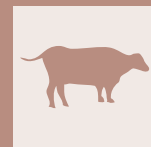


Diagnosi delle mastiti bovine: test di screening e batteriologia a confronto e loro indice predittivo



M. SGORBINI¹, F. BONELLI¹, F. FRATINI¹, A. SBRANA², M. BROMBIN², V. MEUCCI¹, M. CORAZZA¹, V. EBANI¹, F. BERTELLONI¹, B. TURCHI¹, D. GATTA¹, D. CERRI¹

¹ Dipartimento Scienze Veterinarie, viale delle Piagge 2, Pisa

² Libero professionista, Pisa

RIASSUNTO

Scopo - Confrontare alcune metodiche diagnostiche utilizzate per la diagnosi di mastite e confrontarne la predittività.

Materiali e metodi - Il presente studio ha incluso 54 bovine da latte di razza Frisona Italiana, di età varia e in diversi stadi di lattazione per un totale di 216 quarti. Le mammelle sono state valutate dal punto di vista clinico e i campionamenti sono stati eseguiti in fase di pre-mungitura durante la mungitura del pomeriggio. Il prelievo di latte è stato effettuato dopo disinfezione del capezzolo ed eliminazione dei primi getti di latte. Ciascun campione è stato sottoposto a CMT, valutazione del pH, conducibilità elettrica (CE), conta delle cellule somatiche (CCS) ed esame batteriologico.

Risultati - Non sono state rilevate alterazioni cliniche della mammella in nessun soggetto incluso nello studio. Al CMT sono risultate positive 28/54 vacche. La CE è risultata superiore a 11 Ohm in 19/54 animali. La CCS era superiore alle 200.000 cell/ml in 19/54 bovine e il pH in 7/54. L'esame batteriologico è risultato positivo in 10/54 vacche. I batteri isolati sono prevalentemente ambientali ed i nostri risultati concordano con la letteratura. L'analisi statistica ha individuato un indice predittivo positivo per CCS ed esame batteriologico.

Conclusioni - L'analisi statistica ha evidenziato che esiste una probabilità elevata di avere un esame batteriologico positivo con una valutazione delle cellule somatiche >200.000 cell/ml, avvalorando l'importanza dell'utilizzo della CCS come screening per la diagnosi di mastite sub-clinica e, in associazione alla valutazione del secreto mammario e della mammella stessa, di mastite clinica. Anche il CMT sembra essere un buon test di screening per il sospetto di mastite da utilizzare direttamente in sala di mungitura.

PAROLE CHIAVE

Vacca da latte, mastite, esami clinico-fisici, batteriologia.

INTRODUZIONE

La mastite è una delle patologie più importanti della Bovina da Latte ad Alta Produzione (BLAP) che provoca danni zoeconomici legati alla perdita di latte, al benessere animale, alla qualità igienico-sanitaria e casearia del latte e alla redditività dell'allevamento e alle implicazioni sulla salute dell'uomo. Sebbene siano stati fatti notevoli progressi nel controllo, diagnosi e terapia di questa patologia, i risultati non sono ancora ottimali poiché la sua incidenza continua a essere elevata¹.

La mastite bovina è, per definizione, un'infiammazione a carico della ghiandola mammaria, la cui eziologia più frequente è quella da infezione batterica. Le mastiti batteriche possono essere, principalmente, di tipo ambientale o contagioso. Nel primo caso, sono causate da microrganismi ubiquitari, capaci cioè di vivere e moltiplicarsi ovunque trovino un terreno adatto al loro sviluppo; nel secondo caso invece sono implicati agenti eziologici che si trasmettono da un animale all'altro principalmente durante la mungitura. Nelle mastiti ambientali i batteri coinvolti sono fortemente condizionati da fattori gestionali ed igienici d'allevamento¹⁻³. Questi microrganismi, quali *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas aeruginosa*),

Klebsiella pneumoniae, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*⁴⁻⁷, si ritrovano in abbondanza nell'ambiente in cui vivono gli animali, come nell'acqua di lavaggio, nella lettiera, nelle infrastrutture presenti in stalla, nell'impianto di mungitura. Essi possono penetrare nella ghiandola mammaria attraverso il canale del capezzolo entro 1-1,5 ore dalla mungitura, quando questo è ancora beante per il rilassamento dello sfintere^{1,3,8}. Gli stafilococchi coagulasi negativi sono da considerarsi batteri normalmente appartenenti alla microflora cutanea e occasionalmente causa di mastite come batteri opportunisti⁷. Infine i patogeni causa di mastite contagiosa, quali *Staph. aureus*, *S. agalactiae* e *Mycoplasma bovis*, possono anch'essi essere responsabili di una forma sub-clinica o clinica. Inoltre i soggetti malati possono essere dei *reservoir* importanti per la mandria^{9,10}. Al fine di ridurre l'incidenza di tale patologia, e quindi di mantenere inalterate la produttività e la qualità del latte, è importante una diagnosi precoce. L'esame batteriologico è considerato il *gold-standard* per la diagnosi eziologica di mastite^{1,3,11,12}. Tuttavia, pur rappresentando il metodo diagnostico maggiormente valido, l'esame batteriologico del latte prevede dei costi e dei tempi che non sono sempre compatibili con la routine della produzione zootecnica. Allo scopo di raggiungere una diagnosi precoce, basata però su test più economici e funzionali per la pratica di

Autore per la corrispondenza:

Micaela Sgorbini (sgorbini@vet.unipi.it).

stalla, attualmente si utilizzano sistemi di monitoraggio della produzione e dell'igiene del latte, quali la conducibilità elettrica (CE), il *California Mastitis Test* (CMT) e la conta delle cellule somatiche (CCS). Scopo del presente lavoro è stato confrontare alcuni metodi diagnostici (fisici e batteriologici) e valutarne l'indice predittivo.

MATERIALI E METODI

Animali

Il presente studio è stato eseguito presso l'allevamento intensivo di bovine da latte del Centro interdipartimentale ricerche agro-ambientali dell'Università di Pisa "Enrico Avanzi" su 54 bovine da latte di razza Frisona Italiana, di età varia e in diversi stadi di lattazione, comunque sempre superiori ai 10 giorni di lattazione. È noto che, al momento del parto, la conta delle cellule somatiche (CCS) è generalmente superiore ad 1 milione di cell/ml e decrementa progressivamente fino a 100.000 cell/ml nei primi 7-10 giorni del post-parto¹²⁻¹⁵. In letteratura si afferma che la CCS impieghi dai 5¹⁵ ai 35¹⁶ giorni *post-partum* per tornare a livelli normali. Studi più recenti hanno evidenziato la necessità di ulteriori indagini ed hanno proposto il periodo che va dal decimo al trentacinquesimo giorno del *post-partum* come momento adatto per l'esecuzione di una prima CCS di screening¹⁰.

Le bovine sono alloggiare in ampi paddock semi-coperti ed alimentate mediante somministrazione di *unifeed*, contenente insilato di mais, fieno di erba medica, fieno di primo taglio, farina di mais, farina di orzo, nucleo proteico e vitaminico, mangime composto pellettato acquistato da mangimifici. La sala di mungitura è a "spina di pesce", in unica fila, le pareti sono totalmente piastrellate e quindi lavabili, i pavimenti sono antiscivolo con delle canalette grigliate per lo scolo di deiezioni e acqua di lavaggio. La macchina mungitrice (Tecnozoop impianti srl, Lodi, Italia) è dotata di sistema informatico in grado di riconoscere ciascuna bovina nella posta di mungitura, segnala eventuali situazioni di estro nella mandria grazie ai trasponder contapassi, quantifica il latte prodotto da ciascun animale, ne registra i tempi di mungitura e calcola la conducibilità elettrica del latte di ogni vacca. La mungitrice dispone di un impianto di lavaggio automatico che viene eseguito al termine della mungitura di tutte le bovine.

Prima della mungitura, tutte le vacche sono state sottoposte ad una visita clinica generale e, in fase di mungitura, a un esame obiettivo particolare dell'apparato mammario. Sono stati inclusi nello studio gli animali che non presentavano segni clinici riconducibili a mastite clinica secondo il punteggio di Scott et al.³. Questi autori assegnano un punteggio al-

lo stato generale della bovina, all'esame obiettivo particolare della mammella, all'esame macroscopico dei primi getti di latte, alla CCS ed all'esame colturale (Tabella 1).

Campionamento

I campionamenti sono stati eseguiti in fase di pre-mungitura durante la mungitura del pomeriggio. La scelta di eseguire i campionamenti durante la mungitura della sera è legata a fattori di carattere organizzativo, sia dell'allevamento, sia dei laboratori. Mammella e capezzolo sono stati lavati con acqua corrente, asciugati accuratamente e disinfettati con delle salviette imbevute di clorexidina, quindi è stato effettuato il prelievo di latte. Durante il prelievo l'operatore ha indossato guanti in lattice monouso al fine di evitare contaminazioni mano-mammella³. Sono stati inoltre eliminati i primi getti di latte all'interno di un contenitore scuro, al fine di poter evidenziare eventuali presenze di coaguli o flocculi e di evitare di campionare il latte contenuto nel canale del capezzolo, solitamente inquinato dalla flora batterica dell'ambiente esterno^{3,11}. Per ogni bovina sono stati campionati singolarmente i 4 quarti, per un totale di 216 quarti analizzati¹⁷.

Ciascun campione è stato sottoposto a CMT (De Laval Spa, San Donato Milanese, MI, Italia) in sede di mungitura. Quindi il latte proveniente da ciascun quarto è stato raccolto in provette di PVC sterili indicando su ciascuna il numero della bovina e il capezzolo campionato (AD: anteriore destro; AS: anteriore sinistro; PD: posteriore destro; PS: posteriore sinistro). I campioni sono stati trasportati refrigerati al Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Pisa dove, entro un'ora dalla raccolta, è stata eseguita la valutazione del pH e approntato l'esame batteriologico. Per la valutazione delle cellule somatiche, invece, è stato raccolto un unico campione inserendo nel sistema di prelievo della mungitrice automatica un contenitore di PVC sterile con conservante (sodio azide). Il campione destinato alla valutazione delle CCS è stato ottenuto mediante latteprelevatore di cui dispone l'impianto di mungitura. La CCS è stata valutata presso il Laboratorio dell'Associazione Provinciale Allevatori (APA) di Pisa.

Metodi

È stato assegnato un punteggio alla valutazione qualitativa del CMT. La valutazione è stata effettuata in maniera autonoma da 2 operatori (A.S. e F.B.) ed è stata considerata la media delle due osservazioni. Test *negativo*: punteggio 1; Positività *lieve*: punteggio 2; Positività *evidente*: punteggio 3; Positività *conclamata*: punteggio 4. Secondo la letteratura, il punteggio 1 corrisponde ad una CCS fra 100 e 200.000 cell/ml, punteggio 2 fra 200 e 300.000 cell/ml, punteggio 3 fra 300.000 e 1 milione cell/ml, infine, un punteggio CMT di 4

Tabella 1 - Punteggio clinico per la diagnosi di mastite (Da Scott et al., 2011. Modificato).

	No infezione	Mastite sub-clinica	Mastite clinica grado 1	Mastite clinica grado 2	Mastite clinica grado 3
Vacca	Normale	Normale	Normale	Normale	+
Mammella	Normale	Normale	Normale	+	+
Latte	Normale	Normale	+	+	+
SCC	Normale	+	+	+	
Esame colturale	Normale	+	+	+	+

corrisponde ad una CCS >1 milione cell/ml^{19,20}. Per l'analisi statistica, è stato utilizzato per ogni vacca il punteggio più alto ottenuto tra i 4 quarti. La scelta di utilizzare il quarto con punteggio maggiore è stata fatta al fine di ridurre i falsi negativi e per ovviare al fatto di aver correlato la CCS valutata su latte proveniente da un pool dei quattro quarti con una CMT valutata per ogni singolo quarto.

Durante la fase di mungitura è stata valutata la conducibilità elettrica (CE) rilevabile dalla macchina mungitrice (Tecnozoo impianti srl, Lodi, Italia), dotata di specifici sensori. Lo stato infiammatorio modifica la composizione chimica del latte con aumento della concentrazione di Na⁺ e Cl⁻ e la riduzione del contenuto di K⁺. Tali modificazioni portano ad un cambiamento nella conducibilità elettrica del latte²⁰. Sono stati considerati patologici i valori superiori a 11 Ohm, come indicato dalla ditta produttrice (Tecnozoo impianti srl, Lodi, Italia).

Il conteggio delle cellule somatiche (CCS) è stato eseguito con metodo Fluoro-opto-elettronico a cella di flusso mediante Fossomatic™ FC (Foss Italia, Padova) per il riconoscimento del DNA cellulare. Come *cut-off* per la diagnosi di mastite è stato considerato valido un numero di cellule somatiche superiore a 200.000 cell/ml valutato sul totale dei quattro quarti²¹⁻²³.

Il pH è stato invece valutato mediante pHmetro (GLP 21, Crison Instruments, Milano, Italia). Su ogni campione proveniente da ciascun quarto sono state eseguite due misurazioni ed è stata ottenuta poi la media matematica. Quindi sono state calcolate media±deviazione standard dei pH valutati sui singoli quarti. È stato considerato come intervallo fisiologico 6,7±0,2¹¹. Per l'analisi statistica è stata utilizzata la media dei 4 quarti.

L'esame batteriologico è stato eseguito per ciascun campione di latte. Ogni campione è stato seminato tal quale per spatolamento superficiale e dopo omogeneizzazione, su agar sangue (AS) e incubato a 37°C per 24 ore in condizioni di aerobiosi. Le colonie che si sviluppavano con aloni di emolisi, parziale o totale, sono state in seguito sottoposte a colorazione di Gram e a osservazione microscopica. Le colonie riconducibili per morfologia e affinità tintoriale a stafilococchi o streptococchi sono state valutate mediante il test della catalasi e quindi seminate su terreno selettivo opportuno. Nel caso di microrganismi bacillari Gram negativi, la semina è stata effettuata su terreni selettivi specifici, quali VRBA (Violet Red Bile Agar Oxoid) con incubazione a 37° per 24 ore, TBX agar (Triptone Bile X-glucuronide Oxoid) con incubazione a 42°C per 24 ore, Agar Base incubazione a 37°C per 24 ore. Per l'analisi statistica, ogni vacca è stata considerata positiva se almeno uno dei quattro quarti era positivo e negativa se tutti i quattro quarti risultavano negativi.

Analisi statistica

Poiché la CCS è utilizzata normalmente come test di screening per la diagnosi di mastite^{12,21,22}, abbiamo analizzato la relazione tra questa variabile e le altre variabili studiate (CE, pH, CMT ed esame batteriologico). A tal fine sono stati utilizzati l'analisi di correlazione secondo Spearman e la regressione logistica effettuati tramite il programma STAT-GRAPHICS Centurion XVI.I. Non è stata valutata la correlazione tra CCS e le diverse tipologie di infezioni riscontrate perché la CCS non è stata valutata sui singoli quarti, ma su un pool.

RISULTATI

California Mastitis Test (CMT)

I risultati relativi al CMT sono riportati in Tabella 2. Sono risultate negative 26/54 bovine con una prevalenza del 48,2% e positive 28/54 (51,8%). Non sono state individuate bovine positive a tutti e quattro i quarti al momento del prelievo, 4/54 bovine sono risultate positive al CMT per 3 su quattro quarti, con una prevalenza del 7%. Sono risultate positive a due quarti 8/54 (15%) bovine e 16/54 animali (30%) sono risultati positivi al CMT per un solo quarto.

Dal punto di vista qualitativo (Tabella 3), 176/216 quarti sono risultati negativi (punteggio 1), con una prevalenza del 81,5%. Trentasei/216 (16,7%) quarti hanno presentato una positività lieve (punteggio 2) e 4/215 (1,8%) quarti positività evidente (punteggio 3). Non sono state evidenziate positività conclamate (punteggio 4) in nessun quarto campionato.

Conducibilità elettrica

Secondo i risultati ottenuti sulla conducibilità elettrica (CE) (Tabella 4), 35/54 (64,8%) bovine hanno presentato una CE inferiore a 11 Ohm, risultando quindi non affette da mastite, mentre 19/54 (35,2%) animali presentavano una CE di massa superiore a 11 Ohm. Questi animali, quindi, sono stati considerati affetti da mastite.

Cellule somatiche

I risultati relativi alla CCS, valutati sul pool dei quattro quarti di ciascuna vacca, sono riportati in Tabella 5. Diciannove/54 (35,2%) bovine hanno riportato valori di cellule somatiche >200.000/ml, mentre 35/54 (64,8%) hanno riportato valori di cellule somatiche <200.000/ml.

pH

Relativamente al pH (Tabella 6) 47/54 (87%) vacche presentavano valori di pH del latte di 6,7±0,2, mentre non rientravano in questo range 7/54 (13%) bovine. In particolare, 2/54 animali (3,7%) presentavano un aumento del pH relativo a

Tabella 2 - Prevalenza quarti positivi al CMT.

California Mastitis Test	
Quarti	Prevalenza
Negativi	26/54 (48%)
Positivi 1/4 quarti	16/54 (30%)
Positivi 2/4 quarti	8/54 (15%)
Positivi 3/4 quarti	4/54 (7%)
Positivi 4/4 quarti	0/54 (0%)

Tabella 3 - Grado di positività, punteggio e prevalenza di positività al CMT su 216 quarti campionati.

California Mastitis Test		
Positività	Punteggio	Prevalenza
Negativa	1	176/216 (81,5%)
Positività lieve	2	36/216 (16,7%)
Positività evidente	3	4/216 (1,8%)
Positività conclamata	4	0/216 (0%)

Tabella 4 - Risultati della conducibilità elettrica ottenuti sul totale dei quattro quarti per ogni capo bovino incluso nello studio.

n.ro vacca	CE	n.ro vacca	CE	n.ro vacca	CE	n.ro vacca	CE
1	11,3	15	11,7	29	10,7	43	8,9
2	10,9	16	10	30	9,9	44	11,3
3	12	17	11,7	31	10,4	45	10,3
4	10,3	18	12,3	32	11,3	46	10,7
5	11,2	19	9,6	33	10,7	47	10
6	10,3	20	11,3	34	10,4	48	11,1
7	9,8	21	10,7	35	10,4	49	9,9
8	10,7	22	10,4	36	11,1	50	10,2
9	11,3	23	11,1	37	10,4	51	10,3
10	10,4	24	13,1	38	9,6	52	11,8
11	10,4	25	10,2	39	10,3	53	10
12	10,9	26	11,7	40	9,9	54	11,4
13	11,7	27	10,3	41	9,8		
14	9,3	28	12,3	42	8,9		

Tabella 5 - Numero di cellule somatiche sul totale dei quattro quarti per ogni capo bovino incluso nello studio.

CCS (cell.10 ³ /ml)							
n.ro vacca	CCS	n.ro vacca	CCS	n.ro vacca	CCS	n.ro vacca	CCS
1	23	15	197	29	59	43	308
2	262	16	20	30	33	44	23
3	152	17	3783	31	1892	45	81
4	96	18	453	32	106	46	129
5	206	19	133	33	3103	47	151
6	61	20	192	34	150	48	206
7	321	21	81	35	143	49	43
8	111	22	59	36	238	50	200
9	348	23	58	37	278	51	44
10	125	24	866	38	432	52	86
11	326	25	865	39	23	53	160
12	150	26	397	40	128	54	33
13	134	27	404	41	377		
14	34	28	854	42	106		

Tabella 6 - Risultati del pH, espressi in media (X) ± deviazione standard (DS). Legenda - Tot: media totale ottenuta sui 4 quarti; A: pH ottenuto dal quarto anteriore sinistro; B: pH ottenuto dal quarto anteriore destro; C: pH ottenuto dal quarto posteriore sinistro; D: pH ottenuto dal quarto posteriore destro.

Valutazione pH											
	A	B	C	D	X±DS tot		A	B	C	D	X±DS tot
1	6,8	6,8	6,7	6,8	6,8±0,02	28	6,7	6,8	6,7	6,9	6,9±0,07
2	6,7	6,7	6,7	6,8	6,7±0,03	29	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7±0,00
3	6,7	6,7	6,7	6,9	6,8±0,10	30	6,8	6,9	6,8	6,8	6,8±0,02
4	6,7	6,7	6,6	6,7	6,7±0,05	31	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7±0,01
5	6,8	7,3	6,8	6,8	6,9±0,23	32	6,7	7,4	6,7	6,8	6,9±0,35
6	6,9	6,8	6,9	6,8	6,8±0,02	33	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9±0,02
7	6,7	6,8	6,8	6,8	6,8±0,04	34	6,6	6,6	6,5	6,6	6,6±0,07
8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8±0,00	35	6,7	6,7	6,8	6,8	6,8±0,03
9	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8±0,02	36	6,8	6,8	6,9	6,8	6,8±0,03
10	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8±0,00	37	6,9	6,8	6,9	6,8	6,8±0,02
11	6,8	6,9	7,2	6,8	6,9±0,15	38	6,7	6,7	6,8	6,7	6,7±0,03
12	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7±0,02	39	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6±0,02
13	7,0	7,0	7,0	6,9	7,0±0,60	40	6,7	6,7	6,8	6,7	6,7±0,02
14	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8±0,02	41	7,2	6,7	6,8	6,8	6,9±0,20
15	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8±0,03	42	6,7	6,8	6,7	6,7	6,7±0,02
16	6,7	6,7	6,6	6,7	6,7±0,03	43	6,8	6,7	6,8	6,8	6,8±0,03
17	6,9	7,0	6,9	7,0	6,9±0,07	44	6,8	6,8	6,7	6,7	6,7±0,01
18	6,7	6,7	6,7	6,6	6,7±0,04	45	6,8	-	6,8	6,8	6,8±0,01
19	6,7	6,8	6,8	6,8	6,8±0,03	46	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8±0,04
20	6,8	6,8	6,8	6,7	6,9±0,03	47	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8±0,01
21	6,7	6,8	6,8	6,8	6,7±0,06	48	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9±0,04
22	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8±0,02	49	6,7	6,8	6,8	6,8	6,8±0,04
23	6,7	6,8	6,8	6,6	6,7±0,06	50	6,8	6,7	6,7	6,7	6,7±0,03
24	6,8	6,8	6,8	6,9	6,8±0,07	51	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8±0,00
25	6,7	6,8	6,8	6,8	6,8±0,03	52	6,7	6,6	6,8	6,7	6,7±0,08
26	6,6	6,7	6,7	6,7	6,7±0,03	53	6,7	6,6	6,7	6,8	6,7±0,07
27	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7±0,02	54	6,7	6,7	6,8	6,8	6,8±0,01

su 4 quarti; 1/54 (1,8%) bovine presentavano un aumento del pH per 3 su 4 quarti, infine, 4/54 (7,5%) animali presentavano un aumento del pH di tutti e 4 i quarti. Dei 7 animali con pH medio alterato 5/7 presentavano un aumento delle CCS.

Esame batteriologico

L'esame batteriologico del latte (Tab. 7) è risultato negativo in 23/54 (42,5%) bovine. Dieci/54 bovine (18,5%) presentavano positività al campione di latte proveniente da 1 quarto su 4; 5/54 (9%) bovine sono risultate positive per 2 su 4 quarti e per 3 su 4 quarti. Infine 11/54 (20%) bovine sono risultate positive all'esame batteriologico per tutti i quarti. Per quanto riguarda la raccolta dei dati qualitativi dell'esame batteriologico (Tabella 8) sono risultati negativi 137/216 quarti con una prevalenza del 63%. Sono risultati, invece, positivi a Stafilococchi coagulasi negativi 52/216 (24,5%) quarti; 21/216 (10%) quarti presentavano una positività per batteri Coliformi, 3/216 (1,5%) quarti erano invece positivi a *E. coli*. Infine 1/216 (0,5%) quarti è risultato positivo a *S. marcescens* e 1/216 (0,5%) quarti è risultato positivo a Stafilococchi coagulasi positivi.

Analisi statistica

L'analisi di correlazione di Spearman ha mostrato una correlazione positiva significativa tra il parametro CCS e CMT ($p = 0,0027$, $r_2 = 0,20$). L'analisi di correlazione di Spearman non ha mostrato correlazioni significative tra il parametro CCS e le variabili CE, pH ed esame batteriologico ($p > 0,05$). I risultati dell'adattamento di un modello di regressione logistica per descrivere la relazione tra CCS e le 4 variabili indipendenti considerate nel presente studio ha mostrato che esiste una correlazione significativa tra la variabile CCS e le variabili CMT ed esame batteriologico rispettivamente per $p < 0,02$ e $< 0,04$. Il modello di regressione stimato indica che la probabilità di avere CCS > 200.000 cell/ml con un punteggio di CMT pari a 2 è di livello 1, mentre la probabilità di avere CCS > 200.000 cell/ml con un punteggio di CMT pari a

1 è 1,44. La probabilità di avere CCS > 200.000 cell/ml con un esame batteriologico positivo rispetto alla probabilità di avere CCS > 200.000 cell/ml con un batteriologico negativo è pari a 1,62.

DISCUSSIONE

Le mastiti rappresentano una delle patologie a più alto impatto sociale, economico, zootecnico e veterinario nell'allevamento della vacca da latte^{8,12}. Esse sono caratterizzate da cambiamenti fisici, chimici e batteriologici del latte, nonché da cambiamenti patologici a livello della mammella e del capezzolo²⁴. La conta delle cellule somatiche (CCS) è stata ampiamente descritta in letteratura come uno dei test di valutazione più attendibili per la diagnosi di mastite, sia conclamata che subclinica, sia nella mandria, che nella singola bovina, e per la valutazione delle caratteristiche sanitarie del latte vaccino^{8,12}.

Il Reg. CE 853/2004 indica 400.000 cell/ml come *cut-off* per la sanità del latte destinato al consumo umano. Il limite delle CCS indicate ai fini ispettivi, però, può essere diverso rispetto al *cut-off* per la diagnosi di mastite. In letteratura è stato indicato un *cut-off* di in 200.000 cell/ml per il singolo quarto e 400.000 cell/ml per il latte di massa^{4,8,12,22,24-26} e in più di 200.000 cell/ml per la mastite sub-clinica²². In un recente lavoro, gli autori¹² riportano che, con valori di CCS superiori a 200.000 cell/ml, aumenta in modo significativo la positività del latte all'esame batteriologico. Sempre in un recente lavoro, gli autori riportano una probabilità 20,4 volte superiore che soggetti con CCS > 200.000 cell/ml siano infetti da un patogeno maggiore rispetto ad essere non infetti e una probabilità 5,6 volte maggiore di essere infetti da un patogeno minore sempre rispetto ad essere non infetti²⁷. Arrigoni (2010)²⁸ definisce la mastite latente come un'infezione caratterizzata da una CCS < 200.000 cell/ml e nessun segno clinico ed una mastite sub-clinica l'infezione senza sintomatologia clinica, ma con una CCS > 200.000 cell/ml. Il 35,2% degli animali inclusi nel presente studio, pur non mostrando manifestazione clinica di mastite, presentava una CCS > 200.000 cell/ml. I nostri risultati mostrano che il 35,2% delle bovine incluse nello studio era affetto da mastite sub-clinica secondo i criteri internazionali^{12,13} confermando che la CCS sia un'indagine valida per la diagnosi delle forme latenti e subcliniche.

Per la diagnosi di mastite, e in generale di scarsa igiene del latte, sono disponibili in commercio alcuni test da campo, che possono essere utilizzati direttamente in sala mungitura, come ad esempio il California Mastitis test (CMT), il Sodium Lauryl Sulphate Test (SLST), il Surf Field Mastitis Test (SFMT) e il White Side Test (WST). Questi test hanno il vantaggio di essere di semplice esecuzione per gli operatori in campo e con risultati ottenibili immediatamente. L'utilizzo del California Mastitis Test è risultato agevole e di facile esecuzione ed interpretazione per gli autori di questo studio. Nel nostro lavoro il 48,2% dei soggetti era negativo al CMT, mentre il restante 51,8% era positivo per almeno uno dei quattro quarti. La prevalenza di vacche con mastite individuate con il CMT nella nostra indagine è più elevata della prevalenza individuata con il conteggio delle cellule somatiche (51,8% vs 35,2%). Questo dato crediamo sia imputabile al fatto che, nel nostro studio, abbiamo considerato "mastiti-

Tabella 7 - Prevalenza di positività all'esame batteriologico delle 54 vacche incluse nello studio.

Quarti	Prevalenza
Negativi	23/54 (42,5%)
Positivi 1/4 quarti	10/54 (18,5%)
Positivi 2/4 quarti	5/54 (9%)
Positivi 3/4 quarti	5/54 (9%)
Positivi 4/4 quarti	11/54 (20%)

Tabella 8 - Risultati qualitativi dell'esame batteriologico eseguito su 216 quarti.

Batteri isolati	Prevalenza
Stafilococchi coagulasi negativi	53/216 (24,5%)
Coliformi	21/216 (10%)
<i>Escherichia coli</i>	3/216 (1,5%)
<i>Serratia marcescens</i>	1/216 (0,5%)
Stafilococchi coagulasi positivi	1/216 (0,5%)

Tabella 9 - Risultati relativi al californian mastitis test (CMT), conducibilità elettrica (CE), conta cellule somatiche (CCS) ed esame batteriologico effettuato su 54 bovine da latte incluse nello studio. Legenda - A: quarto anteriore sinistro; B: quarto anteriore destro; C: quarto posteriore sinistro; D: quarto posteriore destro.

Vacca	CMT				CE	pH (X±DS)	CCS (cell.10 ³ /ml)	Batteriologico				Vacca	CMT				CE	pH (X±DS)	CCS (cell.10 ³ /ml)	Batteriologico			
	A	B	C	D				A	B	C	D		A	B	C	D				A	B	C	D
1	1	1	1	1	11,3	6,8±0,02	23	+	-	-	-	28	1	1	1	2	12,3	6,9±0,07	854	+	+	+	-
2	2	1	2	2	10,9	6,7±0,03	262	+	+	+	+	29	1	1	1	1	10,7	6,7±0,00	59	-	-	-	-
3	1	1	1	2	12	6,8±0,10	152	-	-	+	+	30	1	1	1	1	9,9	6,8±0,02	33	-	-	+	-
4	1	2	1	1	10,3	6,7±0,05	96	-	+	-	-	31	1	1	1	1	10,4	6,7±0,01	1892	+	+	+	+
5	1	2	2	2	11,2	6,9±0,23	206	-	-	-	-	32	1	2	1	1	11,3	6,9±0,35	106	-	-	-	-
6	1	1	1	1	10,3	6,8±0,02	61	+	+	+	+	33	1	2	1	1	10,7	6,9±0,02	3103	+	-	+	-
7	1	2	1	2	9,8	6,8±0,04	321	+	-	-	-	34	1	1	1	1	10,4	6,6±0,07	150	-	-	+	-
8	1	1	1	1	10,7	6,8±0,00	111	-	-	-	-	35	1	1	1	2	10,4	6,8±0,03	143	-	-	-	-
9	2	1	1	1	11,3	6,8±0,02	348	+	+	+	+	36	1	1	1	1	11,1	6,8±0,03	238	-	+	-	-
10	1	1	1	1	10,4	6,8±0,00	125	+	-	-	-	37	2	2	1	1	10,4	6,8±0,02	278	-	-	-	-
11	1	2	3	2	10,4	6,9±0,15	326	-	-	-	-	38	1	1	2	1	9,6	6,7±0,03	432	+	-	+	+
12	2	1	1	2	10,9	6,7±0,02	nn	+	+	+	+	39	1	1	1	1	10,3	6,6±0,02	23	-	-	-	-
13	1	1	2	2	11,7	7,0±0,60	134	-	-	-	-	40	1	1	1	1	9,9	6,7±0,02	128	+	+	-	-
14	1	1	1	1	9,3	6,8±0,02	34	-	-	-	-	41	2	1	1	1	9,8	6,9±0,20	377	+	-	+	+
15	1	1	1	1	11,7	6,8±0,03	197	-	-	-	-	42	1	1	2	2	8,9	6,7±0,02	106	-	+	-	-
16	1	1	1	1	10	6,7±0,03	20	+	-	+	+	43	1	1	1	3	8,9	6,8±0,03	308	-	-	-	-
17	2	2	1	3	11,7	6,9±0,07	3783	-	-	-	-	44	1	1	1	1	11,3	6,7±0,01	23	-	-	-	-
18	1	1	1	1	12,3	6,7±0,04	453	+	+	+	+	45	1		1	1	10,3	6,8±0,01	81	-	-	-	-
19	1	1	1	2	9,6	6,8±0,03	133	-	-	-	-	46	1	1	1	2	10,7	6,8±0,04	129	-	-	-	-
20	1	1	1	1	11,3	6,9±0,03	192	-	-	-	-	47	1	1	1	1	10	6,8±0,01	151	+	+	+	+
21	1	3	1	1	10,7	6,7±0,06	81	+	+	+	+	48	1	1	1	1	11,1	6,9±0,04	206	-	-	-	-
22	1	1	1	1	10,4	6,8±0,02	59	-	-	-	-	49	1	1	1	1	9,9	6,8±0,04	43	+	+	+	+
23	1	2	1	1	11,1	6,7±0,06	58	+	+	+	+	50	1	1	1	1	10,2	6,7±0,03	200	-	-	-	-
24	1	2	1	2	13,1	6,8±0,07	866	-	+	+	+	51	1	1	1	1	10,3	6,8±0,00	44	-	-	-	-
25	2	1	2	1	10,2	6,8±0,03	865	-	+	-	+	52	1	1	1	1	11,8	6,7±0,08	86	+	+	+	+
26	1	1	1	1	11,7	6,7±0,03	397	-	-	+	-	53	1	1	1	1	10	6,7±0,07	160	+	-	-	+
27	1	1	1	2	10,3	6,7±0,02	404	-	-	-	+	54	1	1	1	1	11,4	6,8±0,01	33	-	-	-	-

che” anche le vacche con un solo quarto positivo al CMT. Considerando che la CCS è il risultato dell’analisi del latte proveniente dai 4 quarti, è possibile che le vacche con CMT alterato ad una sola mammella avessero comunque una CCS bassa. L’analisi statistica, però, ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa tra CMT e CCS con un indice di probabilità elevato di avere CCS >200.000 cell/ml con un MCT pari a 2. Quindi dai nostri risultati possiamo confermare che il CMT è da considerare un buon test di screening per diagnosi di mastite sub-clinica, semplice da utilizzare e poco costoso per l’allevatore. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per $p < 0,05$.

I nostri risultati relativi alla CE mostrano valori superiori a 11 Ohm nel 35,2% delle vacche incluse nello studio, prevalenza paragonabile a quella rilevata con la CCS. In letteratura è riportata una correlazione positiva, ma non molto elevata, tra i valori di CE del latte e i valori di cellule somatiche (CS), considerando però come *cut-off* 400.000 cell/ml²⁹. Nel nostro studio, non abbiamo evidenziato una correlazione statisticamente significativa tra CCS e CE. Probabilmente la diversità dei nostri risultati rispetto a quanto riportato da al-

tri autori può essere legata all’utilizzo nel presente studio di un *cut-off* più basso (200.000 vs 400.000 cell/ml). Quindi dai nostri risultati possiamo supporre che l’utilizzo della CE nella diagnosi di mastiti sub-cliniche porti ad avere dei falsi negativi. Questa ipotesi è supportata da altri autori che considerano l’utilizzo della CE come test di screening per la diagnosi di mastite poco attendibile perché molto variabile in sensibilità e specificità tra uno strumento e l’altro³⁰.

La valutazione del pH dei campioni di latte ha identificato mastiti nel 7,4% delle bovine incluse nel presente studio, prevalenza nettamente inferiore se confrontata con quella individuata dalla valutazione della CCS (35,2%), con un’alta incidenza di falsi negativi. Inoltre, l’analisi statistica non ha evidenziato una correlazione tra CCS e pH, confermando quindi che questo test non sembra essere un metodo di valutazione adeguato per lo screening diagnostico tra bovine con mastite e sane, come già riportato in bibliografia³¹.

Nel nostro studio, l’esame batteriologico è risultato positivo per almeno 1 su 4 quarti per il 57,5% delle bovine, prevalenza simile a quanto riportato da altri autori^{32,33}. Anche i risultati relativi ai tipi di batteri isolati nel nostro studio sono

compatibili con quanto riportato in letteratura^{3-4,32}. La prevalenza più elevata (24,5%) è risultata quella degli Stafilococchi coagulasi negativi (SCN)^{32,33}. I più comuni tra questi sono *S. epidermidis*, *S. chromogenes* e *S. haemolyticus* e sono tutti patogeni opportunisti presenti sull'epidermide degli animali³. L'11,5% dei campioni positivi era rappresentato da batteri coliformi (10%) ed *E. coli* (1,5%), tipici patogeni ambientali che ritroviamo comunemente negli spazi in cui vivono le bovine e che possono penetrare nella mammella nel periodo di tempo fra una mungitura e la successiva^{2,3}. In particolare, i coliformi tipizzati sono stati: *Enterobacter aerogenes* in 1/216 (0,5%) quarti analizzati, *Citrobacter freundii* in 5/216 (2,3%), *Citrobacter braaki* in 3/216 (1,4%), *Klebsiella oxytoca* in 9/216 (4,2%) e *Klebsiella pneumoniae* in 3/216 (1,4%). Tutti i coliformi tipizzati possono essere responsabili di mastite di tipo ambientale³. Infine, l'1% dei quarti era positivo per *S. marcescens*, batterio che può conferire al latte una tipica colorazione rosa³⁴ e per Stafilococchi coagulasi positivi. A nostro avviso l'isolamento di *S. marcescens* da un solo quarto senza evidenziare mai una modificazione della colorazione del latte proveniente dal quarto stesso potrebbe essere imputato ad una contaminazione del campione. In particolare, poiché questo batterio è diffuso nell'acqua, la contaminazione potrebbe essere stata secondaria ad una non accurata asciugatura del capezzolo dopo il lavaggio in fase di pre-mungitura³⁵. L'analisi statistica ha evidenziato che esiste una probabilità elevata di avere un esame batteriologico positivo con una valutazione delle cellule somatiche >200.000 cell/ml, avvalorando ulteriormente l'importanza dell'utilizzo della CCS come screening per la diagnosi di mastite clinica e sub-clinica.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il prof. Marco Mazzoncini, Direttore Del Centro Interdipartimentale di Ricerche Agro-Alimentari "E. Avanzi", San Piero a Grado, Pisa.

■ Mastitis in dairy cattle: a comparison of some screening tests and bacteriology

SUMMARY

Aim - The aim of the present paper was to compare some screening tests, such as California Mastitis Test (CMT), pH, somatic cell count (SCC), electrical conductivity (EC), and bacteriology for diagnosis of mastitis in dairy cattle. The second aim of this work was to evaluate the predictive index of CMT, pH, SCC, EC and bacteriological exam for the diagnosis of mastitis in dairy cattle.

Materials and methods - Fifty-four Frisian cows of different age were included in the present study. Udder was evaluated clinically in all the animals. Milk samples were collected during the evening milking. Electrical conductivity has been evaluated directly in the milking room by the milking machine, along with California Mastitis Test (CMT). Then milk samples have been collected in sterile tubes from each quarter. Samples have been refrigerated at 4°C and evaluated within one hour for bacteriology and milk pH. Milk samples for SCC have been collected in PVC bottles added with a pre-

servative and specimens have been processed in the Breeder County Association laboratory (Associazione Provinciale Allevatori - APA).

Results - No dairy cattle included in the present study showed clinical signs of mastitis. Clinical score was compatible with healthy animals or with animals affected by sub-clinical mastitis. Our results showed a CMT positive in 28/54 cattle. Electrical conductivity was higher than 11 Ohm in 19/54 animals and somatic cell count (SCC) was higher than >200.000/ml in 19/54 animals; pH was changed in 4/54 dairy cattle. The bacteriological exam was positive in 10/54 dairy cattle. Bacteria isolated were predominantly environmental pathogens. Statistical analysis showed a positive predictive index for SCC and bacteriology.

Conclusions - Statistical analysis showed a high probability to have a positive bacteriological culture if SCC was higher than 200.000 cell/ml. These results support the accuracy of SCC as a screening test for the diagnosis of sub-clinical mastitis and for clinical mastitis in association with a modified milk secretion and/or a modified udder. CMT also has been proved as a good screening test to be used during milking in all the animals with suspect mastitis.

KEY WORDS

Dairy cattle, mastitis, CMT, SCC, bacteriology.

Bibliografia

1. Cullor S.J., Tyler J.W. (2002) Mammary gland health and disorders In: Large Animal International Medicine, ed. Smith B.P., 2nd ed., 1019-1037, Mosby-year book, St. Louis, USA.
2. Morin D.E. (2009) Mammary gland health and disorders. In: Large Animal International Medicine, ed. Smith B.P., 4th ed, 1112-1143, Mosby Elsevier, USA.
3. Scott P.R., Penny C.D., Macrae A.I. (2011) Mastitis and teat diseases. In: Cattle Medicine, eds Scott P.R., Penny C.D., Macrae A.I., 1st ed, 216-235, Manson Publishing Ltd, UK.
4. Olechnowicz J., Jaskowski J.M. (2012) Somatic cells count in cow's bulk tank milk. J Vet Med Sci, 74(6): 681-686.
5. Reksen O., Gröhn Y.T., Barlow J.W., Schukken Y.H. (2012) Transmission dynamics of intramammary infections with coagulase-negative staphylococci. J Dairy Sci, 95(9): 4899-910.
6. Dufour S., Dohoo I.R., Barkema H.W., Descôteaux L., Devries T.J., Reyher K.K., Roy J.P., Scholl D.T. (2012) Epidemiology of coagulase-negative staphylococci intramammary infection in dairy cattle and the effect of bacteriological culture misclassification. J Dairy Sci, 95(6): 3110-24.
7. Schukken Y.H., González R.N., Tikofsky L.L., Schulte H.F., Santisteban C.G., Welcome F.L., Bennett G.J., Zurakowski M.J., Zadoks R.N. (2009) CNS mastitis: nothing to worry about? Vet Microbiol, 134: 9-14.
8. Viguier C., Arora S., Gilmartin N., Welbeck K., O'Kennedy R. (2009) Mastitis detection: current trends and future perspectives. Trends Biotechnol, 27(8): 48.
9. Kromker V., Pfannenschmidt F., Helmke K., Andersson R., Grabowski N.T. (2012) Risk factors for intramammary infections and subclinical mastitis in post-partum dairy heifers. J Dairy Res, 79: 304-309.
10. De Vliegher S., Fox L.K., Piepers S., McDougall S., Barkema H.W. (2012) Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. J Dairy Sci, 95: 1025-1040.
11. Rebhun W.C. (1995). Diseases of the teats and udder. In: Diseases in Dairy Cattle, ed Rebhun W.C., 253-308, Lea & Febiger, USA.
12. Sharma N., Singh N.K., Bhadwal M.S. (2011) Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. Asian-Aust J Anim Sci, 24(3): 429-438.
13. Jensen D.L., Eberhart R.J. (1981) Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. Am J Vet Res, 42(5): 743-747.
14. Barkema H.W., Deluyker H.A., Shukken Y.H., Lam T.J.G.M. (1999) Quarter-milk somatic cell count at calving and at the first six milkings after calving. Prev Vet Med, 38: 1-9.
15. Reichmuth J. (1975) Somatic cell counting - Interpretation of results. In: Proc Seminar on Mastitis Control, 7- 11 April, Reading. International Dairy Federation, Brussels, Document 85: 93-109.

16. Sheldrake R.F., Hoare R.J.T., McGregor G.D. (1983) Lactation stage, parity and infection affecting somatic cells, electrical conductivity and serum albumin in milk. *J Dairy Sci*, 66: 542-547.
17. National Mastitis Council (1999) Pages 171-173 in *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. rev. ed. Natl. Mastitis Council, Inc., Madison, WI.
18. Baştan A., Kaymaz M., Findik M., Erünal N. (1997) The use of electrical conductivity, somatic cell count and california mastitis test in diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *Ank Univ Vet Fak Derg*, 44: 1-6.
19. Kaşıkçı G., Çentin Ö., Bingöl E.B., Gündüz M.C. (2012) Relations between electrical conductivity, somatic cell count, California mastitis test and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *Turk J Vet Anim Sci*, 36(1): 49-55.
20. Pyörälä S. (2003) Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res*, 34: 565-578.
21. International Dairy Federation (1997) Recommendations for presenting of mastitis related data. *IDF Bulletin* 321, 7-25, Brussels, Belgium.
22. International Dairy Federation (1999) Suggested interpretation of mastitis terminology. *IDF Bulletin* 338, 3-26, Brussels, Belgium.
23. Schepers A.J., Lam T.J., Schukken Y.H., Wilmink J.B., Hanekamp W.J. (1997) Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J Dairy Sci*, 80(8): 1833-1840.
24. Sharma, N. (2007) Alternative approach to control intramammary infection in dairy cows - A review. *Asian J Anim Vet Adv*, 2(2): 50-62.
25. Schukken Y.H., Wilson D.J., Welcome F., Garrison-Tikofsky L., Gonzalez R.N. (2003) Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res*, 34(5): 579-596.
26. Hillerton J.E. (1999) Redefining mastitis based on somatic cell count. *IDF Bulletin*, 345: 4-6.
27. Pantoja J.C.F., Hulland C., Ruegg P.L. (2009) Dynamics of somatic cell counts and intramammary infections across the dry period. *Prev Vet Med*, 90: 43-54.
28. Arrigoni N. (2010). Aggiornamento sulle principali cause di mastite infettiva. Corso di aggiornamento "Parametri igienico-sanitari del latte bovino: problematiche connesse con il controllo e l'autocontrollo in azienda". 21-22 aprile, Reggio Emilia, Italia.
29. Molinari C., Petrera F., Calamari L. (2008) I sistemi di monitoraggio a distanza della mandria. Dossier: l'allevamento delle bovine da latte. *Agricoltura*, settembre: 74-77.
30. Pisoni G. (2007) Diagnostica. In: *La mastite nell'allevamento della bovina da latte. I manuali pratici di professione allevatore*. 1st ed, Point Veterinaire Italie ed, Milano, Italia.
31. Bansal BK, Hamann J, Grabowskit NT, Singh KB (2005). Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. *J Dairy Res*, 72(2):144-52.
32. Rampino M.L., Correa M.T., Meier A., Anderson K.L. (2006) Analysis of milk somatic cell counts (SCC) of dairy heifers in early lactation from Cherry Dairy farm. *Proceedings of the 6th Mid-Atlantic Dairy Grazing Conference: October 31-November 1*.
33. Pyörälä S., Taponen S. (2009) Coagulase-negative staphylococci - Emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol*, 134(1-2): 3-8.
34. Alberghini L., Tallone G., Giaccone V. (2010). Un caso di nuova alterazione cromatica della ricotta. *A.I.V.I.*, 8: 7-10.
35. Schukken Y.H., Chuff M., Moroni P., Gurjar A., Santisteban C., Welcome F., Zadoks R. (2012) The "other" gram-negative bacteria in mastitis: *Klebsiella*, *Serratia*, and more. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 28(2): 239-25.