



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e
Salute

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

**CARATTERIZZAZIONE
METABONOMICA TRAMITE $^1\text{H-NMR}$ DI
LATTE BOVINO.**

Relatore:

Prof. Gianfranco Gabai

Correlatori:

Prof. Lucio Zennaro

Prof.ssa Maria Elena Gelain

Laureanda

Fiorese Chiara

Matricola n.

1049748

ANNO ACCADEMICO 2017-2018

A nonno Piero

“C’era stato traffico di animali selvatici verso quel mattino: lessi due lepri che avevano danzato, il passaggio di un capriolo, l’attraversamento di una volpe, le impronte di un francolino di monte, e le belle, nitide tracce delle zampe dell’urogallo e delle sue ali sulla neve: era stato lui, con il suo primo *tooc*, che aveva chiamato il sole della primavera. Fu ingenua la mia felicità?”

Mario Rigoni Stern, *Stagioni*

Indice

1. Prefazione e scopo della tesi	1
2. Introduzione	3
2.1 Fisiologia della lattazione	3
2.1.1 Controllo ormonale della secrezione di latte	4
2.2 Meccanismi di difesa della mammella	5
2.2.1 Immunità innata	6
2.2.1.1 Barriere anatomiche	6
2.2.1.2 <i>Toll-like receptors</i>	6
2.2.1.3 Citochine pro-infiammatorie	7
2.2.1.4 Citochine anti-infiammatorie	8
2.2.1.5 Chemochine e risposta immunitaria cellulare	9
2.3 Barriera emato-mammaria	12
2.3.1 Struttura	12
2.3.2 Meccanismi di trasporto	14
2.3.2.1 Sodio, potassio e cloro	15
2.3.2.2 Glucosio	16
2.3.2.3 Calcio	16
2.3.2.4 Lipidi	17
2.3.2.5 Proteine e immunoglobuline	17
2.3.3 Fattori che alterano la permeabilità della barriera emato-mammaria	18
2.3.3.1 Periodo produttivo	18
2.3.3.2 Fattori ormonali	21
2.3.3.3 Stato infiammatorio: mastite	22
2.4 Mastite	23
2.4.1 Forme tipiche della mastite	23
2.4.1.1 Mastite clinica	24
2.4.1.2 Mastite subclinica	25
2.4.1.3 Mastite cronica	25
2.4.2 Diagnosi	26

2.4.2.1	Cellule somatiche e conta cellulare differenziale tramite citofluorimetria	26
2.4.2.2	<i>California Mastitis Test (CMT)</i>	29
2.4.2.3	Esame colturale	30
2.4.2.4	Conducibilità elettrica del latte (EC)	31
2.4.2.5	Proteine di fase acuta (APP)	32
2.5	¹ H-NMR: analisi metabonomica	32
3.	<i>Principi teorici di NMR</i>	35
3.1	Nuclei NMR attivi	35
3.2	Spettroscopia NMR	37
4.	<i>Materiali e metodi</i>	40
4.1	Raccolta dei campioni	40
4.1.1	Azienda	40
4.1.2	Criterio di selezione dei soggetti	41
4.1.3	Metodo di prelievo dei campioni	41
4.2	Citofluorimetria	42
4.3	Antibiogramma	44
4.4	¹ H-NMR	45
4.4.1	Pre-trattamento dei campioni	45
4.4.2	Allestimento dei campioni per NMR	46
4.5	Analisi dei dati ed elaborazione statistica	51
4.5.1	Elaborazione dei dati citofluorimetrici	51
4.5.2	Criteri di classificazione dei campioni	53
4.5.3	Analisi statistica dei dati ottenuti dall'analisi ¹ H-NMR	54
5.	<i>Risultati e discussione</i>	59
5.1	Condizione sanitaria dei soggetti	59
5.2	Risultati Metabonomica tramite ¹ H-NMR	60
5.3	Livello di associazione tra i due criteri di classificazione	72
5.4	Possibile classificazione per animale	72

<i>6. Conclusioni</i>	74
<i>7. Appendice</i>	76
<i>8. Bibliografia</i>	82
<i>9. Ringraziamenti</i>	86

1. Prefazione e scopo della tesi

“ «Il *mastice*» sentenziò il signor Pickersgill «è un affare serio».

Annui concordando sul fatto che il suo problema della mastite era davvero tale da costituire oggetto di interesse; e riflettevo nello stesso tempo che, mentre la maggior parte dei coltivatori si sarebbe contentata del locale «patereccio», era tipico del signor Pickersgill fare un deciso anche se inesatto tentativo di usare un termine scientifico.”

James Herriot, *Beato tra le bestie*

Il veterinario inglese James Alfred Wight (in arte James Herriot) ci narra queste parole dette negli anni '40 da un piccolo allevatore nel mezzo delle colline dello Yorkshire.

A distanza di quasi 80 anni da tale citazione, la mastite è rimasto uno dei principali problemi negli allevamenti di bovine da latte.

In questo arco di tempo numerosi progressi sono stati fatti, sia in termini di conoscenza della patologia che nella sua diagnosi e prevenzione.

La tecnica di mungitura, l'igiene ambientale, la nutrizione, la vaccinazione, le misure di biosicurezza e l'isolamento di capi infetti sono solo alcuni degli elementi fondamentali che possiamo elencare per cercare di evitare la diffusione degli agenti patogeni causanti mastite in un allevamento.

Insieme a tali accorgimenti, importanti sono stati i progressi nella diagnosi della patologia, con lo sviluppo di numerose e diverse tecniche, più o meno laboriose. Tra queste: il *California Mastitis Test*, uno dei metodi più veloci e semplici, la conta delle cellule somatiche (SCC) che si vedono aumentare in seguito a mastite, la citofluorimetria per differenziare le popolazioni cellulari, la rilevazione della conducibilità del latte, l'esame colturale e l'evidenza di proteine di fase acuta (APP) come marker di infiammazione.

Negli ultimi anni però si è sviluppata una nuova tecnica: l'analisi metabonomica tramite $^1\text{H-NMR}$ (*Proton nuclear magnetic resonance*); il cui compito è essenzialmente quello di rilevare i metaboliti presenti all'interno di un composto, sia esso liquido o solido.

Usata dapprima in medicina umana per la diagnosi di patologie quali carcinoma epatocellulare (Y. Yongxia, 2007), carcinoma duttale *in situ* (L.L. Cheng, 1998) e neoplasie cerebrali (J. Peeling, 1992), è stata recentemente adottata anche in medicina veterinaria nella diagnosi di mastite.

Come sappiamo, il processo infiammatorio causa un'alterazione della barriera emato-mammaria, con una conseguente alterazione del passaggio di sostanze nel latte,

risultando quindi in una diversa composizione di quest'ultimo nei soggetti affetti dalla patologia.

Sulla base di questo, alcuni studi effettuati su campioni di latte totale (una miscela di latte dei singoli quarti mammari) di bovine che presentavano un alto numero di cellule somatiche e non, evidenziano un'effettiva differenza nei due profili metabolici (U.K. Sundekilde, 2013).

Lo scopo di questo studio è quello di effettuare un'ulteriore indagine, più approfondita, non sul latte totale dell'individuo scelto ma su quello dei singoli quarti. In tal modo si spera di avere un quadro più preciso della situazione sanitaria dell'animale, riuscire ad identificare i metaboliti che maggiormente subiscono un'alterazione di concentrazione ed effettuare quindi una diagnosi efficace della patologia.

2. Introduzione

2.1 Fisiologia della lattazione

Nelle bovine le quattro mammelle – ognuna costituita da una ghiandola mammaria – sono riunite a formare un unico corpo mammario. Tale corpo, posto ventralmente alla parte caudale dell'addome, ma esteso in parte anche sotto il pavimento pelvico, risulta diviso in una metà destra e una metà sinistra da un evidente solco intermammario (K.M. Dyce, 2009).

In una mammella pienamente sviluppata il tessuto di ciascuna ghiandola mammaria è diviso in alveoli (acini), ossia piccole unità funzionali di base durante la lattazione; lobuli, costituiti da gruppi di 150-200 alveoli; e lobi, costituiti da gruppi di lobuli separati da tessuto connettivo grossolano (V. Sjaastad, 2013).

Il corpo ghiandolare della mammella è una struttura tubulo-alveolare composta, a secrezione apocrina.

Il latte si forma nelle piccole cellule epiteliali che rivestono il lume alveolare e viene successivamente convogliato in un sistema di dotti lattiferi o galattofori grazie alla contrazione delle cellule mioepiteliali, che formano una rete tutt'intorno agli alveoli e ai dotti lattiferi più piccoli. Inoltre, una rete capillare sulla superficie degli alveoli fornisce alle cellule epiteliali i nutrienti e l'ossigeno necessari. Dai dotti più piccoli, il latte viene poi indirizzato in dotti di dimensioni via via crescenti: dal dotto intralobulare al condotto lattifero per finire poi nel seno lattifero posto alla base del capezzolo. Quest'ultimo a sua volta afferisce a un unico dotto papillare dal quale il latte fuoriesce all'esterno attraverso il poro lattifero, munito di sfintere.

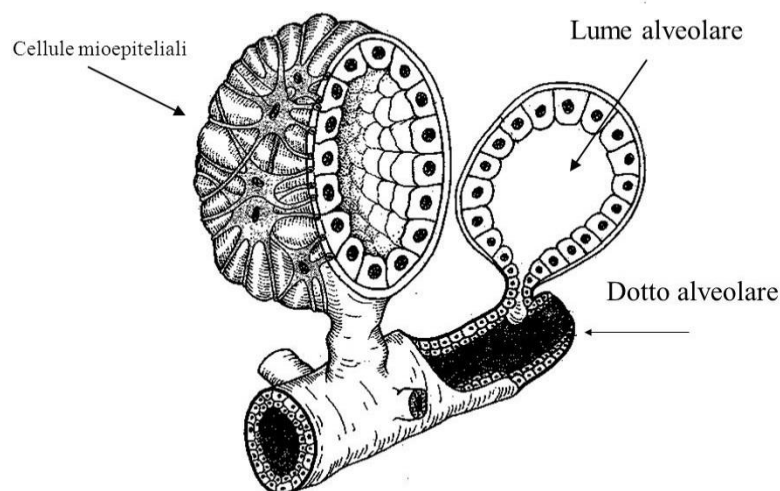


Fig. 2.1 Rappresentazione schematica dell'alveolo mammario (Naitana et al., 1992).

2.1.1 Controllo ormonale della secrezione di latte

Il sistema endocrino svolge un ruolo fondamentale nel controllo della sintesi e secrezione del latte. Attraverso la secrezione di diversi ormoni si ha una vera e propria sincronizzazione tra lo sviluppo e la funzionalità della ghiandola mammaria, lo stato riproduttivo dell'animale e le richieste di latte da parte della prole (M.C.Neville, 2002)

La lattogenesi (o montata latte) è definita come l'inizio della secrezione latte; al momento della lattogenesi, verso la fine della gravidanza, le cellule epiteliali mammarie si differenziano in cellule secernenti attive (V. Sjaastad, 2013). Tale processo si è dimostrato dividersi in due fasi denominate rispettivamente lattogenesi I e lattogenesi II. La prima fase ha inizio nell'ultimo terzo di gravidanza e comprende modificazioni funzionali e strutturali dell'epitelio secernente con progressiva espressione di geni coinvolti nella sintesi dei componenti del latte (M.C.Neville, 2002). In questo periodo, infatti, le elevate concentrazioni di estrogeni e progesterone stimolano sia la crescita che la differenziazione del tessuto secretorio e la secrezione di prolattina da parte dell'ipofisi anteriore promuove lo sviluppo completo della mammella. Nei ruminanti viene inoltre prodotto dalla placenta il lattogeno placentare (somatotropina mammaria), che si lega ai recettori della prolattina e stimola la crescita e la differenziazione delle cellule epiteliali.

A completare il quadro insulina, ormone della crescita, ormoni tiroidei e cortisolo sono necessari per la regolazione del metabolismo delle cellule epiteliali mammarie. Le condizioni apocrine sopra descritte portano a una crescita marcata dei lobuli con strutture alveolari completamente sviluppate e contemporanea diminuzione del tessuto adiposo (V. Sjaastad, 2013).

Nel periodo preparto, invece, la ghiandola mammaria è sottoposta a ulteriori modificazioni che portano alla secrezione prima di colostro e poi di latte. Tale fase, chiamata lattogenesi II, è caratterizzata dall'aumento dell'espressione di geni che codificano per le proteine del latte, dalla chiusura delle *tight junctions* (ossia le connessioni tra le cellule dell'epitelio monostratificato mammario), dallo spostamento nel lume alveolare di micelle di caseina e goccioline lipidiche citoplasmatiche e da un aumento transitorio del passaggio di immunoglobuline e altre sostanze caratterizzano la formazione del colostro (M.C.Neville, 2002). Gli ormoni maggiormente coinvolti in questa fase sono: cortisolo, progesterone (che subisce un crollo), prolattina ed estrogeni. Durante le fasi finali della gravidanza, le elevate concentrazioni di progesterone impediscono sia l'inizio del parto che della lattazione, competendo da una parte con il

cortisolo per i recettori intracellulari e bloccando i recettori della prolattina sulle cellule mioepiteliali mammarie dall'altra. Al momento del parto le concentrazioni di progesterone calano drasticamente riducendosi quasi a zero. Questo favorisce l'azione del cortisolo e della prolattina che agiscono in modo sinergico per stimolare la lattazione. Il cortisolo inoltre induce la crescita del reticolo endoplasmatico rugoso e dell'apparato di Golgi delle cellule epiteliali, essenziali per ottimizzare l'effetto della prolattina sull'avvio della produzione lattea. La prolattina infatti è un peptide che si lega a dei recettori di membrana che attivano delle tirosine chinasi intracellulari, le quali attivano geni codificanti per le proteine nelle cellule epiteliali mammarie. Quando la concentrazione di progesterone crolla, al momento del parto, la ghiandola mammaria è in grado di rispondere alla secrezione di prolattina, significativamente aumentata da parte dell'ipofisi anteriore, aumentando quindi la trascrizione di geni delle proteine del latte, compresi quelli della caseina e dell' α -lattoalbumina (la quale ha un effetto regolatore sulla sintesi del lattosio). Gli estrogeni, infine, stimolano la secrezione di prolattina da parte dell'ipofisi e una loro somministrazione può stimolare la sintesi dei suoi recettori nella ghiandola mammaria fino a che le cellule epiteliali mammarie si differenziano e iniziano a produrre latte (V. Sjaastad, 2013).

2.2 Meccanismi di difesa della mammella

I processi infiammatori a carico della mammella, causati da microrganismi patogeni, sono molto comuni nell'allevamento delle bovine da latte e costituiscono un'importante causa di perdita economica. La prima linea di difesa contro la mastite è il canale del capezzolo, dal momento che questa è la via attraverso cui i batteri invadono la ghiandola mammaria. Una poca attenzione durante la mungitura e un management errato favorente fenomeni di erosione a tale livello, possono essere cause predisponenti se non determinanti un fenomeno infiammatorio localizzato. (P. Rainard, 2006)

La mammella e il capezzolo in sé possiedono diversi meccanismi di difesa che possiamo distinguere in due categorie: immunità innata e immunità acquisita. Questi due sistemi devono essere perfettamente coordinati per garantire la massima risposta all'invasione da parte dei microrganismi.

2.2.1 Immunità innata

L'immunità innata (o naturale) è il primo meccanismo di difesa contro i patogeni. Si instaura rapidamente e prevede il coinvolgimento di fattori non solo cellulari (come

neutrofili, macrofagi, cellule *natural killer* e citochine) ma anche di barriere anatomiche che impediscono fisicamente il passaggio dei batteri.

2.2.1.1 *Barriere anatomiche*

Il capezzolo è considerata la prima linea di difesa contro eventuali infezioni, essendo la strada attraverso cui eventuali microrganismi patogeni possono raggiungere la ghiandola mammaria (L.M. Sordillo, 2002). L'orifizio capezzolare è circondato da anelli muscolari che impediscono la fuoriuscita di latte e fungono da barriera alla penetrazione batterica; lo sfintere del capezzolo deve essere abbastanza elastico in quanto l'elevata frequenza di sollecitazioni a cui è sottoposto durante la mungitura provoca l'affaticamento delle fibre muscolari. Tale sforzo comporta che alla fine della mungitura non si abbia la completa chiusura dell'orifizio (pertanto è facilitato l'ingresso dei batteri) (L.M. Sordillo, 2002).

L'epitelio interno del canale del capezzolo è caratterizzato anche da un'intensa mitosi e cheratinizzazione delle cellule epidermiche, che costituiscono un vero e proprio tappo e barriera contro l'invasione e colonizzazione batterica. La rimozione della cheratina è correlata infatti all'aumento della suscettibilità e incidenza delle infezioni. Questa sostanza inoltre è composta da vari acidi grassi con attività battericida (C18:2 e C18:3) e batteriostatica (C12 e C14) verso *Staph. aureus*, *Staph.hycus*, *Corynebacterium bovis* e *Strept. Agalactiae* (L.M. Sordillo, 1997).

2.2.1.2 *Toll-like receptors*

Percepire la presenza di un agente patogeno è il primo step di un'appropriata risposta immunitaria. A tale compito è adibito un numeroso gruppo di recettori trans-membrana che riconoscono molecole estranee appartenenti ai vari microrganismi: i 13 diversi tipi di recettori TLR (*Toll-like receptors*), localizzati a livello mammario, sono la famiglia di recettori meglio descritta.

Tra questi, l'identificazione di CD14, TLR2 e TLR4 nelle membrane di globuli lipidici nel latte, suggerisce un loro ruolo nei meccanismi di difesa della ghiandola mammaria.

Una volta che avviene il legame recettore-ligando, è stato notato che tutte le vie di trasduzione del segnale portano all'attivazione del fattore NF- κ B (*Nuclear Factor κ chain transcription in B cells*), un fattore di trascrizione che svolge un ruolo primario nella regolazione della risposta immunitaria. Normalmente presente in forma inattiva nel citoplasma, dov'è sequestrato attraverso un legame diretto con un inibitore specifico

(I κ B), viene attivato da segnali extracellulari che ne provocano il distacco e il trasferimento nel nucleo, dove si lega a specifici siti del DNA e ne regola la trascrizione. Questo meccanismo porta, ad esempio, a una up-regulation di citochine pro-infiammatorie e molecole di adesione che mediano la risposta immunitaria locale e/o sistemica.

Ci sono alcune diversità sul tipo di TLR attivati in base al batterio patogeno coinvolto: è stato notato (Elazar *et al.*, 2010) che una mastite causata da *E. Coli* causa un aumento di espressione di β - defensine, TLR2 e TLR4 (quest'ultimo di particolare importanza per il processo di diapedesi dei PMN) mentre non ha influenza sulla regolazione di TLR3 e TLR6. Di contro, un'invasione da parte di *S. Aureus* non causa nessuna significativa regolazione di nessuno dei geni codificanti per queste molecole e perciò l'espressione di citochine in un'infezione di questo tipo è sia ritardata che diminuita a meno del 5% rispetto alla corrispettiva infezione da *E. Coli* (Schukken, 2011).

2.2.1.3 Citochine pro-infiammatorie

Come appena accennato, l'attivazione del fattore NB- κ B dovuto al legame tra recettore e molecola batterica, porta all'aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie che si ritrovano in abbondanza non solo nella mammella di bovine infette ma anche nel latte. Le più importanti sono tumor necrosis factor (TNF- α) e l'interleuchina (IL)-1. Esse regolano non solo l'espressione di una serie di geni coinvolti nella risposta immunitaria (tra cui la sintesi di altre citochine, enzimi, eicosanoidi e proteine di fase acuta) ma anche geni coinvolti nel processo di proliferazione cellulare e apoptosi. Infezioni da batteri gram-negativi, come *E. Coli*, provocano un aumento più significativo di TNF- α e IL-1 rispetto a batteri gram-positivi: *S. Aureus*, ad esempio, è caratterizzato da un aumento piuttosto relativo e di più breve durata di tale risposta pro-infiammatoria, che vede coinvolta primariamente IL-6. *S. Uberis* invece presenta una risposta inizialmente ritardata seguita però da un'intensa espressione di tali citochine. (Schukken, 2011).

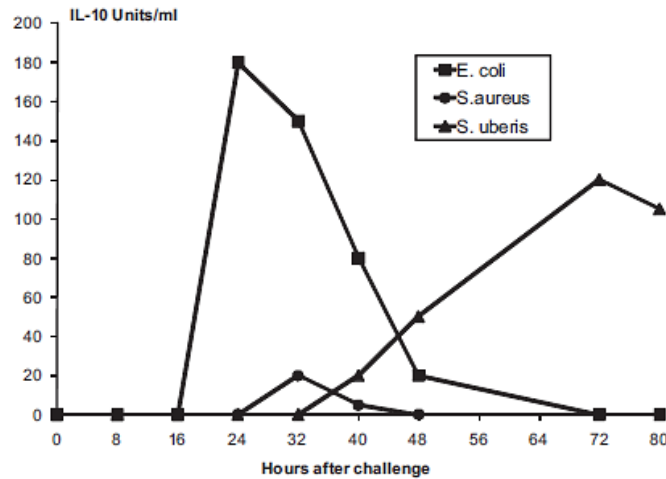


Fig. 2.2 Profilo della citochina IL-10 dopo infezione da E. Coli, S. Aureus e S. Uberis (Schukken, 2011).

2.2.1.4 Citochine anti-infiammatorie

Alcuni tipi di citochine, come IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- α sopprimono la produzione di citochine pro-infiammatorie. Queste interleuchine originano dai leucociti che invadono la mammella durante il fenomeno infiammatorio. IL-10 (una delle molecole più esaminate), oltre a interrompere la produzione di citochine, riduce anche la produzione di fattori del MHC-II (complesso maggiore di istocompatibilità II) ed è coinvolta nella differenziazione e funzionalità di linfociti B e T.

Altre molecole da citare sono gli interferoni (IFN), che formano una famiglia di citochine modulatrici della risposta immunitaria. Tra queste, il più studiato nei meccanismi di difesa della mammella è l'IFN- γ , prodotto esclusivamente dai leucociti. Esso stimola la funzionalità dei macrofagi come cellule presentanti l'antigene, aumenta l'attività lisosomiale, promuove la differenziazione dei linfociti Th1 sopprimendo parallelamente l'attività dei Th2. L'IFN- γ è generalmente presente in alte concentrazioni nel latte degli animali con infezioni persistenti ed è riscontrabile piuttosto tardivamente, dopo 72h dall'inizio del processo patologico (Schukken, 2011).

Cytokine	Observations
IL-1	Mediates acute phase inflammatory response Increases neutrophil numbers Enhances neutrophil phagocytosis and bactericidal activity Triggers neutrophil migration into infected mammary gland
IL-2	Enhances mammary mononuclear cell proliferation Enhances cytotoxic and bactericidal activities of lymphocytes Increases plasma cell numbers Activates NK cells
IL-8	Induces inflammation Mediates IL-1 induced neutrophil migration Potent chemoattractant
G-CSF	Increases numbers of blood and milk neutrophils Increases milk SCC Increases phagocytosis and bactericidal activity
GM-CSF	Decreases neutrophil migration Enhances chemotactic and bactericidal activities of neutrophils Enhances cytotoxic activity Increases number of phagocytic cells
M-CSF	Regulates proliferation and differentiation of macrophages Potent macrophage chemoattractant
IFN- γ	Enhances neutrophil phagocytosis and bactericidal activity Reverses suppressive effects of mammary gland secretions
TNF- α	Enhances acute phase inflammatory response Enhances neutrophil phagocytosis and bactericidal activity Enhances endothelial adhesion molecule expression

Note. IL = interleukin, G-CSF = granulocyte colony-stimulating factor, GM-CSF = granulocyte-monocyte colony-stimulating factor, M-CSF = macrophage colony-stimulating factor, IFN- γ = interferon- γ , and TNF- α = tumor necrosis factor- α .

Tab. 2.1 Effetto delle citochine nella risposta immunitaria della ghiandola mammaria (L.M. Sordillo K. S., 2002).

2.2.1.5 Chemochine e risposta immunitaria cellulare

Indispensabili per la risposta cellulare, le chemochine sono una classe di citochine che media il reclutamento delle cellule effettrici della risposta immunitaria nel sito d'infezione. Tra queste CXCL8, interagendo con i recettori CXCR1 (*chemokine receptor 1*) e CXCR2, è coinvolta nel richiamo dei granulociti e l'accumulo dei macrofagi nella ghiandola mammaria infetta (Schukken, 2011).

I neutrofili sono il tipo cellulare predominante nel tessuto mammario e nelle secrezioni mammarie durante la prima fase della risposta immunitaria e possono costituire più del

90% dei leucociti totali presenti. Queste cellule viaggiano dal torrente circolatorio alla mammella in risposta a una serie di stimoli infiammatori come citochine, complemento e prostaglandine. Un volta giunti al sito d'infezione, il loro compito è quello di fagocitare e distruggere i batteri. Tale azione avviene mediante la liberazione di radicali ossigeno e ossidrilici, responsabili del fenomeno di stress ossidativo (o *respiratory burst*): i patogeni vengono eliminati grazie all'azione dello ione superossido, ipoclorito e perossido d'idrogeno. Oltre a questo, un altro meccanismo ossigeno-indipendente può prendere parte all'azione, producendo perossidasi, lisozima, diversi enzimi idrolitici e lattoferrina. I neutrofili poi, oltre alle suddette proprietà fagocitiche, producono piccoli peptidi antibatterici, le defensine, che sono capaci di distruggere diversi microrganismi causanti mastite.

Oltre alla componente neutrofilica, la presenza di batteri comporta anche l'aumento di macrofagi. Tali cellule hanno il compito di fagocitare i batteri, processarli e produrre peptidi che, associati al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) II, vengono esposti sulla superficie cellulare. Ciò è fondamentale per i linfociti, le uniche cellule del sistema immunitario in grado di riconoscere molecole antigeniche attraverso il loro legame a recettori di membrana specifici per microrganismi invasori.

I linfociti si distinguono principalmente in B e T. I linfociti T possono essere ulteriormente divisi in $\alpha\beta$, che includono i CD4+ (T helper) e CD8+ (T-citotossici), e linfociti $\gamma\delta$.

I T helper, in seguito al riconoscimento del complesso antigene-MHC II, producono alcune citochine aventi un importante ruolo nell'attivazione dei linfociti B, dei linfociti T, dei macrofagi e altre cellule partecipanti nella risposta immunitaria. I CD8+ invece, possono esercitare un'azione citotossica o di soppressione: riconoscono ed eliminano le cellule *self* alterate attraverso il riconoscimento della loro unione con il MHC di classe I, fungono da "spazzini" rimuovendo le cellule secernitrici vecchie e danneggiate (la cui presenza può aumentare la suscettibilità della ghiandola mammaria alle infezioni) e modulano la risposta immunitaria. In una mammella sana, i linfociti T citotossici costituiscono il fenotipo più presente e per questo il rapporto CD4/CD8 a questo livello è <1. Nel sangue invece, accade esattamente il contrario, con quindi un rapporto CD4/CD8 nettamente superiore a 1.

La funzione dei linfociti T $\gamma\delta$ invece non è molto chiara ma la loro funzione principale sembra essere associata alla protezione delle superfici epiteliali. Si pensa anche che essi possano avere un'azione citotossica e NK (natural killer), e che per questo possano

distruggere le cellule epiteliali che risultano essere alterate. In confronto al sangue, la concentrazione di questo fenotipo linfocitario è molto maggiore a livello sia di parenchima mammario che di secrezioni. Il fatto poi che una loro diminuzione sia legata a un aumento di suscettibilità alle infezioni, suggerisce che in effetti questi linfociti costituiscano una linea di difesa essenziale contro le mastiti.

Un altro tipo cellulare da prendere in considerazione sono i linfociti NK, aventi un'azione puramente citotossica. Essi non fanno parte né dei linfociti T né dei linfociti B e sono forniti di un recettore Fc che consente loro di legarsi a complessi antigene-anticorpo determinando la distruzione della cellula target tramite esocitosi di granuli contenenti perforina. Questa proteina consente l'ingresso nel citoplasma della cellula bersaglio di altri enzimi, chiamati granzimi, che ne inducono l'apoptosi. Oltre a questo, i NK possono secernere diverse molecole tossiche tra cui TNF- α . Infine, ci sono i linfociti B. Il loro ruolo primario è quello di produrre anticorpi e a differenza di macrofagi e neutrofili, i utilizzano i loro recettori di superficie per riconoscere patogeni specifici.

Le cellule B possono interiorizzare, processare e presentare l'antigene legato al MHC di classe II ai linfociti T helper. In seguito a ciò, i linfociti T producono IL-2 che induce la

differenziazione dei B o in plasma cellule secernenti anticorpi o in cellule della memoria (L.M. Sordillo K. S., 2002).

Factor	Biological function
Neutrophils	Phagocytosis and intracellular killing of bacteria; secretion of antibacterial factors
Macrophages	Phagocytosis and intracellular killing of bacteria; antigen presentation in conjunction with MHC
Natural killer cells	Nonimmune lymphocytes that secrete antibacterial proteins upon activation
T lymphocytes	
CD4+ (T helper)	Production of immunoregulatory cytokines following antigen recognition with MHC class II molecules; memory cells following antigen recognition
CD8+ (T cytotoxic)	Lysis of altered or damaged host cells when complexed with MHC class I molecules; production of cytokines that can down-regulate certain leukocyte functions
$\gamma\delta$ T lymphocytes	Biological role in the mammary gland is speculative
B lymphocytes	
Mature B cells	Display membrane-bound antibody molecules to facilitate antigen presentation; memory cells following antigen interactions
Plasma cell	Terminally differentiated B lymphocytes that synthesize and secrete antibody against a specific antigen

Tab. 2.2 Elementi della difesa immunitaria mammaria (L.M. Sordillo K. S., 2002).

2.3 Barriera emato-mammaria

Un'altra struttura a cui è doveroso prestare la dovuta attenzione è la barriera emato-mammaria. Essa infatti è coinvolta non solo nell'instaurarsi della lattazione ma anche nella diffusione di antibiotici e sostanze nutritive dal sangue al lume ghiandolare e nel processo di diapedesi dei neutrofili a seguito dell'invasione da parte di patogeni (A.J. Guidry, 1998).

Sono stati identificati vari agenti e sostanze in grado di modificare l'integrità di questa barriera, tra i quali si annoverano i microrganismi in grado di causare fenomeni infiammatori. Data l'incidenza e l'importanza economica di questi ultimi è essenziale capire la struttura e il ruolo di questa barriera naturale nella ghiandola mammaria.

2.3.1 Struttura

La barriera emato-mammaria regola il passaggio di sostanze dal sangue al latte e mantiene un certo gradiente osmotico tra i due comparti che permette, tra le altre cose, il passaggio di acqua nelle secrezioni mammarie (O. Wellnitz, 2016).

Fondamentali per la sua funzione di vero e proprio ostacolo fisico sono le cosiddette *tight junctions* o *zonula occludens*. Queste, insieme ai desmosomi (o *macula adherens*) e alle giunzioni intermedie (o *zonula adherens*), costituiscono il complesso giunzionale che svolge un ruolo fondamentale nelle interazioni cellulari tra epitelio ed endotelio adiacente (K. Stelwagen, 2014).

Le *tight junctions* (o giunzioni occludenti) sono localizzate nella porzione apicale delle cellule e appaiono – quando osservate con il microscopio elettronico – come dei punti in cui le membrane si fondono e gli spazi interstiziali vengono annullati (questi punti vengono definiti *punti nodali*). Oltre a costituire una barriera resistente al movimento dei soluti, le giunzioni occludenti rappresentano anche il confine che consente la separazione del dominio apicale dal dominio basolaterale della cellula, contribuendo così a mantenere la polarità cellulare. Tali giunzioni tuttavia sono strutture dinamiche che si possono dissociare e riformare a seconda delle esigenze funzionali dei tessuti, per favorire la proliferazione delle cellule epiteliali o la migrazione delle cellule infiammatorie.

Le giunzioni occludenti formano una fitta rete di contatti macromolecolari tra cellule confinanti (V.Kumar, 2015). Sono complessi multi-proteici costituiti da proteine integrali di membrana (claudine, occludine e molecole di adesione giunzionale),

proteine periferiche di membrana (*zonula occludens*) e molecole regolatrici come le chinasi.

Le *claudine* (18-27 kDa) sono proteine con 2 loop extracellulari e un dominio citoplasmatico C-terminale. Costituiscono un'ampia famiglia genica in cui sono state identificate 24 isoforme che determinano la selettività della via paracellulare a livello di tessuto, carica e dimensione. La permeabilità degli ioni attraverso le TJ è regolata dalle claudine -4, -8 e -14 che sono coinvolte nella barriera cationica, mentre altre claudine come -2, -7, -13 formano i pori paracellulari per cationi e anioni.

Le *occludine* (65 kDa) sono proteine con 4 domini transmembrana e 2 loop extracellulari ed esistono in 2 isoforme. Il dominio C-terminale, localizzato nel citoplasma, si lega direttamente a ZO-1 (*zonula occludens*) che a sua volta lega la parte apicale dell'actina. Questa porzione di occludina è ricca di siti di fosforilazione che possono essere modificati dalle chinasi e fosfatasi. L'occludina non fosforilata è distribuita nella membrana basolaterale e nelle vescicole citoplasmatiche, mentre l'occludina fosforilata è localizzata nelle TJ e determina una ridotta permeabilità paracellulare.

Le *molecole di adesione giunzionale* (JAM) (32 kDa) contengono un segmento transmembrana e un dominio extracellulare. Sono proteine coinvolte nell'adesione tra le cellule della barriera e tra la barriera e le cellule del sangue e possono formare interazioni omofile ed eterofile con diversi ligandi tra cui le integrine. Possono inoltre interagire con proteine come ZO-1.

Le proteine periferiche di membrana *zonula occludens* (ZO) sono cruciali per l'assemblaggio e il mantenimento delle TJ poiché possiedono domini multipli per l'interazione con altre proteine. Sul lato intracellulare della membrana, le estremità carbossi-terminali di claudina, occludina e actina interagiscono con le proteine ZO-1, ZO-2 e ZO-3.

Il complesso multiproteico delle TJ fin'ora descritto, è legato al citoscheletro di actina attraverso le proteine ZO che si legano alle proteine integrali di membrana con il dominio N-terminale e al citoscheletro di actina con il dominio C-terminale. La proteina che gioca un ruolo centrale è la ZO-1 che direttamente e indirettamente collega le proteine integrali di membrana (occludine e claudine) alle altre proteine citoplasmatiche delle TJ e al citoscheletro di actina, avendo quindi il potenziale di organizzare le componenti strutturali e di modulare la via paracellulare.

Appare quindi evidente che le giunzioni occludenti non sono semplicemente delle strutture cellulari statiche che regolano l'ingresso di soluti e ioni da una cellula all'altra ma, attraverso diversi *cell signaling pathways* e interazioni sia cellula-cellula che cellula-ECM (matrice extracellulare basolaterale) sono fondamentali per il mantenimento della struttura tridimensionale della cellula stessa e quindi della sua funzionalità (K. Stelwagen, 2014).

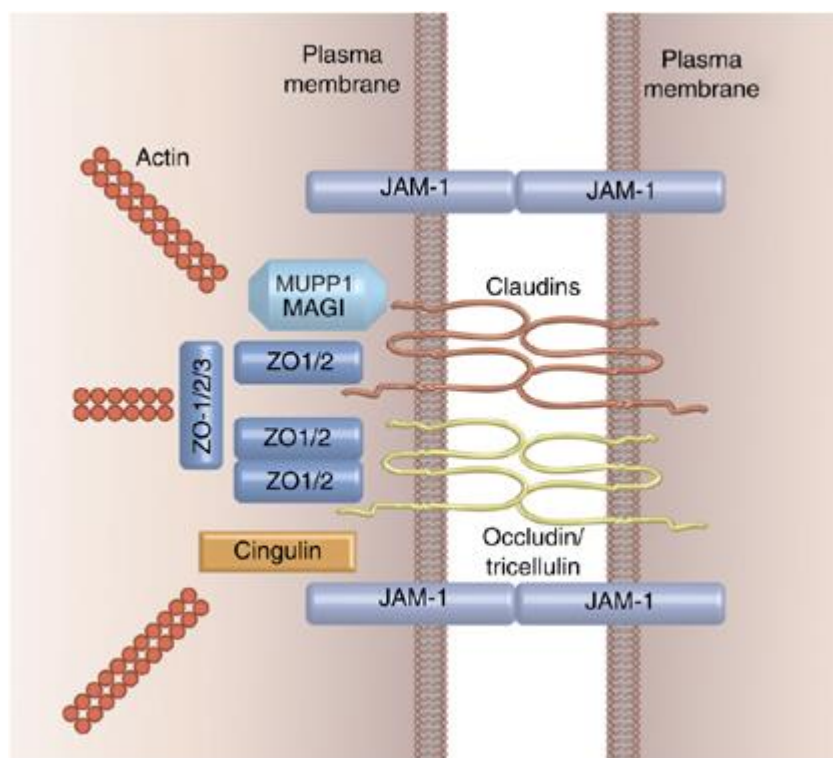
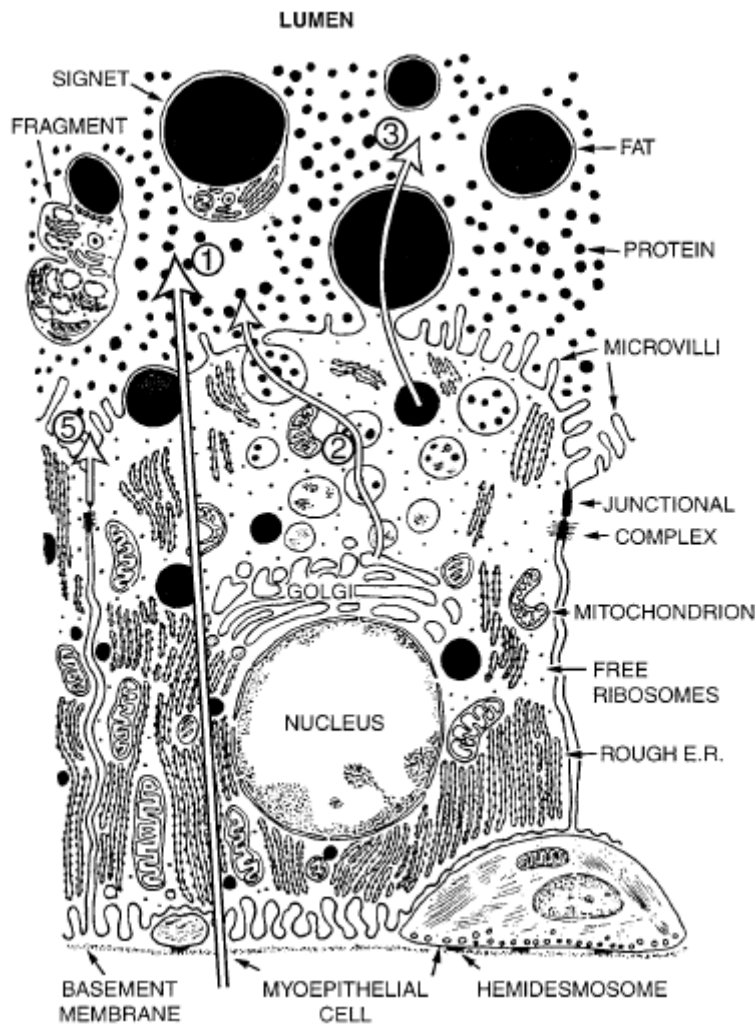


Fig. 2.3 Struttura e conformazione delle tight junctions e le sue interazioni con le proteine associate (C.M. Niessen, 2007).

2.3.2 Meccanismi di trasporto

Ci sono 5 vie principali di secrezione di sostanze attraverso la barriera emato-mammaria, 4 trans-cellulari e una paracellulare: 1) trasporto transmembrana, 2) trasporto attraverso l'apparato di Golgi, 3) trasporto attraverso globuli lipidici, 4) trasporto per transitosi e 5) trasporto paracellulare.

Nella via transmembrana, soluti come acqua, urea, glucosio, Na⁺, K⁺ e Cl⁻ attraversano la membrana cellulare apicale o basolaterale; nella seconda via le sostanze vengono trasportate o sequestrate nell'apparato di Golgi e secrete nel latte attraverso esocitosi: caseina, proteine, lattosio, citrato e calcio intraprendono tale percorso. Lipidi, ormoni liposolubili, farmaci e alcuni fattori di crescita sono invece vengono estrusi a livello dell'apice delle cellule secretrici, avvolti da una membrana lipidica. Nella transitosi, composti quali prolattina, transferrina e immunoglobuline sono trasportati attraverso



vescicole; infine, nella via paracellulare c'è passaggio diretto tra liquido interstiziale e latte (D.B. Shennan, 2000).

Fig. 2.4 Diagramma riassuntivo delle principali vie di secrezione attraverso l'epitelio mammario (D.B. Shennan, 2000).

2.3.2.1 Sodio, Potassio e cloro

Na^+ , K^+ e Cl^- sono presenti nel latte come ioni liberi in concentrazioni che variano tra quelle che si trovano nei fluidi extra- e intracellulari. Come in altre cellule epiteliali, la membrana basolaterale delle cellule epiteliali mammarie contiene pompe Na^+/K^+ che mantengono un'elevata concentrazione di K^+ e una bassa concentrazione di Na^+ all'interno delle cellule. La membrana apicale è permeabile ad entrambi gli ioni e quindi consente la diffusione tra il latte e il citosol. Come il liquido extracellulare, il latte ha un'osmolarità di circa 300 mosm/L e gli ioni inorganici monovalenti, insieme al lattosio, rappresentano le componenti osmotiche più importanti del latte e svolgono un ruolo importante nel determinare il volume di latte prodotto. Le concentrazioni di ioni e lattosio sono correlate negativamente e l'osmolarità combinata di queste due componenti è quasi costante (Sjaastad, 2013).

Ione	Latte	LEC	Citosol
Na ⁺	20	145	15
K ⁺	40	4	140
Cl ⁻	30	120	10

Tab. 2.3 Concentrazione degli ioni monovalenti (mmol/L) nel latte di vacca, nel liquido extracellulare (LEC) e nel citosol (Sjaastad, 2013).

2.3.2.2 Glucosio

La concentrazione di lattosio nel latte è di circa 50 g/L e viene sintetizzato a partire da glucosio e galattosio nell'apparato di Golgi da un complesso enzimatico chiamato lattosio sintetasi. In un ruminante in lattazione, quando la produzione di latte è alta, la mammella utilizza circa il 70-80% del glucosio totale disponibile, il 60-70% del quale viene utilizzato per formare lattosio (O.V. Sjaastad *et al.*, 2010) Da qui si capisce l'alta richiesta di glucosio da parte di quest'organo. Il trasporto attraverso la membrana plasmatica è portato avanti da 2 distinti processi: il primo mediato da una famiglia di *carrier* per il glucosio (GLUT) e il secondo mediato da co-trasportatori Na⁺/glucosio (SGLT). Il trasportatore predominante nella bovina è GLUT1 nonostante vengano espressi a diversi livelli anche GLUT3, GLUT4, GLUT5, GLUT8, GLUT12 e i co-trasportatori sodio-dipendenti SGLT1 e SGLT2. L'espressione della proteina GLUT1 diminuisce con l'andare della lattazione e diventa quasi non identificabile nella fase non-secerne (F.Q. Zhao, 2007).

2.3.2.3 Calcio

Il latte, come si sa, è molto ricco di calcio, la cui concentrazione è attorno ai 3mM. Proprio per questa sua alta concentrazione non è libero in soluzione ma legato a una serie di molecole tra cui: caseina, citrato, fosfato e bicarbonato, la cui funzionalità dipende dalla specie e dal pH del latte. La maggior parte, se non tutto il calcio viene trasportato nel latte tramite esocitosi in vescicole derivanti dall'apparato di Golgi dove un trasportatore ATPasi dipendente ne media il trasporto dal citoplasma. La natura di tali *carrier* non è ancora certa ma si è visto che l'espressione di PMCA2bw (*plasma membrane Ca²⁺-ATPase*) e SPCA (*Secretory Pathway Ca²⁺-ATPase*) aumenta notevolmente durante la lattazione (Neville, 2005).

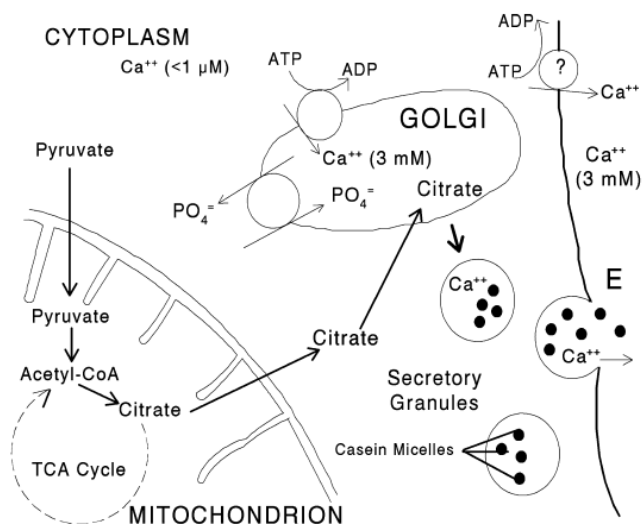


Fig. 2.5 Rappresentazione della via di secrezione del calcio nel latte (Neville, 2005).

2.3.2.4 Lipidi

Nel latte bovino 38 g/L sono composti da grassi. Due possibili meccanismi di trasporto conducono alla sua secrezione. Una prima via prevede la sintesi dei trigliceridi nel reticolo endoplasmatico liscio delle cellule alveolari partendo dai precursori degli acidi grassi e dal glicerolo. Una volta formati si fondono in goccioline di grandi dimensioni che si muovono verso la membrana apicale, protrudono nel lume alveolare e progressivamente vengono avvolte dalla membrana cellulare apicale separandosi così dalla cellula. Una seconda via implica invece un meccanismo di transitosi attraverso la membrana cellulare basale e apicale con il coinvolgimento di *carrier* che attivamente trasferiscono i composti da una parte all'altra della membrana.

I possibili trasportatori implicati fanno parte della superfamiglia delle *ATP-binding cassette* (ABC), che facilitano il trasferimento di composti come metaboliti, lipidi e farmaci attraverso la membrana cellulare tramite idrolisi di ATP (O. Mani, 2009).

2.3.2.5 Proteine e immunoglobuline

La ghiandola mammaria in fase di lattazione richiede un'enorme quantità di aminoacidi per sopperire alla sintesi proteica nel latte. Una vacca che produce 35 l di latte/giorno, contenente il 3,3% di proteine, necessita di più di 1 kg/giorno di aminoacidi per sostenere tale concentrazione proteica finale (D.B. Shennan, 2000). La maggior parte delle proteine del latte non viene prodotta al di fuori della ghiandola mammaria: mentre gli aminoacidi essenziali provengono dal sangue, le cellule epiteliali mammarie possono anche produrre quantità variabili di aminoacidi non essenziali tramite transaminazione. Le proteine vengono formate nel reticolo endoplasmatico rugoso delle cellule epiteliali e trasportate all'apparato di Golgi dove alcune vengono modificate

prima di essere trasferite alle vescicole secretorie e successivamente trasportate al lume alveolare tramite esocitosi.

Un tipo particolare di proteine, essenziali per il passaggio dell'immunità materna alla prole, sono le immunoglobuline. Il latte normale ne contiene basse concentrazioni mentre il colostro ne presenta in quantità molto elevata. Durante la produzione di quest'ultimo una delle immunoglobuline, l'IgG, viene trasportata attivamente dal sangue nelle cellule epiteliali per endocitosi e poi trasferita per esocitosi attraverso la membrana apicale del lume alveolare. L'IgA e l'IgM sono invece prodotte da cellule plasmatiche situate nel tessuto connettivo tra gli alveoli (V. Sjaastad, 2013).

2.3.3 Fattori che alterano la permeabilità della barriera emato- mammaria

Numerosi sono i fattori che contribuiscono ad alterare la permeabilità della barriera emato-mammaria. Riconosciamo meccanismi fisiologici quali: lattogenesi, lattazione e fine lattazione; meccanismi endocrini mediati da sostanze come glucocorticoidi, prolattina, progesterone, serotonina, cortisolo; e processi infiammatori della ghiandola mammaria (mastiti).

2.3.3.1 Periodo produttivo (lattogenesi, lattazione e fine lattazione)

Lattogenesi

Come già detto, con il termine lattogenesi intendiamo l'inizio della secrezione latte, quando le cellule epiteliali mammarie si differenziano in cellule secernenti attive.

Prima del parto possiamo identificare dei cambiamenti nella composizione dei fluidi intramammary che risultano caratterizzati dalla presenza di componenti del latte misti a derivati del sangue. Rispetto al vero e proprio latte contengono più proteine, sodio e cloro, ma contengono meno lattosio e potassio. Questo periodo viene definito lattogenesi I (D.D. Nguyen, 1998).

Nel periodo immediatamente prima del parto, invece, le secrezioni mammarie cominciano a cambiare e si ha una produzione abbondante di vero e proprio latte.

Questo cambiamento può essere attribuito alle *tight junctions* che, a seguito della caduta dei livelli di progesterone, passano dall'essere permeabili durante la lattogenesi I all'essere impermeabili durante la lattogenesi II, favorendo quindi l'inizio della colostrogenesi e permettendo l'instaurarsi di un potenziale elettrico, nonché la polarizzazione dell'epitelio mammario.

Il colostro, detto anche “primo latte”, viene prodotto nei primi giorni dopo il parto ed è contraddistinto dall’averne un’alta concentrazione di immunoglobuline, fondamentali per il sistema immunitario del vitello.

Alcuni di questi fattori immunitari vengono sintetizzati all’interno della ghiandola mammaria, ma per la maggior parte derivano dal sangue e oltrepassano la barriera emato-mammaria via transcellulare o paracellulare. Per questo le TJ giocano un ruolo fondamentale nell’instaurarsi e nel mantenimento della composizione del colostro (K. Stelwagen, 2014).

Lattazione

L’integrità delle *tight junctions* è fondamentale per l’inizio della lattazione, nonché per mantenere attiva la sintesi del latte e la sua secrezione.

A supporto di questo sono stati condotti diversi esperimenti che prevedevano la distruzione delle giunzioni occludenti in animali in lattazione. È stato possibile effettuare questo *in vivo* grazie al fatto che il mantenimento di un livello adeguato di calcio extra-cellulare è necessario al mantenimento dell’integrità delle TJ. Di conseguenza, a questi animali è stato somministrato un chelante del calcio (EGTA) a livello intramammario; a seguito di ciò è stato riscontrato un immediato aumento di permeabilità dell’epitelio e un calo nella produzione di latte (Stelwagen *et al.*, 1995).

Cambiamenti della permeabilità delle TJ si possono osservare anche a seguito dell’accumulo di latte nella ghiandola mammaria. La secrezione di latte durante la lattazione è un processo continuo. Normalmente il latte viene rimosso periodicamente dalla ghiandola grazie all’azione del vitello oppure grazie alla mungitura. Se questo non avviene e il latte si accumula all’interno della mammella, la permeabilità delle giunzioni occludenti aumenta dopo sole 18-21 ore. Questi cambiamenti comportano la diminuzione del flusso di sangue alla ghiandola mammaria e una diminuzione della sintesi lattea (K. Stelwagen, 2014). È stato dimostrato infatti che effettuare una sola mungitura al giorno comporta una diminuzione del 28-38% di montata lattea rispetto a due mungiture giornaliere (D.D. Nguyen, 1998).

Tale calo sembra essere sotto il controllo di fattori locali che diventano dominanti nel momento in cui il latte non viene più rimosso dalla mammella. Questo accumulo aumenta gradualmente la pressione endomammaria e la concentrazione nel latte di una proteina detta “inibitore a feedback della lattazione” (*feedback inhibitor of lactation*, FIL), sintetizzata dalle cellule mammarie, che inibisce la sintesi del latte. La mungitura

rimuove questo fattore e, quando la mammella non viene svuotata, le concentrazioni crescenti di FIL nel latte alveolare riducono la secrezione, coadiuvando in tal modo il meccanismo che riduce la sintesi del latte indotto dalla diminuzione del flusso sanguigno lungo i capillari che circondano gli alveoli (V. Sjaastad, 2013).

Fine lattazione

Con l'interruzione della rimozione del latte attraverso la mungitura si ha un accumulo dello stesso nella mammella e una diminuzione della sua sintesi e secrezione da parte delle cellule secernenti per arrivare infine all'involutione ghiandolare e apoptosi.

Nelle bovine la fine della lattazione comporta una *down-regulation* del segnale di sopravvivenza cellulare e l'adesione focale di chinasi a livello dell'interfaccia MEC-ECM. Inoltre, le comunicazioni tra cellule sembrano essere compromesse durante l'involutione mammaria dato l'aumento di permeabilità a livello paracellulare. Questo processo pare essere associato a una diminuzione dell'espressione delle proteine che vanno a formare le *tight junctions* (come occludine e ZO-1) e a un iniziale aumento e successiva diminuzione dell'espressione della proteina claudina-1. Dato il ruolo protettivo delle claudine nelle giunzioni serrate, il loro transitorio aumento d'espressione potrebbe significare un iniziale tentativo di salvaguardia dell'integrità delle TJ ma, data la progressione del processo di involuzione, alla fine vanno incontro a una down-regulation.

La diminuzione dell'espressione delle occludine invece sembra essere in linea con il loro presunto ruolo nell'inizio del processo di apoptosi e morte cellulare della ghiandola mammaria.

Infine, la down-regulation delle proteine ZO-1 suggerisce una conseguente alterazione nella comunicazione delle TJ con il resto della cellula. Nonostante questi cambiamenti nell'espressione delle *tight junctions* siano legati agli eventi iniziali dell'involutione mammaria, non è ancora chiaro se possano costituire la causa vera e propria di tale processo (K. Stelwagen, 2014).

2.3.3.2 Fattori ormonali

Prolattina

La prolattina è un ormone peptidico che viene secreto dall'ipofisi anteriore e il cui ruolo principale è la regolazione della sintesi e la secrezione di latte. Sembra però che questo ormone abbia anche un ruolo nella regolazione della permeabilità delle *tight junctions*.

Normalmente, all'inizio del periodo di asciutta, la permeabilità delle tight junctions aumenta consentendo quindi un maggior passaggio di sostanze attraverso la barriera emato-mammaria. Un'indicazione di questo fenomeno è data dal cambiamento nelle concentrazioni di Na e K nelle secrezioni mammarie e dalla presenza di lattosio nel plasma. Tra gli altri, la fine della lattazione è indotta anche da cambiamenti nella secrezione degli ormoni galattopoietici. La prolattina, il cui rilascio è indotto dalla mungitura, è dimostrato avere un ruolo nella regolazione dell'attività delle cellule mioepiteliali e del loro turnover. L'inibizione di questo ormone tramite l'utilizzo di cabergolina, agonista dei recettori D2 dopaminergici, si è visto accelerare il processo di rimodellamento della ghiandola mammaria e quindi la sua involuzione, comportando quindi un conseguente cambiamento nella composizione del latte. Tale rilevamento ci suggerisce un ruolo attivo di questo ormone nella regolazione dell'integrità delle tight junctions e della barriera emato-mammaria di conseguenza (Boutinaud *et al.*, 2017).

Ossitocina

L'ossitocina è un ormone peptidico secreto dall'ipofisi posteriore per effetto della mungitura e necessario per il mantenimento della lattazione. Il rilascio di questo ormone provoca la contrazione delle cellule a canestro mioepiteliali che circondano l'alveolo mammario provocandone quindi lo svuotamento; per questo motivo viene generalmente usata come strumento per la rimozione del latte dalla mammella.

Trattamenti con ossitocina – soprattutto se somministrata in dosi massive – possono però comportare cambiamenti nella composizione del latte coincidente a un aumento di permeabilità delle *tight junctions*. Questo effetto è stato osservato non solo in bovine ma anche in conigli, ratti e capre.

Il modo in cui tale ormone modifichi la permeabilità della barriera emato-mammaria non è del tutto noto. Il fatto che i recettori per l'ossitocina si trovino a livello delle cellule mioepiteliali ma non su quelle epiteliali, dove sono presenti le *tight junctions*, suggerisce un meccanismo d'azione indiretto: il cambiamento nella forma delle cellule alveolari epiteliali causato dalla contrazione delle cellule mioepiteliali potrebbe innescare una via di segnalazione cellulare modificante sia le giunzioni occludenti che la secrezione latte (D.D. Nguyen, 1998).

Glucocorticoidi

I glucocorticoidi sono una classe di ormoni steroidei prodotti dalle ghiandole surrenali.

Le *tight junctions* sono normalmente sotto il controllo di diversi ormoni ed esperimenti sia *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato, in particolare, l'importanza dei glucocorticoidi nel mantenimento e nella funzione delle giunzioni a livello mammario. In uno di questi studi (K.S. Zettl, 1992) l'aggiunta di desametasone (un glucocorticoide sintetico) a culture cellulari mammarie determinava una significativa riduzione della permeabilità e un rafforzamento della funzione di barriera delle TJ. Anche esperimenti (Thompson, 1996) *in vivo*, con l'iniezione locale di cortisolo in capre a fine gravidanza, produceva un decremento di sodio e un aumento nelle concentrazioni di potassio nel latte secreto successivamente (D.D. Nguyen, 1998).

Tale effetto dei glucocorticoidi sembra essere legato a una *up-regulation* delle occludine e delle proteine ZO-1 costituenti le *tight junctions*, provocandone la chiusura (K. Stelwagen, 2014).

2.3.3.3 Stato infiammatorio: mastite

La barriera emato-mammaria, come già spiegato, ha la funzione di prevenire un incontrollato passaggio di sostanze da sangue e latte e quindi ha lo scopo di mantenere un gradiente osmotico in grado di attirare l'acqua nelle secrezioni mammarie.

Durante un processo infiammatorio – quale può essere un fenomeno mastitico – la permeabilità di tale barriera è notevolmente aumentata e ciò comporta il passaggio di costituenti del sangue nel latte e viceversa. Di conseguenza la composizione di tale latte sarà considerevolmente diversa rispetto al latte normale: oltre a un aumento di cellule somatiche (SCC), possono essere identificati altri componenti del sangue quali albumina sierica o anticorpi IgG2. Tutto ciò causa un inevitabile riduzione della qualità del latte (O. Wellnitz, 2016).

2.4 La mastite

Con il termine *mastite* ci si riferisce a un processo infiammatorio della ghiandola mammaria che rappresenta la patologia infettiva con i risvolti economici più rilevanti nell'allevamento della bovina da latte. Il danno economico è rappresentato per il 70% dalla riduzione della produzione di latte da parte delle bovine affette. Il processo infiammatorio in atto, inducendo fenomeni di necrosi e apoptosi, riduce infatti il numero e l'attività delle cellule e di conseguenza provoca una minore secrezione latte.

La mastite è principalmente dovuta all'invasione della ghiandola mammaria da parte di batteri ma può essere dovuta anche infezioni da micoplasmi, funghi e alghe (X. Zhao, 2008).

In questo senso possiamo classificare la patologia in base all'agente eziologico coinvolto. I batteri più frequenti sono *S. Aureus*, *Strept. Agalactiae* ed *E. Coli*, i quali possono essere distinti a loro volta in batteri ambientali o contagiosi.

I batteri ambientali (come *E. Coli*, *Klebsiella spp.*, Enterococchi, *Strept. Uberis* e *Strept. Dysgalactiae*) vivono e si replicano nell'ambiente di stabulazione delle bovine. La malattia compare quando aumenta il numero di batteri nell'ambiente o calano le capacità di difesa della bovina. In alcuni casi l'infezione può essere veicolata anche da insetti, come nel caso della mastite estiva.

Le mastiti contagiose, invece, sono causate da patogeni (come *S. Aureus*, *Strept. Agalactiae* e *Corynebacterium bovis*) in grado di sopravvivere esclusivamente o prevalentemente nella mammella. La via più frequente di trasmissione è quindi il latte della bovina infetta, nei quali sono presenti i batteri che determinano l'insorgenza della patologia.

Si comprende dunque che la patologia non solo è determinata dall'agente eziologico ma anche dallo stato immunitario dell'animale e dalle condizioni ambientali. A questo riguardo, i principali fattori di rischio a livello di allevamento riguardano principalmente l'igiene degli ambienti di stabulazione e dell'impianto di mungitura, la presenza di lesioni al capezzolo, l'età degli animali e le loro condizioni fisiche (Bradley, 2002).

2.4.1 Forme tipiche della mastite

La mastite può manifestarsi in tre forme principali: clinica, subclinica e cronica.

2.4.1.1 Mastite clinica

Le mastiti cliniche rappresentano circa il 5% delle mastiti nei focolai sporadici ma la loro prevalenza può arrivare anche al 50%. I germi penetrano nella ghiandola mammaria per via ascendente attraverso il capezzolo e raggiungono gli alveoli determinando un processo infiammatorio caratterizzato da una proliferazione granulomatosa dei dotti galattofori, una proliferazione connettivale inter e intralobulare, danno agli alveoli, sequestri e ascessi. La forma clinica si può presentare sia in forma catarrale che parenchimatosa.

La mastite catarrale può determinare una ripercussione sistemica con rialzo febbrile nelle prime 24 ore. Generalmente sono colpiti due quarti che si presentano aumentati di volume e alla palpazione si può percepire una consistenza pastosa e anelastica, un aumento della temperatura, leggera dolenzia con presenza di noduli di origine alveolare e linfonodi sopramammari ingrossati. Il secreto mammario risulta ridotto, di aspetto variabile, con possibili stralci di fibrina e materiale purulento.

La mastite parenchimatosa invece è caratterizzata dal giungere dei batteri per via ematica e da un esordio improvviso con gravi ripercussioni sistemiche e più quarti coinvolti. L'animale può presentare, a livello sistemico, una depressione del sensorio, atonia dei prestomaci e temperatura febbrile (41-42°C), mentre a livello mammario i quarti risulteranno aumentati di volume e dolenti, con attivazione soprattutto dei linfonodi sopramammari e precurali. Si verifica inoltre un arresto nella produzione di latte e si nota un secreto mammario sieroso/emorragico. La prognosi in questo caso è riservata e se l'animale riesce a sopravvivere sviluppa generalmente una forma cronica.

La mastite clinica può essere classificata, in base alla gravità, in: lieve, moderata e grave.

La forma lieve consiste unicamente in alterazioni del latte, mentre non si rilevano né sintomi a livello mammario né generali. Rappresenta circa il 60-90% dei casi di mastite clinica.

Nella forma moderata, invece, oltre ad alterazioni a carico del latte sono presenti anche segni di infiammazione della mammella. Rappresenta circa il 10-30% dei casi.

Infine la forma grave associa ai sintomi precedenti sintomi generali come febbre, anoressia, blocco ruminale e calo significativo della produzione. Costituisce il 5-20% delle mastiti cliniche.

2.4.1.2 Mastite subclinica

Le mastiti subcliniche sono molto difficili da determinare, in quanto il processo infiammatorio non raggiunge un'intensità tale da causare modificazioni macroscopicamente osservabili né a carico del latte, né della mammella né dell'animale stesso; tuttavia si ha una consistente diminuzione della produzione latte, associata ad alterazioni della sua composizione. Si può rilevare infatti un alto numero di cellule somatiche, un aumento della conducibilità e un incremento della carica batterica.

Queste modificazioni sono rilevabili solo attraverso esami di laboratorio e incidono principalmente sulle caratteristiche tecnologiche del latte, sulle qualità organolettiche e sanitarie.

Le mastiti subcliniche costituiscono una realtà particolarmente dannosa per l'allevamento della bovina da latte, proprio a causa dell'assenza di manifestazioni cliniche nell'animale e di modificazioni macroscopiche a carico del latte. Inoltre, il lungo tempo che intercorre tra l'insorgenza della patologia e la sua diagnosi consente una sua massiccia diffusione tra gli individui della mandria.

2.4.1.3 Mastite cronica

La mastite di tipo cronico è un'infezione mammaria persistente per più di 4 settimane e accompagnata da rialzo costante del contenuto cellulare. Oltre a ciò possiamo riscontrare alterazioni secretorie più o meno gravi e alterazioni anatomiche a carico del quarto mammario interessato.

Sul piano eziologico, quasi tutti gli agenti delle varie forme di mastite clinica e subclinica possono ritenersi responsabili anche di un'evoluzione in senso cronico della flogosi mammaria. Ciò dipende anche dalla tempestività della terapia adottata.

Alterazione del secreto, eventuale presenza di fiocchi e coaguli, riduzione quantitativa della produzione sono le più frequenti manifestazioni disfunzionali presenti. Sul piano anatomico i reperti possono risultare vari, dall'atrofia all'ipertrofia con o senza indurimento, alla presenza di noduli, specie a carico dei quarti posteriori, noduli che possono risultare in vario numero, grandezza e consistenza. In alcune forme si può anche giungere alla formazioni di ascessi multipli nel quarto colpito (situazione tipica delle mastiti croniche da *C. pyogenes*) (Sali, 1980). La forma cronica può saltuariamente dare origine a forme cliniche, per lo più moderate e lievi.

2.4.2 Diagnosi

Un miglioramento quali-quantitativo delle produzioni necessita, in primo luogo, di un'accurata indagine preventiva. Tuttavia, allo stato attuale gli strumenti diagnostici utilizzati non sono adeguati alla diagnosi precoce. Il problema è maggiormente sentito in caso di mastiti subcliniche che, molto spesso, sono riconosciute solo quando il danno economico è ormai irrecuperabile. La possibilità di affiancare ai tradizionali metodi microbiologici strumenti diagnostici innovativi, in grado di identificare in modo rapido, economico ed efficace i capi affetti da mastiti subcliniche (e quindi di valutare lo stato

sanitario degli animali in allevamento) e nello stesso tempo di riconoscere nel latte i patogeni responsabili dell'infezione, faciliterebbe la prevenzione e la cura delle mastiti garantirebbe allo stesso tempo un miglioramento quali-quantitativo delle produzioni (Palumbo, 2008).

Le tecniche qui descritte comprendono: la conta delle cellule somatiche, il *California Mastitis Test* (CMT), la rilevazione della conducibilità del latte, il rapporto tra linfociti B e linfociti T, l'utilizzo della citofluorimetria come metodo di valutazione della vitalità dei polimorfonucleati e di conta differenziale delle cellule infiammatorie presenti nel latte, la stima delle proteine di fase acuta.

2.4.2.1 Cellule somatiche e conta cellulare differenziale tramite citofluorimetria

La conta delle cellule somatiche nel latte è uno degli strumenti più comunemente usati come indicatore della salute della mammella. Tali cellule sono distinguibili in due gruppi: quelle di sfaldamento epiteliale che derivano direttamente dalla mammella in seguito al fisiologico logorio determinato dalla secrezione del latte e quelle del sistema immunitario rappresentate principalmente da leucociti polimorfonucleati (PMNs), linfociti, monociti e macrofagi derivanti dal circolo sanguigno. Il numero e la proporzione tra questi gruppi di cellule varia notevolmente in base alle condizioni fisiologiche e patologiche dell'animale.

L'infezione della ghiandola mammaria è senza dubbio la principale e più importante causa d'incremento della carica leucocitaria nel latte (Bertocchi, 1999).

In una bovina sana, le cellule presenti nel latte sono per il 66-88% macrofagi, con una scarsa presenza di neutrofili (1-11%), cellule epiteliali e mononucleate. Al sopraggiungere dell'infezione, si nota un incremento importante soprattutto della componente neutrofilica, che arriva al 90% e più (Pyörälä, 2003).

Questo fenomeno è dovuto al rilascio da parte di leucociti e cellule epiteliali di fattori chemiotattici (come citochine e proteine di fase acuta) che richiamano cellule della risposta immunitaria (soprattutto PMNs) nel sito dell'infezione.

Il loro compito è quello di distruggere i microrganismi tramite liberazione di granuli contenenti peptidi, proteine ed enzimi battericidi oltre che proteasi e agenti ossidanti.

Il rilascio di queste sostanze causa non solo la distruzione dei patogeni ma anche di una certa quantità di cellule epiteliali, risultando in una riduzione della secrezione lattea e nel rilascio di enzimi quali N-acetil- β -D-glucosaminidasi e lattato deidrogenasi (LDH).

Ultimata la loro azione, i PMNs vanno incontro ad apoptosi e degradazione da parte dei macrofagi.

La morte delle cellule somatiche, unita a quella dei leucociti, esita nella loro eliminazione attraverso il latte, comportando un notevole aumento delle cellule somatiche qui presenti (C. Viguier, 2009).

Convenzionalmente, un valore minore di 100,000 cells/mL è da considerarsi normale in un animale con una mammella sana. D'altra parte, se dalla conta cellulare si rileva un valore superiore alle 200,000 cells/mL, si può sospettare la presenza di un'infezione batterica (M. J. Green, 2008). Una cosa da tenere in considerazione è che, nonostante le più importanti variazioni di SCC siano dovute all'invasione di microrganismi, numerosi altri fattori possono variare il contenuto cellulare del latte.

Durante la lattazione, ad esempio, assistiamo a un incremento di SCC nelle prime due settimane dopo il parto, seguito da una diminuzione durante il secondo mese e un leggero incremento nella fase finale, accentuato se presente un'infezione batterica. (Lee).

La frequenza di mungitura è un altro fattore causante variabilità nella conta cellulare. Il passaggio da due a tre mungiture al giorno ha dimostrato chiaramente una diminuzione di SCC mentre un aumento dell'intervallo di mungitura (4 ore o meno) ha reso evidente l'effetto opposto (Pyörälä, 2003).

Anche la stagionalità è riportato essere un elemento da tenere in considerazione. In generale, a causa della maggiore esposizione ad eventuali patogeni (la cui crescita è favorita dalle condizioni climatiche), fenomeni di mastite sono più frequenti durante i periodi più caldi e umidi dell'anno. Inoltre, lo stress da caldo provato dagli animali risulta in una riduzione della capacità di fagocitosi dei neutrofili, provocando una minore capacità di far fronte all'infezione.

Variazioni non solo stagionali ma anche giornaliere sono significative: oltre a subire variazioni da un giorno all'altro (con fluttuazioni fino al 40%), una differenza si può riscontrare anche all'interno di una stessa giornata, con un più alto numero di cellule nelle ore serali rispetto al mattino.

Fondamentale è ricordare che ciascun quarto diventa infetto in maniera indipendente dagli altri. Quando la conta viene effettuata sul latte totale, è possibile che stati infettivi subclinici non vengano diagnosticati perché le SCC subiscono una riduzione dovuta alla diluizione con latte di quarti sani contenente poche cellule somatiche. Per questo

motivo, per un'accurata e precisa associazione quarto malato-SCC è necessario analizzare il latte di ciascun quarto separatamente (P.L. Ruegg, 2013).

Infine, età e gestione dell'allevamento sono altri due fattori importanti. All'aumentare della prima aumenta la probabilità di sviluppare infezioni e di conseguenza possiamo ritenere nella norma un aumento di cellule somatiche con l'andare del tempo. Per quanto riguarda la gestione degli animali in azienda, particolare attenzione va posta durante il periodo di asciutta. È stato dimostrato che animali con $SCC > 199,000$ prima di tale periodo presentano un rischio più elevato di sviluppare mastite nella lattazione successiva e che fattori quali ambiente e management giocano un ruolo chiave nello sviluppo di tale fenomeno. Di conseguenza, un'appropriata igiene e cura dell'animale in asciutta potrebbe evitare questa spiacevole conseguenza (M. J. Green, 2008).

Oltre ai fattori appena elencati, ci sono numerosi altri aspetti ancora sconosciuti che causano fluttuazioni nel numero di cellule somatiche presenti nel latte. A fronte di ciò sarebbe saggio da parte dell'allevatore effettuare un controllo periodico delle SCC e affiancare ulteriori analisi e metodi diagnostici in modo da avere un quadro completo di ciò che succede in allevamento e prendere le decisioni più appropriate.

Detto ciò, oltre a una valutazione della quantità di cellule somatiche, può risultare efficace una differenziazione di tali cellule. Per questo, la citofluorimetria è un processo che offre un metodo incredibilmente flessibile per la caratterizzazione di cellule in sospensione e permette di analizzare simultaneamente parametri fisici e caratteristiche di fluorescenza di molte migliaia di cellule ogni minuto.

In presenza di un fenomeno infiammatorio infatti giocano un ruolo importante nei meccanismi di difesa linfociti, macrofagi e polimorfonucleati (neutrofili), la cui concentrazione perciò cambia tra un animale sano e uno malato.

È stato visto che in una bovina sana la percentuale di linfociti varia tra il 14 e l'80%, quella dei macrofagi tra il 12 e il 46% mentre quella dei neutrofili tra il 6 e il 50%. In una bovina con mastite d'altro canto, il valore dei PMNL sale fino al 95%.

Se alla conta cellulare differenziale si correla il numero di cellule somatiche rilevate, si può notare un diverso comportamento tra le diverse popolazioni leucocitarie nonché tra i diversi cluster (D. Schwarz, 2011).

Nel caso dei linfociti, esiste una correlazione negativa tra la concentrazione leucocitaria e le cellule somatiche, nonché tra queste ultime e la percentuale di CD2+. D'altro canto, la correlazione tra CD21+ e SCC risulta essere positiva. Sulla base di questi due trend opposti, il rapporto CD2/CD21 risulta essere un valido indicatore della situazione

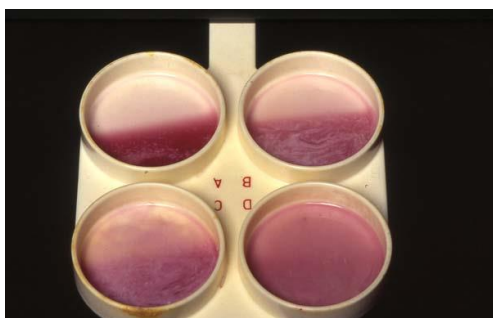
sanitaria della mammella: un indice $CD2/CD21 > 10$ è generalmente associato a un valore di $SCC < 100.000$ mentre, viceversa, un numero elevato di cellule somatiche (> 100.000) è legato a un rapporto $CD2/CD21 < 10$. (D. Schwarz A. R., 2013).

I neutrofili invece, come già detto, subiscono un aumento esponenziale con l'instaurarsi del processo infiammatorio e sono quindi positivamente correlati al valore di cellule somatiche. Oltre a ciò, con la citofluorimetria è possibile riconoscere la loro vitalità, distinguendo cellule vitali, apoptotiche e necrotiche. Tale classificazione potrebbe in parte spiegare la differenza tra le bovine nella risoluzione della patologia e la resistenza all'insorgenza di nuove infezioni (S. Piepers, 2009).

2.4.2.2 California Mastitis Test (CMT)

Il California Mastitis Test è uno strumento di screening rapido, semplice e poco costoso e per questo frequentemente usato negli allevamenti bovini.

Il campione di latte da esaminare (2-3 ml) viene depositato in una vaschetta apposita e a



questo viene aggiunto un uguale volume di reagente (alchil-laurilsolfato 3%, sodio idrato 1.5% e porpora bromocresolo come indicatore); la paletta viene ruotata per miscelare il contenuto. In circa 10 secondi si può eseguire la lettura del risultato. Il cambiamento nella

viscosità (da liquido a gelatinoso) e il viraggio del colore (da grigio a viola) della mistura di secreto e reagente vengono graduati come negativo, in tracce, oppure da dubbio a positivo (1+, 2+, 3+, 4+). Più alto è il grado di viscosità maggiore è la SCC del secreto mammario e quindi maggiore è il grado di infiammazione. In tal caso si forma un materiale gelatinoso o simil-mucoso. Il rivelatore di pH, inoltre, diventa viola scuro nel latte alcalino e dal marrone al giallo nel latte acido. Nel bovino la prova è: negativa (0) se la mescolanza latte-reagente rimane fluida e grigiastra; dubbia (1+) se si nota la comparsa di fragili coaguli che dopo breve tempo si sciolgono e la mescolanza assume un colore grigio violaceo; debolmente positiva (2+) se è presente un'accentuata formazione di coaguli e appare un colore grigio violetto; chiaramente positiva (3+) se vi è la formazione di una massa gelatinosa viola; fortemente positiva (4+) se tale massa gelatinosa è totale ed assume forma convessa non defluente nella vaschetta del test.

Nonostante si possa correlare l'esito del test a un valore presunto di cellule somatiche, è chiaro che l'interpretazione è soggettiva e la sensibilità bassa. Per questo non è

raccomandabile utilizzare unicamente questa prova per stabilire un eventuale diagnosi e trattamento ma affiancarlo ad altri metodi come ad esempio la coltura cellulare.

Sr. No.	Reading Aspect	Score		Interpretation of Infection	Related with the average cellular numeration (x 10 ³ /ml)
		Value	Cross		
1.	Consistency normal or Gray color	0	(0)	Absent	100
2.	Light gel disappearing after stirring or Purplish gray color	1	(+/-)	Infection risk by minor pathogenic	300
3.	Light persistent gel-crumbly filaments or Purple gray	2	(+)	Sub clinical mastitis	900
4.	Immediate thickening viscous cluster at the bottom of the well	3	(++)	Sub clinical mastitis	2700
5.	Thick gel consistency of egg white color dark purple	4	(+++)	Subclinical mastitis near the clinical expression	8100

Tab. 2.3 Interpretazione dei possibili risultati del CMT (Kathiriya *et al.*, 2014).

2.4.2.3 Esame colturale

Effettuare un esame colturale su un campione di latte di massa, individuale o per quarti contribuisce a dare un'immagine della situazione sanitaria del gruppo o dell'animale, permettendo l'identificazione dei fattori di rischio nell'allevamento e suggerendo all'allevatore le misure gestionali più appropriate in base al tipo di patogeno rilevato.

L'esame può essere effettuato su latte di massa o del singolo soggetto. Nel primo caso il test risulta più veloce e semplice e ci permette di conoscere l'eventuale presenza di un patogeno all'interno del gruppo in quel momento e, se ripetuto a intervalli di tempo, darci una panoramica dello stato sanitario dell'allevamento.

La sensibilità del test dipende dalla prevalenza d'infezione all'interno della mandria, dal numero e dal tipo di microrganismi (sensibilità del 90% per *Strept. Agalatae*, 75% per *Staph. Aureus* e 50% per *Mycoplasma spp.*).

Inoltre, l'inevitabile effetto diluizione dato dalla mescolanza di latte di animali diversi può costituire un problema nell'individuare la presenza di un microrganismo, soprattutto in gruppi particolarmente numerosi.

Questi problemi sono superati nel momento in cui l'esame viene effettuato sul singolo capo. In questo caso però, bisogna tenere in considerazione la probabilità di avere falsi negativi dovuti a: una scarsa eliminazione dell'agente (che quindi non viene rilevato dalle metodiche attualmente in uso), alla possibilità che le cellule somatiche abbiano fagocitato l'agente patogeno o che gli antibiotici abbiano soppresso la vitalità e coltivabilità dello stesso, a un prelievo non idoneo o a particolari condizioni di crescita richieste dal microrganismo per crescere in coltura.

Per questi motivi la sensibilità e la specificità di questo tipo di test sono attorno al 70%. Nel momento però in cui vengono effettuati campioni ripetuti dello stesso animale,

nonostante la sensibilità rimanga invariata, la specificità può crescere fino all'80-90%. Un'analisi ancora più accurata e precisa è data dall'associazione tra l'esame colturale e la conta di cellule somatiche presenti nel campione (Program).

2.4.2.4 Conducibilità elettrica del latte (EC)

Nel latte la conducibilità elettrica è determinata dalla concentrazione degli ioni Na⁺, K⁺ e Cl⁻ e in un animale sano varia tra 4.0 e 5.5 mS/cm. Nel momento in cui c'è un'infezione della ghiandola mammaria, la concentrazione di lattosio e K⁺ diminuisce mentre aumenta quella di Na⁺ e Cl⁻ a causa del cambiamento di permeabilità della barriera emato-mammaria. Il valore rilevato ha un'alta correlazione con il numero di cellule presenti nel latte ed esistono dispositivi per la misura della conducibilità elettrica associati ai robot di mungitura.

Purtroppo, la mastite non è l'unico fattore in grado di influenzare la concentrazione ionica del latte e questo è lo svantaggio maggiore nell'effettuare questo tipo di test diagnostico. La conducibilità può subire variazioni anche in base a età, razza, stadio di lattazione, temperatura del latte, percentuale di grasso e frequenza di mungitura.

Recentemente è stato anche analizzato l'effetto di diversi tipi di patogeni, evidenziando che quarti infetti da *S. aureus* e *Strept. agalactiae* risultano in una minore conducibilità rilevata rispetto a quarti infetti da patogeni ambientali.

Data la bassa sensibilità e specificità di questo test, è da considerarsi un test di screening a cui far seguire, in caso di positività, un'attenta valutazione dell'animale e altri metodi diagnostici complementari (Pyörälä, 2003).

2.4.2.5 Proteine di fase acuta (APP)

Le proteine di fase acuta (APP) sono un gruppo di proteine plasmatiche considerate componenti del sistema immunitario innato non specifico, la cui concentrazione è influenzata da infezioni, infiammazioni, traumi, stress e altro.

Un animale affetto da mastite può presentare livelli alti di alcune di queste proteine anche in assenza di cambiamenti macroscopici del latte e prima di eventuali manifestazioni cliniche della patologia. Nella bovina, le APP più sensibili sono l'aptoglobina (Hp) e la proteina siero amiloide A, le cui concentrazioni possono aumentare anche di 100 volte nel siero a seguito di un'infiammazione. La prima ha un ruolo fondamentale nel controllo dei processi infiammatori locali in quanto, avente conformazione molto simile all'emoglobina, ha la capacità di legarsi ad essa sottraendo

a batteri come E. Coli la possibilità di utilizzare il ferro e prevenendo la perossidazione dei lipidi. Anche la proteina siero amiloide (SAA) si è osservato aumentare in concomitanza d'inflammatione. A differenza però della Hp, è stata rilevata una sua produzione anche localizzata, a livello di ghiandola mammaria.

Per questi motivi, una loro misurazione nel latte può essere uno strumento utile per investigare la presenza o meno di mastite e rappresentare un possibile metodo di diagnosi precoce (S. Safi, 2009).

2.5 ¹H-NMR: analisi metabonomica

Come visto, numerosi sono i test diagnostici che possono essere utilizzati per la diagnosi della mastite.

Recentemente, l'utilizzo di una risonanza magnetica spettroscopica per l'analisi metabonomica, si è rivelato essere uno strumento utile e valido.

In analogia con il significato delle altre discipline "omiche" (genomica, proteomica, lipidomica, ...), la Metabolomica costituisce un approccio sperimentale che punta all'identificazione e quantificazione dei metaboliti presenti in una cellula, un tessuto, o un organismo. Essendo i metaboliti i composti a basso peso molecolare in ingresso e in uscita delle varie vie metaboliche, un'analisi del cosiddetto "metaboloma" permette di avere una visione d'assieme del bilancio metabolico di un sistema vivente, sia esso una cellula o un organo o un organismo nel suo complesso. Partendo dal principio che spesso un organismo risponde in modo complesso e spesso imprevedibile a stimoli che portano a stati patologici, inducendo, tra gli altri, perturbazioni nel suo metabolismo, la Metabonomica punta ad identificare la correlazione tra le variazioni metaboliche e le cause che le inducono, attraverso un'analisi comparata degli spettri metabolici tipici dello stato fisiologico e dello stato patologico specificamente indotto dalle cause patogene. Come settore specifico della Metabolomica, la Metabonomica si occupa delle differenze tra i profili metabolici presupponendo che i metaboliti prodotti da un organismo in uno stato patologico siano diversi, per individualità e/o concentrazione, rispetto a quelli prodotti dallo stesso organismo in condizioni fisiologiche. Su questa base, la Metabonomica si prefigge quindi di diagnosticare e modellizzare una specifica patologia a partire dal profilo metabolico. La mastite, nello specifico, oltre a causare un cambiamento nel profilo proteico (C.J. Hogarth, 2004), comporta un afflusso di diversi metaboliti nel latte. Non è chiaro se essi siano prodotti dai microrganismi invasori, dalle cellule del sistema immunitario, se sono il risultato di reazioni enzimatiche o vengano

trasferiti dal sangue a causa di un aumento della permeabilità della barriera emato-mammaria.

In ogni caso, questo fenomeno va ad alterare alcune delle proprietà del latte ed è dimostrato essere correlato a un aumento del numero di cellule somatiche.

Secondo la letteratura esistente (U.K. Sundekilde, 2013), se si confrontano i profili metabolici di due animali, uno con alto e uno con basso numero di cellule, si potranno notare delle differenze nelle concentrazioni di alcune sostanze, rappresentate da picchi di intensità e ampiezza diverse nello spettro ottenuto dalla risonanza.

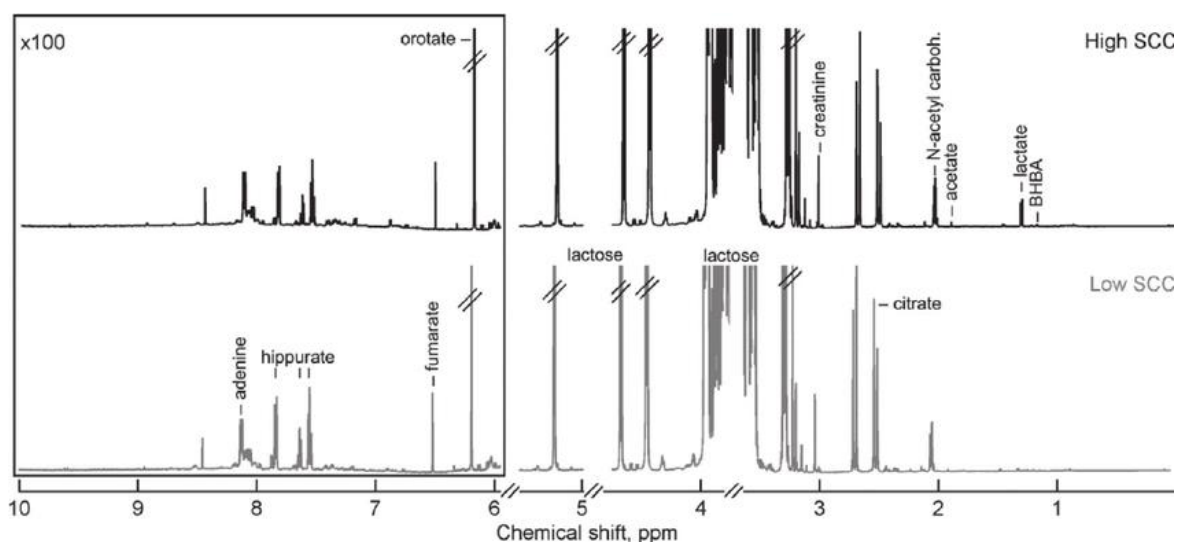


Fig. 2.6 Spettri relativi a due soggetti rispettivamente con alte e basse cellule somatiche (Sundekilde *et al.*, 2012).

In un soggetto con SCC elevata, si nota un aumento di butirrato, β -idrossi-butyrrato (BHBA), isoleucina, lattato e acetato. Di contro, lattosio, fumarato, ippurato e citrato sembrano diminuire. In animali sani invece, con basso numero di cellule somatiche, si verifica l'opposto. Oltre a questo aspetto puramente diagnostico, il profilo metabolico del latte può risultare utile nell'analisi di altri aspetti e patologie.

Una deviazione dalla media di acetone e β -idrossibutyrrato può far pensare ad un'alterazione dello stato metabolico dell'animale; il citrato, il gruppo degli N- acetil carboidrati, la lecitina e la trimetilammina possono essere degli indicatori della qualità del latte così come colina, carnitina, citrato e lattosio riflettono la sua capacità di coagulazione. Altri esempi delle applicazioni dell' $^1\text{H-NMR}$ riguardano la verifica e la garanzia della qualità e provenienza dei prodotti lattei: il suo uso è stato utile nel controllo e tracciabilità di mozzarelle di bufala italiane (P. Mazzei, 2012), nell'analisi dei componenti di latte in polvere per neonati e nell'identificazione di latte adulterato

con melammina (D.W. Lachenmeier, 2009) un composto usato per mimare un incremento nella concentrazione di proteine (U.K. Sundekilde L. L., 2013).

Come tutte le tecniche di analisi presenta vantaggi e svantaggi (Tab.2). Gli aspetti positivi sono: la relazione diretta tra il picco che identifica un metabolita e la sua concentrazione molare nel composto, il corto tempo di acquisizione, la possibile identificazione di nuovi composti, una minima preparazione del campione oltre alla capacità di replicazione dell'analisi in quanto tale tecnica non comporta una sua alterazione, l'identificazione di gran parte delle molecole organiche e alcune inorganiche e il fatto che si tratta di una tecnologia robusta e matura.

Di contro, oltre alla strumentazione particolarmente costosa, tale metodo pecca di sensibilità (tipicamente, alcune millimolarità o frazioni di millimolarità) e non permette l'identificazione di sali, ioni inorganici e composti non protonati. (Sundekilde, 2012).

Nonostante ciò, l'indagine metabonomica tramite risonanza rappresenta un campo di studio davvero promettente che può aiutare nella comprensione della fisiologia della ghiandola mammaria attraverso lo studio della sua attività metabolica e nell'identificazione di stati patologici dell'animale, come la mastite, rappresentando quindi un'importante risorsa e un potenziale strumento per una diagnosi più accurata e precisa.

Tecnica analitica	Vantaggi	Svantaggi
Spettroscopia tramite NMR	<ul style="list-style-type: none"> - Quantitativa (correlazione diretta con concentrazione molare) - Non-distruttiva - Breve tempo di acquisizione - Minima preparazione del campione - Identificazione di nuovi composti - Tecnologia robusta - Riproducibile - Compatibile con liquidi e solidi - Riconosce la maggior parte delle molecole organiche e alcune inorganiche 	<ul style="list-style-type: none"> - Costosa - Poco sensibile - Non riconosce i Sali e gli ioni inorganici - Non riconosce i composti non protonati

Tab. 2.4 Principali vantaggi e svantaggi dell'analisi tramite ^1H -NMR.

3. Principi teorici di NMR

La risonanza magnetica nucleare può essere definita come un fenomeno misurabile di assorbimento e successiva cessione di energia da parte dei nuclei atomici posti in un campo magnetico statico ed eccitati con radiazioni di radio frequenza.

3.1 Nuclei NMR attivi

I nuclei investigabili dall’NMR (cioè “NMR attivi”) sono quelli che hanno spin $\neq 0$. Lo spin (sia esso elettronico o nucleare) è una proprietà fondamentale della materia, come la massa o la carica elettrica. Ad esempio, nuclei con numero dispari di protoni e neutroni, oltre ad essere caratterizzati dalla loro massa e dalla loro carica, hanno anche la proprietà di essere dotati di spin (nucleare), che può essere visualizzato come un moto rotatorio del nucleo attorno al proprio asse. Un nucleo che ruota su se stesso (cioè un nucleo dotato di spin $\neq 0$) è una particella carica che ruota, cioè in movimento rotatorio con velocità angolare ω . Per la fisica classica, un corpo macroscopico che ruota con velocità angolare ω è dotato di quantità di moto angolare p :

$$\vec{p} = m \vec{\omega}$$

con m = massa del corpo, cui è associato un momento della quantità di moto angolare (“impulso” angolare) \vec{L} :

$$\vec{L} = \vec{r} \wedge \vec{p} = \vec{r} \wedge m \cdot \vec{\omega}$$
$$\left| \vec{L} \right| = r \cdot m \cdot \omega \cdot \sin \vartheta$$

dove \vec{r} è il vettore posizione del corpo (rispetto all’asse di rotazione). La direzione del momento \vec{L} è quella dell’asse di rotazione, e il verso è quello determinato dalla regola pratica del cacciavite. Per descrivere però il moto di un corpo microscopico, cioè di una particella elementare (come il nucleo) si deve ricorrere alle leggi della fisica quantistica, per le quali la quantità di moto e il momento della quantità di moto angolari sono entrambe quantizzate. Il movimento rotatorio dovuto allo spin nucleare è quindi caratterizzato dal momento della quantità di moto angolare quantizzata \vec{S} , il cui modulo è:

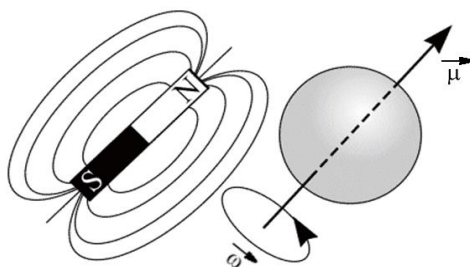
$$\left| \vec{S} \right| = \frac{h}{2\pi} \sqrt{I(I+1)} = \hbar \sqrt{I(I+1)}$$

dove I rappresenta il numero quantico di spin nucleare, e \hbar è la costante di Planck h , $6.62 \cdot 10^{-34}$ (J s), divisa per 2π (costante di Planck ridotta), con il fattore 2π che rende conto di un moto circolare, cioè di un momento angolare. I valori (quantizzati) che I può assumere dipendono dai valori del numero di massa A (protoni + neutroni) e del numero atomico Z (protoni), o meglio, dalla loro combinazione:

A	Z	I	PROTONI	NEUTRONI	I
Pari	Pari	0	Pari	Pari	0
Pari	Dispari	1, 2, 3, ...	Pari	Dispari	1/2, 3/2, 5/2, ...
Dispari	Pari	1/2, 3/2, 5/2, ...	Dispari	Pari	1/2, 3/2, 5/2, ...
Dispari	Dispari	1/2, 3/2, 5/2, ...	Dispari	Dispari	1, 2, 3, ...

In altre parole, in meccanica quantistica lo spin nucleare è rappresentato dal numero quantico di spin nucleare (I).

Ora, sia in fisica classica che in fisica quantistica, se il corpo o la particella in moto sono carichi elettricamente, alla carica in moto è sempre associato un campo magnetico, generato dal moto stesso della carica, e al momento angolare (\vec{L} per il corpo macroscopico, \vec{S} per la particella elementare) è associato un momento magnetico. Quindi, dato che i nuclei atomici sono particelle cariche, il loro moto angolare di spin genera un momento magnetico di spin $\vec{\mu}$ nella direzione dell'asse di rotazione



e, come il momento angolare di spin (\vec{S}), anche il momento magnetico di spin ($\vec{\mu}$) è quantizzato:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{S}$$

γ è definito “rapporto giromagnetico”:

$$\gamma = \frac{g_N \beta_N}{\hbar}$$

dove g_N è il fattore g nucleare, adimensionale, caratteristico del particolare nucleo e β_N è il magnetone nucleare di Bohr, $5.05 \cdot 10^{-27}$ (J T⁻¹).

Consideriamo ora un insieme di nuclei, dotati di spin (cioè nuclei con $I \neq 0$) in una certa regione di spazio. In assenza di un campo magnetico esterno, i momenti magnetici hanno orientazione casuale (random). Se si applica un campo magnetico esterno, i momenti magnetici μ hanno la tendenza ad allinearsi con il campo esterno. Questo succede perché quando si immerge un nucleo dotato di spin in un campo magnetico B_0 , momento magnetico μ del nucleo e campo magnetico interagiscono tra loro e l'interazione è un'interazione energetica, il cui valore è dato da:

$$E = \vec{B}_0 \cdot \vec{\mu} = |\vec{B}_0| \cdot |\vec{\mu}| \cdot \cos \mathcal{G}$$

con \mathcal{G} angolo compreso tra la direzione di B_0 e la direzione di μ . L'interazione energetica è tale che il campo B_0 tende ad allineare l'asse magnetico del nucleo al suo asse magnetico. In pratica, sul nucleo che ruota su sé stesso (spin) agisce una coppia di forze che lo fanno ruotare per allinearlo al campo magnetico esterno, con il risultato che il nucleo (continuando a ruotare su sé stesso) ruoterà anche attorno all'asse di B_0 con velocità angolare $\omega_0 = 2\pi \nu_0$, con ν_0 definita *frequenza di Larmor*, specifica per ogni nucleo. Si noti come ω_0 (velocità angolare di rotazione attorno all'asse di B_0) sia diverso da ω (velocità angolare di rotazione del nucleo su sé stesso), e come ω_0 e ν_0 , specifici per ogni nucleo, dipendano dal valore di B_0 (cambiando intensità di B_0 cambiano anche i valori di ω_0 e ν_0).

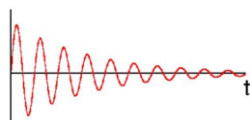
L'energia scambiata per allineare il momento magnetico μ al campo magnetico B_0 dipende quindi dalla loro mutua orientazione (angolo \mathcal{G}). Anche queste orientazioni sono quantizzate, e il numero di orientazioni possibili è dato da $2I + 1$. Ad esempio, per un nucleo con spin $I = 1/2$ (come il protone, ^1H o il carbonio ^{13}C), il numero di orientazioni permesse rispetto al campo magnetico esterno è 2, che vengono usualmente indicate come orientazione $+1/2$ e $-1/2$ (o anche, rispettivamente, "spin up" e "spin down"). La differenza energetica tra queste due possibili orientazioni è data da:

$$\Delta E = g_N \beta_N B_0 = \gamma \hbar B_0 = h \nu_0$$

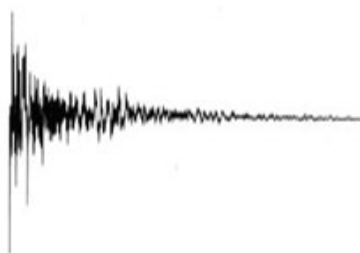
3.2 Spettroscopia NMR

Le spettroscopie (tutte) studiano l'interazione della radiazione elettromagnetica con la materia, e si basano sul postulato che tutti gli spettri siano originati da transizioni fra livelli energetici differenti, quantizzati, e caratteristici del sistema molecolare in esame. Queste transizioni avvengono con assorbimento, da parte del sistema in esame, di fotoni (= radiazioni elettromagnetiche) aventi frequenze caratteristiche, corrispondenti alla

differenza di energia tra i livelli energetici interessati dalla transizione. Riferendoci al fenomeno della risonanza magnetica nucleare, NMR, 2 possibili orientazioni degli spin nucleari corrispondono a 2 diversi livelli di energia dei nuclei, separati da una differenza di energia data da $\Delta E = h\nu_0$. La “differenziazione” (o separazione) energetica viene indotta, come appena visto, dalla presenza di un campo magnetico esterno B_0 e la transizione da un’orientazione ad un’altra, tra le $2I + 1$ disponibili, è possibile se al sistema viene fornita l’energia E corrispondente alla differenza di energia $\Delta E = h\nu_0$. Questa energia viene fornita irradiando il sistema di nuclei con un’onda elettromagnetica oscillante alla frequenza $\nu_1 = \nu_0$ (tale radiofrequenza, naturalmente, è specifica per i nuclei sui quali si vuol indurre transizione di spin nucleare, visto che la sua ν_1 dovrà essere uguale alla ν_0 , frequenza di *Larmor*, specifica per ogni nucleo). Durante l’irradiazione, e per tutta la sua durata, il sistema di nuclei continua ad assorbire energia e si trova in uno stato energetico eccitato, sottostando al fenomeno che va sotto il nome di inversione di spin (a rigor di termini, tale definizione è formalmente corretta solo per i nuclei con due sole orientazioni possibili, quali, ad esempio, il protone ^1H e il carbonio ^{13}C). Al termine dell’irradiazione, il sistema di nuclei rilassa emettendo l’energia precedentemente assorbita, emissione che avviene sotto forma di onda radio di frequenza ν_0 : tale onda radio emessa costituisce *il segnale NMR*, e viene quindi acquisita ed analizzata.

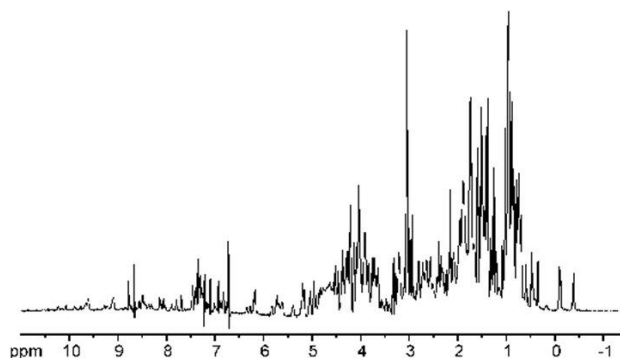


In un campione reale, in cui sono presenti molti nuclei diversi, il segnale NMR non è costituito da un’unica frequenza ν_0 ma da molte frequenze ν_{0i} specifiche per i vari nuclei presenti, ed il segnale NMR risulta quindi costituito da un involuppo molto complicato di radiofrequenze, che prende il nome di FID (Free Induction Decay), e che riporta la caduta esponenziale nel tempo dell’ampiezza di tutte le onde radio emesse dal campione:



L’analisi di tutte le frequenze ν_{0i} (contenute nell’involuppo di onde radio) per risalire all’identificazione e alla quantificazione dei nuclei presenti (e quindi delle molecole che

li contengono) risulta alquanto complicato. Per questo motivo si ricorre all'utilizzo di un algoritmo matematico, noto come *Trasformata di Fourier*, che consente di passare dallo spazio dei tempi allo spazio delle frequenze, e trasformare il segnale NMR in uno spettro che riporta l'intensità del segnale in funzione della frequenza: nel classico spettro NMR, i vari picchi corrispondono alle varie frequenze ν_{0i} rilevate, di area proporzionale alla concentrazione dei nuclei, riportati in funzione non delle frequenze assolute ma delle loro differenze in frequenza espresse in ppm rispetto ad uno standard.



4. Materiali e metodi

4.1 Raccolta dei campioni

Il lavoro di tesi ha avuto come oggetto l'analisi metabonomica tramite $^1\text{H-NMR}$ di campioni di latte bovino, ed ha focalizzato l'attenzione sulla ricerca di eventuali differenze osservate in quarti sani e quarti affetti da batteri causanti mastite. A questo proposito sono stati raccolti campioni di latte da animali clinicamente sani e da animali considerati affetti da infiammazione mammaria, scelti sulla base del numero di cellule somatiche presenti nel latte individuale il giorno precedente il prelievo e considerando l'andamento di tali cellule nella settimana precedente. I criteri di selezione sono descritti più sotto.

4.1.1 Azienda

I campioni di latte da analizzare sono stati prelevati presso l'azienda agricola "Arcobaleno" di Possamai Flavio e Maurizio, località Camalò di Povegliano (TV).

Questa realtà conta 300 capi totali tra Frisone Holstein e Pezzate Rosse, in stabulazione libera, di cui: circa 135 capi in lattazione, 25 capi in asciutta, 110 manze e 20 vitelli non svezzati.

La gestione sanitaria prevede monitoraggi annuali delle principali malattie infettive quali IBR, BVD, paratubercolosi e neospora risultando indenne per le prime tre e in fase di eradicazione per neospora.

Le vaccinazioni vengono effettuate regolarmente utilizzando il preparato commerciale *Bovilis Bovipast RSP*® contenente virus respiratorio sinciziale bovino inattivato, virus parainfluenzale 3 inattivato e *Pasteurella Haemolytica* inattivata. Tale preparato viene somministrato a tutti gli animali a 15 giorni di vita, con un richiamo dopo 28 giorni.

Nei capi in gravidanza invece, viene effettuata una vaccinazione per *E. Coli* k99, coronavirus e rotavirus tramite il prodotto commerciale Rotavec Corona®, somministrato dalle 5 alle 3 settimane prima del parto.

La struttura prevede l'ingresso delle bovine in sala parto appena iniziato il travaglio, dove permangono fino ai primi 4 giorni di lattazione per le manze e fino agli 8 giorni per le vacche. Qui vengono sottoposte a mungitura alla posta attraverso l'utilizzo di un carrello mobile. Superata questa fase entrano nel box di lattazione dove la mungitura viene effettuata dal robot di mungitura DeLaval VMSTTM.

4.1.2 Criterio di selezione dei soggetti

L'identificazione e la selezione dei capi è avvenuta sulla base della SCC e del periodo di lattazione. Il numero di cellule somatiche viene misurato dal robot di mungitura quotidianamente nel latte di tutti i quarti tramite il programma OCC DeLaval. Il sistema di misura consta di una fotocamera digitale in grado di raccogliere l'immagine dei nuclei delle cellule somatiche e di contarli uno ad uno. Il risultato viene poi inviato al software di gestione DelPro® 3.0.

Le bovine sono stati suddivisi "ex post" sulla base della conta delle cellule somatiche, curando di avere un adeguato numero di soggetti (N=16) con SCC < 100.000 cell/mL nei 7 giorni precedenti il prelievo. Un altro gruppo di animali (N=15) considerati affetti da infiammazione mammaria presentava valori di SCC \geq 280.000 cell/mL alla mungitura precedente. Una sola bovina risulta non compresa in nessuno dei due raggruppamenti, in quanto il giorno per prelievo non è stato possibile valutare l'esatto valore di cellule somatiche dei giorni precedenti, per mancanza del reagente necessario alla conta nel robot di mungitura.

Infine, per evitare di includere animali con conta alterata delle cellule somatiche dovuta a fattori differenti da infiammazione mammaria, sono stati arruolati animali tra 90 e 120 giorni di lattazione.

4.1.3 Metodo di prelievo dei campioni

I campioni di latte sono stati prelevati tra febbraio e luglio 2017 e la tecnica utilizzata prevede la mungitura manuale dell'animale e l'uso dei seguenti strumenti:

- Provette tipo Falcon® da 50 mL non sterili;
- Provette tipo Falcon® da 10 mL sterili;
- Guanti, alcol e carta.

Nel momento in cui l'animale entrava nel robot di mungitura, ciascun capezzolo è stato disinfettato con alcol e carta monouso per un totale di 3 passaggi ciascuno.

Dapprima si è proceduto a fare un prelievo sterile per ciascun quarto: dopo aver indossato i guanti ed eliminato i primi 3/4 getti di latte, è stata riempita una provetta Falcon® da 10 mL cercando di non contaminarne il tappo. Una volta scritti i dati dell'animale sul campione, è stata svolta la stessa procedura per i restanti quarti. Di seguito, sono state riempite 2 Falcon da 50 mL per ciascun capezzolo munto e 2

Falcon® da 50 mL di latte “totale”, rappresentato dal mix del secreto dei 4 quarti. Per questa procedura la sterilità non è necessaria.

4.2 Citofluorimetria

La citofluorimetria (o citometria a flusso) è una tecnica che consente di contare e misurare diverse caratteristiche di singole particelle all'interno di un flusso. Le cellule da studiare vengono marcate con uno o più anticorpi legati a un fluorocromo (sostanze colorate che assorbono la radiazione luminosa a una data lunghezza d'onda e la riemettono a una lunghezza d'onda maggiore). Un flusso di cellule marcate viene quindi diretto attraverso un fascio laser; la quantità di fluorescenza emessa e i pattern di dispersione della luce vengono registrati e analizzati da un computer che, sulla base di questi dati, genera istogrammi e grafici a dispersione dai quali è possibile identificare i tipi di cellule presenti (E. Viliers, 2017).

Protocollo utilizzato

La citofluorimetria è stata realizzata utilizzando un citometro Partec CyFlow® Space collegato a un computer contenente il software FlowMax® per la processazione dei dati. L'analisi è stata eseguita il giorno stesso del campionamento usando le seguenti soluzioni e Ab:

- Tampone fosfato salino 1 mM (Phosphate Buffered Saline 1X, PBS 1X): utilizzato per conservare le cellule durante la metodica o riportarle a volume
- RPMI+Azide+FBS: RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), l'azide serve per evitare che il complesso Ag-Ab non si internalizzi, polarizzi o distacchi, FBS (Fetal Bovine Serum) è usato come preservante per le cellule.
- PBS+Azide: per diluire gli anticorpi.

Dopo aver agitato il campione, sono state riempite due provette da centrifuga da 50 ml (Nest®) con 25 ml di latte ciascuna, aggiungendo un ugual volume di PBS 1X. Il composto è stato poi centrifugato a 1500 RPM, per 15 minuti a 4 °C. Terminata la centrifuga è stata aspirata la panna affiorata ed il surnatante. Il pellet rimasto sul fondo, dove risiede gran parte del contenuto cellulare del campione, viene sospeso con del PBS 1X oppure grazie al surnatante rimasto sul fondo delle provette. Una volta in sospensione, entrambi i pellet sono stati trasferiti all'interno di un'unica provetta da 15

ml (Nest®), aggiungendo in seguito 14 ml di PBS 1X e ricentrifugando con le precedenti modalità. Terminata la centrifugazione è stato eliminato il surnatante e risospeso il pellet aggiungendo RPMI+Azide+FBS ed agitando con il Vortex.

Per un campione scarsamente cellulare (informazione ottenuta dalla SCC) sono stati usati 500 µl di RPMI+Azide+FBS, mentre se un campione presentava alta cellularità è stato diluito con 1 ml della stessa soluzione. Infine, 50 µl della sospensione ottenuta vengono inseriti nel tubo da citofluorimetria dove sono già stati posti gli Ab coniugati con i fluorofori.

Questi infatti, parallelamente alla processazione dei campioni vengono diluiti con PBS+azide all'interno di microtubi Eppendorf® Safe-Lock da 1,5 ml come mostrato nella seguente tabella:

Anticorpo contro	Fluoroforo	Clone anticorpale	Tipo anticorpo	Specie di origine	Ditta produttrice	Diluizione utilizzata
CD11b	FITC	CC126	Monoclonale	topo	GeneTex®	1:100
CD14	PE	TÜK4	Monoclonale	topo	Abcam®	1:25
CD44	APC	IM7	Monoclonale	ratto	Invitrogen®	1:25
CD21	PE	LT21	Monoclonale	topo	GeneTex®	1:50
CD4	PE	CC8	Monoclonale	topo	GeneTex	1:50
CD8	Alexa Fluor® 647	CC63	Monoclonale	topo	AbD Serotec®	1:50

I tubi contenenti gli Ab puri di partenza e i microtubi Eppendorf® Safe-Lock con gli Ab diluiti vengono mantenuti in ghiaccio durante tutta la durata dei precedenti passaggi ed anche dei futuri. E' importante che entrambi vengano agitati prima di qualsiasi trasferimento per renderne omogenea la presenza all'interno della soluzione. In seguito vengono preparati 4 tubi da citofluorimetria al cui interno vengono posti 50 µl cadauno di Ab diluiti con le specifiche combinazioni:

1. Tubo senza anticorpi che conterrà la sospensione cellulare addizionata con 50 µl PBS+Azide (Cellule sole)
2. Tubo CD11b+CD14+CD44
3. Tubo CD21+CD44

4. Tubo CD4+CD8

Dopo aver aggiunto 50 µl di sospensione cellulare all'interno, tutti i tubi vengono incubati al buio per 20 minuti in frigorifero (4°C). Una volta terminata tale fase a ciascuno vengono aggiunti 500 µl di PBS 1X centrifugati a 1100 RPM per 10 minuti a 4 gradi. Una volta estratti dalla centrifuga e dopo aver eliminato il surnatante, ai tubi vengono addizionati 900 µl di PBS 1X ciascuno e la soluzione cellulare ottenuta è stata risospesa tramite agitazione manuale prima di inserire il campione nel sistema di dispensazione del citometro Partec CyFlow®. Tale apparecchio è munito di tre laser a diversa lunghezza d'onda: blu a 488 nm, UV a 375 nm, rosso a 638 nm. Una volta acceso e aperto il programma FloMax sul computer, si procede nel seguente modo:

1. Impostare il programma in base alla specie e tipo di campione accedendo alla voce "Instrument settings"
2. Creare il "Gate" appropriato nel primo grafico *side scatter/forward scatter*. Questo gate prende il nome R1, ed impostare 20.000 eventi in R1
3. Tutti gli altri grafici che appaiono sullo schermo vanno impostati affinché facciano vedere solo gli eventi presenti nel gate R1
4. La velocità di acquisizione può essere aumentata qualora il campione si riveli scarsamente cellulare.

Una volta terminate le analisi il circuito dei fluidi del citometro va lavato impostando un'alta velocità di acquisizione (fino a 10 volte superiore) e facendo acquisire due tubi di apposito detergente seguiti da due tubi di *sheat fluid*. Il livello del liquido del secondo tubo deve rimanere al di sopra del beccuccio di aspirazione del citometro ed il tubo va lasciato in situ. A seguito di ciò si chiude il programma, si spegne il computer e si lascia acceso solo il laser blu, spegnendo il citometro.

4.3 Antibiogramma

I campioni raccolti sterilmente dai singoli quarti di ciascun animale sono stati sottoposti ad analisi microbiologica e antibiogramma per l'identificazione di eventuali microrganismi patogeni. I campioni di latte sterile contenuti nelle Eppendorf® da 20 ml sono stati inviati presso il laboratorio Sanità allevamenti e Sicurezza Alimentare del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Milano, coordinato dal prof. Alfonso Zecconi.

Analisi microbiologiche e conta delle cellule somatiche

Una volta che i campioni hanno raggiunto la sede del DIMEVET, sono stati scongelati a temperatura ambiente.

Quindi la diagnosi microbiologica è stata svolta secondo le metodiche da tempo in uso presso i laboratori del Dipartimento, ovvero:

1. per ciascun quarto, semina di 10 μ l di latte per ogni quarto su agar-sangue;
2. incubazione a 37° C per 18 - 24 ore;
3. identificazione preliminare per via morfologica delle colonie sospette e loro isolamento;
4. Identificazione delle colonie sospette mediante sistema automatizzato VITEK™ (Biomérieux, F);
5. Sulle colonie così identificate è stata quindi valutata la minima concentrazione inibente mediante sistema automatizzato VITEK™ (Biomérieux, F).

4.4 ¹H-NMR

4.4.1 Pre-trattamento campioni

Una volta prelevati presso l'azienda agricola "Arcobaleno", i campioni di latte sono stati trasportati direttamente al laboratorio presso il Dipartimento di biomedicina comparata e alimentazione (BCA).

Qui, le Falcon® sterili da 20 ml sono state poste tal quali direttamente in frigorifero a -20°C e conservate fino a successiva spedizione.

Il latte contenuto nelle Falcon da 50 ml invece, sia dei singoli quarti che totale, è stato sottoposto a un primo trattamento.

Dopo leggera agitazione manuale, da ciascun campione sono state prelevate, con delle pipette di plastica da 3 ml, prima un'aliquota di 10 ml trasferita in provette da centrifuga e poi due aliquote trasferite in provette Eppendorf® da 2 ml ciascuna.

Queste ultime sono state poste subito a -20°C mentre il latte residuo contenuto nelle provette da 10 ml è stato centrifugato per 15 minuti a 4.000 g, a 4°C. Tale metodo permette che il grasso contenuto nel campione affiori e formi un "tappo" in superficie. Volendo eliminare tale parte lipidica dal campione finale da analizzare, con una pipetta è stato prelevato il liquido sottostante, facendo attenzione a non "contaminarlo" con il grasso, ottenendo così il cosiddetto *skim milk*.

Di questo, una frazione è stata trasferita in apposite provette di plastica da ultracentrifuga da 5 ml, mentre due aliquote da 2 ml ciascuna sono state poste in provette Eppendorf® e conservate a -20°C.

Il procedimento di ultracentrifugazione è stato realizzato utilizzando un' ultracentrifuga Beckman Coulter® Optima L 90K ed effettuando il seguente procedimento:

1. Bilanciamento dei campioni: utilizzando una bilancia a due piattelli si equilibra il peso di due provette da contrapporre poi in ultracentrifuga;
2. Inserimento di ciascuna provetta in un apposito portaprovette a inclinazione basculante fissato a un rotore SW 55 Ti;
3. Accensione dello strumento, apertura della camera di centrifugazione e inserimento del rotore;
4. Chiudere la camera e premere il tasto VACUUM per creare il vuoto al suo interno (fino ad arrivare a 750 micron di mercurio);
5. Impostare i parametri di tempo, giri e temperatura, ovvero: 30 minuti, 25.000 giri e 4°C;
6. Premere ENTER e attendere il tempo necessario;
7. Finito il processo, premere nuovamente VACUUM, aprire la camera di centrifugazione ed estrarre il rotore con le provette. A questo punto, con l'utilizzo di una pipetta Eppendorf®, sono state prelevate 5 aliquote di campione da 1 ml ciascuna, facendo attenzione a non aspirare il materiale depositatosi sul fondo. Ciascuna frazione è stata posta in Eppendorf® da 1,5 ml che sono poi state conservate a -80°C.

Sono stati ottenuti complessivamente 160 campioni, 5 per bovina (1 totale e 4 quarti), da 32 bovine (per l'elenco completo dei campioni si veda tabella 1, Appendice 1).

4.4.2 Trattamento dei campioni per NMR

L'analisi tramite ¹H-NMR dei campioni di latte è stata effettuata nei mesi di settembre e ottobre presso il Complesso Vallisneri, Dipartimento di Medicina Molecolare, sotto la supervisione del prof. Lucio Zennaro e della dott.ssa Paola Vanzani. Prima di ottenere il protocollo finale sono state effettuate diverse prove per riuscire ad identificare il procedimento più idoneo.

Da dati di letteratura (U.K. Sundekilde, 2012) è stata evidenziata una marcata differenza tra gli spettri NMR ottenuti da campioni di latte (skim milk) tal quale, centrifugato e filtrato dopo centrifugazione (figura 1). Come approccio preliminare si è voluto quindi verificare l'effettiva incidenza di questo fenomeno anche nei campioni di latte a nostra disposizione. A tal fine, dopo una prima centrifugazione a 14.000 rpm per 5 minuti a 4°C, un'aliquota da 1 ml di campione è stata suddivisa in 2 aliquote da 500 µl l'una, una da analizzare come campione tal quale centrifugato e l'altra da sottoporre a filtrazione. Quest'ultima è stata condotta usando dei Vivaspin[®] Sartorius da 500 µl, con taglio (*cut-off*) di 10 KDa.

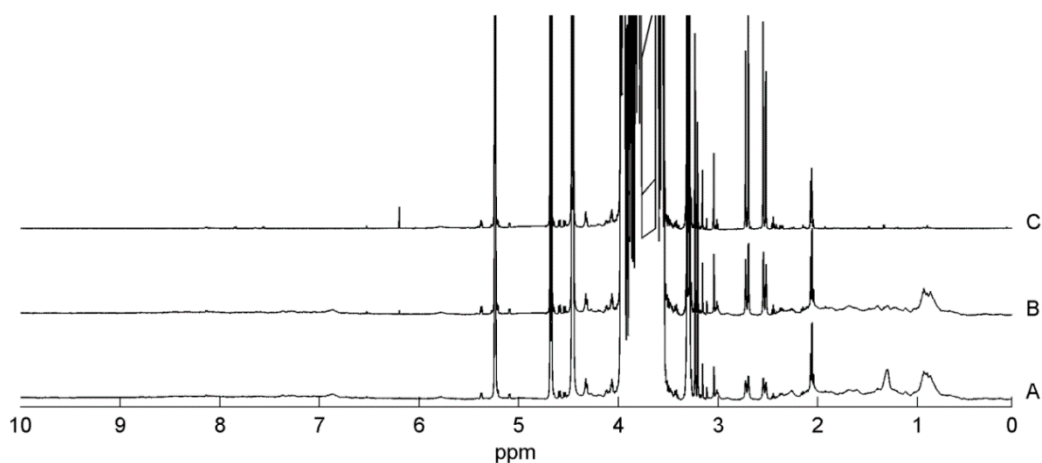


Fig. 3.1 Spettro ottenuto dall'analisi ¹H-NMR di un campione di latte: (A) *Skim milk*, (B) Campione sottoposto a centrifugazione, (C) campione filtrato. (Sundekilde *et al.*, 2012).

Prima però di introdurre nel Vivaspin[®] il campione da filtrare, al fine di eliminare residui di glicerina e sodio azide dalla membrana, sono stati fatti due lavaggi consecutivi del filtro caricando 500 µl di acqua milliQ ciascuno e centrifugando a 10.000 rpm per 2 minuti. Poi, una volta riempito il concentratore Vivaspin[®] con il campione, si è proceduto alla centrifugazione, sempre a 12.000 rpm, per 30 minuti. Terminata la centrifugazione, il contenitore con la membrana è stato rimosso ed eliminato, mentre la provetta contenente il latte filtrato è stata chiusa per venire successivamente analizzata all'NMR.

Al termine di queste operazioni, però, è stato notato che una temperatura di centrifugazione così bassa porta all'alterazione del campione, provocando un'aggregazione della frazione lipidica in esso contenuta, con il risultato di intasare parzialmente la membrana e ottenere una soluzione solo parzialmente filtrata e non omogenea.

Prendendo atto di questo fenomeno, l'intera procedura è stata ripetuta (su un'altra aliquota dello stesso campione), centrifugando questa volta il Vivaspin® a temperatura ambiente (22°C). Gli spettri NMR acquisiti per tali campioni di skin milk (centrifugato tal quale e centrifugato filtrato) hanno confermato la non idoneità del campione tal quale, dovuta alla presenza di larghe bande di segnale che oscurano un non trascurabile numero di picchi (figura 1, zona da 0.5 a 1.5 ppm, e da 6 a 7 ppm).

Prima dell'analisi NMR è stato quindi misurato il pH del latte. Il controllo del pH è molto importante negli studi di Metabonomica mediante ¹H-NMR: piccole variazioni di pH (anche di 1 o 2 punti decimali) comportano uno spostamento nella posizione di alcuni picchi dello spettro, in modo proporzionale o inversamente proporzionale alla variazione di pH. L'analisi statistica degli spettri NMR (vedi più avanti), che tratta simultaneamente l'intero set degli spettri acquisiti (ognuno sovrapposto agli altri), è tale che l'assoluta costanza di posizione spettrale di ogni picco è fondamentale per una corretta valutazione delle informazioni contenute negli spettri NMR.

È stato notato che, in seguito alla filtrazione, il pH dei campioni di latte si alza notevolmente (come si può notare dalla Tabella 3.2 per i campioni 26 e 41, utilizzati per queste valutazioni preliminari), forse per il minor contenuto in proteine che contribuiscono a tamponare il pH. Per questo motivo si è deciso di ricorrere alla preparazione di un buffer a pH 6.80, in modo da uniformare il pH finale di tutti i campioni.

Si è quindi preparato un tampone di potassio fosfato (K/Pi) 1M + NaN₃ 0.5 mMol, aggiungendo 34 g di potassio di-idrogeno fosfato (KH₂PO₄, composto acido) a 43,54 g di idrogeno fosfato di potassio (K₂HPO₄, composto basico). Dopo aver portato il pH a 6,80, sono stati aggiunti 0.078 g di sodio azide, NaN₃ (concentrazione finale 5 mMol), per la sua azione protettiva antibatterica.

L'efficacia del buffer è stata verificata il giorno seguente, sui campioni 26 e 41. Un'aliquota da 1 ml di ognuno di questi campioni è stata suddivisa in 2 aliquote da 500 µl, di cui solo 1 è stata filtrata in Vivaspin®. Misurando il pH prima e dopo l'aggiunta del buffer si è potuto notare come esso si uniformi (Tabella 3.2) nella soluzione finale. (Analogo risultato è stato ottenuto nel corso della preparazione di tutti i campioni analizzati, vedi tabella 2, Appendice 1).

N. Campione	pH tal quale	pH dopo Vivaspin [®]	pH dopo buffer
26	6.67	7.01	6.92
41	6.75	6.94	6.92

Tabella 3.2 Misure di pH del campione tal quale, dopo filtrazione con Vivaspin[®] e dopo aggiunta di buffer.

Protocollo finale

Il procedimento scelto in ultima analisi prevede sia una filtrazione del campione tramite Vivaspin[®] 500 µl sia l'aggiunta di un tampone K/Pi per stabilizzare il pH, secondo il seguente protocollo finale:

- Scongellamento a temperatura ambiente dei campioni di skim milk;
- Misurazione del pH del campione tal quale;
- Dopo due lavaggi con acqua milliQ per la pulizia della membrana, filtrazione a temperatura ambiente tramite Vivaspin[®] di 500 µl di campione, 12.000 rpm (circa 10.000 g) e 30 minuti;
- Misurazione del pH dopo filtrazione;
- Trasferimento di 460 µl di campione in eppendorf da 1.5 ml, quindi aggiunta di 170 µl di buffer K/Pi e 70 µl di soluzione di D₂O + TSP (l'acqua pesante, D₂O, al 10% nel campione finale, serve a mantenere accoppiati (*lock a deuterio*) frequenza di risonanza e campo magnetico, a fronte di eventuali microvariazioni o derive termiche del campo magnetico; il TSP, acido Trimetil Silil Propionico, è usato come standard interno di segnale a 0 ppm)
- Misurazione del pH finale (tabella 2, Appendice 1);
- Con una pipetta Eppendorf[®] 1000 µl trasferimento di 600 µl di campione in un tubo per NMR 535-PP (diametro 5 mm);
- Sgrassatura esterna del tubo con acetone prima di inserirlo nel magnete NMR.

Acquisizione degli spettri NMR

Tutti gli spettri ¹H-NMR sono stati acquisiti usando uno spettrometro Bruker Avance III, operante alla frequenza di Larmor per il protone di 300.13 MHz. È stato utilizzato un probe per ¹H – ¹³C per tubi di diametro esterno di 5 mm, equipaggiato con l'opzione per gradienti in Z. Per ogni campione di latte sono stati acquisiti due diversi spettri NMR monodimensionali (1D), e più precisamente uno spettro ottenuto inviando una

sequenza di impulsi $\pi/2$ NOESY con impulsi di gradiente Z e pre-saturazione dell'acqua (denominata "noesygppr1d" nella libreria di sequenze Bruker), ed uno spettro ottenuto inviando una sequenza di spin-eco Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) con pre-saturazione dell'acqua (denominata "cpmgpr" nella libreria di sequenze Bruker, e talvolta indicata come sequenza "T₂-edited"). La sequenza CPMG viene usata per attenuare i larghi segnali prodotti dalle macromolecole (ad esempio, le proteine) che possono essere presenti nei campioni, permettendo così di ottenere una miglior valutazione delle specie a basso peso molecolare (metaboliti), a fronte di una minor precisione nella determinazione delle concentrazioni delle molecole presenti, dovuta all'utilizzo di un filtro elettronico che attenua le risposte dei composti ad elevato tempo di rilassamento T₂ (da cui il nome T₂-edited), quali, appunto, le macromolecole. Il confronto tra gli spettri CPMG e NOESY non ha però evidenziato differenze significative tra le due modalità di acquisizione, probabilmente per il fatto che il trattamento dei campioni con centrifugazione e successiva filtrazione con Vivaspin[®] elimina comunque già in partenza buona parte delle macromolecole. Per questo motivo, e per il fatto che gli spettri NOESY permettono una più affidabile determinazione delle concentrazioni delle specie presenti, nonostante per tutti i campioni siano sempre stati acquisiti entrambi i tipi di spettro, per le elaborazioni statistiche e l'analisi dei dati sono stati usati i soli spettri NOESY.

La pre-saturazione per la soppressione del picco dell'acqua è stata ottimizzata usando una sequenza standard di impulsi $\pi/2$ ("zgpr" nella libreria di sequenze Bruker). Tutti gli spettri (sia NOESY sia CPMG) sono stati acquisiti con 64 scansioni, 32K punti di FID, una ampiezza spettrale di 20 ppm, 4 dummy scan e un tempo di rilassamento di 5 secondi. Tutti gli spettri sono stati processati con un allargamento di riga di 0.3 Hz prima di procedere alla trasformata di Fourier. Sia l'acquisizione che la processazione degli spettri sono state ottenute usando il software Bruker TopSpin versione 3.5. La posizione di picchi nella scala spettrale è stata calibrata internamente usando il picco a 0 ppm dello standard TSP. Tutti gli esperimenti NMR sono stati condotti alla temperatura costante controllata di 310 K, con una stabilizzazione della temperatura di circa 0.1 K. Per la stabilizzazione della temperatura dei campioni, prima di procedere all'acquisizione degli spettri si è sempre lasciato trascorrere un tempo di 5 minuti dall'inserimento del campione all'interno del magnete.

4.5 Analisi dei dati ed elaborazione statistica

4.5.1 Elaborazione dei dati citofluorimetrici

Utilizzando il programma FlowMax®, che analizza i dati del citometro, si è riusciti ad ottenere le percentuali riguardanti le sottopopolazioni leucocitarie. Una volta aperto il programma e visualizzato il campione da elaborare ci si trova di fronte ad una schermata suddivisa in otto quadranti, ciascuno dei quali contenente un grafico differente vedi fig. . Il numero di quadranti può essere reimpostato a piacere, come le grandezze presenti in ascissa/ordinata ed il tipo di diagramma (dot-plot, istogrammi ed isodensitometrici). Nel nostro caso il primo grafico in alto a sinistra è rappresentato attraverso un dot-plot con in ascissa la grandezza (FSC), che ci riporta informazioni riguardanti la grandezza delle popolazioni cellulari, mentre in ordinata troviamo la grandezza (SSC), che indaga la complessità e lobularità intrinseca della cellula. Avvalendosi di queste due grandezze si possono già evidenziare le diverse sottopopolazioni leucocitarie e racchiuderle nell'insieme R_1 , che rappresenterà il gate di riferimento all'interno del quale si studierà la positività delle cellule agli Ab marcatori. Nel grafico SCC/FSC (Fig. 4.2) localizziamo la maggior parte dei granulociti nel primo terzo dell'ascissa (FSC), poiché caratterizzati da medie-piccole dimensioni, e nella parte medio-alta dell'ordinata (SSC), in quanto il loro nucleo e citoplasma riservano un' elevata complessità, soprattutto se attivi. I macrofagi si ritrovano invece sotto i granulociti sull'ordinata (nucleo tondeggiante, ma abbondante citoplasma vacuolizzato), ma spostati più a destra sull'ascissa grazie alla loro dimensione (Fig. 4.2). Infine i linfociti, scarsi di complessità interna (poco citoplasma con nucleo tondeggiante) e di medie dimensioni, sono a metà dell'ascissa nella parte più bassa del piano cartesiano (Fig. 4.2).

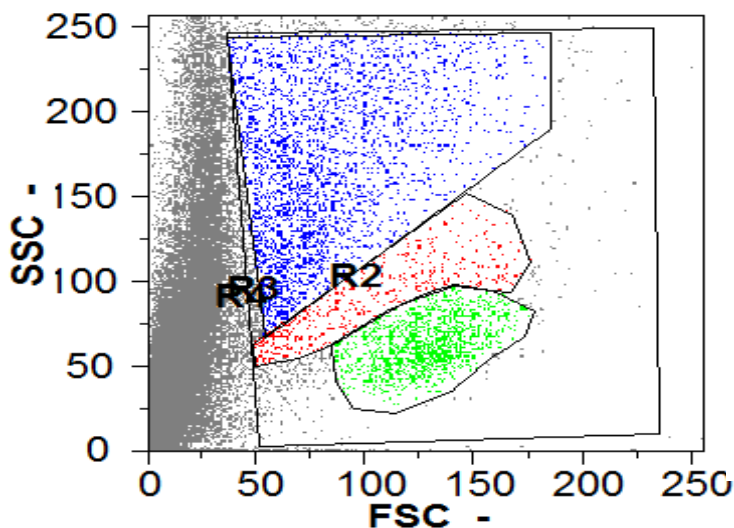


Fig. 4.2 Citogramma SCC/FSC: l'insieme identificato con il colore blu rappresenta i granulociti, l'insieme rosso i macrofagi e l'insieme verde i linfociti.

Altre rappresentazioni possono evidenziare la percentuale di positività di una data popolazione leucocitaria, presente all'interno del gate R_1 , agli anticorpi marcatori e per questo sono state impostate sull'asse x le fluorescenze desiderate (FL_1, FL_2, FL_4, FL_5). Il canale di fluorescenza da leggere è stato deciso in base alla lunghezza d'onda d'eccitazione del marcatore che si deve andare a legare alla popolazione cellulare d'interesse. Gli anticorpi marcatori usati in contemporanea sono stati abbinati in modo che le lunghezze d'onda d'eccitazione si sovrapponevano il meno possibile le une alle altre, confondendo così le popolazioni cellulari. La grandezza impostata sull'asse delle y è sempre la SSC. In particolare, con questo tipo di grafico, si è studiata la percentuale di positività al CD44 in FL_5 come mostrato nella figura (Figura 4.3). La stessa tipologia di grafico è stata usata per studiare la popolazione dei linfociti B (CD21 in FL_2)

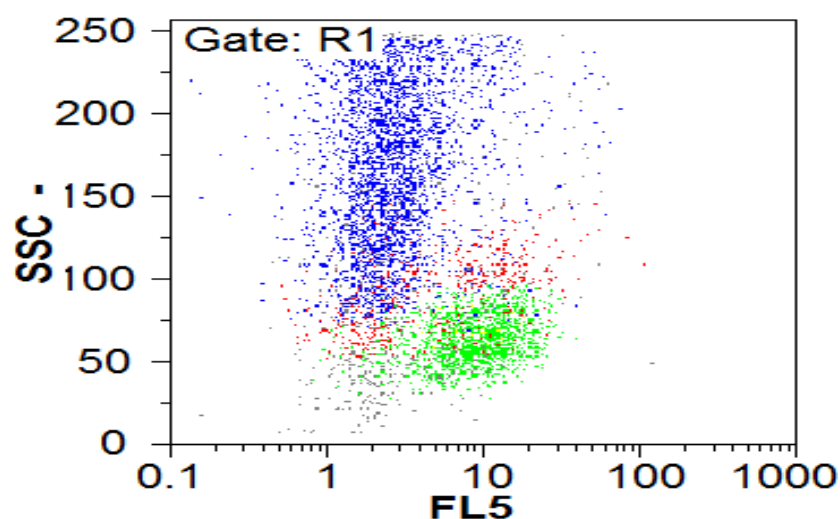


Fig. 4.3 I colori con cui erano state precedentemente evidenziate le popolazioni leucocitarie si ritrovano in questo grafico. Tutti gli eventi contati con un'emissione di luce in FL_5 , e quindi la positività a CD44, rappresentano l'intera popolazione leucocitaria all'interno del gate R_1 (ricordiamo che il CD44 è un *marker* per tutti i leucociti).

L'ultimo modello di grafico è stato impostato con una fluorescenza per l'ordinata ed un'altra per l'ascissa, ed è stato sottoposto ad un processo di compensazione. I fluorofori utilizzati infatti non hanno lunghezze d'onda puntiformi, bensì intervalli d'emissione e d'assorbimento che vanno a sconfinare l'uno nell'altro. Può capitare, ad esempio, che cellule a cui si sono legati Ab coniugati con FITC e PE possano essere lette come emettitrici di luce sia in FL_1 sia in FL_2 . In questo caso la procedura di compensazione esclude tali cellule dalla conta differenziale. Le popolazioni leucocitarie per le quali ci siamo avvalsi della compensazione al fine di studiarle sono le seguenti: CD11+/CD14+ e CD4+/CD8 (Fig. 4.4). I dati ottenuti dall'analisi citofluorimetrica sono espressi in

percentuale rispetto all'insieme R_1 di studio, ovvero la percentuale di una data sottopopolazione leucocitaria rispetto al totale dei leucociti presenti nel campione.

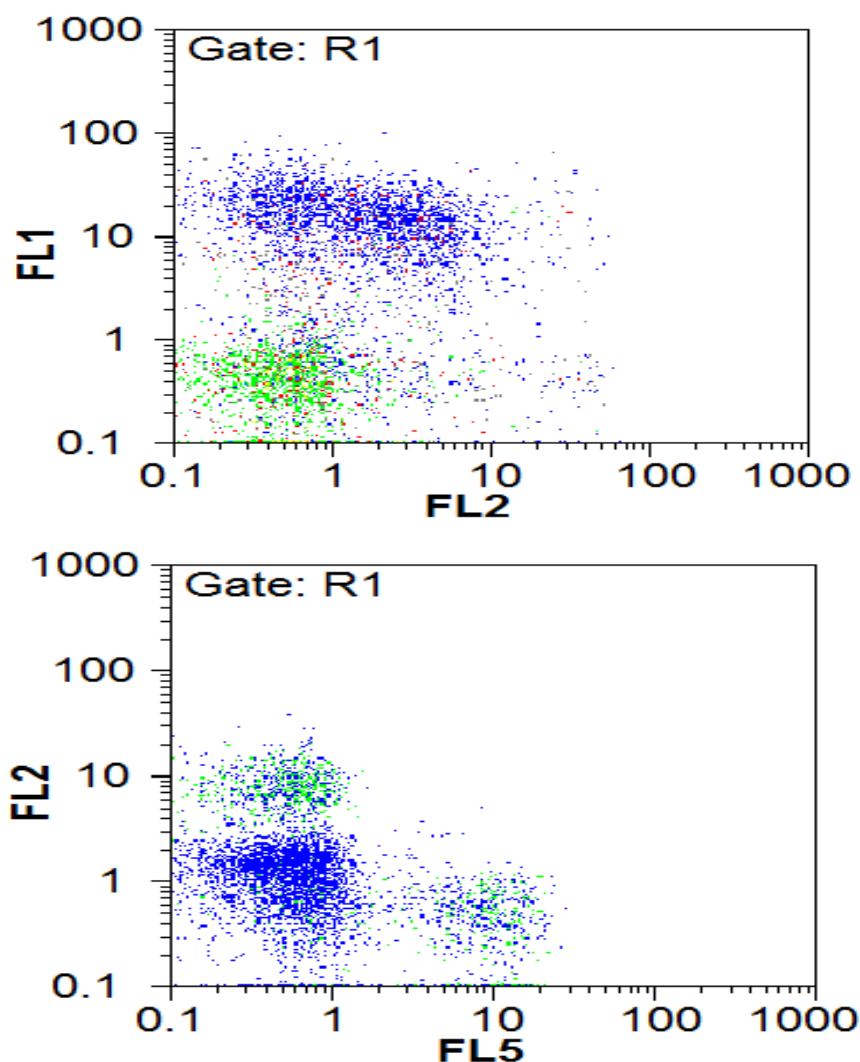


Fig. 4.4 Il grafico FL1/FL2 evidenzia gli eventi CD11+/CD14⁻, ovvero i neutrofili, e gli eventi CD11+/CD14⁺, ovvero i macrofagi. Il secondo grafico rappresenta gli eventi CD8⁺ in FL5 (linfociti T citotossici) ed eventi CD4⁺ in FL2 (linfociti T helper).

4.5.2 Criteri di classificazione dei campioni

I risultati ottenuti mediante l'analisi $^1\text{H-NMR}$ sono stati inizialmente classificati in tre gruppi sulla base della SCC del latte [SCC basso ($\text{SCC} \leq 100.000$ cc/ml); b) SCC intermedio ($200.000 < \text{SCC} \leq 650.000$ cc/ml); c) SCC elevato ($\text{SCC} > 650.000$ cc/ml)]. Inoltre, sono stati analizzati utilizzando la distribuzione percentuale delle popolazioni leucocitaria (CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺, CD44⁺, CD11⁺ e CD14⁺), la conducibilità del latte e gli esiti dell'analisi microbiologica quali criteri di classificazione, come riportato nella tabella 4.4.

Criterio di Classificazione	Gruppo “Basso”	Gruppo “Intermedio”	Gruppo “Elevato”
CD4+	% ≤ 2.08	2.08 > % ≥ 4.12	% > 4.12
CD8+	% ≤ 2.23	2.23 > % ≥ 5.09	% > 5.09
CD11+	% ≤ 5.04	5.04 > % ≥ 18.04	% > 18.04
CD14+	% ≤ 4.49	4.49 > % ≥ 11.27	% > 11.27
CD21+	% ≤ 0.55	0.55 > % ≥ 1.05	% > 1.05
CD44+	% ≤ 30.59	30.59 > % ≥ 56.48	% > 56.48
Conducibilità	mS/cm ≤ 4.40	4.40 > mS/cm ≥ 4.70	mS/cm > 4.70
Analisi Microbiologica	Sterile	NRS	Patogeni

Tabella 4.4 Criteri di classificazione in base alle popolazioni leucocitarie, alla conducibilità del latte e all'analisi microbiologica. I gruppi, numericamente omogenei, sono stati definiti in base alla suddivisione in terzili ottenuta mediante la funzione “Frequencies” del software SPSS 24.0. La classificazione in base all'analisi microbiologica ha considerato l'esito della diagnosi, come emessa dal laboratorio di riferimento. Sterile = campione privo di contaminazione; NRS= Nessun Reperto Significativo; Patogeni = presenza di almeno un microrganismo patogeno.

I metodi di classificazione dei campioni sono stati confrontati mediante tabelle di contingenza, utilizzando il coefficiente di contingenza (SPSS 24.0). Il coefficiente di contingenza è una statistica che descrive il livello di associazione tra due variabili nominali. Il valore è compreso tra 0 (nessuna associazione) e 1 (elevato livello di associazione). La concordanza tra due indicatori di condizione infiammatoria (MNR vs. citofluorimetria combinata a batteriologia) è stata studiata mediante la statistica K di Cohen. Un valore di K pari ad 1 indica una concordanza perfetta; un valore pari a 0 indica che non esiste concordanza tra i valutatori, e che eventuali risultati simili sono da imputarsi al caso.

4.5.3 Analisi statistica dei dati ottenuti dall'analisi ¹H-NMR

L'approccio metabonomico generalmente utilizzato è il cosiddetto approccio “*untargeted*”, cioè un approccio sperimentale che punta non all'identificazione di specifici metaboliti quanto piuttosto alla produzione di mappe di gruppi di metaboliti che permettano di separare, cioè di classificare in modelli diversi, uno stato fisiologico rispetto ad uno stato patologico, traendo ragione di ciò dal fatto che uno stato patologico è il risultato di un processo multifattoriale, che non dipende cioè da una o poche variabili indipendenti fra loro con effetti tipici dovuti ad ogni singola variabile, ma da un complesso di moltissime variabili indipendenti con effetti sinergici interconnessi. Per questa intrinseca complessità di analisi delle informazioni interconnesse contenute nei dati sperimentali, e per l'elevata numerosità dei campioni che è necessario valutare,

l'analisi dei risultati sperimentali deve necessariamente essere condotta su base statistica, e più precisamente non facendo uso della tradizionale statistica monovariata (almeno, non solo) quanto della statistica multivariata.

Tra le varie tecniche di analisi statistica multivariata (PCA, PLS, LCA, LDA, PCR, HCA), in ambito NMR quelle che si sono dimostrate più utili, con risultati statisticamente robusti, sono la PCA (*Principal Components Analysis*) e la PLS-DA (*Partial Least Square fitting – Discriminant Analysis*)

I dati di input per queste due tecniche statistiche (come d'altro canto anche per le altre tecniche multivariate) sono costituiti da una tabella (denominata “*bucket table*”) costruita a partire dai valori sperimentali che costituiscono lo spettro NMR: l'intero spettro NMR viene suddiviso in intervalli rettangolari (operazione di “*bucketing*”), e l'area di ogni intervallo (*bucket*) costituisce il dato che viene collocato in una cella della tabella; l'insieme dei *bucket* di uno spettro va a popolare un'intera riga della *bucket table*, riga che così altro non è che la rappresentazione numerica dell'intero profilo dello spettro NMR considerato. Considerando molti spettri NMR (generalmente uno per campione) si vanno a popolare più righe (una per spettro), che così compongono la suddetta *bucket table*.

L'analisi PCA è usata per cercar di capire se nell'insieme di spettri considerati tutti gli spettri sono simili l'uno all'altro o se alcuni di questi non lo sono, e per rilevare fenomeni e trend collegandoli alle variabili originali (cioè ai *bucket*, ai picchi degli spettri NMR).

Con l'analisi PLS (che viene effettuata sempre sulla stessa *bucket table* creata per l'analisi PCA) si cercano le correlazioni tra i dati contenuti nella *bucket table* e i dati contenuti in una seconda tabella, costruita dal ricercatore inserendo altri dati sperimentali (pH, temperatura, densità,, età,) e/o non sperimentali (maschio/femmina, sano/malato, biondo/moro, occhi chiari/occhi scuri,...). Nel secondo caso, quando cioè nella seconda tabella non si inseriscono dati sperimentali ma “categorie”, la PLS prende il nome di PLS-DA, cioè PLS – *Discriminant Analysis*.

Ciò sta a significare che:

- La PCA è un'analisi statistica fatta “alla cieca”, intendendo con ciò che il sistema non sa – ad esempio - quali sono i campioni sani e quelli malati. I diversi colori nei grafici della PCA non sono “assegnati” dall'analisi statistica, ma sono assegnati dall'operatore solo per riconoscere quali sono quegli spettri

che lui ritiene sani o malati, e vedere se gli spettri di un colore sono effettivamente diversi statisticamente dagli spettri di un altro colore:

- La PLS-DA va invece a vedere quanto i dati sperimentali (gli spettri) sono effettivamente correlati statisticamente con la separazione (maschi/femmine, sani/malati) che l'operatore ha assegnato a priori ai vari spettri.

L'idea principale dell'uso della PCA è quello di andare a scoprire dei trend in un insieme di spettri (ad esempio, la separazione degli spettri in 2 gruppi) che non sarebbero ovvi o evidenti osservando semplicemente l'aspetto degli spettri (o, come si dice in termini più tecnici, lavorando nello "spazio spettroscopico", cioè nello spazio in cui si riportano le frequenze (in Hz o in ppm) contro l'intensità del segnale NMR, cioè contro l'intensità dei picchi).

In questo senso, la *bucket table* è costruita con dati che insistono nello spazio spettroscopico (le cui coordinate per ogni riga sono appunto $x = \text{ppm} = \text{ampiezza del bucket}$ e $y = \text{intensità spettrale}$), e le sue variabili (cioè i dati inseriti nelle celle della tabella) sono i valori dei *bucket* (cioè l'area del rettangolino in cui viene diviso lo spettro).

L'analisi PCA (che lavora sui dati contenuti nella *bucket table*) implica un cambio di coordinate, per passare dallo spazio 2D spettroscopico ad un altro spazio 2D, in cui le variabili non sono più i valori dei *bucket* ma i valori delle componenti principali, PC, della varianza. In altre parole, l'analisi PCA va a calcolare la varianza dei valori spettrali contenuti nella *bucket table*, e costruisce una nuova tabella in cui ogni riga contiene la varianza dei dati di una riga della *bucket table*. Ogni riga di questa nuova tabella è suddivisa in tante celle quante sono le componenti principali PC che costituiscono, nel loro insieme, la varianza totale della riga della *bucket table* (cioè di un singolo spettro NMR). Ogni componente principale (PC) ha un peso diverso nella composizione della varianza totale, con la PC1 che ha il peso maggiore tra tutte le PC, poi viene la PC2, poi la PC3 e così via. Nel complesso, quindi, l'analisi PCA costruisce una tabella in cui ogni riga contiene tutte le PC calcolate per ogni singolo spettro, e ogni colonna contiene i valori di una stessa PC di ogni spettro (ad esempio, la colonna 1 contiene la PC1 di ogni spettro, la colonna 2 la PC2 di ogni spettro, e così via).

I risultati dell'analisi PCA si ottengono sotto forma di grafici, i cui punti sono i valori delle varie PC per ogni *bucket* di ogni spettro, e vengono rappresentati in sottospazi 2D, cioè in spazi di PC a due a due (es.: PC1 vs PC2, PC1 vs PC3, PC2 vs PC3, ...).

Questi grafici prendono il nome di grafico o PLOT degli SCORES, in cui ogni score, cioè ogni punto, rappresenta uno spettro (ogni punto o score ha coordinate, ad esempio, $x=PC1$, $y=PC2$).

In questi plot, spettri raggruppati vicini tra loro sono spettri simili, spettri che si allontanano dagli altri (*outlier*) sono spettri diversi dagli altri. Se quindi i plot degli scores separano gli spettri in 2 gruppi distinti, allora gli spettri sono costituiti effettivamente da due famiglie diverse di spettri.

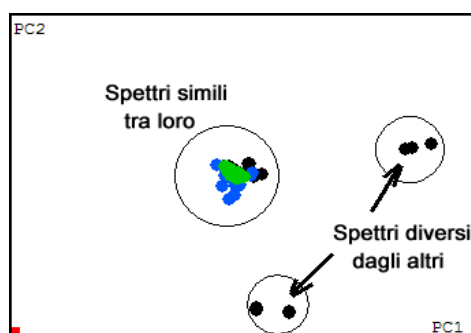


Fig. 4.5 Esempio di Plot degli scores

La relazione tra le variabili nel nuovo spazio delle componenti principali (cioè tra i punti dei plot degli *scores*) e lo spazio spettroscopico originale è dato dai valori dei cosiddetti “*loadings*”, rappresentati nei grafici o plot dei *Loadings*. Anche questi *Loadings* sono riportati nei sottospazi 2D delle componenti principali, cioè sono punti di coordinate $PC_i - PC_j$, e ogni punto nel grafico dei *loadings* rappresenta un *bucket* (cioè un intervallo spettrale, in ppm).

Dallo studio del grafico dei *loadings* risulta evidente quanto i vari *buckets* contribuiscono alla costruzione del nuovo spazio delle componenti principali. *Bucket* raggruppati vicini tra loro nel plot dei *loadings* hanno poco peso nel determinare la varianza, cioè le differenze o trend riscontrati nel corrispondente plot degli *scores*. I *bucket* che nel grafico dei *loadings* si allontanano dal “gruppone” degli altri bucket sono quelli che sono maggiormente responsabili per le separazioni che si osservano nel corrispondente plot degli *scores*.

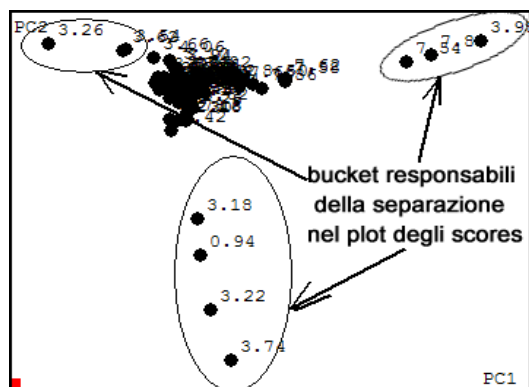


Figura 4.6 Esempio di Plot dei *Loadings*

Quindi, il plot dei *Loadings* costituisce il link tra l'interpretazione statistica e l'interpretazione spettroscopica, cioè va a correlare quali sono le zone spettrali che sono responsabili della (eventuale) differenza statistica tra gruppi di spettri.

5. Risultati e discussione

5.1 Condizione sanitaria dei soggetti

Le bovine, come già visto, sono state inizialmente scelte sulla base del contenuto di cellule somatiche (SCC) nel latte; classificando come “sane” i capi che avevano $SCC < 100.000$ e come “malate” i capi con $SCC \geq 200.000$ cellule/mL. Ricordando che tale stima viene effettuata sul latte totale e non sui singoli quarti, questa iniziale suddivisione (immediata e utile in campo al momento della scelta degli animali) non può essere applicata in maniera precisa nella distinzione tra quarti sani e quarti malati.

Tenendo conto di questo, per giungere a una più appropriata classificazione, i campioni ottenuti da ciascun quarto sono stati analizzati anche utilizzando la distribuzione percentuale delle popolazioni leucocitarie (CD4+, CD8+, CD21+, CD44+, CD11+ e CD14+), la conducibilità elettrica del latte e gli esiti dell’analisi microbiologica quali criteri di classificazione (vedi tabella 4.4).

Nel tentativo di ottenere un più preciso profilo sanitario dei singoli quarti, è stato elaborato un metodo di classificazione che rispondesse ai seguenti criteri, a prescindere dal contenuto di SCC misurato nel latte dei quattro quarti:

1. Un quarto viene definito “sano” se il contenuto di CD11b < 18% (primo e secondo terzile) e il campione è risultato sterile o classificato come NRS (Nessun Reperto Significativo).
2. Un quarto viene definito “malato” se il contenuto di CD11b $\geq 18\%$ (terzo terzile) e/o dal campione sono stati isolati batteri patogeni.

La scelta di utilizzare la % di CD11b (ovvero di granulociti neutrofili) e l’esito dell’antibiogramma come criteri distintivi è giustificabile dal fatto che: i primi risultano essere il tipo prevalente di cellule somatiche che aumentano in condizioni di mastite (Pyörälä, 2003) mentre la presenza del patogeno isolato è un evidente indice di infezione (Sordillo, 1997) che ci aiuta a identificare anche quei casi in cui il contenuto di cellule somatiche (e quindi di neutrofili) nel latte non è ancora elevato.

Utilizzando questo metodo di classificazione, basato sulla combinazione della percentuale di CD11b e la presenza di batteri patogeni, sono stati individuati 70 quarti mammari “sani” e 43 quarti mammari “malati”. Tra questi, in 5 casi (11,6%) la percentuale di CD11b era inferiore al 17%, ma dai quarti erano stati isolati microrganismi patogeni. Inoltre, 11 quarti “malati” sono stati identificati in animali con $SCC < 100.000$ cellule/ml (25,6%). Questi due casi, in cui la risposta immunitaria e

quindi il richiamo di cellule infiammatorie probabilmente deve ancora avvenire (risultando in SCC %CD11 bassi), sono da ritenersi molto interessanti in quanto presuppongono una diagnosi precoce dell'infezione.

5.2 Risultati Metabonomica tramite $^1\text{H-NMR}$

Sono stati acquisiti complessivamente 392 spettri $^1\text{H-NMR}$ da 155 campioni di latte bovino (28 totali e 127 quarti, prelevati da 32 bovine), 196 usando la sequenza NOESY e 196 la sequenza CPMG. Data la non significativa differenza evidenziata dagli spettri CPMG rispetto agli spettri NOESY, e considerando la maggior affidabilità degli spettri NOESY nella determinazione delle concentrazioni delle specie presenti, solo gli spettri NOESY sono stati sottoposti all'analisi statistica multivariata, per estrarne le informazioni differenziali di profilo metabolico tra lo stato sano e lo stato infiammatorio (mastite) delle bovine esaminate. In figura 5.1-NMR1 è riportato un esempio dei tipici spettri NOESY ottenuti dai campioni di *skim milk* prelevati da bovine sane (blu) e malate (rosso).

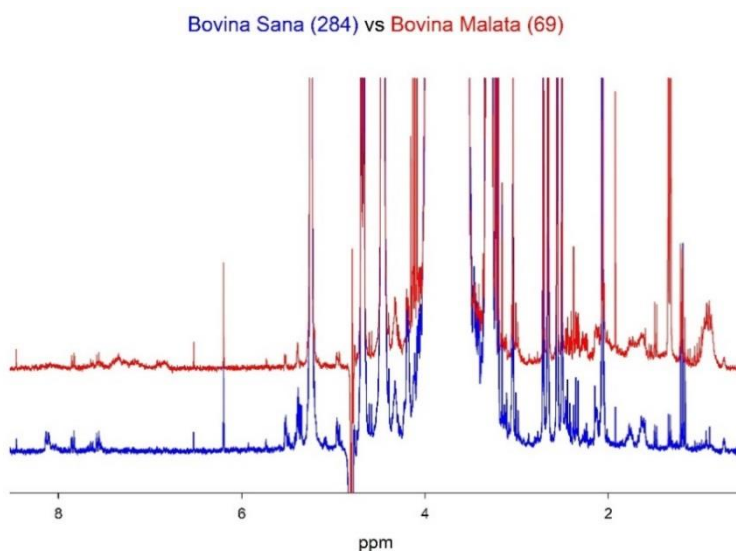


Fig. 5.1-NMR1: Spettri NOESY ottenuti da campioni di latte di una bovina sana (blu) e malata (rosso).

L'analisi PCA (come la successiva analisi PLS-DA) è stata condotta per mezzo del software AMIX (Bruker) versione 3.9.11. La regione spettrale da 0.5 a 10 ppm di ogni spettro è stata suddivisa in *bucket* da 0.05 ppm, con la precauzione di escludere da questa suddivisione (eliminandola) la zona compresa tra 4.50 e 5.00 ppm corrispondente al segnale dell'acqua, per evitare gli artefatti introdotti dalle sequenze di impulsi per la pre-saturazione dell'acqua. Scopo dell'analisi PCA è stata quella di determinare se gli spettri ottenuti potevano essere separati in due o più gruppi, ognuno dei quali costituito

da spettri fra loro simili, cioè se era possibile evidenziare come cluster separati gruppi di spettri derivanti da campioni che si ritengono diversi (nella fattispecie, provenienti da quarti sani o malati). Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi PCA, nei casi in cui si è ottenuta un'effettiva separazione in gruppi si è quindi proceduto con l'analisi PLS-DA per valutare la robustezza statistica di tale separazione. Come nella maggior parte delle analisi statistiche multivariate, i risultati dell'analisi PCA vengono presentati in modo grafico, e, più specificamente, nella forma di grafici degli *scores* e dei *loadings* (vedi Materiali e Metodi). I due grafici vanno "letti" assieme per cercare quegli spettri (*scores*) che si allontanano dagli altri lungo una certa direzione nel grafico degli *scores*, e cercare quei *bucket* che si allontanano lungo la stessa direzione nel grafico dei *loadings*. Questi *bucket* sono quelli che indicano la ragione per cui quel particolare spettro o spettri si allontanano, cioè si separano, dagli altri.

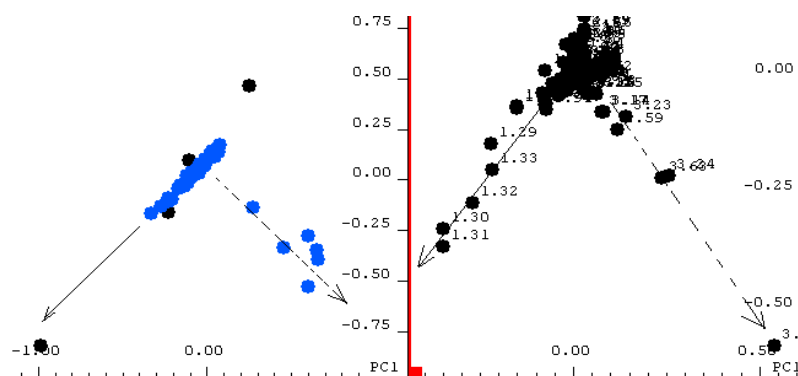
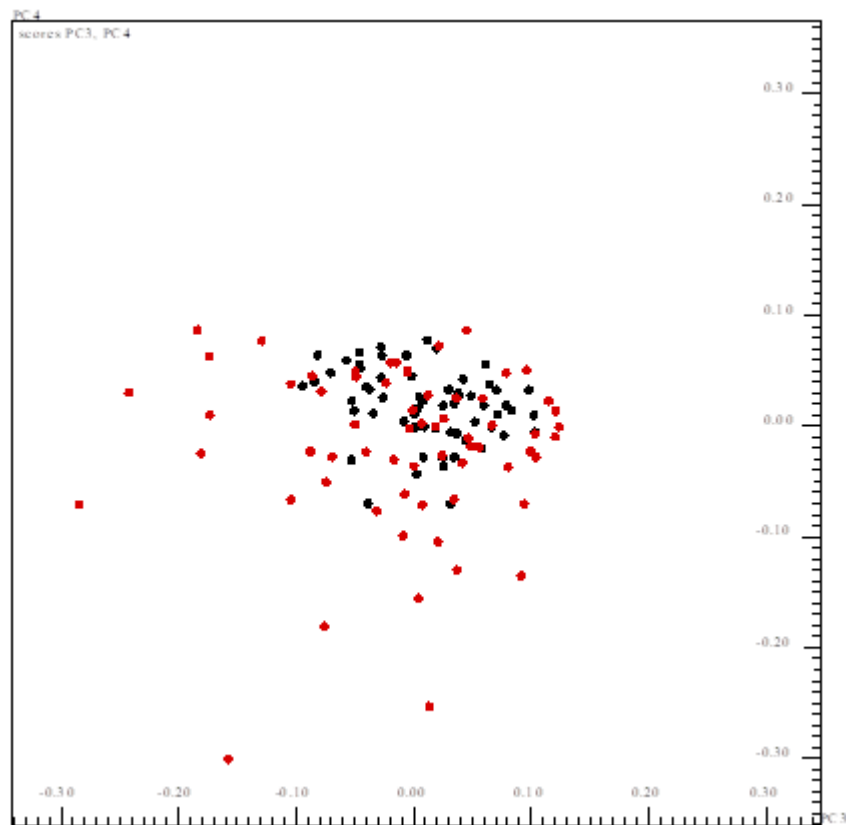


Fig. 5.2 Grafico degli *scores* (a sinistra) e grafico dei *loadings* (a destra).

Nell'esempio di coppia di grafici riportato in figura, per uno spettro (score) che si allontana dal centro (0,0) lungo la direzione indicata dalla freccia a tratto continuo nel grafico degli *scores*, i *bucket* che nel correlato grafico dei *loadings* si allontanano lungo la stessa direzione (freccia a tratto continuo) o nella direzione opposta (freccia tratteggiata) sono quelli che causano l'allontanamento (separazione dello score dagli altri). In particolare, i *bucket* che si allontanano lungo la stessa direzione (freccia a tratto continuo del grafico dei *loadings*) aumentano in valore (area del picco, intensità del picco, concentrazione della specie molecolare cui corrisponde quel *bucket*); i *bucket* che si allontanano lungo la direzione opposta (freccia tratteggiata del grafico dei *loadings*) diminuiscono in valore. Discorso analogo, ma invertito per quanto riguarda l'aumento o la diminuzione della concentrazione della specie molecolare, per quegli spettri (*scores*) che si allontanano nel grafico degli *scores* lungo la direzione della freccia tratteggiata.

La prima valutazione dei singoli quarti è stata condotta considerando il numero di cellule somatiche misurato sul latte proveniente da tutti i quarti mammari. I campioni

sono stati così classificati in due gruppi: a) campioni ottenuti da quarti mammari provenienti da bovine con $SCC < 100.000$ cellule/ml (SCC basso); b) campioni ottenuti da quarti mammari provenienti da bovine con $SCC \geq 200.000$ cellule/ml (SCC elevato). Il grafico degli *scores* e il correlato grafico dei *loadings* ottenuti dall'analisi PCA condotta adottando quest'ipotesi di classificazione sono riportati nella figura 5.3-NMR2, in cui i campioni prelevati da bovine con SCC elevato sono colorati in nero e quelli da bovine con SCC basso in rosso.



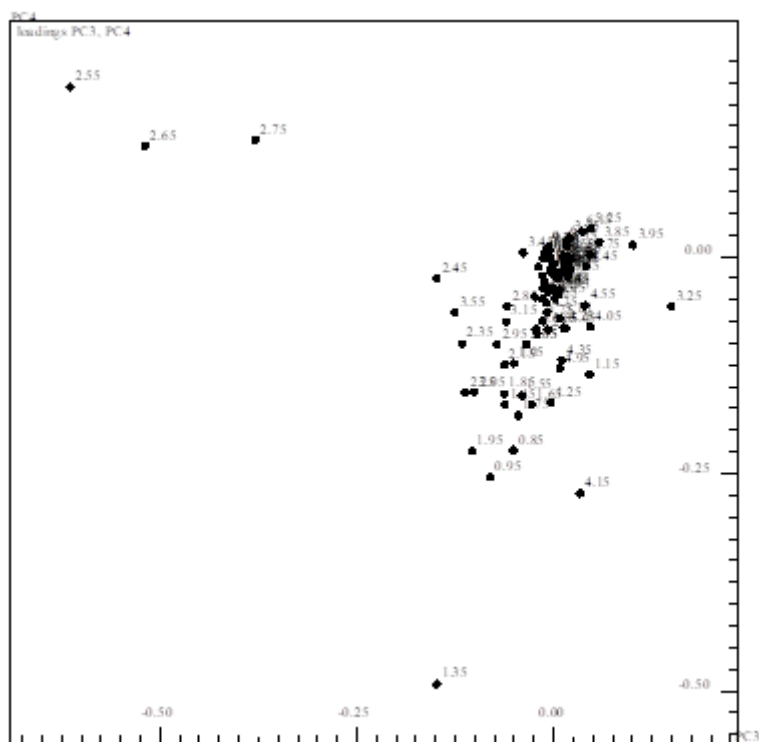


Fig. 5.3-NMR2 Grafico degli *scores* (sopra) e grafico dei *loadings* (a sinistra) ottenuti da analisi PCA dei campioni classificati secondo SCC. Nel grafico degli *scores* le bovine sane sono colorate in rosso, quelle malate in nero.

Il grafico dei *loadings* corrispondente ai grafici degli *scores* ricavati dall'analisi PCA rivela i *buckets* (regioni spettrali) responsabili delle separazioni degli *scores*.

Nonostante nel grafico degli *scores* sia possibile notare una buona separazione dei campioni con SCC elevato, è comunque presente una certa mescolanza con i campioni ottenuti dai soggetti con SCC basso (e quindi similarità di profili metabolici).

Tale risultato è imputabile al fatto che la classificazione è stata fatta sulla base del contenuto di cellule totali nel campione intero, cioè ottenuto dalla mescolanza di tutti e quattro i quarti della bovina, mentre gli spettri NMR sono acquisiti sui singoli quarti, e l'elevato contenuto in cellule totali potrebbe essere dovuto anche a un solo quarto mammario infetto entro bovina (per cui la colorazione avrebbe dovuto esser fatta non usando lo stesso colore per tutti i quarti della stessa bovina). Pertanto, si è proceduto a ripetere l'analisi PCA usando classificazioni diverse, basate sugli altri dati sperimentali disponibili quarto per quarto, quali la conducibilità elettrica, la presenza di batteri patogeni, il contenuto in CD11 e il contenuto in CD 44. La scelta di questi parametri è dovuta a ciò che è presente in letteratura: la conducibilità risulta essere un parametro che rispecchia cambiamenti nella concentrazione ionica del latte dovuti a processi infiammatori (Pyörälä, 2003); la presenza di batteri patogeni rende certo lo stato infettivo del quarto considerato e le percentuali di CD11 e CD44 rispecchiano la risposta immunitaria attuata a livello mammario (Alnakip, 2014). Non esistendo in

letteratura dati certi sul valore di soglia discriminante tra sano e malato relativamente ai parametri suindicati, si è scelto di classificare i quarti sulla base della suddivisione in terzili dei valori misurati (tabella 4.4).

I grafici degli *scores* ottenuti dalle analisi PCA condotte sulla base di queste classificazioni sono riportati nelle figure 5.5-NMR3 – 5.7-NMR6 rispettivamente per conducibilità elettrica, CD11, CD44 e agenti patogeni, nelle quali il colore nero è stato assegnato ai quarti nel primo terzile, il colore blu ai quarti nel secondo terzile, e il colore rosso ai quarti nel terzo terzile. Come si può notare, i grafici degli *scores* ottenuti per le classificazioni basate su conducibilità elettrica (figura 5.4-NMR3), batteri patogeni (figura 5.5-NMR4) e CD44 (figura 5.7-NMR6) non evidenziano alcuna separazione significativa, mentre il solo grafico degli *scores* per la classificazione basata su CD11 (figura 5.6-NMR5) denota una buona separazione dei quarti nel terzo terzile rispetto a quelli del primo e del secondo terzile

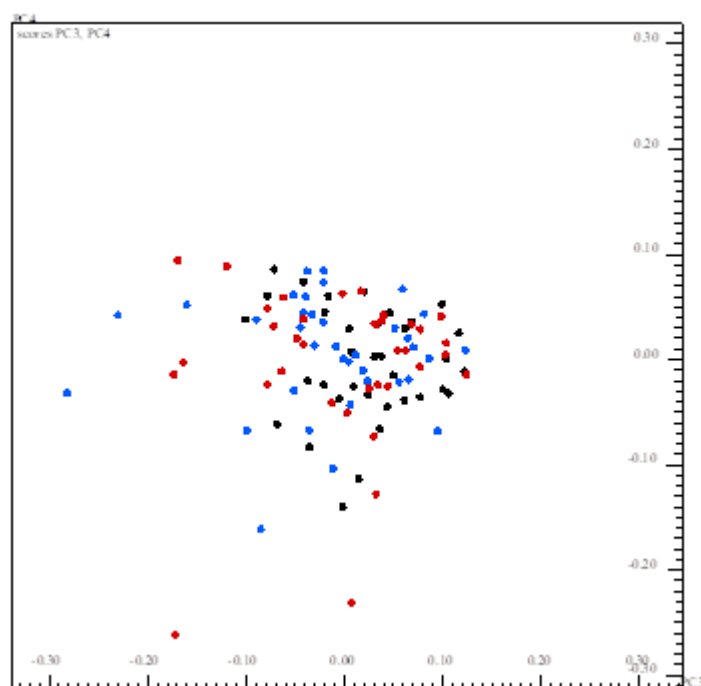


Fig. 5.4-NMR3 Grafico degli *scores* basato sulla conducibilità: in nero sono rappresentati i quarti del primo terzile ($mS/cm \leq 4.40$), in blu i quarti del secondo terzile ($4.40 > mS/cm \geq 4.70$) e in rosso i quarti del terzo terzile ($mS > 4.70$).

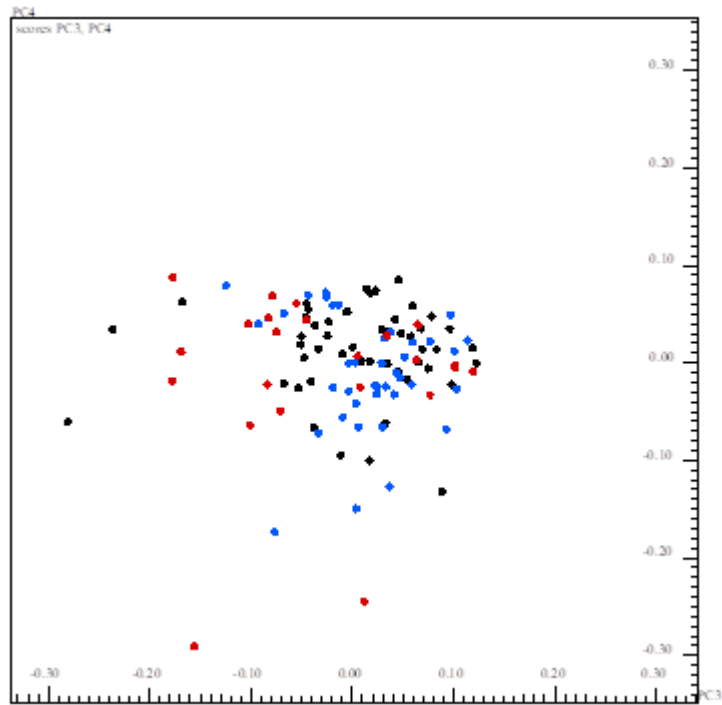


Fig. 5.5-NMR4 Grafico degli scores basato sulle analisi microbiologiche: in nero sono rappresentati i quarti del primo terzile (sterili), in blu i quarti del secondo terzile (NRS) e in rosso i quarti del terzo terzile (patogeni).

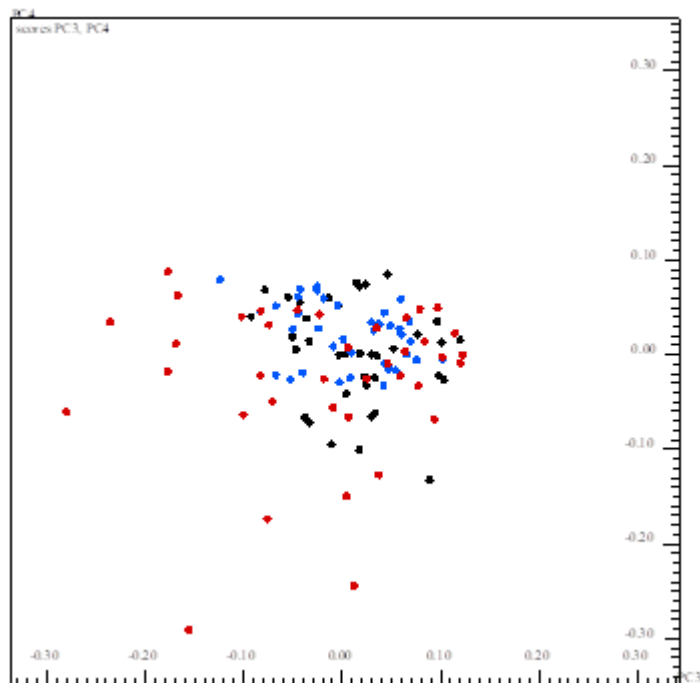


Fig. 5.6-NMR5 Grafico degli *scores* basato sulla percentuale di CD11: in nero sono rappresentati i quarti del primo terzile ($\% \leq 5.04$), in blu i quarti del secondo terzile ($5.04 > \% \geq 18.04$) e in rosso i quarti del terzo terzile ($\% > 18.04$).

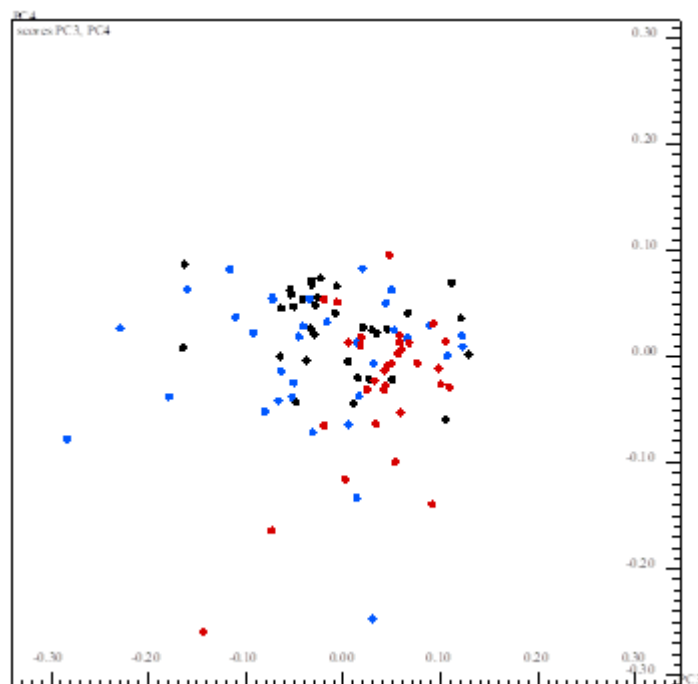


Fig. 5.7-NMR6 Grafico degli *scores* basato sulla percentuale di CD44: in nero sono rappresentati i quarti del primo terzile ($\% \leq 30.59$), in blu i quarti del secondo terzile ($30.59 < \% \leq 56.48$) e in rosso i quarti del terzo terzile ($\% > 56.48$).

Dall'analisi comparata tra i grafici degli *scores* di figura 5.3-NMR2 e figura 5.6-NMR5 risulta come le classificazioni basate sulle cellule totali e sulle cellule CD11 porti a risultati simili, con un risultato solo leggermente migliore per la classificazione basata sul contenuto in CD11. Per verificare la bontà di questa separazione comunque ottenuta dall'analisi PCA, sulle sole classificazioni basate sul contenuto totale in cellule (SCC) e livello di CD11 è stata 0.42 e di 0.36 ottenuti dalle PLS-DA condotte, rispettivamente, sulle classificazione SCC e CD11, confermano una separazione, seppur non elevata, comunque sufficientemente robusta. Ancora, i valori di RMSEC denotano come la separazione basata sul livello di CD11 sia leggermente migliore di quella basata su SCC (minore è il valore di RMSEC migliore è la separazione tra gruppi e l'associazione tra spettri NMR e classificazione sano malato).

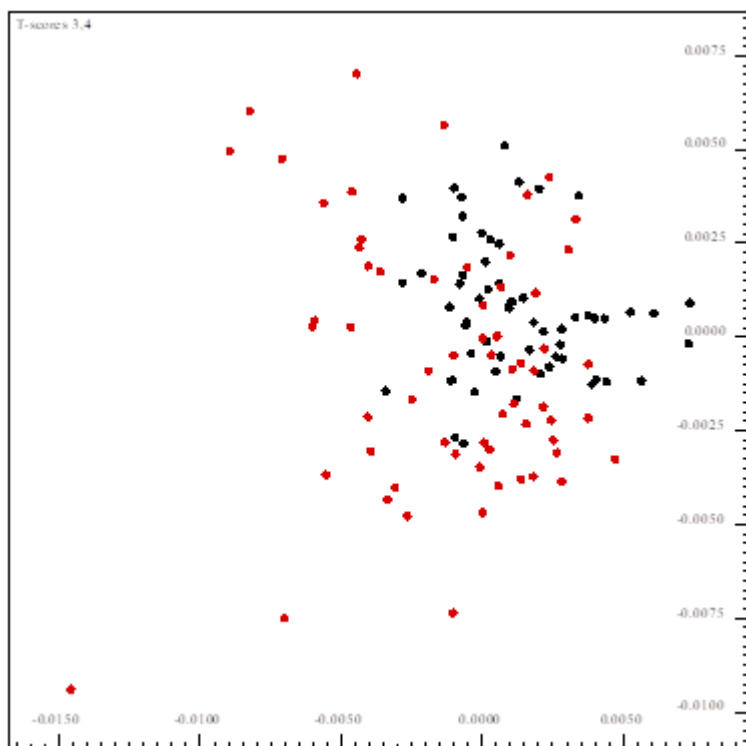


Fig. 5.8-NMR7 Grafico ottenuto dall'analisi PLS-DA condotta sulla classificazione basata sulla SCC.

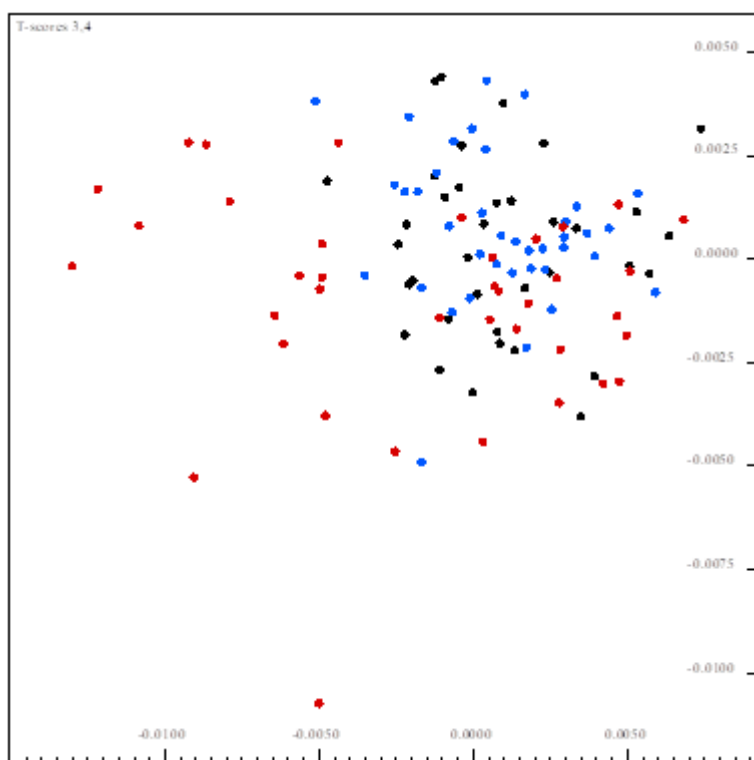


Fig. 5.9-NMR8 Grafico ottenuto dall'analisi PLS-DA condotta sulla classificazione basata sul contenuto di CD11.

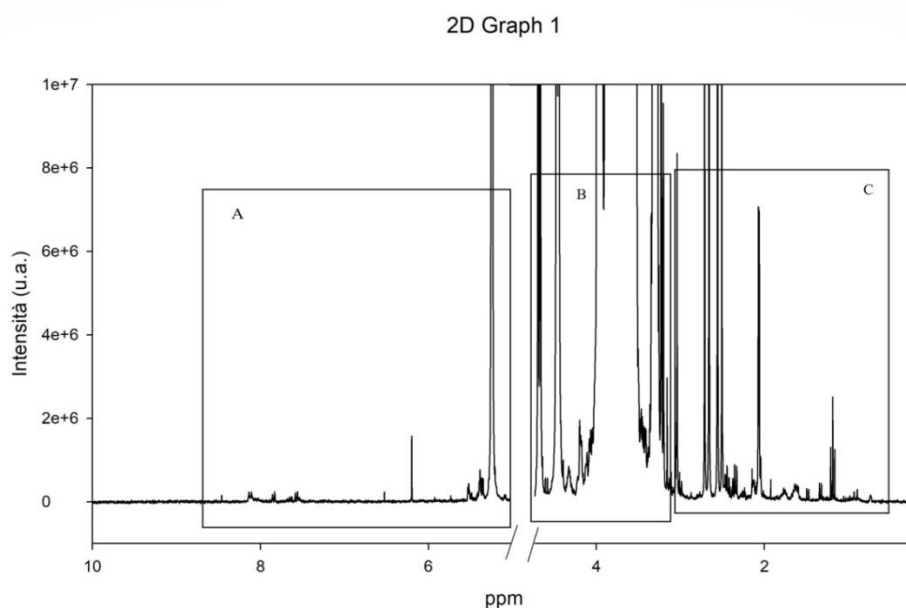
È comunque ancora presente una certa mescolanza tra campioni collocati nel terzo terzile e quelli collocati negli altri due terzili, indicando che una semplice suddivisione in terzili non sembra essere un criterio sufficientemente robusto per classificare con alta specificità un quarto come malato o sano.

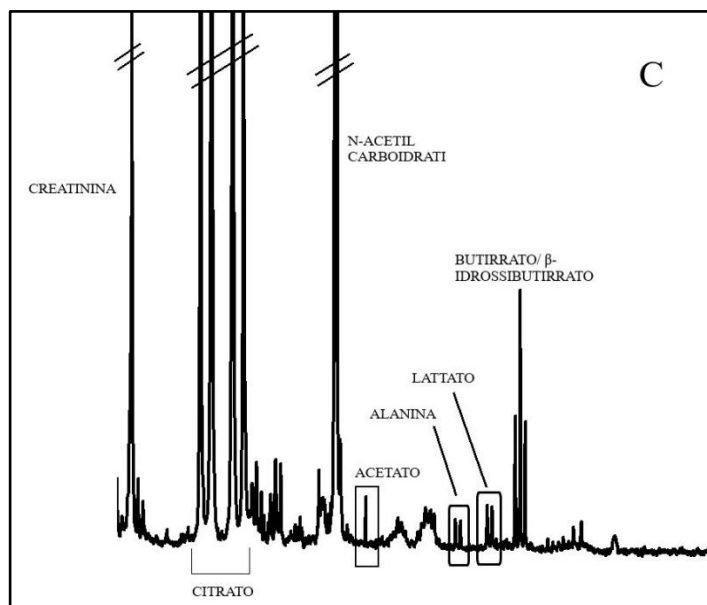
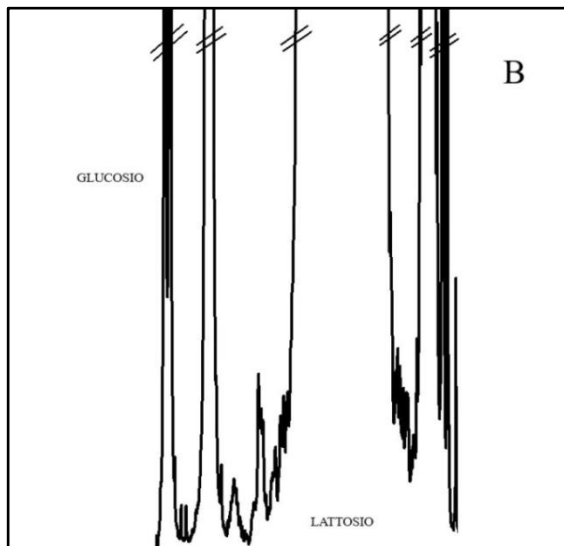
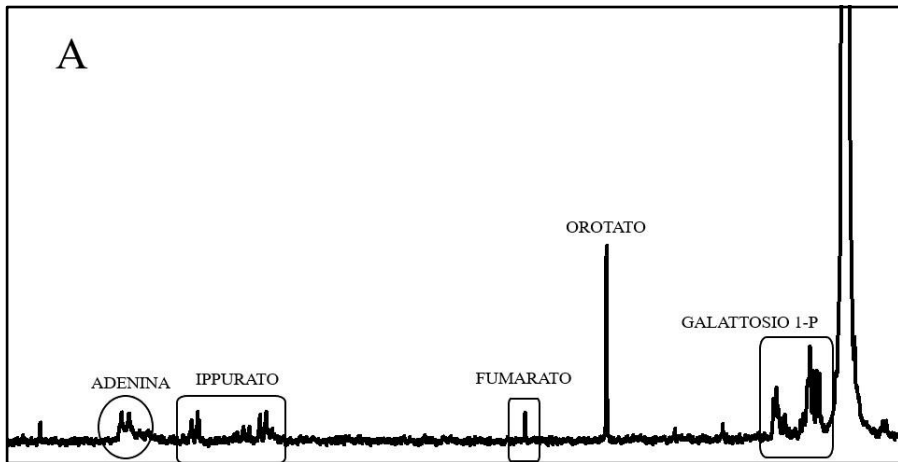
Partendo da questo risultato, che sembrerebbe indicare come la capacità discriminante tra “quarti sani” e “quarti malati” non sia così diversa tra un’analisi per campione intero o per singolo quarto, quando per il primo si utilizzi la conta totale delle cellule e per il secondo il livello di CD11, si è voluto usare il risultato della PCA per cercare di affinare la selettività e specificità del livello delle CD11 come parametro indicativo della condizione sana o malata. Per far questo, sono stati selezionati gli spettri relativi agli *scores* che nel grafico degli *scores* CD11 (Fig. 5.6-NMR5) si differenziano da tutti gli altri, indipendentemente dal terzile di appartenenza (individuato dalla diversa colorazione). La scelta è stata fatta considerando come gruppo unico “non separato” sufficientemente dall’origine (0,0) quello costituito dagli *scores* di coordinate PC3 comprese tra -0.09 e + 0.12 e PC4 comprese tra -0.12 e +0.09, e come *scores* separati quelli con valori di PC3 minori di -0.09 e PC4 minori di -0.09. Ai quarti corrispondenti a questi *scores* così separati (n=32) è stata assegnata la classificazione di “quarti malati”. Tutti gli altri spettri (n=85, 8 erano di dubbia classificazione) sono stati quindi classificati come “quarti sani”. Si è quindi proceduto per i due gruppi di campioni così classificati in base ai risultati della PCA alla valutazione del valore dei parametri sperimentali a disposizione, ottenendo (Tabella 5.5-NMR1) un’indicazione apparentemente netta sulla bassa capacità discriminante della conducibilità e del livello di CD44, a fronte di una promettente capacità discriminante del livello di CD11 per distinguere lo stato malato dallo stato sano (il confronto con la conta totale delle cellule non è possibile, in quanto tale parametro viene fornito solo per il campione “intero”, mediato sui quattro quarti).

Parametro	Classificazione mediante NMR	N	Media	Errore standard
CD4 (%)	Quarti Sani	82	3,99	0,41
	Quarti Malati	31	3,32	0,56
CD8 (%)	Quarti Sani	82	4,64	0,37*
	Quarti Malati	31	3,35	0,45
CD11b (%)	Quarti Sani	82	12,33	1,71***
	Quarti Malati	31	44,98	5,45
CD14 (%)	Quarti Sani	82	10,58	1,31
	Quarti Malati	31	10,96	1,35
CD21 (%)	Quarti Sani	82	1,08	0,14*
	Quarti Malati	31	0,68	0,08
CD44 (%)	Quarti Sani	70	53,03	3,73
	Quarti Malati	30	46,72	4,31
Conducibilità elettrica (mS/cm)	Quarti Sani	78	4,53	0,04**
	Quarti Malati	29	4,82	0,08

Tab. 5.5-NMR1 Valori medi con errori standard dei parametri leucocitari e della conducibilità elettrica ottenuti in seguito alla classificazione dei quarti considerati sani e malati eseguita mediante i parametri della NMR (gli asterischi indicano differenze statisticamente significativa tra i quarti “sani” e i quarti “malati”; *P<0,05; **P<0,01; *P<0,001; test di Mann-Whitney).**

Valutando il grafico dei *loadings* ottenuto dalle PCA delle classificazioni efficaci per la separazione in gruppi degli *scores* (figura 5.8-NMR7) le regioni spettrali che causano la separazione degli *scores* sono quelle corrispondenti ai metaboliti elencati nella tabella 5.6, la cui concentrazione si è vista diminuire, aumentare o rimanere invariata nei quarti malati rispetto ai quarti sani. Di seguito vediamo anche lo spettro NOESY ottenuto dall'analisi ¹H-NMR del campione di latte n. 145 (sano). L'intero spettro è stato diviso in 3 regioni spettrali (A, B, C) evidenziando i metaboliti presenti in ciascuna di esse.





Metabolita	Regione spettrale (ppm)	Concentrazione in caso di mastite
ADENINA	8.11-8.14	/
IPPURATO	7.54-7.86	↓
FUMARATO	6.52	↓
OROTATO	6.20	↓
GALATTOSIO 1-P	5.35-5.53	/
GLUCOSIO	5.24 e 4.68	/
LATTOSIO	3.52-4.45	↓
CREATININA	3.04	/
CITRATO	2.51-2.71	/
N-ACETIL CARBOIDRATI	2.06	/
ACETATO	1.92	↑
ALANINA	1.48	/
LATTATO	1.33 e 4.15	↑
BUTIRRATO	0.90	↑
BHBA	1.20	↑

Tab. 5.6 Elenco dei metaboliti rilevati dall'analisi dei campioni tramite $^1\text{H-NMR}$ con: regione spettrale in cui si trova ciascun metabolita e andamento in termini di concentrazione nei soggetti con alto numero di cellule somatiche, con diminuzione ↓ o aumento ↑ degli stessi. In corrispondenza dei metaboliti che non presentano un cambiamento di concentrazione si è barrata (/) la casella corrispondente.

Tra i metaboliti elencati e che si trovano nel latte, alcuni derivano dai microrganismi (acetato, butirrato); altri, come il latte e il lattosio e il citrato sono secreti dalle cellule epiteliali tramite esocitosi. Il lattosio viene prodotto a partire da glucosio e galattosio nell'apparato di Golgi delle cellule epiteliali mammarie mentre il citrato è un intermedio del ciclo di Krebs e una loro diminuzione nelle bovine con mastite potrebbe essere dovuto al danneggiamento di tali cellule a seguito del processo infiammatorio. Oppure, nel caso del lattosio, dato che in seguito a infiammazione la barriera emato-mammaria risulta indebolita, con conseguente passaggio di sostanze nel latte, una sua diminuzione è essenziale per il mantenimento di una pressione osmotica adeguata. Il lattato invece, è il maggior prodotto finale del metabolismo dei carboidrati e può essere prodotto dai microrganismi nel latte oppure per l'instaurarsi di un metabolismo anaerobico causato dall'infezione, risultando il maggior concentrazione nei soggetti patologici.

Una diminuzione del fumarato, prodotto intermedio del ciclo dell'urea, potrebbe essere spiegato dal cambiamento nel metabolismo energetico della bovina a causa dell'infezione batterica in atto o da una chetosi, risultante in una secrezione attiva di

questo metabolita dalle cellule mammarie al latte. Analogamente, anche l'orotato può derivare da un malfunzionamento nel ciclo dell'urea (Sundekilde, 2013).

5.3 Livello di associazione tra i due criteri di classificazione

Alla fine del processo di analisi è interessante confrontare i due metodi di classificazione utilizzati: il primo, basato essenzialmente sul valore percentuale di CD11b e/o presenza di batteri patogeni in un quarto e il secondo, basato sui risultati dell'analisi statistica dei dati di risonanza magnetica. Per fare ciò si è calcolato il coefficiente di concordanza (K di Cohen) che ha mostrato un discreto livello di concordanza ($K=0.484$; $P<0.001$) tra i due criteri (87 quarti su 113 sono risultati in accordo).

I 26 quarti in disaccordo possono essere così distinti:

- 7 quarti sono considerati “malati” dall'analisi NMR ma considerati invece “sani” secondo la classificazione basata su antibiogramma e percentuale di CD11b. Tra questi differenziamo: 4 campioni con valori di CD11b bassi (1-4%) e 3 con valori di CD11b intermedi (secondo terzile)
- 19 quarti considerati “sani” dall'analisi NMR ma considerati invece “malati” secondo la classificazione basata su antibiogramma e valore di CD11b.
Tra questi riconosciamo: 2 quarti aventi CD11b basso, 2 quarti con CD11b intermedio e 15 con valori di CD11b alto.

5.4 Possibile classificazione per animale

Finora i metodi di classificazione utilizzati sono serviti a cercare di differenziare i singoli quarti. Tenendo conto degli stessi parametri classificativi, possiamo descrivere un metro di giudizio dell'animale *in toto*, basato da una parte sui parametri citologici e batteriologici e dall'altro sui parametri ottenuti dall'analisi NMR (PCA).

Otterremmo quindi la seguente situazione:

Animali	Classificazione secondo parametri "citologici e batteriologici"	Classificazione NMR
Sani (0)	<ul style="list-style-type: none"> • SCC < 100.000 cc/mL • Tutti i quarti con: <ul style="list-style-type: none"> - CD11b < 17% (primo e secondo terzile) - Batteriologico: sterili o NRS 	<ul style="list-style-type: none"> • SCC < 100.000 cc/mL • Tutti i quarti con <i>scores</i> di coordinate PC3 comprese tra -0.09 e + 0.12 e PC4 comprese tra -0.12 e +0.09
Malati (1)	<ul style="list-style-type: none"> • SCC ≥ 200.000 cc/mL • SCC < 100.000 cc/mL e almeno un quarto con: <ul style="list-style-type: none"> - CD11b ≥ 17% e/o batteriologico: patogeni 	<ul style="list-style-type: none"> • SCC ≥ 200.000 cc/mL • SCC < 100.000 cc/mL e almeno un quarto con valori di PC3 minori di -0.09 e PC4 minori di -0.09

La situazione più particolare che in un primo momento potrebbe non essere identificata, in quanto non presenta un valore alto di SCC, è chiaramente l'ultima. In questo caso ciò che discrimina lo stato patologico infatti è la presenza di un'alta percentuale di CD11b e/o la presenza di un batterio patogeno. Nel nostro studio, abbiamo identificato 6 animali facenti parte di questo gruppo: le bovine n. 342, 371, 382, 385, 393 e 395. Anche in questo caso, i due criteri hanno mostrato un discreto livello di concordanza nell'individuare i soggetti potenzialmente malati (K=0,424; P<0,01).

6. Conclusioni

Questo studio rappresenta una iniziale esplorazione dei dati ottenuti grazie a un approccio metabonomico.

Tale metodo di analisi è di recente utilizzo in Medicina Veterinaria e finora è stato applicato, nell'ambito della diagnosi della mastite, su campioni di latte totale (ovvero una miscela di latte dei quattro quarti mammari), dove è stata evidenziata una marcata differenza tra gli animali sani e soggetti a infezione (U.K. Sundekilde, 2013).

In questo lavoro invece, al fine di ottenere un quadro più preciso della situazione sanitaria della bovina, si sono presi in considerazione i singoli quarti. Questi sono stati classificati secondo un criterio basato sul contenuto in percentuale di CD11b unito ai risultati delle analisi microbiologiche, criterio confortato dai risultati delle analisi statistiche (PCA) dei dati scaturiti dalla risonanza magnetica.

In quest'ultimo caso, i parametri utilizzati per cercare di evidenziare tale suddivisione in "sani" e "malati" sono stati inizialmente i valori di conducibilità, di CD11b, di CD44 e i risultati dell'antibiogramma. A fronte dell'analisi PCA per ciascuno di questi criteri, è risultato essere discriminante solo il valore percentuale di granulociti neutrofili, la cui media è statisticamente superiore nei quarti considerati malati rispetto a quelli definiti sani (44.98 ± 5.45 contro 12.33 ± 1.71). D'altro canto, sempre basandoci sulla classificazione derivante dall'analisi PCA, si ottiene un'indicazione apparentemente netta sulla bassa capacità discriminante della conducibilità e del livello di CD44.

Andando ad identificare i metaboliti che spiegano maggiormente le differenze tra i criteri di classificazione tra sani e malati, ritroviamo un'evidente corrispondenza con quanto scritto in letteratura (U.K. Sundekilde, 2013). Nei quarti classificati come "malati" ritroviamo infatti un aumento di concentrazione di acetato, lattato, butirrato e β -idrossibutirrato mentre diminuiscono il lattosio, il fumarato, l'ippurato e l'orotato.

Questo studio preliminare ci ha permesso anche di individuare nuove possibilità e idee di miglioramento. Prima di tutto, sarebbe interessante confrontare i dati da noi ottenuti con i dati di un ipotetico gruppo di animali decisamente malati (controllo positivo) sia dal punto di vista della SCC che delle analisi microbiologiche. Nei capi da noi scelti infatti, nonostante siano stati rilevati batteri patogeni, non avevano mai carica così alta da rendere necessario l'uso di antibiotici.

Inoltre, sarebbe necessario impostare uno studio che segua gli animali durante un periodo di tempo, in modo da valutare l'andamento dello stato sanitario della mammella e non fermandosi ad avere una "fotografia" del singolo momento del prelievo.

Infine, si potrebbe analizzare non solo il latte delle bovine scelte ma anche il sangue, meno soggetto a cambiamenti repentini del profilo metabolico.

Per concludere quindi, questa tesi getta le basi per un'indagine più approfondita basata su una tecnica che può essere molto utile in campo veterinario e che, con un approccio per quarti e non su latte totale, può rappresentare una novità importante nella diagnosi (anche precoce) di mastite.

7. Appendice

Tabella 1. Elenco dei campioni da analizzare tramite $^1\text{H-NMR}$ con: numero identificativo del campione, numero della bovina e tipo di campione (AD = anteriore destro, AS = anteriore sinistro, PD = posteriore destro, PS = posteriore sinistro, totale = mix del secreto dei 4 quarti).

ID. lab.	ID bovina	Latte
1	342	tot
2	342	AS
3	342	AD
4	342	PS
5	342	PD
6	401	tot
7	401	AS
8	401	AD
9	401	PS
10	401	PD
11	69	tot
12	69	AS
13	69	AD
14	69	PS
15	69	PD
16	144	tot
17	144	AS
18	144	AD
19	144	PS
20	144	PD
21	337	tot
22	337	AS
23	337	AD
24	337	PS
25	337	PD
26	145	tot
27	145	AS
28	145	AD
29	145	PS
30	145	PD

31	289	tot
32	289	AS
33	289	AD
34	289	PS
35	289	PD
36	367	tot
37	367	AS
38	367	AD
39	367	PS
40	367	PD
41	284	tot
42	284	AS
43	284	AD
44	284	PS
45	284	PD
46	34	tot
47	34	AS
48	34	AD
49	34	PS
50	34	PD
51	444	tot
52	444	AS
53	444	AD
54	444	PS
55	444	PD
56	343	tot
57	343	AS
58	343	AD
59	343	PS
60	343	PD

ID lab	ID bovina	Latte
61	380	tot
62	380	AS
63	380	AD
64	380	PS
65	380	PD
66	382	tot
67	382	AS
68	382	AD
69	382	PS
70	382	PD
71	371	tot
72	371	AS
73	371	AD
74	371	PS
75	371	PD
76	355	tot
77	355	AS
78	355	AD
79	355	PS
80	355	PD
81	153	tot
82	153	AS
83	153	AD
84	153	PS
85	153	PD
86	393	tot
87	393	AS
88	393	AD
89	393	PS
90	393	PD
91	131	tot
92	131	AS
93	131	AD
94	131	PS
95	131	PD
96	340	tot
97	340	AS
98	340	AD
99	340	PS
100	340	PD

101	395	tot
102	395	AS
103	395	AD
104	395	PS
105	395	PD
106	329	tot
107	329	AS
108	329	AD
109	329	PS
110	329	PD
111	366	tot
112	366	AS
113	366	AD
114	366	PS
115	366	PD
116	385	tot
117	385	AS
118	385	AD
119	385	PS
120	385	PD
121	44	tot
122	44	AS
123	44	AD
124	44	PS
125	44	PD
126	379	tot
127	379	AS
128	379	AD
129	379	PS
130	379	PD
131	384	tot
132	384	AS
133	384	AD
134	384	PS
135	384	PD
136	454	tot
137	454	AS
138	454	AD
139	454	PS
140	454	PD

ID lab.	ID bovina	Latte
141	348	tot
142	348	AS
143	348	AD
144	348	PS
145	348	PD
146	64	tot
147	64	AS
148	64	AD
149	64	PS
150	64	PD
151	11	tot
152	11	AS
153	11	AD
154	11	PS
155	11	PD
156	117	tot
157	117	AS
158	117	AD
159	117	PS
160	117	PD

Tabella 2. Elenco dei campioni analizzati con: misura del pH del campione tal quale, dopo essere stato scongelato; misura del pH del campione tal quale con aggiunta di buffer; misura del pH del campione dopo filtrazione con Vivaspin®; misurazione del pH del campione dopo filtrazione con Vivaspin® e aggiunta di buffer.

ID campione	pH campione t.q.	pH campione t.q. + buffer	pH campione vivaspin®	pH campione vivaspin® + buffer
1	6,84		/	/
16	6,73	/	/	/
21	6,82	/	/	/
26	6,67	6,91	7,01	6,92
31	6,78	/	7,08	6,96
41	6,75	6,94	6,94	6,92
46	6,8	/	7,29	6,92
36	6,72	/	6,95	/
51	6,71	/	6,91	/
56	6,7	/	6,97	/
61	6,72	/	9,87	/
66	6,6	/	/	6,93
71	6,72	/	/	6,93
76	6,59	/	/	6,89

81	6,7	/	/	6,94
86	6,75	/	/	6,89
91	6,84	/	/	6,94
96	6,77	/	/	6,93
101	6,74	/	/	6,92
106	6,62	/	/	6,91
111	6,8	/	/	6,93
121	6,8	/	/	6,91
126	6,87	/	/	6,94
131	6,64	/	/	6,89
136	6,74	/	/	6,92
141	6,86	/	/	6,93
146	6,84	/	6,99	6,91
151	6,77	/	6,9	6,9
156	6,78	/	/	6,94
12	6,8	/	7,04	6,91
13	7,21	/	8,1	6,92
14	6,82	/	7,05	6,92
15	6,78	/	7,03	6,89
2	6,82	/	7,16	6,94
3	6,78	/	7,11	6,93
4	6,77	/	7,17	6,92
5	6,73	/	7,12	6,92
32	6,71	/	6,85	6,92
34	6,88	/	7,37	6,93
35	6,72	/	6,9	6,95
7	6,78	/	7,07	6,94
9	6,78	/	7,04	6,93
10	6,79	/	7,03	6,9
22	6,75	/	7,08	6,92
23	7,1	/	7,75	6,95
24	6,83	/	7,09	6,96
25	6,88	/	7,09	6,9
27	6,78	/	7,03	6,91
28	6,79	/	6,99	6,96
29	6,72	/	7,01	6,93
30	6,78	/	6,93	6,94
37	6,77	/	6,99	6,91
38	6,78	/	6,97	6,9
39	6,71	/	6,99	6,91
40	6,8	/	7,02	6,94
42	6,74	/	6,95	6,91
43	6,77	/	6,93	6,91
44	6,73	/	6,93	6,91
45	6,74	/	6,96	6,94
47	6,74	/	7,15	6,91
48	7,1	/	7,88	6,95
49	6,7	/	7,21	6,93
50	6,93	/	7,38	6,93
52	6,76	/	6,88	6,91
53	6,75	/	6,97	6,94
54	6,62	/	6,91	6,91

55	6,67	/	6,89	6,92
57	6,77	/	7,04	6,94
58	6,81	/	7,06	6,94
59	6,83	/	6,97	6,93
60	6,8	/	6,96	6,94
62	6,77	/	6,9	6,93
63	6,73	/	6,9	6,93
64	6,71	/	6,89	6,95
65	6,73	/	6,89	6,92
67	6,7	/	6,8	6,94
68	6,67	/	6,78	6,94
69	6,69	/	6,8	6,92
70	6,68	/	6,78	6,92
18	6,79	/	6,96	6,94
19	6,76	/	6,93	6,94
20	6,75	/	6,97	6,95
72	6,8	/	6,93	6,94
73	6,83	/	6,97	6,94
74	6,82	/	6,98	6,95
75	6,84	/	7,00	6,95
77	6,7	/	6,76	6,94
78	6,68	/	6,77	6,97
79	6,65	/	6,83	6,96
80	6,67	/	6,82	6,95
82	6,83	/	6,92	6,95
83	6,78	/	6,9	6,95
84	6,84	/	7,01	6,95
85	6,81	/	6,92	6,95
87	6,79	/	6,9	6,95
88	6,79	/	6,91	6,94
89	6,78	/	6,89	6,95
90	6,79	/	6,91	6,95
92	6,87	/	7,12	6,97
93	6,9	/	7,17	6,92
94	6,87	/	7,13	6,93
95	6,96	/	7,26	6,93
97	6,71	/	6,87	6,91
98	6,72	/	6,91	6,92
99	6,73	/	6,91	6,91
100	6,74	/	6,9	6,91
102	6,7	/	6,89	6,94
103	6,76	/	6,92	6,94
104	6,79	/	7,01	6,92
105	6,81	/	6,94	6,92
107	6,62	/	6,77	6,91
108	6,98	/	7,58	6,91
109	6,62	/	6,78	6,94
110	6,71	/	6,78	6,92
112	6,76	/	6,88	6,93
113	6,78	/	6,82	6,93
114	6,78	/	6,94	6,93
115	6,86	/	7,15	6,91

117	6,86	/	7,07	6,93
118	7,06	/	7,57	6,9
119	6,88	/	7,08	6,92
120	6,79	/	7,06	6,9
122	6,83	/	6,94	6,92
123	6,81	/	6,96	6,93
124	6,79	/	6,94	6,93
125	6,76	/	6,96	6,93
127	6,86	/	7,06	6,94
128	6,87	/	7,07	6,92
129	6,86	/	7,08	6,92
130	6,89	/	7,07	6,93
132	6,65	/	6,74	6,95
133	6,63	/	6,7	6,91
134	6,68	/	6,72	6,91
135	6,61	/	6,73	6,93
137	6,72	/	6,88	6,93
138	6,86	/	7,02	6,95
139	6,78	/	6,93	6,96
140	6,8	/	6,9	6,95
142	7,01	/	7,22	6,92
143	7,07	/	7,86	6,96
144	6,83	/	6,98	6,93
145	6,87	/	6,97	6,92
147	6,86	/	6,99	6,95
148	6,87	/	6,99	6,95
149	6,87	/	7,02	6,95
150	6,85	/	7,01	6,96
152	6,8	/	6,83	6,94
153	6,73	/	6,73	6,94
154	6,75	/	6,89	6,91
155	6,75	/	6,92	6,94
157	6,68	/	6,94	6,93
158	6,9	/	7,6	6,94
159	6,76	/	6,86	6,91
160	6,86	/	6,86	6,9
116	6,63	/	7,04	6,92

8. Bibliografia

- A.J. Guidry, C. O. (1998, Aprile). A bovine mammary endothelial/epithelial cell culture model of the blood/milk barrier. *Canadian journal of veterinary research* (62), p. 117-121.
- Alnakip, M. E. (2014). The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *Journal of veterinary medicine*, p. 1-31.
- Bertocchi, L. (1999). Il conteggio delle cellule somatiche nel latte: approccio diagnostico. *Atti della società italiana di buiatria*, (p. 361-369).
- Bradley, A. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *The veterinary journal* , p. 1-13.
- C. Viguier, S. A. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspective. *Trends in biotechnology*, 486-493.
- C.J. Hogarth, J. F. (2004, luglio). Differential protein composition of bovine whey: a comparison of whey from healthy animals and from those with clinical mastitis. *Proteomics*, p. 2094-2100.
- D. Schwarz, A. R. (2013, agosto). CD2/CD21 index: a new marker to evaluate udder health in dairy cows. *Journal of dairy science*, p. 5106-5119.
- D. Schwarz, U. D. (2011, ottobre). Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of dairy science*, p. 5033-5044.
- D.B. Shennan, M. P. (2000). Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiological Reviews*, 927-928.
- D.D. Nguyen, M. N. (1998). Tight junctions regulation in the mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, III, p. 233-245.
- D.W. Lachenmeier, E. H. (2009, agosto). NMR-spectroscopy for nontargeted screening and simultaneous quantification of health-relevant compounds in foods: the example of melamine. *Journal of agricultural and food chemistry*, p. 7194-7199.
- E. Viliers, J. R. (2017). *Gli esami di laboratorio: Indicazioni, Esecuzione, Interpretazione - cane e gatto*. Edra.

- F.Q. Zhao, A. K. (2007). Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *Journal of dairy science*(90), p. E76-E86.
- J. Peeling, G. S. (1992, marzo). High-Resolution ¹H NMR spectroscopy studies of extracts of human cerebral neoplasms. *Magnetic resonance in medicine*, p. 123-136.
- K. Stelwagen, K. S. (2014). The role of tight junctions in mammary gland function. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*(19), p. 131-138.
- K.M. Dyce, W. S. (2009). *Testo di anatomia veterinaria* (Vol. II). Antonio Delfino Editore.
- K.S. Zettl, M. S. (1992, ottobre 1). Glucocorticoid-induced formation of tight junctions in mouse mammary epithelial cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, p. 9069-9073.
- L.L. Cheng, I.-W. C. (1998). Evaluating Human Breast Ductal Carcinomas with High-Resolution Magic-Angle Spinning Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of magnetic resonance*, p. 194-202.
- L.M. Sordillo, K. S. (2002, Aprile). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 7(2), p. 137.
- L.M. Sordillo, K. S.-W. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *Journal of dairy science*, 80(8), p. 1851-1865.
- Lee, D. (s.d.). Factor influencing somatic cell count variation in cow milk samples.
- M. J. Green, A. J. (2008, Dicembre). Cow, farm, and herd management factors in the dry period associated with raised somatic cell counts in early lactation. *Journal of dairy science*, p. 1403-1415.
- M.C.Neville, T. M. (2002, Gennaio). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, p. 49-66.
- Neville, M. (2005, aprile). Calcium secretion into milk. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 10(2), p. 119-127.

- O. Mani, M. T. (2009). Differential expression and localization of lipid transporters in the bovine mammary gland during the pregnancy-lactation cycle. *Journal of dairy science*(92), p. 3744-3756.
- O. Wellnitz, C. Z. (2016). Differential loss of bovine mammary epithelial barrier integrity in response to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Journal of dairy science*(99), p. 4851-4856.
- P. Mazzei, A. P. (2012, gennaio). 1H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food chemistry*, p. 1620-1627.
- P. Rainard, C. R. (2006). Innate immunity of bovine mammary gland. *Veterinary research*(37), 371.
- P.L. Ruegg, J. P. (2013). Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality. *Irish journal of agricultural & food research*, p. 101-117.
- Palumbo, D. (2008). *FedOa*. Tratto il giorno ottobre 2017 da FedOa:
http://www.fedoa.unina.it/1874/1/Palumbo_Produzione_Sanit%C3%A0_Alimenti.pdf
- Program, N. Y. (s.d.). *Animal Health Diagnostic Center - Cornell University*. Tratto il giorno ottobre 2017 da Animal Health Diagnostic Center - Cornell University:
<https://ahdc.vet.cornell.edu/programs/NYSCHAP/docs/Diagnosticmethods.pdf>
- Pyörälä, S. (2003, settembre-ottobre). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary research*, 34(5), p. 565-578.
- S. Piepers, S. D. (2009, febbraio). Flow cytometric identification of bovine milk neutrophils and simultaneous quantification of their viability. *Journal of dairy science*, p. 626-631.
- S. Safi, A. K. (2009, Dicembre). Acute phase proteins in the diagnosis of bovine subclinical mastitis. *Veterinary clinical pathology*, p. 471-476.
- Sali, G. (1980). Indirizzi terapeutici pratici nel controllo delle principali forme di mastite bovina. *XII congresso nazionale SIB*, (p. 119-138).

- Sundekilde, U. (2012, luglio). Milk metabolite variability and heritability and their association with technological properties of bovine milk elucidated by NMR-based metabolomics.
- Thompson, G. (1996, maggio). Cortisol and regulation of tight junctions in the mammary gland of the late-pregnant goat. *Journal of dairy research*, p. 305-308.
- U.K. Sundekilde, L. L. (2013). NMR-Based Milk Metabolomics. *Metabolites*, p. 204-222.
- U.K. Sundekilde, N. P. (2013, gennaio). Nuclear magnetic resonance metabolomics reveals strong association between milk metabolites and somatic cell count in bovine milk. *Journal of dairy science*, p. 290-299.
- V. Sjaastad, O. K. (2013). *fisiologia degli animali domestici*. Casa Editrice Ambrosiana.
- V.Kumar, E. K. (2015). *Il manuale di patologia generale e anatomia patologica*. E. Masson.
- X. Zhao, P. L. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *Journal of animal science*, p. 57-65.
- Y. H. Schukken, J. G. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary immunology and immunopathology*(144), p. 270-271.
- Y. Yongxia, L. C. (2007, giugno). Metabonomic Studies of Human Hepatocellular Carcinoma Using High-Resolution Magic-Angle Spinning 1H NMR Spectroscopy in Conjunction with Multivariate Data Analysis. *Journal of proteome research*, p. 2605-2614.

9. Ringraziamenti

Nonostante tutto il lavoro fatto e le pagine scritte, credo che questo sia per me il capitolo più importante e il più difficile. Come si può esprimere in poche righe tutta la gratitudine per chi mi ha guidato, sostenuto e... sì, qualche volta sopportato lungo questo cammino? In ogni caso voglio provarci lo stesso e mi scuserete se il mio intento non trova corrispondenza sulla carta.

Al mio relatore, il prof. Gabai, per avermi guidato e consigliato, aiutandomi a concludere nel modo migliore la mia esperienza universitaria.

Al prof. Zennaro, che mi ha accompagnata nell'ultimo periodo e a Paola, compagna di tanti pranzi tra un'analisi e l'altra.

A Nadia e Nicola per avermi fatta sentire a casa ogni volta che andavo nella loro azienda.

Al prof. Zecconi, alla prof. Gelain, a Federico e a Laura DaDalt, per avermi aiutato nelle analisi di laboratorio.

Il ringraziamento più importante va però alla mia famiglia.

A mia mamma, che con grande pazienza si è sorbita 5 anni di ripetizioni prima degli esami e che a questo punto potrebbe benissimo avere una laurea in Veterinaria pure lei.

A mio papà, roccia della famiglia.

Grazie per avermi insegnato tanto e sostenuto sempre, anche nei momenti più difficili.

Non potevo desiderare genitori migliori!

A mio fratello, che nonostante sia lontano resta sempre un punto di riferimento e un esempio da seguire.

A mio nonno, che mi diceva sempre di fare in fretta a laurearmi così poi l'avrei curato.

A Ciro, che ho avuto la grande fortuna di incontrare e che "con uno sguardo mi ha reso più bella". Spero che il futuro ci riservi un mare di felicità (magari a Parigi!).

Alle mie migliori amiche e pilastri: a Giulia, la sorella che non ho mai avuto e che mi ha insegnato più di quanto potrei mai dire; a Francesca, il cui spirito così spontaneo e genuino mi è sempre stato d'ispirazione.

Alle mie compagne di corso e amiche; un ringraziamento speciale a Martina ed Eleonora, senza le quali probabilmente non mi starei laureando e che mi hanno supportata tutti questi anni.

Alla mia famiglia spagnola, il tesoro più prezioso che potessi trovare lontano da casa e che hanno reso il mio Erasmus più colorato e unico: auguro a tutte voi il meglio che la vita possa offrirvi.

Ultimi, ma non meno importanti, ringrazio tutte le “creature grandi e piccole” (in particolar modo Jeanne) che in questi anni hanno rallegrato le mie giornate e che mi ricordano perché voglio fare questo lavoro.