

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea a ciclo unico in  
MEDICINA VETERINARIA

## **UTILIZZO DELLA VALUTAZIONE ECOGRAFICA QUALE STRUMENTO DI DIAGNOSI DI MASTITE NELLA BOVINA DA LATTE**

Relatore:

Prof. Matteo Giancesella

Correlatore:

Dott.ssa Chiara Tommasoni

Laureanda:

Giorgia Taio

Matricola n. 1238021

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



# Indice

1. RIASSUNTO .....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. PREMESSA.....	5
4. INTRODUZIONE.....	6
<b>4.1 La mastite nell'allevamento della bovina da latte.....</b>	<b>6</b>
4.1.1. Anatomia della ghiandola mammaria.....	8
4.1.2. Patogenesi.....	10
4.1.3. Classificazione delle mastiti .....	12
4.1.4. Principali agenti eziologici .....	15
4.1.4.a <i>Streptococcus spp.</i> .....	15
4.1.4.b <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
4.1.4.c Stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) .....	17
4.1.4.d <i>Escherichia coli</i> e altri coliformi .....	17
4.1.4.e <i>Mycoplasma spp.</i> .....	18
4.1.5. Prevenzione .....	19
4.1.6. Diagnosi .....	22
4.1.6.a Esame batteriologico e PCR .....	22
4.1.6.b Conta delle cellule Somatiche (SCC) .....	23
4.1.6.c Conducibilità elettrica del latte .....	24
4.1.6.d California Mastitis Test (CMT) .....	24
4.1.6.e On Farm Culture (OFC).....	26
4.1.7. Terapia.....	28
<b>4.2 L'ecografia mammaria in diagnosi di mastite.....</b>	<b>37</b>
4.2.1 Principi fondamentali di diagnostica ecografica .....	37
4.2.2 Principali artefatti ecografici .....	40
4.2.3 Modalità e valenza clinico-diagnostica .....	44

<b>5. OBIETTIVI DELLO STUDIO .....</b>	<b>45</b>
<b>6. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>46</b>
6.1 Sede di svolgimento dello studio e descrizione dell'allevamento .....	46
6.2 Criteri di inclusione .....	46
6.3 Descrizione del protocollo.....	47
6.4 Elaborazione dati e analisi statistica .....	54
<b>7. RISULTATI .....</b>	<b>56</b>
<b>8. DISCUSSIONE .....</b>	<b>67</b>
<b>9. CONCLUSIONI.....</b>	<b>72</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>73</b>
<b>11. SITOGRAFIA .....</b>	<b>89</b>
<b>12. FONTI NORMATIVE .....</b>	<b>90</b>

# **1. RIASSUNTO**

La mastite rappresenta una delle principali patologie nell'allevamento della bovina da latte, causando cospicue perdite economiche e compromettendo la salute e la produttività degli animali. La diagnosi tempestiva e accurata è essenziale per limitare la diffusione nella mandria e intraprendere il giusto piano terapeutico. Questo studio si pone come scopo principale la valutazione dell'utilità e efficacia dell'ecografia mammaria come metodo diagnostico innovativo in bovine da latte affette da mastite.

La prova è stata condotta reclutando 89 bovine di razza Frisona Italiana provenienti da un'unica azienda del Nord-Italia. Gli animali sono stati inclusi nello studio il giorno stesso della diagnosi di mastite e segnalamento da parte dell'allevatore.

Per ciascun individuo sono stati svolti: la visita clinica; l'esame batteriologico e la conta delle cellule somatiche (SCC) su un pool dei quattro quarti; un esame ecografico della mammella a sei ore di distanza dalla mungitura.

La SCC, l'esito dell'esame batteriologico e la presenza di segni clinici sono stati usati come criterio differenziale per dividere gli animali in tre gruppi: sani ( $SCC \leq 100.000$  cellule/ml, negatività all'esame batteriologico e assenza di segni clinici); subclinici ( $SCC >100.000$  cellule/ml e/o positività all'esame batteriologico e/o presenza di segni clinici e assenza di segni clinici); clinici ( $SCC >100.000$  cellule/ml e/o positività all'esame batteriologico e presenza di segni clinici).

L'esame ecografico è stato effettuato con scansione longitudinalmente per indagare lo stato di salute della mammella, con uno specifico focus sulla cisterna del latte.

Le immagini della cisterna del latte sono state analizzate e a ciascun quarto è stato assegnato un valore da 0 a 3, sulla base dell'ecogenicità. Il grado 0 rappresenta la totale anecogenicità della cisterna; il grado 1 ecogenicità lieve; il grado 2 ecogenicità da moderata a massiva; il grado 3 ecogenicità ampiamente diffusa e importante.

L'esame batteriologico ha evidenziato una prevalenza di casi di mastite indotta da Stafilococchi coagulasi negativi (50%), seguiti da *Streptococcus uberis* (19%), coliformi (10%), *Bacillus spp.* (2%), Stafilococchi coagulasi positivi (2%), *Klebsiella spp.* (1%) e *Trueperella pyogenes* (1%). 13 delle bovine campionate sono risultate negative all'esame batteriologico. Per quanto concerne la divisione degli animali su base clinica, 11 soggetti sono stati categorizzati come sani, 55 subclinici e i restanti 23 come clinici.

Per le variabili quali lo stadio di lattazione, il numero di lattazioni e la SCC è stata svolta un'analisi statistica descrittiva, mettendo in evidenza le caratteristiche degli animali

campionati. Sono stati inoltre analizzati gli esiti dell'esame della minima concentrazione inibente per le principali molecole utilizzate in zootecnica.

Il test Shapiro-Wilk ha evidenziato una distribuzione non-normale dei dati, motivo per cui si è proceduto all'applicazione di test non-parametrici.

Attraverso l'utilizzo test del Chi-quadrato, è stato definito l'andamento degli score ecografici in base al gruppo clinico di appartenenza. Il test ha evidenziato una differenza significativa tra i gruppi sani, subclinici e clinici ( $p\text{-value} < 0,0001$ ). Si è potuto osservare come gli score più bassi (grado 0 e 1) siano stati assegnati in condizioni di salute della mammella così come score più alti siano stati assegnati a quarti in condizioni subcliniche e cliniche. Questi dati dimostrano come il valore dello score ecografico aumenti in condizioni infiammatorie.

Infine, su un dataset ristretto sono state eseguite le analisi del latte sul singolo quarto, permettendo di utilizzare come unità campionaria il quarto e non il singolo animale. In questo caso è stato applicato il test di Kruskal-Wallis che ha evidenziato differenze significative tra le medie degli score ecografici dei diversi gruppi clinici.

L'ecografia mammaria si è dimostrata un buon strumento per la valutazione diagnostica di mastite e simultaneamente per la valutazione dello stato di salute della mammella, seppur lo studio necessiti di futuri accorgimenti.

## **2. ABSTRACT**

Mastitis, an inflammatory condition of the mammary gland, poses significant challenges in dairy farming due to economic losses and animal welfare concerns. Traditional diagnostic methods have limitations, necessitating the exploration of alternative approaches. This thesis investigates the utility of ultrasound imaging in diagnosis of mastitis.

The study employs a prospective design, where ultrasound examinations are conducted on 89 dairy cattle presenting with suspected mastitis. Concurrently, bacteriological, Somatic Cells Count (SCC) and clinical examinations are performed to classify animals into healthy, subclinical and clinical groups, providing a comparative basis for ultrasound findings.

SCC, bacteriological examination findings and the presence of clinical signs were used as discriminators to divide the animals into three groups: healthy (SCC  $\leq$  100,000 cells/ml, bacteriological examination negativity and absence of clinical signs); subclinical (SCC  $>$  100,000 cells/ml and/or bacteriological examination positivity and absence of clinical signs); clinical (SCC  $>$  100,000 cells/ml and/or bacteriological examination positivity and presence of clinical signs). The ultrasound examination was carried out scanning each quarter longitudinally to investigate the udder, with a specific focus on the milk cistern. The milk cistern images were analysed and each quarter was assigned a value from 0 to 3, based on echogenicity. Grade 0 represents total anechogenicity of the cistern; grade 1 mild echogenicity; grade 2 moderate to massive echogenicity; grade 3 widespread and massive echogenicity.

The bacteriological examination showed a prevalence of cases of mastitis induced by coagulase negative Staphylococci (50%), followed by *Streptococcus uberis* (19%), coliforms (10%), while 13 of the cows sampled tested negative in bacteriological tests. Regarding the division of animals on a clinical basis, 11 animals were categorised as healthy, 55 as subclinical and the remaining 23 as clinical.

The Shapiro-Wilk test showed a non-normal distribution of the data, which is why non-parametric tests were applied. Using the Chi-square test, the trend of the ultrasound scores according to the clinical group was defined. The test showed a significant difference between the healthy, subclinical and clinical groups (p-value  $<$  0.0001). It could be observed that the lowest scores (grade 0 and 1) were assigned in healthy udder conditions as well as higher scores were assigned to quarters in subclinical and clinical conditions. These data demonstrate how the ultrasound score value increases in inflammatory conditions.

Finally, milk analysis was performed on the individual quarters on a restricted dataset, allowing the quarter and not the individual animal to be used as the sample unit. Here, the

Kruskal-Wallis test was applied, which showed significant differences between the mean ultrasound scores of the different clinical groups.

Preliminary analysis suggests promising results, with ultrasound demonstrating potential in detecting mastitis-associated alterations within the mammary gland. Additionally, suggesting avenues for future research, such as exploring other ultrasound parameters or validating findings in larger cohorts, can help advance the field.



### **3. PREMESSA**

Si definisce mastite uno stato infiammatorio della mammella in risposta ad agenti infettivi, traumi fisici o agenti irritanti (Kibebew, 2017).

Questa patologia rappresenta uno dei maggiori problemi nell'allevamento della bovina da latte sia per quanto riguarda lo stato di benessere e salute dell'animale, sia per l'impatto economico sull'allevatore. L'entità del fenomeno è influenzata da uno schema multifattoriale che comprende le caratteristiche del patogeno, i fattori intrinseci dell'animale e l'ambiente stesso di allevamento (Fredebeul-Krein et al., 2022).

La diagnosi precoce di mastite è cruciale per limitare i danni economici e garantire il benessere animale. Strumenti diagnostici avanzati e approcci innovativi possono migliorare la capacità di identificare tempestivamente il fenomeno infiammatorio, permettendo interventi rapidi e mirati.

L'ecografia è uno strumento utilizzato nella pratica quotidiana dal Medico Veterinario Buiatra come una metodica diagnostica non invasiva che offre notevoli vantaggi. Essa permette una valutazione della struttura e della funzionalità della ghiandola mammaria senza arrecare stress o dolore all'animale (Tommasoni et al., 2023).

Gli obiettivi di questo studio sono:

1. indagare l'applicabilità dal punto di vista pratico dell'ecografia nella diagnosi di mastite;
2. definire una stadiazione del fenomeno infiammatorio sulla base dell'ecogenicità della cisterna del latte, tale da permettere una classificazione in gradi dei singoli quarti;
3. dimostrare l'eventuale correlazione tra la stadiazione/sintomatologia clinica e il numero di cellule somatiche;
4. indagare l'utilità dell'ecografia come futuro strumento per decidere come impostare la terapia della mastite, soprattutto in un'ottica di uso prudente del farmaco.

## **4. INTRODUZIONE**

### **4.1 La mastite nell'allevamento della bovina da latte**

Nel corso degli anni, sono stati condotti diversi studi per determinare il tasso di incidenza delle mastiti cliniche nei Paesi Europei, in Nord America, Africa, Australia e Nuova Zelanda. In questi territori, l'incidenza dei casi di mastite clinica nel primo decennio degli anni duemila era ritenuta variabile dai 13 ai 40 casi ogni 100 capi (Jamali et al., 2018; Riekerink et al., 2008).

L'approccio clinico e l'importanza data ai diversi patogeni sono mutati nel tempo, permettendo una considerevole diminuzione della casistica e una forte riduzione del contenuto di cellule somatiche nel latte.

I dati del Nord Italia hanno messo in evidenza una diminuzione dell'isolamento di patogeni contagiosi dal 47,6% nel 2005 al 29,3% nel 2011, ed un concomitante aumento sia dei patogeni ambientali (dal 23,6% al 35,7%) che dei patogeni minori (dal 13% al 24,7%). Questi dati supportano l'efficacia di una gestione dell'igiene ambientale e delle fasi di mungitura (Bertocchi et al., 2012).

Le mastiti determinano perdite dirette e indirette per l'allevatore: le perdite dirette sono rappresentate dalla diminuzione quantitativa e qualitativa della produzione lattea, dal costo dei trattamenti farmacologici, dal maggiore coinvolgimento degli operatori e del Medico Veterinario. Le perdite indirette, invece, sono legate al rischio di sviluppo di ulteriori patologie e aumento del tasso di animali riformati precocemente (Down et al., 2013).

In tutto il mondo, si è cercato di stimare le perdite economiche indotte dallo sviluppo di mastiti cliniche con un risultato che varia dai 61 ai 97 euro per capo/anno in allevamento (*Figura 1*), con grandi differenze in base al tipo di gestione. La maggior parte degli allevatori tende a sottostimare tali perdite in quanto non coscienti nell'immediato di quelle indirette (Aghamohammadi et al., 2018; Hogeveen et al., 2011).

Facendo riferimento allo studio riguardante l'incidenza della mastite clinica nelle stalle Italiane è emerso come le maggiori perdite produttive si verificano in animali pluripari. Queste sono state quantificate intorno ai 1200 kg di latte per capo nell'intera lattazione (Bronzo et al., 2010).

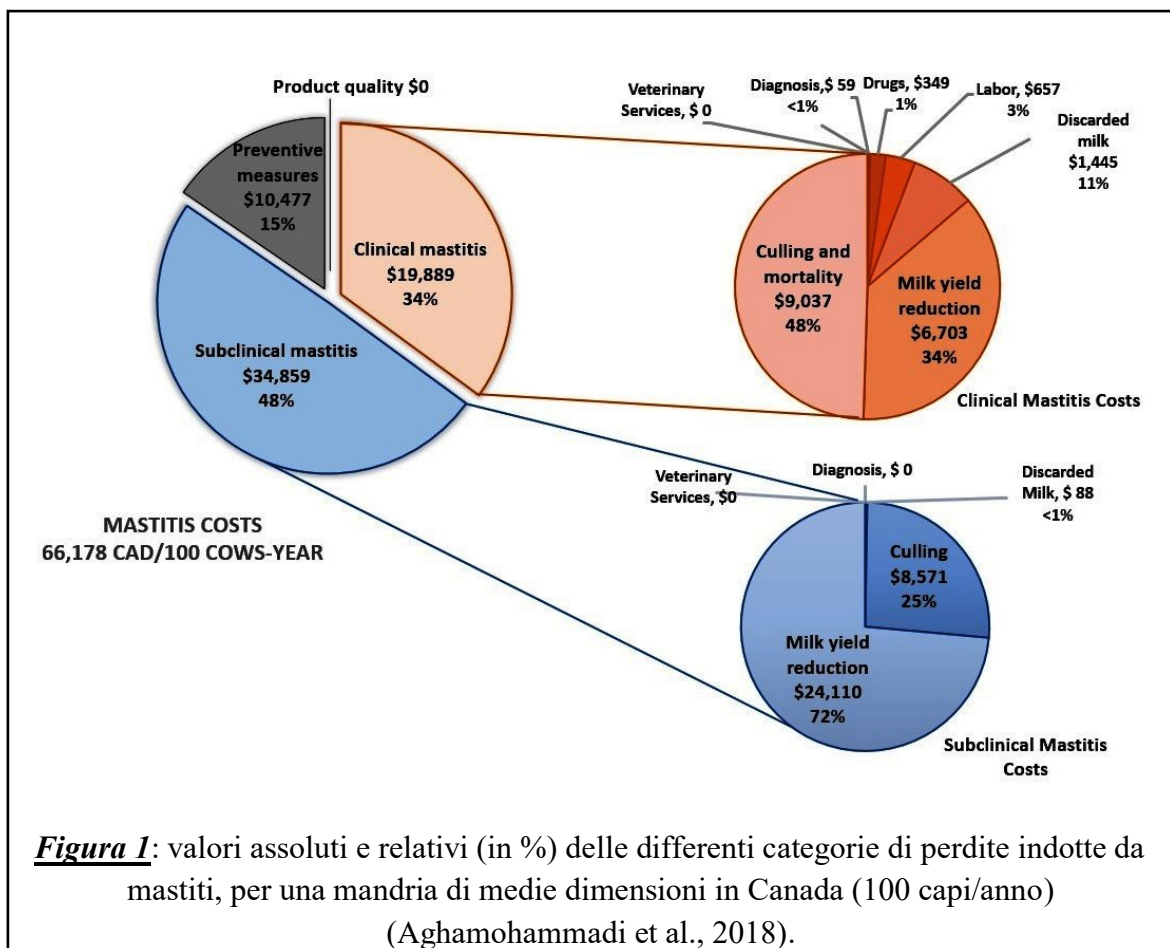
Oltre alla perdita di tipo quantitativo, la condizione infiammatoria induce una diminuzione della resa casearia a causa delle variazioni dei macro-componenti del latte quali lattosio, caseina, grasso e minerali che ne riducono l'attitudine alle produzioni lattiero-casearie (Daprà et al., 2006).

Per quanto riguarda l'utilizzo del farmaco, è importante fare riferimento al fenomeno dell'antibiotico-resistenza che si sta sviluppando nella filiera del latte. I dati riportano che circa l'80% degli antibiotici utilizzati nelle bovine da latte, viene somministrato contestualmente a episodi di mastite (Touza-Otero et al., 2023).

Il fallimento dell'efficacia degli antibiotici nel trattamento delle mastiti si verifica a causa dell'uso indiscriminato di diverse molecole senza averne testato la sensibilità attraverso l'antibiogramma. Questa pratica contribuisce all'aumento delle perdite dirette a causa del prolungamento della terapia per un periodo di tempo maggiore (Aidara-Kane et al., 2018).

Il monitoraggio e l'uso prudente sono raccomandati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità Animale (OIE) ([www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance](http://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance)).

Secondo diversi studi, il susseguirsi dell'uso non corretto del farmaco può tradursi in fenomeni di resistenza interni alla mandria che possono diffondere attraverso il suolo, il cibo, l'acqua nel momento in cui i terreni agricoli vengono concimati con il letame; questo potrebbe tradursi in una maggiore distribuzione dei geni di resistenza anche ai patogeni di interesse umano, determinando un potenziale rischio per la salute umana e aumentando i costi indiretti (Heuer et al., 2011; Wichmann et al., 2014).



### **4.1.1. Anatomia della ghiandola mammaria**

In tutti i mammiferi, la produzione di latte presuppone lo sviluppo corretto della ghiandola mammaria. Nella bovina, la mammella si estende dalla parte ventro-caudale dell'addome alla regione inguinale, ventralmente al pavimento pelvico, e si compone di quattro ghiandole mammarie definite quarti, di cui due anteriori e due posteriori. A sua volta i quarti vengono divisi secondo il piano sagittale dal solco intermammario, definendo quindi una metà destra e una sinistra (Gorewit, 1988).

Esternamente risulta visibile anche la struttura del capezzolo: di forma conica-cilindrica e consistenza elastica permette la fuoriuscita del secreto latteo. Solitamente, un singolo capezzolo drena un'unica ghiandola mammaria, ma sono documentati casi di capezzoli soprannumerari (Hamadani et al., 2023; Sinha et al., 2022). La stabilità di tale complesso mammario è garantita dall'apparato sospenditore che si compone di lamine laterali (con direzione principalmente cranio-ventrale) e lamine mediali responsabili della divisione paramediana dei quarti; quest'ultime sono costituite da tessuto elastico che ne determina una discreta possibilità di stiramento rispetto alle laterali (Jalakas et al., 2000).

Le due componenti principali che definiscono la conformazione interna di un quarto sono il parenchima ghiandolare e lo stroma connettivale. L'alveolo rappresenta l'unità funzionale del tessuto secernente, ricoperto internamente dalle cellule epiteliali ghiandolari con funzione di sintesi delle componenti del latte che, una volta secrete, vengono drenate in piccoli dotti escretori. Il flusso del secreto attraverso i dotti è infatti favorito dall'attività contrattile delle cellule mioepiteliali che circondano con i loro prolungamenti le componenti dell'adenomero (Nichols, 2022; Zeconi et al., 2024).

Gruppi di alveoli convergono tra di essi separati da tessuto connettivo fibroso, formando i cosiddetti lobuli, drenati dai rispettivi dotti intralobulari. A sua volta, l'insieme di più lobuli dà origine a un lobo da cui emerge il relativo dotto intralobare. Quest'ultimi dotti drenano a livello delle strutture ventrali della mammella e capezzolo (Jaswal et al., 2022).

Il capezzolo, internamente, presenta la cisterna del latte (composta da seno ghiandolare e seno del capezzolo), l'anello venoso sottomucoso (definito anche di Fùstenberg), la rosetta di Fùstenberg e, all'estremità, il dotto e l'ostio papillare (*Figura 2a e 2b*) (Fasulkov et al., 2018).

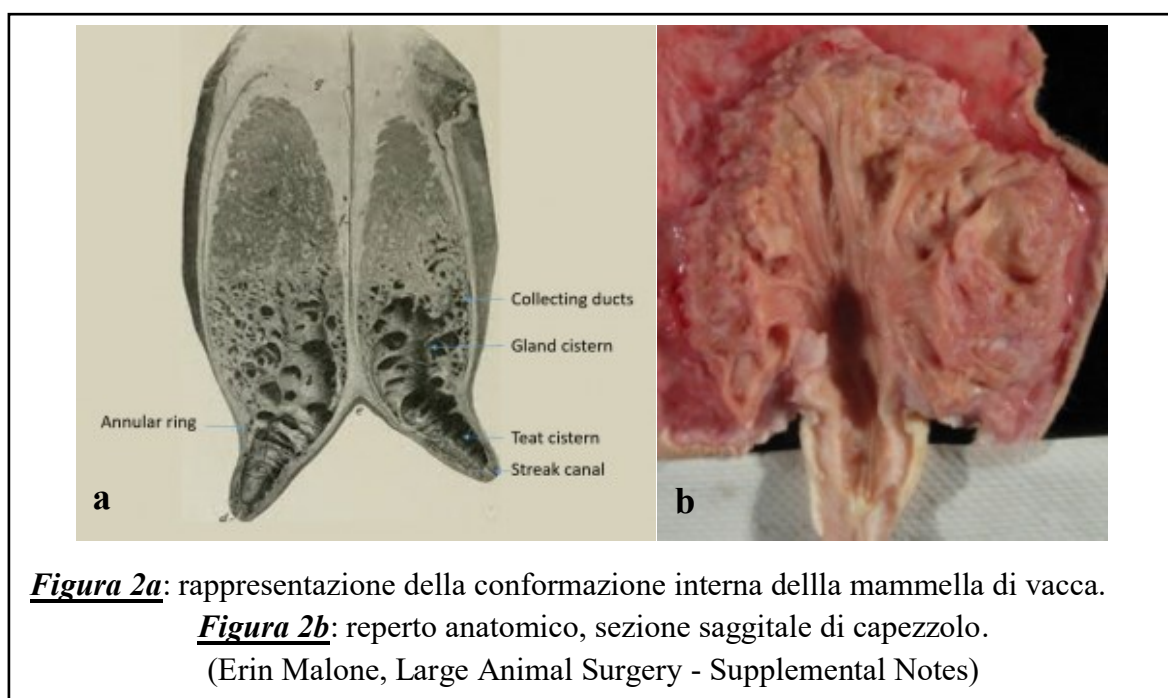
I diversi dotti lattiferi intralobari vengono drenati primariamente a livello di seno ghiandolare posto alla base del capezzolo e secondariamente dal successivo seno del capezzolo, che a sua volta si continua nel dotto papillare comunicante con l'esterno. La cisterna del latte possiede un volume di accumulo di alcune centinaia di millilitri e la

divisione nei due seni sopra descritta è possibile grazie alla presenza di una piega mucosa, la cui sporgenza è determinata dall'influenza dell'anello venoso sottocutaneo definito anche di Fürstenberg (Dyce et al., 2013; Saleh, 2018).

Nel punto di passaggio tra la cisterna del latte e il dotto papillare (detto anche canale del capezzolo), si trova la cosiddetta "Rosetta di Fürstenberg", costituita da numerose piccole pieghe che ricordano la forma dei petali di un fiore, che si chiudono su sé stesse quando la pressione dovuta al riempimento della cisterna aumenta. Essa rappresenta una delle barriere, assieme agli strati circolari di muscolatura liscia del capezzolo, che garantiscono la chiusura del canale del capezzolo e impediscono la risalita batterica (Avdić, 2007; Pandey et al., 2018).

La porzione terminale è infine costituita dal canale del capezzolo e rispettivo ostio papillare (definito più semplicemente papilla). Il canale è circondato da strati muscolari lisci concentrici multipli (definiti muscolo sfintere del capezzolo) e internamente presenta lo strato mucosale che subisce un progressivo passaggio da un epitelio bistratificato, all'epitelio squamoso multistratificato della papilla, quest'ultimo risultante in continuità con la cute che ricopre la superficie esterna del capezzolo (Rainard et al., 2022).

La produzione lattea è garantita da un complesso sistema vascolare che vede come vasi principali arteria e vena mammaria craniale e caudale con le loro rispettive diramazioni, e dal sistema linfatico che riferisce ai linfonodi mammari posti nella porzione caudale della base della mammella (Damian et al., 2015).



### 4.1.2. Patogenesi

Fisiologicamente la ghiandola mammaria possiede due principali meccanismi di difesa contro gli agenti patogeni: l'immunità innata e l'immunità specifica. L'immunità innata (definita anche non-specifica) fornisce la prima linea di difesa dell'ospite; nel contesto della mammella, è rappresentata dalle barriere fisiche proprie del capezzolo, dai neutrofilo, macrofagi, cellule *natural killer* (NK) e molecole solubili (quali ad esempio le citochine, il complemento, anticorpi). Tale genere di risposta si attiva nell'arco di poche ore dall'infezione, possedendo, tuttavia una specificità limitata (Sordillo and Streicher, 2002).

Per quanto riguarda le barriere fisiche, l'integrità della porzione terminale del capezzolo assume significativa importanza nello sviluppo e nella prevenzione della mastite. Seguendo il percorso di risalita dei patogeni, il primo impedimento è il muscolo sfintere del capezzolo, seguito dall'epitelio cheratinizzato del dotto papillare stesso che tramite la propria desquamazione costituisce una sostanza batteriostatica, nonché la rosetta di Fürstenberg (Emre and Alaçam, 2015; Seykora and McDaniel, 1985).

Dal punto di vista cellulare, i neutrofilo polimorfonucleati sono i primi elementi immunitari reclutati nel sito di infezione, in quanto normalmente presenti a livello mammario e dotati di una rapida diapedesi attraverso l'endotelio in caso di necessità. Il loro meccanismo primario di azione è la fagocitosi di agenti estranei, ma presentano anche molecole di adesione per le immunoglobuline per l'attivazione della cascata del complemento (Burvenich, 2010).

I macrofagi, pur possedendo maggiori difficoltà nella migrazione attraverso i vasi rispetto ai neutrofilo, sono le cellule maggiormente presenti nel latte e nella mammella sana, svolgendo l'analoga attività di fagocitosi; inoltre, anche i linfociti NK rientrano nel meccanismo innato in quando la loro attività citotossica aspecifica si sviluppa senza la presenza di molecole target (Alnakip et al., 2014; Paape et al., 2000). Nel momento in cui, l'agente infettivo riesce ad evadere le difese non-specifiche, viene attivata l'immunità adattativa: essa possiede una maggiore specificità nel riconoscimento del microrganismo oltre che una memoria immunitaria che le permette una risposta più rapida nei confronti di un patogeno precedentemente riconosciuto. Le cellule coinvolte sono linfociti T (*T helper* CD4+ e/o T citotossici CD8+) e *antigen-presenting cells* (APC) (Bonilla and Oettgen, 2010).

Considerando quanto sopra descritto, il prerequisito per lo sviluppo di mastite non risulta essere rappresentato esclusivamente dall'entrata dell'agente patogeno ma anche dal suo successo nella fase di sviluppo e moltiplicazione (Jain, 1979).

L'infiammazione intramammaria si sviluppa con la penetrazione dell'agente a livello della cisterna del capezzolo il quale, moltiplicandosi, risalire progressivamente fino a colonizzare

il parenchima alveolare mammario. La principale via è rappresentata dal dotto papillare, seppur in bibliografia venga riportata come possibile fonte anche il circolo sistemico (Akers and Nickerson, 2011; Forbes, 1969).

In seguito alla penetrazione dell'agente patogeno nel quarto, le prime cellule a intervenire nel processo di difesa sono i neutrofili che migrano dal sangue allo stroma intra-alveolare. Le cellule epiteliali secernenti subiscono un danno meccanico e chimico a causa della diapedesi leucocitaria, che determina un distacco dalla membrana basale con conseguente morte cellulare (Aitken et al., 2011). Tuttavia, nonostante i quarti dello stesso lato non siano separati anatomicamente da setti, il complesso sistema di dotti alveolari di un quarto è funzionalmente indipendente, permettendo solitamente l'isolamento dell'infezione a un solo quarto (Budras et al., 2011).

Nel caso in cui le difese dell'ospite non risultassero sufficienti a bloccare la propagazione dell'agente, viene ad instaurarsi il processo mastitico. Diversi patogeni, infatti, sono dotati di meccanismi specifici che gli permettono di eludere i sistemi di difesa. Alcuni di questi sono rappresentati dalla produzione di fattori antifagocitari, esotossine, superantigeni batterici, proteasi (nel caso ad esempio di *Staphylococcus aureus*), oppure da un'adesione più tenace all'epitelio mammario grazie a molecole proteiche definite adesine piuttosto che l'abilità a resistere all'azione del complemento sierico (nel caso particolare di *Escherichia coli*) (DeGo et al., 2002; Fernandes et al., 2011).

Essendo, infatti, un'infezione determinata prevalentemente da batteri non motili, risulta necessario identificare il meccanismo attraverso cui essi vengono spinti all'interno della cisterna. La pervietà del canale del capezzolo è considerata uno dei fattori principali: la causa può essere ricercata o dal punto di vista anatomico (perdita di tono muscolare dello sfintere del capezzolo o una qualsiasi lesione dell'orifizio papillare) o dal punto di vista gestionale della mungitura (pressioni errate dei gruppi di mungitura che creano turbolenze non volute o errata somministrazione della razione che determina un precoce coricamento in cuccetta dell'animale con il canale del capezzolo ancora fisiologicamente aperto) (Bhutto et al., 2010; Spencer, 1989).

Le bovine da latte, inoltre, sono condizionate da una serie di fattori genetici e fisiologici intrinseci, talvolta predisponenti allo sviluppo di mastite. La spinta genetica mirata a massimizzare la produzione latte favorisce infatti una condizione di stress metabolico, con conseguente immunosoppressione nel periodo immediatamente successivo al parto dovuto alla richiesta energetica e proteica della lattazione (Turk et al., 2017).

### **4.1.3. Classificazione delle mastiti**

La classificazione della mastite può avvenire secondo due principali aspetti: la forma clinica o l'agente eziologico coinvolto (Cobirka et al., 2020).

#### **Classificazione in base alla forma clinica**

La classificazione in funzione della forma clinica discrimina le mastiti in cliniche (definite talvolta con l'aggettivo "acute), subcliniche o croniche in base alla sintomatologia dell'animale (Ibrahim, 2017). Secondo l'*International Dairy Federation (IDF)* le mastiti cliniche prevedono un'ulteriore divisione in base alla severità dei sintomi in lievi, moderate e gravi (Bulletin of IDF, n. 338-1999).

Le mastiti lievi presentano esclusivamente alterazioni del latte, il quale può presentare coaguli, fiocchi o consistenza acquosa, senza la presenza di gonfiore o calore della mammella, nonché risentimento generale. Esse rappresentano il 50-60% delle infiammazioni di tipo clinico (Schmenger and Krömker, 2020; Werner et al., 2010).

Le mastiti moderate sono definite dalla presenza, oltre che di alterazioni del latte, anche di segni infiammatori della mammella quali arrossamento, gonfiore e dolorabilità alla palpazione. La sintomatologia peggiora significativamente nelle mastiti di grado grave in cui, oltre ai segni già elencati, si aggiunge il risentimento sistemico della bovina: presenza di febbre, diminuzione dell'ingestione e blocco ruminale (Fredebeul-Krein et al., 2022). In termini percentuali i casi moderati rappresentano circa il 30%, mentre i casi gravi il 10-20% della sintomatologia clinica (Ruegg, 2012).

La mastite subclinica risulta di più difficile diagnosi rispetto alle altre forme in quanto i sintomi si limitano ad un aumento della conta delle cellule somatiche (SCC) e diminuzione nella produzione latte, senza ripercussione clinica manifesta (Mostafizur Rahaman Sumon et al., 2020). Si ritiene che l'incidenza delle mastiti subcliniche oscilli tra il 20-80% nelle bovine da latte. Tale variabilità è determinata dalle difficoltà di diagnosi in quanto la SCC e gli indicatori indiretti della qualità del latte rappresentano gli unici fattori che possono far sospettare la presenza di fenomeno infiammatorio in assenza dei sintomi clinici (Bhakat et al., 2018).

La persistenza del fenomeno infiammatorio nella mastite subclinica può essere più o meno prolungata; in funzione di questo, si definisce mastite cronica un caso in cui, per più di 4 settimane, la SCC presentino valori  $> 200.000$  cellule/mL e/o il colturale batteriologico risulti positivo (Gonçalves et al., 2020).



## **Classificazione in base all'agente eziologico**

La classificazione in funzione dell'agente eziologico discrimina i microrganismi in ambientali o contagiosi (Garcia, 2004).

Le mastiti ambientali sono causate da microrganismi che si trovano nell'ambiente di allevamento (lettiera, letame, pavimentazione, superfici) in modo endemico. Tra tali agenti rientrano comunemente: batteri coliformi quali *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, alcune specie di streptococchi tra cui *Streptococcus uberis*, *Bacillus cereus*, *Pasteurella*, funghi e lieviti (Costa et al., 1998).

La loro presenza non può essere eliminata ma soltanto gestita attraverso buone pratiche manageriali, migliorando ad esempio la pulizia degli ambienti e degli animali stessi. Condizioni di allevamento, infatti, in cui si accumulano importanti quantità di feci e urina rappresentano un ottimo terreno per la crescita microbica (Hospido and Sonesson, 2005).

Tra i principali fattori di rischio sono incluse la gestione non corretta delle cuccette e una routine di mungitura errata. Quando l'animale si corica nella lettiera o sul pavimento, la mammella entra in contatto con le deiezioni e/o il substrato e viene contaminata. Pertanto, è necessaria una pulizia adeguata del capezzolo prima della mungitura. L'utilizzo di getti d'acqua troppo forti o l'uso di materiale da asciugatura riutilizzato, nonché un flusso eccessivamente turbolento del gruppo di mungitura sono da evitarsi in quanto possono favorire la diffusione intramammaria delle infezioni (Cheng and Han, 2020). In aggiunta alle buone pratiche di mungitura, un'azione preventiva efficace è la somministrazione dell'alimento nei trenta minuti immediatamente successivi alla mungitura. Questo intervallo di tempo è cruciale poiché il capezzolo non è ancora completamente chiuso e un precoce coricamento dell'animale nella cuccetta è indesiderato (Blowey e Edmondson, 2000).

L'utilizzo di sigillanti del capezzolo è dimostrato essere una tecnica per ridurre l'insorgenza di nuovi casi di infezione da agenti ambientali nel periodo di asciutta. Il sigillante agisce come una barriera fisica per il canale del capezzolo impedendo la risalita dei microrganismi (Parker et al., 2007).

Le mastiti contagiose sono infezioni della mammella causate da agenti infettivi che si trasmettono facilmente da un animale all'altro. Secondo la definizione dell'Istituto Superiore di Sanità, un quadro infettivo contagioso è determinato da agenti patogeni che, in modo diretto o indiretto, vengono trasmessi da un ospite eliminatore a soggetti ricettivi ([www.epicentro.iss.it/infettive](http://www.epicentro.iss.it/infettive)).

Queste infezioni, spesso provocate da patogeni come *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp* e *Corynebacterium bovis* possono diffondersi attraverso l'attrezzatura di mungitura contaminata, le mani dei mungitori o il contatto diretto tra gli animali (Riekerink et al., 2006).

Le principali sedi anatomiche in cui risiedono tali patogeni sono il tratto genitale, intestinale e il ruminale, nonché la ghiandola mammaria. L'agente contagioso responsabile di mastite ha la capacità di trasmettersi da animale infetto ad animale sano, ma necessita di un vettore che è rappresentato comunemente dalla pratica di mungitura (Cobirka et al., 2020).

Il controllo degli agenti contagiosi può essere attuato attraverso corrette procedure di igiene pre e post-mungitura, ma anche con la tempestiva gestione delle positività riscontrate in azienda (Sharif et al., 2009).

Nonostante alcuni di questi batteri siano considerati endemici nei Paesi produttori di latte, risulta essere consigliabile, a livello di singolo allevamento, uno stretto controllo attraverso misure di biosicurezza. Alcune di queste riguardano la valutazione dello stato di salute presente e passato della mammella dei nuovi capi acquistati; nonché il monitoraggio dei contatti che gli animali possono aver avuto con soggetti infetti esterni (es. trasporto e promiscuità in contesti di fiere o competizioni) (Barkema et al., 2009).

Si utilizza, infine, la definizione di “mastite da batteri opportunisti” qualora l’infiammazione sia indotta da agenti come *Streptococcus dysgalactiae* o differenti specie di CNS che riescono a sviluppare in maniera ottimale sia nell’ambiente e sulla cute, sia in una condizione infiammatoria intramammaria, inducendo occasionalmente mastiti cliniche e subcliniche (Piessens et al., 2012).

	Contagious	Environmental
Source of infection	Teats and udder	Contaminated environment
Transfer of infection into the udder	During milking	Between milkings and during the dry period
Clinical mastitis	Most cases are subclinical	A higher proportion are clinical ( <i>Streptococcus uberis</i> can be subclinical)
Control by	Postmilking teat dipping Dry cow therapy Milking hygiene Culling	Environmental hygiene Predipping Dry period teat sealants

**Figura 3:** principali differenze tra organismi contagiosi e ambientali (Blowey and Edmondson, 2010).

## **4.1.4. Principali agenti eziologici**

### **4.1.4.a Streptococcus spp.**

I batteri del genere *Streptococcus* sono batteri Gram positivi, non motili, non sporigeni, dalla forma sferica che si raggruppano in doppiette o catene. La maggior parte sono anaerobi facoltativi, altri anaerobi obbligati (Liu, 1996). Nonostante molti batteri di questo genere non risultino essere patogeni e rientrino come commensali nel microbiota animale, le specie *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis* sono associate allo sviluppo di mastiti nella bovina (Kabelitz et al., 2021).

#### **Streptococcus agalactiae**

La mastite indotta da *Streptococcus agalactiae* è ritenuta fortemente contagiosa e la sua patogenicità si manifesta sotto forma di infiammazione cronica e subclinica, caratterizzata da un elevato numero di cellule somatiche e grosse perdite in termini di calo produttivo (Barsi et al., 2022). Affinché la sua crescita avvenga, è strettamente necessaria la penetrazione e la persistenza a livello dell'epitelio mucosale della ghiandola mammaria; l'aggressività dei diversi ceppi è infatti determinata dalla capacità di adesione all'epitelio mammario (Keefe, 1997). Le principali fonti di infezione sono l'utilizzo di attrezzatura per mungitura contaminata e l'introduzione di capi positivi in allevamento, in quanto l'agente induce forme prevalentemente asintomatiche per la cui corretta identificazione è necessario ricorrere a diagnosi di laboratorio ([www.vet.cornell.edu](http://www.vet.cornell.edu)).

#### **Streptococcus dysgalactiae**

La decisione se *Streptococcus dysgalactiae* rientri tra gli agenti di mastite contagiosi o ambientali è ancora combattuta in quanto le vie di trasmissione di questo agente non sono chiare. Il batterio può trasmettersi principalmente attraverso il contatto con superfici contaminate, durante la mungitura, tramite il contatto diretto tra animali e attraverso ferite o lesioni sui capezzoli. Alcuni studi riportano che organi come le tonsille, la cavità orale e la vagina della bovina possano essere sedi anatomiche del batterio, agendo in questo caso come agente ambientale (Oliver and Pighetti, 2002).

Qualora l'infezione sia presente, risultano serbatoi di infezione le mammelle infette, il letame, ma anche materiale organico, inclusa la lettiera. Le componenti delle macchine di mungitura possono essere anch'esse mezzi di contagio se contaminate. Per questo motivo è necessaria una corretta sanificazione del materiale di asciugatura del capezzolo, dei gruppi di mungitura, delle guaine e del contenitore per il *pre* e *post-dipping*. Anche una non

adeguata gestione dei valori pressori durante la mungitura facilita la risalita del batterio attraverso il canale del capezzolo, con il rischio di indurre una nuova infezione (Petersson-Wolfe and Currin, 2012).

*S. dysgalactiae* risulta essere l'agente predisponente principale nelle cosiddette "mastiti estive", infezioni complesse in cui i batteri (comunemente *Arcanobacterium pyogenes*) sviluppano una grave infezione di tipo clinico o subclinico grazie al sinergismo tra di essi. L'origine di questo fenomeno è di tipo multi-fattoriale e si sviluppa nella ghiandola mammaria di bovine in asciutta, con sintomatologia che non si rende manifesta fino al momento del parto. Il periodo di maggiore incidenza di questa patologia è associato alle scelte gestionali legate al parto, motivo per cui in molti Paesi europei è frequente in estate e inizio autunno, ma può avvenire anche in primavera (Andrews, 2004).

#### **Streptococcus uberis**

*Streptococcus uberis* è considerato un patogeno ambientale che induce infezioni cliniche e subcliniche e che può persistere in forma cronica nella ghiandola mammaria sia nelle bovine in lattazione che in asciutta (Fessia and Odierno, 2021). Reputato un microrganismo ubiquitario, si distribuisce nell'ambiente dalla mucosa orale degli animali attraverso il leccamento dell'ambiente o del pelo degli altri capi, oppure attraverso le feci. Le mastiti indotte da questo batterio sono solitamente di tipo clinico e si sviluppano durante il periodo di asciutta, per protrarsi poi fino alla lattazione successiva (Kromker et al., 2014). Il materiale utilizzato nelle cuccette e la loro gestione rappresentano fattori critici per lo sviluppo di *S. uberis* in quanto è stata riscontrata una correlazione positiva tra la conta batterica dei campioni prelevati in cuccetta e quelli prelevati a livello di cute della mammella (Paduch et al., 2013).

#### **4.1.4.b Staphylococcus aureus**

*Staphylococcus aureus* è un batterio Gram positivo, reputato uno degli agenti di mastite con maggiore contagiosità, persistenza nell'ambiente di allevamento e difficile gestione terapeutica (Barkema et al., 2006). La manifestazione sintomatologica è variabile. Essa si può presentare sotto forma di mastite clinica lieve o moderata con un elevato numero di cellule somatiche e cambiamenti nella mammella (calore, edema, gonfiore e tensione); sotto forma di mastite cronica con la persistenza dell'infezione per tutta la lattazione in corso e frequentemente anche per la successiva con episodi clinici di riacutizzazione (Rainard et al., 2018). Nei casi più gravi può manifestarsi come una mastite gangrenosa acuta grave, la cui

sintomatologia è sovrapponibile a quella di agenti come *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus spp.* Questa presentazione clinica è caratterizzata da aree di gangrena ischemica a livello della base della mammella e attorno al capezzolo, accompagnate da grave compromissione sistemica (profonda depressione, ipertermia, anoressia) (Islam et al., 2000). Il danno vascolare risulta importante così come la necrosi del tessuto mammario che si presenta sotto forma di lesioni focali asciutte e circondate da un alone emorragico e iperemico, esitando in una condizione del parenchima che appare duro, asciutto e con una colorazione rosso-nerastra, definita gangrenosa (Foster, 2017). Il batterio colonizza la mammella, il canale del capezzolo e eventuali aree lesionate grazie a un'importante capacità adesiva; la principale via di trasmissione è quindi rappresentata dalla mungitura, nel caso in cui il latte di una bovina infetta venisse a contatto con la mammella di una bovina sana. In tal senso, è reputata una buona strategia preventiva isolare gli animali positivi e avviarli alla mungitura per ultimi, in modo da non contaminare l'attrezzatura e provvedere successivamente all'adeguata sanificazione (Petersson-Wolfe et al., 2010).

Alcuni ceppi di *S. aureus* sono meticillino-resistenti in quanto produttori di  $\beta$ -lattamasi, rendendo l'infezione molto difficile da trattare e valorizzando la necessità dell'applicazione dei principi di uso prudente dell'antibiotico dopo averne testato la sensibilità attraverso antibiogramma (Zecconi, 2010).

#### **4.1.4.c Stafilococchi coagulasi-negativi (CNS)**

Gli stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) quali ad esempio *Staphylococcus chromogenes*, *S. simulans*, *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* sono considerati batteri opportunisti che colonizzano la cute e il canale del capezzolo diventando occasionalmente agenti di mastite (Carrillo-Casas et al., 2012). Studi riportano una prevalenza di mastiti da CNS variabile tra 5.5-27.1%; tuttavia le stime di prevalenza dei singoli ceppi sono complicate dal fatto che all'interno si inseriscono molte specie differenti (Thorberg et al., 2009). Sono definiti patogeni minori in quanto le mastiti da essi indotte sono prevalentemente cliniche lievi o subcliniche, associate ad un'alta conta delle cellule somatiche (Pyörälä and Taponen, 2009).

#### **4.1.4.d *Escherichia coli* e altri coliformi**

*Escherichia coli* è un batterio Gram negativo, reputato uno dei più frequenti agenti di mastite bovina. Le sindromi cliniche da esso indotte sono molto variabili, da casi di mastite clinica acuta molto grave a mastite clinica lieve, moderata e mastite subclinica (Blum et al., 2014).

Le infezioni di tipo acuto sono solitamente di breve durata (10-30 giorni) e si verificano più frequentemente nelle ultime settimane pre-partum e prime settimane post-partum. La loro prevenzione si basa su buone prassi igieniche in mungitura e pulizia degli ambienti (Goulart and Mellata, 2022).

Le mastiti indotte da *Escherichia coli* e CNS sono dal punto di vista morfologico di tipo suppurativo. Il parenchima risulta disseminato di aree dal colore giallastro ricche di materiale purulento che corrispondono microscopicamente a infiltrato neutrofilico degenerato e abbondante deposito di fibrina (Bianchi et al., 2019). Nel gruppo dei batteri coliformi responsabili di mastite rientrano anche *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. *Klebsiella* può essere riscontrata nella segatura o truciolo se utilizzato come materiale per le cuccette; le infezioni da *Pseudomonas* originano dall'utilizzo di acqua contaminata (Blowey and Edmondson, 2010).

#### **4.1.4.e Mycoplasma spp.**

Le specie *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma calcifornicum* sono considerate agenti contagiosi in grado di colonizzare il tratto urogenitale, le articolazioni, il sistema respiratorio e la mammella, inducendo condizioni di mastite clinica acuta (Fox, 2012).

La maggior parte delle infezioni non presenta né un incremento considerevole delle cellule somatiche e neppure una netta diminuzione della produzione di latte. La sintomatologia clinica può tuttavia presentarsi sotto forma di blanda compromissione sistemica, mammella gonfia ma non dolente, secrezioni mammarie che variano da una consistenza acquosa con materiale granuloso fino a colorazioni brunastre e drastica diminuzione della produzione di latte (Maunsell et al., 2011). L'infezione si propaga nella mandria prevalentemente per via respiratoria tramite l'introduzione di giovani animali *reservoirs*. L'agente è poi in grado di diffondere per via ematogena fino alla mammella. In seguito a raggiungimento e colonizzazione di questo apparato, la trasmissione tra singoli animali può avvenire anche tramite il processo di mungitura (Nicholas and Ayling, 2003).

Esistono altri agenti eziologici appartenenti a categorie tassonomiche differenti responsabili, meno frequentemente, dello sviluppo di mastiti: altri batteri oltre a quelli elencati funghi (*Aspergillus spp.*), lieviti (*Candida spp.*) e alghe (*Prototecha spp.*) (Wellenberg et al., 2002). Tuttavia, secondo alcuni studi, circa il 20-35% dei casi clinici di mastite bovina hanno un'eziologia sconosciuta (Miltenburg et al., 1996).

#### **4.1.5. Prevenzione**

Negli anni '60 il *National Institute for Research into Dairying (NIRD)* sviluppò un sistema per ridurre l'incidenza delle mastiti e la riduzione delle cellule somatiche, basato su 5 principi fondamentali (Hillerton and Booth, 2018):

- Registrazione e trattamento di tutti i casi clinici;
- Disinfezione dei capezzoli pre e post-mungitura;
- Trattamento degli animali al momento della messa in asciutta;
- Riforma degli animali cronicamente affetti da mastite;
- Manutenzione regolare delle apparecchiature di mungitura.

L'implementazione di questo sistema gestionale ha portato a grandi progressi nella riduzione e nel controllo delle mastiti cliniche e subcliniche, in particolare quelle contagiose, in diversi Paesi. Questo sistema presentava tuttavia dei limiti, in quanto non contemplava la componente ambientale e la sua gestione come fattore coinvolto nello sviluppo di mastite.

Di seguito sono riportati alcuni dei fattori gestionali maggiormente associati a stati infiammatori della mammella e le conseguenti principali buone pratiche da mettere in atto in un'ottica di prevenzione.

#### **Igiene ambientale**

La prima fonte di rischio per lo sviluppo di mastite in allevamento è rappresentata da scarse condizioni di igiene; materiale biologico come feci e urina, associato ad ambienti molto umidi rappresentano l'optimum di crescita batterica. Situazioni caratterizzate da elevata densità di animali, incostante rimozione delle deiezioni e utilizzo di materiale non idoneo per le cuccette, sono associati infatti valori di SCC aumentati (Sant'Anna and Paranhos da Costa, 2011).

Il materiale utilizzato per le cuccette favorisce una diversa crescita batterica in base al substrato: è riportato che la carta tritata e la segatura di conifera non favoriscano grandi crescite batteriche e siano caratterizzate da una buona assorbenza; al contrario il legno cippato, la paglia e biomassa rigenerata sono meno desiderabili in quanto favoriscono un'ampia crescita batterica. Indipendente dal materiale utilizzato, la miglior strategia per ridurre lo sviluppo microbico risulta essere il mantenimento di cuccette asciutte e pulite, tramite interventi di rimozione delle deiezioni giornalieri (Zehner et al., 1986).

La pulizia della mammella e delle regioni anatomiche circostanti influenza direttamente il tipo di batteri presenti sulla loro superficie; infatti mammelle e capezzoli particolarmente

contaminati sono considerati fonte di batteri ambientali nel latte (Schreiner and Ruegg, 2003). Per questo motivo, l'introduzione di *score systems* per la stima delle condizioni di pulizia dei singoli animali (basate su zone quali: la base della coda, i fianchi, la porzione ventrale dell'addome e la mammella) può fornire un quadro generale sull'applicazione di un corretto piano manageriale di igiene in stalla (Reneau et al., 2005).

### **Alimentazione**

Una corretta alimentazione fa parte dei fattori che influenzano il potenziale sviluppo di mastite nella bovina da latte. Il corretto bilanciamento dei nutrienti contribuisce, in primo luogo, allo sviluppo di un sistema immunitario competente e resistente ai patogeni; in secondo luogo, la scorretta somministrazione dei nutrienti essenziali influenza lo sviluppo di patologie metaboliche del periparto. Diversi studi riportano, infatti, che condizioni come ipocalcemia, ritenzione di placenta e chetosi risultano correlate a una maggiore suscettibilità allo sviluppo di mastiti a causa dell'impatto sulla risposta immunitaria (Zigo et al., 2021).

La gestione temporale della somministrazione di alimento rappresenta a sua volta un fattore di rischio in quanto associata allo "*standing time*", ovvero il tempo trascorso dall'animale in piedi dopo la mungitura. L'atteggiamento di coricamento della bovina immediatamente successivo all'attività di mungitura è indesiderato, poiché in questo lasso di tempo il canale del capezzolo risulta ancora pervio e suscettibile all'entrata di agenti patogeni. L'obiettivo da ricercare risulta essere, secondo i dati bibliografici, una somministrazione di alimento tra i 30 minuti prima e i 60 minuti dopo la mungitura per favorire l'interesse della bovina e aumentare lo *standing time* (DeVries et al., 2010).

### **Gestione della mungitura**

La macchina di mungitura può influenzare l'incidenza di mastite in diversi modi: può fungere essa stessa da mezzo di trasmissione se rimangono residui dopo il passaggio di una bovina infetta; se non correttamente settati, i valori del vuoto possono determinare un gradiente pressorio contrario (favorendo la risalita di batteri attraverso il canale); o infine favorire lo sviluppo di infiammazione se la mammella viene munta troppo o, al contrario, non viene svuotata sufficientemente (Edmondson, 2001).

Buone pratiche di igiene prima e durante la mungitura sono ritenute fondamentali per diminuire la popolazione batterica presente all'estremità del capezzolo prima della mungitura. Una corretta procedura di "*pre-dipping*" consiste nella detersione dei capezzoli con un prodotto specifico e autorizzato per eliminare lo sporco presente. Si utilizzano



comunemente prodotti con meccanismo ossidativo (a base di iodio, diossido di cloro, perossido di idrogeno, ozono) o di tipo enzimatico (clorexidina, acidi organici, alfa idrossiacidi). Questa operazione deve essere necessariamente seguita dall'asciugatura dei capezzoli con del materiale monouso che viene cambiato per ciascun animale; il riutilizzo dei tessuti o delle salviette per l'asciugatura tra diversi capi aumenta il rischio di contaminazione della mammella (Bekuma and Galmessa, 2018).

### **Vaccinazioni**

Una delle tecniche disponibili per aumentare l'immunità delle bovine contro agenti di mastite è la somministrazione di vaccini. Data la variabilità di agenti eziologici, la maggior parte delle ricerche sullo sviluppo di vaccini sono atte alla prevenzione di infezioni da *Escherichia coli*, *Streptococchi* e *Staphylococcus aureus*, (Pyörälä, 2002).

Qualora la situazione epidemiologica di allevamento sia caratterizzata da agenti patogeni per cui non sia registrata una formulazione vaccinale, è possibile ricorrere a vaccini stabulogeni. Il vaccino stabulogeno prevede l'incorporazione di diversi ceppi di agenti propri dell'allevamento, rendendoli molto specifici e versatili ([www.izslt.it/officina-farmaceutica/](http://www.izslt.it/officina-farmaceutica/)).

L'utilizzo della vaccinazione come unico metodo di prevenzione non risulta sufficiente in caso di un'alta incidenza di mastiti. Il protocollo vaccinale espleta, infatti, la sua maggiore efficacia nella riduzione della casistica tramite l'implementazione con procedure di controllo, come il trattamento dei casi clinici e il loro isolamento (Ismail, 2017).

#### **4.1.6. Diagnosi**

La diagnosi di mastite avviene in primis sulla base dell'esame clinico dell'animale: la presenza di alterazioni visibili del latte alla mungitura, segni clinici locali (arrossamento, gonfiore, edema della mammella) e sistemici permettono di diagnosticare una mastite clinica (Constable et al., 2016). I principali metodi diagnostici sono inoltre l'esame batteriologico e PCR (per l'identificazione dell'agente eziologico coinvolto), la conta delle cellule somatiche (SCC), la conducibilità elettrica e pH del latte. A queste si aggiunge l'insieme di diverse tecniche attuabili in allevamento quali il *California Mastitis Test (CMT)*, l'*On Farm Culture (OFC)* e l'ecografia mammaria (Adkins and Middleton, 2018).

##### **4.1.6.a Esame batteriologico e PCR**

L'esame batteriologico e la *Polymerase Chain Reaction (PCR)* rappresentano le tecniche analitiche di elezione per la diagnosi di mastite, in quanto permettono di isolare e identificare il microrganismo responsabile del processo patologico (Bolzoni et al., 2006).

L'esame batteriologico si basa sull'applicazione di tecniche colturali che prevedono l'inoculo di campioni in terreni di coltura e la successiva identificazione biochimico-culturale degli agenti isolati (Godkin and Leslie, 1993).

Secondo i protocolli diagnostici dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, il principale terreno utilizzato è l'agar sangue, ma possono essere utilizzati anche altri terreni come il *Mannitol Salt Agar (MSA)* o l'*Agar MacConkey*; successivamente alla semina del campione, le piastre vengono incubate successivamente in aerobiosi a 37°C per 24-48 ore. Al termine del periodo di incubazione, viene esaminata dall'operatore la crescita batterica e, se ritenuto necessario, si procede all'isolamento in coltura pura che verrà poi osservata al microscopio ottico per l'identificazione dell'agente ([www.izs-sardegna.it](http://www.izs-sardegna.it)).

La tecnica di campionamento del latte assume grande importanza per evitare fonti di contaminazione ambientale che potrebbero inficiarne il risultato: il prelievo deve essere effettuato in condizioni asettiche dopo l'accurata pulizia del capezzolo e con l'utilizzo di materiale sterile (Hiitiö et al., 2016). Si ritiene che in circa il 30% dei campioni di latte di bovine con mastite clinica o subclinica analizzati mediante metodo colturale, la crescita batterica non avvenga dopo 48 ore. Le possibili ragioni per cui la crescita non avviene possono essere svariate: una bassa concentrazione di batteri nel campione, agenti che non crescono in un terreno di coltura standard, piuttosto che la presenza nel latte di sostanze che inibiscono la crescita batterica (ad esempio trattamenti antibiotici somministrati prima del campionamento, di cui il laboratorio non viene informato) (Taponen et al., 2009).

Per i motivi sopra elencati, l'introduzione di metodi molecolari come la PCR sono stati proposti come una rapida e sensibile alternativa all'esame colturale. Tale procedura si basa sull'amplificazione di frammenti di acidi nucleici presenti nel latte, dei quali si conoscono le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. Questa metodica permette un'accurata identificazione degli agenti responsabili di mastite che non crescono facilmente su un terreno di coltura, in un arco di tempo inferiore alle 6 ore (Keane et al., 2013). L'utilizzo della PCR rappresenta un ottimo metodo di monitoraggio a livello di latte di massa rispetto alle analisi individuali, in quanto può essere utilizzata come alternativa rapida e meno impattante dal punto di vista economico (Soltau et al., 2017).

#### **4.1.6.b Conta delle cellule Somatiche (SCC)**

Le cellule somatiche rappresentano il numero totale di cellule immunitarie presenti nel latte, prevalentemente linfociti, polimorfonucleati e macrofagi. La correlazione positiva tra aumento delle cellule somatiche del latte e la presenza di una condizione infiammatoria della mammella è ben conosciuta, e ha portato all'introduzione di questo parametro nel monitoraggio routinario della qualità del latte (Leitner et al., 2016).

Le diverse popolazioni di leucociti si modificano in base al processo in atto: i macrofagi e i linfociti sono maggiormente presenti nel latte di una mammella sana, mentre durante un fenomeno flogistico prevalgono i polimorfonucleati (PMN) (Moroni et al., 2020). La conta delle cellule può essere determinata tramite l'utilizzo di contatori di cellule siano essi portatili per l'uso in campo, piuttosto che in un contesto laboratoristico (Duarte et al., 2015). La metodica diretta di conta cellulare permette di analizzare il valore sul latte prodotto dal singolo animale (*Individual Somatic Cells Count- ISCC*) piuttosto che il valore sul latte di massa (*Bulk Tank Somatic Cells Count - BTSCC*). Nonostante la determinazione della ISCC abbia maggiore rilevanza nel monitoraggio e nella diagnosi di mastite sul singolo animale, la BTSCC è meno costosa, più conveniente e più rapida rispetto allo screening di campioni di singoli. In modo particolare, la BTSCC fornisce maggiori informazioni sullo stato sanitario corrente dell'intera mandria e permette di individuare potenziali criticità se valutata nel contesto delle pratiche manageriali di allevamento (Shen et al., 2017).

Per quanto riguarda l'Unione Europea nel latte individuale il limite consigliato è di 200.000 cellule/ml, mentre per il latte di massa quando la SCC, calcolata come media geometrica di almeno un campione al mese per tre mesi successivi, è superiore a 400.000 cellule/ml il latte è considerato non idoneo al consumo umano (Regolamento (CE) 853-854/2004).

#### **4.1.6.c Conducibilità elettrica del latte**

La conducibilità elettrica (EC) del latte può essere considerata come un indicatore della presenza di mastite. Gli ioni presenti nel latte sono in grado di condurre elettricità, per cui, cambiamenti nella composizione ionica del liquido, determinano variazioni nei valori di conducibilità (Hamann and Zacconi, 1998). Quando la mammella si trova in uno stato infiammatorio, la concentrazione di lattosio e ioni K<sup>+</sup> diminuisce mentre la concentrazione degli ioni Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> aumenta a causa del danno ai sistemi di pompe ioniche, portando a un aumento dei valori di EC. (Norberg et al., 2004).

Il valore tipico della EC in una bovina sana si aggira tra i 4.0 e i 5.5 Ms/cm a 25°C, espresso nell'unità di misura della conduttanza elettrica del Sistema Internazionale, i milliSiemens (mS) (Nielen et al., 1992).

Le condizioni di mastite non sono le uniche situazioni in cui si può apprezzare un'alterazione nei valori di EC: variazioni fisiologiche quali temperatura del campione, stadio di lattazione, percentuale di grasso e razza rappresentano fattori di variabilità anche in bovine non affette da mastite (Ruegg and Reinemann, 2002). Al giorno d'oggi, la maggior parte delle macchine di mungitura possiede specifici sensori per la misurazione della EC e della temperatura del latte (Romero et al., 2012).

#### **4.1.6.d California Mastitis Test (CMT)**

Il *California Mastitis Test (CMT)* rappresenta il più comune metodo indiretto di misurazione delle cellule somatiche del latte (Persson and Olofsson, 2011).

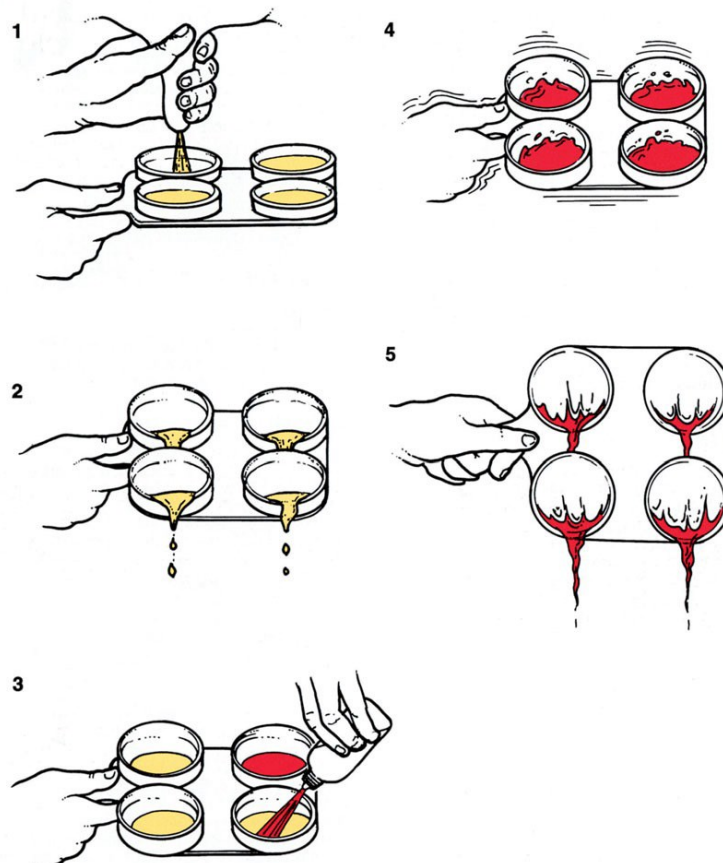
L'esecuzione prevede di versare 2-3 ml di latte in un'apposita paletta costituita da 4 pozzetti (uno per ciascun quarto della mammella), di aggiungere in parti uguali lo specifico reagente (alchil-laurilsolfato 3%, sodio idrato 1.5% ed eventuale indicatore di pH) e di mescolare il tutto con movimenti circolari (*Figura 4*) (Blowey and Edmondson, 2010). Il reagente provoca la lisi delle cellule leucocitarie, rilascio dell'acido nucleico con la formazione di una matrice dalla consistenza gelatinosa. Il grado di viscosità ottenuto può variare da liquido a gelatinoso: quando il numero di cellule è elevato, il materiale nucleare coagula maggiormente formando un materiale simil-mucoso. Quando il rilevatore di pH è presente, si può assistere ad una variazione di colore più o meno intensa in rapporto alla SCC (Barnumt and Newbouldt, 1961). I risultati vengono classificati come (Islam, 2011):

- negativi (0) se non si osserva nessun cambiamento nella consistenza;
- dubbi (1+) se si evidenzia la formazione di coaguli lievi che si sciolgono in breve tempo;

- debolmente positivi (2+) se sono presenti diversi coaguli, che con rapidi movimenti si spostano verso il centro del pozzetto;
- chiaramente o fortemente positivi (3+/4+) se la massa assume una consistenza gelatinosa più o meno compatta, che non si muove nel pozzetto.

Un punteggio maggiore o uguale a 1 corrisponde a un contenuto di cellule somatiche  $>$  o uguale a 500.000 cellule/ml ed è da considerarsi indicativo di mastite subclinica (Kivaria et al., 2007).

Sensibilità e specificità del CMT nel diagnosticare infiammazioni intramammarie sono stimate rispettivamente intorno al 86,07% e 59,7%, nonostante l'interpretazione della viscosità del campione ottenuto abbia una certa variabilità operatore-dipendente (Sharma et al., 2010). I principali vantaggi di questa metodica sono la rapidità e la semplicità di svolgimento, nonché la convenienza in termini economici (Duarte et al., 2015).



**Figura 4:** metodo di svolgimento del *California Mastitis Test (CMT)* (Blowey and Edmondson, 2010).

- 1: dopo aver scartato i primi getti di latte, 2-3 ml di latte vengono posti in ciascun pozzetto.
- 2: l'eccesso di latte viene eliminato.
- 3: un'eguale quantità di reagente viene addizionato a ciascun pozzetto.
- 4: latte e reagente vengono mescolati con movimenti rotatori della paletta.
- 5: la soluzione viene esaminata per evidenziare la presenza di una reazione gelificante; la presenza di lacinie gelatinose è indicazione di un'alta conta di cellule in quel determinato quarto.

California mastitis test scores	Reaction observed	Equivalent milk somatic cell counts per milliliter
Negative	Homogenous mixture, no thickening	0–200,000; 0–25% neutrophils <sup>4</sup>
Trace	Slight (a faint cloud like) thickening that disappears in about 10 s	150,000–500,000; 30–40% neutrophils
1	Distinct slime formation occurs immediately after mixing, but no tendency to form a gel. This slime may dissipate over time	400,000–1,500,000; 40–60% neutrophils
2	Distinct slime formation occurs immediately after mixing, with a slight gel formation	800,000–5,000,000; 60–70% neutrophils
3	Distinct slime formation occurs immediately after mixing, distinct gel is formed and the surface of the mixture becomes elevate like a fried egg	>5,000,000; 70–80% neutrophils

**Figura 5:** punteggi del CMT e equivalente valore di cellule somatiche (Hillterton and Semmens, 1999).

#### 4.1.6.e On Farm Culture (OFC)

L'esame batteriologico di laboratorio non viene utilizzato di routine dalla maggior parte degli allevamenti a causa delle lunghe tempistiche tra il conferimento del campione di latte e il ricevimento del referto. Per tale motivo, molte realtà hanno adottato sistemi di On-Farm Culture per l'identificazione giornaliera degli agenti coinvolti negli episodi di mastite clinica al fine di delineare una strategia di trattamento tempestiva (Lago et al., 2011).

Il protocollo si basa sull'incubazione di piastre di coltura che possono contenere un solo terreno oppure essere bi o tri-parti con differenti terreni di coltura. Dopo aver raccolto un campione nelle migliori condizioni di sterilità possibile, il latte viene stemperato con un tampone in ciascuno dei quadranti della piastra e mantenuto in incubatoio a 37°C per 24 ore (Canny and Jones, 2022).

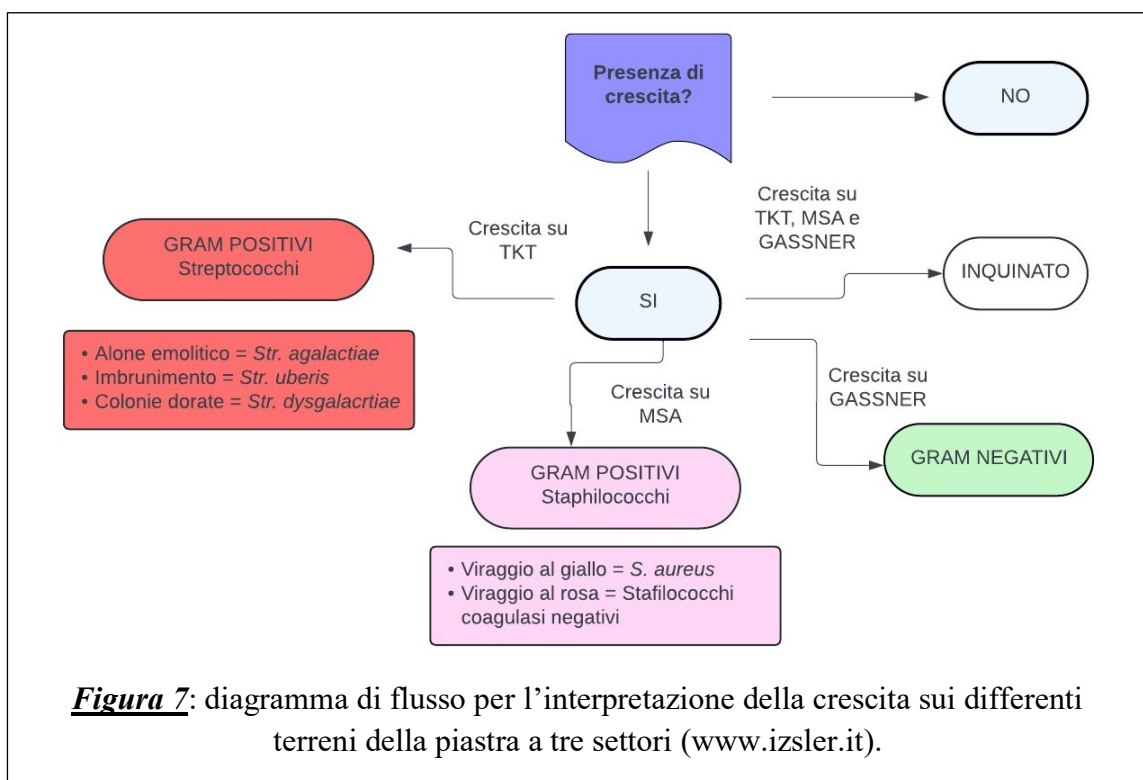
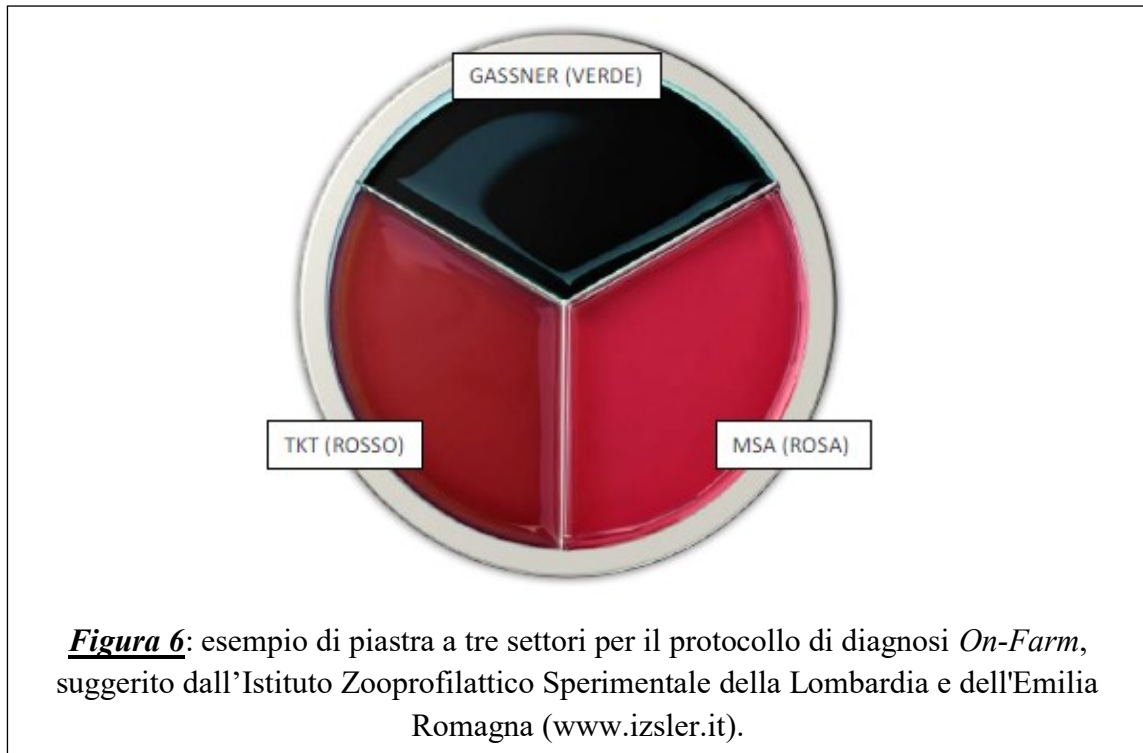
L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna prevede l'utilizzo di piastre a tre settori, in cui si trovano i seguenti terreni (*Figura 6*) ([www.izsler.it](http://www.izsler.it)):

1. *Mannitol Salt Agar (MSA)*: terreno selettivo e differenziale per stafilococchi;
2. *Gassner*: terreno selettivo e differenziale per enterobatteri;
3. *Tallium Kristalviolette Tossin (TKT)*: terreno selettivo e differenziale per streptococchi.

Secondo tale protocollo, l'identificazione degli agenti batterici si basa sulla presenza di cromogeni incorporati nel terreno di coltura: nel momento in cui si sviluppa la crescita batterica, gli enzimi degli agenti specifici si legano al substrato producendo pigmenti che rendono facilmente identificabile la colonia in base al cambiamento di colore. Questa

tecnologia permette il riconoscimento della famiglia batterica senza la necessità di formare il personale dal punto di vista microbiologico (Ganda et al., 2016).

L'OFC è reputata una tecnica utile nella prevenzione delle mastiti grazie alla tempestività di intervento e grazie al trattamento mirato sin dal momento della diagnosi, diminuendo l'uso non necessario di antibiotici (Neeser et al., 2006).



### **4.1.7. Terapia**

In passato, la principale strategia per il trattamento delle mastiti risultava essere la terapia antibiotica. Il suo utilizzo rimane però tutt'ora una sfida a causa dell'emergenza di sempre più frequenti episodi di antibiotico-resistenza, della riduzione dell'efficacia e dell'aumento dei costi di alcune molecole (Gomes and Henriques, 2015).

In tal senso, nel caso di mastiti lievi e moderate non sempre si ricorre necessariamente all'uso dell'antibiotico, preferendo una terapia di supporto con anti-infiammatori non steroidei e somministrazione di liquidi (Wagner and Apley, 2004; Zigo et al., 2021).

### **Antibiogramma e MIC**

Nel momento in cui si procede con l'isolamento batterico tramite l'esame colturale, è possibile associare l'esecuzione dell'antibiogramma. Tale tecnica permette di valutare in vitro la suscettibilità dell'organismo isolato nel paziente nei confronti di diversi antimicrobici. Le tecniche più comunemente utilizzate sono: il test di Bauer, la microdiluizione in brodo (*broth micro-dilution BMD*) e il metodo per diffusione (*E-test*) (Tascini et al., 2016).

Il metodo di Bauer si basa sul principio che un dischetto di carta imbevuto di antibiotico e poi seccato, depositato su un terreno in cui è stato seminato un ceppo batterico, a contatto con la superficie umida dell'agar, assorbe l'acqua e rilascia l'antibiotico che diffonde nel terreno circostante. L'inibizione alla zona di crescita rappresenta la MIC; dalla misura del diametro dell'alone di inibizione si risale alla MIC attraverso una curva di regressione (Poli et al. 2017).

La BMD prevede l'inoculo del batterio in un terreno che contiene diluizioni seriali dell'antimicrobico in questione e permette di ottenere la minima concentrazione inibente (MIC) ovvero la minima concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita in vitro del microrganismo dopo 18-24 ore di incubazione. Il metodo di Bauer non fornisce un valore di MIC ma sono il diametro degli aloni di inibizione che contengono il dischetto di antibiotico che si sta testando che vengono confrontati con una griglia interpretativa (Tascini et al., 2016).

L'*E-test* consiste in una combinazione dei saggi di diffusione e di diluizione. Esso consiste di una sottile striscia di plastica inerte e non porosa; su una faccia della striscia è riportata una scala di lettura graduata espressa in  $\mu\text{g/ml}$ , sull'altra è immobilizzato l'antibiotico essiccato e stabilizzato. La concentrazione di antibiotico è in gradiente esponenziale predefinito, con il valore massimo all'estremità superiore e il valore minimo a quella



inferiore. Quando la striscia E-test viene applicata sulla superficie inoculata della piastra, il rilascio di antibiotico dal supporto di plastica alla matrice agarizzata è immediato. Dopo l'incubazione, quando la crescita batterica si rende visibile, si può osservare un alone di inibizione ellittico, centrato lungo la striscia di plastica. Il valore di MIC viene letto nel punto di intersezione tra il bordo dell'ellisse di inibizione e la striscia E-test (Tascini et al., 2016). Nel caso di agenti di mastite contagiosa, i risultati dell'antibiogramma sono generalmente utilizzabili sulla mandria, estendendo la sua applicazione a tutti gli animali infetti. In questo caso si ha la possibilità di monitorare nel tempo lo sviluppo di eventuali resistenze in azienda nei confronti di determinate categorie di antibiotici (Bolzoni et al., 2006). Secondo il Regolamento (UE) 2019/6 del Parlamento europeo e del Consiglio, dell'11 dicembre 2018, il processo diagnostico dovrebbe essere svolto da Enti/laboratori accreditati e necessario per giustificare l'utilizzo dell'antibiotico all'interno dell'azienda da parte del Medico Veterinario ([www.salute.gov.it/portale/medicinaliVeterinari/](http://www.salute.gov.it/portale/medicinaliVeterinari/)).

### **Protocollo terapeutico**

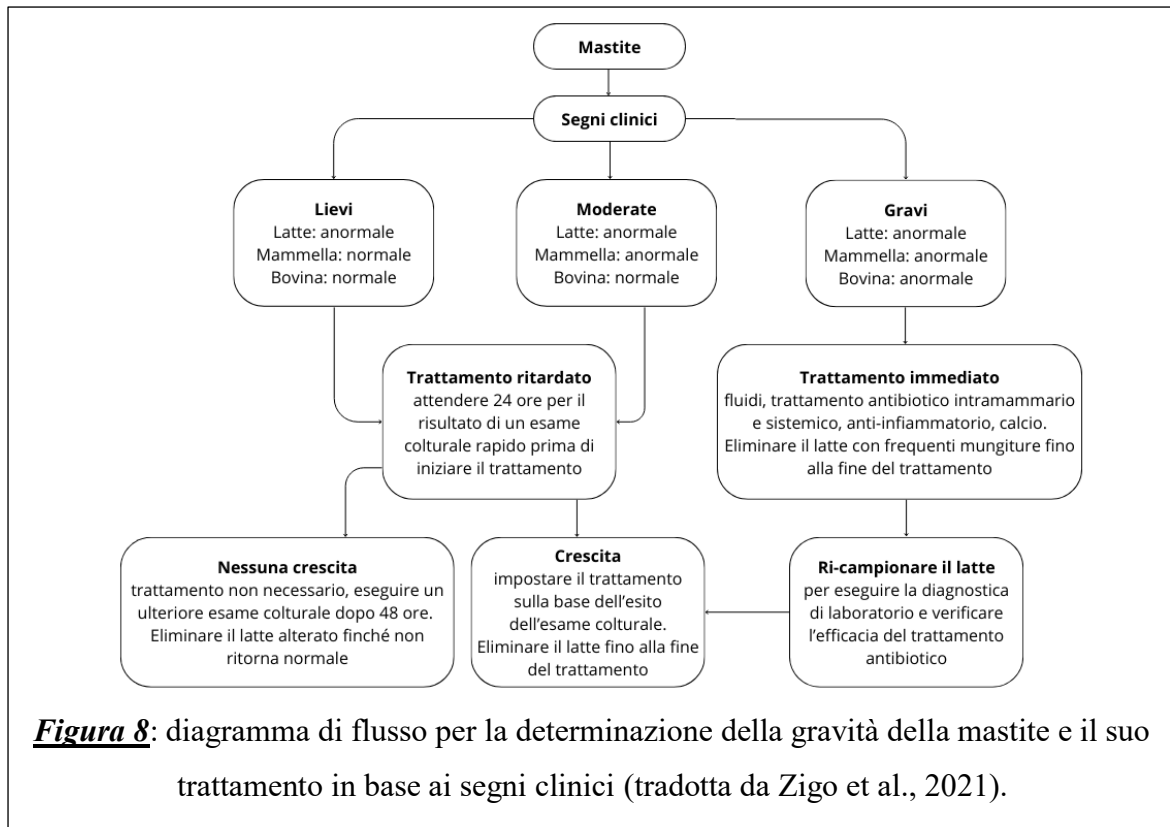
L'approccio terapeutico nei confronti di una bovina in mastite si basa su (Royster and Wagner, 2015):

- Gravità della sintomatologia: clinica (lieve, moderata, grave), subclinica o cronica;
- Agente eziologico responsabile del fenomeno infiammatorio, indicato dall'esame coltura di laboratorio o PCR;
- Antibiogramma e MIC;
- Periodo produttivo della bovina;
- Anamnesi prossima e remota del singolo capo, ma anche dell'allevamento;
- Farmacocinetica e farmacodinamica del farmaco che si intende utilizzare;
- Linee guida per l'uso prudente del farmaco in zootecnia.

La determinazione dello stato clinico dell'animale serve per indirizzare il Medico Veterinario verso il trattamento da intraprendere (*Figura 8*). In tal senso, per i casi lievi e moderati è consigliabile attendere l'esito dell'esame colturale prima di intervenire, suggerendo comunque un costante monitoraggio. Al contrario, nei casi gravi è consigliato un intervento immediato tramite la somministrazione di fluidi, antibiotici per via intramammaria e sistemica, anti-infiammatori e calcio (De Jong et al., 2023).

Nonostante alcuni segni clinici possano far propendere verso una determinata eziologia, non è mai possibile attribuire con assoluta certezza la condizione clinica ad uno specifico agente

eziologico, se non tramite l'opportuno esame colturale. Il tempo necessario per lo svolgimento di un esame colturale è di 24-48 ore, che può allungarsi se a tale diagnostica aggiungiamo anche l'antibiogramma e la determinazione della MIC. Per tale motivo, i segni clinici in condizioni gravi o di urgenza sono necessari per impostare un'ipotesi diagnostica e iniziare immediatamente la terapia. A supporto di tale ipotesi può essere utile indagare la storia clinica del singolo animale e consultare l'anamnesi di allevamento, integrata con le analisi di laboratorio precedenti (Arrigoni et al., 2014).



### Scelta del farmaco e vie di somministrazione

La scelta del farmaco da utilizzare va effettuata considerando, oltre all'esito dell'antibiogramma, anche la farmacocinetica, la farmacodinamica e i tempi di sospensione della molecola stessa. La ghiandola mammaria rappresenta un organo di difficile penetrazione da parte degli antibiotici; motivo per cui le cause che determinano l'insuccesso terapeutico includono una scarsa penetrazione nell'antibiotico nei foci infiammatori, l'inattivazione della molecola da parte delle componenti del latte, la persistenza dei batteri all'interno di macrofagi e altri tipi di cellule e la formazione di batteri privi di parete cellulare (*bacterial L-forms*) che rendono i batteri insensibili all'effetto antibiotico (McDougall et al., 2022; Owens et al., 1988).

Il trattamento antibiotico per la mastite può essere somministrato per via topica (intramammaria) o per via sistemica (parenterale) (Ziv, 1980).

L'efficacia della somministrazione intramammaria permette di raggiungere alte concentrazioni di antibiotico che permangono per un tempo maggiore, pur utilizzando quantità ridotte di farmaco e riducendo contemporaneamente il rischio della presenza di residui nel latte. È suggeribile infatti che il farmaco abbia un basso grado di legame con le proteine tissutali e del latte affinché diffonda correttamente in tutta la mammella (Gruet et al., 2001).

La terapia parenterale è invece suggerita in condizioni di infezioni profonde del parenchima (come nel caso di *S. aureus*) o in caso di infezioni sistemiche/batteriemia con segni di compromissione sistemica (come nel caso di *E. coli*) (Barlow, 2011).

Le mastiti cliniche sono comunemente trattate tramite somministrazione locale intramammaria; qualora la sintomatologia sia grave è prevista la somministrazione di antibiotico anche via parenterale. A differenza delle mastiti cliniche, il trattamento delle mastiti subcliniche non è sempre necessario nell'immediato a causa di un alto tasso di insuccessi terapeutici (Krömker and Leimbach, 2017).

In generale, il trattamento antibiotico dovrebbe essere utilizzato solo nel caso di infezioni che presentano scarsa probabilità di guarigione spontanea e un'elevata probabilità di successo terapeutico. Le linee guida per l'uso prudente del farmaco in zootecnica raccomandano come prima scelta l'utilizzo di una sola molecola a spettro ristretto e l'uso di trattamenti endomammari piuttosto che sistemici. Risulta inoltre fondamentale rispettare le caratteristiche del protocollo terapeutico che vengono riportate nel foglietto illustrativo quali in particolare dosi e durata del trattamento (Arrigoni et al., 2023). In taluni casi, può essere necessario ricorrere all'associazione di più molecole, come ad esempio la somministrazione in contemporanea sia per via endomammaria sia per via sistemica. Secondo l'articolo 29 del Decreto Legislativo 218/2023, infatti, riguardante l'impiego degli antimicrobici "l'associazione di più di un medicinale veterinario contenente sostanze attive antimicrobiche è consentita soltanto in casi opportunamente giustificati e documentati e per la somministrazione a un singolo animale, sulla base di una diagnosi clinica e di laboratorio, che includa la coltura batterica e il test di sensibilità" (Art. 29 D.lgs. 218/2023).

## **Uso prudente dell'antibiotico**

La resistenza agli antibiotici, o antibiotico-resistenza (AMR), è un fenomeno naturale biologico di adattamento di alcuni microrganismi che acquisiscono la capacità di sopravvivere ai trattamenti antimicrobici. Si parla di resistenza intrinseca quando è dovuta alla natura del microrganismo stesso, che non è mai stato sensibile a un particolare antimicrobico ([www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/antimicrobial-resistance](http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/antimicrobial-resistance)). Si parla invece di resistenza acquisita quando il microrganismo, in precedenza sensibile a un particolare antimicrobico, sviluppa in un secondo tempo resistenza nei suoi confronti ([www.salute.gov.it/portale/antibioticoresistenza](http://www.salute.gov.it/portale/antibioticoresistenza)).

La diffusione dell'AMR attraverso i settori umano, animale e ambientale rappresenta un'emergenza nel contesto di un approccio *One Health* in quanto rischia di diminuire l'efficacia degli agenti antimicrobici, soprattutto di quelli di importanza critica per la salute umana. Per migliorare l'uso responsabile e prudente degli antimicrobici è importante implementare un approccio di riduzione dell'utilizzo in tutti i settori coinvolti. Il Regolamento UE 2019/6 sui medicinali veterinari e il Regolamento UE 2019/4 sui mangimi medicati, applicati su tutto il territorio comunitario dal 28 gennaio 2022, limitano infatti fortemente l'utilizzo degli antibiotici per l'uso preventivo e restringono il campo d'azione per l'uso metafilattico, con l'obiettivo di renderne razionale oltre che prudente l'utilizzo e contrastare il fenomeno della resistenza ([www.salute.gov.it/portale/medicinali Veterinari](http://www.salute.gov.it/portale/medicinali_Veterinari)). Attualmente vengono utilizzate a livello europeo due diverse categorizzazioni degli antibiotici in funzione della loro importanza terapeutica e del loro effetto ai fini dell'antibiotico resistenza:

- Categorizzazione della *World Health Organization (WHO)*;
- Categorizzazione dell'*European Medicines Agency (EMA)*.

La categorizzazione stabilita dalla WHO mira a definire una divisione delle classi di antimicrobici autorizzate per il solo uso in umana, per l'utilizzo sia in umana che in zootecnica o per l'uso esclusivo per gli animali (*Figura 9*). Tale classificazione si basa sull'importanza della singola molecola nelle terapie in umana, considerando anche il potenziale rischio di sviluppo di AMR. In tal senso, i farmaci antibatterici possono essere definiti come:

- HPCIA (*Highest Priority Critically Important Antimicrobials*);
- CIA (*Critically Important Antimicrobials*);
- HIA (*Highly Important Antimicrobials*);

- IA (*Important Antimicrobials*);

Alla prima categoria appartengono molecole il cui utilizzo richiede la massima cautela e possono essere utilizzate in produzione zootecnica come ultima risorsa: le cefalosporine di terza e quarta generazione, i chinoloni e le polimixine. L'utilizzo di queste molecole dovrebbe essere sempre giustificato da un test di sensibilità in vitro (antibiogramma). (*WHO List of Medically Important Antimicrobials*, 2024).

La categorizzazione secondo l'EMA prevede la divisione in 4 categorie relativamente all'uso in Medicina Veterinaria con le relative misure di gestione del rischio di sviluppo di AMR (*Figura 10*) ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), *Categorisation of antibiotics in the European Union*):

- *A- avoid (evitare)*: molecole non autorizzate in medicina veterinaria;
- *B- restrict (limitare)*: vi rientrano gli antimicrobici che la WHO considera HPCIA e delle sottoclassi che non sono autorizzate nell'UE. Il loro uso è consentito qualora per una determinata condizione clinica non ci siano antimicrobici efficaci nelle categorie C e D. Il loro uso dovrebbe essere giustificato dal relativo test di sensibilità. Al loro interno rientrano: cefalosporine di terza e quarta generazione, polimixine e chinoloni;
- *C- caution (cautela)*: comprende gli antibiotici per cui esistono alternative in medicina umana. Questi antibiotici dovrebbero essere utilizzati solo quando non ci sono sostanze clinicamente efficaci nella categoria D;
- *D- prudence (prudenza)*: comprende gli antibiotici che dovrebbero essere utilizzati come trattamenti di prima linea, ma pur sempre in un contesto di uso prudente.

La via di somministrazione rappresenta un altro fattore determinante l'AMR. Vista la varietà di combinazioni e formulazioni di classi di antibiotici, la via di somministrazione va presa in considerazione in associazione con le categorizzazioni sopra descritte. L'ordine di preferenza in base all'impatto stimato nella selezione di fenomeni di resistenza è il seguente:

- trattamento individuale locale (ad esempio intramammario, gocce oculari o auricolari);
- trattamento individuale parenterale (endovenoso, intramuscolare, sottocutaneo);
- trattamento individuale orale (tramite compresse o boli);
- medicazione iniettabile, o tramite acqua di abbeverata, o mangimi medicati/pre-miscele di gruppo (metafilassi), solo se appropriatamente giustificata.

Medically important antimicrobials						Not medically important
Authorized for use in humans only		Authorized for both humans and animals				Not authorized in humans
Class	Class	Categorization of categorization of antimicrobials antimicrobials				
		HPCIA	CIA	HIA	IA	
Aminoglycosides (plazomicin)	Lipopeptides	Cephalosporins (3rd, 4th generation)	Aminoglycosides	Amphenicols	Aminocyclitols	Aminocoumarins
Aminomethycyclines	Macrolides 18-membered ring (fidaxomicin)	Quinolones	Ansamycins	Cephalosporins (1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> generation) and cephamycins	Cyclic polypeptides	Arsenicals
Anti-pseudomonal penicillins (carboxypenicillin and ureidopenicillin)	Monobactams	Polymyxins	Macrolides (14-, 15-, 16-membered ring)	Lincosamides	Heterocyclic compounds	Bicyclomycons
Anti-pseudomonal penicillins with β-lactamase inhibitors	Oxazolidinones	Phosphonic acid derivatives		Nitroimidazoles	Hydroxyquinoline	Orthosomycins
Carbapenems with or without β-lactamase inhibitors	Riminoenzimes			Tetracyclines		
				Penicillins (aminopenicillins and aminopenicillins)	Pleuromutilins	Phosphoglycolipids
Cephalosporins (3rd-, 4th- and 5th-generation with β-lactamase inhibitors)	Sulfones			Penicillins (aminopenicillins with β-lactamase inhibitors)	Nitrofur derivatives	Ionophores (including polyethers)
Cephalosporins (5th-generation)	Glycopeptides and lipoglycopeptides			Penicillins (anti-staphylococcal)		Quinoxalines
Cephalosporins (Siderophore)	Pseudomonic acids (mupirocin)			Penicillins (narrow spectrum)		Halogenated 8-hydroxyquinol
Fluorocyclines	Phenol derivatives (clofocetol)			Streptogramins		
Glycylcyclines	8-hydroxy-5-nitroquinoline			Sulfonamides, dihydrofolate reductase inhibitors and combinations		
Drugs used solely to treat tuberculosis or other mycobacterial diseases				Fusidanes		

**Figura 9:** Categorizzazione delle classi di antibiotici per uso veterinario secondo la WHO (*WHO, List of Medically Important Antimicrobials, 2024*).

<b>A</b>	<b>Aminopenicilline</b> mecillinam pivmecillinam	<b>Carbapenemi</b> meropenem doripenem	<b>Medicinali usati solo per trattare la tubercolosi o altre malattie causate da micobatteri</b> isoniazide etambutolo pirazinamide etonamide	<b>Glicopeptidi</b> vancomicina	<b>EVITARE</b>
	<b>Ketolidi</b> telitromicina	<b>Lipopeptidi</b> daptomicina		<b>Gliciciline</b> tigeciclina	
	<b>Monobattami</b> aztreonam	<b>Oxazolidinoni</b> linezolid		<b>Derivati dell'acido fosfonico</b> fosfomicina	
	<b>Rifamicine (tranne rifaximina)</b> rifampicina	<b>Riminoenzime</b> clofazimina		<b>Acidi pseudomonici</b> mupirocina	
	<b>Carbossipenicillina e ureidopenicillina, comprese le combinazioni con inibitori delle beta-lattamasi</b> piperacillina-tazobactam	<b>Solfoni</b> dapsona		<b>Altre cefalosporine e penemi (codice ATC J01DI), comprese le combinazioni di cefalosporine di terza generazione con inibitori delle beta-lattamasi</b> ceftobiprola ceftarolina ceftalozano-tazobactam faropenem	
<b>B</b>	<b>Cefalosporine di terza e quarta generazione con l'eccezione di combinazioni con inibitori delle beta-lattamasi</b> cefoperazone cefovecina cefquinome ceftiofur	<b>Polimixine</b> colistina polimixina B	<b>Chinoloni: fluorochinoloni e altri chinoloni</b> cinoxacina danofloxacina difloxacina enrofloxacina flumequina ibafloxacina	<b>LIMITARE</b>	

**Figura 10a:** Categorizzazione delle classi di antibiotici per uso veterinario secondo l'EMA ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

<b>C</b>	<b>Aminoglicosidi (tranne spectinomomicina)</b> amikacina apramicina diidrostreptomomicina framicetina gentamicina kanamicina neomicina paromomicina streptomomicina tobramicina	<b>Aminopenicilline, in associazione con inibitori delle beta-lattamasi</b> amoxicillina + acido clavulanico ampicillina + sulbactam	<b>Amfenicoli</b> cloramfenicolo florfenicolo tiamfenicolo	<b>Macrolidi</b> eritromicina gamitromicina oleandomicina spiramicina tilidipirosina tilmicosina tulatromicina tilosina tilvalosina	<b>ATTENZIONE</b>	
		<b>Cefalosporine di prima e seconda generazione e cefamicine</b> cefacetile cefadroxil cefalexina cefalonio cefalotina cefapirina cefazolina	<b>Lincosamidi</b> clindamicina lincomicina pirimicina	<b>Pleuromutiline</b> tiamulina valnemulina		<b>Rifamicina: solo rifaximina</b> rifaximina
	<b>Aminopenicilline, senza inibitori delle beta-lattamasi</b> amoxicillina ampicillina metampicillina	<b>Aminoglicosidi: solo spectinomomicina</b> spectinomomicina	<b>Sulfonamidi, inibitori della diidrofolato reductasi e combinazioni</b> formosulfatazolo ftalilsulfatazolo sulfacetamide sulfaclopiridazina sulfaclozina sulfadiazina sulfadimetoxina sulfadimidina sulfadoxina sulfafurazolo sulfaguanidina sulfalene sulfamerazina sulfametizolo sulfametoxazolo sulfametoxipiridazina sulfamonometoxina sulfanilamide sulfapiridina sulfachinosalina sulfiazolo trimetoprim			<b>PRUDENZA</b>
	<b>Tetraciclina</b> clortetraciclina doxiciclina oxitetraciclina tetraciclina	<b>Penicilline anti-stafilococche (penicilline beta-lattamasi resistenti)</b> cloxacillina dicloxacillina nafcillina oxacillina	<b>Polipeptidi ciclici</b> bacitracina	<b>Nitroimidazoli</b> metronidazolo		
<b>Penicilline naturali, a spettro ristretto (penicilline sensibili alle beta-lattamasi)</b> benzilpenicillina benzatinica fenossimetilpenicillina benzatinica benzilpenicillina penetamato iodidrato feneticillina fenossimetilpenicillina benzilpenicillina procaina		<b>Antibatterici steroidei</b> acido fusidico	<b>Derivati nitrofuranici</b> furaldone furazolidone			

**Figura 10b:** Categorizzazione delle classi di antibiotici per uso veterinario secondo l'EMA ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

### Terapia di supporto

Talvolta, in condizioni di mastite clinica grave associata a condizioni di tossiemia, può essere necessario ricorrere ad ulteriori trattamenti come la somministrazione di farmaci anti-infiammatori, fluidoterapia e ossitocina con frequente mungitura del quarto affetto (Green et al., 1997).

I FANS (antinfiammatori non steroidei), come il flunixin meglumine, fungono da anti-piretici, anti-dolorifici, contrastano l'endotossiemia e determinano un miglioramento dei sintomi clinici (gonfiore locale della mammella, diminuzione della motilità ruminale e letargia) negli animali in stato di endotossiemia batterica (Wagner and Apley, 2004).

Il quarto affetto deve essere munto frequentemente (preferibilmente ogni due ore) per rimuovere l'antinfiammatorio dalla mammella. La rimozione del latte può essere favorita attraverso la somministrazione intramuscolo di ossitocina (20 UI) per due o tre mungiture successive. Tale protocollo si è rivelato favorevole in condizioni di mastiti da streptococchi e coliformi (Hillerton and Semmens, 1999).

### Asciutta selettiva

La terapia antimicrobica sistematica dei tutti i quarti delle bovine in asciutta è stata alla base della routine di allevamento per decenni nel tentativo di ridurre le infezioni intramammarie

nel periodo di asciutta (Neave et al., 1969). Il trattamento durante il periodo di asciutta previene l'instaurarsi della mastite nei quarti colpiti, permette l'isolamento delle bovine affette da quelle in lattazione e permette la guarigione di danni al tessuto mammario, qualora presenti (Rindsig et al., 1978).

Le attuali preoccupazioni sull'uso dell'antibiotico e l'attuale normativa comunitaria sull'uso del farmaco hanno implicato la necessità di rivedere la pratica dell'asciutta sistematica verso l'obbligo di applicazione dell'asciutta selettiva (Huey et al., 2021).

In riferimento all'articolo 107 del Regolamento UE 2019/6, esso ribadisce che “i medicinali antimicrobici non sono utilizzati in modo sistematico” (comma 1) e “non sono utilizzati per profilassi se non in casi eccezionali, per la somministrazione a un singolo animale o a un numero ristretto di animali quando il rischio di infezione o di malattia infettiva è molto elevato e le conseguenze possono essere gravi. In tali casi, l'impiego di medicinali antibiotici per profilassi è limitato alla somministrazione esclusivamente a un singolo animale” (comma 3) ([www.salute.gov.it/portale/medicinaliVeterinari](http://www.salute.gov.it/portale/medicinaliVeterinari)).

Il concetto di asciutta selettiva prevede che il trattamento antibiotico sia effettuato solamente sulla base dell'anamnesi clinica di mastite nella lattazione precedente, o su sospetto di infezioni intramammarie a seguito si SCC, esame colturale o antibiogramma, nonché sui fattori di rischio dell'allevamento (Scherpenzeel et al., 2016). L'applicazione di sigillanti interni e l'uso di vaccini possono essere utili nel ridurre il rischio in vacche non trattate all'asciutta (Huxley et al., 2002).



## **4.2 L'ecografia mammaria in diagnosi di mastite**

### **4.2.1 Principi fondamentali di diagnostica ecografica**

L'ecografia è una tecnica di diagnostica per immagini non invasiva e sicura che permette di essere eseguita in breve tempo anche in condizioni di campo. L'ecografia è considerata uno strumento essenziale nella pratica clinica bovina, in primis, soprattutto per quanto riguarda l'ambito ginecologico ma anche per l'indagine di altri apparati sia negli animali giovani che nell'adulto (Braun and Kruger 2013; Gnemmi et al., 2020; Vang et al., 2023). Negli ultimi decenni, possedere un ecografo portatile è diventato molto più accessibile rispetto al passato grazie alla riduzione dei costi, permettendo al libero professionista di lavorare con una tecnologia pratica, rapida, compatta e maneggevole (DeFrancesco and Royal, 2018).

L'utilizzo dell'ecografia rispetto ad altri tipi di indagine diagnostica offre la possibilità di ottenere un maggior contrasto e risoluzione, nonché acquisire immagini dell'organo secondo diversi assi in tempo reale (Blond and Buczinski, 2009).

La diagnostica ecografica si basa sul principio di emissione di eco e della trasmissione di onde sonore ad alta frequenza (ben oltre il limite di udibilità umano) definite ultrasuoni (US). Gli US sono onde sonore di natura meccanica che hanno una frequenza superiore ai 20 kHz (20.000 Hertz), il limite massimo che l'orecchio umano può percepire. Queste onde si distinguono per i loro movimenti vibratorii periodici ad alte frequenze e viaggiano attraverso i mezzi a velocità diverse: 340 m/s nell'aria e 1840 m/s nell'acqua (Fulton, 2013).

Le onde sono caratterizzate da un moto oscillatorio in cui la sollecitazione di un elemento si trasmette agli elementi vicini e da questi agli altri, fino a propagarsi a tutto il sistema. La propagazione nella materia sotto forma di moto ondulatorio, genera delle bande di compressione e rarefazione delle molecole che costituiscono il mezzo (Leighton, 2007). Le caratteristiche che definiscono un US o sono rispettivamente: la lunghezza d'onda ( $\lambda$ ), la frequenza (f), la velocità (v) di propagazione, intensità e l'attenuazione dovuta all'impedenza acustica del mezzo che viene attraversato dall'onda (Ziskin, 1993).

La lunghezza d'onda è definita come la distanza tra due punti massimi o minimi di oscillazione di una funzione sinusoidale. Il *range* di lunghezze d'onda utilizzato negli US è compreso tra 1.5 e 0.1 nm (Lawrence, 2007).

La frequenza rappresenta il numero di oscillazioni compiute nell'unità di tempo e la sua unità di misura sono gli Hertz o cicli/secondo. Le sonde per *imaging* comunemente utilizzate hanno una frequenza variabile tra 2 e 10 MHz (Aldrich, 2007). La frequenza determina la

capacità di penetrazione degli US attraverso i tessuti e il dettaglio dell'immagine che restituiscono basse frequenze permettono di raggiungere strutture poste più in profondità ma con perdita di definizione; al contrario, frequenze alte penetrano molto meno nei tessuti ma con maggiore dettaglio (Sarti, 2009). Considerato quindi questo rapporto indirettamente proporzionale, la scelta della sonda da utilizzare deve essere effettuata in base alla distanza della struttura da valutare rispetto alla cute: una sonda da 7.5 MHz penetra di 4-6 cm, 5 MHz penetra di 10-12 cm, 3.5MHz penetra di 15-20 cm and 2.5 MHz penetra di 25-30 cm (Andualet et al., 2017).

La velocità di propagazione di un'onda è data dal prodotto tra la sua frequenza e la sua lunghezza d'onda secondo l'equazione:

$$v = f \cdot \lambda$$

Le onde si propagano quindi con una certa velocità che dipende dall'elasticità e dalla densità del mezzo che attraversano. A seconda delle proprietà fisiche del mezzo, le modalità di propagazione dell'onda al suo interno saranno diverse (Laugier and Haiat, 2011).

Quando le onde sonore viaggiano attraverso i tessuti, vengono in parte trasmesse a strutture più profonde, in parte riflesse al trasduttore, in parte disperse e in parte trasformate in calore. Nell'ottica di generare un'immagine ecografica, le onde devono ritornare al trasduttore sotto forma di echi riflessi. La quantità di echi restituita dopo aver colpito un'interfaccia tissutale è determinata dalla cosiddetta impedenza acustica (Mattoon and Nyland, 2016).

Si definisce impedenza acustica la resistenza intrinseca della materia ad essere attraversata dagli ultrasuoni. Ogni volta che un fascio ultrasonoro incontra un'interfaccia fra tessuti aventi diversa impedenza, viene in parte riflesso. La percentuale riflessa è direttamente proporzionale alla differenza di impedenza. Gli organi contenenti aria hanno l'impedenza acustica più bassa, mentre gli organi densi come le ossa hanno un'impedenza acustica molto elevata (Chan and Perlas, 2011).

Quando il fascio sonoro viaggia attraverso il paziente viene attenuato a causa dell'interazione con i diversi tessuti. Le principali interazioni dell'onda sonora con il mezzo di trasmissione sono: riflessione, rifrazione, diffusione, attenuazione e assorbimento (Powles et al., 2018).

Si definisce riflessione l'interazione tra un fascio di piccola lunghezza d'onda e un'interfaccia piana, di grandi dimensioni, con un'incidenza perpendicolare ("interfaccia speculare"). Se due tessuti hanno un'impedenza acustica diversa, nella loro interfaccia una parte più o meno grande del fascio di ultrasuoni è riflessa e si genera un eco (Patey and Corcoran, 2021).

Se l'incidenza del fascio è obliqua, l'eco di ritorno dall'interfaccia presenta un angolo uguale a quello di incidenza, determinando la cosiddetta rifrazione. Il fascio trasmesso è deviato dalla linea retta proporzionalmente alla differenza nella velocità degli ultrasuoni in ciascun lato dell'interfaccia (Martin et al., 2015).

La diffusione o *scattering* si verifica quando un fascio ultrasonoro incontra una superficie irregolare o tante piccole superfici orientate in modo diverso, tali per cui il fascio si diffonde in tutte le direzioni (Santoro and Di Falco, 2004).

L'attenuazione consiste nella perdita d'intensità (potenza) che le onde sonore subiscono attraversando i tessuti in seguito a fenomeni di riflessione e assorbimento. Questo è dovuto al fatto che le vibrazioni elastiche delle particelle che costituiscono i tessuti sono disomogenee e si verifica quindi una dispersione di energia. È, quindi, proporzionale alla frequenza dell'onda ultrasonora. L'assorbimento è la trasformazione dell'energia acustica in energia termica, che il fascio subisce nell'attraversamento dei tessuti, in una percentuale di circa l'80% (Kossoff and Eng, 2000).

Gli US sono prodotti da cristalli piezoelettrici posti nel trasduttore della sonda. L'interazione tra le onde e i tessuti determina degli echi di ritorno che vengono analizzati dal computer per creare immagini tomografiche di organi, tessuti e flussi sanguigni (Malhotra et al., 2014). La modalità di scansione maggiormente utilizzata in Medicina Veterinaria è il *Real-Time Brightness mode (B-mode)*: questo ritorna una immagine in 2D in bianco e nero (sotto forma di differenti scale di grigi) la cui brillantezza è correlata positivamente all'intensità degli echi che ritornano al traduttore (Fontes and Oosthuizen, 2022).

Le immagini ecografiche che ne risultano sono composte da pixel, ai quali viene assegnata una diversa brillantezza in base all'intensità degli echi ricevuti. Le immagini saranno monocromatiche, comprendendo vari toni di grigio (*gray scale*) per la rappresentazione di echi intermedi, bianco per echi intensi e il nero per evidenziare l'assenza di echi. Basandoci sull'ecogenicità, una struttura può essere definita iperecoica (riflette maggiormente gli echi quindi è più chiara sullo schermo), ipoecoica (trasmette maggiormente gli echi quindi più scura sullo schermo) o anecoica (nera) (Martin, 2019). I diversi tessuti dell'organismo possono essere classificati secondo una scala crescente di ecogenicità:

*fluida < muscolo < corticale renale < fegato < grasso < milza < osso*

Un'altra distinzione si basa sull'immagine prodotta da diversi tipi di sonda. La sonda lineare genera un gran numero di fasci paralleli che permettono di esplorare una sezione dalla forma

rettangolare e della stessa dimensione del trasduttore. Nel caso di una sonda convex, i cristalli sono posti sul trasduttore secondo una circonferenza e i fasci di ultrasuoni sono generano una scansione dalla forma trapezoidale, aumentando l'area di scansione rispetto alla sonda lineare (Szabo and Lewin, 2023). Quando viene utilizzata una sonda convex, le onde ultrasonore sono emesse a raggiera, paragonabile alla forma di un ventaglio; per questo motivo, nelle porzioni laterali di questa forma a ventaglio, gli ultrasuoni non intersecano la superficie dell'organo in maniera ortogonale e l'immagine in quei punti risulta maggiormente sfocata (Demi et al., 2022).

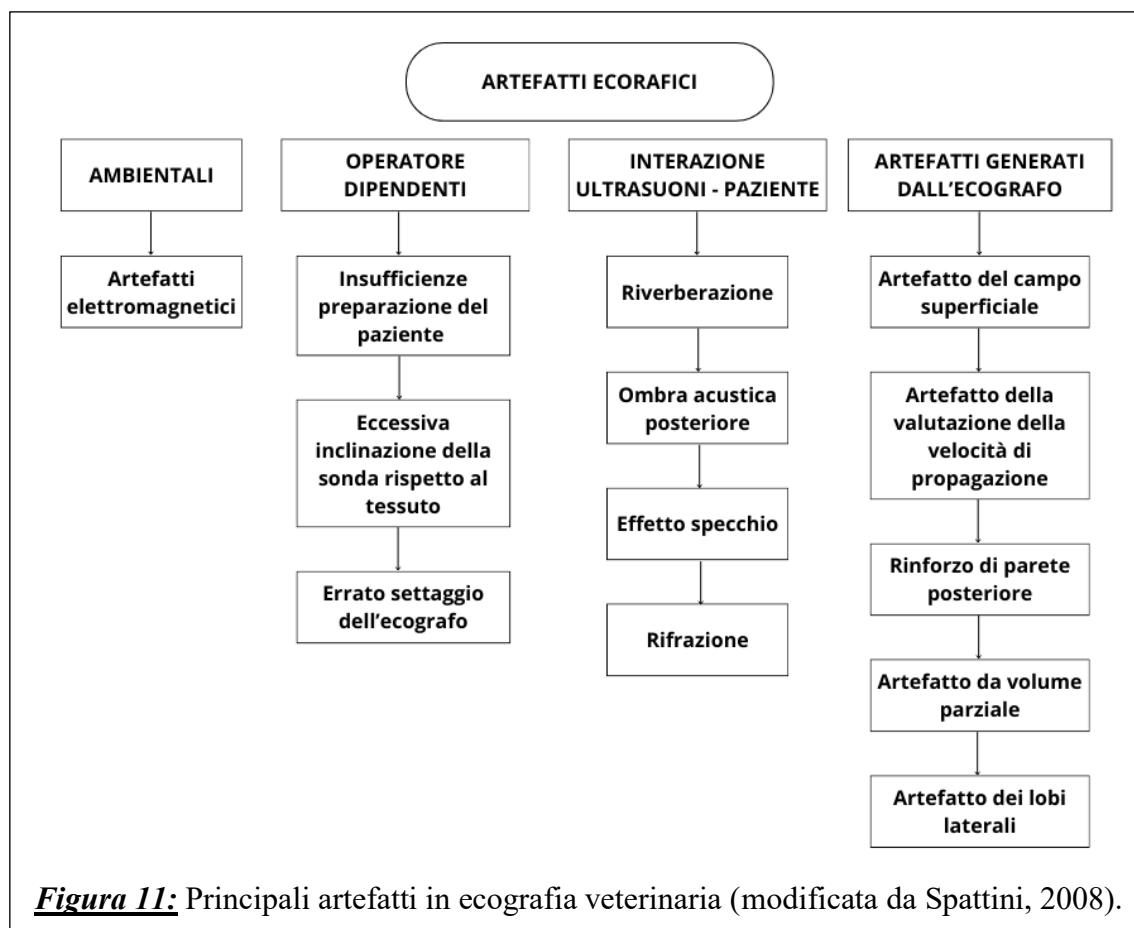
Per analizzare correttamente un organo, l'area di indagine deve essere posta al centro dello schermo, posizionando la sonda correttamente e regolando la profondità in base alla necessità. Nella maggior parte delle macchine di ultima generazione, è possibile agire sulle impostazioni di controllo per modificare la risoluzione dell'immagine e la brillantezza (Zander et al., 2020).

#### **4.2.2 Principali artefatti ecografici**

In ecografia, l'artefatto è un elemento che si evidenzia nell'immagine ma che non corrisponde ad una reale caratteristica strutturale del soggetto esaminato, dandone una rappresentazione parzialmente distorta o alterata (Kremkau and Taylor, 1986).

Gli artefatti ecografici possono essere divisi in quattro principali categorie (*Figura 11*): artefatti di natura ambientale; artefatti operatore-dipendenti; artefatti generati dall'interazione tra paziente e fascio ultrasonoro; e artefatti generati dall'ecografo. Gli artefatti possono essere utili nella diagnosi contribuendo alla sua caratterizzazione oppure la possono ostacolare, alterando o nascondendo l'immagine della struttura anatomica portando a una diagnosi incorretta o completamente errata (Spattini, 2008).

Gli artefatti di natura ambientale si basano principalmente su interferenze elettromagnetiche generate da diverse tipologie di apparecchiature. Si manifestano in modi diversi, l'unica possibilità per eliminarle è quella di spegnere la fonte o trasferirsi in un altro luogo in cui svolgere l'esame ecografico (Littmann, 2021).



Tra gli artefatti operatore-dipendenti rientrano: l'insufficiente preparazione del paziente, l'eccessiva inclinazione della sonda rispetto al tessuto e l'errato settaggio dell'ecografo (Spattini, 2008).

Gli artefatti derivanti da una scarsa preparazione del paziente sono tra i più frequenti: un'adeguata tricotomia, pulizia e contatto adeguato della sonda con la cute tramite l'apposizione di un mezzo (gel o alcol) sono alla base della realizzazione di una corretta ecografia. L'obiettivo è ridurre al minimo l'interposizione di aria, che possa ostacolare la trasmissione degli US, dando un'immagine alterata (Blond and Buczinski, 2009).

Al fin di evitare la visualizzazione di aree ipoecogene, è necessario che il fascio di US venga trasmesso in maniera perpendicolare rispetto alla struttura da indagare; se l'inclinazione della sonda risulta eccessiva rispetto alla superficie, una parte degli ultrasuoni viene riflessa nei tessuti circostanti e non ritorna alla sonda (Bahner et al., 2016).

Gli artefatti di errato settaggio dell'ecografo si basano su una gestione non corretta dei *setting* quali potenza, frequenza, guadagno. Il settaggio della potenza (*power*) regola l'intensità dell'impulso sonoro emesso dalla sonda; per ottenere la migliore risoluzione

dell'immagine sarebbe opportuno impostare la potenza a valori più bassi possibili. Se il suo valore è troppo alto, si genera un'eccessiva interazione del fascio con i tessuti superficiali e si perde la normale scala di grigi (Spattini, 2008).

Il settaggio del guadagno (gain) influenza l'amplificazione degli echi di ritorno ed è direttamente responsabile della luminosità globale dell'immagine. *Gains* troppo alti tendono a saturare l'immagine e a ridurre il contrasto, mentre valori troppo bassi comportano una perdita di dettaglio dell'immagine (Grogan and Mount, 2023).

Tra gli artefatti dovuti all'interazione degli US con il paziente rientrano: l'artefatto da riverbero (riverberazione), l'ombra acustica posteriore, l'effetto specchio e le ombre acustiche laterali (rifrazione) (Spattini, 2008).

- Artefatto da riverbero (riverberazione). Questo artefatto si verifica quando il fascio ultrasonoro colpisce perpendicolarmente una struttura anatomica altamente riflettente (gas, osso, parete prossimale di una raccolta liquida, strutture contenenti calcio); gli US riflessi colpiscono il trasduttore e da questo vengono inviati nuovamente ai tessuti. Questo percorso viene effettuato più volte, dando origine a riflessioni multiple che determinano una serie di bande ecogene distanziate tra loro da un intervallo costante e con intensità decrescente. La cosiddetta "coda di cometa" è il tipico artefatto da riverbero caratterizzato dalla formazione di uno stretto fascio di linee iperecoiche discrete e strettamente distanziate, che si verifica quando gli US incontrano superfici riflettenti di piccole dimensioni, come bolle di gas (Oglat et al., 2020).
  
- Ombra acustica posteriore (o cono d'ombra posteriore). Tale artefatto si genera posteriormente a strutture che hanno una grande capacità di assorbimento o di riflessione degli US con notevole attenuazione dell'energia acustica, tale da determinare un'assenza di echi di ritorno, dietro la struttura (Muça et al., 2021).
  
- Effetto specchio. L'effetto a specchio si verifica in presenza di interfacce ricurve e a forte riflessione speculare; le immagini che si visualizzano in prossimità dell'interfaccia vengono riprodotte al di là della superficie riflettente che si comporta come uno specchio (Kerr and Middleton, 2020).
  
- Ombre acustiche laterali (rifrazione). Nel momento in cui il fascio di US investe una formazione rotondeggiante, solida o liquida, le porzioni del fascio che incidono in

corrispondenza dei margini della struttura vengono deviati secondo il meccanismo della lente acustica. Tale deviazione determina la formazione di coni d'ombra laterali che nelle formazioni liquide tendono ad essere convergenti, mentre nelle formazioni solide tendono ad essere divergenti (Kirberger, 1995).

Tra gli artefatti generati dall'ecografo rientrano: l'artefatto del campo superficiale, l'artefatto della valutazione della velocità di propagazione, il rinforzo di parete posteriore, l'artefatto da volume parziale e l'artefatto dei lobi laterali (Spattini, 2008).

- Artefatto del campo superficiale. La visualizzazione delle strutture situate nelle immediate vicinanze della sonda può essere ostacolata dalla sonda stessa, motivo per cui si utilizzano dei distanziatori in modo che questo artefatto rimanga isolato alla porzione di materiale tra la sonda e la cute (Spattini, 2008).
- Artefatto della valutazione della velocità di propagazione. L'apparecchio ecografico assume che la velocità degli US nei tessuti sia costante; motivo per cui maggiore è il tempo che intercorre tra l'emissione dell'US e il ritorno del suo eco alla sonda, maggiore è la distanza nella quale si è verificata la riflessione del fascio (Williams, 2012). In realtà, la velocità di propagazione degli US nei tessuti non è costante. Strutture che si trovano in profondità rispetto ad uno spesso strato di tessuto adiposo (che possiede la maggiore variazione in termini di velocità di propagazione) possono essere dislocate più in profondità rispetto alla loro reale posizione (Spattini, 2008).
- Rinforzo di parete posteriore. Tale artefatto è rappresentato da un aumento dell'ampiezza degli echi che appare sullo schermo come un'area di maggiore luminosità. Gli US all'interno dei liquidi non subiscono fenomeni di attenuazione, assorbimento e riflessione, di conseguenza non si attenuano (Reef, 1998).
- Artefatto da volume parziale. L'immagine ecografica è la rappresentazione bidimensionale di strutture tridimensionali. Tale artefatto è determinato dalla sommatoria di strutture ecogene e anecogene che nell'immagine finale vengono inserite come ecogenicità intermedie (Spattini, 2008).
- Artefatto dei lobi laterali - *Side-lobe artifact*. Il fascio ultrasonoro emesso è composto principalmente da un largo fascio primario e da molteplici fasci secondari di intensità

variabile. Il computer assume che tutti gli echi derivino dal fascio primario perciò gli echi dei fasci laterali secondari sono posizionati al centro dell'immagine, come se derivassero dal fascio principale. Per ridurre gli artefatti da fasci laterali in genere è sufficiente diminuire il gain generale allo scopo di sopprimere gli echi a bassa energia; in questo modo è possibile eliminarli quasi completamente senza ridurre il dettaglio dell'immagine (Laing and Kurtz, 1982).

### **4.2.3 Modalità e valenza clinico-diagnostica**

Nel contesto della salute della mammella l'ecografia trova la sua utilità nell'identificazione di ostruzioni congenite o acquisite del capezzolo e della cisterna del latte, piuttosto che alterazioni come infiammazioni, lesioni della mucosa, corpi estranei, proliferazione tissutale, calcoli del latte, ematomi o ascessi (Fasulkov, 2012). L'utilizzo dell'ecografia non sostituisce l'utilità dell'esame batteriologico o della conta delle cellule somatiche, ma può fornire informazioni aggiuntive sullo stato della mammella e formulare di conseguenza una prognosi (Flöck and Winter, 2006).

Nella bovina, le immagini ecografiche permettono di indagare il tessuto ghiandola, così come i seni e i dotti lattiferi (Nishimura et al., 2011). L'esame ecografico del parenchima ghiandolare può essere eseguito con sonde convex, lineari o settoriali di frequenza superiore ai 5.0 MHz; la sonda viene posta direttamente a contatto con la cute lateralmente e caudalmente al quarto da indagare dopo aver applicato alcol o gel sulla superficie. Per migliorare la qualità dell'immagine è necessario invece aumentare la frequenza della sonda, di minimo 7.5 MHz (Franz et al., 2009).

In condizioni di normalità, il parenchima della mammella appare uniformemente ecoico, mentre il latte risulta anecoico. In presenza di infiammazione con alto contenuto cellulare, l'ecogenicità del latte aumenta; così come in un quadro di mastite subclinica o cronica si evidenzia un cambiamento dell'aspetto del parenchima mammario (Trostle and O' Brien, 1998).

L'analisi della *texture* ecografica delle strutture ghiandolari combinata all'uso di algoritmi di *deep learning* può rappresentare un potenziale strumento nella valutazione della salute della mammella a livello individuali e di mandria in un'ottica di *precision farming* (Themistokleous et al., 2022).



## **5. OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Il presente studio è stato condotto nell'ambito del Centro Nazionale Agritech, finanziato dall'Unione Europea – NextGenerationEU (PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA (PNRR) – MISSIONE 4 COMPONENTE 2, INVESTIMENTO 1.4 – D.D. 1032 17/06/2022, CN00000022) che vede come partner affiliato l'Università degli Studi di Padova.

In questo contesto molto ampio sono stati raccolti dati relativi a diversi aspetti produttivi degli animali reclutati. Tuttavia solo determinati parametri selezionati sono stati considerati per lo sviluppo di questa tesi.

Lo studio si pone come scopo principale la valutazione dell'utilità e efficacia dell'ecografia mammaria come metodo diagnostico innovativo in bovine da latte affette da mastite.

Il lavoro mira a sviluppare un sistema per identificare e classificare lo stato infiammatorio dei quarti mammari in base all'ecogenicità della cisterna del latte, osservabile nelle immagini ecografiche. Esso vuole inoltre investigare l'esistenza di una correlazione significativa tra i gradi di infiammazione rilevati ecograficamente e i parametri clinici e quantitativi di mastite, con particolare attenzione all'aumento del numero di cellule somatiche del latte.

In futuro, l'ecografia potrebbe diventare una pratica con un riscontro nella diagnosi tempestiva e una valutazione della terapia da intraprendere di fronte a soggetti con mastite. Considerando le attuali preoccupazioni legate all'aumento dei fenomeni di AMR, potrebbe portare alla riduzione di trattamenti non necessari e promuovere un approccio più sostenibile alla gestione della salute della bovina da latte.

## **6. MATERIALI E METODI**

Il presente studio è stato approvato dall'Organismo Preposto al Benessere degli Animali dell'Università degli Studi di Padova (Numero di Protocollo 10/2024). La gestione degli animali e le diverse procedure sono state svolte nel rispetto della Guida per la Cura e l'Utilizzo di Animali da Laboratorio e la Direttiva 2010/63/EU per gli esperimenti scientifici su animali (Legge Nazionale: D.lgs. 26/2014).

### **6.1 Sede di svolgimento dello studio e descrizione dell'allevamento**

Per ridurre la variabilità dovuta a gestioni manageriali differenti, lo studio è stato condotto in un singolo nell'allevamento di bovine da latte in provincia di Vicenza, Veneto. La struttura presenta 160 vacche in lattazione (di razza Frisona, Bruna e incroci tra le due, in percentuale variabile) e una rimonta di tipo sia interna che esterna.

L'azienda adotta un sistema a stabulazione libera, con cuccette sia in gomma che con segatura, alimentazione unifeed distribuita due volte al giorno, acqua ad libitum, sala di mungitura a spina di pesce con 20 postazioni. La politica aziendale prevede un tempo minimo di asciutta 60 giorni.

I controlli funzionali di rilevazione della quantità e qualità del latte prodotto in azienda venivano effettuati una volta al mese. La produzione media giornaliera dell'azienda (considerando tutte le razze presenti) è di circa 35 litri/giorno/animale e un'anamnesi di mastiti da agenti ambientali.

### **6.2 Criteri di inclusione**

Lo studio si è svolto dal mese di maggio 2023 al mese di febbraio 2024 (per un totale di 10 mesi) e ha visto coinvolto un totale di 89 bovine sia primipare che pluripare di sola razza frisona. L'inclusione dei capi nell'analisi si è basata sul costante monitoraggio da parte dell'allevatore che settimanalmente, in prossimità dell'intervento in azienda, ha individuato gli animali che affetti da mastite sulla base di: alterazioni del latte, sintomatologia clinica locale o sistemica, positività al CMT, aumento rilevante della SCC del latte in seguito al controllo funzionale avente cadenza mensile. Il controllo funzionale prevede la rilevazione della quantità e qualità del latte prodotto da tutte le bovine presenti in azienda (grasso, proteine, lattosio, caseina, urea, profilo degli acidi grassi, BHB, acetone, cellule somatiche) e la rilevazione della funzionalità mammaria delle medesime.

All'interno dello studio sono stati reclutati anche animali in assenza di mastiti attraverso una procedura di selezione casuale. Questi soggetti sono stati inclusi per garantire un confronto adeguato con il gruppo di pazienti affetti da mastite. Inoltre, sono state escluse dallo studio bovine con altri concomitanti processi patologici differenti dalla mastite o già in trattamento farmacologico antibiotico.

### **6.3 Descrizione del protocollo**

Qualora una bovina fosse ritenuta una potenziale candidata per il presente studio, essa è stata segnalata preventivamente dall'allevatore. Per ogni soggetto reclutato sono stati raccolti il segnalamento, l'anamnesi, i dati produttivi (quali stadio di lattazione e numero di lattazioni) e informazioni riguardanti la somministrazione di terapie. Ciascun animale è stato poi sottoposto rispettivamente a:

- Esame clinico;
- Campionamento sterile del latte, in pool dei quattro quarti mammari;
- Analisi del latte: SCC e esame batteriologico con determinazione della MIC;
- Esame ecografico di ciascun quarto mammario dopo 6 ore dalla mungitura, con focus sulla cisterna del latte;
- Valutazione dei dati produttivi risalenti all'ultimo controllo funzionale.

Al fine di valutare la relazione tra l'esito delle analisi del latte del singolo quarto rispetto al pool, per soli 7 animali reclutati successivamente (per un totale di 28 quarti), sono stati eseguiti l'esame batteriologico e la SCC sul latte del singolo quarto e il relativo esame ecografico.

#### **Esame clinico**

Ogni soggetto è stato sottoposto a visita clinica i cui esiti, integrati con le analisi di laboratorio, hanno permesso di categorizzare gli individui in sani, subclinici e clinici.

#### **Campionamento sterile del latte**

Il campionamento del latte è stato ottenuto come pool dei quattro quarti di ciascuna bovina positiva al CMT o al controllo funzionale. Per la diagnostica di laboratorio è stato essenziale che il campione fosse prelevato in condizioni di sterilità, al fine di ridurre le contaminazioni ambientali. Il prelievo è stato effettuato nella fase pre-mungitura la mattina stessa dell'intervento in azienda: l'operatore, dotato di guanti monouso puliti, per prima cosa provvedeva all'igienizzazione della mammella e dei capezzoli applicando il prodotto

detergente (DEOSAN TEATFOAM®) e rimuovendolo con carta assorbente a perdere. Segue la fase di disinfezione dell'apice del capezzolo con garze sterili imbevute con alcool etilico. Dopo aver assicurato che anche l'apice del capezzolo fosse completamente asciutto e privo di residui si procedeva al campionamento.

Per una raccolta ottimale, sono state utilizzate provette omologate sterili per il campionamento del latte; i primi getti di latte di ciascun capezzolo sono stati eliminati e la provetta è stata riempita per circa  $\frac{3}{4}$  del proprio volume, ponendo attenzione a non contaminare il capezzolo durante il prelievo. La provetta è stata a quel punto richiusa e contrassegnata in pennarello indelebile con l'identificativo codice di stalla dell'animale prima di essere posta nel porta-provette. Le provette sono state refrigerate in frigorifero o nel contenitore da trasporto refrigerato a una temperatura non superiore agli 8°C. Il mantenimento della catena del freddo è stata mantenuta per tutto il tragitto fino al laboratorio di analisi, la cui consegna è sempre avvenuta entro le 24 ore dal prelievo.

### **Analisi del latte**

I campioni sono stati conferiti alla sezione diagnostica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) di Legnaro (PD), forniti della relativa accompagnatoria contenente: ragione sociale dell'allevamento, data del prelievo, specie, tipologia e stato del campione, elenco progressivo dei numeri di prelievo, nonché le analisi richieste.

Il protocollo diagnostico prevede lo svolgimento dell'esame batteriologico, la minima concentrazione inibente (MIC) per saggiare la sensibilità agli antibiotici degli eventuali ceppi isolati, e la conta delle cellule somatiche (SCC).

### **Protocollo esame batteriologico**

I campioni sono stati portati a temperatura ambiente ed è stata seminata una quantità di 0,01 ml di latte in piastre agar sangue esculina (ASE). Le piastre sono state incubate in termostato a 37°C per 16-24. Dopo questo tempo, è stata effettuata una prima lettura dei campioni e successivamente le piastre sono state lasciate per altre 16-24 ore ed è stata effettuata una seconda lettura.

- *Stafilococchi coagulasi-positivi (SCP)*: le colonie si presentano larghe 3-5 mm di diametro, opache, colore biancastro o giallastro, solitamente emolitiche. Questi microrganismi sono cocchi Gram + (a grappolo), catalasi positiva e KOH negativi. Il test di conferma è il test di coagulasi.

- *Streptococcus agalactiae*: le colonie sono piccole, lisce, traslucide. *S. agalactiae* può essere non emolitico oppure presentare emolisi di tipo  $\beta$ . Questo microrganismo è Gram + (cocchi a catena), catalasi negativo, KOH negativo, esculina negativo alla lampada di Wood. Esistono due test di conferma: CAMP test e sieroaagglutinazione.
- *Streptococcus uberis* ed *Enterococcus spp*: le colonie di entrambi i generi sono piccole, lisce e opache. Sono cocchi a catena Gram+, catalasi negativi e KOH negativi, le colonie sono esculina positive alla lampada di Wood. Per differenziare i due ceppi, si sottopongono le colonie a una semina in BEA (Bile Esculin Azide Agar) e si incubano le piastre a 37°C per 18-24 ore. *Streptococcus uberis* non cresce su questo tipo di terreno colturale, mentre gli enterococchi crescono fermentando l'esculina che determina la comparsa di una colorazione nerastra delle colonie e della zona circostante ad esse, visibile ad occhio nudo.
- *Prototheca*: è una microalga unicellulare eterotrofa, immobile, le colonie in ASE sono puntiformi, la crescita è scarsa o assente dopo 24 ore, più evidente dopo 48 ore. Essa è facilmente identificabile a vetrino mediante colorazione di Gram (si presenta con strutture grandi, di forma irregolare e di aspetto granuloso; le strutture ovalari si colorano di blu) oppure con la colorazione a fresco (*Prototheca* presenta sporangi sferici o ovali, con o senza endospore).

### **Protocollo determinazione della MIC**

Per quanto concerne la determinazione della MIC, nei laboratori diagnostici di IZSVe, il metodo utilizzato per la determinazione della MIC è il metodo della microdiluzione in brodo che impiega piastre monouso a 96 pozzetti, contenenti diluizioni scalari dei diversi principi attivi saggiati. Nei rapporti di prova il microrganismo in esame viene definito Sensibile (S), Intermedio (I) o Resistente (R) nei confronti degli antibiotici considerati. Le concentrazioni soglia dell'antibiotico ("breakpoint") utilizzate per classificare l'efficacia in vitro degli antibiotici impiegati dall'Istituto, sono stati desunti, quando possibile, dalle linee guida delle seguenti organizzazioni internazionali, che garantiscono una robusta analisi statistica.

### **SCC**

La determinazione della SCC è stata effettuata attraverso il metodo fluoro-opto-elettronico con apparecchiatura automatizzata secondo la norma UNI EN ISO 13366-2:2007.

## **Ecografia mammaria**

La valutazione ecografica della mammella è effettuata a 6 ore di distanza dalla mungitura. Per questo proposito, è stato utilizzando un ecografo portatile Draminski Blue (Draminski® S.A., Olsztyn, Polonia) con sonda convex multi-frequenza (*Figura 12*).

Le scansioni sono state effettuate mantenendo le bovine in stazione quadrupedale poste in cattura.

La modalità di scansione utilizzata è stata il *Brightness mode* (B-mode). Le scansioni sono state eseguite con una sonda di tipo convex mantenendo un settaggio costante con frequenza di 6,5 MHz, 150 mm di profondità della finestra acustica e focus 50 mm. Le immagini sono state salvate in formato DICOM (*digital imaging and communications in medicine*) per le analisi successive.

La procedura prevedeva un esame sistematico di ciascun quarto della mammella della bovina in esame seguendo l'ordine: quarto anteriore destro, posteriore destro, anteriore sinistro e posteriore sinistro (*Figure 13a e 13b*).

La mammella veniva bagnata con alcool etilico utilizzato come mezzo interposto tra la sonda e la cute dell'animale. La scansione è stata effettuata in senso longitudinale dorso-ventrale, partendo dall'osservazione dello stato di salute del parenchima mammario e poi, ventralmente, della cisterna del latte.



**Figure 12:** Ecografo portatile Draminski Blue con sonda convex multi-frequenza.

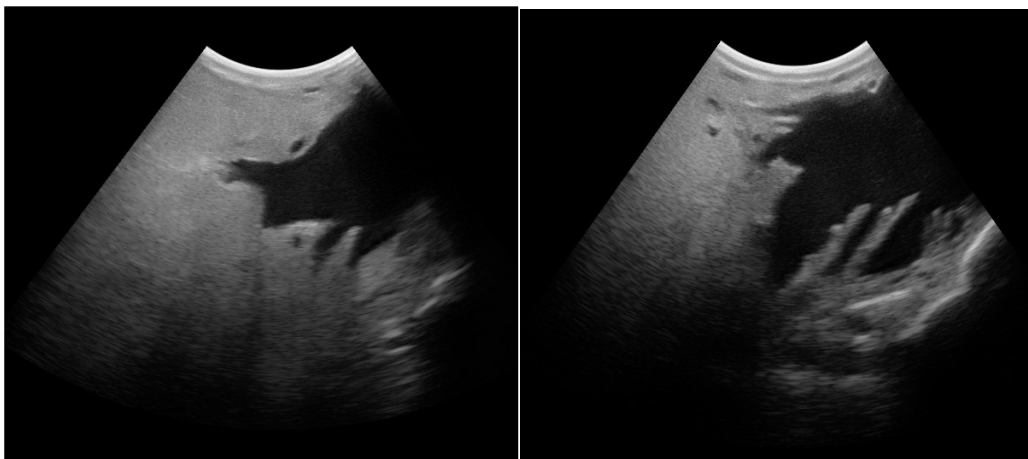


***Figure 13a e 13b:*** Esecuzione esame ecografico della mammella (quarti anteriore e posteriore destro rispettivamente).

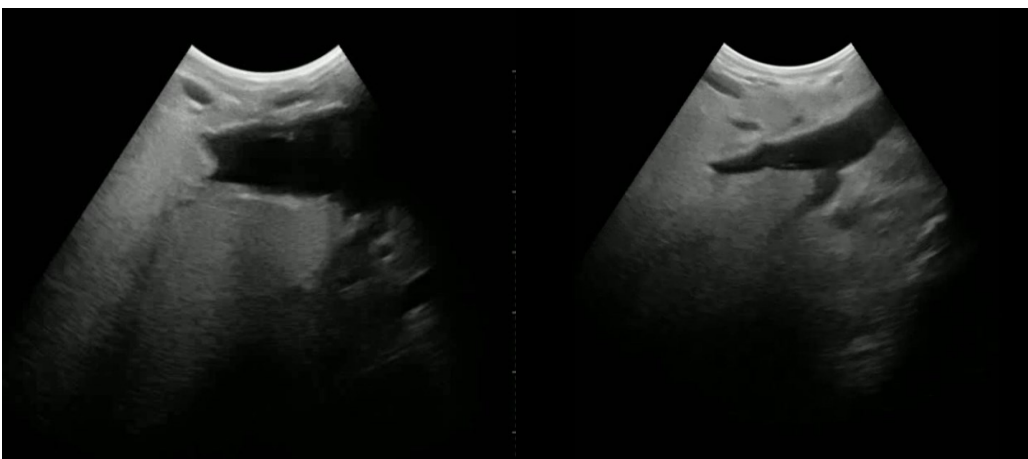
Durante l'esecuzione dell'esame ecografico è stata effettuata una valutazione basandosi sull'aspetto ecogenico della cisterna del latte. Non essendo presente in letteratura alcun riferimento relativo all'utilizzo di uno score ecografico per descrivere l'aspetto della cisterna del latte della mammella bovina, è stato definito dagli operatori a priori un sistema di *grading* basato su 4 punteggi (da 0 a 3).

A ciascun quarto indagato è stato assegnato un valore di punteggio compreso tra 0 e 3.

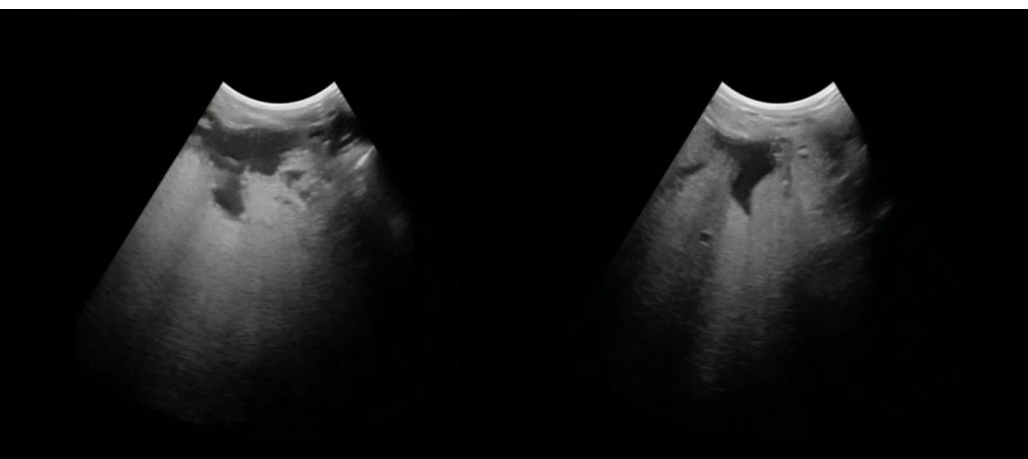
0. aspetto completamente anecogeno (*Figura 14*);
1. aspetto prevalentemente anecogeno con piccoli spot ecogeni (*Figura 15*);
2. aspetto moderatamente anecogeno con grossi spot ecogeni (*Figura 16*);
3. aspetto ampiamente ecogeno (*Figura 17*).



***Figura 14:*** Grado 0, aspetto della cisterna del latte completamente anecogeno.  
Fonte: U.I. Ruminanti – Università degli Studi di Padova, Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD)

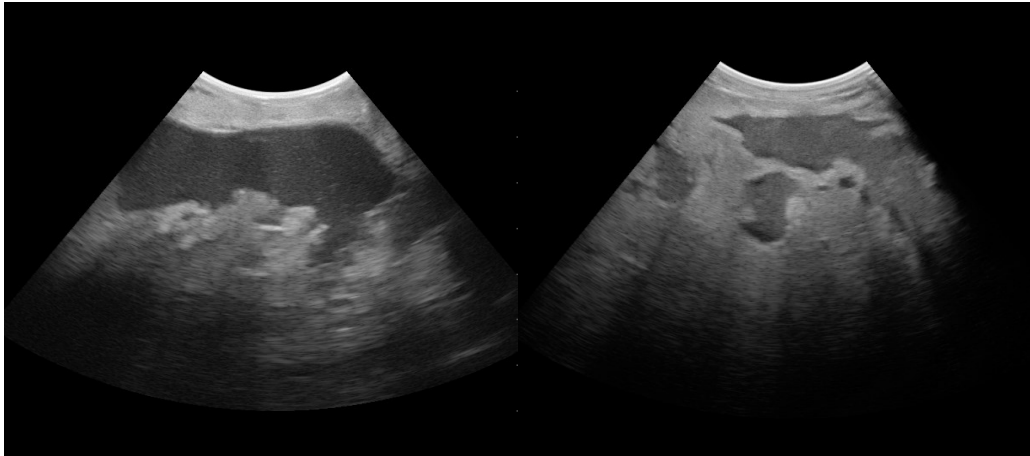


***Figura 15:*** Grado 1, aspetto della cisterna del latte prevalentemente anecogeno con piccoli spot ecogeni. Fonte: U.I. Ruminanti – Università degli Studi di Padova, Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD)



***Figura 16:*** Grado 2, aspetto della cisterna del latte moderatamente anecogeno con grossi spot ecogeni. Fonte: U.I. Ruminanti – Università degli Studi di Padova, Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD)





***Figura 17:*** Grado 3, aspetto della cisterna del latte aspetto ampiamente ecogeno.  
Fonte: U.I. Ruminanti – Università degli Studi di Padova, Ospedale Veterinario  
Universitario Didattico (OVUD)

## 6.4 Elaborazione dati e analisi statistica

La raccolta dati è stata condotta seguendo un protocollo rigoroso per garantire l'affidabilità e la validità dei risultati e successivamente inseriti in un foglio di calcolo Excel. Ogni soggetto è stato inoltre codificato con un identificativo unico per mantenere l'anonimato e la riservatezza dei dati aziendali.

In funzione degli esiti dell'IZSVe e della manifestazione clinica, i soggetti sono stati suddivisi in tre gruppi: clinici, subclinici e sani.

- Gli animali sani presentavano  $SCC \leq 100.000$  cellule/ml, negatività all'esame batteriologico e assenza di segni clinici.
- Gli animali subclinici presentavano  $SCC > 100.000$  cellule/ml e/o positività all'esame colturale e assenza di segni clinici.
- Gli animali clinici presentavano  $SCC > 100.000$  cellule/ml e/o positività all'esame colturale e presenza di segni clinici.

SANI	SUBCLINICI	CLINICI
SCC $\leq$ 100.000 cellule/ml	SCC $>$ 100.000 cellule/ml	SCC $>$ 100.000 cellule/ml
esame batteriologico negativo	esame batteriologico positivo	esame batteriologico positivo
assenza di segni clinici	assenza di segni clinici	presenza di segni clinici

***Figura 16:*** Criteri di suddivisione dei soggetti reclutati.

Inizialmente, è stata effettuata una descrizione statistica delle variabili, comprendente misure di tendenza centrale (media, mediana) e di dispersione (deviazione standard, *range*). Successivamente, sono stati eseguiti test inferenziali per verificare le ipotesi di ricerca. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata tramite il Software R versione 4.0.3 implementato con il pacchetto "rcmdr".

Prima di procedere con i diversi test, è stato necessario valutare la distribuzione dei dati stessi. Per determinare se i dati seguissero una distribuzione normale, è stato applicato il test di Shapiro-Wilk. Questo test è particolarmente indicato per la verifica della normalità in

quanto è sensibile alla simmetria dei dati e alla presenza di outlier. Il test ha restituito un *p-value* inferiore alla soglia di significatività comunemente accettata ( $p < 0,05$ ), indicando che possiamo rigettare l'ipotesi nulla e concludere che la distribuzione dei dati non è normale. Questo risultato ha determinato implicazioni sulla scelta dei metodi statistici da utilizzare per l'analisi successiva, ricorrendo all'applicazione di test non parametrici. Il test non parametrico utilizzato è il test del Chi-quadrato (o Chi-test), impiegato per esaminare se vi fosse una differenza significativa tra le frequenze osservate e le frequenze attese in una o più categorie.

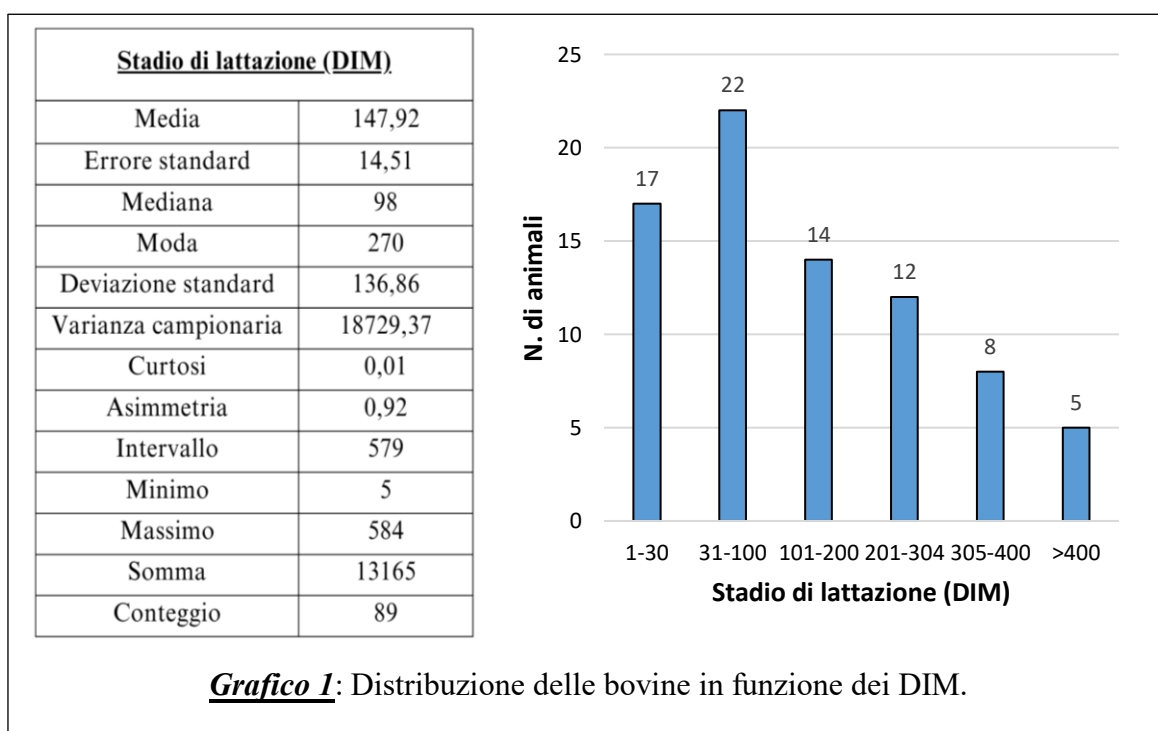
Infine, sono stati analizzati i dati relativi al gruppo ristretto di animali su cui è stato effettuato il campionamento di latte per singolo quarto. Anche in questo caso dal test di Shapiro-Wilk è emersa una distribuzione non normale dei dati. Su questo dataset si è voluto indagare se vi fossero differenze significative tra le medie dei diversi gruppi attraverso l'applicazione del test di Kruskal-Wallis.

## 7. RISULTATI

Il primo passo dell'analisi dei dati è stato svolgere una statistica descrittiva per ottenere una panoramica delle caratteristiche principali del campione studiato. Questa fase ha permesso di sintetizzare e descrivere le variabili raccolte, fornendo una base per le successive analisi inferenziali. Le variabili analizzate sono state: lo stadio di lattazione espresso in *day-in-milking (DIM)*, il numero di lattazioni e il numero di cellule somatiche di ciascuna bovina reclutata nello studio. Per ogni variabile, sono state calcolate le principali misure di tendenza centrale e dispersione. Di seguito vengono presentati i risultati per le variabili più rilevanti.

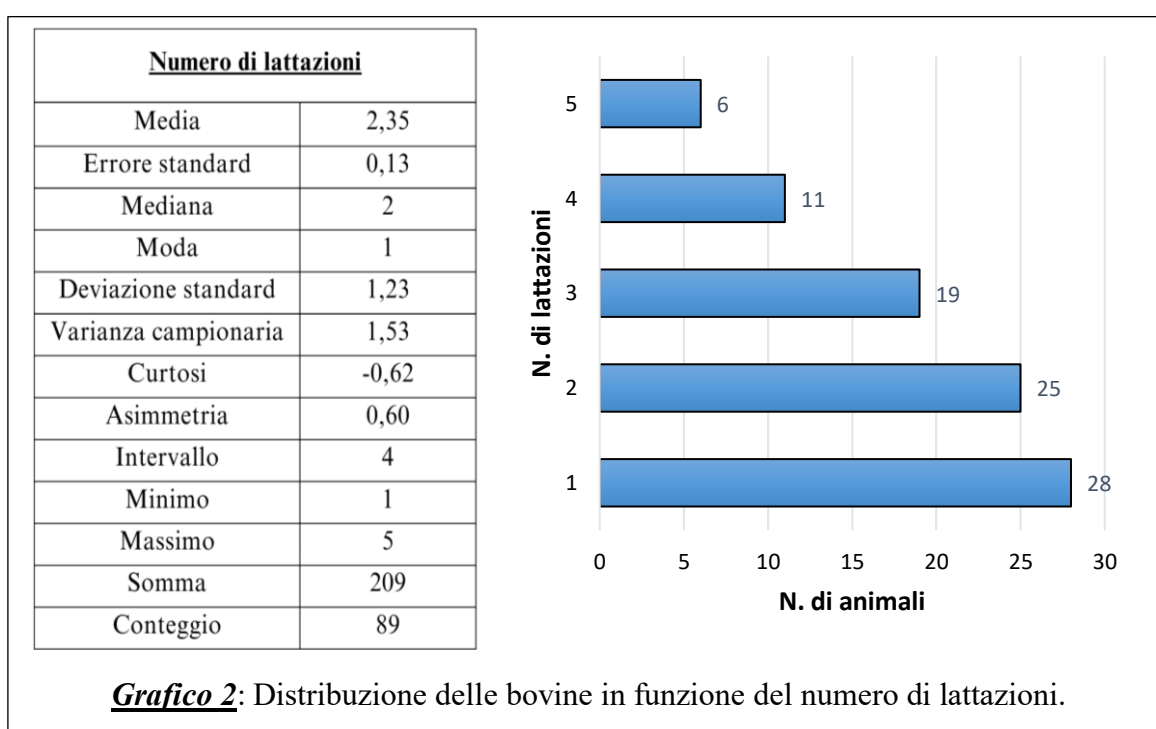
### Stadio di lattazione (DIM)

Per quanto riguarda lo stadio di lattazione degli animali reclutati è emerso un valore medio di  $147,92 \pm 136,86$  giorni, con una mediana di 98 e una moda di 270. Il campione di animali presenta una variabilità importante partendo da un valore minimo di 5 fino a un massimo di 584 DIM. I dati campionari presentano inoltre un valore di asimmetria di 0,92, che indica una distribuzione moderatamente asimmetrica verso destra: la coda destra (verso i valori più alti) della distribuzione è infatti più lunga della coda sinistra e i dati tendono ad accumularsi sul lato sinistro del grafico (*Grafico 1*).



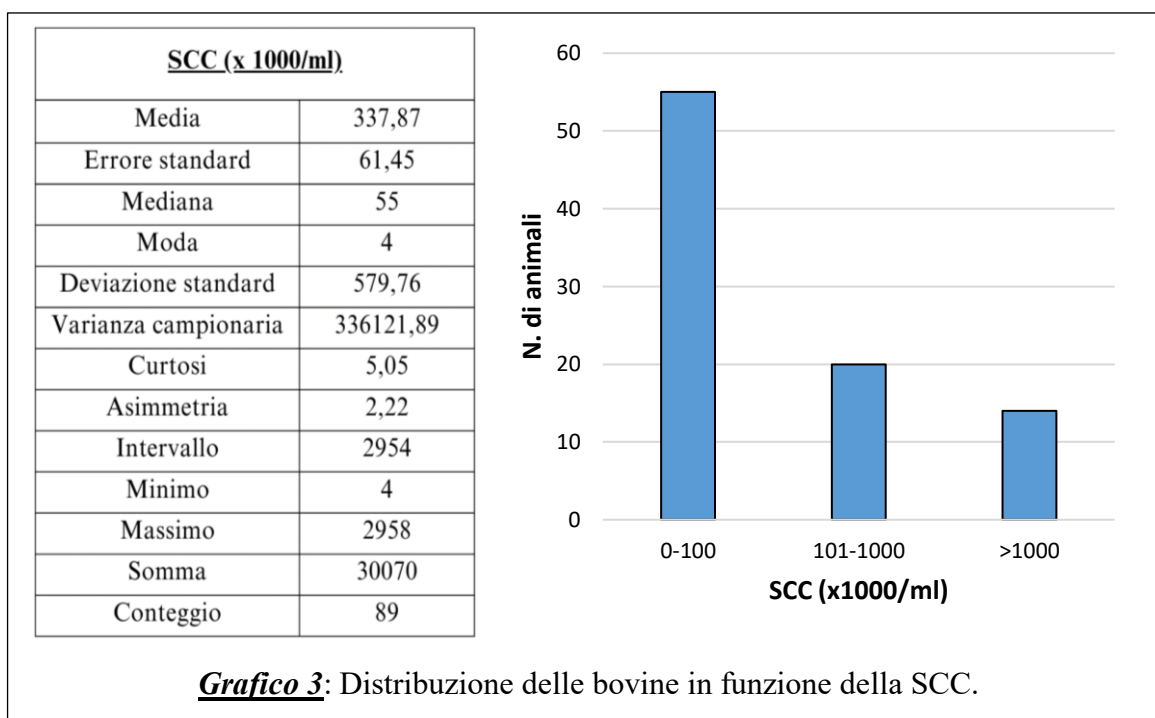
## Numero di lattazioni

Per quanto riguarda il numero di lattazioni degli animali reclutati è emerso un valore medio di  $2,35 \pm 1,23$ , con una mediana di 2 e una moda di 1. Il campione di animali presenta 28 bovine primipare e un numero massimo di lattazioni pari a 5. Il valore di asimmetria di 0,60 indica una distribuzione leggermente inclinata verso destra, con una coda destra più lunga e questo suggerisce che i dati hanno una leggera tendenza verso i valori più alti. Un valore di curtosi di -0,62 indica una distribuzione caratterizzata da code più leggere e un picco più basso e largo rispetto a una distribuzione normale. Ciò significa che i dati sono più dispersi e meno concentrati intorno alla media (*Grafico 2*).



## SCC

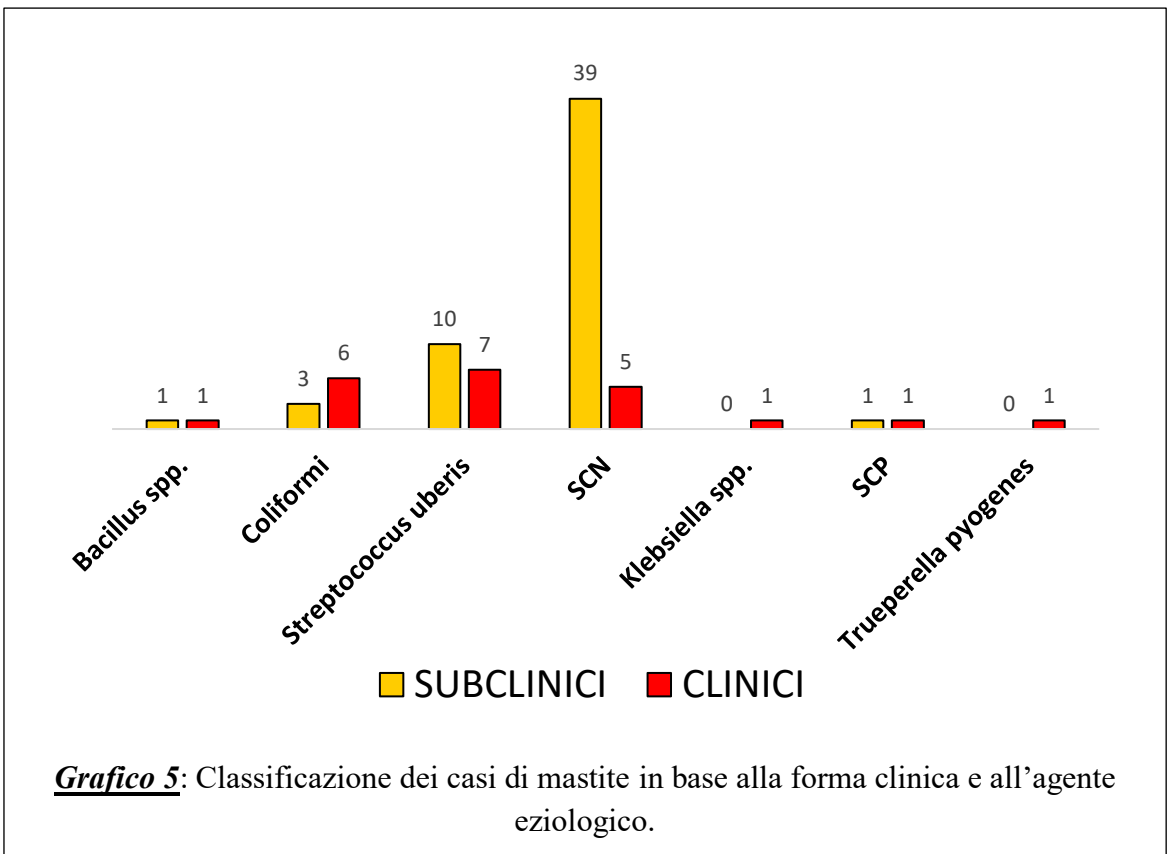
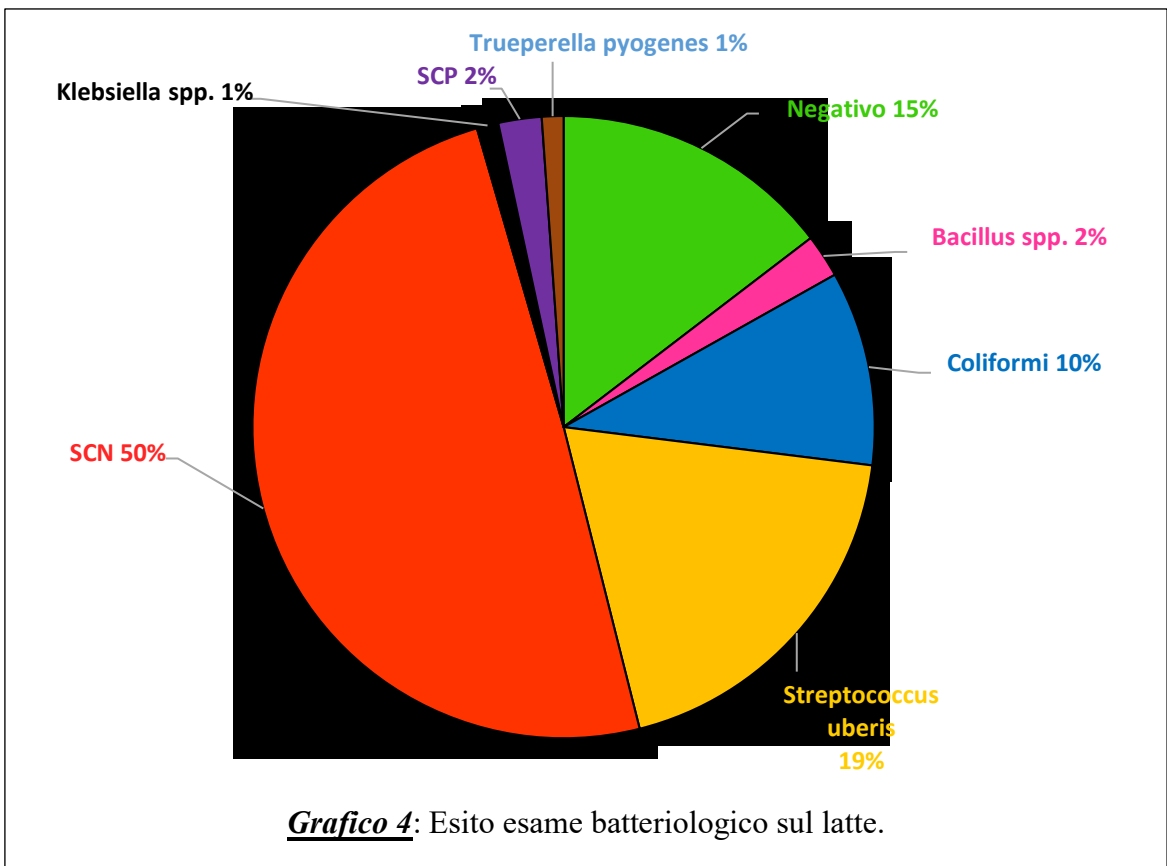
Per quanto riguarda la SCC degli animali reclutati è emerso un valore medio di  $337,87 \pm 579,76 \times 1000$  cellule/ml, con una mediana di 55 e una moda di 4. Il valore minimo di SCC riscontrato è stato di 4000 cellule/ml mentre il valore massimo è stato di  $2958 \times 1000$  cellule/ml. Il valore di curtosi di 5,05 indica una distribuzione dei dati caratterizzata da code più pesanti e un picco più alto e stretto rispetto a una distribuzione normale. Ciò significa che i dati sono molto concentrati intorno alla media, con una maggiore frequenza di valori estremi. Il valore di asimmetria è risultato essere 2,22: esso indica una distribuzione fortemente inclinata verso destra e suggerisce una concentrazione dei dati verso valori più bassi, con un significativo numero di valori estremamente alti (*Grafico 3*).



### **Esiti dell'esame batteriologico**

I risultati dell'esame batteriologico (riportati nel *Grafico 4*) hanno rilevato la presenza di 76 animali positivi, 13 negativi su un totale di 89 soggetti testati. I principali agenti isolati si sono rivelati essere SCN (44 animali, pari al 50%) seguiti da *Streptococcus uberis* (17 animali, pari al 19%). In percentuale minore, sono stati isolati anche batteri coliformi al cui interno rientrano *Escherichia coli* e *Enterococcus spp.* (10%), *Bacillus spp.* (2%), Stafilococchi coagulasi positivi (SCP) (2%), *Klebsiella spp.* (1%) e *Trueperella pyogenes* (1%).

Gli esiti dell'esame batteriologico sono stati integrati con i risultati della visita clinica e della SCC. Tale integrazione ha permesso l'ulteriore suddivisione dei soggetti positivi all'esame batteriologico in mastite clinica e subclinica (*Grafico 5*).



Per ciascun agente eziologico sono inoltre stati calcolati i valori medi di SCC degli animali in cui esso è stato isolato (*Tabella 6*).

I batteri che hanno determinato un livello maggiore di SCC sono risultati essere i coliformi, SCP e *S. uberis*. La loro deviazione standard (SD) è elevata, suggerendo una notevole variabilità all'interno del campione di animali. *Klebsiella spp.* e *Truperella pyogenes* hanno determinato sintomatologia in 1 solo animale, motivo per cui la media presenta un valore molto alto e la SD risulta pari a 0. *Bacillus spp.* ha invece indotto un valore di SCC < 100.000.

<b><u>SCC (x 1000/ml)</u></b>			
	<b><u>Media</u></b>	<b><u>SD</u></b>	<b><u>Mediana</u></b>
<i>Bacillus spp.</i>	33,00	4,00	33,00
Coliformi	940,86	937,71	904,00
<i>Streptococcus uberis</i>	507,94	548,24	306,00
SCN	179,45	403,38	47,00
<i>Klebsiella spp.</i>	1274,00	0,00	1274,00
SCP	541,50	514,50	541,50
<i>Trueperella pyogenes</i>	1348,00	0,00	1348,00

**Tabella 6**: Valori di media, deviazione standard (SD) e mediana di SCC in base all'agente infettivo isolato.



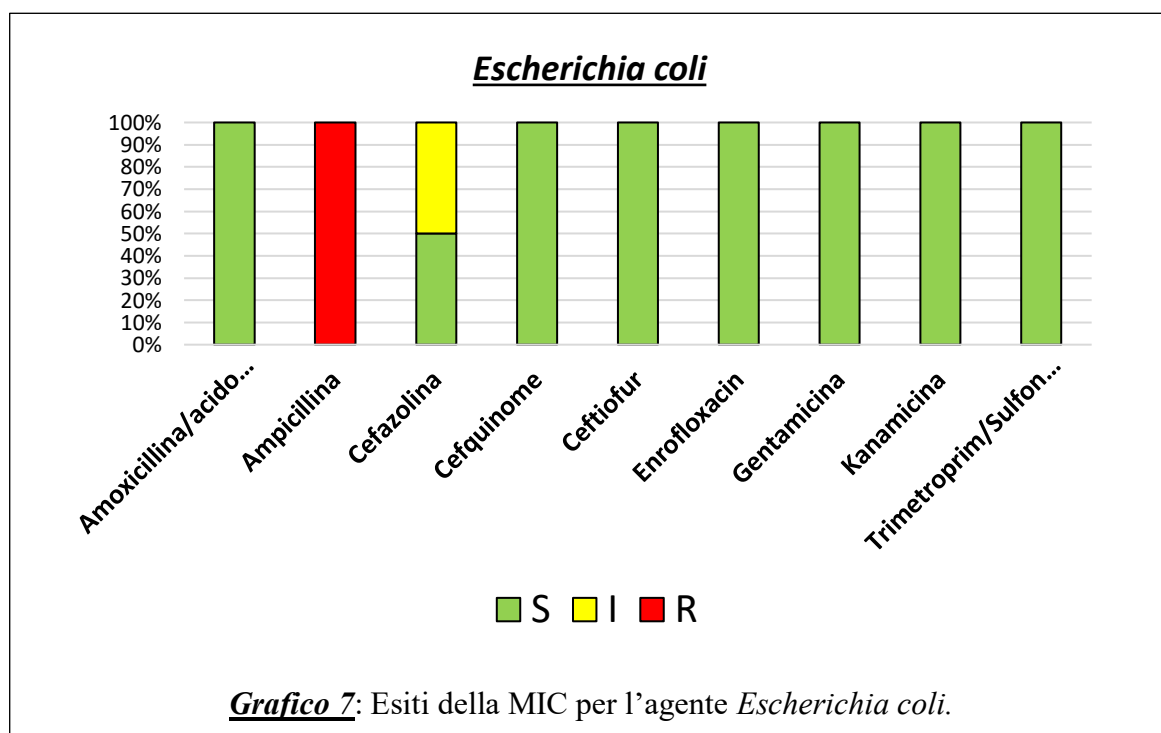
## Esiti della MIC

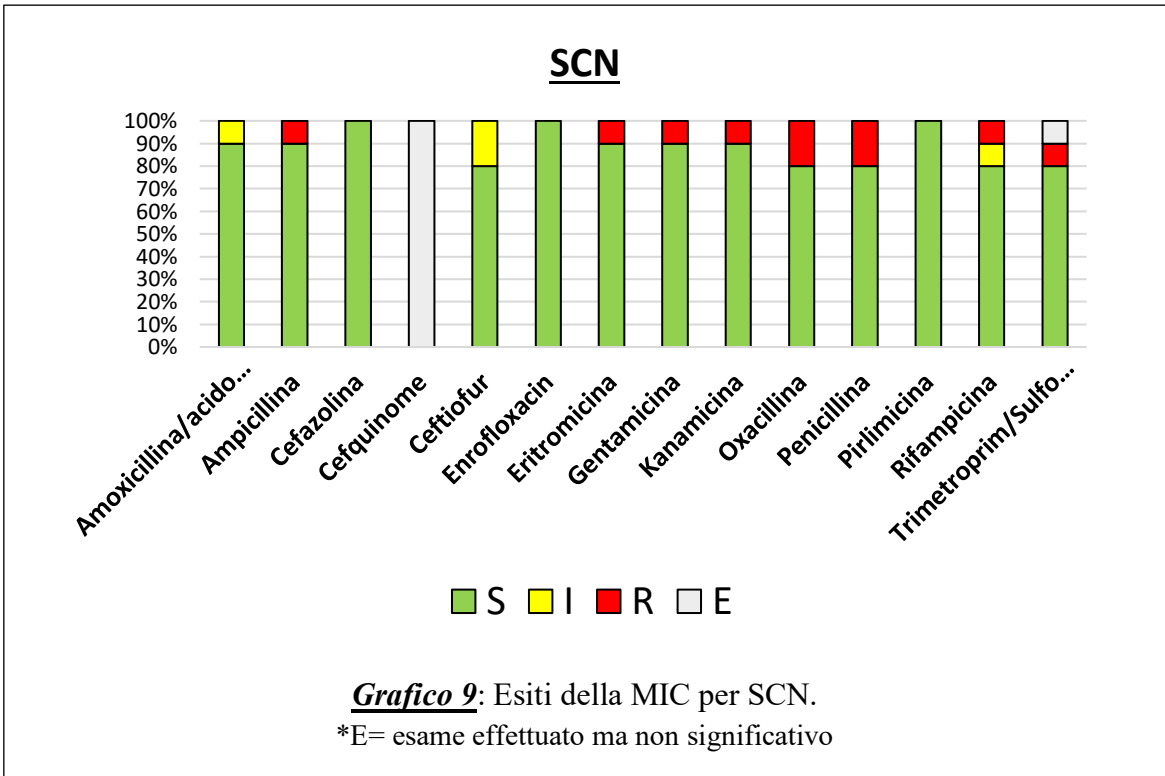
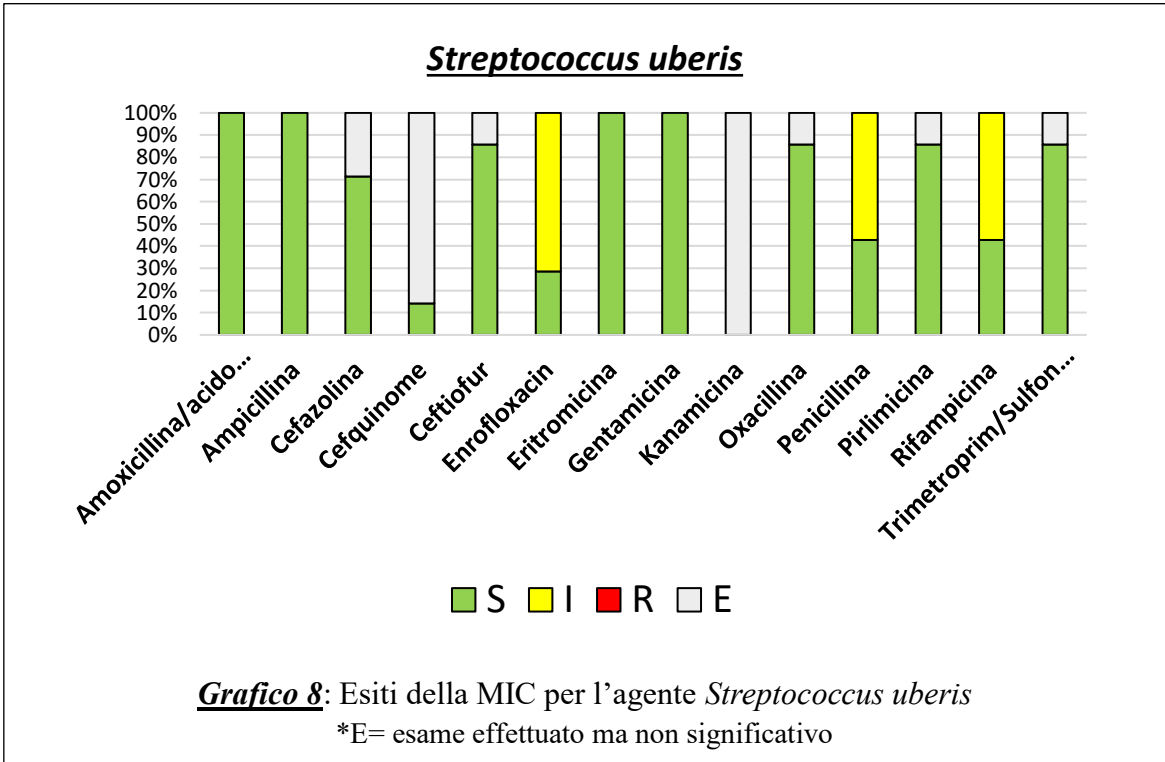
La determinazione della MIC di *E. coli* è stata effettuata per le seguenti molecole: amoxicillina/acido clavulanico, ampicillina, cefazolina, cefquinome, ceftiofur, enrofloxacin, gentamicina, kanamicina, trimetroprim/sulfonamidi (*Grafico 7*). È stata rilevata resistenza all'ampicillina nella totalità degli animali testati e un 50% è risultato "intermedio" nei confronti della cefazolina.

La determinazione della MIC di *S. uberis* e SCN è stata effettuata per le stesse molecole precedentemente elencate più eritromicina, oxacillina, penicillina, pirlimicina, rifampicina (*grafici 8 e 9*). L'esito per alcune molecole è risultato essere non significativo ed è stato riportato con la dicitura "E- effettuato".

*S. uberis* è risultato "intermedio" in più del 50% dei casi per enrofloxacin, penicillina e rifampicina. Non sono state rilevate resistenti per nessun antibiotico.

Per quanto riguarda gli SCN, sono emerse resistenze (in valore variabile tra il 10 e il 20% dei casi di mastite) per ampicillina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, oxacillina, penicillina, rifampicina e trimetroprim/sulfonamidi. Alcuni individui sono risultati inoltre "intermedi" per amoxicillina/acido clavulanico, ceftiofur e rifampicina.





## **Esame ecografico**

Nel complesso sono emersi 11 soggetti sani, 55 subclinici e 23 clinici. Per quanto riguarda i singoli quarti, sono stati analizzati 356 quarti di cui: 144 con punteggio 0, 143 con punteggio 1, 51 con punteggio 2 e 18 con punteggio 3.

Per quanto riguarda i punteggi attribuiti tramite l'esame ecografico, è stato calcolato uno score ecografico individuale attraverso la media del punteggio di ciascun quarto. Questo è stato necessario in quanto la classificazione in sano, subclinico e clinico si riferisce all'individuo e non al singolo quarto, considerando che l'analisi del latte è stata effettuata sul *pool* dei quattro quarti. Nella *Tabella 10* è possibile osservare i valori di media, SD e media dello score ecografico individuale.

<b><u>Score ecografico individuale (media dei quarti)</u></b>			
	<b><u>Media</u></b>	<b><u>SD</u></b>	<b><u>SEM</u></b>
SANI	0,23	0,21	0,25
SUBCLINICI	0,67	0,45	0,50
CLINICI	1,48	0,52	1,50

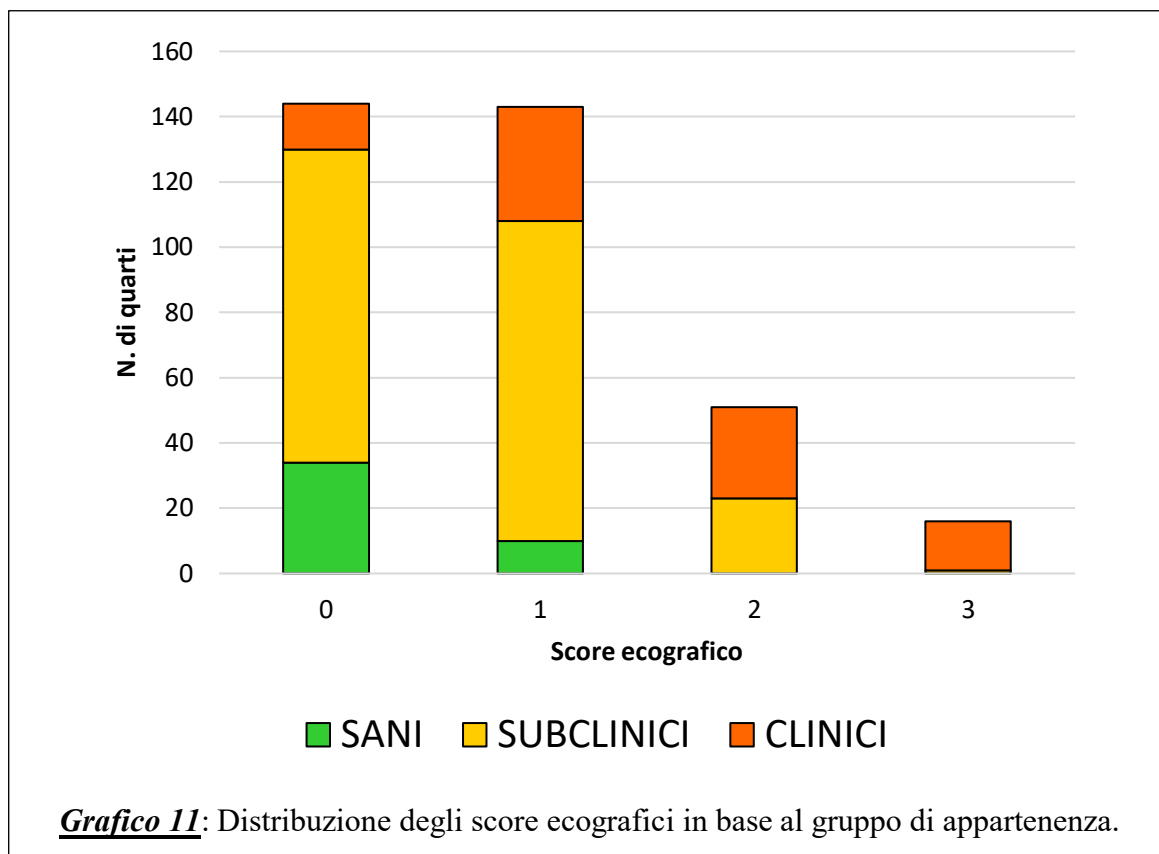
**Tabella 10:** Valori di media, deviazione standard (SD) e mediana dello score ecografico individuale in base al gruppo di appartenenza.

In seguito all'applicazione del Chi-squared test, è stato definito l'andamento degli score ecografici in base al gruppo clinico di appartenenza (*grafico 11*). Il test ha evidenziato una differenza significativa tra i gruppi sani, subclinici e clinici ( $p\text{-value} < 0,0001$ ).

Si osserva come gli score più bassi (grado 0 e 1) siano stati assegnati in condizioni di salute della mammella e quindi in soggetti appartenenti al gruppo dei sani; allo stesso modo gli score più alti sono stati assegnati a quarti in condizioni subcliniche e cliniche.

L'assegnazione di score molto bassi in soggetti subclinici e clinici è determinata in questo caso dalla metodologia di campionamento. Avendo effettuato il prelievo di latte in pool dei quattro quarti, nei casi subclinici non conosciamo quale sia il quarto affetto. Eccezion fatta per animali in stato clinico, di cui è noto il quarto malato a seguito dell'esame clinico.

Lo scopo principale di questa analisi preliminare era evidenziare l'efficacia della scala di punteggi dell'esame ecografica. Lo dimostra il fatto che i punteggi 2 e 3 non sono stati assegnati in condizione di animale sano.



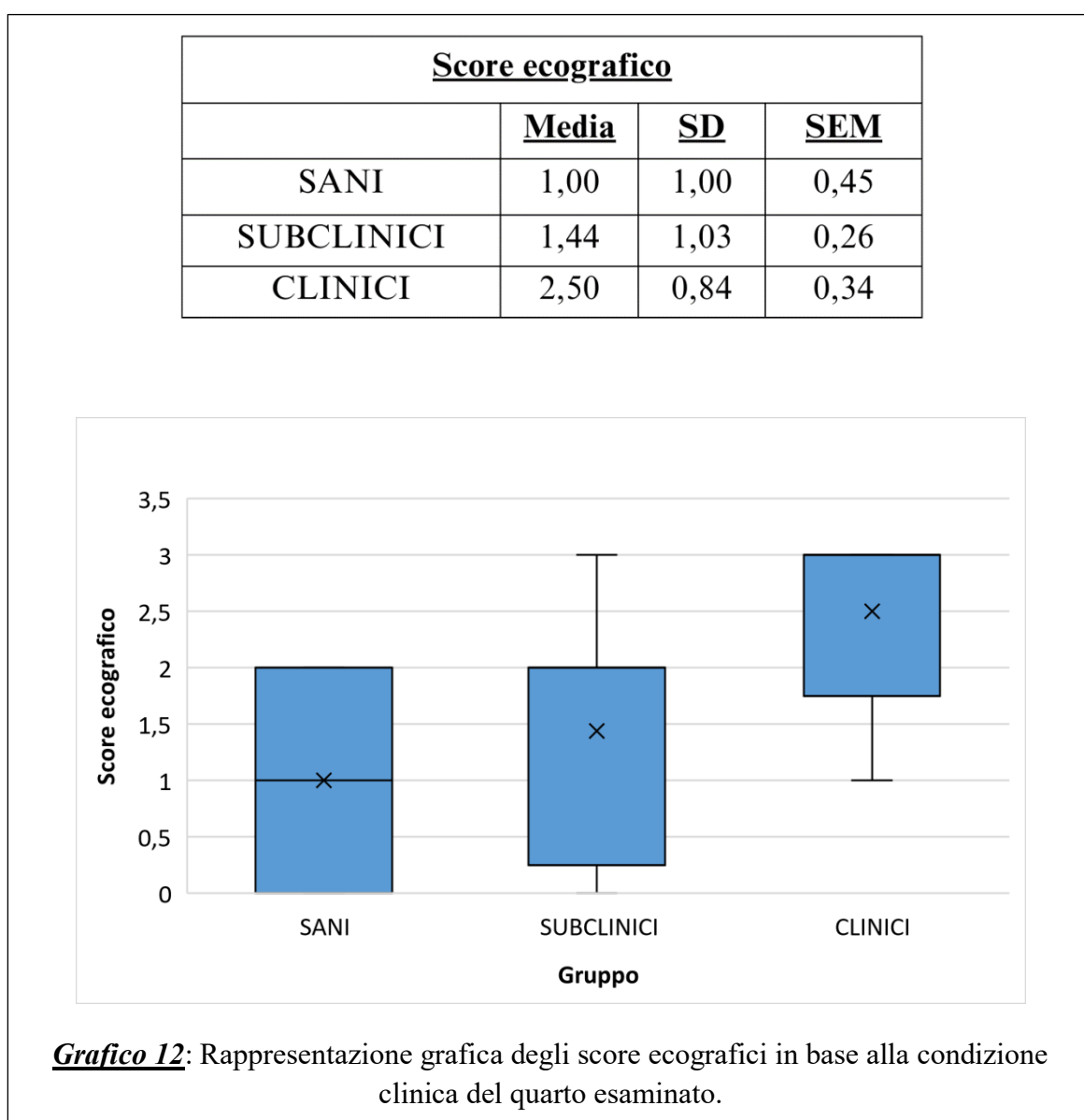
Per ovviare a questo *bias*, su 7 animali reclutati successivamente è stata effettuata la SCC su il campione di latte del singolo quarto e il relativo esame ecografico, per un totale di 27 quarti analizzati. In questo modo i quarti sono stati raggruppati nei diversi gruppi, senza l'influenza della diluizione del campione sui quattro quarti.

All'interno di questo gruppo sono emersi: 5 quarti sani, 16 subclinici e 6 clinici. Per quanto riguarda lo score ecografico: 6 quarti hanno ricevuto un punteggio di 0, 5 un punteggio di 1, 10 un punteggio di 2, 6 un punteggio di 3.

Il test di Kruskal-Wallis è stato condotto per determinare se vi fossero differenze significative nelle misure dello score ecografico relativo al singolo quarto tra i tre gruppi (sani, subclinici e clinici). I risultati del test indicano una differenza significativa tra i gruppi ( $\chi^2 = 9.4352$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.008937$ ). Poiché il valore  $p$  è inferiore al livello di significatività ( $\alpha$ ) 0.05, possiamo concludere che vi sono differenze significative nelle misure di score ecografico tra almeno due dei gruppi esaminati.

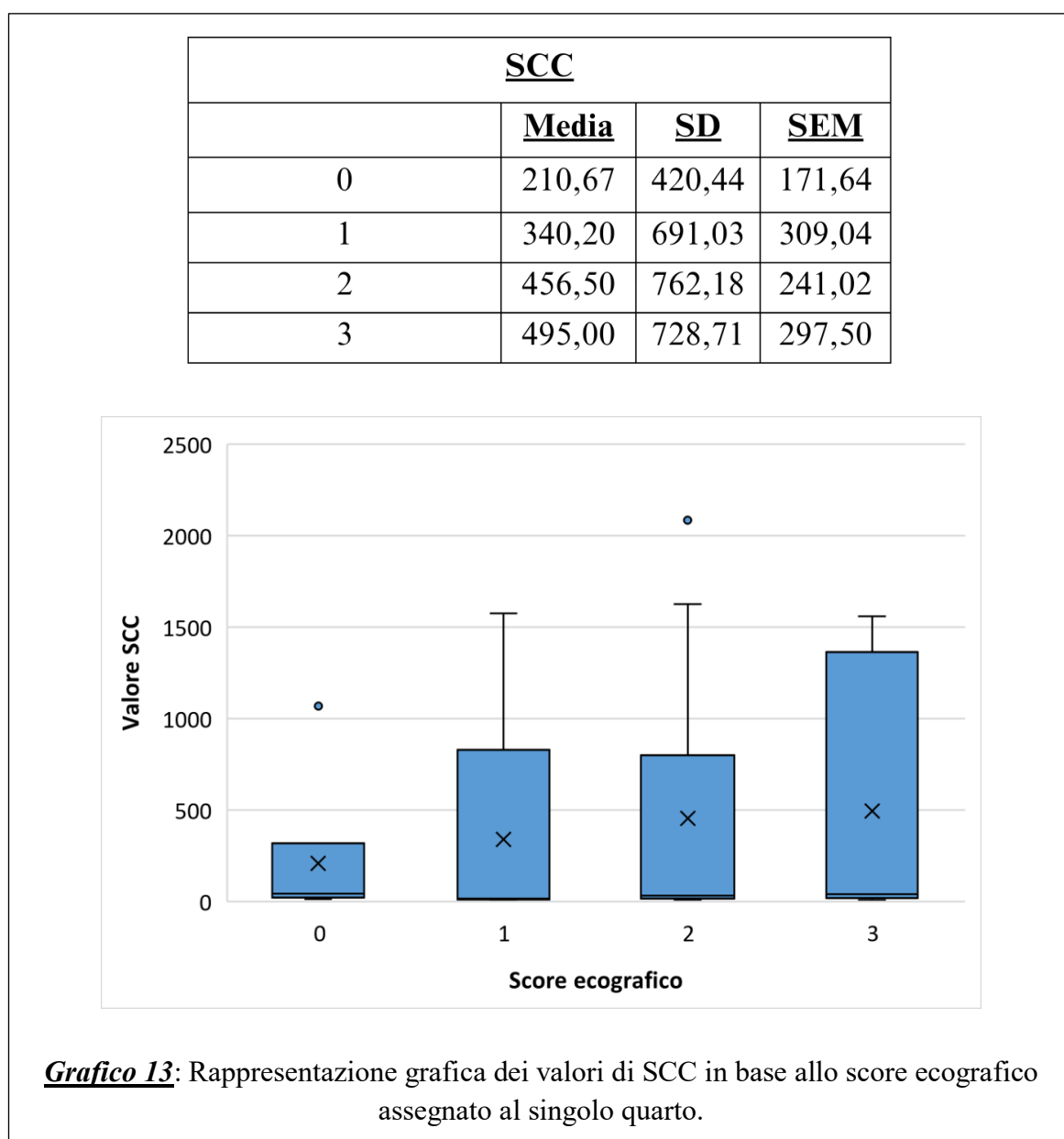
### **Rapporto score ecografico – gruppo di appartenenza**

La tabella sottostante riporta i valori di media, SD e errore standard della media (SEM). I quarti sani hanno evidenziato un valore medio di score ecografico pari a 1, con valori massimi di 2; mentre i quarti subclinici una media pari a 1,44. I quarti clinici presentano un intervallo interquartile (IQR) da 1,75 a 3. Non ci sono outlier in questo dataset, suggerendo che non ci sono score anormalmente alti in caso di quarti sani o score anormalmente bassi in caso di quarti clinici. Il *box plot* sottostante (*Grafico 12*) rappresenta graficamente la situazione sopra descritta.



## Rapporto score ecografico - SCC

Per quanto riguarda i valori di SCC rispetto allo score ecografico assegnato al quarto, è emersa una grande variabilità dei dati (*Grafico 13*). Il valore delle medie mostra un andamento crescente all'aumentare del valore dello score ecografico. I punteggi 0 e 1, che nell'analisi precedente si è visto essere associati a condizioni di salute del quarto, presentano valori al di sopra del *cut-off* di riferimento scelto per definire le condizioni di assenza di fenomeno infiammatorio. L'entità dell'errore standard dipende dalla dimensione del campione; valori di SEM elevati suggeriscono la necessità di un campione più grande per ottenere stime più precise. L'indagine su questo piccolo gruppo ha permesso di capire che l'analisi quantitativa del latte si rende necessaria sul singolo quarto in modo da poter elaborare i dati in funzione di singoli quarti e non di singolo animale.



## **8. DISCUSSIONE**

La mastite rappresenta una delle principali sfide per la salute delle bovine da latte, con conseguenze significative sia per il benessere animale che per la produttività del settore lattiero-caseario. L'ecografia mammaria emerge come uno strumento diagnostico promettente per rilevare questa patologia, offrendo la possibilità di osservare in dettaglio i cambiamenti sia nel parenchima mammario che nella cisterna del latte. Gli studi condotti finora hanno evidenziato come la mastite induca alterazioni ecografiche distintive, tra cui variazioni nella struttura e nella tessitura del parenchima e anomalie nella cisterna del latte, che possono essere utilmente sfruttate per la diagnosi precoce e il monitoraggio della malattia (Suzuki et al., 2020).

L'obiettivo primario dello studio prevedeva di confermare l'applicabilità dal punto di vista pratico dell'ecografia come metodo diagnostico di mastite nella bovina da latte. Come già suggerito in bibliografia, l'ecografia si è dimostrata una metodica di facile e rapido utilizzo, nonché non invasiva per l'animale (Flöck and Winter, 2006). Questo strumento diagnostico permette di ottenere immagini in tempo reale, facilitando l'identificazione di eventuali anomalie. La sua praticità risiede nella sua facilità d'uso e nella possibilità di eseguire l'esame direttamente sul campo, senza necessità di trasportare gli animali in strutture specializzate. Inoltre, l'assenza di radiazioni e la natura non invasiva del metodo lo rendono particolarmente adatto per ripetute indagini, garantendo il benessere degli animali. Questo aspetto è fondamentale, poiché riduce lo stress per le bovine e aumenta la collaborazione durante l'esame, migliorando così la qualità delle diagnosi. In questo studio, l'operatore ha impiegato in media 3 minuti per l'indagine di tutti e quattro i quarti di un singolo animale posto in cattura, con il solo utilizzo dell'ecografo e di alcol per bagnare la zona da indagare.

Riguardo le caratteristiche del campione di animali in analisi, sono emerse diverse peculiarità in base alla variabile considerata.

Relativamente allo stadio di lattazione, i soggetti hanno presentato una variabilità importante partendo da un valore minimo di 5 fino a un massimo di 584 DIM. Sono risultati infatti 13 animali che hanno superato la durata della lattazione standard, convenzionalmente definita di lunghezza pari a 305 giorni. La media di lattazioni del campione è pari a 2,35, con il maggior numero di casi di mastite incluso nelle prime 3 lattazioni.

Inoltre, la SCC si è dimostrata essere di valore  $\leq 100.000$  cellule/ml in più del 50% dei casi. Questo dato indica che, ad eccezione degli 11 soggetti sani, i restanti individui che rientrano in questo intervallo sono stati inclusi come subclinici e clinici, ovvero con esame

batteriologico positivo e eventuale presenza di segni clinici. A dimostrazione del fatto che un esame batteriologico positivo non necessariamente determina un aumento significativo delle cellule somatiche oltre il valore di riferimento.

Gli esiti dell'esame colturale hanno evidenziato come la stragrande maggioranza delle mastiti indotte da SCN sia di tipo subclinico, rimanendo in linea con i dati presenti in letteratura (Pyörälä and Taponen, 2009). Nel caso invece delle mastiti da *S. uberis* si è osservata un'incidenza simile di casi clinici e subclinici. Questi due agenti eziologici rappresentano quasi il 70% dei casi totali reclutati per questo studio. I batteri coliformi, gli SCP e *S. uberis* sono i microrganismi hanno determinato l'aumento più alto della SCC, seppur con una grande variabilità. Motivo per cui non è stato possibile determinare con certezza quale sia l'effettiva influenza dell'agente infettivo sull'andamento della SCC.

Relativamente agli esiti della MIC, l'unica resistenza rilevata è stata riscontrata per *Escherichia coli* nei confronti dell'ampicillina. Questo dato risulta coerente con i dati dell'Istituto Superiore di Sanità che hanno evidenziato una moderata resistenza di *Escherichia coli* all'ampicillina del 61,6% nel anno 2022 ([www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza](http://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza)).

Il protocollo di gestione dei casi di mastite aziendale è coerente con gli esiti della MIC che sono stati ottenuti in questo studio. Le molecole utilizzate per il trattamento di mastiti cliniche sono amoxicillina/acido clavulanico e in seconda linea cefalosporine di seconda generazione (in seguito all'esito dell'esame batteriologico e MIC). Per il trattamento in asciutta di mastiti da *S. uberis* viene invece utilizzata la penicillina. Per tali molecole, infatti, non sono state riscontrate resistenze nei soggetti analizzati. Questo va a dimostrazione del fatto che per l'impostazione di una strategia terapeutica in allevamento, sia necessario un continuo monitoraggio dell'evoluzione delle sensibilità degli agenti infettivi circolanti per le molecole comunemente utilizzate in zootecnica, nel rispetto della Normativa Vigente riguardo l'uso prudente del farmaco (D.lgs. n. 218/2023).

Per quanto riguarda l'esame ecografico, la principale differenza di questo studio rispetto ai due precedentemente citati, è l'utilizzo dell'ecografia per indagare l'aspetto della cisterna del latte, escludendo la valutazione del parenchima. I dati ottenuti possono essere definiti preliminari in quanto alcuni aspetti andranno in futuro approfonditi con ulteriori studi e modifiche del protocollo di svolgimento.

L'analisi dei dati ha individuato un aumento significativo dell'ecogenicità della cisterna del latte nelle bovine affette da mastite clinica, in accordo con precedenti studi.



È stato possibile osservare una chiara differenza nei punteggi ecografici: gli animali sani presentavano punteggi bassi, prevalentemente 0 o 1; gli animali con mastite subclinica presentavano generalmente punteggi intermedi, con una prevalenza di 1 e 2; gli animali con mastite clinica mostravano punteggi alti, principalmente 2 o 3. L'assegnazione di score molto bassi in soggetti subclinici è stata determinata dalla metodologia di campionamento. In questi casi infatti, essendo il campione di latte effettuato su un singolo quarto, non era noto il quarto mastitico. Eccezion fatta per gli animali in stato clinico, di cui era noto il quarto malato a seguito dell'esame clinico. Su tale *dataset* non è stato possibile definire la relazione tra aumento del grado di ecogenicità e aumento delle cellule somatiche a causa della diluizione data dalla raccolta in pool.

Solo la successiva analisi del singolo quarto su un campione ristretto di soggetti ha permesso di produrre dei dati preliminari più precisi riguardo il rapporto tra score ecografico e gruppo di appartenenza. Su questo campione è stata predisposta la raccolta e analisi di campioni di latte del un singolo quarto. In questo caso le medie dei singoli quarti in base alla condizione clinica, si sono modificate rispetto al *dataset* precedente, ma consolidando la tesi dello studio. La media di punteggio ecografico dei quarti sani è risulta 1, quella dei quarti subclinici 1,44 e quella dei quarti clinici 2,50. La differenza maggiore si può osservare nei quarti clinici rispetto ai quarti sani e subclinici; tra questi ultimi due infatti i valori di media e SD erano molto simili. Si desume quindi che le alterazioni maggiormente evidenti siano riconducibili a condizioni di mastite clinica, mentre gli score intermedi con grado di ecogenicità lieve/moderato siano più difficilmente differenziabili in condizioni di salute o subclinicità.

Tale indagine dimostra inoltre come l'unità campionaria appropriata su cui sviluppare l'analisi statistica sia il singolo quarto e non il singolo individuo. In tal senso, si è cercato di definire anche il rapporto tra score ecografico e SCC.

Sempre sul campione ristretto di animali campionati in singolo quarto, è stato osservato un andamento crescente nel numero di cellule somatiche all'aumentare del punteggio ecografico, ma con un'alta variabilità. I quarti con punteggio ecografico 0 hanno mostrato una media di cellule somatiche ben superiore al *cut-off* di riferimento scelto per definire la condizione di subclinicità e clinicità del fenomeno infiammatorio. Valori molto alti di SEM indicano infatti la necessità di reclutare un maggior numero di animali per ottenere stime più precise.

Questo concetto in particolare, pone l'attenzione sul fatto che sia presente un aumento della SCC all'aumentare del punteggio ecografico della cisterna del latte; ma per il momento non

è possibile affermare che uno score 0 sia univocamente equivalente a un quarto sano. Questo suggerisce che il solo utilizzo dello score ecografico può non essere sufficiente per una diagnosi accurata e che l'associazione alla SCC sia necessaria per una valutazione più completa dello stato di salute della mammella.

I risultati del metodo suggeriscono spunti di approfondimento: di aumentare in primis il numero di animali reclutati per ciascuna categoria in futuro. Essendo la valutazione del grado di ecogenicità relativo al singolo quarto, anche il campionamento e le analisi batteriologiche e quantitative andrebbero eseguite sul latte ottenuto dal singolo quarto; in modo da non necessitare di calcolare una media dello score ecografico del singolo individuo. Anche la SCC calcolata sul pool di quattro quarti risente della diluizione dei quarti non affetti, abbassando il numero di cellule somatiche il cui valore del quarto clinicamente più grave, sarebbe più alto.

Ampliare le sedi di campionamento, includendo aziende con incidenza di patogeni differenti da quelli già analizzati permetterebbe inoltre di fornire un quadro completo di come i principali agenti patogeni di mastite inducano cambiamenti a livello ecografico (Flöck and Winter, 2006). Individuare alterazioni ecografiche specifiche di ciascun patogeno rappresenta una prospettiva molto utile nella futura diagnosi di mastite.

L'ecografia è una metodica diagnostica soggetta a una grande variabilità operatore-dipendente nel settore veterinario (Lindquist et al., 2021). In tal senso, lo *score* ecografico suggerito da questo studio necessiterebbe di una standardizzazione oggettiva. L'utilizzo di software per l'analisi della scala di grigi sulla base dei singoli pixel, rappresenta una valida soluzione in quanto permette di stabilire un *cut-off* per discriminare i diversi gradi di ecogenicità.

Infine, si ritiene necessario per espletare gli obiettivi preliminari della ricerca, di ampliare lo studio includendo anche il successivo trattamento farmacologico della mastite (Fuenzalida and Ruegg, 2019; Lago et al., 2011).

Monitorare quindi l'aspetto ecografico della mammella prima, durante e alla fine del trattamento, se avvenuto, per evidenziare eventuali relazioni tra terapia intrapresa, molecola utilizzata, agente eziologico coinvolto e tempi di guarigione. Lo scopo ultimo è utilizzare tale metodo come discriminante nel processo decisionale di trattare o meno la bovina affetta. L'ecografia offre infatti la possibilità di effettuare controlli periodici sullo stato di salute della mammella, facilitando un monitoraggio continuo e proattivo della mastite. Questo approccio permette di gestire in modo efficace anche le infezioni croniche o ricorrenti.

I vantaggi nell'adozione diffusa dell'ecografia nella diagnosi di mastite sono dimostrati ma essa presenta tuttavia ancora alcune sfide; tra queste, la necessità di formazione specifica per il personale veterinario e di implementare tale metodica in stretta collaborazione con l'allevatore. Tuttavia, i benefici a lungo termine, in termini di miglioramento della salute degli animali e di riduzione dei costi legati alla gestione della mastite, superano ampiamente questi svantaggi.

Nel tempo l'ecografia continuerà a evolversi, con miglioramenti tecnologici rendendo l'apparecchiatura sempre più accessibile e facile da usare. Le future ricerche dovrebbero concentrarsi sull'integrazione dell'ecografia con altre tecnologie diagnostiche avanzate, come l'intelligenza artificiale e la telemedicina. L'adozione e l'implementazione di questa tecnologia nel contesto zootecnico possono migliorare significativamente l'efficienza produttiva e la sostenibilità economica delle aziende agricole, promuovendo un approccio più olistico e integrato alla salute della mandria.

## **9. CONCLUSIONI**

In conclusione della presente tesi, si può affermare che l'utilizzo dell'ecografica nella diagnosi di mastite nella bovina da latte rappresenti un valido strumento. L'uso di questa tecnologia è pratico e veloce, permettendo di indagare lo stato di salute della mammella di molti soggetti, minimizzando lo stress e la manipolazione dell'animale. L'obiettivo di definire una stadiazione del fenomeno infiammatorio sulla base dell'ecogenicità della cisterna del latte è stato pienamente raggiunto. Lo score ecografico sviluppato nel presente studio (punteggio da 0 a 3) si è rivelato efficace e coerente con lo stadio clinico della mammella, mostrando differenze significative tra animali sani, subclinici e clinici.

Per quanto riguarda il rapporto tra stadiazione ecografica e il numero di cellule somatiche, i dati indicano un aumento della SCC con il peggioramento della sintomatologia clinica; tuttavia si è osservato come i punteggi ecografici più bassi non siano sempre correlati a un valore di  $SCC \leq 100.000$  cellule/ml. Questo dimostra il fatto che la totale anecogenicità della cisterna del latte non sia necessariamente indicativa di una condizione di salute del quarto, necessitando comunque dell'integrazione con l'esame di SCC. Infine, l'obiettivo di indagare l'utilità dell'ecografia come futuro strumento per decidere come impostare la terapia della mastite, con particolare attenzione a un uso prudente dei farmaci, ha fornito spunti promettenti. In particolare, sarà importante indagare gli effetti specifici degli agenti infettivi sull'aspetto ecografico per migliorare la precisione diagnostica e terapeutica. Pertanto, si può concludere che, pur avendo identificato potenziali benefici, l'utilizzo dell'ecografia nel processo decisionale della terapia della mastite non è ancora attuabile.

Per raggiungere un'efficace implementazione clinica, è essenziale sviluppare linee guida standardizzate che definiscano i criteri ecografici di diagnosi, formare adeguatamente gli operatori veterinari e condurre ulteriori ricerche che confermino la riproducibilità e l'affidabilità dei risultati ecografici in contesti diversi e su larga scala.

In prospettiva, l'adozione più diffusa dell'ecografia potrebbe portare a diagnosi più precise e a un trattamento tempestivo della mastite, contribuendo a ridurre l'uso indiscriminato di antibiotici e migliorando la salute generale delle mandrie. La strada da percorrere comprende non solo la validazione clinica di questa tecnologia, ma anche l'integrazione con altre modalità diagnostiche e con le pratiche gestionali. Solo attraverso un approccio integrato, che combini innovazione tecnologica e miglioramento delle pratiche cliniche, sarà possibile sfruttare appieno il potenziale dell'ecografia mammaria nella gestione della mastite nelle bovine da latte.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Aghamohammadi M., Haine D., Kelton D. F., Barkema H. W., Hogeveen H., Keefe G. P., Dufour, S. (2018). Herd-level mastitis-associated costs on Canadian dairy farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 355975.
2. Aidara-Kane A., Angulo F. J., Conly J., Minato Y., Silbergeld E. K., McEwen S. A., Collignon P. J., Balkhy H., Collignon P., Friedman C., Hollis A., Kariuki S., Kwak H. S., McEwen S., Moulin G., Ngandjio A., Rollin B., Rossi F., Wallinga, D. (2018). World Health Organization (WHO) guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(1), 1–8.
3. Aitken S. L., Corl C. M., Sordillo L. M. (2011). Immunopathology of mastitis: Insights into disease recognition and resolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 291–304.
4. Akers R. M., Nickerson, S. C. (2011). Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 275–289.
5. Aldrich J. E. (2007). Basic physics of ultrasound imaging. *Critical Care Medicine*, 35(5 Suppl).
6. Alnakip M. E., Quintela-Baluja M., Böhme K., Fernández-No I., Caamaño-Antelo S., Calo-Mata P., Barros-Velázquez J. (2014). The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 1–31.
7. Andrews A. H., Blowey R. W., Boyd, H. (2007). Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle (2nd ed.), John Wiley & Sons.
8. Andualem T., Alemu B., Tintagu T., Berhe N. (2017). Review on diagnostic approach of ultrasound in Veterinary practice. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4(8), 134–142.
9. Arrigoni N., Garbarino C., Franco A., Battisti A. (2014). Strumenti diagnostici e test di sensibilità agli antibiotici nell'approccio alla terapia della mastite bovina. *Seminario Nazionale Convegno SIVAR*.
10. Avdić R. (2007). Morphological characteristics of Fürstenberg's rosette and mammary channels (duct) in cows. *Veterinaria (Sarajevo)*, 56, 7–16.

11. Bahner D. P., Blickendorf J. M., Bockbrader M., Adkins E., Vira A., Boulger C., Panchal A. R. (2016). Language of Transducer Manipulation: Codifying Terms for Effective Teaching. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 35(1), 183–188.
12. Barkema H. W., Schukken Y. H., Zadoks R. N. (2006). Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1877–1895.
13. Barlow J. (2011). Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: A multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 383–407.
14. Barnumt D. A., Newbouldt F. H. S. (1961). The Use of the California Mastitis Test for the Detection of Bovine Mastitis. *The Canadian Veterinary Journal*, 2(3), 83.
15. Barsi F., Carra E., Ricchi M., Gnali G., Pisoni G., Russo S., Filippi A., Arrigoni N., Zadoks R. N., Garbarino C. (2022). Circulation of *Streptococcus agalactiae* ST103 in a Free Stall Italian Dairy Farm. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(11).
16. Bekuma A., Galmessa U. (2018). Review on Hygienic Milk Products Practice and Occurrence of Mastitis in Cow's Milk. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*, 18(2), 1–10.
17. Bertocchi L., Vismara F., Hathaway T., Fusi F. (2012). Evoluzione dell'eziologia della mastite bovina nel Nord Italia dal 2005 al 2011. *Large Animal Review*, 18, 51-58.
18. Bhakat C., Kumari T., Choudhary R. K. (2018). Low Cost Management Practices to Detect and Control Sub-Clinical Mastitis in Dairy Cattle. *Int. J. Pure App. Biosci*, 6(2), 1291–1299.
19. Bhutto A. L., Murray R. D., Woldehiwet, Z. (2010). Udder shape and teat-end lesions as potential risk factors for high somatic cell counts and intra-mammary infections in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 183(1), 63–67.
20. Bianchi R. M., Schwertz C. I., De Cecco B. S., Panziera W., De Lorenzo C., Heck L. C., Snel G. G. M., Lopes B. C., Da Silva F. S., Pavarini S. P., Driemeier D. (2019). Pathological and microbiological characterization of mastitis in dairy cows. *Tropical Animal Health and Production*, 51 (7), 2057-2066.
21. Blond L., Buczinski S. (2009). Basis of ultrasound imaging and the main artifacts in bovine medicine. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 25(3), 553–565.
22. Blowey R., Edmondson P. (2000). The environment and mastitis. *In Practice*, 22(7), 382–394.

23. Blowey R., Edmondson P. (2010). Mastitis control in dairy herds. *Mastitis Control in Dairy Herds*, 2, 1–266.
24. Blum S. E., Heller E. D., Leitner, G. (2014). Long term effects of *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary Journal*, 201(1), 72-77
25. Bolzoni G., Benicchio S., Posante A., Boldini M., Peli M., Varisco, G. (2006). Esame batteriologico del latte. alcune considerazioni su esecuzione, interpretazione dei risultati e frequenza degli isolamenti. *Large Animal Review*, 12(5), 3.
26. Bonilla F. A., Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33–S40.
27. Braun U., Krüger, S. (2013). Ultrasonography of the spleen, liver, gallbladder, caudal vena cava and portal vein in healthy calves from birth to 104 days of age. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), 68.
28. Bronzo V., Scaccabarozzi L., Locatelli C., Colombo M., Sicilia, F. (2010). Incidenza della mastite clinica sulle produzioni nelle stalle italiane. *Large Animal Review*, 16, 45-46.
29. Budras K. D., Habel R. E. (2003). *Atlante illustrato di anatomia del bovino* (2<sup>a</sup> edizione). Antonio Delfino Editore.
30. Burvenich C. (2010). Role of neutrophils in protection of udder from infection in high yielding dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 11(231), 102–118.
31. Carrillo-Casas E. M., Miranda-Morales R. E. (2012). Bovine Mastitis Pathogens: Prevalence and Effects on Somatic Cell Count. *Milk Production - An Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health*.
32. Cheng W. N., Han S. G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments-A review. *Asian-Australas J Anim Sci*, 33(11), 1699–1713.
33. Cobirka M., Tancin V., Slama, P. (2020). Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals*, 10(12), 2212.
34. Constable P.D., Hinchcliff K.W., Done S.H., Grümberg W. (2016). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*, eleventh edition. Elsevier Health Sciences; 11th ed.; Cap 20, pp. 1904-1991.
35. Costa E. O., Ribeiro A. R., Watanabe E. T., Melville, P. A. (1998). Infectious Bovine Mastitis Caused by Environmental Organisms. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 45(2), 65–71.

37. Damian A., Socaciu A., Chirilean I., Stan F., Gudea A., Dezdrobitu C., Tuns F., Martonos C., Crișan M., Irimescu, I. (2015). Venous Vascular System of the Mammary Gland in the Buffalo Cow - Morphological Aspects. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 72(2).
38. Daprà V., Piccinini R., Zecconi A. (2006). Le mastiti costano molto all'allevatore. *L'informatore Agricolo*, 2, 59–63.
39. DeFrancesco T., Royal K. (2018). A survey of point-of-care ultrasound use in veterinary general practice. *Education in the Health Professions*, 1(2), 50.
40. Dego O. K., van Dijk J. E., Nederbragt, H. (2002). Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Veterinary Quarterly*, 24(4), 181–198.
41. de Jong E., McCubbin K. D., Speksnijder D., Dufour S., Middleton J. R., Ruegg P. L., Lam T. J. G. M., Kelton D. F., McDougall S., Godden S. M., Lago A., Rajala-Schultz P. J., Orsel K., De Vliegher S., Krömker V., Nobrega D. B., Kastelic J. P., Barkema H. W. (2023). Invited review: Selective treatment of clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 106(6), 3761–3778.
42. Demi M., Buda N., Soldati G. (2022). Vertical Artifacts in Lung Ultrasonography: Some Common Clinician Questions and the Related Engineer Answers. *Diagnostics 2022, Vol. 12, Page 215, 12(1)*, 215.
43. DeVries T. J., Dufour S., Scholl D. T. (2010). Relationship between feeding strategy, lying behavior patterns, and incidence of intramammary infection in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 1987–1997.
44. Down P. M., Green M. J., Hudson C. D. (2013). Rate of transmission: A major determinant of the cost of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6301–6314.
45. Duarte C. M., Freitas P. P., Bexiga, R. (2015). Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(6), 665–672.
46. Dyce K. M., Wolfgang O. S., Cornelis J. G. W. *Textbook of Veterinary Anatomy*. 5th ed., Elsevier Health Sciences, 2017.
47. Edmondson, P. (2001). Influence of milking machines on mastitis. *In Practice*, 23(3), 150–159.



48. Emre, B., Alaçam, E. (2015). The Occurrence of Teat Hyperkeratosis in Cows and Its Effect on Milk Somatic Cell Counts. *Turkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 6(1), 1–6.
49. Fasulkov I. R. (2012). Ultrasonography of the mammary gland in ruminants: a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 15(1), 1–12.
50. Fernandes J. B. C., Zanardo L. G., Galvão N. N., Carvalho I. A., Nero L. A., Moreira M. A. S. (2011). Escherichia coli from clinical mastitis: Serotypes and virulence factors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(6), 1146–1152.
51. Fessia A. S., Odierno, L. M. (2021). Potential factors involved in the early pathogenesis of Streptococcus uberis mastitis: a review. *Folia Microbiologica*, 66(4), 509–523.
52. Flöck M., Winter P. (2006). Diagnostic ultrasonography in cattle with diseases of the mammary gland. *The Veterinary Journal*, 171(2), 314–321.
53. Fontes P. L. P., Oosthuizen N. (2022). Applied Use of Doppler Ultrasonography in Bovine Reproduction. *Frontiers in Animal Science*, 3, 912854.
54. Forbes D. (1969). The Pathogenesis of Bovine Mastitis. *The Veterinary Bulletin*, 39.
55. Foster R. A. Female Reproductive System and Mammae, in *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, edited by J. F. Zachary, 1169-70, 1181. 6th ed. St. Louis, MO: Elsevier, 2017.
56. Fox L. K. (2012). Mycoplasma Mastitis Causes, Transmission, and Control. *Veterinary Clinics of North America*, 28(2), 225-37.
57. Franz S., Floek M., Hofmann-Parisot M. (2009). Ultrasonography of the Bovine Udder and Teat. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(3), 669–685.
58. Fredebeul-Krein F., Schmenger A., Wente N., Zhang Y., Krömker V. (2022). Factors Associated with the Severity of Clinical Mastitis. *Pathogens*, 11(10), 1089.
59. Fuenzalida M. J., Ruegg, P. L. (2019). Negatively controlled, randomized clinical trial to evaluate use of intramammary ceftiofur for treatment of nonsevere culture-negative clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 102, 3321–3338.
60. Fulton R. M. (2013). Focused-basic ultrasound principles and artifacts. *Focused Ultrasound Techniques for the Small Animal Practitioner*, 1–16.
61. Ganda E. K., Bisinotto R. S., Decter D. H., Bicalho R. C. (2016). Evaluation of an On-Farm Culture System (Accumast) for Fast Identification of Milk Pathogens Associated with Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Plos One*, 11(5), e0155314.
62. Garcia A. (2004). Contagious vs. Environmental Mastitis. *South Dakota State University Extension Extra Archives*, 126.

63. Gnemmi G., Gardón J. C., Maraboli, C. (2020). Ultrasonography in Bovine Gynecology. *Biotechnologies Applied to Animal Reproduction*, 21–40.
64. Godkin M. A., Leslie, K. E. (1993). Culture of bulk tank milk as a mastitis screening test: A brief review. *The Canadian Veterinary Journal*, 34(10), 601.
65. Gomes F., Henriques, M. (2015). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology* 2015 72:4, 72(4), 377–382.
66. Gonçalves J. L., Kamphuis C., Martins C. M. M. R., Barreiro J. R., Tomazi T., Gameiro A. H., Hogeveen H., dos Santos M. V. (2018). Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. *Livestock Science*, 210, 25–32.
67. Gorewit R. C., National Research Council (US) Committee on Technological Options to Improve the Nutritional Attributes of Animal Products. *Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace*. Washington (DC), National Academies Press (US), 1988.
68. Goulart D. B., Mellata, M. (2022). Escherichia coli Mastitis in Dairy Cattle: Etiology, Diagnosis, and Treatment Challenges. *Frontiers in Microbiology*, 13, 928346.
69. Green M. J., Green L. E., Cripps P. J. (1997). Comparison of fluid and flunixin meglumine therapy in combination and individually in the treatment of toxic mastitis. *Veterinary Record*, 140(6), 149–152.
70. Grogan S. P., Mount C. A. *Ultrasound Physics and Instrumentation*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
71. Gruet P., Maincent P., Berthelot X., Kaltsatos V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(3), 245–259.
72. Hamadani H., Khan A. A., Fazili M. R. (2023). A Study on the Presence of Supernumerary Teats in Dairy Cattle. *Indian Journal of Animal Production and Management*, 37(3), 204–207.
73. Hamann J., Zacconi A. (1998). Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator. *Bulletin of International Dairy Farm*, 334.
74. Heuer H., Schmitt H., Smalla K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 236–243.
75. Hiitiö H., Simojoki H., Kalmus P., Holopainen J., Pyörälä S., Taponen, S. (2016). The effect of sampling technique on PCR-based bacteriological results of bovine milk samples. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6532–6541.

76. Hillerton J. E., Semmens J. E. (1999). Comparison of Treatment of Mastitis by Oxytocin or Antibiotics Following Detection According to Changes in Milk Electrical Conductivity Prior to Visible Signs. *Journal of Dairy Science*, 82(1), 93–98.
77. Hogeveen H., Huijps K., Lam T. J. G. M. (2011). Economic aspects of mastitis: New developments. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(1), 16–23.
78. Hospido A., Sonesson U. (2005). The environmental impact of mastitis: a case study of dairy herds. *Science of The Total Environment*, 343(1–3), 71–82.
79. Huey S., Kavanagh M., Regan A., Dean M., McKernan C., McCoy F., Ryan E. G., Caballero-Villalobos J., McAloon C. I. (2021). Engaging with selective dry cow therapy: understanding the barriers and facilitators perceived by Irish farmers. *Irish Veterinary Journal*, 74(1), 1–13.
80. Huxley J. N., Green M. J., Green L. E., Bradley A. J. (2002). Evaluation of the Efficacy of an Internal Teat Sealer During the Dry Period. *Journal of Dairy Science*, 85(3), 551–561.
81. Ibrahim N. (2017). Review on Mastitis and Its Economic Effect. *Canadian Journal of Scientific Research*, 6(1), 13–22.
82. Islam M. (2011). Subclinical mastitis in dairy cows in selected areas of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 9(1), 73–78.
83. Islam M., Hoque M., Rima U., Fatema B., Aziz F., Faruk M., Akter M. R. (2000). Gangrenous mastitis in cows: pathological, microbiological and surgicotherapeutical investigation. *Journal of Soil and Nature*, 2 (3), 29–36.
84. Ismail Z. B. (2017). Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Veterinary World*, 10(9), 1057.
85. Jain N. C. (1979). Common Mammary Pathogens and Factors in Infection and Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 62(1), 128–134.
86. Jalakas M., Saks P., Klaassen M. (2000). Suspensory apparatus of the bovine udder in the estonian black and white holstein breed: Increased milk production (udder mass) induced changes in the pelvic structure. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 29(1), 51–62.
87. Jamali H., Barkema H. W., Jacques M., Lavallée-Bourget E. M., Malouin F., Saini V., Stryhn H., Dufour, S. (2018). Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 4729–4746.

88. Jaswal S., Jena M. K., Anand V., Jaswal A., Kancharla S., Kolli P., Mandadapu G., Kumar S., Mohanty A. K. (2022). Critical Review on Physiological and Molecular Features during Bovine Mammary Gland Development: Recent Advances. *Cells*, *11*(20), 3325.
89. Joarder Y. A. (2020). Uplifted Tissue Characterization and Classification of Fatty Liver Disease from Ultrasound Images. *Journal of Image Processing & Pattern Recognition Progress*, *3*.
90. Kabelitz T., Aubry E., van Vorst K., Amon T., Fulde M. (2021). The Role of *Streptococcus* spp. in Bovine Mastitis. *Microorganisms*, *9*(7).
91. Keane O. M., Budd K. E., Flynn J., McCoy F. (2013). Increased detection of mastitis pathogens by real-time PCR compared to bacterial culture. *Veterinary Record*, *173*(11), 268.
92. Keefe G. P. (1997). *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *The Canadian Veterinary Journal*, *38*(7), 429.
93. Kerr D. M., Middleton, W. D. (2020). Reflections on the Ultrasound Mirror Image Artifact. *Ultrasound Quarterly*, *36*(4), 287–299.
94. Kibebew K. (2017). Bovine Mastitis: A Review of Causes and Epidemiological Point of View. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, *7*(2).
95. Kirberger R. M. (1995). Imaging Artifacts in Diagnostic Ultrasound - A Review. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, *36*(4), 297–306.
96. Kivaria F. M., Noordhuizen J. P. T. M., Nielen M. (2007). Interpretation of California mastitis test scores using *Staphylococcus aureus* culture results for screening of subclinical mastitis in low yielding smallholder dairy cows in the Dar es Salaam region of Tanzania. *Preventive Veterinary Medicine*, *78*, 274–285.
97. Kossoff G., Eng Ds. (2000). Basic Physics and Imaging Characteristics of Ultrasound. *World Journal of Surgery*, *24*(2), 134–142.
98. Kremkau F. W., Taylor K. J. W. (1986). Artifacts in ultrasound imaging. *Journal of Ultrasound in Medicine: Official Journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*, *5*(4), 227–237.
99. Krömker V., Leimbach S. (2017). Mastitis treatment—Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, *52*, 21–29.

100. Lago A., Godden S. M., Bey R., Ruegg, P. L., & Leslie, K. (2011). The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *Journal of Dairy Science*, 94, 4441–4456.
101. Laing F. C., Kurtz A. B. (1982). The importance of ultrasonic side-lobe artifacts. *Radiology*, 145(3), 763–768.
102. Laugier P., Haïat, G. (2011). Introduction to the Physics of Ultrasound. *Bone Quantitative Ultrasound*, 29–45.
103. Lawrence J. P. (2007). Physics and instrumentation of ultrasound. *Critical Care Medicine*, 35(8 SUPPL.).
104. Leighton T. G. (2007). What is ultrasound? *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 93(1–3), 3–83.
105. Leitner G., Lavon Y., Matzrafi Z., Benun O., Bezman D., Merin U. (2016). Somatic cell counts, chemical composition and coagulation properties of goat and sheep bulk tank milk. *International Dairy Journal*, 58, 9–13.
106. Lindquist E., Lobetti R., McFadden D., Ondreka-Eley N., Roth A. (2021). Abdominal ultrasound image quality is comparable among veterinary sonographers with varying levels of expertise for healthy canine and feline patients. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 62(6), 705–710.
107. Littmann L. (2021). Electrocardiographic artifact. *Journal of Electrocardiology*, 64, 23–29.
108. Liu D. (1996). Streptococcus. *Laboratory Models for Foodborne Infections*, 223–234.
109. Malhotra N., Shah P., Kumar P., Acharya P., Panchal S., Malhotra J. (2014). *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, JP Medical Ltd, 908.
110. Malone E., Norton E., Dobbs E., Ezzo A. *Large Animal Surgery - Supplemental Notes* (2019), University of Minnesota Libraries.
111. by Erin Malone, DVM, PhD; Elaine Norton, DVM PhD; Erica Dobbs, DVM; and Ashley Ezzo,
112. Martin K. (2019) *Diagnostic Ultrasound, Third Edition: Physics and Equipment* (3rd ed.), Taylor & Francis Ltd.
113. Mattoon J. S., Nyland T. G. (2016). *Trattato di Ecografia del Cane e del Gatto* (3rd ed.), Edra-EV, maggio 2023.

114. Maunsell F. P., Woolums A. R., Francoz D., Rosenbusch R. F., Step D. L., Wilson D. J., Janzen, E. D. (2011). Mycoplasma bovis infections in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), 772–783.
115. McDougall S., Clausen L. M., Hussein H. M., Compton C. W. R. (2022). Therapy of Subclinical Mastitis during Lactation. *Antibiotics 2022, Vol. 11, Page 209, 11(2)*, 209.
116. Miltenburg J. D., De Lange D., Crauwels A. P. P., Bongers J. H., Tielen M. J. M., Schukken Y. H., Elbers A. R. W. (1996). Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands. *The Veterinary Record*, 139(9), 204–207.
117. Moroni M., Antinori S., Mastroianni C. M., Vullo V. (2020). *Manuale di malattie infettive* (3<sup>a</sup> edizione). Edra.
118. Mostafizur Rahaman Sumon S. M., Parvin S., Ehsan A., Islam T. (2020). Relationship between somatic cell counts and subclinical mastitis in lactating dairy cows. *Veterinary World*, 13(8), 1709.
119. Muça M., Currò F., Sachs C., Campo I. (2021). Grayscale ultrasound artifacts. *Imaging in Nephrology*, 25–42.
120. Neave F. K., Dodd F. H., Kingwill R. G., Westgarth D. R. (1969). Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *Journal of Dairy Science*, 52(5), 696–707.
121. Neeser N. L., Hueston W. D., Godden S. M., Bey R. F. (2006). Evaluation of the use of an on-farm system for bacteriologic culture of milk from cows with low-grade mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(2), 254–260.
122. Nicholas R. A. J., Ayling, R. D. (2003). Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Science*, 74(2), 105-112.
123. Nichols S. (2022). Chronic Udder Abscess, *Comparative Veterinary Anatomy*, Academic Press, pages 1236-1241.
124. Nielen M., Deluyker H., Schukken Y. H., Brandl A. (1992). Electrical Conductivity of Milk: Measurement, Modifiers, and MetaAnalysis of Mastitis Detection Performance. *Journal of Dairy Science*, 75, 606–614.
125. Nishimura M., Yoshida T., El-Khodery S., Miyoshi M., Furuoka H., Yasuda J., Miyahara K. (2011). Ultrasound imaging of mammary glands in dairy heifers at different stages of growth. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73, 19–24.

126. Norberg E., Hogeveen H., Korsgaard I. R., Friggens N. C., Sloth K. H. M. N., Løvendahl P. (2004). Electrical Conductivity of Milk: Ability to Predict Mastitis Status. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 1099–1107.
127. Oglat A. A., Alshipli M., Sayah M. A., Ahmad M. S. (2020). Artifacts in Diagnostic Ultrasonography. *Journal for Vascular Ultrasound*, 44(4), 212–219.
128. Oliver S. P., Pighetti G. M. (2002). Mastitis Pathogens - Environmental Pathogens. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 1728–1734.
129. Owens W. E., Watts J. L., Boddie R. L., Nickerson S. C. (1988). Antibiotic Treatment of Mastitis: Comparison of Intramammary and Intramammary Plus Intramuscular Therapies. *Journal of Dairy Science*, 71(11), 3143–3147.
130. Paape M. J., Shafer-Weaver K., Capuco A. V., Van Oostveldt K., Burvenich C. (2000). Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 480, 259–277.
131. Paduch J. H., Mohr E., Krömker, V. (2013). The association between bedding material and the bacterial counts of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and coliform bacteria on teat skin and in teat canals in lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Research*, 80(2), 159–164.
132. Pandey Y., Taluja J. S., Vaish R., Pandey A., Gupta N., Kumar, D. (2018). Gross anatomical structure of the mammary gland in cow. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(4), 728–733.
133. Parker K. I., Compton C., Anniss F. M., Weir A., Heuer C., McOougall S. (2007). Subclinical and Clinical Mastitis in Heifers Following the Use of a Teat Sealant *Precalving*. *Journal of Dairy Science*, 90(1), 207–218.
134. Patey S. J., Corcoran, J. P. (2021). Physics of ultrasound. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 22(1), 58–63.
135. Persson Y., Olofsson I. (2011). Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), 15.
136. Petersson-Wolfe C. S., Currin J. F. (2012). *Streptococcus dysgalactiae: A Practical Summary for Controlling Mastitis*. Virginia Cooperative Extension, DASC-5P.
137. Petersson-Wolfe C. S., Mullarky I. K., Jones G. M. (2010). *Staphylococcus aureus Mastitis: Cause, Detection, and Control*. Virginia Cooperative Extension, 404-229.

138. Piessens V., De Vliegher S., Verbist B., Braem G., Van Nuffel A., De Vuyst L., Heyndrickx M., Van Coillie E. (2012). Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative Staphylococcus species causing bovine intramammary infections. *Veterinary Microbiology*, 155(1), 62–71.
139. Poli G., Dall'Ara P., Martino P. A. (2017). *Microbiologia e immunologia veterinaria* (3a ed.). Edra.
140. Powles A. E., Martin D. J., Wells I. T., Goodwin C. R. (2018). Physics of ultrasound. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 19(4), 202–205.
141. Pyörälä S. (2002). New strategies to prevent mastitis. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(4), 211–216.
142. Pyörälä S., Taponen, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci - Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 3–8.
143. Rainard P., Gilbert F. B., Germon, P. (2022). Immune defences of the mammary gland epithelium of dairy ruminants. *Frontiers in Immunology*, 13, 1031785.
144. Rainard P., Foucras G., Fitzgerald J. R., Watts J. L., Koop G., Middleton, J. R. (2018). Knowledge gaps and research priorities in Staphylococcus aureus mastitis control. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 149–165.
145. Reef, V. B. (1998). *Equine diagnostic ultrasound*. Saunders Company, 560.
146. Reneau J. K., Seykora A. J., Heins B. J., Endres M. I., Farnsworth R. J., Bey R. F. (2005). Association between hygiene scores and somatic cell scores in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(8), 1297–1301.
147. Riekerink R. G. M. O., Barkema H. W., Kelton D. F., Scholl D. T. (2008). Incidence Rate of Clinical Mastitis on Canadian Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1366–1377.
148. Rindsig R. B., Rodewald R. G., Smith A. R., Spahr S. L. (1978). Complete Versus Selective Dry Cow Therapy for Mastitis Control. *Journal of Dairy Science*, 61(10), 1483–1497.
149. Romero G., Díaz J. R., Sabater J. M., Perez C. (2012). Evaluation of Commercial Probes for On-Line Electrical Conductivity Measurements during Goat Gland Milking Process. *Sensors*, 12(4), 4493–4513.
150. Royster E., Wagner S. (2015). Treatment of Mastitis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 31(1), 17–46.
151. Ruegg P. L. (2012). New Perspectives in Udder Health Management. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2), 149–163.



152. Ruegg P. L., Reinemann, D. J. (2002). Milk quality and mastitis tests. *The Bovine Practitioner*, 41–54.
153. Saleh T. F. (2018). Anatomical and histological study in the udder of local Iraqi cattle (Bovidae caprinae). *Basrah Journal of Veterinary Research*, 17(3).
154. Sant'Anna A. C., Paranhos da Costa M. J. R. (2011). The relationship between dairy cow hygiene and somatic cell count in milk. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 3835–3844.
155. Sarti A. (2009). Cenni di fisica degli ultrasuoni. *Ecocardiografia per l'intensivista*, Springer-Verlag.
156. Scherpenzeel C. G. M., Tijds S. H. W., den Uijl I. E. M., Santman-Berends I. M. G. A., Velthuis A. G. J., Lam, T. J. G. M. (2016). Farmers' attitude toward the introduction of selective dry cow therapy. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 8259–8266.
157. Schmenger, A., & Krömker, V. (2020). Characterization, Cure Rates and Associated Risks of Clinical Mastitis in Northern Germany. *Veterinary Science*, 7(4), 170.
158. Schreiner D. A., Ruegg P. L. (2003). Relationship Between Udder and Leg Hygiene Scores and Subclinical Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 86(11), 3460–3465.
159. Seykora A. J., McDaniel B. T. (1985). Udder and Teat Morphology Related to Mastitis Resistance: A Review. *Journal of Dairy Science*, 68(8), 2087–2093.
160. Sharif A., Umer M., Muhammad G. (2009). Mastitis control in dairy production. *J. Agric. Soc. Sci*, 5, 102–105.
161. Sharma N., Pandey V., Sudhan N. A. (2010). Comparison of some indirect screening tests for detection of subclinical mastitis in dairy cows. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 13(2), 98–103.
162. Shen J., Zhang X., Kumagai R., Prasad A., Kasai S. (2017). Somatic cell counts in bulk milk and their importance for milk processing. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 85(1), 012085.
163. Sinha R., Sinha B., Kumari R., Vineeth M. R., Shrivastava K., Verma A., Gupta I. D. (2022). Udder and teat morphometry in relation to clinical mastitis in dairy cows. *Tropical Animal Health and Production*, 54(2), 1–7.
164. Soltau J. B., Einax E., Klengel K., Katholm J., Failing K., Wehrend A., Donat K. (2017). Within-herd prevalence thresholds for herd-level detection of mastitis pathogens using multiplex real-time PCR in bulk tank milk samples. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 8287–8295.

165. Sordillo L. M., Streicher K. L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(2), 135–146.
166. Spattini G. (2008). Gli artefatti in ecografia veterinaria: come riconoscerli e correggerli. *Veterinaria*, 1, 9–20.
167. Spencer S. B. (1989). Recent Research and Developments in Machine Milking - A Review. *Journal of Dairy Science*, 72, 1907–1917.
168. Suzuki N., Kurose T., Kaneko S., Haraguchi A., Isobe N. (2020). Outcome prediction from the first examination in clinical mastitis using ultrasonography in dairy cows. *Animal Science Journal*, 91(1), e13452.
169. Szabo T. L., Lewin P. A. (2013). Ultrasound transducer selection in clinical imaging practice. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 32(4), 573–582.
170. Taponen S., Salmikivi L., Simojoki H., Koskinen M. T., Pyörälä, S. (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2610-7.
171. Tascini C., Sozio E., Viaggi B., Meini S. (2016). Reading and understanding an antibiogram. *Italian Journal of Medicine*, 10(4), 289–300.
172. Themistokleous K. S., Sakellariou N., Kiossis E. (2022). A deep learning algorithm predicts milk yield and production stage of dairy cows utilizing ultrasound echotexture analysis of the mammary gland. *Computers and Electronics in Agriculture*, 198, 106992.
173. Thorberg B. M., Danielsson-Tham M. L., Emanuelson U., Persson Waller K. (2009). Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4962-70.
174. Tommasoni C., Fiore E., Lisuzzo A., Gianesella, M. (2023). Mastitis in Dairy Cattle: On-Farm Diagnostics and Future Perspectives. *Animals 2023*, Vol. 13, Page 2538, 13(15), 2538.
175. Touza-Otero L., Landin M., Diaz-Rodriguez, P. (2023). Fighting antibiotic resistance in the local management of bovine mastitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 170, 115967.
176. Trostle S, O' Brien R. (1998). Ultrasonography of the bovine mammary gland. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 20, 64–71.

177. Tsegaye Lakew, B., Fayera, T., & Muktar Ali, Y. (2019). Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia. *Tropical Animal Health Production*, 51(6), 1507-1513.
178. Turk, R., Koledić, M., Maćešić, N., Benić, M., Dobranić, V., Đuričić, D., Cvetnić, L., & Samardžija, M. (2017). The role of oxidative stress and inflammatory response in the pathogenesis of mastitis in dairy cows. *Mljekarstvo: Časopis Za Unaprjeđenje Proizvodnje i Prerade Mlijeka*, 67(2), 91–101.
179. Vang A. L., Bresolin T., Frizzarini W. S., Menezes G. L., Cunha T., Rosa G. J. M., Hernandez L. L., Dorea J. R. R. (2023). Longitudinal analysis of bovine mammary gland development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 28(1), 1–11.
180. Wagner S. A., Apley M. D. (2004). Effects of two anti-inflammatory drugs on physiologic variables and milk production in cows with endotoxin-induced mastitis. *American Journal of Veterinary Research*, 65(1), 64–68.
181. Wellenberg G. J., Van Der Poel W. H. M., Van Oirschot J. T. (2002). Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, 88(1), 27-45.
182. Werner, C., Sobiraj, A., & Sundrum, A. (2010). Efficacy of homeopathic and antibiotic treatment strategies in cases of mild and moderate bovine clinical mastitis. *Journal of Dairy Research*, 77(4), 460-7.
183. Wichmann F., Udikovic-Kolic N., Handelsman A. S. (2014). Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure. *MBio*, 5(2), 1017–1030.
184. Williams D. (2012). The physics of ultrasound. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 13(6), 264–268.
185. Zander D., Hüske S., Hoffmann B., Cui X. W., Dong Y., Lim A., Jenssen C., Löwe A., Koch J. B. H., Dietrich C. F. (2020). Ultrasound Image Optimization (“Knobology”): B-Mode. *Ultrasound International Open*, 6(1), E14.
186. Zeconi, A. (2010). *Staphylococcus aureus* mastitis: what we need to know to control them. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 65(3).
187. Zeconi A., Mota-Rojas, D., Napolitano F., Chay-Canul A., Ghezzi M., Braghieri A., Domínguez-Oliva A., Bragaglio A., Álvarez-Macías A., Olmos-Hernández A., De Rosa G., García-Herrera R., Lendez P., Pacelli C., Bertoni A., Barile V. L. (2024). Anatomy and Physiology of Water Buffalo Mammary Glands: an anatomofunctional comparison with Dairy Cattle. *Animals 2024, Vol. 14, Page 1066, 14(7)*, 1066.

188. Zehner M. M., Farnsworth R. J., Appleman R. D., Larntz K., Springer J. A. (1986). Growth of Environmental Mastitis Pathogens in Various Bedding Materials. *Journal of Dairy Science*, 69(7), 1932–1941.
189. Zigo F., Vasil' M., Ondrašovičová S., Výrostková J., Bujok J., Pecka-Kielb E. (2021). Maintaining Optimal Mammary Gland Health and Prevention of Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 607311.
190. Ziskin M. C. (1993). Fundamental physics of ultrasound and its propagation in tissue. *RadioGraphics*, 13(3), 705–709.
191. Ziv G. (1980). Drug selection and use in mastitis: systemic vs local therapy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 176, 1109–1115.

## 11. SITOGRAFIA

1. Arrigoni N., Diegoli G., Lanza G. (2023). *Linee guida - Uso prudente dell'antibiotico nell'allevamento bovino da latte.*  
[https://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_3347\\_allegato.pdf](https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_3347_allegato.pdf)
2. Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare,  
<https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/antimicrobial-resistance>
3. Bulletin of International Dairy Federation, n. 338-1999,  
<https://shop.fil-idf.org/products/suggested-interpretation-of-mastitis-terminology-instruments-for-mechanical-tests-of-milking-machines-mastitis-newsletter-n23>
4. Canny G., Jones B. (2022). *The use of bacterial culture for an on-farm method of determining mastitis causing pathogens*  
<https://texasdairymatters.tamu.edu/files/2022/03/On-farm-bacterial-culture-for-determining-mastitis-causing-pathogens.pdf>
5. Cornell, College of Veterinary Medicine, Animal Health Diagnostic Center  
<https://www.vet.cornell.edu/animal-health-diagnostic-center/testing/testing-protocols-interpretations/streptococcus-agalactiae-strep-ag>
6. European Medicine Agency, Categorisation of antibiotics in the European Union,  
<https://www.ema.europa.eu>
7. Hillerton J. E., & Booth, J. M. (2018). *The Five-Point Mastitis Control Plan-A Revisory Tutorial!*  
<https://www.ruminantia.it/wp-content/uploads/2018/03/NATIONAL-MASTITIS-COUNCIL-2018.pdf>
8. Istituto Superiore di Sanità, EpiCentro, <https://www.epicentro.iss.it/infettive>
9. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, [www.izslt.it](http://www.izslt.it)
10. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna,  
[www.izsler.it](http://www.izsler.it)
11. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, [www.izs-sardegna.it](http://www.izs-sardegna.it)
12. Ministero della Salute  
<https://www.salute.gov.it/portale/medicinaliVeterinari>  
<https://www.salute.gov.it/portale/antibioticoresistenza>
13. World Health Organization (WHO), <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>

## **12. FONTI NORMATIVE**

Art. 107, 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.

Art. 29, Decreto Legislativo 7 dicembre 2023, n. 218, riguardante l'impiego degli antimicrobici.

Regolamenti (CE) 853 e 854/2004, norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.

## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero esprimere la mia più profonda gratitudine ai miei genitori, per il loro supporto incondizionato da tutti i punti di vista. Grazie per avermi permesso di seguire i miei sogni e aver assecondato i miei desideri, senza di voi tutto questo non sarebbe stato possibile.

Un ringraziamento speciale va a mia sorella, il mio braccio destro, che ha sempre saputo capirmi al volo e mi ha spianato la strada con mamma e papà. Il tuo sostegno e la tua comprensione sono stati fondamentali in questo percorso.

Un pensiero alle mie montagne e a quella vita genuina trascorsa in mezzo agli animali e tra i boschi. Questi luoghi mi hanno instillato la passione per gli animali da reddito, in particolare per le mie adorate vacche, e mi hanno spinto a intraprendere la strada della Medicina Veterinaria. La bellezza e la serenità di questi luoghi mi hanno sempre ispirato e motivato, fornendomi la pace necessaria per affrontare le sfide che si sono presentate lungo il cammino.

Un ringraziamento particolare va a Chiara, la mia spalla in questo percorso universitario. Mai avrei immaginato di incontrare una persona più testarda di me, una persona con la mia stessa determinazione, che riesce a capirmi in un attimo perché la sua mente funziona proprio come la mia. Ringrazio la vita per avermi donato un'amica così preziosa che mi ha sempre spinto a dare il meglio di me, anche nei momenti più difficili.

Un grazie di cuore anche agli amici dell'università. Sono tanti, ma quando leggeranno queste parole sapranno benissimo che sto parlando di loro. La vostra amicizia e il vostro supporto hanno reso questo viaggio indimenticabile.

Infine, un ringraziamento speciale va ai professori Giancesella e Fiore, a Chiara e Anastasia per la loro pazienza e disponibilità. Grazie per avermi fatta entrare in questo team, per le tirate di orecchie e per i preziosi consigli, aver potuto imparare da voi è stato un gran privilegio.