinate patologie (Fantini, 2009).

Le proteine di fase acuta si suddividono in due gruppi, positive e negative, a seconda che l'insulto ne aumenti o ne riduca la concentrazione plasmatica. Le APP positive sono ulteriormente classificate in base all'entità dell'aumento dei livelli ematici, distinguendole in APP di tipo I, II e III con aumenti rispettivi del 50%, da due a cinque volte e oltre cinque volte della concentrazione plasmatica. Il gruppo delle APP positive comprende l'aptoglobina, la proteina C-reattiva, la sieroamiloide A, la ceruloplasmina, il fibrinogeno e altre di minore importanza. Le APP negative includono l'albumina e la transferrina (Schrödl et al., 2016).

Nel bovino, le principali proteine di fase acuta includono l'amiloide A sierica (SAA), l'aptoglobina (Hp) e il fibrinogeno. Sono stati effettuati numerosi studi sulla concentrazione sierica delle APP nei bovini e sul loro significato in diverse fasi di età, durante il parto, il periodo di lattazione, le infezioni acute e croniche, e le malattie non infettive e metaboliche. I vitelli mostrano una concentrazione maggiore di APP rispetto ai bovini adulti, poiché devono affrontare diverse esigenze fisiologiche durante la fase di crescita. La concentrazione media di Hp e SAA in un vitello sano di un mese di vita è rispettivamente di 6,8 mg/dL e 5,9 mg/dL, che scendono a circa 2,1 mg/dL e 1,9 mg/dL all'età di sei mesi (Tothova et al., 2011). Tuttavia, a differenza dei canini, l'applicazione clinica delle APP nei grandi animali non è ancora stata sufficientemente standardizzata nella pratica di routine.

Le proteine di fase acuta sono glicoproteine sintetizzate principalmente dal fegato. Esiste anche una possibile produzione extraepatica di APP. La produzione delle APP è stimolata dalle citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina 6 (IL-6), l'interleuchina 1 (IL-1) e il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), che giocano un ruolo fondamentale nella reazione di fase acuta. Queste citochine vengono rilasciate da diversi tipi cellulari, principalmente macrofagi, in risposta a stimoli esterni o interni, come tossine batteriche o alterazioni locali. Nel fegato, le cellule di Kupffer sono i macrofagi responsabili del rilascio di citochine pro-infiammatorie, le quali possono poi diffondersi nel sangue e inviare segnali anche a livello del sistema nervoso centrale. Dopo la loro sintesi, le citochine possono avviare un processo a cascata, stimolando la produzione di una successiva ondata delle stesse molecole o di citochine differenti. A seguito di queste interazioni, gli epatociti iniziano a sintetizzare le proteine di fase acuta con ruoli difensivi, di controllo e di marcatori del processo infiammatorio. In particolare, le APP hanno una rilevante importanza nell'ottimizzazione e nell'intrappolamento dei microrganismi e dei loro prodotti, nell'attivazione del sistema del complemento, nel legame con i resti cellulari

come le frazioni nucleari, nella neutralizzazione degli enzimi, nella cattura dell'emoglobina libera e dei radicali, e nel modulare la risposta immunitaria dell'ospite (Pradeep, 2013).

Le proteine di fase acuta sono state utilizzate per decenni nella medicina umana, mentre nel contesto della medicina veterinaria il loro utilizzo è stato limitato. Solo recentemente sono stati compiuti progressi significativi nel rilevamento, nella misurazione e nell'applicazione delle APP sia negli animali da compagnia che negli animali da reddito. Grazie agli sviluppi attuali della ricerca, è probabile che queste biomolecole saranno sempre più impiegate nel futuro per la diagnosi e la prognosi delle malattie negli animali domestici (Eckersall e Bell, 2010).

Nel cane, la proteina C-reattiva, l'aptoglobina e l'amiloide A sierica sono state identificate come marcatori diagnostici significativi di meningite-arterite steroidea. Nelle bovine da latte, l'aptoglobina e l'isoforma A3 dell'amiloide sierica prodotta dalla ghiandola mammaria (MAA) rappresentano promettenti biomarcatori durante gli episodi di mastite (Eckersall e Bell, 2010). Ulteriori applicazioni delle APP possono essere estese a processi non infettivi come la gravidanza, il parto, le malattie metaboliche, lo stress e la qualità del latte. Con l'avanzare delle conoscenze sulle APP e l'adeguata standardizzazione delle metodiche diagnostiche, potrebbe essere possibile monitorare lo stato di salute e il comfort degli animali da allevamento, contribuendo così al miglioramento del benessere animale e, di conseguenza, garantendo una maggiore sicurezza per il consumatore (Fantini, 2009).

1.4 La proteina amiloide A del latte (MAA)

La sieroamiloide A (SAA) comprende una famiglia eterogenea di apolipoproteine prodotte principalmente a livello epatico in risposta al rilascio di citochine da parte dei monociti attivati (Patel et al., 1998). La SAA è considerata un'importante proteina di fase acuta appartenente al gruppo delle APP positive, ossia correlate positivamente con un processo patologico. Nell'arco delle prime 24-36 ore, i suoi livelli ematici possono aumentare anche di mille volte rispetto ai valori fisiologici in risposta a stimoli lesivi come traumi, infiammazioni, infezioni o neoplasie (Urieli-Shoval et al., 2000). Inoltre, funge da precursore dell'amiloide A, che costituisce la principale componente fibrillare dei depositi di amiloide nei pazienti affetti da amiloidosi (Husby e Natvig, 1974).

Nel corso dell'evoluzione, questa famiglia di proteine ha mantenuto un alto grado di conservazione tra i mammiferi, rispecchiando l'omologia presente tra i geni codificanti tali

molecole nelle diverse specie (Ullrich et al., 1994). Nel genoma umano sono stati identificati quattro geni posizionati sul cromosoma 11 che sono responsabili della produzione della proteina sieroamiloide A (Steel e Whitehead, 1994). I due geni omologhi SAA1 e SAA2 codificano per le proteine SAA1 e SAA2, entrambe di fase acuta (A-SAA) (Jensen e Whitehead, 1998). Il gene SAA3 è uno pseudogene poiché codifica per la produzione di una proteina tronca, la SAA3, che rappresenta l'isoforma predominante espressa a livello extraepatico in molte specie animali (McDonald et al., 2001). Il gene SAA4, invece, codifica per la SAA4 che è un'apolipoproteina costitutiva delle lipoproteine ad alta densità (HDL) (De Beer et al., 1995).

Durante la reazione infiammatoria, la sintesi della A-SAA è attivata dalla liberazione di citochine come l'IL-1 e il TNF- α , mentre l'IL-6 ha un effetto indiretto quando agisce in sinergia con altre citochine. La maggior parte della A-SAA plasmatica è prodotta a livello epatico, ma vi sono anche diversi siti di sintesi extraepatici, tra cui le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce, gli adipociti, i siti di lesione aterosclerotica e le cellule tumorali (Jensen e Whitehead, 1998). Le citochine, inoltre, stimolano la produzione di glucocorticoidi dalla corteccia surrenale, i quali a loro volta promuovono la sintesi della A-SAA e inibiscono la risposta sistemica di fase acuta (Ullrich e Whitehead, 1999).

Sebbene il ruolo fisiologico principale della proteina A-SAA rimanga poco chiaro, sono stati riportati diversi effetti e funzioni. Essa agisce come una proteina multifunzionale coinvolta sia nella modulazione della risposta infiammatoria, con funzioni stimolanti e inibenti, sia nel metabolismo e nel trasporto del colesterolo (Urieli-Shoval et al., 2000). La A-SAA è coinvolta nella soppressione della risposta immunitaria, influenzando l'interazione tra macrofagi e linfociti T (Aldo-Benson e Benson, 1982). Inoltre, inibisce l'azione delle citochine IL-1 e TNF- α che sono responsabili, attraverso l'attivazione della sintesi della prostaglandina E2 a livello ipotalamico, dell'insorgenza della febbre (Dimarello et al., 1998). La A-SAA ha anche un ruolo nell'inibire l'aggregazione piastrinica (Syversen et al., 1994) e induce la sintesi della prostaglandina I2, con funzione antiaggregante (Shainkin-Kestenbaum et al., 1997). Ancora, la A-SAA legandosi ai neutrofili e inibendo la risposta ossidativa durante l'infiammazione, può prevenire il danno derivante da questa condizione (Gatt et al., 1998).

A differenza di SAA1 e SAA2, che sono prodotte principalmente nel fegato e rilasciate nella circolazione sistemica, la SAA3 si trova solo in quantità minime nella frazione di lipoproteine ad alta densità del siero, suggerendo che questa variante abbia principalmente una funzione a livello locale (Husby et al., 1994). Nella maggior parte dei mammiferi la SAA3 sembra essere

l'isoforma predominante espressa a livello extraepatico. Sono stati riscontrati elevati livelli di SAA3 nel colostro e bassi livelli nel latte di molti mammiferi (McDonald et al., 2001), e ciò ha portato all'identificazione di questa proteina come SAA mammaria o MAA. Il sito di trascrizione del gene dell'isoforma MAA contenuta nel latte è rappresentato dalle cellule epiteliali mammarie (Bochniarz et al., 2020). Le cellule epiteliali sintetizzano la MAA in risposta a segnali di infiammazione che possono essere mediati sia dalle interleuchine (Brenaut et al., 2014), sia da componenti batterici, come l'acido lipoteicoico, che costituisce parte della struttura della parete cellulare dei batteri gram-positivi (Weber et al., 2006), o il lipopolisaccaride (LPS), che si trova nella membrana esterna dei batteri gram-negativi (Yu et al., 2017).

L'aumento della concentrazione di MAA nel latte di bovine affette da mastite è il risultato della combinazione tra la sua produzione locale e quella di derivazione epatica, che ottiene l'accesso al latte a causa dell'aumentata permeabilità della barriera emato-mammaria in corso di infiammazione (Eckersall e Bell, 2010). Nonostante ciò, la concentrazione di MAA nel latte non subisce incrementi in caso di processi infiammatori che si verificano al di fuori della ghiandola mammaria (Nielsen et al., 2004).

La produzione locale della MAA nella ghiandola mammaria svolge un ruolo fondamentale nella protezione innata contro gli agenti patogeni di mastite (Jacobsen et al., 2005). Ricerche condotte su modelli sperimentali di mastite nelle bovine da latte hanno evidenziato la produzione di MAA nella ghiandola mammaria infetta, sottolineando il suo potenziale ruolo come biomarcatore di questa condizione (Eckersall et al., 2006). In uno studio basato su infezioni sperimentali della mammella con *Streptococcus uberis*, si è osservato che i livelli di amiloide A aumentano in modo significativo nel latte prima che nel siero e precedono l'incremento della conta delle cellule somatiche nel latte (Pedersen et al., 2003).

La MAA è presente in alte concentrazioni nel colostro di diversi mammiferi, apparentemente come parte di un naturale processo fisiologico che non è legato esclusivamente a risposte patologiche (McDonald et al., 2001). Il colostro, il primo secreto della ghiandola mammaria dopo il parto, costituisce un'importante fonte di nutrienti, fattori immunitari e sostanze bioattive che permettono la transizione del neonato dalla vita fetale a quella extrauterina (Grosvenor et al., 1993). Oltre al suo valore nutritivo, il colostro fornisce al neonato una protezione contro gli agenti infettivi, tramite il trasferimento passivo di immunoglobuline (Aldridge et al., 1998) e la produzione di mucina che previene l'adesione dei patogeni alle mucose (Montagne et al., 2000).

La MAA presente nel colostro svolge una funzione protettiva per il tratto gastrointestinale del vitello attraverso la stimolazione della produzione di mucina e la riduzione dell'adesione di agenti patogeni (Pedersen et al., 2003). Allo stesso modo, MAA può partecipare alla modulazione di diverse risposte immunitarie fondamentali per la protezione dell'ospite e il ripristino dell'equilibrio (De Villiers et al., 2000). È stato dimostrato che la prolattina può stimolare la sintesi della MAA (Larson et al., 2003). In definitiva, la MAA sembra fornire un contributo significativo al benessere e alla sopravvivenza dei nuovi nati, giocando un ruolo multifunzionale nel contesto delle prime fasi della vita dei mammiferi.

Mentre numerosi sforzi sono stati dedicati alla ricerca di biomarcatori alternativi per la mastite subclinica (Pyörälä, 2003), le relazioni tra la presenza di questi biomarcatori nel latte ed eventuali alterazioni negative nella qualità del latte hanno ricevuto meno attenzione. In uno studio condotto da un gruppo di ricercatori svedesi, è stato osservato che diversi livelli di MAA e Hp nel latte sono correlati a vari aspetti qualitativi dello stesso. Specificatamente, un aumento nella concentrazione di queste APP è associato a una riduzione delle proteine del latte e del lattosio, suggerendo che MAA e Hp potrebbero essere utilizzate come indicatori della qualità del latte (Akerstedt et al., 2008).

Esistono diversi metodi per valutare specifiche APP. Una semplice elettroforesi delle proteine sieriche può fornire informazioni generiche sulla presenza di condizioni infiammatorie, che di solito si traducono in un aumento delle α - e β -globuline (Thomas, 2000). Attualmente, l'analisi delle proteine totali viene solitamente condotta tramite l'analizzatore chimico automatizzato del siero (Pradeep, 2013). Sono disponibili metodi immunologici come il radioimmunoassay (RIA), l'ELISA, i test di immunodiffusione radiale e la nefelometria (Gruys et al., 2005). Tuttavia, la maggior parte di questi metodi richiede un considerevole intervallo di tempo e presenta un certo costo, limitando quindi l'impiego su larga scala delle APP nella pratica di routine. Il metodo ELISA è ampiamente utilizzato per il dosaggio delle singole APP. Questo metodo è più adatto per l'analisi di una numerosità elevata di campioni. Per ottenere risultati affidabili è necessario utilizzare kit ELISA specifici per ogni specie (Pradeep, 2013). Inoltre, sono disponibili tecniche in grado di rilevare cambiamenti qualitativi o strutturali delle APP, come l'elettroforesi su gel bidimensionale, la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e il Western blotting. Queste tecniche, però, sono utilizzate solo a scopo di ricerca, a causa dei costi e della necessità di attrezzature e personale specializzati (Paltrinieri, 2008). La concentrazione di MAA nel latte può essere determinata tramite l'utilizzo di un kit ELISA commerciale (Tridelta Development

Ltd., Greystones, Wicklow, Ireland). Nonostante non sia stato stabilito un intervallo di riferimento ufficiale per la concentrazione di MAA, nel latte vaccino sano si è osservata una variazione che va da 0,1 a 1,4 µg/mL (Gerardi et al. 2009), inferiore rispetto a quella rilevata nel latte ovino in condizioni di salute (intervallo 23,75 - 35,61 µg/mL) (Miglio et al. 2013). Nelle capre, la MAA non si è dimostrata efficace come indicatore di mastite, poiché i suoi livelli aumentano fisiologicamente con l'avanzare del periodo di lattazione, in parallelo all'aumento della SCC, anche in assenza di infezioni (Pisanu et al. 2020). È importante sottolineare che le concentrazioni di MAA mostrano delle differenze tra le bovine affette da mastite subclinica e quelle affette da mastite clinica, situandosi in un intervallo compreso tra 5,5 e 6,9 µg/mL, rispettivamente (Gerardi et al., 2009). Recentemente è stato sviluppato un sensore elettrochimico a impronta molecolare per il rilevamento della MAA in modo più rapido, sensibile ed economico rispetto all'ELISA (Zhang et al., 2020). Tuttavia, l'assenza di un metodo di riferimento "gold standard" rappresenta un punto critico nell'uso generalizzato della MAA come indicatore di salute nelle bovine da latte.

2. Obiettivi

La salute delle bovine da latte è una componente fondamentale per garantire la produttività e la qualità del latte. In particolare, la mastite rappresenta una delle principali sfide connesse alla salute di questi animali, oltre ad essere la patologia che comporta il maggior impiego di antibiotici nell'allevamento bovino da latte. La variazione dei caratteri produttivi e qualitativi del latte durante un episodio di mastite riveste un interesse significativo e il suo monitoraggio diventa strategico per il miglioramento dell'efficienza produttiva nel settore lattiero-caseario. L'obiettivo di questo studio è stato quindi quello di quantificare il contenuto di MAA nel latte di bovine di razza Bruna e valutare la sua variabilità in relazione a fattori animali (stadio di lattazione, ordine di parto e salute tramite l'uso delle cellule somatiche totali) e ambientali (allevamento di provenienza e stagione), nonché la sua correlazione con i caratteri di qualità del latte.

3. Materiali e metodi

3.1 Disegno sperimentale

Per la realizzazione di questa tesi sono stati utilizzati dati ottenuti tramite il progetto GenetoCheese, finanziato dal MIPAAFT DM 16830 del 11/04/2019. Grazie al supporto dell'Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna Italiana (ANARB), sono stati selezionati 1080 soggetti di razza Bruna italiana distribuiti in 54 allevamenti nel territorio delle regioni Emilia-Romagna, Lombardia e Toscana. Questo approccio è stato adottato al fine di valutare eventuali differenze di allevamento e/o ambientali. I campionamenti sono stati eseguiti per un periodo di 24 mesi consecutivi. Per ogni allevamento sono stati scelti 20 soggetti e da ogni bovina sono stati prelevati 2 litri di latte durante la mungitura della sera. La scelta degli animali da campionare per ciascun allevamento è stata effettuata tramite l'utilizzo dell'ultimo controllo funzionale disponibile per l'azienda stessa in termini di stadio di lattazione, ordine di parto e livello produttivo (kg latte/d). Quest'ultimo passaggio è stato di fondamentale importanza per garantire un numero bilanciato di soggetti rispetto ai fattori relativi allo stadio di lattazione e all'ordine di parto.

Per ogni allevamento sono state rilevate numerose informazioni relative alla gestione e alla struttura aziendale, come ad esempio la dimensione aziendale e il tipo di alimentazione fornita agli animali. Inoltre, gli allevamenti selezionati dovevano rispecchiare lo scenario della zootecnia da latte bovina italiana in termini di dimensioni, localizzazione e gestione. Più del 50% degli allevamenti selezionati ha una quantità superiore a 100 capi in lattazione e il 70,4% si localizza ad altitudini inferiori a 300 metri sul livello del mare. La maggior parte delle aziende campionate adotta la tecnica UNIFEED per l'alimentazione delle bovine in lattazione (68,5%) mentre solamente il 31,5% opta per un'alimentazione tradizionale. Soltanto nel 33,3% dei casi gli animali non hanno accesso ad aree esterne, e la stabulazione più frequente è quella tradizionale a cuccette (64,8%).

3.2 Analisi di laboratorio

3.2.1 Composizione del latte e conta cellule somatiche

Tutti i campioni di latte sono stati sottoposti ad analisi entro un periodo di 24 ore dal prelievo. Nello specifico, sono state misurate le concentrazioni di grasso, proteina, caseina e lattosio utilizzando uno spettrofotometro ad infrarossi, MilkoScan FT3 (Foss Electric A/S, Hillerød, Danimarca). Per quanto riguarda l'analisi delle cellule somatiche, è stata adottata la tecnica della citometria a flusso utilizzando lo strumento Fossomatic 7DC (Foss Electric A/S, Hillerød, Danimarca). I valori di SCC sono stati convertiti in Somatic Cell Score (SCS) utilizzando la seguente formula (Ali e Shook, 1980):

$$SCS = \log_2 (SCC / 100,000) + 3$$

Il Somatic Cell Score (SCS) è un indice utilizzato per normalizzare la distribuzione della conta totale delle cellule somatiche (SCC).

3.2.2 Proteina amiloide A del latte

Per questo studio, la quantificazione della proteina amiloide A del latte (MAA) è stata effettuata utilizzando un kit immunoenzimatico commerciale (Tridelta Mast ID ELISA assay, Tridelta Development Ltd., Kildare, Ireland, Cat. No.: TM-900). Il kit MAA facente parte della linea Mast ID di Tridelta è un test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) sandwich in fase solida (Figura 3a). La tecnica ELISA sandwich prevede che la molecola di interesse venga intrappolata fra due anticorpi monoclonali specifici; il primo, chiamato anticorpo di cattura, è posizionato sul fondo dei pozzetti della micropiastra, mentre il secondo, chiamato anticorpo di rilevamento, viene aggiunto successivamente ed è legato ad un enzima target.

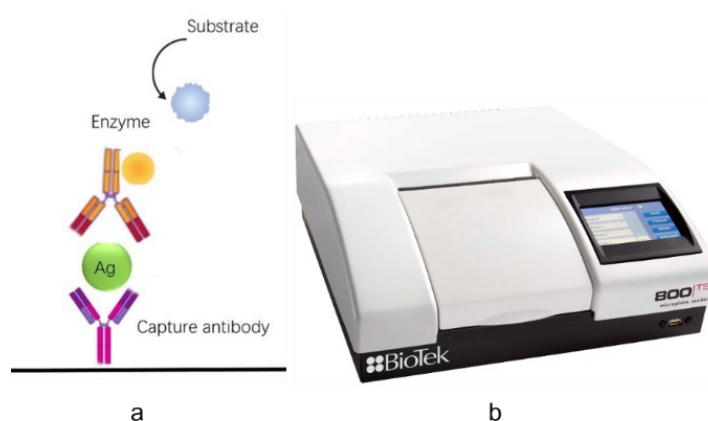


Figura 3. Modello di ELISA sandwich (a) (download da Creative Biolabs - Antibody) e spettrofotometro Biotek 800TS utilizzato per l'analisi (b) (download da Agilent).

L'aggiunta di un substrato crea una reazione colorimetrica direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita di interesse. La rilevazione dell'assorbanza viene effettuata tramite spettrofotometria (Figura 3b).

Dopo aver preparato tutti i reagenti, l'analisi è stata effettuata secondo il protocollo di analisi fornito dal kit e riportato di seguito nel dettaglio:

- Preparazione della curva di calibrazione a 6 punti tramite diluizione seriale 1:1 dello standard di partenza (150 ng/mL, 75 ng/mL, 37,5 ng/mL, 18,75ng/mL, 9,375 ng/mL, 0 ng/mL).
- Preparazione dei campioni di latte con diluizione 1:50 nell'apposito buffer di diluizione.
- Aggiunta di 50 µL di anticorpo Anti-MAA coniugato a HRP in ogni pozzetto della piastra.
- Aggiunta di 50 µL di standard (in doppio), campione o controllo in ciascun pozzetto.
- Mescolare gentilmente la piastra battendo le dita sui bordi, coprire con una pellicola e lasciare in incubazione 15 minuti a temperatura ambiente su un vortex mixer per micropiastre.
- Aspirazione del contenuto della piastra e lavaggio con la soluzione fornita dal kit, precedentemente diluita. Per ogni lavaggio vengono aggiunti 400 µL di soluzione di lavaggio 1X in ciascun pozzetto. Alla fine del quarto lavaggio, la piastra viene delicatamente tamponata su carta assorbente per favorirne l'asciugatura.
- Aggiunta di 100 µL di substrato tetrametilbenzidina (TMB) in ogni pozzetto.
- Coprire la piastra con una pellicola e lasciare in incubazione 15 minuti a temperatura ambiente su un vortex mixer per micropiastre.
- Aggiunta di 100 µL di soluzione di stop fornita dal kit.
- Lettura dell'assorbanza con spettrofotometro a una lunghezza d'onda di 450 nm (BioTek 800 TS).

Per analizzare i risultati del test, è necessario calcolare l'assorbanza media di ciascun campione, controllo o standard. Successivamente, si sottrae a ciascun pozzetto l'assorbanza media dello standard a concentrazione 0 ng/mL per eliminare il rumore di fondo (background)

e si procede alla definizione della curva di calibrazione. Una volta ottenuta la curva standard di calibrazione, è possibile determinare le concentrazioni incognite dei campioni in esame tramite interpolazione con l'equazione della retta standard. La concentrazione finale del campione viene poi calcolata moltiplicando il valore ottenuto per il fattore di diluizione (nel nostro studio X50).

Il 41% dei campioni analizzati (444 su 1080) ha riportato concentrazioni di MAA pari a 0, per cui sono stati rimossi dall'analisi statistica. Tutti i risultati mostrati nei capitoli successivi di questa tesi, sono riferiti quindi ai 636 campioni che hanno evidenziato un contenuto di MAA superiore a 0.

3.3 Analisi statistica

Le informazioni sperimentali (MAA; $\mu\text{g/mL}$) sono state analizzate impiegando le procedure del pacchetto statistico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Per quantificare l'effetto dell'allevamento, della stagione, dei giorni di lattazione, dell'ordine di parto e delle cellule somatiche sulla proteina amiloide A del latte, è stato utilizzato un modello lineare misto come segue:

$$y_{ijklmn} = \mu + \text{DIM}_i + \text{parity}_j + \text{allevamento}_k + \text{stagione}_l + \text{SCS}_m + e_{ijklmn},$$

dove:

y_{ijklmn} = variabile dipendente (MAA);

μ = intercetta generale del modello;

DIM_i = effetto fisso dell' i ma classe di stadio di lattazione della bovina (classe 1: $\text{DIM} \leq 60$ giorni; classe 2: $60 \text{ giorni} < \text{DIM} < 120$ giorni; classe 3: $120 \text{ giorni} < \text{DIM} < 180$ giorni; classe 4: $180 \text{ giorni} < \text{DIM} < 240$ giorni; classe 5: $240 \text{ giorni} < \text{DIM} < 300$ giorni; classe 6: $\text{DIM} \geq 300$ giorni);

parity_j = effetto fisso della j ma classe di ordine di parto della bovina ($j = \text{da } 1 \text{ a } \geq 4$);

allevamento_k = effetto casuale dell' k ma classe allevamento ($k = \text{da } 1 \text{ a } 40$);

stagione_l = effetto fisso dell' l ma classe di stagione ($l = \text{da } 1 \text{ a } 2$);

SCS_m = effetto fisso dell' m ma classe di cellule somatiche nel latte ($m = \text{da } 1 \text{ a } 5$);

e_{ijklmn} = errore casuale $\sim N(0, \sigma^2_e)$.

Gli intervalli di ciascuna delle 5 classi del SCS rappresentano 0,5 DS del carattere, con la classe centrale centrata sulla media. Sono stati calcolati dei contrasti polinomiali ($P < 0,05$) per esaminare i risultati ottenuti all'interno di ciascun effetto fisso testato: nel caso dello stadio di

lattazione e del SCS è stata testata la significatività di eventuali trend lineari, quadratici e cubici. Nel caso dell'ordine di parto sono state testate le differenze tra gruppi di bovine appartenenti a gruppi diversi e specificatamente: primipare VS successivi, secondipare VS successivi e terzipare VS successivi. Infine, per ciascuna stagione, è stata determinata un'eventuale differenza significativa rispetto le altre 3 raggruppate.

Come ulteriore analisi dei risultati ottenuti, al fine di comprendere meglio le relazioni esistenti tra i caratteri che descrivono la qualità del latte e la MAA, sono state stimate le correlazioni di Pearson utilizzando la procedura CORR di SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

4. Risultati e discussione

4.1 Statistiche descrittive

Nella Tabella 1 sono elencati i caratteri relativi alla produzione giornaliera di latte (kg/d), alla composizione (%) e alla concentrazione della proteina amiloide A ($\mu\text{g/mL}$) del latte dei campioni di latte individuale sottoposti ad analisi.

Tabella 1. Statistiche descrittive della produzione giornaliera di latte (kg/d), della composizione del latte (%) e della concentrazione di amiloide A del latte (MAA) ($\mu\text{g/mL}$).

Variabile	N	Media	DS ¹	P5 ²	P95 ³
<i>dMY⁴, kg/d</i>	636	24,68	7,76	12,00	37,00
<i>Composizione, %</i>					
Grasso	635	4,07	0,84	2,60	5,43
Proteina	635	3,81	0,41	3,13	4,50
Caseina	635	3,03	0,36	2,45	3,66
Lattosio	635	4,77	0,23	4,35	5,09
<i>MAA⁵, $\mu\text{g/mL}$</i>	636	1,78	1,73	0,26	5,72

¹DS = deviazione standard;

²P5 = 5° percentile;

³P95 = 95° percentile;

⁴dMY = produzione giornaliera di latte (Daily Milk Yield);

⁵MAA = proteina amiloide A del latte (Milk Amyloid A).

La media della produzione giornaliera di latte nelle bovine oggetto di studio è stata di 24,68 kg. Questo dato è leggermente più basso rispetto alla media nazionale della razza Bruna registrata nel 2021, la quale è stata di 25,50 kg/d, secondo quanto riportato nel bollettino dei controlli sulla produttività del latte dell'Associazione Italiana Allevatori. Va notato che alcuni degli allevamenti campionati sono localizzati in aree montane, dove le condizioni ambientali e il tipo di gestione dell'azienda possono notevolmente influenzare la produzione giornaliera. È essenziale notare, comunque, che il valore ottenuto dallo studio è coerente con le statistiche fornite dall'Associazione Nazionale degli Allevatori di Razza Bruna (24,34 kg/giorno).

Per quanto riguarda il contenuto medio di grasso (4,07%) e proteina (3,81%), i risultati ottenuti mostrano una qualità superiore rispetto alla media di razza riportata dall'Associazione Italiana Allevatori nel 2021 (4,04% e 3,61%, rispettivamente). La quantità di caseina rappresenta il 3,03% del totale, mentre il lattosio costituisce il 4,77%. Questi valori sono superiori a quelli riportati in uno studio precedente sulla razza Bruna condotto da Bittante *et al.* (2015), dove la percentuale di caseina era del 2,88% e quella di lattosio era del 4,86%. Per quanto riguarda la caseina, bisogna evidenziare che gli obiettivi di selezione della razza (es. k caseina B) e il miglioramento genetico ottenuto nel corso degli ultimi anni hanno sicuramente contribuito all'innalzamento di questo carattere.

La concentrazione media di MAA è risultata di 1,78 µg/mL, inferiore rispetto a quanto riscontrato in bibliografia. In uno studio condotto da Thomas *et al.* (2015), è stata riportata una concentrazione media di MAA di 3,87 µg/mL in campioni di latte prelevati da 54 bovine di razza Holstein. In un altro studio condotto da Hussein *et al.* (2018), la concentrazione media di MAA nei campioni di latte di 88 bovine di razza Holstein, batteriologicamente negativi e con una conta delle cellule somatiche (SCC) inferiore alle 500.000 cellule/mL, è stata registrata a 3,58 µg/mL. Nonostante i risultati ottenuti nel nostro studio abbiano evidenziato un quantitativo inferiore rispetto ai valori riportati in letteratura, è importante considerare il numero elevato di campioni inclusi nella nostra analisi e il fatto che il campione di bovine selezionate non si è limitato solo ai soggetti affetti da mastite.

4.2 Effetto di stagione, ordine di parto, DIM e SCS sulla MAA

In Tabella 2 sono presentati i risultati relativi all'analisi della varianza (ANOVA) del carattere della proteina amiloide A del latte. Sono stati considerati come effetti fissi la stagione, l'ordine di parto, i giorni in lattazione (DIM) e il Somatic Cell Score (SCS). Gli effetti casuali legati al singolo allevamento sono stati valutati esprimendo la loro influenza come percentuale rispetto alla varianza totale del carattere stesso.

L'effetto della stagione sulla concentrazione di MAA è trascurabile, così come l'influenza dell'ordine di parto è limitata. Al contrario, i giorni in lattazione ($P < 0,05$) e soprattutto il Somatic Cell Score ($P < 0,001$) si sono rivelati molto importanti nel determinare la variabilità del contenuto di MAA del latte.

Tabella 2. Risultati dell'ANOVA (Valori di F e significatività) per le concentrazioni di amiloide A del latte (MAA).

Effetto	MAA ¹
<i>Effetti fissi</i>	
Stagione	0,2
Ordine di parto	2,4
DIM ²	2,9*
SCS ³	71,3***
<i>Effetti variabili</i>	
Allevamento, %	8
<i>RMSE⁴</i>	1,37

¹MMA = proteina amiloide A del latte (Milk Amyloid A);

²DIM = giorni in lattazione (Days In Milk);

³SCS = Somatic Cell Score;

⁴RMSE = errore quadratico medio (Root Mean Square Error);

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

L'effetto del singolo allevamento è stato responsabile di circa l'8% della variabilità del carattere MAA. Bisogna considerare che ogni allevamento include diversi fattori di gestione, tra cui le condizioni di stabulazione e il tipo di alimentazione. Inoltre, dato che ogni allevamento è stato campionato solo una volta, questo fattore comprende anche la variabilità dovuta alle procedure di raccolta dei campioni.

Nella Tabella 3 sono presenti i risultati dei contrasti ortogonali utilizzati per valutare i diversi livelli dei fattori considerati sulla concentrazione della MAA. Nello specifico, i contrasti ortogonali consentono di scomporre l'effetto totale di ciascun fattore e di valutarne eventuali differenze significative.

Tabella 3. Contrasti ortogonali degli effetti della stagione, dell'ordine di parto, dei giorni in lattazione e del Somatic Cell Score (SCS) sulla concentrazione di amiloide A del latte (MAA).

Etichetta	MAA ¹	
	F-Value	P-Value
<i>Stagione</i>		
Autunno VS altre	0,38	NS
Estate VS altre	0,28	NS
Inverno VS altre	0,21	NS
Primavera VS altre	0,00	NS
<i>Ordine di parto</i>		
Primipare VS successivi	0,04	NS
Secondipare VS successivi	0,95	NS
Terzipare VS successivi	6,27	*
<i>DIM²</i>		
Lineare	6,38	*
Quadratico	1,44	NS
Cubico	0,07	NS
<i>SCS³</i>		
Lineare	202,65	***
Quadratico	30,21	***
Cubico	0,02	NS

¹MAA = proteina amiloide A del latte (Milk Amyloid A);

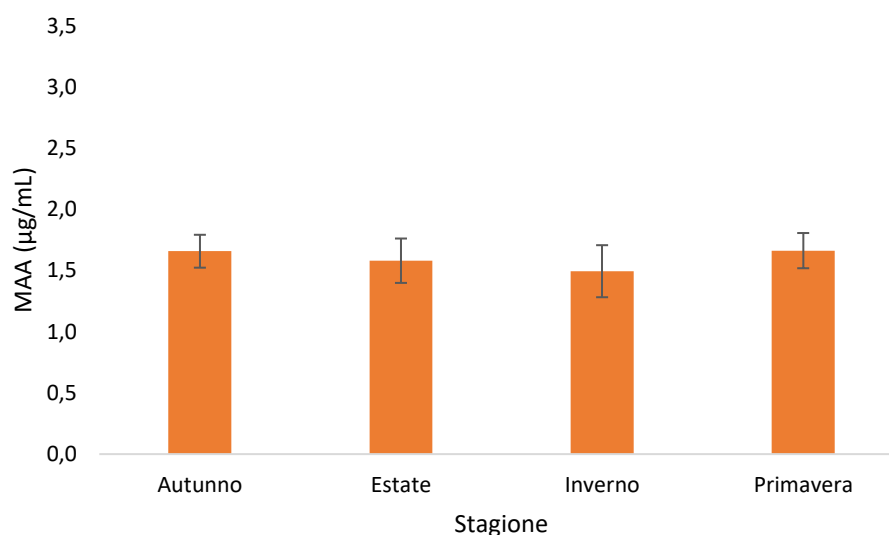
²DIM = giorni in lattazione (Days In Milk);

³SCS = Somatic Cell Score;

^{ns}non significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Dall'analisi della varianza e dei contrasti ortogonali l'effetto della stagione sulle concentrazioni di MAA nel latte è risultato non significativo. La Figura 4 evidenzia infatti come la concentrazione di MAA rimane pressoché costante durante tutto l'anno, indipendentemente dalla stagione in cui sono stati effettuati i campionamenti. Questo risultato può essere dovuto a due aspetti: il campionamento ha incluso allevamenti in zona montana, caratterizzati da temperature gradevoli durante il periodo estivo; più del 50% degli allevamenti campionati sono dotati di impianti di ventilazione. Questi due fattori potrebbero aver ridotto l'effetto dello stress da caldo nelle bovine riducendo così la risposta infiammatoria associata alla concentrazione di MAA e quindi anche le conseguenze normalmente evidenziate sul latte nel periodo estivo.

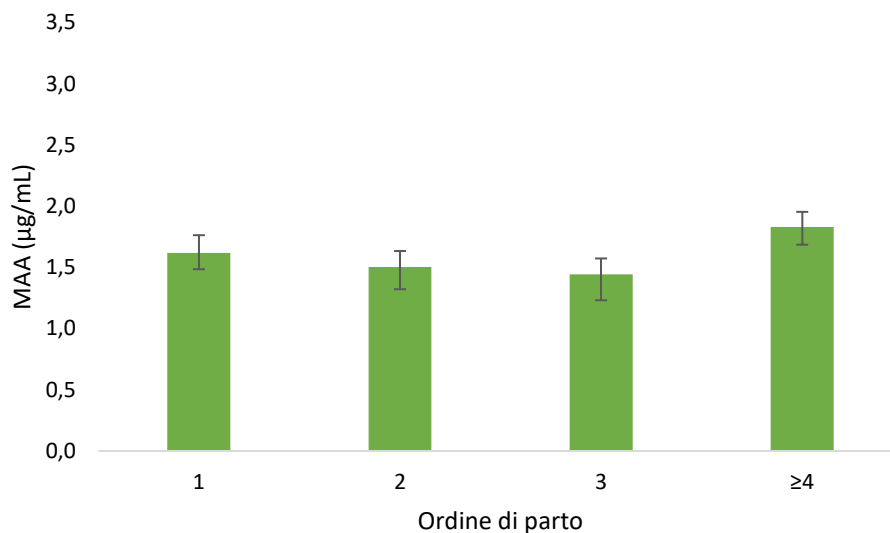
Figura 4. Effetto della stagione sulla MAA



Per quanto riguarda l'ordine di parto, è emerso che questo può influenzare in modo limitato la concentrazione di MAA, con una differenza significativa che si manifesta principalmente tra le bovine terzipare e quelle con quattro o più parti. Nel grafico rappresentato in Figura 5, si nota una graduale diminuzione della concentrazione di MAA nei primi tre parti (non significativa), seguita da un notevole aumento nelle bovine con almeno quattro parti. Le primipare tendono ad avere concentrazioni leggermente più elevate di MAA rispetto alle bovine secondipare e terzipare. Ciò potrebbe essere spiegato dal gravoso stress fisico legato alla nuova esperienza del primo parto e all'inizio della produzione di latte. Tuttavia, le bovine pluripare con quattro o più parti mostrano concentrazioni ancora più elevate di MAA, possibilmente a causa dell'esposizione ripetuta a potenziali agenti patogeni di mastite nei parti

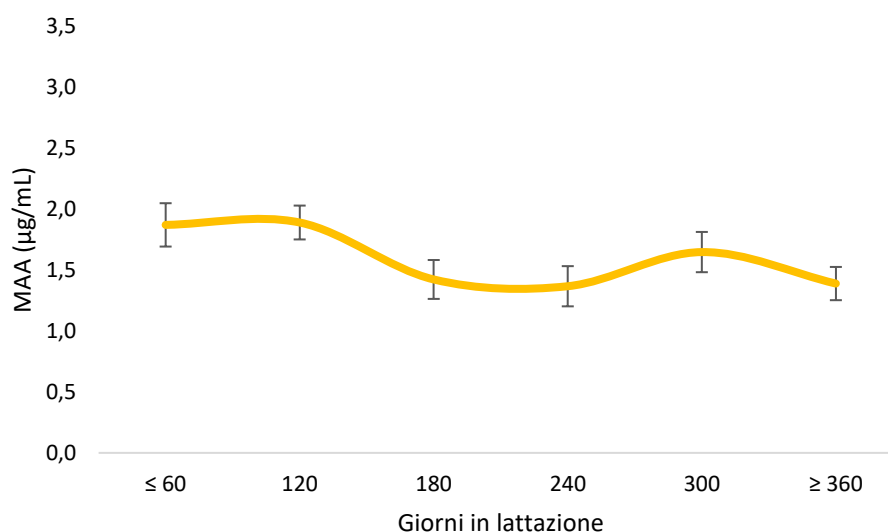
precedenti, che rendono l'animale più suscettibile al rischio di infezioni ricorrenti nella ghiandola mammaria. Inoltre, si ipotizza che il progressivo declino strutturale e funzionale delle ghiandole mammarie associato all'invecchiamento possa contribuire a rendere queste bovine più suscettibili alle infezioni e infiammazioni mammarie.

Figura 5. Effetto dell'ordine di parto sulla MAA



Nell'ambito dello stadio di lattazione, dalla Tabella 3 si evidenzia che l'andamento lineare risulta quello più probabile per la concentrazione di MAA nel latte. La Figura 6 permette di osservare l'andamento della concentrazione di MAA durante la lattazione. La fase di transizione nelle bovine da latte è un periodo critico che comprende le settimane immediatamente prima e dopo il parto. Durante questo periodo, l'animale attraversa notevoli cambiamenti fisiologici e metabolici per adattarsi alle esigenze del parto e alla produzione di latte. In risposta a questo evento, il sistema immunitario dell'animale viene attivato, generando una risposta infiammatoria caratterizzata dall'aumento dei livelli di molecole infiammatorie come la MAA. Di conseguenza, nelle prime settimane dopo il parto è normale osservare un incremento dei livelli di MAA a causa dello stato infiammatorio legato all'inizio della produzione di latte e alla ripresa dell'attività riproduttiva. Questi livelli elevati tendono a mantenersi costanti per circa due mesi dopo il parto, per poi subire una riduzione graduale nel corso della restante parte della lattazione.

Figura 6. Effetto dei giorni in lattazione sulla MAA



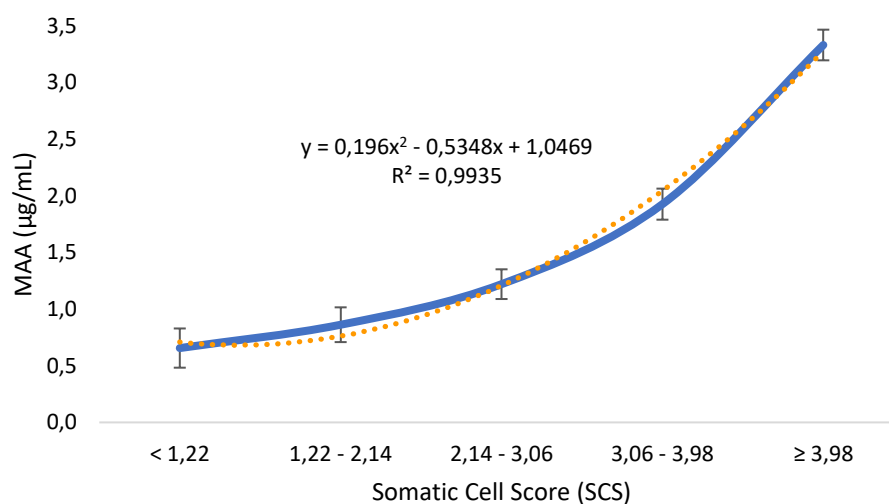
L'analisi dei contrasti ortogonali in Tabella 3 conferma la forte relazione tra la concentrazione di MAA e l'andamento delle cellule somatiche del latte (SCS). Questa relazione è caratterizzata da due andamenti significativi ($P < 0,001$): uno lineare e uno quadratico, con una maggiore importanza per il primo. Nelle prime tre classi di SCS è stato notato che il tasso di aumento della MAA è piuttosto modesto, mentre nelle classi successive si osserva un aumento notevole che segue una crescita esponenziale. La coesistenza di entrambi questi andamenti, lineare e quadratico, nei risultati delle analisi può essere attribuita alla complessità della relazione tra le variabili misurate, probabilmente curvilinea. Questa complessità può essere influenzata da vari fattori biologici o condizioni sperimentali che influenzano la concentrazione di MAA in modo variabile nei differenti livelli di SCS.

In sintesi, il grafico in Figura 7 rappresenta visivamente come MAA e SCS siano connessi. Quando il numero di cellule somatiche aumenta, si osserva un aumento significativo della concentrazione di MAA, e viceversa. Questa relazione suggerisce che l'attivazione del sistema immunitario nelle ghiandole mammarie, indicata da un aumento del SCS, è direttamente associata all'aumento della secrezione di MAA nel latte. Come previsto, quindi, sia la conta delle cellule somatiche che la concentrazione della proteina amiloide A nel latte possono essere considerate indicatori dello stato di salute della mammella e della qualità del latte.

Nel grafico è stata inclusa una linea di tendenza polinomiale di secondo grado per esaminare la relazione tra le variabili SCS e MAA. Questa linea di tendenza è rappresentata dall'equazione $y = 0,196x^2 - 0,5348x + 1,0469$, con un coefficiente R^2 di 0,9935. L'interpretazione generale

dell'equazione di regressione polinomiale ha rivelato una relazione non lineare tra SCS e MAA, con una curva che conferma quanto visto nell'analisi dei contrasti ortogonali. Il coefficiente R^2 di 0,9935 indica che questa linea di tendenza si adatta estremamente bene ai dati raccolti, confermando la sua validità come rappresentazione della relazione tra SCS e MAA nei campioni del nostro studio. È stata confermata l'ipotesi di ricerca e l'equazione potrebbe essere utilizzata per stimare la concentrazione di MAA quando si conosce il valore di SCS. Tuttavia, è importante notare che questa funzione è valida per lo studio specifico condotto e che possibili influenze esterne non considerate potrebbero condizionare la sua validità in altri contesti. In futuro potrebbe essere interessante esplorare ulteriormente la relazione tra SCS e MAA, cercando di identificare le cause specifiche di questa tendenza curva, ed esaminare come questa relazione potrebbe variare in contesti diversi o in altre razze bovine.

Figura 7. Effetto della SCS sulla MAA



4.3 Relazioni tra MAA, produzione e composizione del latte

Nella Tabella 4 si evidenziano le correlazioni tra la produzione giornaliera di latte, la composizione del latte e la concentrazione della proteina amiloide A del latte.

I risultati delle correlazioni riportate nella Tabella 4 tra la produzione giornaliera di latte e la composizione del latte mostrano delle evidenti tendenze. La produzione di latte è moderatamente correlata in modo negativo alla percentuale di grasso, proteina e caseina, indicando che quando la produzione aumenta, il contenuto percentuale di questi componenti tende a diminuire, e viceversa. Queste correlazioni sono altamente significative dal punto di vista statistico, confermando che non sono casuali ma riflettono relazioni reali. In contrasto, la

produzione di latte mostra una correlazione moderatamente forte e positiva con la composizione in lattosio, suggerendo che quando la produzione aumenta, la quantità di lattosio tende a crescere, e viceversa. Infatti, il lattosio gioca un ruolo fondamentale nella regolazione della produzione di latte. Quando il lattosio viene sintetizzato e accumulato all'interno delle cellule epiteliali del tessuto mammario, crea una pressione osmotica che attira l'acqua dall'interstizio circostante all'interno delle cellule. In questo modo, l'effetto osmotico del lattosio determina la quantità di latte prodotta (Fox et al., 2015).

Per quanto riguarda le correlazioni con la concentrazione di MAA, la produzione di latte non ha alcuna relazione. Inoltre, la correzione tra la concentrazione di MAA e la composizione in grasso, proteina e caseina è ancora più vicina allo zero, suggerendo che non vi sono relazioni con la concentrazione di MAA. Tuttavia, si osserva una correlazione molto forte e negativa tra la concentrazione di MAA e la quantità di lattosio nel latte. Un aumento della concentrazione di MAA, indice della presenza di uno stato infiammatorio in atto nella ghiandola mammaria, ha un impatto negativo sulla quantità di lattosio. Pertanto, questo conferma che il lattosio può essere considerato indirettamente un indicatore dello stato di salute della mammella.

Tabella 4. Risultati dell'analisi della correlazione di Pearson fra produzione giornaliera di latte, composizione e concentrazioni di amiloide A del latte (MAA).

	Grasso	Proteina	Caseina	Lattosio	MAA ¹
<i>dMY</i> ²	-0,24***	-0,44***	-0,43***	0,38***	-0,05
Grasso	1	0,46***	0,47***	-0,31***	-0,03
Proteina		1	0,99***	-0,27***	-0,005
Caseina			1	-0,19***	-0,04
Lattosio				1	-0,27***

¹MMA = proteina amiloide A del latte (Milk Amyloid A);

²dMY = produzione giornaliera di latte (Daily Milk Yield);

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

5. Conclusioni

La proteina amiloide A (MAA) nel latte vaccino può essere considerata un indicatore affidabile della salute delle bovine, in particolare delle loro mammelle. Questo è supportato dal fatto che la concentrazione di MAA aumenta nel latte durante i processi infiammatori della ghiandola mammaria, ovvero in corso di mastite. Un aspetto rilevante è che i livelli di MAA aumentano nel latte ancor prima che nel siero e anticipano l'incremento delle cellule somatiche nel latte (SCC). Dunque, la MAA potrebbe essere un parametro precoce di mastite. Questo studio può essere considerato il primo esempio di analisi della concentrazione di MAA su un numero significativo di bovine, includendo un totale di 636 animali. Dai campioni individuali di latte di questi animali è emersa una variabilità significativa della MAA soprattutto in relazione a fattori animali come l'ordine di parto, lo stadio di lattazione e la conta totale delle cellule somatiche, rispetto ai fattori ambientali come l'allevamento e la stagione. Lo studio ha evidenziato una forte relazione tra la concentrazione di MAA e l'andamento delle cellule somatiche del latte (SCS). Pertanto, sia la conta delle cellule somatiche che la concentrazione della proteina amiloide A del latte possono essere considerati indicatori dello stato di salute della mammella e della qualità del latte. Oltre a ciò, lo stadio di lattazione ha dimostrato di avere un impatto sulla concentrazione di MAA, affermando che i livelli di MAA variano durante il ciclo di produzione del latte. Infine, in merito alla relazione tra la concentrazione di MAA e i caratteri di qualità del latte, è importante notare che la concentrazione di MAA è correlata negativamente con la quantità di lattosio nel latte, confermando che il lattosio può essere ritenuto un parametro indiretto di valutazione delle condizioni di salute delle mammelle.

In definitiva, questo studio indica che la MAA può essere considerata un biomarcatore importante per la salute delle ghiandole mammarie delle bovine, con potenziali implicazioni rilevanti per la gestione della produzione di latte nella filiera lattiero-casearia. Ulteriori ricerche sono necessarie per approfondire la conoscenza di questa proteina e sviluppare tecniche di analisi adatte per l'utilizzo direttamente in allevamento, come test rapidi o metodi applicabili agli impianti di mungitura. Inoltre, la dimensione del dataset raccolto permetterà la realizzazione di altre indagini sugli aspetti genetici dell'MAA nella popolazione bovina da latte.

6. Bibliografia

Abebe R., Hatiya H., Abera M., Megersa B. and Asmare K. (2016). Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 12(1) (p. 270).

Akerstedt M., Waller K.P., Larsen L.B., Forsbäck L. and Sternesjö A. (2008). Relationship between haptoglobin and serum amyloid A in milk and milk quality. *International Dairy Journal*, 18(6) (p. 669-674).

Aldo-Benson M.A. and Benson M.D. (1982). SAA suppression of immune response in vitro: evidence for an effect on T cell-macrophage interaction. *The Journal of Immunology*, 128(6) (p. 2390-2392).

Aldridge B.M., McGuirk S.M. and Lunn D.P. (1998). Effect of colostrum ingestion on immunoglobulin-positive cells in calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 62(1) (p. 51-64).

Alhussien M.N. and Dang A.K. (2018). Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Veterinary World*, 11(5) (p. 562-577).

Ali A.K.A. and Shook G.E. (1980). An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. *American Dairy Science Association. Elsevier Inc*, 63(3) (p. 487-490).

Almehdar H., El-Fakharany E., Uversky V. and Redwan E. (2015). Disorder in milk proteins: structure, functional disorder, and biocidal potentials of lactoperoxidase. *Current Protein & Peptide Science*, 16(4) (p. 352-365).

Arrigoni N., Bassi P., Bursi E., Casadio C., Luppi A., Padovani A. and Trambajolo G. (2022). LINEE GUIDA - Uso prudente dell'antibiotico nell'allevamento bovino da latte. Regione Emilia-Romagna, prima revisione (p. 15-34).

Arrigoni N., Bassi P., Maragno D., Padovani A. and Trambajolo G. (2023). LINEE GUIDA - Uso prudente dell'antibiotico nell'allevamento bovino da latte. Ministero della salute, seconda revisione (p. 22-46).

- Ashraf A. and Imran M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical Animal Health and Production*, 50(6) (p. 1193-1202).
- Barone R. (2003). Conformazione interna delle mammelle della vacca; Figura 135. Trattato di anatomia comparata dei mammiferi domestici. Vol. 4: Splanchnologia. Apparecchio urogenitale. Feto e i suoi annessi. Peritoneo e topografia addominale. Edizione italiana a cura di Bortolami R. (2010). Edagricole Calderini (p. 372).
- Biggs A. (2019). Management of Somatic Cell Count (SCC). *Mastipedia, Hipra* (p. 34–42).
- Bittante G., Cipolat-Gotet C., Malchiodi F., Sturaro E., Tagliapietra F., Schiavon S. and Cecchinato A. (2015). Effect of dairy farming system, herd, season, parity, and days in milk on modeling of the coagulation, curd firming, and syneresis of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 98(4) (p. 2759-2774).
- Blowey R. and Edmondson P. (2010). *Mastitis control in dairy herds*. CAB International; 2nd edition (p. 33–59).
- Bobbo T., Penasa M. and Cassandro M. (2020). Combining total and differential somatic cell count to better assess the association of udder health status with milk yield, composition and coagulation properties in cattle, *Italian Journal of Animal Science*, 19(1) (p. 697-703).
- Bochniarz M., Szczubiał M., Brodzki P., Krakowski L. and Dąbrowski R. (2020). Serum amyloid A as an marker of cow's mastitis caused by *Streptococcus* sp. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 72 (101498).
- Bolzoni G., Benicchio S., Posante A., Boldini M., Peli M. and Varisco G. (2006). Esame batteriologico del latte. Alcune considerazioni su esecuzione, interpretazione dei risultati e frequenza degli isolamenti. *Large Animal Review*, Anno 12, n. 5 (p. 3-11).
- Bramley A. J. and Dodd F. H. (1984). Reviews of the progress of dairy science: mastitis control-progress and prospects. *Journal of Dairy Research*, 51(3) (p. 481-512).
- Brenaut P., Lefèvre L., Rau A., Laloë D., Pisoni G., Moroni P., Bevilacqua C. and Martin P. (2014). Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Vet Res* 45(1) (16).

Bytyqi H., Zaugg U., Sheri K., Hamidi A., Gjonbalaj M., Muji S. and Mehmeti H. (2010). Influence of management and physiological factors on somatic cell uence of management and physiological factors on somatic cell count in raw cow milk in Kosova. *Veterinarski Arhiv* 80(2) (p. 173-183).

Capuco A. V., Mein G. A., Nickerson S. C., Jack L., Wood D.L. , Bright S.A., Aschenbrenner R.A., Miller R.H. and Bitman J. (1994). Influence of pulsationless milking on teat canal keratin and mastitis. *Journal of Dairy Science*, 77(1) (p. 64-74).

Castañeda Vázquez H., Jäger S., Wolter W., Zschöck M., Vazquez C. and El-Sayed A. (2013). Isolation and identification of main mastitis pathogens in Mexico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 65(2) (p. 377-382).

Cheng W. and Han S. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australas J Anim Sci*, 33(11) (p. 1699-1713).

Constable P.D., Hinchcliff K.W., Done S.H. and Grümberg W. (2016). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. Elsevier Science; 11th edition (p. 1904-1991).

Cray C., Zaias J. and Altman N.H. (2009). Acute phase response in animals: a review. *Comparative Medicine*, 59(6) (p. 517-526).

Damm M., Holm C., Blaabjerg M., Bro M.N. and Schwarz D. (2017). Differential somatic cell count-A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *Journal of Dairy Science*, 100(6) (p. 4926–4940).

De Beer M.C., Yuan T., Kindy M.S., Asztalos B.F., Roheim P.S. and De Beer F.C. (1995). Characterization of constitutive human serum amyloid A protein (SAA4) as an apolipoprotein. *J Lipid Res*. 36(3) (p. 526-534).

De Villiers W.J., Varilek G.W., De Beer F.C., Guo J.T. and Kindy M.S. (2000). Increased serum amyloid a levels reflect colitis severity and precede amyloid formation in IL-2 knockout mice. *Cytokine*, 12(9) (p. 1337-1347).

Deb R., Kumar A., Chakraborty S., Verma A., Tiwari R., Dhama K., Singh U. and Kumar S. (2013). Trends in Diagnosis and Control of Bovine Mastitis. *Pak J Biol Sci*, 16(23) (p. 1653-1661).

Dimarello C.A., Cannon J.G. and Wolff S.M. (1988). New concepts on the pathogenesis of fever. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(1) (p. 168-189).

Eckersall P.D. and Bell R. (2010). Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Veterinary Journal*, 185(1) (p. 23-27).

Eckersall P.D., Young F.J., Nolan A.M., Knight C.H., McComb C., Waterston M.M., Hogarth C.J., Scott E.M. and Fitzpatrick J.L. (2006). Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(5) (p. 1488-1501).

El-Sayed A. and Kamel M. (2021). Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. *Trop Anim Health Prod*, 53(2) (236).

Ezzat Alnakip M., Quintela-Baluja M., Böhme K., Fernández-No I., Caamaño-Antelo S., Calomata P. and Barros-Velázquez J. (2014). The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *Journal of Veterinary Medicine*, 2014 (659801).

Fantini A. (2008). I meccanismi difensivi della mammella. *Professione Allevatore* (p. 72-73).

Fantini A. (2009). Le proteine della fase acuta come biomarkers. *Professione allevatore* (p. 56-57).

Food and Agriculture Organization FAO (2014). Impact of mastitis in small scale dairy production systems. *Animal Production and Health Working Paper*. No. 13. Rome.

Fox L.K. and Gay J.M. (1993). Contagious mastitis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 9(3) (p. 475-487).

Fox P.F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P.L.H. and O'Mahoni J.A. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer International Publishing; 2nd edition (p. 21-68).

Gatt M.E., Urieli-Shoval S., Preciado-Patt L., Fridkin M., Calco S. and Azar Y. (1998). Effect of serum amyloid A on selected in vitro functions of isolated human neutrophils. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 132(5) (p. 414-420).

Gerardi G., Bernardini D., Elia C.A., Ferrari V., Iob L. and Segato S. (2009). Use of serum amyloid A and milk amyloid A in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 76(4) (p. 411-417).

Gomes F. and Henriques M. (2016). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology*, 72(4) (p. 377-383).

Grosvenor C.E., Picciano M.F. and Baumrucker C.R. (1993). Hormones and growth factors in milk. *Endocrine Reviews*, 14(6) (p. 710-728).

Gruet P., Maincent P., Berthelot X., Kaltsatos V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(3) (p. 245-259).

Gruys E., Toussaint M.J.M., Upragarin N., Van Ederen A.M., Adewuyi A.A., Candiani D., Nguyen T.K.A. and Sabeckiene J. (2005). Acute phase reactants, challenge in the near future of animal production and veterinary medicine. *Journal of Zhejiang University Science*, 6(10) (p. 941-947).

Husby G. and Natvig J.B. (1974). A serum component related to nonimmunoglobulin amyloid protein as a possible precursor of the fibrils. *The Journal of clinical investigation*, 53(4) (p. 1054-1061).

Husby G., Marhaug G., Downton B., Sletten K. and Sipe J.D. (1994). Serum amyloid A (SAA): biochemistry, genetics and the pathogenesis of AA amyloidosis. *Amyloid*, 1(2) (p. 119-137).

Hussein H.A., El-Razik K., Gomaa A.M., Elbayoumy M.K., Abdelrahman K.A. and Hosein H.I. (2018). Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle. *Vet World*. 11(1) (p. 34-41).

Islam M.A., Islam M.Z., Islam M.A., Rahman M.S. and Islam M.T. (2011). Prevalence of sub-clinical mastitis in dairy cows in selected areas of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 9(1) (p. 73-78).

Ismail Z.B. (2017). Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Veterinary World*, 10(9) (p. 1057-1062).

Jacobsen S., Niewold T.A., Kornalijnslijper E., Toussaint M.J.M. and Gruys E. (2005). Kinetics of local and systemic isoforms of serum amyloid A in bovine mastitic milk. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104(1-2) (p. 21-31).

Jensen L.E. and Whitehead A.S. (1998). Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochemical Journal*, 334(3) (p. 489-503).

- Kalmus P., Simojoki H., Pyörälä S., Taponen S., Holopainen J. and Orro T. (2013). Milk haptoglobin, milk amyloid A, and N-acetyl- β -d-glucosaminidase activity in bovines with naturally occurring clinical mastitis diagnosed with a quantitative PCR test. *Journal of Dairy Science*, 96(6) (p. 3662-3670).
- Kehrli M.E. and Harp J.A. (2001). Immunity in the mammary gland. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 17(3) (p. 495-516).
- Lam T.J., Schukken Y.H., Grommers F.J., Smit J.A. and Brand A. (1993). Within-herd and between-herd variation in diagnosis of clinical mastitis in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 202(6) (p. 938-942).
- Larson M.A., Wei H.S., Weber A., Weber A.T. and McDonald T.L. (2003). Induction of human mammary-associated serum amyloid A3 expression by prolactin or lipopolysaccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(4) (p. 1030-1037).
- Li N., Richoux R., Boutinaud M., Martin P. and Gagnaire V. (2014). Role of somatic cells on dairy processes and products: A review. *Dairy Science and Technology*, 94(6) (p. 517-538).
- Libera K., Konieczny K., Witkowska K., Żurek K., Szumacher-Strabel M., Cieslak A. and Smulski S. (2021). The Association between Selected Dietary Minerals and Mastitis in Dairy Cows. *Animals*, 11(8) (2330).
- Liebich H.G. (2010). *Istologia e anatomia microscopica dei mammiferi domestici e degli uccelli*. Edizione italiana a cura di Ballarin C. e Radaelli G. (2012). Piccin (p. 354-356).
- Marshall J.S., Warrington R., Watson W. and Kim H.L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 14(2) (49).
- McDonald T.L., Larson M.A., Mack D.R. and Weber A. (2001). Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A3 (MAA3) into colostrum. *Vet Immunol Immunopathol*, 83(3-4) (p. 203-211).
- Miglio A., Moscati L., Fruganti G., Pela M., Scoccia E., Valiani A. and Maresca C. (2013). Use of milk amyloid A in the diagnosis of sub-clinical mastitis in dairy ewes. *J Dairy Res*, 80(4) (p. 496-502).

Montagne L., Toullec R. and Lallès J.P. (2000). Calf intestinal mucin: isolation, partial characterization, and measurement in ileal digesta with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Dairy Science*, 83(3) (p. 507-517).

Murata H., Shimada N. and Yoshioka M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Veterinary Journal*, 168(1) (p. 28-40).

Nickerson S.C. (1987). Resistance mechanisms of the bovine udder: New implications for mastitis control at the teat end. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 191(11) (p. 1484-1488).

Nielsen B.H., Jacobsen S., Andersen P.H., Niewold T.A. and Heegaard P.M. (2004). Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. *Veterinary Record*, 154(12) (p. 361-365).

Oviedo-Boyso J., Valdez-Alarcón J.J., Cajero-Juárez M., Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J., Bravo-Patiño A. and Baizabal-Aguirre V. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, 54(4) (p. 399-409).

Paltrinieri S. (2008). The feline acute phase reaction. *Veterinary Journal*, 177(1) (p. 26-35).

Patel H., Fellowes R., Coade S. and Woo P. (1998). Human serum amyloid A has cytokine like properties. *Scandinavian Journal of Immunology*, 48(4) (p. 410-418).

Paulrud C.O. (2005). Basic concepts of the bovine teat canal. *Veterinary Research Communications*, 29(3) (p. 215-245).

Pedersen L.H., Aalbæk B., Røntved C.M., Ingvarsen K.L., Sorensen N.S., Heegaard P.M.H. and Jensen H.E. (2003). Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. *J Comp Pathol*, 128(2-3) (p. 156-164).

Pisanu S., Cacciotto C., Pagnozzi D., Uzzau S., Pollera C., Penati M., Bronzo V. and Addis M.F. (2020). Impact of *Staphylococcus aureus* infection on the late lactation goat milk proteome: new perspectives for monitoring and understanding mastitis in dairy goats. *J Proteomics*, 221 (103763).

Poli G., Dall'Ara P., Martino P.A. and Rosati S. (2017). *Microbiologia e immunologia veterinaria*. Edra; 3rd edition (p. 423-427).

Pradeep M. (2013). Application of acute phase proteins as biomarkers in modern veterinary practice. *Ind. J. Vet & Anim. Sci. Res.*, 43(1) (p. 163-187).

Pyörälä S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, 34(5) (p. 565-578).

Rainard P. (2003). The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary Research*, 34(5) (p. 647-670).

Regolamento (UE) 2019/6 del Parlamento Europeo e del Consiglio dell'11 dicembre 2018 relativo ai medicinali veterinari e che abroga la direttiva 2001/82/CE.

Salvador, R., Beltran, J., Abes, N., Gutierrez, C. and Mingala, C. (2012). Prevalence and risk factors of subclinical mastitis as determined by the California Mastitis Test in water buffaloes (*Bubalis bubalis*) in Nueva Ecija, Philippines. *Journal of Dairy Science*, 95(3) (p. 1363-1366).

Schrödl W., Büchler R., Wendler S., Reinhold P., Muckova P., Reindl J., Rhode H. (2016). Acute phase proteins as promising biomarkers: Perspectives and limitations for human and veterinary medicine. *Proteomics Clin Appl*, 10(11) (p. 1077-1092).

Schukken Y.H., Wilson D.J., Welcome F., Garrison-Tikofsky L. and Gonzalez R.N. (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, 34(5) (p. 579-596).

Schultz L.H. (1977). Somatic cells in milk-physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. *Journal of Food Protection*, 40(2) (p. 125-131).

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

Seegers H., Fourichon C. and Beaudeau F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research*, 34(5) (p. 475-491).

Shainkin-Kestenbaum R., Zimlichman S., Lis M., Preciado-Patt L., Fridkin M. and Berenheim J. (1997). Modulation of prostaglandin I₂ production from bovine aortic endothelial cells by serum amyloid A and its N-terminal tetradecapeptide. *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids*, 2(4) (p. 101-106).

Sharma N., Singh K. and Bhadwal M.S. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(3) (p. 429-438).

Sordillo L.M., Shafer-Weaver K. and DeRosa D. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 80(8) (p. 1851-1865).

Steel D.M. and Whitehead A.S. (1994). The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology Today*, 15(2) (p. 81-88).

Stelwagen K., Carpenter E., Haigh B., Hodgkinson A. and Wheeler T.T. (2009). Immune components of bovine colostrum and milk. *Journal of animal science*, 87(13) (p. 3-9).

Stocco G., Summer A., Cipolat-Gotet C., Zanini L., Vairani D., Dadousis C. and Zecconi A. (2020). Differential Somatic Cell Count as a Novel Indicator of Milk Quality in Dairy Cows. *Animals*, 10(5) (753).

Syversen P.V., Saeter U., Cunha-Ribeiro L., Orvim U.J., Sletten K.J. and Husby G. (1994). The effect of serum amyloid protein A fragment-SAA25-76 on blood platelet aggregation. *Thrombosis Research*, 76(3) (p. 299-305).

Thomas F.C., Waterston M., Hastie P., Parkin T., Haining H. and Eckersall P.D. (2015). The major acute phase proteins of bovine milk in a commercial dairy herd. *BMC Vet Res*, 11 (207).

Thomas J.S. (2000). Overview of plasma proteins and protein electrophoresis. *Schalm's veterinary haematology*. Lippincott Williams & Wilkins; 5th edition (p. 891–904).

Tothova C.S., Nagy O., Seidel H. and Kovac G. (2011). Age-related changes in the concentrations of acute phase proteins and some variables of protein metabolism in calves. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 98(1-2) (p. 33-40).

Ullar C.M. and Whitehead A.S. (1999). Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *European Journal of Biochemistry*, 265(2) (p. 501-523).

Ullar C.M., Burgess C.J., Sharp P.M. and Whitehead A.S. (1994). Evolution of the serum amyloid A (SAA) protein superfamily. *Genomics*, 19(2) (p. 228-235).

Urieli-Shoval S., Linke R.P. and Matzner Y. (2000). Expression and function of serum amyloid A, a major acute phase protein, in normal and disease state. *Current Opinion in Hematology*, 7(1) (p. 64-69).

Verbeke J., Piepers S., Supré K. and De Vliegher S. (2014). Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. *Journal of Dairy Science*, 97(11) (p. 6926-6934).

Weber A., Weber A.T., McDonald T.L. and Larson M.A. (2006). Staphylococcus aureus lipoteichoic acid induces differential expression of bovine serum amyloid A3(SAA3) by mammary epithelial cells: Implications for early diagnosis of mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109(1-2) (p. 79-83).

Yu G.M., Kubota H., Okita M. and Maeda T. (2017). The anti-inflammatory and antioxidant effects of melatonin on LPS-stimulated bovine mammary epithelial cells. *PLoS ONE*, 12(5).

Zecconi A., Hamanno J., Bronzo V., Moroni P., Giovannini G. and Piccinini R. (2002). Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections. *Biology of the mammary gland. Biology of the Mammary Gland*, 480 (p. 287–293).

Zhang Z., Chen S., Ren J., Han F., Yu X., Tang F., Xue F., Chen W., Yang J., Jiang Y., Jiang H., Jiang H., Lv B., Xu J. and Dai J. (2020). Facile construction of a molecularly imprinted polymer–based electrochemical sensor for the detection of milk amyloid A. *Microchimica Acta*, 187(12) (642).