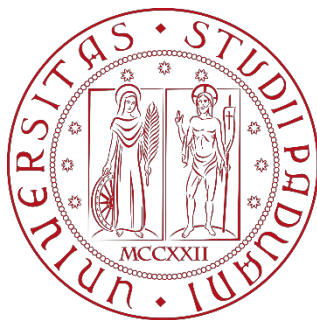




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

**UTILIZZO DELL'EMOGAS-ANALISI IN CORSO DI
MASTITE NELLA BOVINA DA LATTE**

Relatore:

Prof. Matteo Giancesella

Correlatrici:

dott.ssa Giorgia Taio

dott.ssa Chiara Tommasoni

Laureando:

Andrea Cosaro

Matricola n. 2019920

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

INDICE

1.	RIASSUNTO	1
2.	ABSTRACT.....	3
3.	PREMESSA.....	5
4.	INTRODUZIONE.....	7
4.1	MASTITI NELLA BOVINA DA LATTE	7
4.1.1	Anatomia della ghiandola mammaria	8
4.1.2	Patogenesi	9
4.1.3	Classificazione	11
4.1.4	Principali patogeni responsabili di mastite	14
4.1.5	Diagnostica.....	20
4.1.6	Prevenzione e controllo	25
4.1.7	Terapia	26
4.2	EMOGASANALISI	32
4.2.1	Equilibrio acido-base	33
4.2.2	Modelli interpretativi.....	34
4.2.3	Alterazioni dell'equilibrio acido-base	39
4.2.4	Principali applicazioni in buiatria	45
5.	OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	49
6.	MATERIALI E METODI	51
6.1	DESCRIZIONE DELL'ALLEVAMENTO OGGETTO DI STUDIO	51
6.2	DESCRIZIONE DEL PROTOCOLLO E CRITERI DI INCLUSIONE.....	51
6.2.1	Esame clinico.....	52
6.2.2	Campionamento sterile del latte.....	52
6.2.3	Analisi del latte.....	53
6.2.4	Emogasanalisi	54
6.3	ELABORAZIONE DATI E ANALISI STATISTICA.....	56
7.	RISULTATI	59
8.	DISCUSSIONE	75
9.	CONCLUSIONI.....	81
10.	BIBLIOGRAFIA	83
11.	SITOGRAFIA E FONTI NORMATIVE.....	95

1. RIASSUNTO

La mastite rappresenta una delle principali criticità nell'allevamento della bovina da latte, sia per le ripercussioni sul benessere e sulla salute dell'animale, sia per le conseguenze economiche che comporta per l'allevatore. La diagnosi tempestiva e accurata è essenziale per limitare la diffusione nella mandria e intraprendere il giusto piano terapeutico. Lo studio si propone come principale obiettivo la valutazione del potenziale applicativo dell'emogasanalisi nella diagnosi di forme lievi di mastiti cliniche.

La prova è stata condotta reclutando bovine di razza Frisona Italiana provenienti da un'unica azienda del Nord-Italia. Il protocollo prevedeva un intervento settimanale, pertanto, al momento dell'intervento (3 ore dopo la mungitura), venivano arruolati tutti gli animali che, in seguito alla valutazione dell'allevatore, avevano manifestato una sintomatologia riconducibile a una forma lieve di mastite clinica durante la mungitura della mattina stessa.

Per ciascun animale sono stati previsti due interventi: il primo intervento a T_0 (il giorno della diagnosi) e il secondo a distanza di 7 giorni (T_1). In entrambi gli interventi sono stati effettuati: esame clinico per confermare il grado lieve della mastite; esame batteriologico e conta delle cellule somatiche (SCC); emogasanalisi in campo. Sono stati esclusi dallo studio animali con forme di mastite moderate o gravi, animali con casi di mastite ripetuti durante il periodo di prova, animali con altri concomitanti processi patologici differenti dalla mastite e animali già in trattamento farmacologico antibiotico al momento dell'intervento.

Ai fini dello studio sono stati considerati gli animali che hanno confermato in entrambe le tempistiche di campionamento la positività per Stafilococchi coagulasi negativi (SCN), suddividendoli in 2 gruppi: gruppo SCN_BASSO, n. 45 animali (SCC < 200.000 ed esame batteriologico positivo per SCN a T_0 e a T_1); gruppo SCN_ALTO, n.12 animali (SCC > 200.000 ed esame batteriologico positivo per SCN a T_0 e a T_1).

È stato inoltre inserito un terzo gruppo controllo NEGATIVO, n.6 animali (con esame batteriologico negativo a T_0 e a T_1 , SCC < 200.000 ed assenza di sintomatologia clinica rilevabile).

In seguito all'analisi statistica condotta sono emerse diverse alterazioni elettrolitiche, in particolare i livelli di K^+ e Cl^- si sono dimostrati più elevati negli individui affetti da mastite. I parametri riferiti all'equilibrio acido-base hanno manifestato per gli animali affetti dalla patologia delle variazioni rispetto al range fisiologico suggestive di una condizione di lieve alcalosi metabolica. Infine, è stato rilevato negli animali malati un aumento del valore dei parametri renali (urea, creatinina e BUN) e dei livelli di lattato ematico, che potrebbe essere ricondotto ad un'alterazione della perfusione conseguente ad un fenomeno di disidratazione.

Pertanto l'emogasanalisi può essere considerato un buono strumento per la diagnosi di tale patologia e al contempo per la valutazione di diversi indicatori prognostici, seppur necessari di futuri studi che ne confermino l'affidabilità, ne definiscano i limiti e ne standardizzino l'applicazione in ambito clinico.

2. ABSTRACT

Mastitis represents one of the principal challenges in dairy cattle farming, both due to its repercussions on animal welfare and health, and for the economic consequences it entails for the farmer. Timely and accurate diagnosis is essential to limit herd dissemination and to initiate an appropriate therapeutic strategy. The primary objective of this study is the evaluation of the potential applicability of blood gas analysis in the diagnosis of mild forms of clinical mastitis.

The trial was carried out by recruiting Italian Friesian breed dairy cows from a single farm located in Northern Italy. The protocol included a weekly intervention; thus, at the time of intervention (3 hours after milking), all animals which, following evaluation by the farmer, had shown clinical signs attributable to a mild form of clinical mastitis during the morning milking, were enrolled.

Two interventions were scheduled for each animal: the first at T_0 (day of diagnosis) and the second at an interval of 7 days (T_1). During both interventions, the following were performed: clinical examination to confirm the mild degree of mastitis; bacteriological examination and somatic cell count (SCC); blood gas analysis in the field. Animals with moderate or severe forms of mastitis, animals presenting repeated mastitis episodes during the trial period, animals with other concomitant pathological processes different from mastitis, and animals already undergoing antibiotic pharmacological treatment at the time of the intervention were excluded from the study.

For the purposes of this study, animals that confirmed positivity for coagulase-negative staphylococci (CNS) at both sampling times were considered, dividing them into two groups: group SCN_LOW, n. 45 animals (SCC < 200,000 and bacteriological examination positive for CNS at T_0 and T_1); group SCN_HIGH, n. 12 animals (SCC > 200,000 and bacteriological examination positive for CNS at T_0 and T_1).

Moreover, a third NEGATIVE control group was included, n. 6 animals (negative bacteriological examination at T_0 and T_1 , SCC < 200,000, and absence of detectable clinical symptoms).

Following the conducted statistical analysis, various electrolyte alterations emerged, particularly K^+ and Cl^- levels proved to be higher in subjects affected by mastitis. Parameters relating to the acid-base balance in affected animals displayed variations from the physiological range suggestive of a mild metabolic alkalosis condition. Finally, in diseased animals, an increase in renal parameters (urea, creatinine, and BUN) and blood lactate levels was observed, potentially attributable to altered perfusion secondary to a dehydration phenomenon.

Therefore, blood gas analysis can be considered a valid tool for the diagnosis of this pathology as well as for the assessment of several prognostic indicators, although future studies are required to confirm its reliability, define its limitations, and standardize its application in the clinical setting.

3. PREMESSA

La mastite rappresenta una delle principali criticità nell'allevamento della bovina da latte, sia per le ripercussioni sul benessere e sulla salute dell'animale, sia per le conseguenze economiche che comporta per l'allevatore.

La mastite è considerata una "Production disease", ovvero l'insieme di tutte quelle patologie che, comportando un utilizzo inefficiente delle risorse destinate alla produzione di prodotti di origine animale, determinano delle perdite economiche significative. I costi complessivi associati a queste patologie includono oltre alle spese per la prevenzione, le perdite legate a cali produttivi, interventi terapeutici ed eventuale riforma.

In presenza di mastite, l'identificazione precoce della condizione patologica rappresenta un elemento cruciale, in quanto consente di limitare l'evoluzione del processo infiammatorio intervenendo in maniera rapida e mirata preservando lo stato di benessere animale.

In relazione a quanto detto, l'impiego di dispositivi portatili per l'emogasanalisi, con possibilità di utilizzo in condizioni di campo e in tempo reale, offre potenzialità diagnostiche precoci che meritano di essere implementate.

L'emogasanalisi è una metodica già largamente utilizzata nell'identificazione e nella gestione di patologie in ambito zootecnico; in particolare, nei vitelli neonati essa rappresenta una pratica consolidata per la valutazione degli squilibri acido-base comunemente osservati in corso di patologie respiratorie ed enteriche.

Pertanto, gli obiettivi principali di questo studio sono orientati alla valutazione del potenziale applicativo dell'emogasanalisi attraverso l'identificazione di alterazioni metaboliche e sistemiche negli animali affetti da forme lievi di mastite clinica di origine batterica. Al contempo lo studio si propone di valutare la possibile applicazione dell'emogasanalisi come strumento diagnostico precoce o indicatore prognostico.

4. INTRODUZIONE

4.1 Mastiti nella bovina da latte

La mastite è un processo infiammatorio che interessa i tessuti della ghiandola mammaria, causato da traumi fisici, agenti chimici irritanti o infezioni di natura microbica e che si manifesta clinicamente con gonfiore, dolore, edema, infiammazione e fibrosi a carico della ghiandola mammaria. L'eziologia della mastite è di natura multifattoriale e la presenza di numerosi agenti patogeni coinvolti ne rende particolarmente complessa la prevenzione e il controllo (Ashraf and Imran, 2020).

Il trattamento delle forme attive di mastite si basa principalmente sull'impiego di antibiotici. Tuttavia, l'uso intensivo di tali farmaci ha sollevato crescenti preoccupazioni circa lo sviluppo di ceppi batterici resistenti, spingendo il settore lattiero-caseario a ridurre progressivamente il ricorso agli antibiotici (Cheng and Han, 2020), investendo al contempo nello sviluppo di approcci antimicrobici innovativi per contrastare la resistenza batterica (El-Sayed and Kamel, 2021).

Parallelamente allo sviluppo di nuove soluzioni terapeutiche, sono emerse nuove strategie per il controllo della mastite. Le misure preventive e gestionali si articolano su diversi livelli, con un focus specifico sulle condizioni di stabulazione, sull'alimentazione degli animali, sui protocolli applicati durante la mungitura e la fase di asciutta, oltre che sull'impiego di vaccini specifici per la mastite. (El-Sayed and Kamel, 2021).

Il trattamento antibiotico della mastite bovina rappresenta la principale causa di utilizzo di antibiotici nell'industria lattiero-casearia (Pedersen et al., 2021).

Le perdite economiche globali riconducibili a questa patologia sono stimate intorno ai 35 miliardi di dollari ogni anno (Castañeda Vázquez et al., 2013).

La maggior parte delle analisi economiche relative alla mastite si concentra esclusivamente sui costi diretti legati alla patologia, come le perdite produttive, la riforma degli animali e le spese terapeutiche ("Failure Costs"). Tuttavia, è fondamentale considerare anche gli investimenti sostenuti dagli allevatori per il controllo della mastite, ovvero i costi preventivi ("Preventive Costs"), che rappresentano una componente rilevante nella valutazione complessiva dell'onere economico legato alla malattia (van Soest et al., 2016).

Come già evidenziato, oltre alla riduzione quantitativa, un'infezione a livello mammario compromette anche la qualità del latte, influenzando negativamente la resa nella trasformazione casearia. L'infezione determina, infatti, modificazioni significative nelle componenti fondamentali che conferiscono al latte un elevato valore nutrizionale e una buona attitudine alla caseificazione, quali lattosio, caseina, lipidi e sali minerali (Daprà et al., 2006).

Oltre all'impatto economico, la contaminazione del latte da parte di alcuni microrganismi patogeni rappresenta una seria minaccia per la salute pubblica (Castañeda Vázquez et al., 2013).

4.1.1 Anatomia della ghiandola mammaria

Nella bovina, la mammella è costituita da quattro ghiandole mammarie che rappresentano una forma specializzata di ghiandole sudoripare, caratteristiche esclusivamente dei mammiferi euteri. Il prodotto di secrezione di queste ghiandole è il latte. Subito dopo il parto, la prima sostanza secreta è il colostro, ricco di anticorpi che offrono al neonato una protezione immunitaria passiva.

Le quattro ghiandole mammarie che compongono la mammella sono localizzate nell'area inguinale e sono comunemente denominate quarti. Ogni ghiandola mammaria è composta da un capezzolo e da un corpo ghiandolare. Le dimensioni del corpo e la lunghezza del capezzolo variano in base all'individuo e allo stato funzionale della mammella (Budras and Habel, 2003).

La mammella dei mammiferi domestici è formata da un numero variabile di lobi ghiandolari, ciascuno suddiviso in lobuli circondati da tessuto connettivo. All'interno dei lobuli si trovano adenomeri secernenti di tipo tubulo-alveolare. In base alla struttura dei dotti escretori e alla disposizione delle unità ghiandolari, la mammella è classificata come una ghiandola composta ramificata e di tipo tubulo-alveolare. Questa particolare organizzazione del tessuto ghiandolare consente di definirla funzionalmente una ghiandola di accumulo. Infatti, gli adenomeri alveolari presenti formano un sistema comunicante, il cui lume è in grado di accumulare il secreto (latte) per un certo periodo di tempo (Liebich, 2010).

Il latte, prodotto dagli alveoli, viene convogliato nei dotti alveolari e successivamente nei dotti galattofori. L'epitelio dei tratti prossimali dei dotti presenta ancora capacità secernente; tutti i dotti sono circondati da un reticolo lasso di cellule mioepiteliali responsabili del processo di eiezione del latte. Questi ultimi trasportano il secreto verso i dotti collettori, che lo riversano nel seno lattifero (parte ghiandolare). Da lì, il latte passa nel seno papillare e poi nel dotto papillare, da dove viene espulso tramite la suzione del vitello, la mungitura manuale o l'uso della mungitrice. Nel punto di connessione tra la cisterna ghiandolare e la cisterna papillare la mammella presenta strutture definite pliche anulari (Nichols, 2022; Liebich, 2010).

Nel punto di transito tra la cisterna del latte e il dotto papillare (o canale del capezzolo), si trova la cosiddetta "Rosetta di Fürstenberg", una struttura costituita da numerose piccole pieghe che ricordano i petali di un fiore. Queste pieghe si chiudono quando la pressione nella cisterna aumenta durante il riempimento mammario.

Queste strutture, associate ai fasci di fibre muscolari lisce longitudinali e circolari che circondano il canale del capezzolo giocano un ruolo importante nella difesa locale contro la mastite (Pandey, 2018).

L'arteria pudenda esterna rappresenta il principale vaso responsabile dell'irrorazione arteriosa della mammella. Essa decorre attraverso il canale inguinale, accompagnata dalla vena pudenda e da vasi linfatici, per irrorare la porzione cranio-laterale della ghiandola mammaria. Posteriormente, l'arteria pudenda interna si ramifica originando l'arteria perineale ventrale a livello dell'arco ischiatico, proseguendo poi caudalmente verso la vulva, lungo il perineo, fino alla base dei quarti posteriori della mammella.

Il principale sistema di drenaggio venoso è rappresentato invece dalla vena epigastrica superficiale caudale (nota anche come vena addominale sottocutanea o "vena del latte"), situata superficialmente lungo la parete ventrale dell'addome. Essa si dirige cranialmente verso l'orifizio noto come "fontana del latte", attraverso il quale penetra nella cavità addominale per confluire nella vena toracica interna, successivamente nella vena succlavia e infine nella vena cava craniale (Peek and Divers, 2018).

Il complesso mammario viene diviso in due parti, destra e sinistra, da un solco intermammario. La mammella è rivestita da una cute modificata, che nella zona dei capezzoli è priva di peli e ghiandole. L'apparato sospenditore della mammella è costituito da lamine laterali della fascia che attraversano la superficie della mammella, originando dal tendine sinfisario e dal pilastro laterale dell'anello inguinale superficiale, con direzione principalmente cranioventrale. Le lamine mediali separano le due metà della mammella, sono costituite principalmente da tessuto elastico e derivano dal legamento sospenditore pari paramediano. Questo trae origine dalla tonaca addominale gialla, che si trova sulla faccia esterna del tendine prepubico, nel punto di unione con il tendine sinfisario. Dalle lamine laterali e mediali, sottili lamelle sospendorie penetrano nel parenchima mammario, separando il tessuto ghiandolare in lobi (Budras and Habel, 2003).

4.1.2 Patogenesi

La mastite è una condizione infiammatoria che colpisce i tessuti della mammella, compromettendo la produzione di latte e provocando alterazioni patologiche come gonfiore, dolore, edema, infiammazione e fibrosi della ghiandola mammaria (Ashraf and Imran, 2020).

Uno dei primi studiosi della mastite, descrisse lo sviluppo di questa patologia come un processo articolato in tre fasi:

- penetrazione dell'agente patogeno, con o senza instaurarsi dell'infezione
- instaurazione dell'infezione, quando i batteri si stabiliscono nella ghiandola mammaria
- comparsa dell'infiammazione.

Questa sequenza rimane tuttora una base fondamentale per comprendere la patogenesi della mastite (Ruegg, 2017).

Meccanismi difensivi della mammella

La mammella è dotata di specifiche strutture anatomiche e meccanismi di difesa che contribuiscono a limitare l'ingresso di agenti patogeni potenzialmente dannosi. L'orifizio del capezzolo è composto da uno sfintere a muscolatura liscia, la cui funzione principale è mantenere chiuso il canale del capezzolo e impedire la fuoriuscita del latte. Questo meccanismo ha anche un ruolo difensivo, impedendo l'ingresso di agenti patogeni nel canale (Ashraf and Imran, 2020). La conformazione dell'estremità del capezzolo sembra essere associata alla resistenza alla mastite (Seykora and McDaniel, 1985).

La parete interna del capezzolo produce cheratina, una sostanza con proprietà batteriostatiche che agisce come barriera contro i microrganismi. Tuttavia, lesioni al capezzolo possono danneggiare la cheratina o

le membrane mucose che rivestono il seno del capezzolo, aumentando il rischio di penetrazione, colonizzazione e infezione batterica (Ashraf and Imran, 2020).

All'interno della componente cheratinica del capezzolo sono stati identificati composti con attività antimicrobica:

- Alcuni acidi grassi: l'acido miristico, l'acido palmitoleico e l'acido linoleico mostrano proprietà batteriostatiche.
- Proteine cationiche: sono presenti nel canale del capezzolo e possono legarsi elettrostaticamente ai patogeni responsabili della mastite, modificandone la parete cellulare e rendendoli più vulnerabili alla pressione osmotica (Sordillo et al., 1997).

Quando i microrganismi riescono a superare la barriera costituita dal canale del capezzolo, si trovano ad affrontare il sistema immunitario umorale e cellulare, che nella maggior parte dei casi riesce a neutralizzare gli agenti invasori.

Non è ancora del tutto chiaro perché, in alcune situazioni, si manifesti un'inflammatione clinica. Tuttavia, si ipotizza che una temporanea riduzione dell'efficienza del sistema immunitario, forse causata da situazioni di stress, possa rendere la ghiandola più vulnerabile a infezioni batteriche e determinare la conseguente risposta infiammatoria. In tali condizioni, anche microrganismi poco virulenti possono superare le difese immunitarie e provocare i sintomi tipici della mastite. Un'inefficienza persistente del sistema immunitario mammario può inoltre favorire la ricomparsa frequente di stati infiammatori cronici (Targowski, 1983).

L'immunità innata, nota anche come non specifica, costituisce la prima barriera difensiva dell'organismo. Nel caso della ghiandola mammaria, questa difesa è garantita da strutture fisiche del capezzolo, dalla presenza di cellule come neutrofili, macrofagi e natural killer (NK), nonché da molecole solubili come citochine, sistema del complemento e anticorpi. Questo tipo di risposta immunitaria si attiva rapidamente, entro poche ore dall'ingresso dell'agente infettivo, anche se presenta una specificità limitata (Sordillo and Streicher, 2002).

I principali fagociti coinvolti nella risposta immunitaria sono i leucociti polimorfonucleati (PMN) e i macrofagi. Durante le fasi iniziali del processo infiammatorio, i neutrofili rappresentano la tipologia cellulare più abbondante nei tessuti e nelle secrezioni della ghiandola mammaria, arrivando a costituire oltre il 90% dei leucociti totali presenti (Sordillo et al., 1997).

In un quarto mammario affetto da mastite clinica, si riscontrano comunemente fino a 50 milioni di neutrofili per millilitro di latte (Paape et al., 1979).

Queste cellule, prive di specificità antigenica, migrano dal circolo sanguigno verso la mammella in risposta a diversi mediatori dell'inflammatione, tra cui citochine, componenti del complemento e prostaglandine.

La popolazione cellulare prevalente nel tessuto e nel latte di ghiandole mammarie sane, sia in fase di involuzione che durante la lattazione è rappresentata dai macrofagi. Come anche i neutrofili, i macrofagi svolgono una intensa attività di fagocitosi che può aumentare in modo significativo quando sono presenti

anticorpi opsonizzanti specifici per determinati patogeni. Oltre al loro ruolo nei meccanismi di difesa innati, i macrofagi svolgono una funzione cruciale nell'elaborazione e presentazione degli antigeni; nei meccanismi di difesa innati troviamo anche le cellule NK (natural killer) che possiedono capacità citotossiche (Sordillo et al., 1997).

Quando l'agente patogeno riesce a superare le difese innate aspecifiche, entra in azione il sistema immunitario adattativo. Quest'ultimo si caratterizza per un'elevata specificità nel riconoscimento del microorganismo e per la capacità di sviluppare una memoria immunologica, che consente una risposta più rapida ed efficiente in caso di successive esposizioni allo stesso patogeno. I principali attori di questa risposta sono i linfociti T (sia T helper (CD4⁺) sia T citotossici (CD8⁺)) insieme alle cellule presentanti l'antigene (APC) (Bonilla and Oettgen, 2010).

La presenza di immunoglobuline (IgG, IgA, IgM) nelle secrezioni della ghiandola mammaria è stata ampiamente documentata. Tra le principali funzioni biologiche di queste immunoglobuline, l'opsonizzazione riveste un ruolo centrale, poiché favorisce l'attività fagocitaria da parte dei macrofagi e dei leucociti polimorfonucleati. Le immunoglobuline, in particolare la classe IgG, sono in grado di svolgere un'azione di opsonizzazione legandosi a specifici siti antigenici presenti sulla superficie batterica.

I complessi formati dall'interazione tra anticorpi e antigeni (immunocomplessi) tendono generalmente a reagire con il sistema del complemento (Targowski, 1983).

Essendo la mastite una patologia multifattoriale che non dipende esclusivamente dal microorganismo coinvolto, l'intensità della risposta infiammatoria dipende anche da fattori dell'ospite, tra cui lo stadio della lattazione, l'età, lo stato immunitario, la genetica e la condizione nutrizionale della vacca (Harmon, 1994).

La condizione infiammatoria comporta ad ogni modo delle modifiche rilevanti nelle caratteristiche fisiche, chimiche e batteriologiche del latte. Diverse forme di mastite, specialmente quelle causate da *Staphylococcus aureus*, stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) e altri patogeni batterici, portano a una diminuzione dei livelli di lattosio, grassi, proteine e azoto ureico nel latte (Kayano et al., 2018).

Alla luce di ciò, e considerando che il latte rappresenta un ambiente favorevole alla rapida crescita microbica per via della sua ricchezza nutrizionale, risulta fondamentale un intervento tempestivo in caso di colonizzazione da parte di patogeni, al fine di preservare la funzione secretoria della ghiandola mammaria. (Saleem et al., 2024).

4.1.3 Classificazione

Esistono diversi modi per classificare le mastiti. Possono essere suddivise in base all'origine in due categorie: mastiti ambientali e mastiti contagiose. Le mastiti ambientali sono causate da microrganismi provenienti dall'ambiente circostante, noti come patogeni ambientali, mentre le mastiti contagiose sono causate dalla diffusione di infezioni da altri quarti infetti. Le mastiti possono essere classificate anche in base ai sintomi come infiammazioni intramammarie cliniche o subcliniche.

Oltre alla classificazione degli agenti causanti la mastite in base all'origine e ai sintomi, questi possono essere suddivisi in patogeni maggiori e minori, in base alla loro prevalenza e alla gravità della sintomatologia. Secondo alcuni autori, i principali patogeni responsabili della mastite sono *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e gli streptococchi (Cobirka et al., 2020).

Classificazione in base all'origine

Sebbene la distinzione tra patogeni contagiosi e ambientali rappresenti ancora un valido strumento didattico, tale classificazione non sempre risulta chiara; un esempio è rappresentato da *Streptococcus uberis*, che manifesta caratteristiche in comune alle due classi. Tra i microrganismi comunemente associati alla forma contagiosa si annoverano *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus* e specie di *Mycoplasma*. I patogeni ambientali, invece, comprendono *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, specie di *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, altri batteri gram-negativi, stafilococchi coagulasi-negativi (CNS), streptococchi ambientali, lieviti o funghi, *Prototheca*, *Trueperella pyogenes* e *Corynebacterium bovis* (Peek and Divers, 2018).

La mastite ambientale è definita come un'infezione intramammaria causata da microrganismi patogeni il cui principale serbatoio è rappresentato dall'ambiente in cui vive l'animale, piuttosto che da quarti mammari infetti. Questa forma si differenzia dalla mastite contagiosa, dove gli agenti patogeni si trasmettono principalmente da un quarto infetto a uno sano (K. L. Smith et al., 1985).

Il controllo efficace della mastite ambientale in un allevamento si basa principalmente sulla riduzione del contatto delle bovine con i microrganismi patogeni presenti nell'ambiente. Le infezioni intramammarie derivanti da questi agenti patogeni si instaurano solitamente quando i batteri riescono a penetrare attraverso il canale del capezzolo, colonizzando successivamente la ghiandola mammaria (Hogan and Smith, 2012).

L'obiettivo prioritario della ricerca sulla mastite per il prossimo decennio sarà lo sviluppo di strategie di controllo efficaci contro le infezioni provocate da agenti patogeni che non provengono principalmente da quarti mammari infetti o da lesioni del capezzolo, ma da fonti ambientali esterne (Dodd, 1983).

I microrganismi contagiosi si localizzano a livello della ghiandola mammaria e si diffondono da un capezzolo infetto a uno sano principalmente durante il processo di mungitura (Ashraf and Imran, 2020). Le mani dell'operatore, gli asciugamani o la macchina mungitrice possono fungere da veicoli di trasmissione per i batteri contagiosi (Garcia, 2004).

La mastite contagiosa si trasmette tra le bovine attraverso patogeni per i quali la ghiandola mammaria rappresenta il principale serbatoio. Questa forma di mastite tende a manifestarsi in modo subclinico, senza sintomi evidenti, ma comporta significative perdite economiche dovute a riduzioni nella produzione lattiera, peggioramento della qualità del latte (elevato conteggio delle cellule somatiche), eliminazione precoce degli animali e costi associati ai programmi di controllo. I principali agenti

patogeni colonizzano la pelle del capezzolo e l'interno della ghiandola mammaria (Chhargari and Muhammad, 2009).

Le infezioni si verificano più frequentemente durante il periodo di lattazione, con una prevalenza che può variare dal 7% al 40% delle bovine (Fox and Gay, 1993).

Sebbene l'uso di antibiotici e il miglioramento dell'igiene abbiano ridotto l'incidenza della mastite streptococcica, quella stafilococcica è aumentata, diventando una delle principali cause di mastite subclinica e clinica in molti paesi. Il monitoraggio del conteggio delle cellule somatiche e l'identificazione tempestiva delle infezioni sono strumenti essenziali per ridurre l'incidenza della mastite nelle aziende lattiero-casearie (Chhargari and Muhammad, 2009).

Si utilizza, infine, la denominazione di batteri opportunisti per riferirsi a patogeni che possiedono marcate capacità adesive che facilitano la loro penetrazione all'interno dell'epitelio ghiandolare. Queste caratteristiche consentono loro di provocare, in modo ricorrente, episodi di mastite clinica (Ashraf and Imran, 2020).

Le infezioni causate da batteri contagiosi, trasmessi principalmente da un quarto mammario all'altro o da un animale all'altro durante la mungitura, vengono significativamente ridotte dall'impiego di soluzioni germicide al termine della mungitura stessa. Al contrario, i microrganismi provenienti dall'ambiente circostante dell'animale, risultano meno controllabili attraverso la sola disinfezione dei capezzoli (Eberhart et al., 1983).

Classificazione in base alla sintomatologia

La mastite bovina può essere suddivisa in funzione della sintomatologia clinica in tre forme: mastite clinica, mastite subclinica e mastite cronica (Cheng and Han, 2020)

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 (Fredebeul-Krein et al., 2022).

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, 2017).

Nei casi più gravi, questa condizione può risultare potenzialmente letale (Khan and Khan, 2006).

La mastite subclinica si distingue per l'assenza di segni evidenti nel latte o nella mammella. Tuttavia, comporta comunque una riduzione della produzione latte (sebbene meno marcata rispetto alla forma clinica) e un aumento del numero di cellule somatiche nel latte (SCC) (Cobirka et al., 2020).

Le evidenze riportate in letteratura scientifica mostrano che la mastite subclinica presenta una prevalenza da 15 a 40 volte superiore rispetto alla forma clinica, risultando pertanto una delle principali cause di rilevanti perdite economiche nel settore zootecnico (Chen et al., 2022).

È stato accertato un legame tra specifici agenti patogeni e le diverse forme della mastite. Ad esempio, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e i batteri piogeni sono principalmente identificati come responsabili della mastite clinica. Al contrario, *Streptococcus agalactiae*, gli stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) e i batteri del genere *Enterococcus* sono maggiormente associati alla forma subclinica della patologia (Argaw, 2016).

La mastite cronica è una forma infiammatoria protratta della ghiandola mammaria, caratterizzata da un persistente aumento del numero di cellule somatiche per un periodo minimo di tre o quattro settimane. Più a lungo persiste l'infezione, minori sono le probabilità di guarigione. I casi cronici possono contribuire in modo significativo alla diffusione delle infezioni intramammarie e determinare rilevanti perdite nella produzione di latte. Alcuni autori hanno individuato come possibile fattore di rilievo nell'insorgenza della forma cronica di mastite, la presenza di biofilm, un aggregato di cellule batteriche inglobate in una matrice di biopolimeri che, rispetto alle cellule in forma planctonica, presenta una maggiore tolleranza agli agenti antimicrobici e alle difese dell'ospite (Pedersen et al., 2021).

4.1.4 Principali patogeni responsabili di mastite

Streptococcus spp.

Il genere *Streptococcus* comprende batteri Gram-positivi di forma coccoide, disposti in catene. Questi microrganismi possono essere commensali, patogeni oppure patogeni opportunisti sia per l'uomo che per gli animali. Molte specie di *Streptococcus* rilevanti in ambito veterinario presentano una nicchia ecologica specifica, come *Streptococcus uberis*, considerato quasi esclusivamente un patogeno ambientale responsabile della mastite bovina (Haenni et al., 2018).

Sebbene numerosi batteri appartenenti a questo genere non siano patogeni e facciano parte del normale microbiota degli animali, le specie *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* sono strettamente legate all'insorgenza di mastiti nella bovina (Kabelitz et al., 2021).

Streptococcus agalactiae

Streptococcus agalactiae è ritenuto uno dei principali agenti eziologici responsabili di infezioni intramammarie nei bovini (Martinez et al., 2000).

È un patogeno obbligato della ghiandola mammaria bovina, in grado di aderire ai tessuti della ghiandola mammaria bovina. La virulenza dei diversi ceppi è legata in parte alla loro capacità di adesione all'epitelio mammario. Nonostante sia generalmente sensibile a diversi tipi di antibiotici, i dati disponibili indicano una prevalenza nelle mandrie che varia dall'11% fino al 47%. L'infezione da *Streptococcus agalactiae* è correlata a un aumento del numero di cellule somatiche e della carica batterica totale, oltre a provocare una riduzione sia nella quantità che nella qualità del latte prodotto (Keefe, 1997).

Negli ultimi quarant'anni, la diffusione di *Streptococcus agalactiae* all'interno delle mandrie è notevolmente diminuita grazie all'impiego sistematico della terapia alla messa in asciutta e al miglioramento delle pratiche igieniche durante la mungitura. Queste includono l'uso di guanti, l'applicazione di disinfettanti efficaci sui capezzoli dopo la mungitura e l'utilizzo di asciugamani monouso per la pulizia e l'asciugatura della mammella (Peek and Divers, 2018).

Streptococcus dysgalactiae

Streptococcus dysgalactiae è un agente patogeno che presenta caratteristiche sia da patogeno contagioso sia da patogeno ambientale, rendendo necessario il controllo sia delle pratiche nella sala di mungitura sia delle condizioni ambientali in cui vive la vacca, al fine di limitare la diffusione dell'infezione (Peek and Divers, 2018).

È un microrganismo estremamente versatile, in grado di sopravvivere in numerosi ambienti: ghiandola mammaria, ruminale, feci e lettiera. Il patogeno è stato isolato non solo dalla mammella, ma anche da diverse altre zone del corpo animale, tra cui musello, tonsille e vagina (Cobirka et al., 2020).

Le forme cliniche di mastite causate da *Streptococcus dysgalactiae* si presentano generalmente in forma acuta. Diversi studi hanno evidenziato una notevole variabilità tra i ceppi, sia in termini di capacità infettiva che di virulenza (Rantamäki and Müller, 1995).

Streptococcus dysgalactiae ha origine nell'ambiente circostante gli animali e, sebbene in rari casi, può essere trasmesso tramite insetti vettori come vespe o mosche. Tuttavia, questa modalità di trasmissione si verifica esclusivamente nel periodo estivo (Yeruham et al., 2002).

Streptococcus uberis

Streptococcus uberis è un cocco Gram-positivo classificato come patogeno ambientale. In alcune aree del mondo, rappresenta il principale agente ambientale responsabile della mastite bovina ed è considerato tra i più rilevanti anche dal punto di vista economico. La sua prevalenza è in aumento a livello globale e si stima che sia responsabile del 14% al 26% dei casi di mastite clinica in paesi come Stati Uniti, Canada, Regno Unito e Paesi Bassi. A differenza di altri agenti eziologici, *S. uberis* non sembra limitarsi agli allevamenti a stabulazione fissa/libera, poiché è uno dei patogeni più comuni anche in Nuova Zelanda e Australia, dove il sistema di allevamento è basato sul pascolo. Una possibile

spiegazione di questo incremento è che il miglior controllo dei patogeni contagiosi abbia creato una nicchia ecologica che *Streptococcus uberis* ha potuto occupare (Peek and Divers, 2018).

Le infezioni intramammarie sono comunemente segnalate intorno al periodo del parto, ma le infezioni subcliniche possono durare a lungo. Spesso, queste infezioni risultano difficili da trattare con la terapia antimicrobica. Questo patogeno si diffonde nell'ambiente tramite la mucosa orale degli animali, attraverso il leccamento dell'ambiente o del pelo di altri esemplari, oppure tramite le feci (Kromker, 2014).

Diversi studi hanno permesso di evidenziare che *Streptococcus uberis* è in grado di sopravvivere per almeno 35 giorni su lettieri di paglia e che può replicarsi su lettieri usati sia di paglia che di sabbia. Sono emerse differenze tra i ceppi isolati in campo nella capacità di sopravvivenza e replicazione in funzione del tipo di substrato, probabilmente legate a specifiche variazioni genomiche e all'elevata eterogeneità genetica tipica di questa specie (Sherwin et al., 2021).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus è un organismo Gram-positivo, catalasi-positivo e coagulasi-positivo. È un microrganismo non sporigeno, ossidasi-negativo, non motile, che forma grappoli ed è facoltativamente anaerobico, in grado di crescere in un ampio intervallo di temperature e pH (G Abril et al., 2020).

Le infezioni subcliniche sono la norma, ma la mastite acuta o le riacutizzazioni ricorrenti sono più frequenti con *Staphylococcus aureus* rispetto agli streptococchi contagiosi. Generalmente, l'infezione da *Staphylococcus aureus* è cronica e le guarigioni spontanee sono rare. Oltre alla riduzione della produttività, le ghiandole infette subiscono danni permanenti al parenchima, con formazione di fibrosi e microascessi.

Una volta che *Staphylococcus aureus* si è stabilito all'interno di una mandria, è difficile, se non impossibile, eliminarlo. Le infezioni croniche, la resistenza agli antibiotici e la difficoltà nella diagnosi sono caratteristiche tipiche di questo batterio. *Staphylococcus aureus* non è un patogeno obbligato della ghiandola mammaria, ma può colonizzare la cute lesionata dei capezzoli o della mammella, la vagina, le tonsille e altre zone del corpo. Tuttavia, la principale fonte di infezione mastitica è rappresentata dalle secrezioni provenienti dalle mammelle infette, che si diffondono attraverso le mani degli addetti alla mungitura e le attrezzature utilizzate per la mungitura stessa (Peek and Divers, 2018).

La mastite causata da questo patogeno può essere controllata con successo solo attraverso la prevenzione di nuove infezioni e la riforma degli animali affetti (Cobirka et al., 2020).

Nonostante un miglioramento nella comprensione della patogenesi della malattia, i progressi verso nuove metodiche di controllo delle infezioni intramammarie (IMI) da *Staphylococcus aureus* sono stati limitati, soprattutto nel campo delle vaccinazioni (Campos et al., 2022).

Nonostante i ceppi di *Staphylococcus aureus* siano sensibili a una vasta gamma di antibiotici in vitro, gli allevatori spesso riportano che i tassi di guarigione in vivo sono inferiori alle aspettative. A confermare questa osservazione ci sono evidenze che *Staphylococcus aureus* possieda una notevole

capacità di sopravvivere all'attività dei neutrofili, inducendo fibrosi nella mammella e invadendo le cellule epiteliali mammarie (Erskine et al., 2003; Mullarky et al., 2001).

Questo patogeno sviluppa molto facilmente resistenza agli antibiotici, portando a infezioni intramammarie persistenti e non curabili (IMI) negli animali, oltre alla formazione di ceppi resistenti a più farmaci (MDR) (Sharifi et al., 2023).

Stafilococchi coagulasi-negativi (CNS)

Gli stafilococchi coagulasi-negativi fanno parte della normale flora cutanea del capezzolo e dell'orifizio esterno del canale del capezzolo. Non sono classificabili in modo rigoroso né come patogeni strettamente contagiosi né come patogeni ambientali, ma piuttosto come microrganismi opportunisti.

Sebbene siano state identificate fino a 48 specie diverse, studi recenti indicano che solo un numero limitato di esse è responsabile della maggior parte delle infezioni intramammarie (IMI). Le mastiti causate da stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) si manifestano generalmente in forma subclinica, con un aumento delle cellule somatiche nelle ghiandole infette, ma con un impatto minimo o nullo sulla produzione latte. Le specie più frequentemente riscontrate includono: *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus xylosus* (Peek and Divers, 2018).

Nella diagnostica di routine della mastite, gli stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) non vengono solitamente identificati a livello di specie, ma considerati come un gruppo omogeneo. Tradizionalmente, sono stati classificati come patogeni minori della mastite, soprattutto se confrontati con agenti principali come *Staphylococcus aureus*, streptococchi e coliformi. Tuttavia, il loro ruolo merita una rivalutazione, poiché in molti paesi i CNS rappresentano ormai i principali agenti eziologici di mastite (Pyorala and Taponen, 2009).

Migliorare l'igiene durante la mungitura, correggere eventuali problemi alle macchine mungitrici per ridurre i danni all'estremità del capezzolo, utilizzare disinfettanti iodati dopo la mungitura e effettuare terapia in asciutta rappresentano strategie molto efficaci nel controllo delle infezioni da stafilococchi coagulasi-negativi (CNS). Pratiche come la mungitura con mammelle bagnate o una preparazione inadeguata della mammella sono notoriamente associate a una maggiore incidenza di mastiti. Nelle mandrie con un'elevata percentuale di infezioni intramammarie causate da CNS, è inoltre raccomandata la terapia alla messa in asciutta (Peek and Divers, 2018).

Mycoplasma spp.

Le infezioni da *Mycoplasma spp.* possono determinare vere e proprie epidemie di mastite acuta all'interno della mandria, che spesso evolvono in forme croniche. Dopo un episodio acuto, le bovine possono sviluppare mastite persistente, manifestare riacutizzazioni intermittenti oppure presentare un'infezione subclinica, la cui conferma richiede un'analisi colturale (Peek and Divers, 2018).

I micoplasmi sono agenti patogeni coinvolti in diverse patologie tipiche del bovino, tra cui infiammazioni del tratto urogenitale, artrite, polmonite e mastite. Tra le specie più frequentemente responsabili di queste patologie, *Mycoplasma bovis* è il principale agente eziologico, seguito da *Mycoplasma californicum* e *Mycoplasma bovis* (Fox, 2012).

La mastite causata da micoplasmi è meno frequente rispetto a quella provocata da altri batteri, ma può determinare forme infiammatorie gravi e presenta caratteristiche epidemiologiche e fattori di rischio differenti. Le mastiti da micoplasmi si distinguono per alcuni aspetti tipici:

- l'elevata trasmissibilità tra gli animali;
- il frequente coinvolgimento di più di un quarto mammario;
- la marcata riduzione della produzione di latte;
- la tendenza a non rispondere efficacemente alla terapia antibiotica;
- la tendenza a manifestarsi con secrezioni purulente, anche se prive di odore, spesso anomale nel colore e nella consistenza;
- la tendenza delle bovine affette ad apparire clinicamente normali, anche in presenza di un'infezione grave.

La mastite causata da micoplasmi è generalmente considerata non curabile; per questo motivo, la riforma degli animali infetti rappresenta ancora oggi la strategia di controllo più comunemente adottata (Nicholas et al., 2016).

Mastiti da coliformi

Nel contesto della mastite bovina, il termine "coliformi" si riferisce generalmente a batteri Gram-negativi lattosio-fermentanti appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Tra i principali generi inclusi in questa categoria figurano *Escherichia*, *Klebsiella* ed *Enterobacter*. I coliformi sono considerati patogeni di origine ambientale. Le mastiti da coliformi possono presentarsi con gravità variabile: da forme subcliniche fino a casi iperacuti e potenzialmente letali. Tuttavia, la manifestazione più frequente è la mastite clinica acuta, caratterizzata da segni sia locali che sistemici della malattia. Quest'ultima forma si verifica più comunemente nel periodo immediatamente successivo al parto (Kremer et al., 1990).

La mastite da coliformi rappresenta un tipico esempio di infezione di origine ambientale. Diversi fattori gestionali possono favorire l'accumulo di batteri coliformi nell'ambiente, aumentando così il rischio di infezioni mammarie. Ad esempio, la presenza di fango profondo nei cortili delle stalle incrementa notevolmente la possibilità che i patogeni contaminino la mammella. Le condizioni climatiche estive, caratterizzate da alte temperature e umidità, favoriscono la proliferazione e la sopravvivenza di questi microrganismi nell'ambiente, portando a un'incidenza maggiore della malattia durante i mesi caldi. Tuttavia, anche in assenza di fattori stagionali, l'adozione diffusa di sistemi di stabulazione libera crea ambienti umidi all'interno delle stalle che predispongono comunque alla mastite da coliformi. Inoltre,

il contatto tra l'estremità del capezzolo e materiali contaminati, come membrane fetali trattenute o secrezioni uterine, può aumentare ulteriormente il rischio d'infezione.

Le bovine in asciutta sono particolarmente vulnerabili alle infezioni soprattutto immediatamente dopo l'inizio del periodo di asciutta e poco prima del parto, momenti in cui la concentrazione intramammaria di lattoferrina raggiunge i livelli più bassi. La mastite da coliformi tende a manifestarsi con maggiore frequenza negli allevamenti in cui le forme contagiose di mastite vengono efficacemente contenute (Peek and Divers, 2018).

Tra i batteri coliformi *Escherichia coli* è il più frequentemente responsabile di processi infiammatori della ghiandola mammaria nelle vacche da latte, soprattutto in prossimità del parto e durante le prime fasi della lattazione. Questo patogeno è solitamente associato a forme di mastiti cliniche e acute. Tuttavia, i sintomi clinici possono variare notevolmente, da forme lievi a forme iperacute, e sono stati riportati anche casi di infezioni persistenti (Blum et al., 2014). La mastite iperacuta da *Escherichia coli* è ritenuta una delle principali cause di mortalità nei casi più gravi.

L'evoluzione clinica dell'infezione dipende da diversi fattori, tra cui la gravità dell'infezione stessa, il momento della lattazione in cui si verifica, lo stato energetico dell'animale, eventuali carenze vitaminiche e la presenza o meno di una copertura vaccinale (Cobirka et al., 2020).

L'infezione si manifesta con sintomi clinici evidenti a livello locale e, in alcuni casi, con gravi manifestazioni sistemiche. Questa forma di mastite colpisce in particolare le bovine ad alta produzione, e nei casi più gravi può provocare decessi multipli all'interno della mandria nel corso dell'anno. Studi recenti hanno evidenziato che la gravità della mastite da *Escherichia coli* dipende più dallo stato immunitario dell'animale che dalla virulenza del batterio stesso. In particolare, il ruolo dei neutrofili si è rivelato cruciale nella risposta immunitaria della bovina: la loro efficacia nell'eliminare il patogeno è determinante per la risoluzione dell'infezione e l'esito clinico della malattia (Burvenich et al., 2003).

Altri agenti di mastite

I batteri rappresentano la principale causa della mastite bovina, ma l'interesse verso agenti patogeni non batterici come virus, funghi e protozoi è in crescente aumento. Questi microrganismi possono provocare infiammazione e rendere più complesso il trattamento. Le mastiti di origine micotica, in particolare quelle causate da lieviti, insorgono frequentemente a seguito di terapie antibiotiche o interventi veterinari che alterano la flora microbica naturale della mammella. In tali condizioni, si favorisce lo sviluppo di lieviti appartenenti ai generi *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* e *Trichosporum*. Le infezioni da lieviti risultano più complesse da trattare rispetto alla mastite batterica, poiché i lieviti sono intrinsecamente resistenti agli antibiotici. Queste infezioni possono assumere un decorso cronico, compromettendo in modo duraturo la qualità del latte e causando danni irreversibili al tessuto mammario. In tali situazioni, è fondamentale ricorrere a trattamenti antifungini e adottare strategie preventive, come il miglioramento delle condizioni igieniche ambientali e la riduzione dell'impiego non necessario di antibiotici.

Le alghe del genere *Prototheca* spp. rappresentano agenti eziologici rari ma in crescita e spesso sottovalutati nella mastite bovina. Queste alghe, prive di capacità fotosintetica, si trovano comunemente in natura, in particolare nel suolo e nelle acque (Motrenko et al., 2025).

4.1.5 Diagnostica

Una diagnosi accurata rappresenta un passaggio fondamentale per la cura di una patologia. Disporre di uno strumento diagnostico che sia economico, affidabile e rapido è essenziale per una gestione efficace della salute della mammella (Ashraf and Imran, 2018).

La diagnosi precoce riveste un'importanza cruciale a causa degli elevati costi associati alla mastite. La normativa dell'Unione Europea (Regolamento 853/2004) stabilisce che il latte destinato al consumo umano debba provenire esclusivamente da animali sani. Per garantire tale requisito, sono stati messi a punto metodi diagnostici finalizzati a valutare la qualità del latte, attraverso l'identificazione di stati infiammatori della ghiandola mammaria e la ricerca dei patogeni responsabili (Viguier et al., 2009).

La mastite può essere classificata, in base alla gravità dell'infezione, in due forme principali: clinica e subclinica. Nel caso della mastite clinica si osservano sintomi evidenti, come alterazioni nell'aspetto del latte e nella fisiologia della mammella. Al contrario, la forma subclinica non presenta manifestazioni visibili. Per individuare quest'ultima, si ricorre comunemente a test di screening in azienda, come il conteggio delle cellule somatiche (SCC), il California Mastitis Test e il Surf Field Mastitis Test. Tuttavia, questi metodi non forniscono informazioni né sull'agente eziologico né sulla gravità quantitativa dell'infezione. Il SCC è ampiamente considerato un indicatore universale per la diagnosi di mastite ed è utilizzato per valutare la qualità del latte sia a livello di singolo quarto che su latte massale. Nonostante ciò, presenta alcune limitazioni, come il costo dell'analisi e la necessità di personale qualificato (Ashraf and Imran, 2018).

La mastite può essere individuata anche mediante test eseguibili direttamente in stalla, noti come test “cow-side” o “on-site”, utilizzabili sia dagli allevatori che dai veterinari, senza necessità di una formazione specialistica approfondita. Tra i più consolidati e noti vi è il California Mastitis Test (CMT). La mastite può essere rilevata anche attraverso la variazione della conducibilità elettrica o del pH del latte. Sebbene questi parametri siano semplici da monitorare, presentano una sensibilità limitata. Per questo motivo, è particolarmente importante individuare nuovi biomarcatori che siano specifici per la mastite, facilmente rilevabili, presenti già nelle fasi iniziali dell'infezione e misurabili direttamente in azienda (Viguier et al., 2009).

I test diagnostici convenzionali per la mastite sono generalmente di tipo qualitativo e presentano una sensibilità e specificità limitate, mentre le tecniche più avanzate offrono misurazioni quantitative con un'elevata precisione e capacità identificativa. Le tecniche molecolari avanzate, basate sia su metodi di fenotipizzazione che di genotipizzazione, offrono strumenti di identificazione rapidi e altamente specifici per la diagnosi dei patogeni responsabili della mastite, fino al livello di specie e sottospecie (Sharun et al., 2021).

Conta delle cellule somatiche (SCC)

Le cellule somatiche presenti nel latte bovino sono costituite principalmente da leucociti e, in minor misura, da cellule epiteliali desquamate. Nel latte proveniente da ghiandole mammarie sane e non infette, si trovano normalmente: neutrofili (1–11%), macrofagi (66–88%), linfociti (10–27%) e cellule epiteliali (0–7%). Quando i batteri invadono e colonizzano la ghiandola mammaria, i macrofagi attivano la risposta infiammatoria, richiamando cellule polimorfonucleate (PMN) nel latte, che intervengono fagocitando i patogeni. La mastite rappresenta il principale fattore che influisce sull'aumento del numero di cellule somatiche nel latte (Ruegg and Reinemann, 2002).

Il conteggio delle cellule somatiche è diventato l'indicatore più comunemente utilizzato per rilevare infezioni mastitiche sia a livello individuale che di mandria. Il monitoraggio del numero di cellule somatiche è stato notevolmente semplificato grazie all'impiego di specifici strumenti, che permettono di analizzare un elevato numero di campioni di latte (Peek and Divers, 2018). Tali dispositivi utilizzano frequentemente la citometria a flusso, permettendo di determinare in modo rapido e agevole il numero di cellule somatiche.

L'analisi di ciascun quarto mammario o di campioni provenienti dai quattro quarti fornisce informazioni dettagliate, utili per prendere decisioni mirate in merito allo stato di salute dell'animale. Inoltre, il controllo del SCC nei campioni di latte di massa è uno strumento utile per gli allevatori e i veterinari, poiché fornisce un'indicazione costante sull'efficacia complessiva delle strategie di controllo della mastite nella mandria. (Peek and Divers, 2018).

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).

Conducibilità elettrica (EC)

La conducibilità elettrica rappresenta la misura della resistenza del latte al passaggio della corrente elettrica ed è influenzata dalla presenza e dalla concentrazione di specifici ioni, in particolare sodio, potassio e cloro (Anika et al., 2023). Questo valore latte aumenta in presenza di mastite, a causa dell'incremento delle concentrazioni di sodio e cloruro e della diminuzione del potassio. Diversi produttori di impianti di mungitura hanno integrato l'EC come metodo in-linea per la rilevazione della mastite (Adkins and Middleton, 2018).

La mastite non è l'unica condizione in grado di modificare il contenuto ionico del latte, e questa variabilità non legata all'infezione rappresenta una limitazione significativa nell'affidabilità diagnostica della conducibilità elettrica. Tra i fattori non correlati alla mastite che possono influenzare l'EC si annoverano la temperatura del latte (EC aumenta in modo lineare con l'innalzarsi della temperatura del

campione), la fase della lattazione, la percentuale di grasso (il grasso è un materiale non conduttivo), l'intervallo tra le mungiture e la razza dell'animale (Ruegg and Reinemann, 2002).

California mastitis test (CMT)

Il California Mastitis Test è un test che fornisce una stima qualitativa del contenuto di DNA nelle secrezioni mammarie, un parametro utile poiché la concentrazione di DNA è direttamente correlata alla presenza di globuli bianchi (WBC) nel latte. Il reagente impiegato nel test provoca la lisi delle cellule e la formazione di un gel con il DNA rilasciato. Il grado di gelificazione osservato consente di stimare il numero di globuli bianchi presenti nel campione (Peek and Divers, 2018). L'esito del test viene interpretato visivamente e classificato come:

- **Negativo:** la miscela rimane omogenea, senza alcun ispessimento visibile.
Cellule somatiche: 0-200.000/ml
Neutrofili: 0-25%
Indicazione: quarto sano, nessun segno di infezione
- **Traccia:** leggero addensamento simile a una nube che scompare entro circa 10 secondi.
Cellule somatiche: 150.000-500.000/ml
Neutrofili: 30-40%
Indicazione: possibile infezione; se tutti e quattro i quarti risultano "traccia", l'infezione è improbabile. Se uno o due quarti mostrano "traccia", è possibile la presenza di una forma subclinica.
- **+1:** si forma immediatamente una consistenza viscosa dopo la miscelazione, ma senza gelificazione evidente. Questa viscosità tende a scomparire col tempo.
Cellule somatiche: 400.000-1.500.000/ml
Neutrofili: 40-60%
Indicazione: mastite subclinica.
- **+2:** comparsa immediata di materiale viscoso con inizio di formazione del gel.
Cellule somatiche: tra 800.000 e 5.000.000/ml
Neutrofili: 60-70%
Indicazione: mastite subclinica
- **+3:** dopo la miscelazione, si osserva la formazione immediata di un gel ben evidente, con un sollevamento della superficie che assume un aspetto caratteristico simile a quello di un "uovo fritto".
Cellule somatiche: superiori a 5.000.000/ml
Neutrofili: 70-80%
Indicazione: mastite subclinica in fase avanzata (Kivaria et al., 2007).

Il CMT risulta particolarmente utile quindi per l'identificazione delle forme subcliniche; tuttavia, pur essendo preciso, ha un'utilità limitata nei casi di mastiti cliniche acute (Peek and Divers, 2018).

Il California Mastitis Test continua a rappresentare l'unico test di screening affidabile per la mastite subclinica facilmente eseguibile direttamente in stalla. Originariamente sviluppato per analizzare il latte proveniente da singoli quarti della mammella, il CMT è stato successivamente applicato anche a campioni di latte di massa (Ruegg and Reinemann, 2002).

Nelle bovine fresche, l'impiego del CMT per rilevare infezioni intramammarie ha mostrato una sensibilità del 66,7% e una specificità del 54,8%. I principali punti di forza di questo test risiedono nella sua rapidità, economicità, semplicità d'uso e nella possibilità di eseguirlo direttamente in stalla, senza la necessità di attrezzature complesse (Duarte et al., 2015).

Coltura batterica

Le tecniche di coltura batterica sono in genere economiche e semplici da eseguire, purché vengano applicati metodi standardizzati e ripetibili. Sebbene molti patogeni responsabili della mastite crescano facilmente in condizioni aerobiche su terreni a base di sangue, alcuni, come *Mycoplasma*, richiedono terreni e condizioni di crescita specifici. Una volta ottenuti i risultati della coltura, è necessario definire criteri diagnostici chiari per garantire uniformità nell'interpretazione dei dati (Adkins and Middleton, 2018).

Ambienti sporchi, scarsa igiene nella preparazione della mammella, mungitura di mammelle ancora bagnate e altre pratiche errate durante la mungitura possono favorire un aumento del numero di coliformi e di altri batteri ambientali rilevati nei conteggi su piastra. Altre cause che possono contribuire a un'elevata carica batterica nei campioni di latte di massa includono un raffreddamento inadeguato del latte, dovuto a problemi nel sistema di refrigerazione o a una miscelazione inefficiente, nonché l'uso di attrezzature o tubazioni non correttamente sanificate.

Sono stati proposti diverse metodiche colturali per l'analisi del latte di massa, ma tra le più rilevanti vi sono il conteggio standard su piastra (SPC), il conteggio dopo pastorizzazione in laboratorio (LPC), la coltura per *Mycoplasma*, il conteggio dei coliformi e l'analisi per agenti patogeni responsabili di forme contagiose di mastite. Per garantire l'affidabilità del campione, il latte va agitato prima del prelievo e raccolto con un mestolo sterile direttamente dalla cisterna, evitando l'uso della valvola di scarico che potrebbe contenere batteri ambientali in concentrazione elevata, portando così a risultati falsamente positivi (Peek and Divers, 2018).

Secondo quanto riportato in letteratura, in almeno il 20–30% dei campioni di latte prelevati da quarti mammari affetti da mastite clinica non si rileva alcuna crescita batterica. Alcuni studi hanno registrato percentuali simili: 26,5% nel Regno Unito, 27,2% negli Stati Uniti, 23,7% e 27,1% in Finlandia, fino a un valore particolarmente elevato del 43,9% in Canada. Nella mastite subclinica, la frequenza di campioni senza crescita batterica è generalmente ancora più alta: diverse ricerche riportano una gamma

compresa tra il 28,7% e il 38,6%, mentre uno studio ha registrato un valore del 49,7% senza distinguere tra forme cliniche e subcliniche.

Un risultato negativo rappresenta spesso una fonte di frustrazione non solo per l'allevatore e il veterinario che hanno richiesto l'analisi, ma anche per il laboratorio responsabile della diagnosi. Le possibili cause dell'assenza di crescita batterica includono una bassa concentrazione di microrganismi nel campione, la presenza di patogeni che non riescono a svilupparsi nei terreni di coltura standard o sostanze presenti nel latte che riducono la vitalità batterica in coltura (Taponen et al., 2009).

On farm culture

Sebbene l'identificazione precisa degli agenti responsabili della mastite sia essenziale per definire un intervento terapeutico mirato, le indagini di laboratorio non sono comunemente adottate a causa dei costi elevati e dei tempi prolungati necessari per ottenere i risultati.

Negli ultimi decenni, però, sono stati sviluppati test su terreni selettivi per l'on-farm culture, capaci di distinguere tra patogeni Gram-positivi e Gram-negativi, offrendo un'alternativa più economica e veloce rispetto alle colture di laboratorio. L'obiettivo dell'on-farm culture è fornire risultati rapidi, permettendo agli allevatori di prendere decisioni terapeutiche strategiche direttamente in azienda (Ferreira et al., 2018).

I sistemi on-farm possono basarsi su metodi tradizionali di semina, utilizzando terreni non selettivi come l'agar sangue, oppure su combinazioni di terreni selettivi, ad esempio: agar MacConkey per l'identificazione di patogeni Gram-negativi, agar TKT (*Tallium Kristalviolette Tossin*) per i streptococchi e Baird-Parker per gli stafilococchi.

Esistono anche soluzioni semplificate, come i bi- o triparti, che integrano più terreni selettivi in un'unica piastra Petri.

PCR

Negli ultimi vent'anni si è registrato un crescente utilizzo di metodi molecolari per l'identificazione dei patogeni responsabili della mastite. In particolare, la PCR ("Polymerase Chain Reaction") è ampiamente descritta in letteratura come una tecnica efficace per il rilevamento di un'ampia gamma di microrganismi coinvolti nella patologia. La PCR si è dimostrata un metodo rapido (risultati ottenibili in 1-2 giorni), sensibile (76,9-100%) e specifico (63,3-98,7%) per la diagnosi della mastite. Sebbene anche le colture batteriche vengano utilizzate a tale scopo, esse risultano significativamente meno sensibili rispetto ai test PCR (Chakraborty et al., 2019).

La spettrometria di massa accoppiata alla PCR è stata impiegata come strumento diagnostico per identificare i patogeni responsabili della mastite bovina a partire da campioni di latte. Questa tecnologia permette non solo di rilevare specie batteriche, ma anche lieviti, muffe, parassiti e virus, risultando particolarmente utile anche in presenza di colture miste (Ashraf and Imran, 2018).

Sono stati descritti Multiplex PCR e Real-time PCR che consentono di rilevare simultaneamente diversi organismi patogeni responsabili della mastite in campioni di latte. L'analisi più recentemente sviluppata è in grado di identificare 11 dei principali patogeni associati alla mastite, tra cui *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis* (Viguier et al., 2009).

4.1.6 Prevenzione e controllo

Igiene nei processi di mungitura

L'igiene durante la mungitura comprende sia le pratiche da eseguire prima e dopo il processo di mungitura, sia la pulizia dell'attrezzatura utilizzata per mungere le vacche. Le operazioni preliminari possono includere l'immersione preventiva delle mammelle in una soluzione disinfettante, l'asciugatura a secco, l'eliminazione dei primi getti di latte e la pulizia o asciugatura dei capezzoli e delle estremità. All'inizio di ogni mungitura, o ogni volta che è necessario manipolare i capezzoli, il personale deve indossare guanti in lattice o nitrile per limitare il rischio di diffusione di agenti patogeni responsabili della mastite da un animale all'altro tramite le mani. Se i guanti si sporcano con latte o altro materiale organico, devono essere lavati e disinfettati. La disinfezione può essere effettuata con una soluzione contenente 50 ppm di iodio o con altri disinfettanti adeguati. In caso di rottura, i guanti devono essere immediatamente sostituiti. È ampiamente riconosciuto il legame tra la colonizzazione batterica della pelle del capezzolo e l'insorgenza di infezioni intramammarie. Per questo motivo, l'adozione di pratiche gestionali volte a limitare la contaminazione batterica delle estremità dei capezzoli rappresenta un elemento essenziale nella prevenzione della mastite (Ruegg, 2017).

L'applicazione di disinfettanti post-mungitura (post-dip) subito dopo la rimozione del gruppo di mungitura ha lo scopo di prevenire l'insorgenza di nuove infezioni causate da microrganismi contagiosi. Questi prodotti contengono solitamente una concentrazione più elevata di agenti disinfettanti, oltre a sostanze emollienti che aiutano a mantenere la pelle dei capezzoli morbida e integra, evitando secchezza e screpolature. L'elevata concentrazione del disinfettante è inoltre fondamentale per contrastare eventuali infezioni ambientali, soprattutto considerando che l'apertura del capezzolo può rimanere esposta per oltre un'ora dopo la mungitura. Il disinfettante deve essere applicato in modo da coprire l'intero capezzolo, assicurandosi che si formi una goccia visibile sulla punta (Peek and Divers, 2018). L'esposizione delle estremità dei capezzoli a patogeni ambientali avviene principalmente tra una mungitura e l'altra, e non è limitata al momento della mungitura stessa, a differenza di quanto accade con i patogeni contagiosi. Di conseguenza, la disinfezione post-mungitura dei capezzoli risulta meno efficace, se non del tutto inefficace, nel prevenire l'insorgenza di nuove infezioni causate da microrganismi presenti nell'ambiente (K. L. Smith et al., 1985).

Il "backflushing" (risciacquo) dell'unità di mungitura rappresenta un'ulteriore tecnica di disinfezione utile per limitare la trasmissione di agenti patogeni responsabili della mastite da un animale all'altro attraverso l'attrezzatura. Questo procedimento, effettuato utilizzando una soluzione iodio con

concentrazione tra 30 e 50 ppm, contribuisce a ridurre la presenza di tali microrganismi, pur non garantendone l'eliminazione completa (Peek and Divers, 2018).

Vaccinazione

La vaccinazione stimola l'immunità acquisita contro patogeni specifici e presenta pochi effetti collaterali. La vaccinazione rappresenta uno strumento importante nella gestione delle malattie infettive. Il successo della profilassi vaccinale dipende dalla qualità del vaccino utilizzato e dalla tempestiva immunizzazione degli animali a rischio. Le moderne conoscenze in immunologia e prevenzione hanno consolidato le basi teoriche e tracciato le linee guida per lo sviluppo di vaccini sempre più sicuri ed efficaci (Zhylkaidar et al., 2021).

L'impiego della sola vaccinazione non è sufficiente nei contesti in cui l'incidenza delle mastiti è elevata. Il protocollo vaccinale raggiunge la massima efficacia quando è integrato con misure di controllo complementari, quali il trattamento tempestivo dei casi clinici e il loro isolamento (Ismail, 2017).

4.1.7 Terapia

Un programma efficace di controllo della mastite prevede il rilevamento precoce dell'infezione, la comprensione della patogenesi, l'adozione di buone pratiche di gestione per ridurre il rischio di trasmissione e l'uso strategico di antibiotici (Sharun et al., 2021). Data la diversità degli agenti patogeni implicati, la terapia antibiotica rappresenta l'approccio terapeutico standard nella gestione della mastite, costituendo circa il 60% dell'utilizzo complessivo di antibiotici nell'allevamento bovino (Debruyn et al., 2025). Tuttavia, anche la terapia antibiotica durante il periodo di asciutta si è dimostrata altamente efficace nel controllo della mastite (Ashraf and Imran, 2020).

L'uso di tali molecole però risulta essere soggetto a crescenti restrizioni a livello globale, a causa dell'aumento dell'antimicrobico-resistenza, della presenza di residui e delle implicazioni che l'utilizzo di queste molecole ha sulla salute pubblica. Per questo motivo, sono state studiate strategie innovative per la prevenzione e il trattamento della mastite. Tra queste rientrano l'utilizzo di nanoparticelle, nutraceutici, estratti vegetali, probiotici, radiazioni laser, lisozima, saponine, propoli, lisosubtilina, peptidi antimicrobici, nonché l'infusione intramammaria di lattoferrina o ozono (El-Sayed and Kamel, 2021).

Approccio 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, individuato tramite esame colturale di laboratorio o PCR;
- Antibiotogramma e MIC ("Minimum Inhibitory Concentration") ;

- Periodo produttivo della bovina;
- Anamnesi ambientale;
- Anamnesi prossima e remota del singolo animale;
- Caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche del farmaco che si intende utilizzare;
- Linee guida per l'uso prudente del farmaco in zootecnia.

La valutazione dello stato clinico dell'animale è fondamentale per orientare il Medico Veterinario nella scelta dell'intervento terapeutico più adeguato. Nei casi lievi o moderati, è preferibile posticipare il trattamento in attesa dei risultati dell'esame colturale, monitorando attentamente l'animale. Al contrario, nelle forme gravi è necessario intervenire tempestivamente mediante la somministrazione di fluidi, antibiotici sia per via intramammaria che sistemica, farmaci antinfiammatori e integratori di calcio (de Jong et al., 2023).

La conoscenza del patogeno responsabile dell'infezione non è generalmente disponibile nell'immediato poiché i risultati delle colture per la mastite, eseguite presso laboratori accreditati, possono richiedere diversi giorni (Royster and Wagner, 2015).

Risulta fondamentale effettuare un esame colturale prima di iniziare il trattamento antibiotico, poiché i risultati delle colture mostrano che nel 10-40% dei casi non sono rilevabili colonie batteriche. In queste situazioni, gli antibiotici sarebbero probabilmente inefficaci a causa della complessità dell'eziologia della mastite che comporta una diversa risposta dei patogeni alla somministrazione di determinati farmaci (Ashraf and Imran, 2020).

L'integrazione della conoscenza del patogeno responsabile dell'infezione con la storia clinica e i dati relativi al conteggio delle cellule somatiche della vacca, rappresenta un elemento fondamentale che condiziona l'approccio terapeutico da parte del veterinario. Questo richiede buone pratiche di "record keeping" da parte dell'allevatore; i dati individuali dell'animale includono gli eventuali episodi di mastite pregressi (data, gravità e quarti interessati, nonché il valore di SCC del giorno del test).

Gli animali che presentano forme croniche di infezione o causate da agenti patogeni difficili da trattare, e che quindi hanno scarse probabilità di trarre beneficio da una terapia antimicrobica, dovrebbero essere gestiti attraverso strategie alternative oppure eliminati dal gruppo. Tra le opzioni gestionali per gli animali non sottoposti a trattamento vi sono l'isolamento, l'asciutta anticipata del quarto mammario infetto o l'asciutta precoce di tutti i quarti. L'asciutta anticipata del singolo quarto, comporta comunque dei rischi e andrebbe considerata solo quando la bovina si trova in buone condizioni generali di salute e mantiene una produttività soddisfacente (Royster and Wagner, 2015).

Scelta della molecola e via di somministrazione

La selezione del farmaco più idoneo deve basarsi non solo sui risultati dell'antibiogramma, ma anche su un'attenta valutazione dei parametri farmacocinetici e farmacodinamici della molecola scelta, oltre che dei tempi di sospensione previsti. La mammella bovina costituisce un distretto anatomico con

limitata accessibilità per molti farmaci, fattore che determina frequentemente l'insuccesso terapeutico (McDougall et al., 2022; Owens et al., 1988).

Affinché un farmaco risulti efficace, è fondamentale che raggiunga concentrazioni terapeutiche adeguate nel sito dell'infezione, noto come. I patogeni possono trovarsi liberamente dispersi nel latte (come *Escherichia coli*), aderire alle membrane cellulari (come gli streptococchi) oppure essere localizzati a livello intracellulare (come *Staphylococcus aureus*).

Al fine di raggiungere il sito di infezione, il trattamento può essere somministrato per via intramammaria (via topica) oppure per via sistemica (via parenterale) (Gruet et al., 2001).

Le principali cause di inefficacia includono una scarsa diffusione dell'antibiotico nei tessuti infiammati, l'inattivazione del farmaco ad opera di componenti del latte, la capacità dei patogeni di persistere all'interno di cellule come i macrofagi e la trasformazione batterica in forme prive di parete cellulare (forme L), che risultano refrattarie all'azione dei comuni antimicrobici (McDougall et al., 2022; Owens et al., 1988).

La somministrazione per via intramammaria consente di ottenere concentrazioni elevate dell'antibiotico direttamente nel sito d'azione, con una durata prolungata dell'effetto terapeutico, pur utilizzando dosi contenute di principio attivo. Questo approccio contribuisce anche a ridurre il rischio di residui nel latte. Per garantire una distribuzione efficace del farmaco all'interno del tessuto mammario, è preferibile che la molecola presenti un basso grado di legame con le proteine del latte e dei tessuti.

La terapia parenterale viene invece preferita quando l'animale deve essere trattato nel periodo di asciutta o quando l'infezione risulta presente in profondità nel parenchima mammario (Gruet et al., 2001).

Uso prudente dell'antibiotico

Per uso prudente si intende “una serie di misure pratiche e di raccomandazioni che conferiscono benefici alla salute animale e pubblica” (OIE - Codice Terrestre) o “l'uso di antimicrobici che massimizza l'effetto terapeutico e minimizza lo sviluppo dell'antimicrobico-resistenza” (OMS).

In pratica, attraverso un uso prudente è possibile:

- preservare e mantenere l'efficacia terapeutica e la sicurezza degli antimicrobici;
- mantenere gli animali in salute;
- prevenire e/o ridurre la selezione di microrganismi resistenti, il trasferimento di determinanti di resistenza;
- mantenere l'efficacia degli antimicrobici usati in medicina umana;
- proteggere la salute del consumatore assicurando la sicurezza degli alimenti di origine animale, sia in termini di residui che di trasferimento di microrganismi resistenti all'uomo.

Un uso prudente dipende strettamente dalle buone pratiche veterinarie e di allevamento (miglioramento della loro gestione, delle condizioni igieniche-sanitarie), nonché delle pratiche attuate per la prevenzione

delle malattie come, ad esempio, l'attuazione di programmi di vaccinazione. È, inoltre, il risultato di corrette condizioni d'impiego dei medicinali veterinari autorizzati come rispetto delle indicazioni d'uso, il ricorso all'uso in deroga soltanto in via eccezionale e al fine di evitare all'animale evidenti stati di sofferenza, l'utilizzo di antibatterici per fini preventivi limitato a casi eccezionali e supportato da documentata giustificazione. Accanto a queste misure, è importante tenere sempre presente la situazione epidemiologica: la continua raccolta e analisi dei dati derivati da campioni prelevati in allevamento e/o al macello devono fornire il substrato per apportare continue e nuove misure alla lotta all'AMR (https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2782_allegato.pdf).

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, che quindi perdono la loro capacità di bloccare o rallentare la loro crescita. Alcuni batteri sono naturalmente resistenti a certi antibiotici (resistenza intrinseca o innata). Quando alcuni batteri, normalmente sensibili agli antibiotici, diventano resistenti a causa di cambiamenti genetici (resistenza acquisita) essi sopravvivono in presenza dell'antibiotico e continuano a moltiplicarsi, causando malattie più lunghe e persino la morte

(<https://www.salute.gov.it/new/it/faq/faq-antibiotico-resistenza/?tema=Antibiotico-resistenza>).

La diffusione della AMR nel settore umano, veterinario e ambientale costituisce un aspetto critico nel contesto dell'approccio integrato One Health, in quanto minaccia l'efficacia terapeutica degli antimicrobici, in particolare di quelli considerati essenziali per la medicina umana. Per promuovere un impiego consapevole e mirato di tali farmaci, risulta fondamentale adottare un utilizzo prudente in tutti gli ambiti coinvolti.

A tal scopo, il Regolamento (UE) 2019/6 relativo ai medicinali veterinari e il Regolamento (UE) 2019/4 riguardante i mangimi medicati, in vigore in tutti gli Stati membri dal 28 gennaio 2022, impongono restrizioni significative all'impiego degli antibiotici per finalità profilattiche e limitano il ricorso al trattamento metafilattico. Tali normative mirano a garantire un uso più razionale e selettivo degli antimicrobici, al fine di contenere lo sviluppo e la diffusione delle resistenze batteriche (www.salute.gov.it).

A livello comunitario, il rischio associato all'uso degli antibiotici viene attualmente valutato secondo due principali sistemi di classificazione:

- La categorizzazione proposta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO);
- La classificazione adottata dall'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA).

La categorizzazione proposta dalla WHO mira a preservare i benefici per la salute pubblica degli antimicrobici attraverso un loro impiego responsabile e prudente in tutti i settori (umano, animale e vegetale). L'elenco OMS degli antimicrobici di importanza critica per la medicina umana (WHO MIA

List) rappresenta uno strumento di gestione del rischio utile a supportare le decisioni volte a minimizzare l'impatto dell'uso di antimicrobici nei settori non umani sullo sviluppo della resistenza antimicrobica nell'uomo.

Più nello specifico gli antimicrobici vengono suddivisi in (*Figura 1*):

- Autorizzati esclusivamente per utilizzo in medicina umana;
- HPCIA (“ALTOest Priority Critically Important Antimicrobials”);
- CIA (“Critically Important Antimicrobials”);
- HIA (“ALTOly Important Antimicrobials”);
- IA (“Important Antimicrobials”);
- Autorizzati esclusivamente per utilizzo in medicina veterinaria;

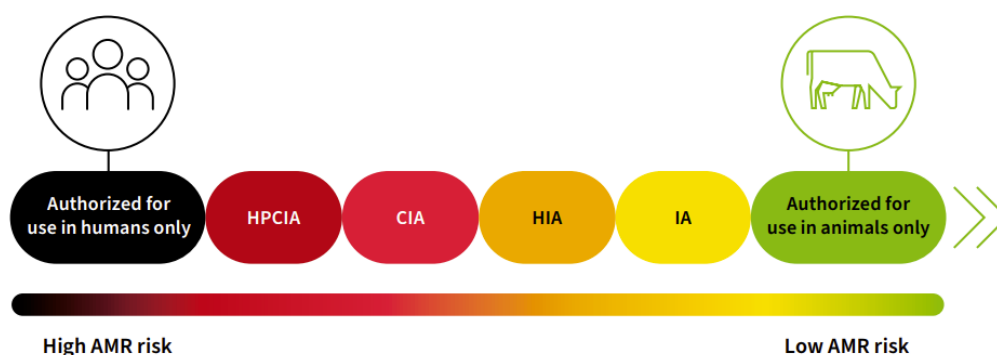


Figura 1: suddivisione degli antimicrobici in base al rischio di sviluppo di AMR associato al loro utilizzo.

(<https://www.who.int/news/item/08-02-2024-who-medically-important-antimicrobial-list-2024>).

Secondo la classificazione proposta dalla EMA gli antimicrobici vengono suddivisi in 4 categorie relativamente all'uso in Medicina Veterinaria con le relative misure di gestione del rischio di sviluppo di AMR (come riportato in *Figura 2*):

- A – “avoid” (evitare): molecole non autorizzate in medicina veterinaria;
- B – “restrict” (limitare): dovrebbero essere presi in considerazione solo per il trattamento di condizioni cliniche quando non esistono alternative antibiotiche nelle Categorie C o D che siano clinicamente efficaci. In particolare per questa categoria, l'impiego dovrebbe basarsi, ove possibile, sui risultati dei test di sensibilità agli antimicrobici;
- C – “caution” (cautela): dovrebbero essere utilizzati solo quando non è disponibile alcuna sostanza appartenente alla Categoria D che risulti clinicamente efficace;
- D – “prudence” (prudenza): dovrebbero essere utilizzati, ove possibile, come trattamenti di prima linea.

Categorisation of antibiotic classes for veterinary use (with examples of substances authorised for human or veterinary use in the EU)				
A	Aminopenicillins mecillinam pivmecillinam	Carbapenems meropenem doripenem	Drugs used solely to treat tuberculosis or other mycobacterial diseases isoniazid ethambutol pyrazinamide ethionamide	Glycopeptides vancomycin
	Ketolides telithromycin	Lipopeptides daptomycin		Glycylcyclines tigecycline
	Monobactams aztreonam	Oxazolidinones linezolid		Phosphonic acid derivatives fosfomicin
	Rifamycins (except rifaximin) rifampicin	Riminoferazines clofazimine	Other cephalosporins and penems (ATC code J01DI), including combinations of 3rd-generation cephalosporins with beta lactamase inhibitors ceftiofur ceftazidime ceftazidime-tazobactam faropenem	Pseudomonic acids mupirocin
	Carboxypenicillins and ureidopenicillins, including combinations with beta lactamase inhibitors piperacillin-tazobactam	Sulfones dapsone		Substances newly authorised in human medicine following publication of the AMEG categorisation to be determined
B	Cephalosporins, 3rd- and 4th-generation, with the exception of combinations with β-lactamase inhibitors cefoperazone cefovecin cefquinome ceftiofur	Polymyxins colistin polymyxin B	Quinolones: fluoroquinolones and other quinolones cinoxacin danofloxacin difloxacin enrofloxacin flumequine ibafloxacin	
C	Aminoglycosides (except spectinomycin) amikacin apramycin dihydrostreptomycin framycetin gentamicin kanamycin neomycin paromomycin streptomycin tobramycin	Aminopenicillins, in combination with beta lactamase inhibitors amoxicillin + clavulanic acid ampicillin + sulbactam	Amphenicols chloramphenicol florfenicol thiamphenicol	Macrolides erythromycin gamithromycin oleandomycin spiramycin tildipirosin tilmicosin tulathromycin tylosin tylvalosin
		Cephalosporins, 1st- and 2nd-generation, and cephamycins cefacetrile cefadroxil cefalexin cefalonium cefalotin cefapirin cefazolin	Lincosamides clindamycin lincocin pirimycin	
			Pleuromutilins tiamulin valnemulin	Rifamycins: rifaximin only rifaximin
D	Aminopenicillins, without beta-lactamase inhibitors amoxicillin ampicillin metampicillin	Aminoglycosides: spectinomycin only spectinomycin	Sulfonamides, dihydrofolate reductase inhibitors and combinations formosulfathiazole phthalylsulfathiazole sulfacetamide sulfachlorpyridazine sulfadiazine sulfadiazine sulfadimethoxine sulfadimidine sulfadoxine sulfafurazole sulfaguanidine	
	Tetracyclines chlortetracycline doxycycline oxytetracycline tetracycline	Anti-staphylococcal penicillins (beta-lactamase-resistant penicillins) cloxacillin dicloxacillin nafcillin oxacillin		
	Natural, narrow-spectrum penicillins (beta lactamase-sensitive penicillins) benzathine benzylpenicillin benzathine phenoxymethylpenicillin benzylpenicillin penethamate hydriodide	pheneticillin phenoxymethylpenicillin procaine benzylpenicillin	Cyclic polypeptides bacitracin	Nitroimidazoles metronidazole
			Steroid antibacterials fusidic acid	Nitrofurans derivatives furaladone furazolidone

Figura 2: categorizzazione delle classi di antibiotici ad uso veterinario in funzione del rischio associato al loro utilizzo.

La via di somministrazione rappresenta un altro fattore determinante per lo sviluppo di 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);
- medicazioni iniettabili di gruppo (metafilassi) solo se giustificate;
- medicazioni orali di gruppo tramite acqua o sostituti del latte solo se giustificate;
- medicazioni orali di gruppo tramite mangime solo se giustificate.

(https://www.ema.europa.eu/system/files/documents/report/ameg_-_categorisation_of_antibiotics_en.pdf#page=37andzoom=100,80,686)

Terapia in asciutta

La mastite bovina si manifesta spesso durante il periodo di asciutta. In questa fase, i casi clinici possono derivare sia da infezioni preesistenti, contratte prima dell'asciutta, sia da nuove infezioni insorte nel corso di questo intervallo. Il trattamento effettuato durante il periodo di asciutta contribuisce a prevenire l'insorgenza di mastite nei quarti interessati, consente di separare le bovine infette da quelle in lattazione e favorisce il recupero di eventuali lesioni a carico del tessuto mammario (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).

Il principio della terapia selettiva alla messa in asciutta si basa sull'impiego mirato di antibiotici, limitato alle bovine che presentano una storia clinica di mastite durante la lattazione precedente oppure nei casi in cui vi sia il sospetto di infezioni intramammarie, rilevate attraverso l'aumento delle cellule somatiche, esami colturali o test di sensibilità agli antimicrobici. La decisione terapeutica tiene conto anche dei fattori di rischio specifici dell'allevamento (Scherpenzeel et al., 2016).

Terapia di supporto

In presenza di mastite clinica accompagnata da sintomi sistemici, è fondamentale intervenire sul dolore e sull'infiammazione associati alla patologia perché l'impiego di antinfiammatori in combinazione con la terapia antibiotica favorisce un miglior recupero clinico nelle bovine colpite (McDougall et al., 2009). In genere, i farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) risultano più efficaci rispetto ai corticosteroidi nel trattamento delle forme cliniche di mastite.

In caso di disidratazione dell'animale, al trattamento antinfiammatorio può essere associata una terapia reidratante mediante somministrazione di cristalloidi isotonici o soluzione salina ipertonica, accompagnata da acqua disponibile ad libitum (Constable, 2016).

L'uso dell'ossitocina, insieme a mungiture frequenti, favorisce la rimozione di agenti patogeni e residui farmacologici dalla ghiandola mammaria, contribuendo a un più rapido miglioramento clinico (Smith, 2015).

4.2 Emogasanalisi

L'emogasanalisi rappresenta uno strumento utile per valutare lo stato acido-base e l'efficienza degli scambi gassosi a livello polmonare. La sua interpretazione si basa tradizionalmente sull'equazione di Henderson-Hasselbalch. Tuttavia, questo metodo presenta dei limiti, in particolare quando si tratta di analizzare alterazioni complesse dell'equilibrio acido-base. Per questo motivo, sono stati introdotti strumenti aggiuntivi come il base excess (BE, eccesso di basi) e l'anion gap (AG, gap anionico).

Un modello alternativo, proposto da Peter Stewart e successivamente perfezionato, offre un approccio quantitativo noto come "strong ion approach" (approccio degli ioni forti). Questo sistema differisce dalla

metodologia tradizionale soprattutto nella valutazione dei disordini metabolici legati all'equilibrio acido-base.

Entrambi gli approcci possono essere considerati complementari, pur avendo vantaggi e limiti specifici. Nelle alterazioni semplici dell'equilibrio acido-base, l'equazione di Henderson-Hasselbalch è generalmente sufficiente. Tuttavia, in situazioni più complesse, come quelle associate a variazioni nei livelli di albumina o fosfato nel sangue, l'approccio degli ioni forti risulta più indicato.

Una conoscenza approfondita di entrambi i modelli, unita all'analisi del quadro clinico del paziente, consente una gestione ottimale dei disturbi dell'equilibrio acido-base e l'impostazione di un trattamento mirato ed efficace (Wagner et al., 2015).

4.2.1 Equilibrio acido-base

Nel contesto biochimico, un acido è definito come una sostanza in grado di cedere ioni idrogeno (H^+), ossia protoni, mentre una base è una molecola capace di accettare tali protoni. Gli acidi sono generalmente rappresentati come HA, dove “ H^+ ” rappresenta lo ione idrogeno e “ A^- ” la base con carica negativa. In soluzione acquosa, il composto HA si dissocia generando H^+ e A^- . Gli ioni idrogeno possono essere classificati come acidi fissi o non volatili, prodotti dal metabolismo proteico e fosfolipidico, e vengono escreti principalmente per via renale. Le basi neutralizzano gli acidi riducendo la concentrazione di H^+ in soluzione, contribuendo così all'omeostasi del pH (Guyton and Hall, 1956).

Il diossido di carbonio (CO_2), invece, rappresenta un acido volatile, cioè un gas liposolubile che, in presenza dell'enzima anidrasi carbonica, può idratarsi per formare acido carbonico (H_2CO_3). Questo composto si dissocia reversibilmente in H^+ e bicarbonato (HCO_3^-). Il CO_2 deriva dal metabolismo aerobico di carboidrati e lipidi e viene eliminato attraverso la ventilazione polmonare. Le due principali fonti acide, ovvero H^+ e CO_2 , sono funzionalmente interconnesse, come descritto dall'equilibrio chimico seguente:



Questa reazione è bidirezionale e dipende dalla disponibilità dei reagenti su entrambi i lati dell'equilibrio. L'anidrasi carbonica ne catalizza la conversione, e tutte le cellule che esprimono questo enzima sono in grado di mediare tale processo (Ettinger and Feldman, 2005).

Il pH, parametro fondamentale in fisiologia, è definito come il logaritmo negativo della concentrazione degli ioni idrogeno. Un incremento di H^+ (acidosi) determina una riduzione del pH ematico (acidemia), mentre una riduzione di H^+ conduce a un aumento del pH (alcalemia). L'accumulo sistemico di acidi può derivare da un'inadeguata eliminazione renale di sostanze acide endogene o dall'introduzione esogena di composti acidi (Romero and Rossano, 2019).

Le variazioni nella concentrazione di CO_2 influenzano significativamente l'equilibrio acido-base. Un aumento della ventilazione alveolare promuove l'eliminazione di CO_2 , spostando l'equilibrio verso la formazione di H_2O e CO_2 a partire da H_2CO_3 ; ciò riduce la disponibilità di H^+ e favorisce un aumento

del pH. Al contrario, una ridotta ventilazione porta a ritenzione di CO₂, favorendo l'acidosi respiratoria (Sjaastad et al., 2010).

I sistemi tampone svolgono un ruolo cruciale nella regolazione del pH, legando H⁺ per limitare le variazioni della sua concentrazione. Tra i principali tamponi presenti nell'organismo si annoverano quelli non bicarbonato (come le proteine e i fosfati, prevalentemente intracellulari) e il bicarbonato (HCO₃⁻), principale tampone extracellulare. Il sistema tampone bicarbonato è particolarmente efficace grazie alla sua elevata concentrazione e alla capacità di interagire con l'anidride carbonica per formare un gas eliminabile attraverso i polmoni (Hamm et al., 2015).

Per tale motivo, il sistema bicarbonato è considerato un sistema aperto, poiché mantiene la sua efficacia tampone fintanto che la ventilazione polmonare è funzionale. Tuttavia, un'eccessiva perdita di bicarbonato attraverso il tratto urinario o gastrointestinale può compromettere tale equilibrio: in tal caso, CO₂ e H₂O si combinano per rigenerare H₂CO₃, il quale dissocia incrementando H⁺ e inducendo una condizione di acidemia (Ettinger and Feldman, 2005).

4.2.2 Modelli interpretativi

Modello Boston (Bicarbonate-centered)

All'inizio del Novecento, gli acidi venivano definiti come sostanze capaci di donare ioni idrogeno (H⁺) a una soluzione, mentre le basi come quelle in grado di accettarli.

Henderson fu il primo a evidenziare il ruolo fondamentale del bicarbonato come tampone fisiologico: questa molecola può legare o rilasciare ioni idrogeno, contribuendo così a mantenere stabile il pH quando la pressione parziale di CO₂ (pCO₂) resta costante. L'equazione di Henderson-Hasselbalch descrive in modo semplice la relazione tra pCO₂ (componente respiratoria), il bicarbonato (componente non respiratoria) e il pH (indice complessivo dell'acidità) (Kimura et al., 2018).

A partire da questa equazione venne sviluppato un metodo per interpretare i disturbi acido-base basato sul rapporto CO₂/HCO₃⁻ (Schwartz and Relman, 1963).

Questo approccio non considera infatti altri sistemi tampone presenti nel sangue, come l'albumina e l'emoglobina, per cui variazioni nella concentrazione di bicarbonato non sempre riflettono accuratamente lo stato metabolico complessivo. Inoltre, rappresentare pCO₂ e bicarbonato come variabili indipendenti può creare confusione, data la loro reciproca influenza (Kimura et al., 2018).

Gap Anionico (AG)

Il concetto di gap anionico deriva dal principio di elettroneutralità, secondo cui l'AG rappresenta la differenza tra la concentrazione di anioni non misurati ([UA]) e quella di cationi non misurati ([UC]) presenti nel siero. Questo principio può essere espresso attraverso l'equazione generale:

$$[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] + [\text{UC}] = [\text{Cl}^-] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{UA}]$$

Nel calcolo del AG è sempre necessario includere la concentrazione sierica di potassio, in quanto essa può variare sensibilmente nei ruminanti, specialmente negli adulti in condizione di anoressia o nei vitelli con grave disidratazione e diarrea. L'equazione può essere riorganizzata nel seguente modo:

$$[UA] - [UC] = ([Na^+] + [K^+]) - ([Cl^-] + [HCO_3^-]) = AG$$

Questo indica che ogni variazione nella concentrazione di [UA] o [UC] determinerà una corrispondente modifica del valore del AG. Un aumento del AG riflette pertanto un incremento degli anioni non misurati, una riduzione dei cationi non misurati oppure una combinazione di entrambi. In condizioni fisiologiche, circa due terzi del AG derivano dalla carica negativa netta delle proteine plasmatiche, principalmente dell'albumina, mentre la parte restante è attribuibile alla concentrazione sierica di fosfato e di anioni forti come lattato, solfato, β -idrossibutirrato, aceto acetato e anioni associati a condizioni di uremia.

Il metodo basato sull'AG consente quindi di stimare la concentrazione degli anioni forti non misurati; tuttavia, tale stima può essere alterata da variazioni delle concentrazioni sieriche di proteine, in particolare dell'albumina, e di fosfato. È stato riportato che una riduzione di 1 g/dL della concentrazione di proteine plasmatiche può associarsi a una diminuzione dell'AG di circa 3,7 mEq/L. Sebbene siano disponibili formule correttive che considerano specificamente componenti come fosfato e albumina, l'impiego di tali aggiustamenti non sembra migliorare in modo sostanziale l'utilità clinica dell'AG nei bovini e ne aumenta la complessità di calcolo; per questi motivi, il loro uso non è comunemente raccomandato (Constable, 1999).

Approccio di Copenhagen (BE e SBE)

Nel 1948 venne introdotto il concetto di "buffer base", definendola come la somma di tutti gli anioni tampone presenti nel plasma, inclusi il bicarbonato e altri acidi deboli non volatili come l'albumina e i fosfati. Le variazioni in questa base tampone riflettono alterazioni metaboliche dell'equilibrio acido-base e hanno portato allo sviluppo del concetto di base excess (Singer and Hastings, 1948).

Negli anni '60, alcuni studi misurarono la concentrazione di bicarbonato plasmatico in condizioni di temperatura e pCO_2 controllate, confrontandola con un valore di riferimento. La differenza, corretta con un valore costante, rappresenta il BE: la quantità di acido o base da aggiungere a un litro di sangue completamente ossigenato (con pCO_2 di 40 mmHg) per ottenere un pH di 7,40 (Siggaard-Andersen, 1963).

Il BE è un parametro che misura il contributo metabolico all'equilibrio acido-base, indipendentemente dalla componente respiratoria, includendo anche l'effetto tampone dell'emoglobina (Kimura et al., 2018).

Il termine “base deficit” è tecnicamente corretto quando si osserva una carenza di basi, come avviene nell’acidosi metabolica. Al contrario, “base excess” indica un eccesso di basi, tipico dell’alcalosi metabolica. Tuttavia, nella pratica clinica i due termini sono spesso usati in modo intercambiabile. Il termine “base excess” viene spesso utilizzato per indicare l’intero spettro di valori, sia positivi che negativi (Hopper, 2023).

La formula più usata per calcolarlo è l’equazione di Van Slyke, sviluppata da Siggaard-Andersen (Siggaard-Andersen, 1963):

$$BE = \{[(HCO_3^-] - 24.4 + (2.3 * [Hemoglobin (Hb)] + 7.7) * (pH - 7.4)\} * (1 - 0.023 * [Hb])$$

Tuttavia, in condizioni reali, il BE può risultare impreciso se la pCO₂ varia, probabilmente a causa dell’equilibrio tra il sangue e il liquido interstiziale. Per migliorare la precisione, è stato introdotto il concetto di “base excess standard” (SBE), che tiene conto dell’effetto dell’emoglobina nella regolazione della CO₂:

$$SBE = 0.9287 * \{[(HCO_3^-] - 24.4 + 14.83 * (pH - 7.4)\}$$

Nonostante ciò, l’SBE può ancora risentire di variazioni nella pCO₂ e presuppone concentrazioni normali di albumina e fosfati. In situazioni critiche, come nei pazienti in terapia intensiva, dove questi valori sono spesso alterati, l’SBE può risultare meno affidabile. Inoltre, né il BE né l’SBE riescono a identificare con precisione disturbi acido-base complessi o distinguere le diverse forme di acidosi metabolica (Kimura et al., 2018).

Approccio di Stewart

Stewart propose un nuovo approccio allo studio della fisiologia e dei disturbi dell’equilibrio acido-base, integrando elementi concettuali già esistenti ma riorganizzandoli in una modalità innovativa. Il principale motivo che spinse Stewart a esplorare questa tematica fu la percezione che il modello centrato sul bicarbonato risultasse confuso e insufficiente per spiegare in modo esaustivo le alterazioni acido-base (Story, 2004).

Applicando i seguenti principi chimico-fisici (Whitehair et al., 1995):

- Principio dell’elettroneutralità: in soluzione acquosa, la somma delle cariche positive deve essere uguale alla somma delle cariche negative.
- Principio di conservazione della massa: la quantità di una sostanza rimane uguale a meno che essa non sia aggiunta o generata, distrutta o rimossa.

- L'equilibrio di dissociazione degli elettroliti deboli in acqua

Stewart sviluppò un modello concettualmente affine agli approcci precedentemente delineati da Van Slyke e da Singer e Hastings (Story, 2004).

La sua teoria si basa sulla distinzione tra variabili indipendenti e dipendenti nel determinare la concentrazione degli ioni idrogeno (H^+) in una soluzione. Secondo il suo modello, sono tre le variabili che determinano in modo indipendente l'equilibrio acido-base e, di conseguenza, il pH (Kimura et al., 2018):

- La differenza tra ioni forti (SID, Strong Ion Difference)
- La concentrazione totale degli acidi deboli (A_{TOT})
- La pCO_2 .

Il pH e la $[HCO_3^-]$ costituiscono invece le variabili dipendenti (il cui valore è determinato dalle variabili indipendenti), per cui né l'uno né l'altro possono variare primariamente e individualmente (Stewart, 1981).

Le alterazioni di SID o A_{TOT} sono, secondo Stewart, la base dei disturbi metabolici dell'equilibrio acido-base (Kimura et al., 2018).

L'approccio di Stewart può offrire una comprensione più approfondita non solo dei meccanismi alla base dei disturbi dell'equilibrio acido-base, ma anche delle diverse strategie terapeutiche, comprese la gestione dei fluidi, la terapia con tamponi e le metodiche di sostituzione renale (Story, 2004).

SID (Strong Ion Difference)

Gli ioni presenti a livello plasmatico possono essere distinti in due principali categorie: ioni non tampone (detti anche ioni forti o elettroliti forti) e ioni tampone.

Gli ioni forti risultano completamente dissociati a pH fisiologico e, per tale motivo, non esercitano alcun effetto tampone. Tuttavia, questi ioni producono un effetto elettrico, poiché la somma delle cariche dei cationi completamente dissociati non corrisponde a quella degli anioni completamente dissociati. Stewart definì questa differenza come SID.

Poiché gli ioni forti non prendono parte a reazioni chimiche nel plasma a pH fisiologico, possono essere considerati come un'unità collettiva di carica, indicata come $[SID^+]$, espressa in mEq/L (Constable, 1999).

Il valore della SID varia se cambia la differenza tra la somma dei cationi forti e quella degli anioni forti. Nel plasma, il sodio (Na^+) rappresenta il principale catione forte in grado di determinare modifiche significative del SID. Tra gli anioni plasmatici, variazioni nella concentrazione di cloro (Cl^-), di anioni non identificati o di entrambi possono alterare il SID. Gli anioni non identificati comprendono acidi organici, come il lattato e i corpi chetonici, oppure anioni inorganici forti, come il solfato. In assenza di

anioni non identificati, il valore del SID corrisponde approssimativamente alla differenza tra la concentrazione di Na^+ e quella di Cl^- (Whitehair et al., 1995).

Un valore di SID negativo riflette un eccesso di anioni forti, che deve essere compensato da cariche positive. In questo caso, i cationi necessari provengono dalla dissociazione dell'acqua, rendendo necessario un aumento della concentrazione di $[\text{H}^+]$, che tenderà ad avvicinarsi al valore assoluto del $[\text{SID}^-]$.

Al contrario, un valore di SID positivo indica un eccesso di cationi forti, che richiede un bilanciamento attraverso cariche negative. Gli anioni disponibili derivano anch'essi dalla dissociazione dell'acqua, con conseguente incremento della concentrazione di $[\text{OH}^-]$, che si avvicinerà al valore del $[\text{SID}^+]$ (Mercieri, 2006).

SID_a, SID_e e SIG

Come precedentemente illustrato, in base al principio di elettroneutralità, la carica positiva rappresentata dal SID_a (SID apparente, definito come la differenza tra cationi forti e anioni forti misurabili (Morgan, 2009)) deve essere compensata dalle cariche negative fornite dalla pCO_2 e dagli acidi deboli (costituiti principalmente da albumina e fosfati). Questa valutazione del valore del SID viene definita SID effettivo. In condizioni normali, i valori di SID_a e SID_e dovrebbero coincidere, e pertanto la loro differenza dovrebbe risultare pari a zero. Tuttavia, un incremento nella concentrazione di anioni forti diversi dal cloro (come lattato, chetoacidi e solfati), generalmente non considerati nel calcolo del SID_a, comporta, per il principio di elettroneutralità, una riduzione degli anioni tampone volatili e non volatili, con conseguente diminuzione del SID_e.

In tale situazione, la differenza tra SID_a e SID_e genera un gap, definito *Strong Ion Gap* (SIG), che rappresenta la stima della quantità di anioni forti non misurati (Mercieri, 2006):

$$\text{SIG} = [\text{SID}_a^-] - [\text{SID}_e^-]$$

Un vantaggio teorico del SIG rispetto all'AG è che rappresenta in modo più specifico gli ioni effettivamente non misurati. Mentre l'AG comprende anche ioni comunemente presenti come calcio, magnesio, albumina, fosfati e lattato, il SIG esclude questi e si concentra solo su componenti normalmente non misurati.

In condizioni fisiologiche, mentre l'AG si aggira tra 7 e 17 mEq/L (quando si include il potassio), il SIG è prossimo allo zero. Sebbene il gap anionico corretto per l'albumina riduca l'impatto di variazioni nei livelli di questa proteina, una discrepanza residua può comunque persistere (Kimura et al., 2018).

A_{TOT}

Il termine $[\text{A}_{\text{TOT}}]$ indica la somma delle concentrazioni plasmatiche degli ioni tampone, che derivano dalla dissociazione parziale di acidi deboli non volatili (HA) a pH fisiologico. Ogni acido debole si

presenta in due forme, una dissociata (A^-) e una non dissociata (HA), mantenendo un rapporto costante secondo il principio di conservazione della massa:

$$K = ([H^+][A^-]) / [HA]$$

La somma delle concentrazioni delle forme dissociata e non dissociata di tutti gli acidi deboli costituisce il valore complessivo di $[A_{TOT}]$:

$$[A_{TOT}] = [HA] + [A^-]$$

Nel plasma, gli acidi deboli sono rappresentati principalmente dalle proteine (soprattutto l'albumina) e, in misura minore, dal fosfato inorganico, che contribuisce per circa il 5% al valore di $[A_{TOT}]$. L'espressione complessiva di $[A_{TOT}]$ nel plasma è (Constable, 1999):

$$[A_{TOT}] = [A_{alb}] + [A_{glb}] + [A_{Pi}]$$

pCO₂:

Rappresenta la concentrazione misurata di anidride carbonica disciolta nel sangue, espressa in millimetri di mercurio (mmHg). La produzione di anidride carbonica avviene all'interno delle cellule, principalmente durante il ciclo dell'acido citrico, a livello del citoplasma e dei mitocondri.

La CO₂ rappresenta sottoprodotto del metabolismo che deve essere eliminato dall'organismo tramite il trasporto ai polmoni e la successiva espirazione. La CO₂ viene trasportata dai tessuti periferici ai polmoni attraverso tre principali modalità: come gas disciolto, sotto forma di bicarbonato e legata all'emoglobina come carbamino-emoglobina (o ad altre proteine).

Quando la CO₂ diffonde dai tessuti periferici nel circolo ematico, circa il 10% rimane disciolto nel plasma o nella matrice extracellulare sanguigna, mantenendo una pressione parziale di circa 45 mmHg.

La maggior parte dell'anidride carbonica che attraversa i capillari e penetra nei globuli rossi si combina con l'acqua attraverso una reazione chimica catalizzata dall'enzima anidrasi carbonica, formando acido carbonico. Quest'ultimo si dissocia quasi immediatamente in uno ione bicarbonato e un protone (H^+).

Di conseguenza, il bicarbonato rappresenta il principale meccanismo di trasporto dell'anidride carbonica a livello ematico, secondo la reazione (Doyle and Cooper, 2025):



4.2.3 Alterazioni dell'equilibrio acido-base

La valutazione dell'equilibrio acido-base consente di identificare quattro principali alterazioni, riconducibili ai sistemi respiratorio o metabolico: acidosi o alcalosi metabolica e acidosi o alcalosi

respiratoria. Il primo passaggio nella valutazione di un'emogasanalisi consiste nell'accertare la presenza di acidemia o alcalemia attraverso l'osservazione del valore di pH. Un pH inferiore a 7,35 indica acidemia, mentre un pH superiore a 7,45 indica alcalemia. Successivamente, è necessario determinare quale meccanismo (metabolico o respiratorio) sia responsabile della variazione del pH osservata. È importante sottolineare che nei pazienti possono coesistere simultaneamente più disturbi acido-base, il che può risultare in un valore di pH normale o prossimo alla normalità (Gonzalez and Waddell, 2016).

Alterazioni acido-base di tipo respiratorio

Le alterazioni acido-base di tipo respiratorio si presentano quando i polmoni rimuovono CO₂ a una velocità minore (acidosi respiratoria) o maggiore (alcalosi respiratoria) di quella alla quale viene prodotta. Nel primo caso la pCO₂ aumenta, spostando a destra la reazione nell'equazione; ne consegue un aumento della concentrazione di H⁺:



La maggior parte dell'eccesso degli ioni idrogeno generati viene catturata dai sistemi tampone, con l'eccezione del sistema H₂CO₃ – HCO₃⁻. Senza questo tamponamento, le variazioni di pH sarebbero più elevate. Quando la CO₂ è eliminata a una velocità maggiore della sua produzione (alcalosi respiratoria), si sviluppa una situazione opposta. La diminuzione della concentrazione di H⁺ comporta quindi un rilascio di H⁺ da parte dei sistemi tampone, che minimizzano così le variazioni di pH.

Durante le alterazioni respiratorie dell'equilibrio acido-base le concentrazioni di H⁺ e HCO₃⁻ variano nella stessa direzione. Pertanto, la caratteristica dell'acidosi respiratoria è data dall'aumento sia di H⁺ che di HCO₃⁻:



Nell'acidosi respiratoria, mentre HCO₃⁻ aumenta, le concentrazioni anioniche delle altre coppie di tamponi si riducono.

Poiché il problema alla base dell'acidosi e dell'alcalosi respiratoria è di origine respiratoria, tali disturbi non possono essere corretti da una compensazione respiratoria, ma da un meccanismo renale. Durante l'acidosi respiratoria sia l'aumento di pCO₂ che quello di H⁺ stimola l'escrezione urinaria di H⁺ e quindi la generazione renale di HCO₃⁻. Una compensazione totale implica che la concentrazione di HCO₃⁻ nel liquido extracellulare aumenti nella stessa misura dell'iniziale incremento di CO₂, così da ristabilire il normale rapporto di 20:1 tra HCO₃⁻ e CO₂ e conseguentemente un normale pH.

Tuttavia la correzione delle concentrazioni di CO₂, e HCO₃⁻ non avviene fino a che le cause dell'acidosi respiratoria non sono state rimosse e la pCO₂ non è ritornata normale; l'escrezione urinaria di H⁺ e la

generazione renale di HCO_3^- ritornano allora ai loro livelli fisiologici. Nell'alcalosi respiratoria i meccanismi compensatori che si attuano nei reni sono di segno opposto rispetto a quelli che operano durante l'acidosi respiratoria.

Alterazioni acido-base di tipo metabolico

I disturbi metabolici nell'equilibrio acido-base comprendono tutti i tipi di acidosi e alcalosi non causati da un'anormale rimozione di CO_2 dal sistema respiratorio.

Quando l' H^+ ha un'origine diversa dalla reazione fra CO_2 e acqua, per esempio da acido lattico, l'equilibrio nell'equazione è spostato a sinistra. Questo tipo di alterazione nell'equilibrio acido-base è chiamato acidosi metabolica.

Molti H^+ in eccesso reagiscono con HCO_3^- e altre basi, che limitano le variazioni di pH. Mentre durante le alterazioni acido-base di tipo respiratorio H^+ e HCO_3^- si modificano nella stessa direzione, durante i disturbi metabolici questi ioni subiscono modificazioni in direzioni opposte; per esempio, durante l'acidosi metabolica H^+ aumenta, mentre HCO_3^- , come le altre basi dei tamponi, si riduce.

Sebbene l'acidosi metabolica non sia causata da ritenzione di CO_2 , nell'organismo, la concentrazione di CO_2 , durante questo tipo di disturbo acido-base non rimane inalterata. L'incremento di concentrazione di H^+ stimola il centro respiratorio tramite chemosensori periferici e il respiro diventa più profondo e più rapido. Conseguentemente le concentrazioni di CO_2 e HCO_3^- si riducono a valori inferiori alla norma. La ridotta concentrazione plasmatica di CO_2 porta le reazioni dell'equazione verso sinistra, riducendo la concentrazione di H^+ (il pH torna verso la normalità). L'acidosi è ora parzialmente compensata da una riduzione della concentrazione di CO_2 quasi della stessa entità dell'iniziale riduzione nella concentrazione di HCO_3^- .

Il rapporto tra HCO_3^- e CO_2 , e quindi il pH, è così quasi normalizzato; durante l'alcalosi metabolica avviene il contrario. In questa situazione, il volume tidale e la frequenza respiratoria diminuiscono, determinando ritenzione di CO_2 e ritorno del pH verso la normalità.

Quindi mentre una pCO_2 anormale è la causa di disturbi respiratori nell'equilibrio acido-base, i polmoni possono compensare disturbi metabolici modificando la pCO_2 ; tuttavia, la compensazione polmonare è sempre incompleta.

La completa correzione degli squilibri acido-base metabolici non si attua fintanto che i reni non hanno ripristinato una normale concentrazione di HCO_3^- e, successivamente, una normale pCO_2 nel liquido extracellulare mediante un aumento della produzione renale di HCO_3^- durante l'acidosi e la sua escrezione urinaria durante l'alcalosi. Negli squilibri acido-base metabolici dovuti a malattie renali la compensazione completa non è possibile, in quanto i meccanismi renali non sono in grado di contribuire pienamente alla regolazione del pH (Sjaastad et al., 2010).

L'acidosi metabolica è caratterizzata quindi da una riduzione del pH, del bicarbonato e del BE, spesso accompagnata da una diminuzione compensatoria della pCO_2 . Al contrario l'alcalosi metabolica è

caratterizzata da un aumento del pH, del bicarbonato e del BE, spesso associato a un aumento compensatorio della $p\text{CO}_2$.

Le alterazioni dell'equilibrio acido-base determinano variazioni del pH, che attivano meccanismi compensatori a carico del sistema opposto. La compensazione respiratoria è rapida, si completa in pochi minuti, mentre quella metabolica richiede un periodo più lungo, generalmente tra i 2 e i 5 giorni. È importante sottolineare che non si arriva mai ad una ipercompensazione: il pH non supera i limiti fisiologici. Se la compensazione appare eccessiva rispetto a quanto previsto, potrebbe essere presente un disturbo misto, ovvero la coesistenza di più alterazioni primarie dell'equilibrio acido-base (Gonzalez and Waddell, 2016).

Tipologia di prelievo

L'analisi dei gas nel sangue può essere effettuata su campioni venosi o arteriosi. I prelievi venosi sono più semplici da eseguire, tramite venopuntura diretta o mediante un catetere endovenoso. Possono essere utilizzati per valutare squilibri metabolici ed elettrolitici e per ottenere informazioni sullo stato ventilatorio del paziente, anche se non sono altrettanto efficaci nella valutazione dell'ossigenazione. I valori ottenuti dai gas ematici venosi possono essere influenzati da alterazioni della circolazione periferica e dell'attività metabolica. I risultati rispecchiano infatti il metabolismo dei tessuti a valle del punto di prelievo e possono quindi variare; per questo, se possibile, è preferibile utilizzare campioni venosi centrali rispetto a quelli periferici. Tuttavia, nei pazienti con buona perfusione, anche un'emogasanalisi venosa periferica può fornire dati utili.

Il prelievo arterioso, invece, è meno soggetto a errori dovuti a scarsa perfusione, ma richiede competenze tecniche maggiori. I campioni arteriosi sono i più indicati per valutare l'ossigenazione, oltre che per identificare alterazioni metaboliche, elettrolitiche e ventilatorie. È essenziale sapere se il campione analizzato sia venoso o arterioso, poiché i valori di riferimento differiscono. Per esempio, la $p\text{CO}_2$ venosa è solitamente circa 5 mmHg più alta rispetto a quella arteriosa, un aspetto da considerare nell'interpretazione dei risultati (Gonzalez and Waddell, 2016).

Nonostante questo, in diversi scenari clinici, i parametri emogasanalitici quali pH, $p\text{CO}_2$ e bicarbonato derivati da campioni di sangue venoso, sia periferico che centrale, possono rappresentare un'alternativa valida alle corrispondenti misurazioni arteriose (Treger et al., 2010).

I parametri rilevabili attraverso l'emogasanalisi sono vari, di seguito verranno presentati i principali.

pH

Indica il grado di acidità del campione. Il valore di pH è determinato come logaritmo negativo della concentrazione di ioni idrogeno, mostrando quindi un rapporto inverso con essa: all'aumentare della concentrazione di ioni idrogeno, il pH si riduce (Hopper, 2023).

Nei pazienti veterinari, un valore di pH ematico inferiore a 7,35 è indicativo di acidemia, mentre un valore superiore a 7,45 suggerisce una condizione di alcalemia. Ad esempio, un campione di sangue con pH pari a 7,0 verrebbe classificato come acidemico, corrispondente a una concentrazione di ioni idrogeno pari a $1,0 \times 10^{-7}$ (Gonzalez and Waddell, 2016).

pCO₂ e PO₂

La pressione parziale di un gas corrisponde alla pressione esercitata da un singolo componente gassoso all'interno di una miscela di gas o in soluzione liquida. Essa riflette il rapporto tra la concentrazione del gas specifico e la pressione totale della miscela. Per determinarla, si moltiplica la frazione del gas per la pressione assoluta totale. Ad esempio, poiché l'ossigeno rappresenta circa il 21% dell'aria atmosferica e la pressione atmosferica a livello del mare è di 760 mmHg, la pressione parziale dell'ossigeno (pO₂) sarà di circa 160 mmHg ($760 \times 0,21$). Le pressioni parziali di ossigeno e anidride carbonica sono indicate rispettivamente come pO₂ e pCO₂.

Nel sistema circolatorio, l'anidride carbonica è trasportata in diverse forme: disciolta nel plasma, legata all'emoglobina o, in prevalenza, sotto forma di ioni bicarbonato. Esiste una regolazione reciproca tra ossigeno e CO₂ nel loro legame con l'emoglobina: il legame della CO₂ facilita il rilascio di ossigeno ai tessuti (effetto Bohr), mentre la saturazione dell'emoglobina con l'ossigeno promuove la liberazione della CO₂ negli alveoli polmonari (effetto Haldane) (Gonzalez and Waddell, 2016).

Ematocrito (Hct)

L'ematocrito rappresenta la percentuale di globuli rossi rispetto al volume totale di sangue ed è determinato mediante la misurazione della resistenza elettrica del campione ematico (Gonzalez and Waddell, 2016).

Emoglobina (Hgb)

Il valore dell'emoglobina viene solitamente stimato dalla maggior parte degli apparecchi da emogas utilizzando la seguente formula (Gonzalez and Waddell, 2016):

$$\text{Emoglobina (g/dL)} = \text{Ematocrito misurato} / 3,0$$

BE

Il base excess rappresenta in modo diretto la quantità (solitamente espressa in mEq/L) di base forte o acido che è stata aggiunta per litro di sangue o plasma, considerando come riferimento un valore medio

normale arbitrariamente fissato a zero. Attualmente, il base excess è definito come la quantità di acido forte (ad esempio HCl) necessaria per riportare il pH di sangue umano completamente ossigenato a 7,40, alla temperatura di 37 °C (inizialmente 38 °C) e con una pCO₂ costante di 40 mmHg.

Secondo questa definizione, il valore normale di base excess nell'uomo è pari a 0 mEq/L, con un intervallo fisiologico compreso tra -2 e +2 mEq/L. Un base excess superiore a +2 mEq/L è indicativo di alcalosi metabolica, mentre un valore inferiore a -2 mEq/L (noto anche come deficit basico) è indicativo di acidosi metabolica (Constable, 1999).

Per superare i limiti dell'analisi in vitro, che non riflette accuratamente la capacità tampone dell'organismo, è stato sviluppato il concetto di standard base excess. Questo parametro valuta l'ammontare di acido o base necessario per riportare il compartimento extracellulare a un pH fisiologico di 7,40. Alcuni analizzatori riportano questi valori calcolati, che sono spesso utilizzati per determinare il dosaggio di tamponi, generalmente sotto forma di bicarbonato di sodio, da somministrare in caso di acidosi metabolica grave (Bateman, 2009).

Anidride carbonica totale (tCO₂)

Rappresenta una stima della concentrazione di bicarbonato, parametro indicativo della componente metabolica dell'equilibrio acido-base. Salvo in presenza di valori di pCO₂ estremamente alterati, la TCO₂ risulta generalmente superiore di 1–2 mmol/L rispetto alla reale concentrazione di bicarbonato. Questo valore viene utilizzato in assenza della misura diretta di [HCO₃⁻] ed è comunemente riportato nei profili biochimici sierici (Hopper, 2023).

Bicarbonato [HCO₃⁻]

Il bicarbonato rappresenta il principale tampone extracellulare dell'organismo. Viene prodotto a partire da CO₂ e H₂O in presenza dell'enzima anidrasi carbonica. La sua concentrazione è un valore calcolato, derivato dall'equazione di Henderson-Hasselbalch. Il bicarbonato è un indicatore della componente metabolica dell'equilibrio acido-base: valori ridotti suggeriscono tipicamente un'acidosi metabolica, mentre concentrazioni elevate sono indicative di alcalosi metabolica. Tuttavia, poiché il bicarbonato viene calcolato a partire dai valori di pH e pCO₂, risente anche della componente respiratoria e, pertanto, deve essere interpretato congiuntamente alla pCO₂ (Constable, 1999).

Contenuto di ossigeno

Il contenuto di ossigeno è definito come la quantità totale di ossigeno presente in un determinato volume di sangue intero, considerando sia l'ossigeno legato all'emoglobina sia l'ossigeno disciolto nel plasma (Gonzalez and Waddell, 2016).

Saturazione dell'ossigeno (SaO₂)

La SaO₂ rappresenta la percentuale di emoglobina ossigenata (ossi-emoglobina) rispetto alla quantità totale di emoglobina, che comprende sia la forma ossigenata che quella deossigenata. In assenza di tecnologie di emossimetria, tale valore viene calcolato dalla maggior parte degli analizzatori emogasanalitici utilizzando i parametri di pH, PO₂ ed emoglobina (Gonzalez and Waddell, 2016).

Elettroliti

Diversi elettroliti, tra cui sodio, potassio, cloruro, calcio e magnesio, possono essere determinati mediante elettrodi ione-selettivi. Questi elettrodi utilizzano una membrana semipermeabile a ciascuna ione, creando così concentrazioni differenti e un potenziale elettrico dal quale è possibile misurare la concentrazione di ioni liberi (Gonzalez and Waddell, 2016).

4.2.4 Principali applicazioni in buiatria

Asfissia fetale

L'asfissia è caratterizzata da un eccesso di anidride carbonica (ipercapnia) e da una carenza di ossigeno (ipossiemia) causata da un insufficiente apporto di ossigeno al feto attraverso il cordone ombelicale (Bleul et al., 2007).

Nell'ambito dell'ostetricia bovina, stabilire il momento opportuno per intervenire al fine di salvare il feto può risultare complesso. La durata della seconda fase del parto varia considerevolmente tra le bovine, rendendo difficile il riconoscimento tempestivo dei primi segnali di distocia. Un intervento prematuro può causare lesioni sia al vitello che al canale del parto, a causa di un'insufficiente dilatazione cervicale. Al contrario, un'attesa eccessiva comporta il rischio di danni fetali dovuti a carenza di ossigeno (ipossia), accumulo di anidride carbonica (ipercapnia) e acidosi.

A tal proposito è stato condotto uno studio con l'obiettivo di riuscire a valutare l'affidabilità dell'utilizzo di specifici parametri, ricavati attraverso emogasanalisi durante la seconda fase del parto, con il fine di identificare in maniera efficace condizioni di asfissia fetale. I parametri che tendono a variare in maniera considerevole sono il pH e il BE, i cui valori risultano significativamente più bassi dopo la nascita rispetto agli ultimi 30 minuti della seconda fase del parto (Bleul et al., 2008).

Diarrea neonatale del vitello

La diarrea neonatale del vitello (NCD) rappresenta ancora oggi la principale causa di morbidità e mortalità nei bovini giovani, ed è caratterizzata da diarrea accompagnata da acidosi metabolica, disidratazione e squilibrio elettrolitico. Nonostante la complessa fisiopatologia che caratterizza la NCD, è prassi comune che allevatori e gestori degli allevamenti tentino di diagnosticare e trattare la patologia senza il supporto del medico veterinario.

L'emogasanalisi è generalmente considerata il metodo di riferimento per la valutazione degli squilibri legati a questa condizione (Dillane et al., 2020).

Le principali conseguenze della diarrea nei vitelli includono squilibri elettrolitici, disidratazione e acidosi metabolica, spesso associate a un'alterazione della differenza di ioni forti (Sayers et al., 2016). Numerosi studi hanno evidenziato una stretta correlazione tra i segni clinici e variabili ematiche come il pH, il bicarbonato e l'eccesso di basi, in particolare. Nonostante le evidenze disponibili, la definizione di criteri standardizzati e oggettivi per la diagnosi della NCD in funzione della gravità clinica non è stata ancora adeguatamente approfondita dalla ricerca scientifica (Dillane et al., 2020).

SARA (acidosi ruminale subacuta)

L'acidosi ruminale subacuta (SARA) rappresenta una patologia complessa che si riscontra frequentemente nei bovini da latte ad alta resa produttiva alimentati con diete ad alto contenuto energetico. Tuttavia, questo approccio nutrizionale può predisporre gli animali a diversi disturbi gastroenterici. Questa patologia può alterare il comportamento degli animali e causare importanti perdite produttive. Gli erbivori, tra cui i bovini, assorbono nel ruminale acidi organici, lattato e carboidrati, e il pH dei fluidi corporei dipende dal grado di compensazione del sistema tampone bicarbonato.

Dal momento che esiste una stretta correlazione tra il pH ruminale e quello ematico, l'emogasanalisi rappresenta uno strumento diagnostico utile per individuare stati di acidosi nelle bovine da latte, in quanto consente una valutazione efficace della condizione senza la necessità di interventi invasivi come la ruminocentesi. Inoltre, tale metodologia permette di distinguere tra acidosi respiratoria e metabolica, un aspetto particolarmente rilevante nei casi di SARA (Gianesella et al., 2010).

Ipocalcemia subclinica

Uno dei principali ostacoli per la vacca da latte nel periparto è il mantenimento di concentrazioni ematiche ottimali di calcio, fondamentali per sostenere la produzione latte e garantire una corretta funzionalità del sistema immunitario. L'ipocalcemia subclinica (SCH) è una condizione largamente diffusa che colpisce circa il 50% delle vacche pluripare nei primi giorni dopo il parto (Reinhardt et al., 2011), ed è oggetto di crescente attenzione da parte della ricerca scientifica. Per questo motivo, il monitoraggio dei livelli di calcio rappresenta uno strumento essenziale a livello diagnostico e per lo sviluppo di strategie preventive e terapeutiche efficaci.

Nel sangue, il calcio esiste in tre forme: legato alle proteine, complessato con anioni e nella forma ionizzata. Quest'ultima rappresenta la frazione biologicamente attiva, ovvero quella direttamente coinvolta nei processi fisiologici, nonché la forma misurata con gli apparecchi da emogasanalisi.

Il dosaggio del calcio totale (tCa) è più economico e manifesta maggiore stabilità nel tempo, rendendolo pratico per l'uso routinario. Tuttavia, presenta dei limiti: è influenzato dalle variazioni del pH e soprattutto dalle concentrazioni di albumina (Piccione et al., 2011), che possono variare in risposta allo stato di idratazione dell'animale. Al contrario, la misurazione del calcio ionizzato (iCa), pur essendo più costosa e sensibile alle variazioni ambientali (soprattutto del pH), non è influenzata dall'albumina e riflette in modo più accurato il reale stato calcemico dell'animale.

Nel periodo del parto, le bovine da latte attraversano cambiamenti fisiologici significativi, come la diminuzione dell'albumina e l'alterazione dello stato idrico ed elettrolitico. Queste variazioni possono compromettere l'attendibilità del tCa come indicatore dello stato minerale.

Di conseguenza, nonostante la maggiore semplicità e disponibilità della misurazione del tCa, è l'iCa a offrire un valore diagnostico superiore, in particolare per il monitoraggio e la prevenzione dell'ipocalcemia subclinica (SCH) nelle bovine in transizione (Neves et al., 2018).

Mastite

In merito all'utilizzo dell'emogasanalisi in animali affetti da mastite studi recenti hanno evidenziato correlazioni significative tra parametri ematici e livelli di produzione latte, osservando un incremento della pressione parziale di ossigeno direttamente proporzionale alla resa produttiva dell'animale. Tale fenomeno è plausibilmente riconducibile a un aumento della capacità di ossigenazione del sangue nei soggetti ad alta produzione. Parallelamente, è stata riscontrata un'elevata concentrazione di bicarbonato nelle vacche ad elevata produzione latte. L'aumento della glicemia, al contrario, è risultato inversamente correlato alla produzione latte, presumibilmente in quanto legato a un maggiore consumo di glucosio necessario a soddisfare le elevate richieste metaboliche della ghiandola mammaria.

Uno studio ha (Feng et al., 2022) esplorato l'applicazione dell'emogasanalisi in bovini con elevati conteggi di cellule somatiche, finalizzato alla valutazione della permeabilità della ghiandola mammaria. In tale contesto, particolare attenzione è stata dedicata ai livelli di Na^+ e K^+ , riconosciuti come marcatori critici della permeabilità mammaria. I risultati hanno mostrato un aumento significativo della concentrazione di potassio e un incremento del rapporto Na^+/K^+ , nei soggetti con elevate SCC, suggerendo l'impiego dell'emogasanalisi come strumento diagnostico rapido per la valutazione dello stato funzionale della ghiandola mammaria.

Ulteriori indagini (Qayyum et al., 2016) hanno documentato una riduzione statisticamente significativa dei livelli sierici di calcio, fosforo e zinco nei soggetti affetti rispetto al gruppo di controllo (Tommasoni et al., 2023).

5. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il presente lavoro si colloca all'interno di un progetto più ampio, per il quale sono stati raccolti dati relativi a diversi aspetti produttivi e sanitari degli animali reclutati. Particolare attenzione è stata rivolta alla mastite nell'allevamento della bovina da latte, con un focus specifico sulle procedure diagnostiche che si avvalgono dell'utilizzo di strumenti di campo. Tuttavia, solo determinati parametri selezionati sono stati presi in considerazione per lo sviluppo di questa tesi.

Pertanto, gli obiettivi principali di questo studio sono orientati alla valutazione del potenziale applicativo dell'emogasanalisi attraverso l'identificazione di alterazioni metaboliche e sistemiche negli animali affetti da forme lievi di mastite cliniche di origine batterica. Al contempo lo studio si propone di valutare la possibile applicazione dell'emogasanalisi come strumento diagnostico precoce o indicatore prognostico.

6. MATERIALI E METODI

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.

Questo studio è stato approvato dal Comitato per il Benessere Animale dell'Università di Padova (Protocollo n. 10/2024). La gestione degli animali e le diverse procedure sono state effettuate nel rispetto della *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e della Direttiva 2010/63/UE sulle sperimentazioni scientifiche sugli animali (Decreto Legislativo 26/2014).

6.1 Descrizione dell'allevamento oggetto di studio

Lo studio è stato effettuato in un'unica azienda di vacche da latte situata nella provincia di Vicenza (Regione Veneto), al fine di ridurre la variabilità dovuta a differenti gestioni aziendali.

L'allevamento scelto conta 160 vacche in lattazione (Frisone, Brune Alpine e incroci tra le due in percentuali variabili) e pratica sia rimonta interna che esterna. Il sistema adottato è la stabulazione libera, con lettiera mista in gomma e segatura, e sala di mungitura a spina di pesce con 20 postazioni. La politica aziendale prevede un periodo d'asciutta minimo di 60 giorni. La produzione media giornaliera dell'allevamento (considerando tutte le razze presenti) è di circa 35 litri/giorno/capo, e l'azienda riferisce una storia di mastiti causate principalmente da agenti ambientali.

L'azienda prevede l'esecuzione di un controllo funzionale con cadenza mensile e l'utilizzo del CMT, oltre alla valutazione clinica di eventuali forme di mastite da parte dell'allevatore sulla base dell'indicazione del medico veterinario.

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.

6.2 Descrizione del protocollo e criteri di inclusione

Lo studio è stato condotto tra maggio 2023 e febbraio 2024 e ha coinvolto sia vacche primipare che pluripare appartenenti esclusivamente alla razza Frisone Italiana. Il protocollo prevedeva un intervento settimanale, pertanto, al momento dell'intervento (3 ore dopo la mungitura), venivano arruolati tutti gli animali che, in seguito alla valutazione dell'allevatore, avevano manifestato una sintomatologia riconducibile a una forma lieve di mastite clinica durante la mungitura della mattina stessa. Per ogni soggetto reclutato sono stati raccolti il segnalamento, l'anamnesi e i dati produttivi (quali stadio di lattazione e numero di lattazioni).

Con l'obiettivo di evitare "bias", sono stati esclusi animali con forme di mastite moderate o gravi, animali con casi di mastite ripetuti durante il periodo di prova, animali con altri concomitanti processi patologici differenti dalla mastite e animali già in trattamento farmacologico antibiotico al momento dell'intervento.

Per ciascun animale sono stati previsti due interventi: il primo intervento a T_0 (il giorno della diagnosi) e il secondo a distanza di 7 giorni (T_1). In entrambi gli interventi sono stati effettuati:

- Esame clinico;
- Campionamento sterile del latte, in pool dei quattro quarti mammari;
- Analisi del latte: SCC e esame batteriologico con determinazione della MIC;
- Emogasanalisi in campo

6.2.1 Esame clinico

In tutti gli animali è stata effettuata una valutazione clinica al fine di confermare la presenza di una forma di mastite lieve ed escludere capi con forme di mastite moderate o gravi. In particolare distinguiamo:

- Mastite lieve: forma caratterizzata unicamente da alterazioni del latte (flocculi, coaguli, latte sieroso o rossastro), mentre non si rilevano né sintomi a livello mammario, né a livello sistemico.
- Mastite moderata: forma in cui oltre alle alterazioni del latte, sono presenti anche dei segni di infiammazione della mammella, che appare dolente, calda ed edematosa.
- Mastite grave: forma in cui ai sintomi precedenti si associano almeno due sintomi generali (o sistemici) come febbre, anoressia, blocco ruminale, calo significativo della produzione.

6.2.2 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 48 detergente (DEOSAN TEATFOAM®) e rimuovendolo con carta assorbente a perdere. Segue la fase di disinfezione dell'apice del capezzolo con garze sterili imbibite 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.

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

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.

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 ore. 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. L'interpretazione dei risultati si è basata sui seguenti criteri:

- 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, translucide. *Streptococcus agalactiae* può essere non emolitico oppure presentare emolisi di tipo β . 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 sieroagglutinazione.
- *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).

MIC

Per quanto concerne la determinazione della MIC, nei laboratori diagnostici dell'IZSve, il metodo utilizzato per la determinazione della MIC è il metodo della microdiluizione in brodo che impiega piastre monouso a 96 pozzetti, contenenti diluizioni scalari dei diversi principi attivi saggiati. Nei rapporti di prova il microorganismo 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.

6.2.4 Emogasanalisi

Raccolta del campione

Il campione ematico è stato ottenuto mediante prelievo venoso dalla vena giugulare, scelta giustificata dall'interesse rivolto principalmente alla valutazione degli elettroliti e dei parametri metabolici. Considerata la minore rilevanza nella valutazione dei gas ematici, non si è ritenuto necessario ricorrere a un prelievo arterioso, metodologicamente più indicato per tale scopo.

Gli animali sono stati adeguatamente contenuti mediante l'utilizzo di catture e capezze (come mostrato in *Figura 3*), al fine di garantire la sicurezza dell'operatore e la corretta esecuzione della procedura. Il prelievo è stato effettuato mediante siringa eparinata al fine di preservare l'integrità del campione e garantire l'accuratezza delle analisi.



Figura 3: contenimento mediante l'utilizzo di catture e capezze al fine di garantire la sicurezza dell'operatore e la corretta esecuzione della procedura.

Analisi del campione

Per la valutazione dei parametri rilevabili attraverso emogasanalisi è stato utilizzato il sistema di analisi ematiche epoc®, dispositivo portatile progettato per l'analisi rapida del sangue, composto da tre elementi principali: l'epoc Reader, l'epoc Host e la test card epoc (come mostrato in *Figura 4*).



Figura 4: sistema di analisi ematiche epoc® composto da epoc Reader, epoc Host e test card epoc.

L'introduzione del campione nella test card è avvenuta utilizzando una siringa, assicurandosi che il campione destinato al test sia stato raccolto e gestito correttamente, in modo da ottenere risultati che riflettano fedelmente la condizione del paziente.

Per una corretta introduzione del campione ematico (come mostrato in *Figura 5*) è stato necessario:

- tenere il corpo della siringa in posizione verticale e perpendicolare alla test card per evitare perdite;
- esercitare una leggera pressione verso il basso, bloccando la punta della siringa nella porta di ingresso della test card ed introdurre il campione ematico;
- continuando ad esercitare pressione verso il basso, premere in modo uniforme lo stantuffo della siringa con un unico movimento continuo finché non viene richiesto di interrompere l'operazione.

Lettura dei risultati

L'analizzatore utilizzato fornisce i risultati raggruppati in tre pannelli: Gas⁺, Chem⁺ e Meta⁺ (visibili in *Figura 5*). Ciascun pannello include valori misurati, calcolati e corretti per la temperatura, accessibili tramite l'interfaccia del dispositivo.

I parametri del pannello Gas⁺ comprendono: pH, pressione parziale di anidride carbonica (pCO₂), pressione parziale di ossigeno (pO₂), concentrazione di bicarbonato (cHCO₃⁻), eccesso di basi nei fluidi extracellulari (BE) e saturazione dell'ossigeno (cSO₂).

I parametri del pannello Chem⁺ comprendono: sodio (Na⁺), potassio (K⁺), calcio ionizzato (Ca²⁺), cloruro (Cl⁻), anidride carbonica totale (cTCO₂), gap anionico (AG), ematocrito (Hct), concentrazione di emoglobina (cHgb).

I parametri del pannello Meta⁺ comprendono: glucosio (Glu), lattato (Lac), creatinina (Crea), azoto ureico ematico (BUN), urea, rapporto azoto ureico ematico/creatinina (BUN/Creatinina) e rapporto urea/creatinina.

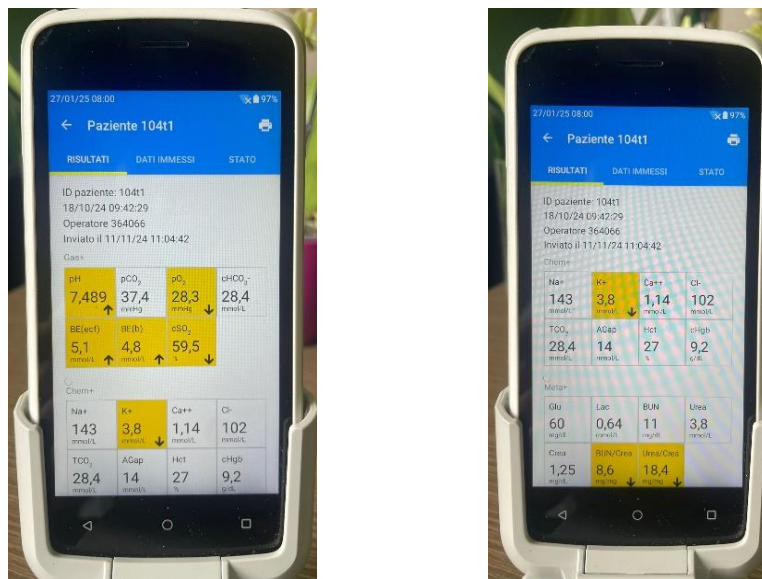


Figura 5: esempio delle schermate dei risultati con parametri suddivisi nelle categorie Gas⁺, Chem⁺ e Meta⁺.

Tutte le procedure sono state eseguite seguendo le istruzioni del produttore per la calibrazione e il controllo di qualità. Le analisi sono state effettuate in campo immediatamente dopo il prelievo, per garantire l'affidabilità e l'accuratezza dei risultati.

6.3 Elaborazione dati e analisi statistica

La raccolta dati è stata effettuata seguendo un protocollo rigoroso per garantire l'affidabilità e la validità dei risultati, ed è stata successivamente seguita dall'inserimento dei dati in un foglio di calcolo Excel. Ogni soggetto considerato è stato codificato con un identificativo unico per mantenere l'anonimato e la riservatezza dei dati aziendali.

A partire dagli 81 animali inizialmente reclutati per lo studio, 57 animali hanno confermato la positività per Stafilococchi coagulasi-negativi all'esame batteriologico eseguito nelle tempistiche di campionamento T₀ e T₁. I restanti 24 soggetti, invece, non hanno manifestato una concordanza tra i risultati dell'esame batteriologico effettuati nelle due tempistiche di campionamento.

Pertanto, al fine di raggiungere l'obiettivo previsto dal lavoro, in termini di analisi statistica, sono stati considerati esclusivamente i 57 animali che hanno confermato la positività per SCN nelle due tempistiche di campionamento.

Inoltre, sono stati reclutati attraverso una procedura di selezione casuale, 6 animali non affetti da mastite, con un valore di SCC inferiore a 200.000, esito negativo all'esame batteriologico in entrambe le

tempistiche di campionamento e privi di altra sintomatologia clinica. L'inclusione di questi soggetti ha avuto l'obiettivo di garantire la presenza di un gruppo di confronto adeguato rispetto al gruppo di animali affetti da mastite.

Sulla base dell'integrazione degli esiti dell'analisi del latte condotta presso l'IZSVE e la conta delle SCC, si è deciso quindi di suddividere gli animali in tre gruppi (*Tabella 1*):

- SCN_BASSO: SCC < 200.000 ed esame batteriologico positivo per SCN a T₀ e a T₁;
- SCN_ALTO: SCC > 200.000 ed esame batteriologico positivo per SCN a T₀ e a T₁.
- NEGATIVO (animale sano): SCC < 200.000 ed esame batteriologico negativo a T₀ e a T₁;

GRUPPO	N. ANIMALI
SCN_BASSO	45
SCN_ALTO	12
NEGATIVO	6

Tabella 1: distribuzione degli animali reclutati nei tre gruppi NEGATIVO, SCN_ALTO e SCN_BASSO.

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il pacchetto “rcomdr” all'interno dell'ambiente di programmazione R, versione 4.4.2, uno strumento ampiamente riconosciuto per l'elaborazione dei dati in ambito scientifico. Per verificare che i dati seguissero una distribuzione normale, è stato impiegato il test di Shapiro-Wilk, particolarmente indicato per campioni di piccole e medie dimensioni. L'omogeneità delle varianze tra i gruppi è stata invece valutata attraverso il test di Levene, al fine di garantire l'adeguatezza dei presupposti per l'analisi della varianza.

Successivamente, è stata applicata un'analisi della varianza (ANOVA) a due vie con modello misto, che ha permesso di esaminare gli effetti principali del gruppo e del tempo, nonché la loro eventuale interazione. In questo modello, il gruppo e il tempo sono stati considerati come effetti fissi, mentre il singolo animale è stato trattato come effetto casuale e ripetuto, al fine di tenere conto della variabilità individuale e delle misurazioni ripetute nel tempo sullo stesso soggetto.

Infine, per approfondire le differenze emerse dall'ANOVA, sono stati effettuati confronti post-hoc a coppie tra le medie dei minimi quadrati. Tali confronti sono stati corretti mediante il metodo di Bonferroni, al fine di controllare il rischio di errore di Tipo I dovuto alla molteplicità dei test.

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. 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 la media, la mediana, il minimo e il massimo in funzione del gruppo di appartenenza e della tempistica di campionamento (T_0 e T_1).

In *Tabella 2* viene riassunto l'andamento dei parametri produttivi (DIM, SCC e numero di lattazioni) degli animali inclusi nello studio:

	DIM	SCC (x 10 ³ cellule/ml)	n. lattazioni		DIM	SCC (x 10 ³ cellule/ml)	n. lattazioni
NEGATIVO T_0				NEGATIVO T_1			
MEDIA	108	23	2	MEDIA	108	18	2
MEDIANA	63	16	2	MEDIANA	63	15	2
MINIMO	7	9	1	MINIMO	7	6	1
MASSIMO	260	52	3	MASSIMO	260	43	3
SCN_ALTO T_0				SCN_ALTO T_1			
MEDIA	152	790	2	MEDIA	152	166	2
MEDIANA	120	494	2	MEDIANA	120	105	2
MINIMO	35	203	1	MINIMO	35	32	1
MASSIMO	384	1993	5	MASSIMO	384	892	5
SCN_BASSO T_0				SCN_BASSO T_1			
MEDIA	121	47	2	MEDIA	121	69	2
MEDIANA	102	36	2	MEDIANA	102	42	2
MINIMO	4	4	1	MINIMO	4	3	1
MASSIMO	584	183	6	MASSIMO	584	354	6

Tabella 2: tabella riassuntiva delle variabili più rilevanti prese in considerazione (DIM, SCC e numero di lattazioni).

Come si può evidenziare per quanto concerne i DIM degli animali reclutati la media è compresa per tutti i gruppi nelle due tempistiche di campionamento tra i 108 e i 152 giorni con valori minimi di 4 giorni e valori massimi di 584 giorni.

Per quanto riguarda invece il SCC degli animali reclutati la media è compresa per tutti i gruppi nelle due tempistiche di campionamento tra le 18 x 1000 cellule/ml e le 790 x 1000 cellule/ml con valori minimi di 4 x 1000 cellule/ml e valori massimi di 1993 x 1000 cellule/ml.

Infine, il numero medio di lattazioni degli animali inclusi nello studio è pari a 2 lattazioni, con valori minimi di 1 lattazione e valori massimi di 6 lattazioni.

Non sono state riscontrate differenze significative tra i gruppi in relazione ai parametri produttivi analizzati. Ciò suggerisce che le eventuali variazioni osservate nei parametri rilevati mediante

emogasanalisi siano attribuibili esclusivamente all'appartenenza al gruppo sperimentale (NEGATIVO, SCN_ALTO o SCN_BASSO).

Emogasanalisi

Dalla valutazione effettuata attraverso emogasanalisi sono emersi i valori riportati di seguito in *Tabella 3, 4 e 5*, corrispondenti rispettivamente alle schermate Gas⁺, Chem⁺ e Meta⁺ presenti nello strumento di analisi ematica rapida epoc.

	pH (SI)	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)	HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	BE (ecf)	cSO ₂ (%)
NEGATIVO T ₀						
MEDIA	7,44	44,2	31,9	29,8	5,6	62,0
MEDIANA	7,44	43,1	31,0	28,8	4,7	60,9
MINIMO	7,41	40,1	25,1	27,9	3,5	46,9
MASSIMO	7,46	51,5	38,9	35,4	11,4	74,5
SCN_ALTO T ₀						
MEDIA	7,44	42,0	29,2	28,5	4,3	56,3
MEDIANA	7,44	41,6	28,1	28,6	4,2	54,8
MINIMO	7,40	35,8	21,1	23,4	-1,5	36,5
MASSIMO	7,52	48,3	40,7	32,7	9,8	79,2
SCN_BASSO T ₀						
MEDIA	7,44	41,7	30,6	27,7	4,1	60,5
MEDIANA	7,44	41,5	30,9	28,3	4,0	62,1
MINIMO	7,36	31,6	23,6	2,9	-6,1	44,1
MASSIMO	7,50	50,1	37,9	34,1	10,3	73,7
NEGATIVI T ₁						
MEDIA	7,43	44,4	30,5	29,4	5,0	59,4
MEDIANA	7,43	44,9	30,1	29,0	4,6	58,3
MINIMO	7,40	39,5	27,7	26,3	2,0	53,9
MASSIMO	7,46	46,9	33,6	33,1	9,2	67,1
SCN_ALTO T ₁						
MEDIA	7,45	44,3	29,5	30,9	6,9	58,1
MEDIANA	7,45	44,7	30,3	30,8	6,9	59,6
MINIMO	7,41	37,0	22,4	25,0	0,9	41,2
MASSIMO	7,52	48,5	36,8	33,9	10,2	72,7
SCN_BASSO T ₁						
MEDIA	7,44	42,0	30,4	28,9	4,8	60,0
MEDIANA	7,44	41,5	30,2	29,0	4,8	63,0
MINIMO	7,37	32,6	19,2	20,6	-4,1	32,6
MASSIMO	7,52	54,7	41,3	36,4	12,4	78,8

Tabella 3: risultati dell'emogasanalisi per quanto concerne i Gas⁺ (pH, pressione parziale di anidride carbonica (pCO₂), pressione parziale di ossigeno (pO₂), concentrazione di bicarbonato (cHCO₃⁻), eccesso di basi nei fluidi extracellulari (BE) e saturazione dell'ossigeno (cSO₂)).

	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Ca ⁺⁺ (mmol/L)	Cl ⁻ (mmol/L)	tCO ₂ (mmol/L)	SID	AG (mmol/L)	Hct (%)	cHgb (g/dL)
NEGATIVI T ₀									
MEDIA	138,3	3,5	1,2	98,2	28,9	43,7	14,0	27,7	9,4
MEDIANA	138,0	3,6	1,2	99,5	27,9	43,2	13,8	28,0	9,4
MINIMO	136,0	3,3	1,1	93,0	26,9	40,8	10,9	26,0	8,9
MASSIMO	141,0	3,8	1,2	101,0	34,4	46,3	18,1	29,0	9,8
SCN_ALTO T ₀									
MEDIA	138,6	3,7	1,2	102,4	28,0	39,9	11,4	27,3	9,4
MEDIANA	138,5	3,8	1,2	103,0	28,5	40,6	10,9	27,5	9,4
MINIMO	136,0	3,3	1,1	97,0	22,5	33,7	8,0	21,0	7,3
MASSIMO	143,0	4,0	1,3	107,0	32,4	43,8	17,0	30,0	10,2
SCN_BASSO T ₀									
MEDIA	138,3	3,8	1,2	102,4	27,7	39,6	11,3	26,5	9,7
MEDIANA	138,0	3,7	1,2	103,0	27,4	39,8	11,7	27,5	9,4
MINIMO	132,0	2,7	1,0	95,0	18,6	31,2	4,4	10,0	7,6
MASSIMO	143,0	4,6	1,3	111,0	33,9	44,3	14,3	30,0	10,8
NEGATIVI T ₁									
MEDIA	139,0	3,5	1,2	100,5	28,8	42,0	12,6	28,2	9,6
MEDIANA	139,5	3,6	1,2	101,0	28,4	41,8	12,6	27,5	9,4
MINIMO	136,0	2,7	1,2	96,0	26,2	39,6	11,3	26,0	8,7
MASSIMO	140,0	4,2	1,3	104,0	32,1	45,2	13,9	31,0	10,7
SCN_ALTO T ₁									
MEDIA	138,7	3,7	1,2	100,7	30,4	38,3	10,0	28,0	9,5
MEDIANA	139,0	3,8	1,2	100,0	30,9	40,9	10,2	28,0	9,4
MINIMO	134,0	3,4	1,2	98,0	24,1	0,0	0,0	26,0	8,7
MASSIMO	143,0	4,1	1,3	105,0	32,9	44,4	14,5	31,0	10,6
SCN_BASSO T ₁									
MEDIA	138,1	3,7	1,2	101,5	28,3	39,4	11,2	27,0	9,2
MEDIANA	138,0	3,7	1,2	102,0	28,3	40,8	11,8	27,0	9,2
MINIMO	133,0	3,0	1,1	93,0	20,2	0,0	0,0	20,0	6,9
MASSIMO	143,0	4,1	1,4	108,0	35,3	47,0	14,9	32,0	10,8

Tabella 4: risultati dell'emogasanalisi per quanto concerne i Chem⁺ (sodio (Na⁺), potassio (K⁺), calcio ionizzato (Ca²⁺), cloruro (Cl⁻), anidride carbonica totale (cTCO₂), gap anionico (AG), ematocrito (Hct), concentrazione di emoglobina (cHgb)).

	Glu (mg/dL)	Lac (mmol/L)	BUN (mg/dL)	Urea (mmol/L)	Crea (mg/dL)	BUN/ Crea	Urea/ Crea
NEGATIVI T ₀							
MEDIA	69,3	0,7	10,2	3,6	0,7	15,6	33,4
MEDIANA	68,0	0,6	10,0	3,6	0,6	17,1	36,7
MINIMO	64,0	0,3	9,0	3,2	0,5	10,4	22,3
MASSIMO	79,0	1,7	11,0	4,1	1,0	19,0	40,7
SCN_ALTO T ₀							
MEDIA	69,8	0,5	11,7	4,1	0,7	16,6	35,6
MEDIANA	68,5	0,5	12,0	4,3	0,8	15,3	32,7
MINIMO	57,0	0,3	8,0	2,9	0,4	8,5	18,2
MASSIMO	90,0	1,1	14,0	4,9	1,0	29,5	63,2
SCN_BASSO T ₀							
MEDIA	67,8	0,5	13,1	4,7	0,8	12,9	38,7
MEDIANA	67,0	0,4	13,0	4,5	0,8	13,0	37,3
MINIMO	51,0	0,3	6,0	2,3	0,4	6,0	14,0
MASSIMO	100,0	1,7	24,0	8,4	1,2	24,0	93,8
NEGATIVI T ₁							
MEDIA	65,0	0,4	10,0	3,5	0,8	13,0	27,8
MEDIANA	65,5	0,3	10,0	3,5	0,8	12,3	26,3
MINIMO	55,0	0,3	7,0	2,3	0,7	8,2	17,5
MASSIMO	73,0	0,7	13,0	4,5	0,9	18,4	39,5
SCN_ALTO T ₁							
MEDIA	68,1	0,5	11,2	3,9	0,8	14,9	31,9
MEDIANA	68,0	0,5	12,0	4,1	0,8	15,4	32,9
MINIMO	59,0	0,3	7,0	2,5	0,6	8,0	17,0
MASSIMO	75,0	1,0	15,0	5,3	0,9	20,3	43,6
SCN_BASSO T ₁							
MEDIA	65,3	0,4	13,3	4,7	0,8	17,2	38,6
MEDIANA	67,0	0,3	13,0	4,6	0,7	16,4	37,7
MINIMO	41,0	0,3	6,0	2,2	0,5	6,5	16,7
MASSIMO	82,0	1,6	26,0	9,2	1,2	30,1	72,6

Tabella 5: risultati dell'emogasanalisi per quanto concerne i Meta⁺ glucosio (Glu), lattato (Lac), creatinina (Crea), azoto ureico ematico (BUN), urea, rapporto azoto ureico ematico/creatinina (BUN/Creatinina) e rapporto urea/creatinina).

Quanto emerso dall'analisi statistica ANOVA, condotta tenendo in considerazione possibili variazioni tra gruppi, differenti tempistiche di campionamento e l'interazione tra queste due variabili, è riportato di seguito in *Tabella 6*, *7* e *8*, corrispondenti rispettivamente alle schermate Gas⁺, Chem⁺ e Meta⁺ presenti nello strumento di analisi ematica rapida epoc.

Parametro	Gruppo	T ₀	T ₁	SEM ¹	p-values		
					Gruppo	Tempo	Interazione
pH (SI)	NEGATIVO	7,43	7,42*	7,428	0,038	0,553	0,641
	SCN_ALTO	7,43	7,45**	7,452			
	SCN_BASSO	7,43	7,44*	7,445			
pCO ₂ (mmHg)	NEGATIVO	44,2	44,4	1,515	0,133	0,871	0,069
	SCN_ALTO	42,0	44,4	1,092			
	SCN_BASSO	41,7	41,9	0,556			
pO ₂ (mmHg)	NEGATIVO	31,9	30,5	2,039	0,880	0,525	0,739
	SCN_ALTO	29,2	29,3	1,468			
	SCN_BASSO	30,8	29,6	0,748			
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	NEGATIVO	29,8*	29,4**	1,299	0,222	0,826	0,035
	SCN_ALTO	28,5 ^{b,**}	31,0 ^{a,*}	1,080			
	SCN_BASSO	27,7 ^{b,**}	29,0 ^{a,**}	0,515			
BE (ecf)	NEGATIVO	5,55*	5,03**	0,978	0,297	0,699	0,042
	SCN_ALTO	4,31 ^{b,**}	7,04 ^{a,*}	0,921			
	SCN_BASSO	4,05 ^{b,**}	5,78 ^{a,**}	0,459			
cSO ₂ (%)	NEGATIVO	62	59,4	3,770	0,844	0,516	0,668
	SCN_ALTO	56,30	57,80	2,715			
	SCN_BASSO	60,5	59,60	1,390			

Tabella 6: risultati del “linear mixed model” (p-values) per i parametri dell'emogasanalisi riferiti ai Gas⁺.

¹ Errore standard della media (SEM);

x, y: lettere diverse sulla stessa riga corrispondono a differenze significative (P<0,05) tra periodi;

a, b, c: lettere diverse sulla stessa colonna corrispondono a differenze significative (P<0,05) tra gruppi.

Le celle corrispondenti ai valori di p-value che risultano statisticamente significativi sono evidenziate.

Parametro	Gruppo	T ₀	T ₁	SEM ¹	p-values		
					Gruppo	Tempo	Interazione
Na⁺ (mmol/L)	NEGATIVO	138,3	139,0	0,619	0,526	0,543	0,734
	SCN_ALTO	138,6	138,7	0,663			
	SCN_BASSO	138,3	138,1	0,337			
K⁺ (mmol/L)	NEGATIVO	3,53**	3,53**	0,082	0,047	1	0,643
	SCN_ALTO	3,70*	3,74*	0,085			
	SCN_BASSO	3,76*	3,67**	0,048			
Ca⁺⁺ (mmol/L)	NEGATIVO	1,20	1,22	0,029	0,657	0,487	0,782
	SCN_ALTO	1,22	1,22	0,021			
	SCN_BASSO	1,19	1,20	0,011			
Cl⁻ (mmol/L)	NEGATIVO	98,20 ^{b,**}	100,50 ^a	0,971	0,607	0,073	0,030
	SCN_ALTO	102,40 ^{a,*}	100,60 ^b	0,765			
	SCN_BASSO	102,40 ^{a,*}	101,50 ^b	0,368			
tCO₂ (mmol/L)	NEGATIVO	28,90	28,80**	4,680	0,004	0,996	0,056
	SCN_ALTO	28,00 ^a	54,80 ^{b,*}	7,000			
	SCN_BASSO	27,70	28,30**	3,555			
SID	NEGATIVO	43,70	42,00	2,560	0,795	0,796	0,981
	SCN_ALTO	39,90	38,30	3,220			
	SCN_BASSO	41,90	39,40	1,660			
AG (mmol/L)	NEGATIVO	13,95	12,63	2,170	0,865	0,82	0,920
	SCN_ALTO	11,38	9,96	2,950			
	SCN_BASSO	12,00	11,21	1,520			
Hct (%)	NEGATIVO	27,70	28,20	1,112	0,401	0,695	0,975
	SCN_ALTO	27,30	28,00	0,802			
	SCN_BASSO	26,60	27,00	0,410			
cHgb (g/dL)	NEGATIVO	9,37	9,57	0,942	0,901	0,875	0,767
	SCN_ALTO	9,35	9,46	0,681			
	SCN_BASSO	9,70	9,20	0,348			

Tabella 7: risultati del “linear mixed model” (p-values) per i parametri dell’emogasanalisi riferiti ai Chem⁺.

¹ Errore standard della media (SEM);

x, y : lettere diverse sulla stessa riga corrispondono a differenze significative (P<0,05) tra periodi;

a, b, c: lettere diverse sulla stessa colonna corrispondono a differenze significative (P<0,05) tra gruppi.

Le celle corrispondenti ai valori di p-value che risultano statisticamente significativi sono evidenziate.

Parametro	Gruppo	T ₀	T ₁	SEM ¹	p-values		
					Gruppo	Tempo	Interazione
Glu (mg/dL)	NEGATIVO	69,30	69,00	1,340	0,425	0,251	0,077
	SCN_ALTO	69,80	68,80	2,405			
	SCN_BASSO	68,00	65,20	1,225			
Lac (mmol/L)	NEGATIVO	0,40**	0,39	0,151	0,052	0,361	0,038
	SCN_ALTO	0,78 ^{a,*}	0,49 ^b	0,107			
	SCN_BASSO	0,68 ^{a,*}	0,46 ^b	0,091			
BUN (mg/dL)	NEGATIVO	10,60	10,00	0,535	0,051	0,701	0,923
	SCN_ALTO	11,70	11,20	0,670			
	SCN_BASSO	13,10	13,20	0,549			
Urea (mmol/L)	NEGATIVO	3,76**	3,47**	0,346	0,037	0,573	0,724
	SCN_ALTO	4,13*	3,95*	0,380			
	SCN_BASSO	4,64*	4,69*	0,195			
Crea (mg/dL)	NEGATIVO	0,68**	0,67**	0,035	0,044	0,183	0,511
	SCN_ALTO	0,74*	0,75*	0,047			
	SCN_BASSO	0,76*	0,77*	0,024			
BUN/Crea	NEGATIVO	15,52**	14,93**	0,726	0,048	0,281	0,555
	SCN_ALTO	15,79**	14,97**	0,795			
	SCN_BASSO	17,26*	17,23*	0,943			
Urea/Crea	NEGATIVO	5,51**	5,18**	0,369	0,041	0,22	0,466
	SCN_ALTO	5,57**	5,28**	0,338			
	SCN_BASSO	6,11*	6,12*	0,335			

Tabella 8: risultati del “linear mixed model” (p-values) per i parametri dell’emogasanalisi riferiti ai Meta⁺.

¹ Errore standard della media (SEM);

a, b: lettere diverse sulla stessa riga corrispondono a differenze significative (P<0,05) tra periodi;

*, **, ***: asterischi diversi sulla stessa colonna corrispondono a differenze significative (P<0,05) tra gruppi.

Le celle corrispondenti ai valori di p-value che risultano statisticamente significativi sono evidenziate.

Verranno di seguito riportati i grafici per quanto concerne i parametri che hanno mostrato una significatività in termini di gruppo, tempistica di campionamento o per l'interazione tra questi due valori.

I valori di pH (*Grafico 2*) osservati in entrambi i gruppi affetti da mastite (SCN_ALTO e SCN_BASSO) risultano superiori in T₁ rispetto a T₀ e in entrambi i casi sono risultati superiori rispetto al gruppo di controllo (NEGATIVO). La differenza tra gruppi risulta statisticamente significativa (p-value = 0,038).

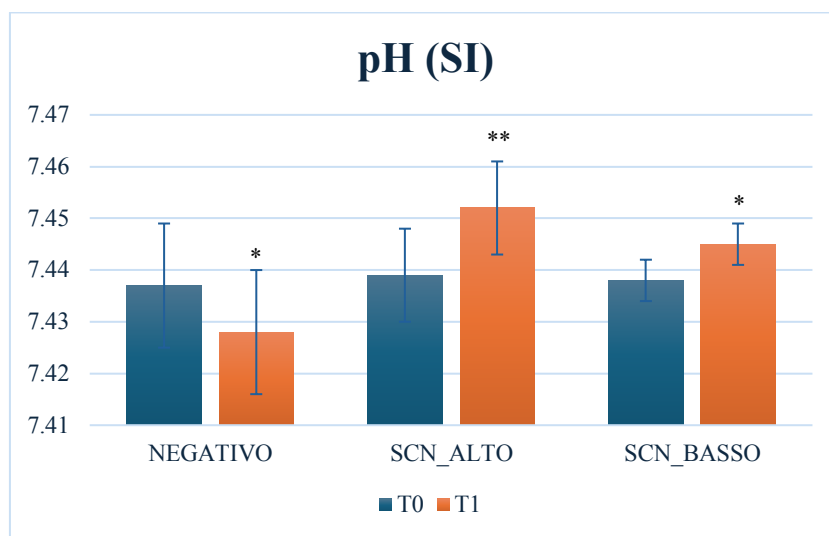


Grafico 2: confronto dei valori di pH in funzione del gruppo e della tempistica di campionamento.

a, b: lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra periodi diversi all'interno dello stesso gruppo.

, **, *:* asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra gruppi diversi all'interno dello stesso periodo.

I livelli di HCO_3^- (*Grafico 3*) osservati in entrambi i gruppi affetti da mastite (SCN_ALTO e SCN_BASSO) risultano superiori in T₁ rispetto a T₀. In particolare il gruppo SCN_ALTO alla tempistica di campionamento T₁ ha mostrato un incremento dei valori di HCO_3^- (31,0 mmol/L) rispetto ai valori rilevati alla tempistica di campionamento T₀. La differenza per l'interazione tra gruppo e tempistica di campionamento risulta statisticamente significativa (p-value = 0,035).

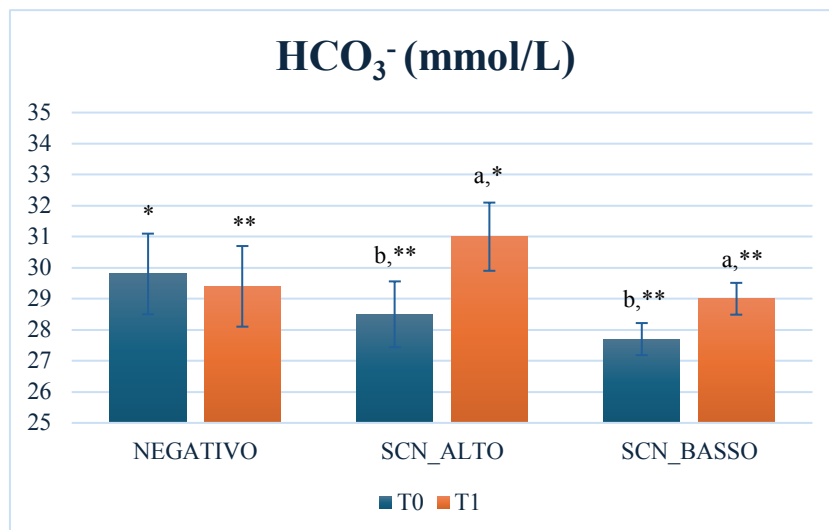


Grafico 3: confronto dei valori di HCO₃⁻ in funzione del gruppo e della tempistica di campionamento.

a, b: lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra periodi diversi all'interno dello stesso gruppo.

, **, *:* asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra gruppi diversi all'interno dello stesso periodo.

I valori di BE (Grafico 4) osservati in entrambi i gruppi affetti da mastite (SCN_ALTO e SCN_BASSO), hanno mostrato un considerevole incremento nel valore di BE alla tempistica di campionamento T₁ rispetto ai valori rilevati alla tempistica di campionamento T₀. La differenza per l'interazione tra gruppo e tempistica di campionamento risulta statisticamente significativa (p-value = 0,042).

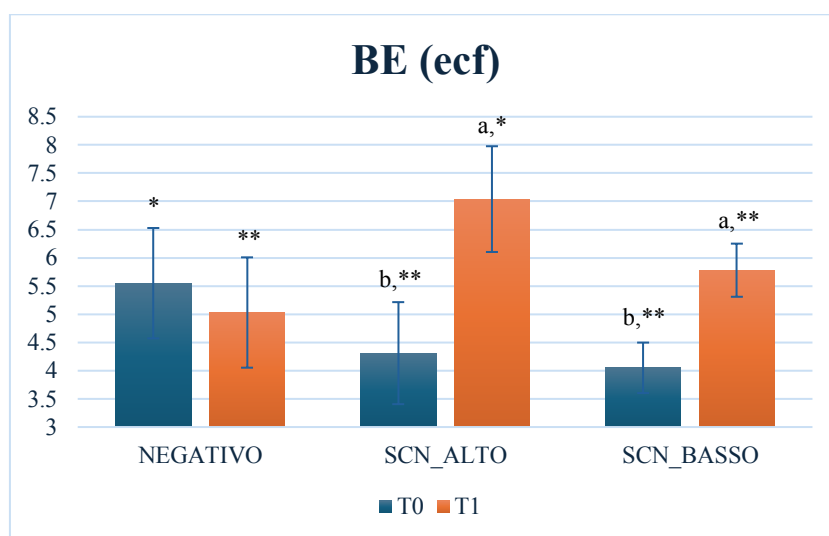


Grafico 4: confronto dei valori di BE in funzione del gruppo e della tempistica di campionamento.

a, b: lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra periodi diversi all'interno dello stesso gruppo.

, **, *:* asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra gruppi diversi all'interno dello stesso periodo.

I valori di K^+ (*Grafico 5*) sono risultati più elevati negli animali affetti da mastite (SCN_ALTO e SCN_BASSO) in entrambe le tempistiche di campionamento (T_0 e T_1) rispetto al gruppo controllo (NEGATIVO). La differenza tra gruppi risulta statisticamente significativa (p-value = 0,047).

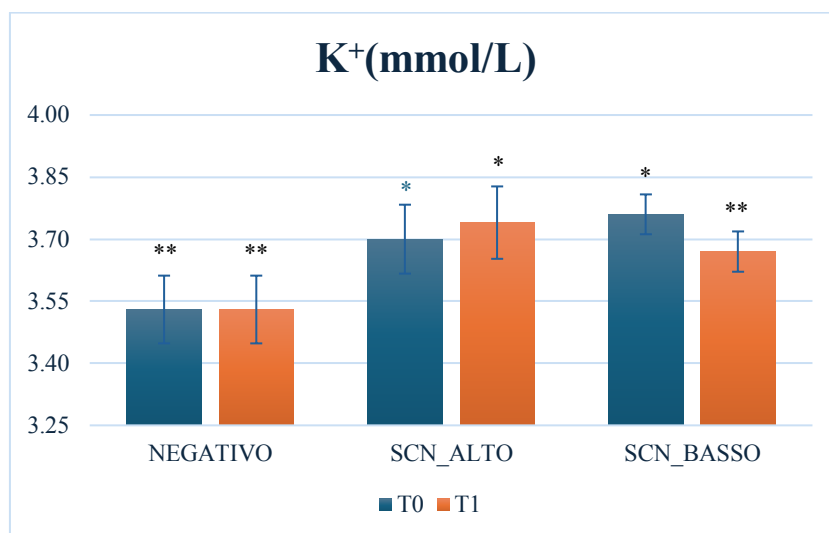


Grafico 5: confronto dei valori di K^+ in funzione del gruppo e della tempistica di campionamento.

a, b: lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra periodi diversi all'interno dello stesso gruppo.

*, **, ***: asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra gruppi diversi all'interno dello stesso periodo.

I valori di Cl^- (*Grafico 6*) sono risultati più elevati alla tempistica di campionamento T_0 nei gruppi affetti da mastite (SCN_ALTO e SCN_BASSO) rispetto al gruppo controllo (NEGATIVO); al contrario, i valori di Cl^- alla tempistica di campionamento T_1 sono risultati sovrapponibili in tutti i gruppi. La differenza per l'interazione tra gruppo e tempistica di campionamento risulta statisticamente significativa (p-value = 0,030).

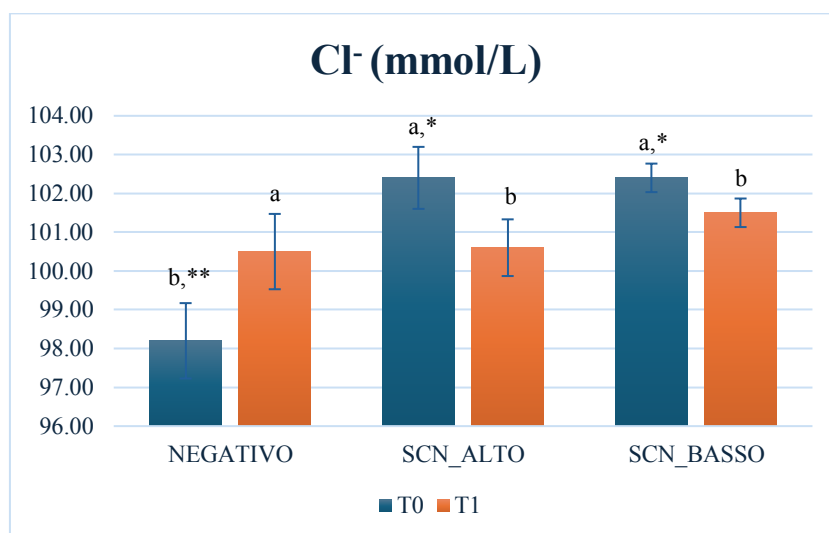


Grafico 6: confronto dei valori di Cl^- in funzione del gruppo e della tempistica di campionamento.

a, b: lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra periodi diversi all'interno dello stesso gruppo.
, **, *: asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra gruppi diversi all'interno dello stesso periodo.*

I valori di tCO_2 (Grafico 7) sono risultati elevati per il gruppo SCN_ALTO in corrispondenza della tempistica di campionamento T_1 (54,80 mmol/L) se confrontati con i valori riferiti agli altri gruppi e ad altre tempistiche di campionamento. La differenza tra gruppi risulta statisticamente significativa (p-value = 0,004).

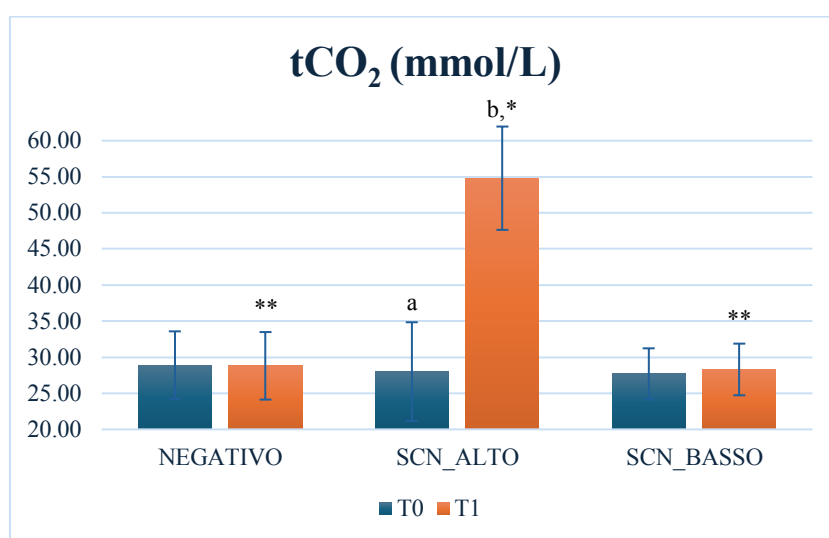


Grafico 7: confronto dei valori di tCO_2 in funzione del gruppo e della tempistica di campionamento.

a, b: lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra periodi diversi all'interno dello stesso gruppo.

, **, *: asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra gruppi diversi all'interno dello stesso periodo.*

I valori di lattato (Grafico 8) risultano elevati in entrambi i gruppi affetti da mastite (SCN_ALTO e SCN_BASSO) rispetto al gruppo di controllo (NEGATIVO). Entrambi i gruppi hanno mostrato un incremento nel valore di lattato alla tempistica di campionamento T_0 rispetto ai valori rilevati successivamente, alla tempistica di campionamento T_1 . La differenza per l'interazione tra gruppo e tempistica di campionamento risulta statisticamente significativa (p-value = 0,038).

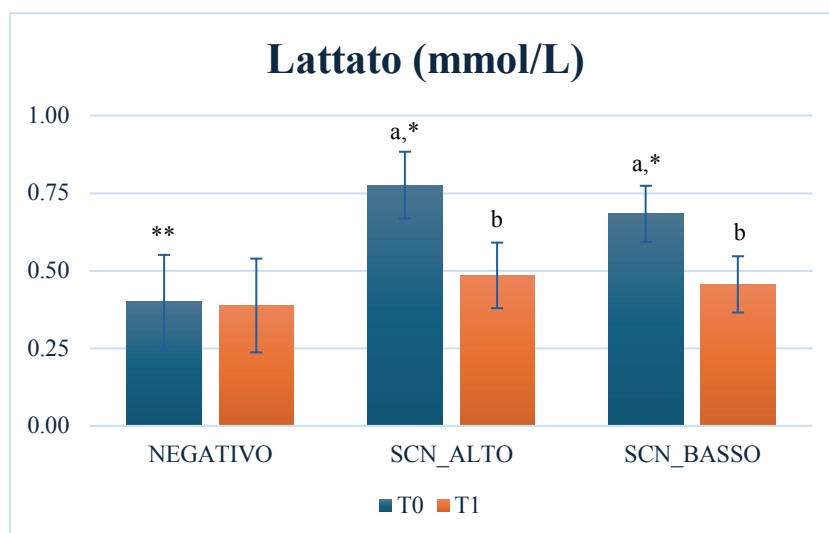


Grafico 8: confronto dei valori di lattato in funzione del gruppo e della tempistica di campionamento.
a, b: lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra periodi diversi all'interno dello stesso gruppo.
 *, **, ***: asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra gruppi diversi all'interno dello stesso periodo.

I valori di urea (*Grafico 8*) per quanto concerne il gruppo SCN_BASSO mostrano valori elevati sia in T₀ che in T₁ se rapportati ai valori dei gruppi SCN_ALTO e NEGATIVO. La differenza tra gruppi risulta statisticamente significativa (p-value = 0,037).

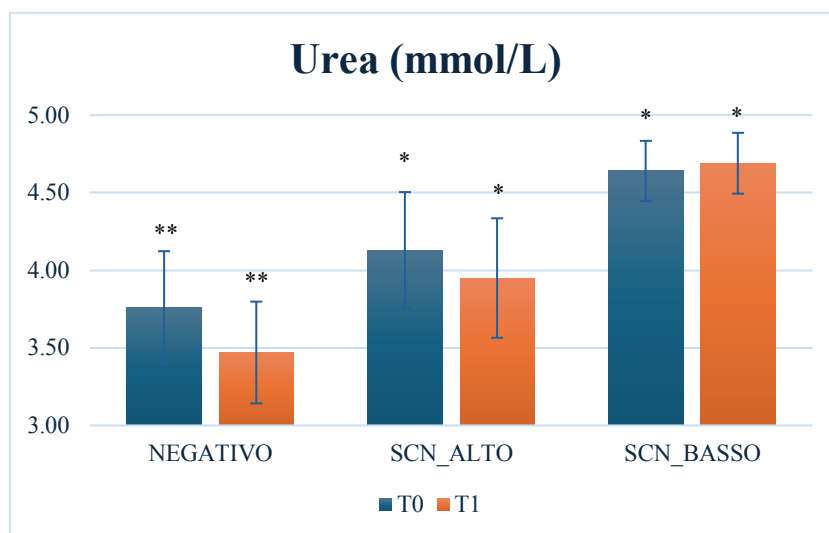


Grafico 8: confronto dei valori di urea in funzione del gruppo e della tempistica di campionamento.
a, b: lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra periodi diversi all'interno dello stesso gruppo.
 *, **, ***: asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra gruppi diversi all'interno dello stesso periodo.

I valori di creatinina (*Grafico 9*) sono risultati più elevati negli animali affetti da mastite (SCN_ALTO e SCN_BASSO) in entrambe le tempistiche di campionamento (T₀ e T₁) rispetto al gruppo controllo (NEGATIVO). La differenza tra gruppi risulta statisticamente significativa (p-value = 0,044).

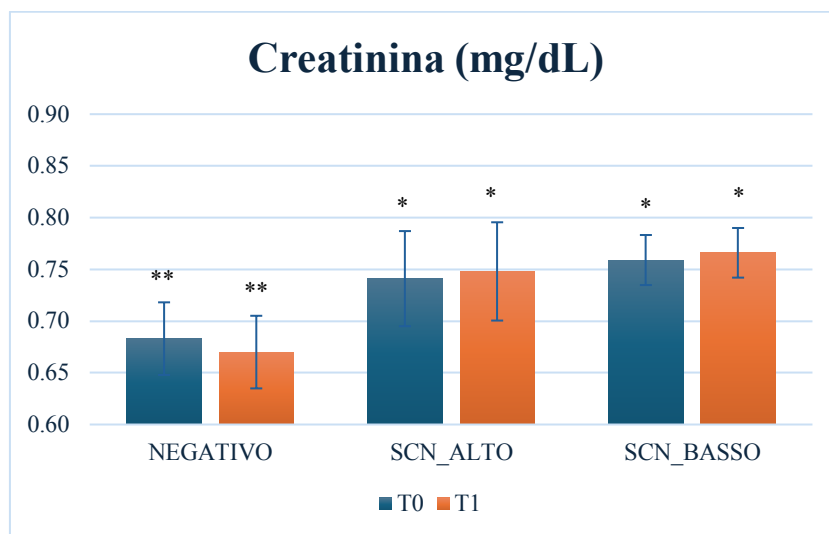


Grafico 9: confronto dei valori di creatinina in funzione del gruppo e della tempistica di campionamento.
a, b: lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra periodi diversi all'interno dello stesso gruppo.
, **, *: asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra gruppi diversi all'interno dello stesso periodo.*

I valori del rapporto BUN/Creatinina (*Grafico 10*) per quanto concerne il gruppo SCN_BASSO mostrano valori elevati sia in T₀ che in T₁ (17,26 e 17,23 rispettivamente) se rapportati ai valori dei gruppi SCN_ALTO e NEGATIVO che invece presentano valori molto simili tra loro. La differenza tra gruppi risulta statisticamente significativa (p-value = 0,048).

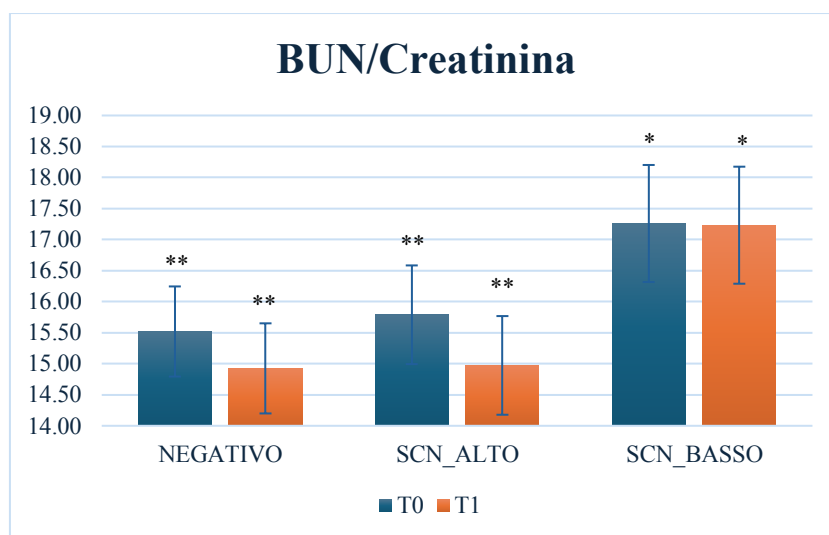


Grafico 10: confronto dei valori di BUN/Crea in funzione del gruppo e della tempistica di campionamento.
a, b: lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra periodi diversi all'interno dello stesso gruppo.
, **, *: asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra gruppi diversi all'interno dello stesso periodo.*

I valori di Urea/Creatinina (*Grafico 11*) per quanto concerne il gruppo SCN_BASSO mostrano valori elevati sia in T₀ che in T₁ (6,11 e 6,12 rispettivamente) se rapportati ai valori dei gruppi SCN_ALTO e NEGATIVO che invece presentano valori molto simili tra loro. La differenza tra gruppi risulta statisticamente significativa (p-value = 0,041).

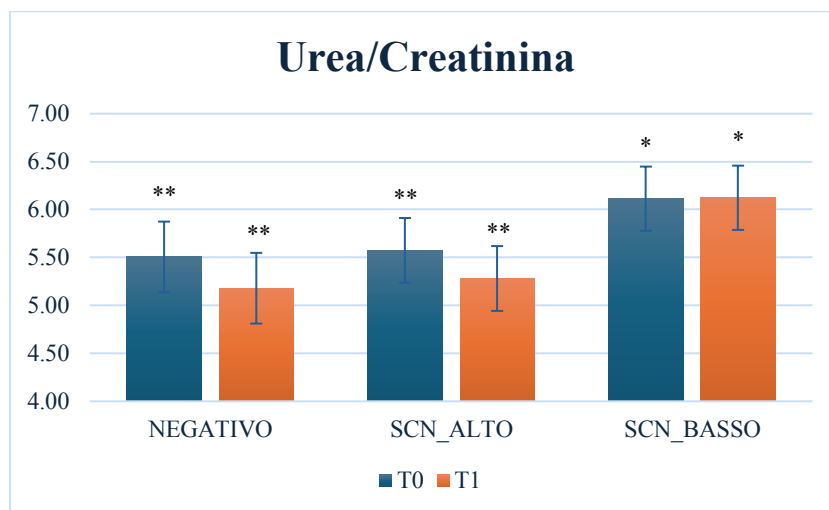


Grafico 11: confronto dei valori di Urea/Crea in funzione del gruppo e della tempistica di campionamento.

a, b: lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra periodi diversi all'interno dello stesso gruppo.

*, **, ***: asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra gruppi diversi all'interno dello stesso periodo.

Esiti della MIC

La determinazione della MIC degli SCN (riportata in *Grafico 1*) è stata effettuata per le seguenti molecole: amoxicillina/acido clavulanico, ampicillina, cefazolina, cefquinome, ceftiofur, enrofloxacin, gentamicina, kanamicina, trimetoprim/sulfonamidi. L'esito per alcune molecole è risultato essere non significativo ed è stato riportato con la dicitura "E- effettuato".

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, oxacilina, penicillina, rifampicina e trimetoprim/sulfonamidi. Alcuni individui sono risultati inoltre "intermedi" per amoxicillina/acido clavulanico, ceftiofur e rifampicina.

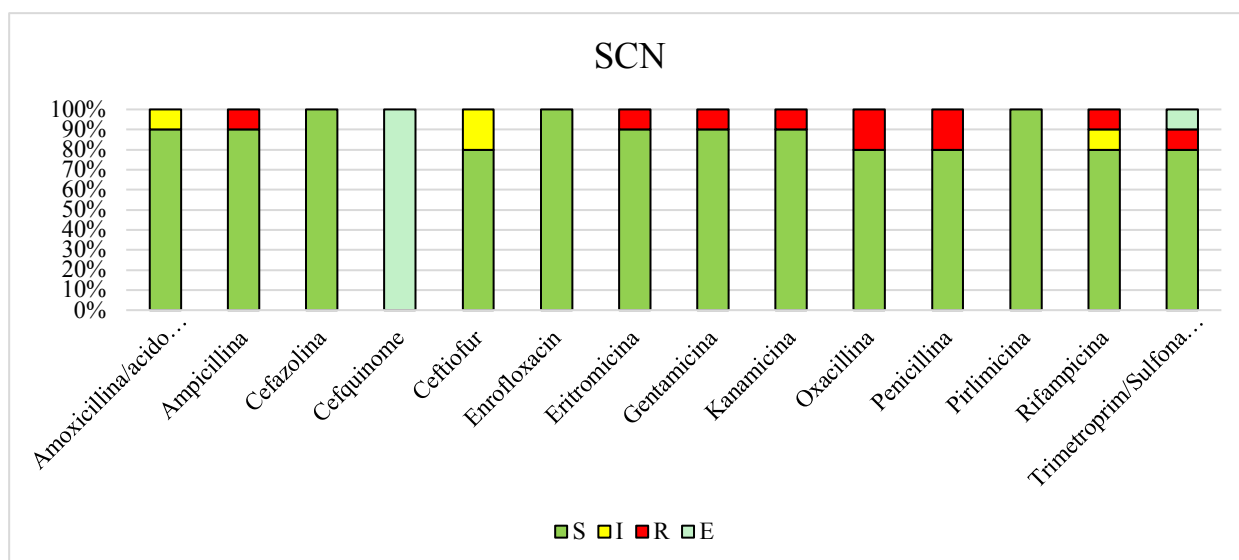


Grafico 1: esiti della MIC per SCN. E= esame effettuato ma non significativo.

8. DISCUSSIONE

Gli obiettivi principali di questo studio sono orientati alla valutazione del potenziale applicativo dell'emogasanalisi attraverso l'identificazione di alterazioni metaboliche e sistemiche negli animali affetti da forme lievi di mastite clinica di origine batterica. Al contempo lo studio si propone di valutare la possibile applicazione dell'emogasanalisi come strumento diagnostico precoce o indicatore prognostico.

La consapevolezza delle potenzialità di utilizzo dell'emogasanalisi come strumento diagnostico per il monitoraggio della salute della mammella è in rapida crescita. Molti dei lavori scientifici condotti a tal proposito negli ultimi anni hanno avuto come obiettivo l'identificazione, attraverso la valutazione dei parametri ematici, di specifici "marker" suggestivi di mastite. Alcuni di questi hanno evidenziato che diversi parametri, inclusi K^+ , Hct, Hgb e pO_2 , differivano tra vacche ad alta produzione con differenti livelli di SCC e che la maggior parte delle variabili che differivano tra animali sani e animali affetti da mastite erano correlate al metabolismo dell'ossigeno. L'emoglobina è il principale vettore dell'ossigeno nei mammiferi; la maggiore attività di questa proteina nelle bovine con bassi livelli di SCC potrebbe spiegare la maggiore disponibilità di ossigeno nei vasi, rispetto alle bovine con alti livelli di SCC (Feng et al., 2022).

Nel presente studio i valori di Hct, Hgb e pO_2 non hanno subito delle variazioni statisticamente significative; questo potrebbe essere giustificato dalla lieve entità del processo patologico in atto, che, non determinando una compromissione del parenchima mammario e di conseguenza della perfusione di tale struttura, non influenzerebbe i valori di tali parametri a livello ematico.

Oltre a variabili correlate al metabolismo dell'ossigeno, di crescente interesse è la valutazione delle concentrazioni elettrolitiche, considerati importanti indicatori nella valutazione della permeabilità vascolare a livello mammario. Un aumento della permeabilità delle "tight junctions" può essere presente quando le cellule si trovano in un ambiente a basso contenuto di ossigeno, ovvero in condizioni di ipossia (Feng et al., 2022).

L'elevata concentrazione di elettroliti come Na^+ e Cl^- nel latte mastitico deriva dalla trasudazione ematica, conseguente ad un aumento della permeabilità dell'endotelio vasale a livello della mammella. Tale processo solitamente viene compensato da una riduzione di concentrazione di lattosio e K^+ nel latte. Tuttavia, considerando il rapporto tra la concentrazione di Na^+ e Cl^- , è possibile affermare che questi due ioni non si spostano in quantità equivalenti nel latte mastitico. Nella maggior parte dei casi, nelle fasi iniziali della patologia, la variazione della concentrazione elettrolitica a livello ematico (specialmente per quanto riguarda Na^+) risulta meno evidente rispetto a quanto è riscontrabile nel latte a causa dei meccanismi compensatori messi in atto dall'organismo (Wegner and Stull, 1978). Le bovine affette da forme di mastite normalmente presentano livelli più elevati di K^+ ematico e livelli ridotti di

Ca⁺ ematico. Inoltre è spesso possibile rilevare un aumento del valore del rapporto Na⁺ / K⁺ (Feng et al., 2022).

Nel presente elaborato sono state evidenziate delle differenze statisticamente significative per quanto riguarda i livelli di K⁺ e Cl⁻.

I valori di K⁺ sono risultati al di sotto del limite minimo del range fisiologico (3,9-5,5 mmol/L) in tutti e tre i gruppi e in entrambe le tempistiche di campionamento. I valori minimi si sono registrati in corrispondenza del gruppo di controllo di animali sani e privi di altra sintomatologia (NEGATIVO). Ciò è concorde con quanto viene riportato in letteratura; i valori di K⁺ rilevati nei gruppi affetti da mastite (SCN_ALTO e SCN_BASSO) risultano superiori rispetto ai valori rilevati in animali sani (NEGATIVO), ma non superano in nessun gruppo i valori massimi del range di riferimento (3,9-5,5 mmol/L). Ciò è probabilmente conseguenza di una situazione in cui è presente uno squilibrio elettrolitico che viene compensato in maniera propria dall'organismo data la lieve entità del processo patologico. Infatti solamente dal confronto con animali sani è possibile rilevare lo spostamento dei valori medi per gruppo verso il limite superiore del range di riferimento.

I valori di Cl⁻ sono risultati all'interno del range fisiologico (97-111 mmol/L) in tutti e tre i gruppi e in entrambe le tempistiche di campionamento. Ciò è probabilmente conseguenza dei meccanismi fisiologici messi in atto per compensare la perdita di cloro in seguito alla trasudazione in mammella al fine di mantenere i livelli di cloro ematico entro il range di riferimento.

La perdita di elettroliti in seguito ad un aumento di permeabilità dei vasi a livello mammario determina una variazione del pH del latte che si riflette con una lieve variazione a livello ematico di tale parametro. Normalmente in condizioni di mastite i livelli di pH risultano essere lievemente diminuiti (lieve acidosi) o normali, qualora i meccanismi di compensazione messi in atto dall'organismo riuscissero a contenere tali variazioni. Sono riportati in letteratura degli studi che evidenziano la presenza di alcalosi metabolica in corso di mastiti da coliformi (Ohtsuka et al., 1997).

Nel presente studio la valutazione del pH ha evidenziato dei valori tendenti al limite superiore del range di riferimento in tutti i gruppi e in entrambe le tempistiche con livelli superiori a quest'ultimo in corrispondenza del prelievo in tempistica T₁ per il gruppo SCN_ALTO con valore di pH pari a 7,45. Altri elementi da considerare nella valutazione dell'equilibrio acido-base a livello ematico sono il BE, l'HCO₃⁻ e il tCO₂.

Il BE è la quantità di acido o base forte necessaria per titolare 1 litro di sangue fino a un pH di 7,40 a 37°C, mentre la pCO₂ viene mantenuta costante a 40 mm Hg. Più nello specifico, aumenti del valore di BE al di sopra del range di riferimento (-2 mmol/L < BE < +2 mmol/L) indicano la presenza di alcalosi metabolica al contrario valori al di sotto del range di riferimento presenza di acidosi metabolica (Siggaard-Andersen, 1963).

Nella prova condotta i valori di BE sono risultati in tutti i gruppi e in entrambe le tempistiche superiori rispetto ai range di riferimento. In particolar modo in corrispondenza della tempistica di prelievo T₁, il gruppo SCN_ALTO ha mostrato dei valori di BE pari a 7 mmol/L. Al netto di quanto riportato precedentemente valori di BE superiori a due possono essere indicativi di una condizione di alcalosi metabolica.

Il bicarbonato rappresenta il principale tampone extracellulare dell'organismo. Viene prodotto a partire da CO₂ e H₂O in presenza dell'enzima anidrasi carbonica. La sua concentrazione è un valore calcolato, derivato dall'equazione di Henderson-Hasselbalch. Il bicarbonato è un indicatore della componente metabolica dell'equilibrio acido-base: valori ridotti suggeriscono tipicamente un'acidosi metabolica, mentre concentrazioni elevate sono indicative di alcalosi metabolica (Constable, 1999).

I valori di bicarbonato riscontrati in questa prova risultano lievemente al di sopra del limite massimo del range fisiologico (21-29 mmol/L) in corrispondenza della tempistica di campionamento T₁ per il gruppo SCN_ALTO con valori di 31 mmol/L. Tale valore potrebbe essere suggestivo di una condizione di lieve alcalosi metabolica già ipotizzata in seguito alla valutazione di variabili come il pH e il BE.

Anche i valori di molto superiori rispetto al range di riferimento di tCO₂ (indicatore indiretto dei livelli di HCO₃⁻) in corrispondenza della tempistica di campionamento T₁ per il gruppo SCN_ALTO ci porterebbero a formulare le medesime conclusioni.

Per quanto riguarda l'insieme delle variabili rilevanti per la valutazione dell'equilibrio acido-base, l'osservazione di valori compatibili con una lieve alcalosi metabolica riscontrabili esclusivamente al tempo T₁, potrebbe rappresentare il segnale di una difficoltà dell'organismo nel compensare adeguatamente una condizione di perdita elettrolitica protratta. Tale squilibrio potrebbe essere riconducibile a un aumento della permeabilità vascolare a livello della ghiandola mammaria, che favorirebbe un passaggio anomalo di fluidi ed elettroliti, compromettendo la capacità di mantenere l'omeostasi acido-base nel tempo.

Diversi studi hanno riportato la presenza di una correlazione tra i livelli di lattato a livello ematico o nel latte e le condizioni di mastite. L'andamento dei livelli di lattato sia a livello ematico che nel latte risultano molto interessanti. I neutrofili, reclutati rapidamente nella ghiandola mammaria entro poche ore dall'infezione, si attivano e usano la glicolisi anaerobica anche in presenza di ossigeno (Gammariello et al., 2024).

In seguito ad un primo incremento nei livelli ematici, avviene un rapido passaggio di questo metabolita verso la ghiandola mammaria favorito da un basso peso molecolare del lattato (90 Dalton), da una compromissione delle "tight junctions" in seguito a danno tissutale e da un gradiente di concentrazione favorevole (Wellnitz et al., 2015).

I livelli di lattato nel latte possono raggiungere livelli più elevati rispetto a quelli presenti nel sangue (Lehmann et al., 2013). Questo fenomeno suggerisce che tale aumento non possa essere attribuito

unicamente al passaggio dal sangue al latte attraverso una barriera emato-mammaria compromessa. Secondo quanto riportato in altri studi infatti, anche le cellule epiteliali della ghiandola mammaria producono L-lattato localmente in risposta a una temporanea transizione verso un metabolismo anaerobico, che si verifica durante la mastite e contribuisce all'aumento di lattato nel latte nel corso della malattia (Silanikove et al., 2011).

L'incremento dei livelli di lattato a livello ematico è immediato, rilevabile molto precocemente e porta ad un incremento dei livelli di lattato anche nel latte rilevabili dopo 2,5 ore rispetto all'inizio del processo infiammatorio (Wellnitz et al., 2015).

Nel presente studio è stato possibile rilevare un incremento dei livelli di lattato a livello ematico nei gruppi affetti da mastite (SCN_ALTO e SCN_BASSO) principalmente nella tempistica di campionamento T₀. La presenza di valori inferiori nella seconda tempistica di campionamento potrebbe essere conseguente alla lieve entità del processo patologico in atto.

Ciò risulta concorde con quanto detto precedentemente, di conseguenza il lattato potrebbe essere considerato tra i più rilevanti indicatori precoci di mastite. Associare il dosaggio delle lattato ematico con una valutazione dei livelli di lattato nel latte permetterebbe di avere un quadro più completo della condizione dell'animale e di localizzare in maniera chiara il processo patologico a questo livello.

Altri parametri che in letteratura sono annoverati tra i maggiormente soggetti a variazione in seguito a fenomeni di mastite sono l'urea, la creatinina e la BUN.

L'incremento del valore dell'urea in condizione di mastite è riscontrato a livello diagnostico frequentemente. Oltre a indicare la possibile presenza di mastite, alcuni studi supportano l'ipotesi che la valutazione dell'azotemia associata alla valutazione di altri parametri come Hct e Hgb, possa permettere di distinguere mastiti di origine batterica sostenute da Gram-positivi e sostenute da Gram-negativi. In particolare valori più elevati di urea, Hct ed Hgb risulterebbero più frequentemente associati a patogeni Gram-negativi (G. W. Smith et al., 2001).

Nel presente studio la valutazione dei livelli ematici di urea ha mostrato dei valori più elevati in corrispondenza dei gruppi affetti da mastite (SCN_ALTO e SCN_BASSO) se confrontati con il gruppo di controllo (NEGATIVO). I valori risultano in ogni caso all'interno dei range di riferimento presenti in letteratura (3,3-6,4 mmol/L).

La valutazione dei livelli ematici di creatinina ha manifestato un andamento sovrapponibile a quanto visto per l'urea, con valori più elevati in corrispondenza dei gruppi affetti da mastite (SCN_ALTO e SCN_BASSO), nonostante nemmeno in questo caso i valori abbiano superato il valore massimo del range di riferimento (0,5-2 mg/dL).

Tra le possibili cause di aumento dei livelli ematici di urea e creatinina la più probabile è una condizione di disidratazione legata alla patologia in atto che, determinando una riduzione della perfusione renale, avrebbe portato ad un accumulo di tale composto in circolo.

Nella bovina da latte affetta da mastite clinica, l'impiego dell'emogasanalisi consente una lettura complessiva dello stato metabolico e infiammatorio dell'animale, fornendo indicazioni sia diagnostiche sia prognostiche fondamentali per guidare l'intervento terapeutico.

In particolare, secondo alcuni studi condotti prendendo in esame animali affetti da forme acute di mastite da coliformi, i parametri di maggior interesse per effettuare una valutazione prognostica sono stati, il pH, elettroliti e parametri associati alla funzionalità renale.

In particolare (Cebra et al., 1996):

- Iponatremia, ipokaliemia, ipocloremia e alcalosi metabolica sarebbero degli indicatori prognostici positivi.
- Ipernatremia, iperkaliemia, iperazotemia, aumento della creatinina ematica, e acidosi metabolica sarebbero indicatori prognostici negativi.

Un "marker" di crescente interesse in questo contesto è la lattatemia. L'aumento della lattatemia è indice di un metabolismo anaerobio, che si attiva in risposta all'ipossia tissutale e all'alterata perfusione sistemica. È considerato un parametro di rilievo nella valutazione dell'entità di diversi processi patologici, può segnalare precocemente condizioni di ipoperfusione tissutale, stress metabolico o infiammazione, anche in assenza di segni clinici evidenti. Questo lo rende uno strumento fondamentale per la diagnosi e il monitoraggio di patologie acute come la mastite, la metrite o la tossiemia, aiutando il veterinario a valutare la gravità della condizione e a prendere decisioni terapeutiche tempestive.

La determinazione della MIC è stata eseguita al fine di analizzare il profilo di sensibilità del patogeno presente in allevamento a differenti antibiotici. I risultati ottenuti evidenziano una sensibilità verso tutte le molecole testate, il che suggerisce la possibilità di impiegare, qualora risultasse necessario, differenti classi di antibiotici senza limitazioni specifiche.

I risultati dello studio suggeriscono spunti di approfondimento che meritano di essere sviluppati.

Innanzitutto, la carenza di valori di riferimento in letteratura relativi al profilo biochimico e minerale delle bovine da latte affette da mastite risulta essere un ostacolo significativo nella valutazione dei livelli rilevati. L'introduzione nella routine diagnostica di tale esame, associata ad una successiva integrazione dei dati, permetterebbe di individuare i parametri che più frequentemente sono oggetto di variazione in corso di tale patologia. Registrare l'andamento di questi parametri durante tutto il processo patologico, renderebbe possibile caratterizzare in maniera più precisa lo stato di salute dell'animale e valutare la progressione del processo patologico in atto.

Altri studi potrebbero essere orientati alla valutazione di specifici parametri come potenziali indici prognostici, capaci di prevedere con maggiore accuratezza l'evoluzione della patologia. Ciò consentirebbe una comprensione più approfondita dello stato di salute dell'animale e, di conseguenza,

l'ottimizzazione delle strategie terapeutiche di supporto, con l'obiettivo ultimo di favorire il processo di guarigione.

Ampliare le sedi di campionamento, includendo aziende con incidenza di patogeni differenti rispetto agli SCN permetterebbe inoltre di fornire un quadro completo di come i principali agenti patogeni di mastite inducano cambiamenti nel profilo ematico rilevato attraverso emogasanalisi.

Infine, si ritiene opportuno ampliare lo studio includendo anche la fase successiva relativa al trattamento farmacologico della mastite, al fine di valutare in modo più oggettivo possibile l'efficacia del approccio terapeutico adottato.

9. CONCLUSIONI

In conclusione della presente tesi, si può affermare che l'utilizzo dell'emogasanalisi nella diagnosi di mastite nella bovina da latte rappresenti un valido strumento. L'uso di questa tecnologia è pratico e veloce, e permette di indagare lo stato di salute della mammella in maniera poco invasiva.

L'obiettivo di valutazione dell'applicabilità di tale tecnica come strumento per la diagnosi di forme lievi di mastite ha fornito dei risultati promettenti. Attraverso futuri studi sarà importante identificare un dataset di parametri rilevabili tramite emogasanalisi in corso di mastite e indagare in maniera più dettagliata gli effetti specifici degli agenti infettivi su tali parametri per migliorarne la precisione diagnostica.

L'obiettivo di individuare specifiche variabili dotate di valore prognostico ha prodotto risultati parzialmente soddisfacenti, in quanto l'assenza di intervalli di riferimento consolidati e universalmente accettati per la specie bovina, unitamente alla mancanza, in alcuni casi, di evidenze statisticamente significative che correlino determinati parametri alla prognosi della patologia stessa, limita l'affidabilità e l'applicabilità pratica di tali indicatori.

Pertanto, si può concludere che, pur avendo identificato potenziali benefici, l'utilizzo dell'emogasanalisi nella diagnosi di mastite è al momento attuabile solo in parte.

Per raggiungere un'efficace implementazione clinica, è essenziale formare adeguatamente gli operatori veterinari, sviluppare linee guida standardizzate che definiscano i criteri per la diagnosi e condurre ulteriori ricerche che confermino l'affidabilità di tali criteri su larga scala e in diverse condizioni.

In prospettiva, l'adozione più diffusa dell'emogasanalisi 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'emogasanalisi nella gestione della mastite nelle bovine da latte.

10. **BIBLIOGRAFIA**

- Adkins, P. R. F., and Middleton, J. R. (2018). Methods for Diagnosing Mastitis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 34(3), 479–491. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.003>
- Anika, T. T., Noman, Z. Al, Rahman, A. K. M. A., Sultana, N., Ashraf, M. N., Pervin, M., Islam, M. A., Hossain, M. M., and Khan, M. A. H. N. A. (2023). Electrical conductivity and total dissolved solid of raw milk for the detection of bovine subclinical mastitis. *Veterinary World*, 16(12), 2521–2525. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.2521-2525>
- Argaw, A. (2016). *Review on Epidemiology of Clinical and Subclinical Mastitis on Dairy Cows*. 52. www.iiste.org
- Ashraf, A., and Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical Animal Health and Production*, 50(6), 1193–1202. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1629-0>
- Ashraf, A., and Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. In *Animal Health Research Reviews* (Vol. 21, Issue 1, pp. 36–49). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>
- Bateman, S. W. (2009). Making Sense of Blood Gas Results. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 39(3), xiii. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.03.001>
- Bleul, U., Lejeune, B., Schwantag, S., and Kähn, W. (2007). Blood gas and acid-base analysis of arterial blood in 57 newborn calves. *Veterinary Record*, 161(20), 688–691. <https://doi.org/10.1136/vr.161.20.688>
- Bleul, U., Schwantag, S., and Kähn, W. (2008). Blood gas analysis of bovine fetal capillary blood during stage II labor. *Theriogenology*, 69(2), 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.027>
- Blum, S. E., Heller, E. D., and Leitner, G. (2014). Long term effects of Escherichia coli mastitis. *The Veterinary Journal*, 201(1), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.04.008>
- Bonilla, F. A., and Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S33-40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Budras, K.-D., and Habel, R. E. (2003). *Bovine Anatomy: An Illustrated Text*.
- Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., and Duchateau, L. (2003). Severity of *E. Coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research*, 34(5), 521–564. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003023>

- Campos, B., Pickering, A. C., Rocha, L. S., Aguilar, A. P., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira Mendes, T. A., Fitzgerald, J. R., and de Oliveira Barros Ribon, A. (2022). Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03197-5>
- Castañeda Vázquez, H., Jäger, S., Wolter, W., Zschöck, M., Castañeda Vazquez, M. A., and El-Sayed, A. (2013). Isolation and identification of main mastitis pathogens in Mexico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(2), 377–382. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000200012>
- Cebra, C. K., Garry, F. B., and Dinsmore, R. P. (1996). Naturally Occurring Acute Coliform Mastitis in Holstein Cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10(4), 252–257. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1996.tb02058.x>
- Chakraborty, S., Dhama, K., Tiwari, R., Iqbal Yattoo, M., Khurana, S. K., Khandia, R., Munjal, A., Munuswamy, P., Kumar, M. A., Singh, M., Singh, R., Gupta, V. K., and Chaicumpa, W. (2019). Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population-a review. *The Veterinary Quarterly*, 39(1), 76–94. <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1642546>
- Chen, X., Chen, Y., Zhang, W., Chen, S., Wen, X., Ran, X., Wang, H., Zhao, J., Qi, Y., and Xue, N. (2022). Prevalence of subclinical mastitis among dairy cattle and associated risks factors in China during 2012-2021: A systematic review and meta-analysis. *Research in Veterinary Science*, 148, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.04.007>
- Cheng, W. N., and Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(11), 1699–1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>
- Chhargari, M. U., and Muhammad, G. (2009). *Mastitis control in dairy production*. <http://www.fspublishers.org>
- Cobirka, M., Tancin, V., and Slama, P. (2020). Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/ani10122212>
- Constable. (2016). *Veterinary medicine - A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*.
- Constable, P. D. (1999). *Clinical assessment of acid-base status - Strong Ion Difference Theory*.
- Daprà, V., Piccinin, R., and Zecconi, A. (2006). *Le mastiti costano molto all'allevatore*.
- 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., and Barkema, H. W. (2023). Invited review: Selective treatment of clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 106(6), 3761–3778. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22826>

Debruyn, E., Ghumman, N. Z., Peng, J., Tiwari, H. K., and Gogoi-Tiwari, J. (2025). Alternative approaches for bovine mastitis treatment: A critical review of emerging strategies, their effectiveness and limitations. *Research in Veterinary Science*, 185, 105557. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2025.105557>

Dillane, P., Krump, L., Kennedy, E., Sayers, R. G., and Sayers, G. P. (2020). Determining the predictive capability of a Clinical Assessment Scoring Chart to differentiate severity of the clinical consequences of neonatal calf diarrhea relative to gold-standard blood gas analysis. *Plos One*, 15(4), e0230708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230708>

Dodd, F. H. (1983). Mastitis--progress on control. *Journal of Dairy Science*, 66(8), 1773–1780. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)82005-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)82005-0)

Doyle, J., and Cooper, J. S. (2025). *Physiology, Carbon Dioxide Transport*.

Duarte, C. M., Freitas, P. P., and Bexiga, R. (2015). Technological advances in bovine mastitis diagnosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(6), 665–672. <https://doi.org/10.1177/1040638715603087>

Eberhart, R. J., Ilevan, P. L., Griel, L. C., and Kesler, E. M. (1983). Germicidal teat dip in a herd with low prevalence of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 66(6), 1390–1395. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81949-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81949-3)

El-Sayed, A., and Kamel, M. (2021). Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. *Tropical Animal Health and Production*, 53(2), 236. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02680-9>

Ersine, R. J., Wagner, S., and deGraves, F. J. (2003). Mastitis therapy and pharmacology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 19(1), 109–138. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00067-1)

Ettinger, S. J., and Feldman, E. C. (2005). *Textbook Of Veterinary Internal Medicine: Diseases Of The Dog And Cat*.

Feng, J., Peng, W., Hu, Z., Cai, J., Liu, J., and Wang, D. (2022a). Multiple-Vessel-Based Blood Gas Profiles Analysis Revealed the Potential of Blood Oxygen in Mammary Vein as Indicator of Mammary Gland Health Risk of High-Yielding Dairy Cows. *Animals*, 12(12), 1484. <https://doi.org/10.3390/ani12121484>

Feng, J., Peng, W., Hu, Z., Cai, J., Liu, J., and Wang, D. (2022b). Multiple-Vessel-Based Blood Gas Profiles Analysis Revealed the Potential of Blood Oxygen in Mammary Vein as Indicator of Mammary

Gland Health Risk of High-Yielding Dairy Cows. *Animals*, 12(12), 1484. <https://doi.org/10.3390/ani12121484>

Ferreira, J. C., Gomes, M. S., Bonsaglia, E. C. R., Canisso, I. F., Garrett, E. F., Stewart, J. L., Zhou, Z., and Lima, F. S. (2018). Comparative analysis of four commercial on-farm culture methods to identify bacteria associated with clinical mastitis in dairy cattle. *PLOS ONE*, 13(3), e0194211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194211>

Fox, L. K. (2012). Mycoplasma Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28(2), 225–237. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.007>

Fox, L. K., and Gay, J. M. (1993). Contagious mastitis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 9(3), 475–487. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30615-0](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30615-0)

Fredebeul-Krein, F., Schmenger, A., Wentz, N., Zhang, Y., and Krömker, V. (2022a). Factors Associated with the Severity of Clinical Mastitis. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/pathogens11101089>

Fredebeul-Krein, F., Schmenger, A., Wentz, N., Zhang, Y., and Krömker, V. (2022b). Factors Associated with the Severity of Clinical Mastitis. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/pathogens11101089>

G Abril, A., G Villa, T., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P., and Carrera, M. (2020). Staphylococcus aureus Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. *Toxins*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/toxins12090537>

Gammariello, C. S., Hanson, J., Relling, A. E., Oliveira, M. X. S., Sipka, A. S., Enger, K. M., and Enger, B. D. (2024). Localized mammary gland changes in milk composition and venous blood metabolite concentrations result from sterile subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 107(8), 6148–6160. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24044>

Garcia, A. (2004). Contagious vs. Environmental Mastitis. http://openprairie.sdstate.edu/extension_extra/126

Gianesella, M., Morgante, M., Cannizzo, C., Stefani, A., Dalvit, P., Messina, V., and Giudice, E. (2010). Subacute Ruminant Acidosis and Evaluation of Blood Gas Analysis in Dairy Cow. *Veterinary Medicine International*, 2010, 1–4. <https://doi.org/10.4061/2010/392371>

Gonzalez, A. L., and Waddell, L. S. (2016). Blood Gas Analyzers. In *Topics in Companion Animal Medicine* (Vol. 31, Issue 1, pp. 27–34). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2016.05.001>

Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., and Kaltsatos, V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(3), 245–259. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00160-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00160-0)

- Guyton, A., and Hall, J. (1956). *Textbook of Medical Physiology*.
- Haenni, M., Lupo, A., and Madec, J.-Y. (2018). Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. *Microbiology Spectrum*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017>
- Hamm, L. L., Nakhoul, N., and Hering-Smith, K. S. (2015). Acid-Base Homeostasis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 10(12), 2232–2242. <https://doi.org/10.2215/CJN.07400715>
- Harmon, R. J. (1994). Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. *Journal of Dairy Science*, 77(7), 2103–2112. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77153-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77153-8)
- Hogan, J., and Smith, K. L. (2012). Managing Environmental Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28(2), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.009>
- Hopper, K. (2023). Acid–Base. In *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* (Vol. 53, Issue 1, pp. 191–206). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.07.014>
- Huey, S., Kavanagh, M., Regan, A., Dean, M., mckernan, C., mccoey, F., Ryan, E. G., Caballero-Villalobos, J., and mcAloon, C. I. (2021). Engaging with selective dry cow therapy: understanding the barriers and facilitators perceived by Irish farmers. *Irish Veterinary Journal*, 74(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13620-021-00207-0>
- Ismail, Z. B. (2017). Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Veterinary World*, 10(9), 1057–1062. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1057-1062>
- Kabelitz, T., Aubry, E., van Vorst, K., Amon, T., and Fulde, M. (2021). The Role of *Streptococcus* spp. In Bovine Mastitis. *Microorganisms*, 9(7), 1497. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071497>
- Kayano, M., Itoh, M., Kusaba, N., Hayashiguchi, O., Kida, K., Tanaka, Y., Kawamoto, K., and Gröhn, Y. T. (2018). Associations of the first occurrence of pathogen-specific clinical mastitis with milk yield and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 85(3), 309–316. <https://doi.org/10.1017/S0022029918000456>
- Keefe, G. P. (1997). *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 38(7), 429–437.
- Khan, M. Z., and Khan, A. (2006). Basic facts of mastitis in dairy animals: a review. In *Vet. J* (Vol. 26, Issue 4).
- Kimura, S., Shabsigh, M., and Morimatsu, H. (2018). Traditional approach versus Stewart approach for acid–base disorders: Inconsistent evidence. *SAGE Open Medicine*, 6. <https://doi.org/10.1177/2050312118801255>

- Kivaria, F. M., Noordhuizen, J. P. T. M., and 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(3–4), 274–285. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.10.011>
- Kremer, W. D. J., Noordhuizen-Stassen, E. N., and Lohuis, J. A. C. M. (1990). Host defence and bovine coliform mastitis. *Veterinary Quarterly*, 12(2), 103–113. <https://doi.org/10.1080/01652176.1990.9694252>
- Kromker, V. (2014). Bovine *Streptococcus uberis* Intramammary Infections and Mastitis. *Clinical Microbiology: Open Access*, 03(04). <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000157>
- Lehmann, M., Wellnitz, O., and Bruckmaier, R. M. (2013). Concomitant lipopolysaccharide-induced transfer of blood-derived components including immunoglobulins into milk. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 889–896. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5410>
- Liebich, H.-G. (2010). *Funktionelle Histologie der Haussaugetiere und Vogel*.
- Martinez, G., Harel, J., Higgins, R., Lacouture, S., Daignault, D., and Gottschalk, M. (2000). Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolates of Bovine and Human Origin by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 71–78. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.1.71-78.2000>
- McDougall, S., Bryan, M. A., and Tiddy, R. M. (2009). Effect of treatment with the nonsteroidal antiinflammatory meloxicam on milk production, somatic cell count, probability of re-treatment, and culling of dairy cows with mild clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4421–4431. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2284>
- McDougall, S., Clausen, L. M., Hussein, H. M., and Compton, C. W. R. (2022). Therapy of Subclinical Mastitis during Lactation. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020209>
- Mercieri, A. (2006). *L'approccio quantitativo di Stewart all'equilibrio acido-base*. www.sint-italy.org/gin
- Morgan, T. J. (2009). The Stewart approach--one clinician's perspective. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 30(2), 41–54.
- Motrenko, M., Lange, A., Kalińska, A., Gołębiowski, M., Kunowska-Słószarz, M., Nasiłowska, B., Czwartos, J., Skrzeczanowski, W., Orzeszko-Rywka, A., Jagielski, T., Hotowy, A., Wierzbicki, M., and Jaworski, S. (2025). Green Nanoparticle Synthesis in the Application of Non-Bacterial Mastitis in Cattle. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 30(6). <https://doi.org/10.3390/molecules30061369>

- Mullarky, I. K., Su, C., Frieze, N., Park, Y. H., and Sordillo, L. M. (2001). *Staphylococcus aureus agr* Genotypes with Enterotoxin Production Capabilities Can Resist Neutrophil Bactericidal Activity. *Infection and Immunity*, 69(1), 45–51. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.45-51.2001>
- Neves, R. C., Stokol, T., Bach, K. D., and mcart, J. A. A. (2018). Method comparison and validation of a prototype device for measurement of ionized calcium concentrations cow-side against a point-of-care instrument and a benchtop blood-gas analyzer reference method. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 1334–1343. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13779>
- Nicholas, R. A. J., Fox, L. K., and Lysnyansky, I. (2016). Mycoplasma mastitis in cattle: To cull or not to cull. *The Veterinary Journal*, 216, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.08.001>
- Nichols, S. (2022). Chronic Udder Abscess. In *Comparative Veterinary Anatomy* (pp. 1236–1241). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91015-6.00113-8>
- Ohtsuka, H., Mori, K., Hatsugaya, A., Koiwa, M., Sato, H., Yoshino, T., and Takahashi, K. (1997). Metabolic alkalosis in coliform mastitis. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 59(6), 471–472. <https://doi.org/10.1292/jvms.59.471>
- Owens, W. E., Watts, J. L., Boddie, R. L., and Nickerson, S. C. (1988). Antibiotic Treatment of Mastitis: Comparison of Intramammary and Intramammary Plus Intramuscular Therapies. *Journal of Dairy Science*, 71(11), 3143–3147. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79915-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79915-4)
- Paape, M. J., Wergin, W. P., Guidry, A. J., and Pearson, R. E. (1979). Leukocytes--second line of defense against invading mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 62(1), 135–153. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83215-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83215-4)
- Pandey, Y. (2018). *Gross anatomical structure of the mammary gland in cow*.
- Pedersen, R. R., Krömker, V., Bjarnsholt, T., Dahl-Pedersen, K., Buhl, R., and Jørgensen, E. (2021a). Biofilm Research in Bovine Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 656810. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.656810>
- Pedersen, R. R., Krömker, V., Bjarnsholt, T., Dahl-Pedersen, K., Buhl, R., and Jørgensen, E. (2021b). Biofilm Research in Bovine Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 656810. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.656810>
- Peek, S. Francis., and Divers, T. J. . (2018). *Rebhun's diseases of dairy cattle*. Elsevier.
- Piccione, G., Messina, V., Schembari, A., Casella, S., Giannetto, C., and Alberghina, D. (2011). Pattern of serum protein fractions in dairy cows during different stages of gestation and lactation. *Journal of Dairy Research*, 78(4), 421–425. <https://doi.org/10.1017/S0022029911000562>

PYORALA, S., and TAPONEN, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.015>

Qayyum, A., Khan, J. A., Hussain, R., Avais, M., Ahmad, N., and Khan, M. S. (2016). *Pakistan Veterinary Journal Investigation of Milk and Blood Serum Biochemical Profile as an Indicator of Sub-Clinical Mastitis in Cholistani Cattle*. www.pvj.com.pk

Rantamäki, L. K., and Müller, H.-P. (1995). Phenotypic characterization of *Streptococcus dysgalactiae* isolates from bovine mastitis by their binding to host derived proteins. *Veterinary Microbiology*, 46(4), 415–426. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00046-D](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00046-D)

Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D., mccluskey, B. J., Goff, J. P., and Horst, R. L. (2011). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The Veterinary Journal*, 188(1), 122–124. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.025>

Rindsig, R. B., Rodewald, R. G., Smith, A. R., and Spahr, S. L. (1978). Complete Versus Selective Dry Cow Therapy for Mastitis Control. *Journal of Dairy Science*, 61(10), 1483–1497. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83753-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83753-9)

Romero, M. F., and Rossano, A. J. (2019). Acid-Base Basics. *Seminars in Nephrology*, 39(4), 316–327. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2019.04.002>

Royster, E., and Wagner, S. (2015). Treatment of Mastitis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 31(1), 17–46. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.11.010>

Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10381–10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>

Ruegg, P. L., and Reinemann, D. J. (2002). Milk quality and mastitis tests. *The Bovine Practitioner*, 41–54. <https://doi.org/10.21423/bovine-vol36no1p41-54>

Saleem, A., Saleem Bhat, S., A Omonijo, F., A Ganai, N., M Ibeagha-Awemu, E., and Mudasir Ahmad, S. (2024). Immunotherapy in mastitis: state of knowledge, research gaps and way forward. *The Veterinary Quarterly*, 44(1), 1–23. <https://doi.org/10.1080/01652176.2024.2363626>

Sayers, R. G., Kennedy, A., Krump, L., Sayers, G. P., and Kennedy, E. (2016). An observational study using blood gas analysis to assess neonatal calf diarrhea and subsequent recovery with a European Commission-compliant oral electrolyte solution. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4647–4655. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10600>

Scherpenzeel, C. G. M., Tijs, S. H. W., den Uijl, I. E. M., Santman-Berends, I. M. G. A., Velthuis, A. G. J., and Lam, T. J. G. M. (2016). Farmers' attitude toward the introduction of selective dry cow therapy. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 8259–8266. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11349>

- Schwartz, W. B., and Relman, A. S. (1963). A Critique of the Parameters Used in the Evaluation of Acid-Base Disorders. *New England Journal of Medicine*, 268(25), 1382–1388. <https://doi.org/10.1056/NEJM196306202682503>
- Seykora, A. J., and mcdaniel, B. T. (1985). Udder and teat morphology related to mastitis resistance: a review. *Journal of Dairy Science*, 68(8), 2087–2093. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81072-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81072-9)
- Sharifi, A., Sobhani, K., and Mahmoudi, P. (2023). A systematic review and meta-analysis revealed a high-level antibiotic resistance of bovine mastitis *Staphylococcus aureus* in Iran. *Research in Veterinary Science*, 161, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.05.016>
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Iqbal Yatoo, M., Patel, S. K., Pathak, M., Karthik, K., Khurana, S. K., Singh, R., Puvvala, B., Amarpal, Singh, R., Singh, K. P., and Chaicumpa, W. (2021). Advances in therapeutic and managerial approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *The Veterinary Quarterly*, 41(1), 107–136. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>
- Sherwin, V. E., Egan, S. A., Green, M. J., and Leigh, J. A. (2021). Survival of *Streptococcus uberis* on bedding substrates. *The Veterinary Journal*, 276, 105731. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105731>
- Siggaard-Andersen, O. (1963). The X Y Z of Blood Acid-Base Chemistry. *Proceedings of the Association of Clinical Biochemists*, 2(6), 137–138. <https://doi.org/10.1177/036985646300200613>
- Silanikove, N., Rauch-Cohen, A., Shapiro, F., Blum, S., Arieli, A., and Leitner, G. (2011). Lipopolysaccharide challenge of the mammary gland in bovine induced a transient glandular shift to anaerobic metabolism. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4468–4475. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4092>
- Singer, r. B., and hastings, a. B. (1948). An improved clinical method for the estimation of disturbances of the acid-base balance of human blood. *Medicine*, 27(2), 223. <https://doi.org/10.1097/00005792-194805000-00003>
- Sjaastad, O. V., Sand, O., and Hove, K. (2010). *Physiology of Domestic Animals*.
- Smith. (2015). *Large animal internal medicine*.
- Smith, G. W., Constable, P. D., and Morin, D. E. (2001). Ability of Hematologic and Serum Biochemical Variables to Differentiate Gram-Negative and Gram-Positive Mastitis in Dairy Cows. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(4), 394–400. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2001.tb02335.x>
- Smith, K. L., Todhunter, D. A., and Schoenberger, P. S. (1985). Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *Journal of Dairy Science*, 68(6), 1531–1553. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80993-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80993-0)

- Sordillo, L. M., Shafer-Weaver, K., and derosa, D. (1997). Immunobiology of the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*, 80(8), 1851–1865. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76121-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76121-6)
- Sordillo, L. M., and Streicher, K. L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(2), 135–146. <https://doi.org/10.1023/a:1020347818725>
- Stewart, P. A. (1981). *How to understand acid-base : a quantitative acid-base primer for biology and medicine*.
- Story, D. A. (2004). Bench-to-bedside review: a brief history of clinical acid-base. *Critical Care (London, England)*, 8(4), 253–258. <https://doi.org/10.1186/cc2861>
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T., and 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), 2610–2617. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1729>
- Targowski, S. P. (1983). Role of immune factors in protection of mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 66(8), 1781–1789. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)82006-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)82006-2)
- Tommasoni, C., Fiore, E., Lisuzzo, A., and Ganesella, M. (2023). Mastitis in Dairy Cattle: On-Farm Diagnostics and Future Perspectives. *Animals*, 13(15), 2538. <https://doi.org/10.3390/ani13152538>
- Treger, R., Pirouz, S., Kamangar, N., and Corry, D. (2010). Agreement between Central Venous and Arterial Blood Gas Measurements in the Intensive Care Unit. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(3), 390–394. <https://doi.org/10.2215/CJN.00330109>
- Van Soest, F. J. S., Santman-Berends, I. M. G. A., Lam, T. J. G. M., and Hogeveen, H. (2016). Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 8365–8374. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10561>
- Viguier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., and O’Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 27(8), 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.05.004>
- Wagner, J., Rieker, T., and Siegling-Vlitakis, C. (2015). Blutgasanalyse beim Hund in der tierärztlichen Praxis – eine Übersicht. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere*, 43(04), 260–272. <https://doi.org/10.15654/TPK-141021>
- Wegner, T. N., and Stull, J. W. (1978). Relation between mastitis test score, mineral composition of milk, and blood electrolyte profiles in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 61(12), 1755–1759. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83798-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83798-9)

- Wellnitz, O., Zbinden, C., Lüttgenau, J., Bollwein, H., and Bruckmaier, R. M. (2015). Different chronological patterns of appearance of blood derived milk components during mastitis indicate different mechanisms of transfer from blood into milk. *The Journal of Dairy Research*, 82(3), 322–327. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000345>
- Whitehair, K. J., Haskins, S. C., Whitehair, J. G., and Pascoe, P. J. (1995). Clinical Applications of Quantitative Acid-Base Chemistry. In *Journal of Veterinary Internal Medicine* (Vol. 9, Issue 1, pp. 1–11). <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1995.tb03265.x>
- Yeruham, I., Schwimmer, A., and Brami, Y. (2002). Epidemiological and bacteriological aspects of mastitis associated with yellow-jacket wasps (*Vespula germanica*) in a dairy cattle herd. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 49(10), 461–463. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2002.00487.x>
- Zhylkaidar, A., Oryntaev, K., Altenov, A., Kyplybai, E., and Chayxmet, E. (2021). Prevention of Bovine Mastitis through Vaccination. *Archives of Razi Institute*, 76(5), 1381–1387. <https://doi.org/10.22092/ari.2021.356008.1764>

11. **SITOGRAFIA e FONTI NORMATIVE**

Bullettin 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>.

Sezione per la Farmacosorveglianza sui Medicinali Veterinari Ministero Della Salute. *Linee guida per l'uso prudente degli antimicrobici negli allevamenti zootecnici per la prevenzione dell'antimicrobico-resistenza e proposte alternative*,

https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2782_allegato.pdf).

Ministero della salute (2024). *Antibiotico-resistenza*, <https://www.salute.gov.it/new/it/faq/faq-antibiotico-resistenza/?tema=Antibiotico-resistenza>).

World Health Organization (2024). *Medically Important Antimicrobials List for Human Medicine*, <https://www.who.int/news/item/08-02-2024-who-medically-important-antimicrobial-list-2024>).

European Medicine Agency (2019), *Categorisation of antibiotics in the European Union*, https://www.ema.europa.eu/system/files/documents/report/ameg_-_categorisation_of_antibiotics_en.pdf#page=37andzoom=100,80,686).

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

Art. 107, Regolamento (UE) 2019/4 e 2019/6 relativi rispettivamente ai medicinali veterinari e ai mangimi medicati del Parlamento Europeo e del Consiglio Europeo relativo a mangimi medicati e ai medicinali veterinari.