



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN PRODUZIONI ANIMALI
INNOVATIVE E SOSTENIBILI

MASTITE BOVINA: DIAGNOSI E PROSPETTIVE FUTURE

MASTITIS IN DAIRY CATTLE: DIAGNOSIS AND FUTURE PERSPECTIVES

RELATORE:

Chiar.ma Prof. Maria Cristina OSSIPRANDI

LAUREANDA:

Irene DEMOZZI

ANNO ACCADEMICO: 2025 – 2026

Abstract italiano

La mastite bovina rappresenta la patologia più diffusa e economicamente rilevante negli allevamenti da latte a livello mondiale, sostenuta da un'ampia varietà di agenti eziologici suddivisi in patogeni contagiosi (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*) e ambientali (streptococchi ambientali, coliformi). La malattia costituisce inoltre il principale determinante del consumo di antimicrobici negli allevamenti da latte, con rilevanti implicazioni per l'antibiotico-resistenza nella prospettiva One Health. Dopo aver inquadrato anatomia e fisiologia della ghiandola mammaria, classificazione clinica, eziologia, epidemiologia, diagnosi, antibiotico-resistenza e nuove prospettive terapeutiche della malattia, la presente tesi propone uno studio sperimentale sulla distribuzione dei patogeni isolati presso il laboratorio IZSve di Trento nel 2025. Sono stati analizzati 10.813 campioni di latte bovino valutabili (su 11.002 processati, 401 allevamenti) mediante esame batteriologico standard; la distribuzione stagionale è stata valutata con test del Chi-quadrato e un'analisi di sensibilità azienda-stagione per il controllo dell'effetto cluster. Il 44,5% dei campioni è risultato positivo (5.385 isolamenti), con predominanza di patogeni minori/opportunisti (53,05%) e ambientali (30,62%) sui contagiosi (15,75%); gli stafilococchi coagulasi-negativi sono il reperto più frequente (49,34%). La significatività stagionale osservata sui singoli campioni ($\chi^2=167,00$; $p<0,001$) decade dopo correzione per l'effetto azienda ($\chi^2=30,56$; $p=0,167$), escludendo una reale stagionalità. I risultati confermano lo spostamento del profilo eziologico verso patogeni minori e ambientali e supportano un approccio gestionale basato su igiene ambientale e terapia selettiva della messa in asciutta.

Abstract inglese

Bovine mastitis represents the most widespread and economically significant disease in dairy herds worldwide, caused by a wide variety of etiological agents divided into contagious pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*) and environmental pathogens (environmental streptococci, coliforms). The disease is also the main driver of antimicrobial consumption on dairy farms, with significant implications for antimicrobial resistance from a One Health perspective. After outlining the anatomy and physiology of the mammary gland, clinical classification, etiology, epidemiology, diagnosis, antimicrobial resistance and emerging therapeutic approaches to the disease, this thesis presents an experimental study on the distribution of pathogens isolated at the IZSve laboratory in Trento in 2025. A total of 10,813 evaluable bovine milk samples (out of 11,002 processed, from 401 farms) were analyzed using the standard bacteriological culture method; seasonal distribution was assessed by means of the Chi-square test and a farm-season sensitivity analysis to control for the clustering effect. Overall, 44.5% of the samples tested positive (5,385 isolates), with a predominance of minor/opportunistic pathogens (53.05%) and environmental pathogens (30.62%) over contagious pathogens (15.75%); coagulase-negative staphylococci were the most frequent finding (49.34%). The seasonal significance observed at the individual-sample level ($\chi^2=167.00$; $p<0.001$) disappeared after correcting for the farm effect ($\chi^2=30.56$; $p=0.167$), ruling out a genuine seasonal pattern. These findings confirm the shift of the etiological profile toward minor and environmental pathogens and support a management approach based on housing hygiene and selective dry cow therapy.

Indice:

Abstract italiano	3
Abstract inglese	4
1 introduzione	6
2 Anatomia e fisiologia della ghiandola mammaria	7
3 Classificazione mastite bovina	10
3.1 mastite clinica e subclinica	10
3.2 Mastite subacuta, acuta, iperacuta e cronica	12
3.3 Mastite ambientale e contagiosa	14
3.4 Patogenesi della mastite	15
4 Principali agenti eziologici	23
4.1 Patogeni contagiosi	24
4.2 Patogeni ambientali	29
5 Epidemiologia e fattori di rischio	43
6 La diagnosi della mastite bovina	53
6.1 Diagnosi clinica e indiretta	54
6.2 Diagnostica eziologica microbiologica e molecolare	59
6.3 Diagnostica rapida, sensoristica e automazione	66
7 Antibiotico-resistenza nella gestione della mastite	71
7.1 Principali fenotipi di resistenza nei patogeni della mastite	76
7.2 <i>One Health e antimicrobial stewardship</i>	78
8 Nuove prospettive terapeutiche e strategie innovative	83
8.1 Immunomodulazione e vaccini di nuova generazione	87
8.2 Trattamenti biologici avanzati e antibiofilm	93
9 Obiettivi dello studio	97
10 Materiali e metodi	98
11 Risultati	103
12 Discussione	112
13 Conclusioni	121
14 Bibliografia	122

1 introduzione

La mastite bovina è un'infezione della ghiandola mammaria in grado di compromettere lo stato di salute della mammella, nonché la quantità e la qualità del latte prodotto (Tommasoni et al., 2023). A livello mondiale, rappresenta la malattia più frequente e impattante per i bovini da latte, oltre ad essere la causa principale di significative perdite economiche per il settore (Tommasoni et al., 2023; Abdi et al., 2021). L'insorgenza della malattia è legata a diversi microrganismi, i principali patogeni contagiosi sono: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma bovis*. I patogeni ambientali includono invece i coliformi *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, gli streptococchi ambientali invece sono *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *Trueperella pyogenes* e gli stafilococchi non-aureus (Abdi et al., 2021). L'azione di questi microrganismi determina un aumento del conteggio delle cellule somatiche (SCC: *Somatic Cell Count*) nel latte (Abdi et al., 2021).

Sebbene il trattamento antimicrobico sia essenziale per ridurre l'SCC e ripristinare gli standard qualitativi, la mastite è responsabile di circa il 60-70% di tutti gli antibiotici somministrati negli allevamenti. Un uso eccessivo o improprio di tali farmaci rischia tuttavia di favorire l'insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza.

Di conseguenza, una diagnosi tempestiva e accurata diventa cruciale: non solo per ridurre i costi diretti e indiretti legati al calo produttivo e alla rimozione precoce degli animali dalla rimonta, ma si rivela essenziale per la salute pubblica considerando che circa il 62% degli agenti batterici isolati mostra resistenza ad almeno un antimicrobico e che alcuni di essi possiedono un potenziale zoonotico (Tommasoni et al., 2023).

2 Anatomia e fisiologia della ghiandola mammaria

La ghiandola mammaria bovina è un organo dinamico e complesso, composto da diverse tipologie cellulari che lavorano insieme per la sintesi e la secrezione del latte (Ryman et al., 2015). Le cellule epiteliali mammarie (MEC: matrice extracellulare) rappresentano l'unico tipo cellulare responsabile della produzione effettiva di latte durante la lattazione (Kobayashi et al., 2023).

La ghiandola mammaria viene comunemente definita mammella, si presenta come un organo complesso la cui morfologia macroscopica è caratterizzata da una suddivisione in due metà speculari e distinte, separate fisicamente dal legamento sospensorio mediano. Ciascuna di queste metà comprende a sua volta due ghiandole indipendenti, ognuna delle quali termina in un capezzolo dedicato alla secrezione del latte. Dal punto di vista istologico, l'organo è organizzato in due comparti principali che interagiscono strettamente: il parenchima, che rappresenta la porzione cellulare funzionale deputata alla sintesi e all'espulsione del secreto, e lo stroma, ovvero il tessuto di supporto costituito da adipociti, fibroblasti, vasi sanguigni e linfatici, oltre alla matrice extracellulare che fornisce l'impalcatura strutturale necessaria allo sviluppo ghiandolare (Jaswal et al. 2022).

L'unità funzionale fondamentale della ghiandola, particolarmente evidente durante la fase di lattazione, è rappresentata dall'alveolo. Questa struttura è rivestita internamente da un singolo strato di cellule epiteliali mammarie (MEC), di forma variabile tra il cuboidale e il colonnare, le quali estraggono i precursori dal sangue per sintetizzare proteine, grassi e lattosio (Figura 1). Queste cellule assorbono nutrienti come aminoacidi, glucosio e acidi grassi attraverso una vasta gamma di trasportatori e canali situati specificamente nella membrana basolaterale (Kobayashi et al., 2023). All'interno delle MEC, il lattosio viene sintetizzato esclusivamente tramite reazioni enzimatiche che coinvolgono l'alfa-lattoalbumina, una proteina specifica del latte (Kobayashi et al., 2023). I lipidi del latte, inizialmente prodotti come piccole goccioline citoplasmatiche, aumentano di dimensioni per fusione e vengono infine avvolti dalla membrana apicale per essere rilasciati nel lume tramite un meccanismo apocrino (Kobayashi et al., 2023). All'esterno dell'epitelio luminale si trova uno strato di cellule mioepiteliali con proprietà contrattili simili alla muscolatura liscia; queste cellule, contraendosi sotto l'influsso ormonale dell'ossitocina, comprimono l'alveolo e facilitano l'espulsione del latte dal lume alveolare verso il sistema dei dotti. Negli alveoli, le cellule mioepiteliali formano uno strato discontinuo per permettere alle cellule epiteliali il

contatto diretto con la membrana basale, fattore cruciale per la loro differenziazione funzionale (Jaswal et al. 2022).

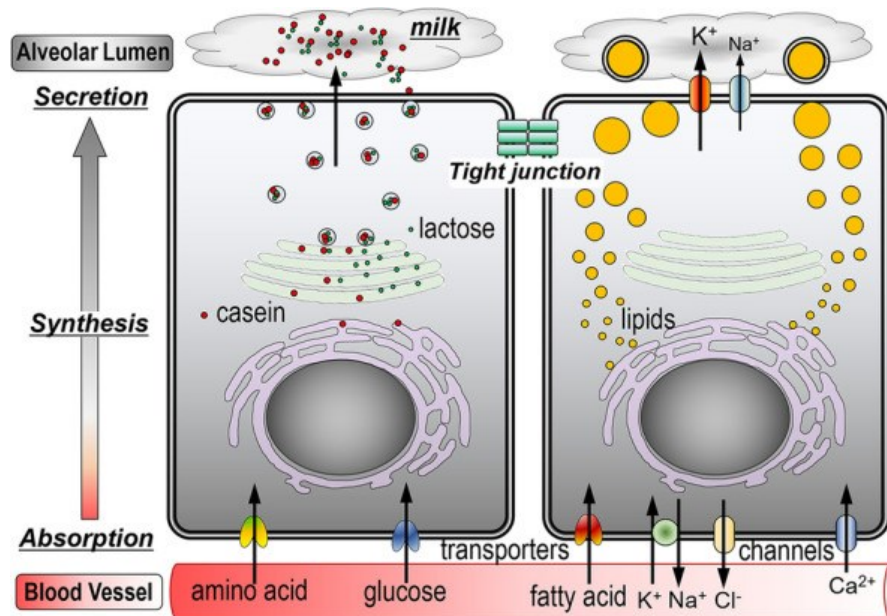


Figura 1. Rappresentazione schematica dei principali processi di assorbimento dei nutrienti, sintesi e secrezione del latte nelle cellule epiteliali mammarie (MEC). Gli aminoacidi, il glucosio e gli acidi grassi vengono assorbiti dal compartimento vascolare attraverso trasportatori e canali localizzati sulla membrana basolaterale; successivamente sono utilizzati per la sintesi di caseine, lattosio e lipidi, che vengono secreti nel lume alveolare. Le giunzioni serrate (*tight junctions*) mantengono la polarità cellulare e costituiscono la barriera sangue-latte (Kobayashi et al. 2023).

Il trasporto del latte verso le strutture di raccolta avviene attraverso i dotti galattofori, una rete di condotti che si originano dai singoli alveoli e convergono in canali progressivamente più grandi. L'integrità di questo sistema è garantita dalle giunzioni serrate (*Tight Junctions*) tra le MEC, che formano la barriera sangue-latte per impedire la fuoriuscita paracellulare dei componenti del latte e del sangue. Queste giunzioni fungono anche da "recinzione" molecolare, mantenendo la polarità cellulare e segregando proteine specifiche, come il trasportatore del glucosio GLUT1 (Glucose transporter), esclusivamente sulla membrana basolaterale (Kobayashi et al., 2023). I dotti primari, caratterizzati da un lume ampio, fungono da serbatoio per il latte durante la lattazione. Lungo questi dotti, le cellule mioepiteliali costituiscono una barriera continua, a differenza di quanto avviene a livello alveolare. Il sistema duttale culmina infine nella cisterna della ghiandola, un'ampia cavità dove si raccoglie il latte prima di passare alla cisterna del capezzolo. L'intero percorso

termina nel canale del capezzolo, che mette in comunicazione l'ambiente interno con l'esterno attraverso un'apertura regolata, fondamentale per prevenire l'ingresso di agenti patogeni e la fuoriuscita involontaria di secreto (Jaswal et al. 2022).

Durante i cicli riproduttivi, la ghiandola subisce profonde modificazioni strutturali. Durante la gravidanza, sotto la spinta ormonale, i dotti subiscono una massiccia ramificazione laterale che porta alla formazione di lobuli, questi occupano progressivamente lo spazio dello stroma adiposo, aumentando progressivamente la capacità sintetica della mammella in vista del parto e della successiva fase di lattazione (Jaswal et al. 2022). Questo processo di maturazione funzionale è regolato principalmente dalla prolattina e dai glucocorticoidi, che attivano rispettivamente le vie di segnalazione intracellulare STAT5 e GR per indurre la produzione di proteine e lipidi (Kobayashi et al., 2023). In concomitanza con il parto, la barriera delle giunzioni serrate diventa meno permeabile grazie a cambiamenti nella composizione proteica, come la traslocazione della claudina 3 e la riduzione della claudina 4. Infine, la sintesi del latte è influenzata anche dalla temperatura, con studi che indicano come una temperatura di 39°C possa favorire la capacità produttiva delle MEC rispetto ai 37°C (Kobayashi et al., 2023).

3 Classificazione mastite bovina

La mastite è definita come una malattia infiammatoria multifattoriale della ghiandola mammaria (Haxhiaj et al., 2022). Si tratta di una patologia complessa e multi-eziologica, la cui incidenza e gravità sono strettamente associate al sistema di gestione zootecnica e all'ambiente di allevamento delle bovine (Stanek et al., 2024). La patologia si manifesta clinicamente attraverso anomalie macroscopiche della ghiandola mammaria e alterazioni visibili nelle proprietà organolettiche, nella consistenza e nella composizione chimica del latte secreto. Sulla base della gravità del quadro sintomatologico e della rilevabilità visiva dei segni clinici, la malattia viene classicamente distinta in due forme principali: mastite clinica (CM, *Clinical Mastitis*) o mastite subclinica (SCM, *Subclinical Mastitis*). Tale classificazione rappresenta un pilastro diagnostico fondamentale per l'efficace monitoraggio e la gestione sanitaria della mandria nell'allevamento della bovina da latte (Haxhiaj et al., 2022).

3.1 mastite clinica e subclinica

La distinzione fondamentale nella diagnosi della mastite si basa sulla presenza o assenza di segni clinici rilevabili, suddividendo la patologia in forme cliniche e subcliniche (Cobirka et al., 2020).

La mastite clinica è una delle malattie più importanti che colpiscono le vacche da latte. La mastite clinica si manifesta con chiari segni esterni visibili come gonfiore, arrossamento e/o dolore alla mammella e febbre sistemica. Si possono inoltre rilevare cambiamenti nel latte e nei suoi componenti. Nel latte possono verificarsi variazioni di colore, consistenza, nonché la presenza di coaguli, sangue e cambiamenti chimici. Altre modifiche del latte possono includere un aumento della conduttività, un aumento del pH e cambiamenti nel contenuto di acqua. L'incidenza della mastite clinica è stimata in 19 casi ogni 100 bovine all'anno (Haxhiaj et al., 2022). Nelle forme cliniche più gravi, la temperatura corporea può superare i 39,5 °C e l'animale può manifestare una completa anoressia (Kour et al., 2023). La diagnosi sul campo della forma clinica si basa tipicamente sulla rilevazione di secrezioni lattee anormali e sulla valutazione della simmetria e della consistenza della mammella tramite palpazione ed analisi visiva (Kour et al., 2023). Inoltre, l'uso dell'ecografia mammaria si sta rivelando uno strumento utile per identificare la presenza di lesioni o alterazioni strutturali del parenchima e dei capezzoli già durante la fase clinica (Tommasoni et al., 2023).

Parallelamente, la mastite subclinica rappresenta la forma più diffusa, può essere molto significativa per un allevamento di bovini da latte, poiché può colpire fino al 50% della mandria (Haxhiaj et al., 2022). Essa è definita dalla totale assenza di alterazioni visibili sia nel latte che nella mammella, rendendo la sua identificazione possibile solo attraverso esami di laboratorio (Cobirka et al., 2020). A causa della mancanza di segni evidenti, questa forma viene spesso trascurata, sebbene comporti una riduzione persistente della qualità e della quantità di latte prodotto (Kour et al., 2023). L'indicatore principale per la diagnosi subclinica è l'aumento della Conta delle Cellule Somatiche (SCC), dove valori superiori a 400.000 cellule/mL sono generalmente indicativi di un'infezione intramammaria (Cobirka et al., 2020). Tuttavia, studi recenti indicano che una soglia superiore a 200.000 cellule/mL è già sufficiente per identificare un quarto infetto e considerare la conta delle cellule somatiche come il *gold standard* diagnostico (Ali et al., 2023). In condizioni di salute normali, le cellule somatiche presenti nella ghiandola mammaria sono i macrofagi, che costituiscono il 66-68% delle cellule rilevate. Altre cellule somatiche possono includere neutrofili, cellule mononucleate ed epiteliali. La concentrazione locale di neutrofili aumenta con il progredire dell'infezione intramammaria. Le uniche cellule che dimostrano la presenza di un'elevata SCC sono i leucociti, in particolare un numero elevato di neutrofili, riscontrato in quasi il 90% dei casi di mastite subclinica (Haxhiaj et al., 2022). Oltre alle cellule somatiche, la mastite subclinica induce una risposta infiammatoria che altera la permeabilità della barriera sangue-latte, permettendo il passaggio di proteine plasmatiche nel secreto. Tra queste, le proteine di fase acuta (APP: Acute-phase proteins) come la ferritina e la proteina C-reattiva (CRP: *C-reactive protein*) aumentano significativamente nel latte e nel siero, fungendo da biomarcatori precoci per la diagnosi (Ali et al., 2023). Il danno tissutale nella fase subclinica è evidenziato anche da cambiamenti nella composizione chimica del latte, con un aumento dei livelli di sodio e cloruro e una contestuale diminuzione di calcio e fosforo inorganico (Kour et al., 2023).

Questa forma è particolarmente critica per la gestione aziendale poiché, oltre a causare una riduzione della produzione latte, funge da serbatoio invisibile di patogeni che favorisce la diffusione dell'infezione all'interno della mandria (Cobirka et al., 2020). Per il monitoraggio rapido in stalla, il *California Mastitis Test* (CMT) rimane uno degli strumenti diagnostici più utilizzati ed economici per predire l'elevata conta. Altre tecnologie emergenti, come la termografia a infrarossi, consentono di rilevare precocemente l'infiammazione subclinica percependo le variazioni della temperatura superficiale della mammella (Tommasoni et al., 2023). anche l'uso della metabolomica sta aprendo nuove prospettive per la diagnosi

precoce: è stato dimostrato, infatti, che alcuni metaboliti nel sangue (come il lattato) e nelle urine possono fungere da biomarcatori predittivi, segnalando la suscettibilità alla mastite fino a 4 settimane prima del parto (Haxhiaj et al., 2022). L'identificazione tempestiva tramite questi biomarcatori e strumenti diagnostici è fondamentale per ridurre le gravi perdite economiche legate allo scarto del latte e ai costi dei trattamenti (Ali et al., 2023).

3.2 Mastite subacuta, acuta, iperacuta e cronica

La distinzione fondamentale nella diagnosi della mastite si basa sulla presenza o assenza di segni clinici rilevabili, suddividendo la patologia in forme cliniche e subcliniche.

La mastite clinica è caratterizzata da un'insorgenza improvvisa che comporta alterazioni fisiche evidenti, come arrossamento e gonfiore della ghiandola mammaria. In questa forma, il secreto appare visibilmente compromesso, presentando una consistenza acquosa o la presenza di grumi e fiocchi. L'animale affetto mostra spesso una sintomatologia sistemica che include febbre, inappetenza e uno stato di letargia generale (Cobirka et al., 2020). L'incidenza della mastite clinica è stimata in 19 casi ogni 100 bovine all'anno. Nelle forme cliniche più gravi, la temperatura corporea può superare i 39,5 °C e l'animale può manifestare una completa anoressia (Kour et al., 2023). La diagnosi sul campo della forma clinica si basa tipicamente sulla rilevazione di secrezioni lattee anormali e sulla valutazione della simmetria e della consistenza della mammella tramite palpazione (Kour et al., 2023). Inoltre, l'uso dell'ecografia mammaria si sta rivelando uno strumento utile per identificare la presenza di lesioni o alterazioni strutturali del parenchima e dei capezzoli già durante la fase clinica (Tommasoni et al., 2023).

Parallelamente, la mastite subclinica rappresenta la forma più diffusa, con un'incidenza che può raggiungere i 50 casi ogni 100 bovini l'anno, risultando nettamente superiore a quella clinica (Haxhiaj et al., 2022). Essa è definita dalla totale assenza di alterazioni visibili sia nel latte che nella mammella, rendendo la sua identificazione possibile solo attraverso esami di laboratorio (Cobirka et al., 2020). A causa della mancanza di segni evidenti, questa forma viene spesso trascurata, sebbene comporti una riduzione persistente della qualità e della quantità di latte prodotto (Kour et al., 2023). L'indicatore principale per la diagnosi subclinica è l'aumento della Conta delle Cellule Somatiche (SCC), dove valori superiori a 400.000 cellule/mL sono generalmente indicativi di un'infezione intramammaria (Cobirka et al., 2020). Tuttavia, studi recenti indicano che una soglia superiore a 200.000 cellule/mL è già

sufficiente per identificare un quarto infetto e considerare la conta delle cellule somatiche come il *gold standard* diagnostico (Ali et al., 2023). In condizioni di salute normali, le cellule somatiche presenti nella ghiandola mammaria sono i macrofagi, che costituiscono il 66-68% delle cellule rilevate. Altre cellule somatiche possono includere neutrofili, cellule mononucleate ed epiteliali. La concentrazione locale di neutrofili aumenta con il progredire dell'infezione intramammaria. Le uniche cellule che dimostrano la presenza di un'elevata SCC sono i leucociti, in particolare un numero elevato di neutrofili, riscontrato in quasi il 90% dei casi di mastite subclinica (Haxhiaj et al., 2022). Oltre alle cellule somatiche, la mastite subclinica induce una risposta infiammatoria che altera la permeabilità della barriera sangue-latte, permettendo il passaggio di proteine plasmatiche nel secreto. Tra queste, le proteine di fase acuta (APP) come la ferritina e la proteina C-reattiva (CRP) aumentano significativamente nel latte e nel siero, fungendo da biomarcatori precoci per la diagnosi (Ali et al., 2023). Il danno tissutale nella fase subclinica è evidenziato anche da cambiamenti nella composizione chimica del latte, con un aumento dei livelli di sodio e cloruro e una contestuale diminuzione di calcio e fosforo inorganico (Kour et al., 2023).

Questa forma è particolarmente critica per la gestione aziendale poiché, oltre a causare una riduzione della produzione latte, funge da serbatoio “invisibile” di patogeni che favorisce la diffusione dell'infezione all'interno della mandria (Cobirka et al., 2020). Per il monitoraggio rapido in stalla, il *California Mastitis Test* (CMT) rimane uno degli strumenti diagnostici più utilizzati ed economici per predire l'elevata conta batterica. Altre tecnologie emergenti, come la termografia a infrarossi, consentono di rilevare precocemente l'infiammazione subclinica percependo le variazioni della temperatura superficiale della mammella (Tommasoni et al., 2023). L'impiego della metabolomica sta inoltre offrendo nuove opportunità per la diagnosi precoce: è stato infatti dimostrato che specifici metaboliti presenti nel sangue (come il lattato) e nelle urine possono agire come biomarcatori predittivi, indicando una possibile predisposizione alla mastite fino a quattro settimane prima del parto (Haxhiaj et al., 2022).

L'identificazione tempestiva tramite questi biomarcatori e strumenti diagnostici è fondamentale per ridurre le gravi perdite economiche legate allo scarto del latte e ai costi dei trattamenti (Ali et al., 2023).

3.3 Mastite ambientale e contagiosa

Dal punto di vista epidemiologico, i patogeni responsabili della mastite vengono suddivisi in contagiosi e ambientali in base al loro serbatoio principale e alle modalità di trasmissione. La mastite contagiosa è causata da microrganismi che risiedono prevalentemente nella ghiandola mammaria delle vacche infette, come *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, e la trasmissione avviene tipicamente durante le operazioni di mungitura, quando il latte infetto entra in contatto con mammelle sane attraverso le mani dei mungitori, le spugne per la pulizia o i componenti della macchina mungitrice. La mastite ambientale deriva invece da patogeni opportunisti che vivono nell'ambiente circostante l'animale, in particolare nelle feci, nelle lettiere di paglia o segatura, nell'acqua e nel suolo: specie come *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* penetrano nella mammella attraverso il canale del capezzolo, specialmente nel periodo post-mungitura quando il canale rimane aperto per circa una o due ore (Cobirka et al., 2020). Mentre le forme contagiose possono essere controllate efficacemente attraverso programmi di igiene rigorosi e la terapia della messa in asciutta, i patogeni ambientali rappresentano una sfida persistente poiché la loro presenza nell'ambiente di stabulazione è difficile da eliminare completamente (Cobirka et al., 2020).

Nella mastite contagiosa, i principali agenti eziologici sono *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e le specie del genere *Mycoplasma*, che utilizzano la ghiandola mammaria come serbatoio e si diffondono tra le vacche soprattutto durante la mungitura, spesso in concomitanza con pratiche igieniche inadeguate (Jember et al., 2026; Gelgie et al., 2024). Fa eccezione *Mycoplasma spp.*, la cui trasmissione avviene per via aerogena, con invasione della mammella attraverso la batteriemia, a differenza degli altri patogeni contagiosi, la cui diffusione è legata principalmente alle pratiche di mungitura (Jember et al., 2026).

Tra questi, *Staphylococcus aureus* si trasmette soprattutto da vacca a vacca durante la mungitura. Sia questo patogeno che *Streptococcus agalactiae* possono persistere a lungo nel tessuto della ghiandola mammaria delle vacche infette, venendo eliminati nel latte e diffondendosi agli animali sani attraverso le guaine del gruppo mungitore, le mani dell'operatore e gli asciugamani. *Strep. agalactiae*, lo streptococco di gruppo B (GBS), è l'agente eziologico tipico della mastite contagiosa: la maggior parte dei bovini infetti non manifesta segni clinici evidenti, a differenza degli streptococchi ambientali, generalmente associati a forme cliniche di mastite ambientale (Tong et al., 2025).

Un patogeno contagioso di particolare rilevanza emergente è *Mycoplasma bovis*, responsabile di una mastite che rappresenta una sfida significativa a livello globale a causa della sua natura altamente contagiosa e della resistenza agli antimicrobici. I tradizionali programmi di controllo, basati su sanificazione ambientale, corrette procedure di mungitura e cura della salute della mammella, risultano solo parzialmente efficaci nei suoi confronti, poiché *M. bovis* può trasmettersi anche per via respiratoria, attraverso lo sperma o il fluido seminale, e nella direzione vitello-vacca o vacca-vitello (Gelgie et al., 2024).

Per quanto riguarda la forma ambientale, i batteri presenti nell'ambiente infettano la mammella in qualsiasi momento (Jember et al., 2026), e includono: *Escherichia coli*, specie *Klebsiella*, *Serratia marcescens* ed *Enterobacter aerogenes*, specie *Enterococcus*, *Staphylococcus* coagulasi-negativi, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium bovis* e *Arcanobacterium pyogenes*. Le loro fonti primarie sono rappresentate dalle feci dei bovini, da fonti d'acqua contaminate, lettieri sporche, pascoli riutilizzati, materiali della stalla e dell'ambiente circostante (Jember et al., 2026). Questi microrganismi proliferano soprattutto nel letame, nella lettiera, sul pavimento della stalla e nei liquami, penetrando nella mammella attraverso il dotto del capezzolo quando l'animale è in posizione sdraiata. *E. coli*, in particolare, è ubiquitario negli ambienti delle aziende lattiero-casearie e rappresenta uno dei patogeni ambientali più frequentemente identificati nelle vacche da latte (Tong et al., 2025).

Va tuttavia precisato che una tale classificazione binaria della mastite bovina è una semplificazione eccessiva, poiché questa distinzione è fuorviante, in particolare per specie come *Staph. aureus*, *Strep. uberis* e altre specie di *Streptococcus*, tra cui *Strep. agalactiae*. Questi batteri possono infatti esibire caratteristiche sia della mastite contagiosa che di quella ambientale, sfidando la rigidità della dicotomia tradizionale (Jember et al., 2026).

3.4 Patogenesi della mastite

Ingresso del patogeno e prime linee di difesa

La principale via di accesso dei microrganismi alla ghiandola mammaria è rappresentata dal canale del capezzolo che costituisce, al contempo, la prima barriera difensiva dell'organismo (Figura 2) (Stanek et al., 2024). Tale struttura è rivestita internamente da cheratina, un materiale ceroso composto da acidi grassi e proteine fibrose con proprietà batteriostatiche e battericide, la cui attività varia in funzione della specie batterica

considerata (Haxhiaj et al., 2022). Le proteine fibrose della cheratina si legano elettrostaticamente ai patogeni, alterandone la parete cellulare e aumentandone la suscettibilità alla pressione osmotica; l'incapacità dei microrganismi di regolare tale pressione conduce alla lisi della membrana cellulare e alla morte del patogeno invasore. Tra i fattori che ostacolano la penetrazione dei patogeni nel tessuto ghiandolare rientrano il lisozima, la lattoferrina e la lattoperossidasi, componenti della risposta immunitaria innata di tipo umorale. Componenti importanti dei meccanismi di difesa innata della ghiandola mammaria sono inoltre le cellule endoteliali che controllano il flusso ematico verso i tessuti colpiti e regolano la migrazione e l'attivazione dei leucociti, e gli ossilipidi (mediatori biologicamente attivi derivati dall'ossidazione enzimatica o non enzimatica degli acidi grassi polinsaturi), responsabili principalmente della regolazione della microvascolarizzazione (Stanek et al., 2024).

I batteri responsabili di mastite si distinguono in patogeni contagiosi e ambientali in base alla loro principale modalità di trasmissione ed al loro profilo di virulenza (Stanek et al., 2024). I patogeni contagiosi, tra cui *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*, colonizzano la cute del capezzolo, si adattano a sopravvivere e moltiplicarsi nella ghiandola mammaria e si trasmettono tra gli animali principalmente durante la fase di mungitura (Stanek et al., 2024). I patogeni ambientali, quali *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus uberis* ed Enterococchi, sono presenti nell'ambiente di stabulazione suolo, acqua, lettiera, feci e penetrano nel canale del capezzolo solitamente quando la vacca è in decubito. Gli stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) si trovano principalmente sulla cute del capezzolo e nel canale galattoforo, agendo prevalentemente come patogeni opportunisti e causando forme subcliniche o mastiti clinicamente lievi. Una volta penetrati nel canale del capezzolo, i patogeni risalgono verso la cisterna del capezzolo, la cisterna ghiandolare e i dotti, raggiungendo infine gli alveoli (Tong et al., 2025).

L'intensità e il decorso dell'infezione risultano influenzati da una molteplicità di fattori, tra cui il tipo di patogeno, l'età dell'animale, il suo stato immunitario e la fase della lattazione (Stanek et al., 2024). Il periodo di asciutta rappresenta una fase di particolare suscettibilità alle nuove infezioni intramammarie: è stato dimostrato, infatti, che numerosi casi di mastite diagnosticati entro i primi 100 giorni di lattazione risultano in realtà contratti già durante tale periodo. L'elevata incidenza di infezioni intramammarie in prossimità del parto è strettamente correlata all'immunosoppressione fisiologica che le bovine attraversano durante questo specifico periodo. Il periodo critico per la salute della bovina è compreso tra

le tre settimane precedenti e le tre settimane successive al parto, definito periodo di transizione, durante il quale l'animale affronta significative modificazioni nutrizionali, metaboliche, immunitarie e ormonali che lo rendono più suscettibile alle malattie peripartali. L'integrità della barriera cheratinica può essere ulteriormente compromessa dalla tecnica di infusione di antibiotici nella mammella all'inizio dell'asciutta: l'inserimento completo della cannula della siringa nella cisterna del capezzolo può disgregare porzioni di cheratina colonizzate da batteri, con possibili conseguenze infettive per la successiva lattazione (Haxhiaj et al., 2022).

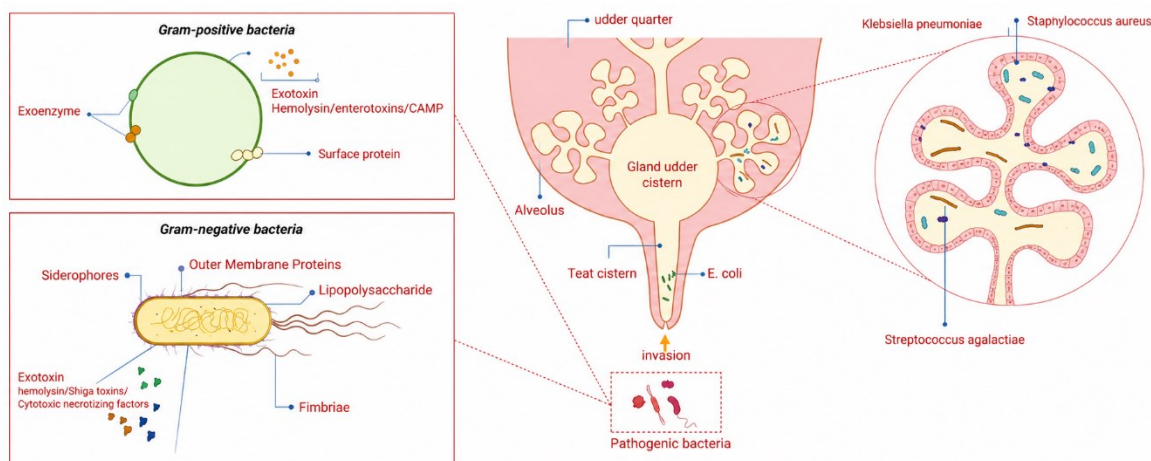


Figura 2: rappresentazione schematica dell'invasione dei patogeni nella ghiandola mammaria bovina. I microrganismi penetrano attraverso il canale del capezzolo e raggiungono progressivamente la cisterna del capezzolo, la cisterna ghiandolare, i dotti e gli alveoli. I principali fattori di virulenza comprendono proteine di superficie ed esotossine nei batteri Gram-positivi, e fimbrie, proteine della membrana esterna, lipopolisaccaridi e sistemi di acquisizione del ferro nei batteri Gram-negativi (Tong et al., 2025).

Risposta immunitaria dell'ospite

Quando i patogeni mastitogeni superano le difese del canale del capezzolo, viene attivata la risposta immunitaria innata, che rappresenta il meccanismo difensivo più importante poiché si attiva senza richiedere una precedente esposizione al patogeno. Tale risposta è mediata dalla componente cellulare, leucociti fagocitari e da diversi fattori umorali. Il riconoscimento dei patogeni avviene attraverso recettori specifici (PRR: *Pattern Recognition Receptors* recettori di riconoscimento dei pattern) presenti sulla superficie o all'interno delle cellule ospiti, che legano molecole conservate dei microrganismi denominate pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Tali molecole sono strutture conservate condivise da gruppi di microrganismi (Bruckmaier e

Wellnitz, 2017). Diversi recettori *Toll-like* sono presenti nella ghiandola mammaria, sia sui leucociti sia sulle cellule epiteliali mammarie. Non appena il PAMP si lega al recettore *Toll-like*, viene avviata una cascata di segnalazione che stimola le difese dell'ospite; in particolare, la conseguente traslocazione nucleare di NF- κ B induce la trascrizione di numerosi immunomodulatori, tra cui le citochine TNF- α , IL-8 e RANTES (Bruckmaier e Wellnitz, 2017).

Nelle cellule epiteliali mammarie bovine (bMEC), il TLR4 riconosce l'LPS dei batteri Gram-negativi e attiva le vie di segnalazione di NF- κ B e delle proteine chinasi attivate da mitogeni (MAPK), con conseguente produzione di citochine pro-infiammatorie quali IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . Il TLR2 riconosce invece le componenti della parete cellulare dei batteri Gram-positivi, quali peptidoglicano e tossine, attivando le vie NF- κ B e AP-1 con rilascio di IL-1 β , IL-6, CXCL8 e CCL5. Il TLR9, localizzato a livello endosomiale nelle cellule epiteliali mammarie, riconosce il pattern CpG non metilato nel DNA batterico, attivando le vie di segnalazione MyD88-dipendenti e TRAF-6-dipendenti, con conseguente produzione di interferoni di tipo I e citochine pro-infiammatorie che mediano l'effetto battericida delle cellule immunitarie (Tong et al., 2025).

La risposta immunitaria innata si traduce, dal punto di vista cellulare, in un incremento della conta delle cellule somatiche (SCC) nel latte. Le cellule somatiche nel latte comprendono, oltre alle cellule epiteliali esfoliate, leucociti immunocompetenti costituiti principalmente da macrofagi, neutrofili polimorfonucleati e linfociti. Nella ghiandola sana, i macrofagi rappresentano la popolazione cellulare predominante nel latte, in particolare nella frazione cisternale, prossima al punto di ingresso dei patogeni (Bruckmaier e Wellnitz, 2017). A seguito del riconoscimento del patogeno, i neutrofili polimorfonucleati vengono reclutati in grandi quantità dal sangue verso il latte, dove fagocitano e uccidono i microrganismi mastitogeni. I neutrofili, una volta migrati nella ghiandola mammaria, sovraregolano i propri recettori Fc per IgG2, potenziando ulteriormente la fagocitosi mediata da opsonizzazione. L'efficacia della risposta immunitaria risulta inferiore nei quarti con SCC basale ridotta rispetto a quelli con SCC nella norma, e il numero di cellule fagocitiche reclutate dipende dal tipo di patogeno coinvolto.

Oltre alla componente cellulare, intervengono fattori umorali solubili ad azione non specifica, sintetizzati localmente nella ghiandola mammaria, quali lattoferrina e lisozima oppure trasferiti dal sangue al latte; l'entità del loro incremento nel latte può dipendere dal tipo di patogeno coinvolto. Esiste una marcata differenza qualitativa e quantitativa tra la risposta

immunitaria evocata dai batteri Gram-negativi e quella indotta dai Gram-positivi. L'infezione da *E. coli* determina un incremento rapido e intenso della SCC, associato a un significativo incremento delle citochine nel latte tra cui TNF- α , IL-1 β e IL-8 che diversi studi hanno descritto come assente nelle infezioni da *S. aureus*. Studi sperimentali condotti mediante somministrazione intramammaria di dosi equivalenti di LPS da *E. coli* e LTA da *S. aureus*, calibrate per ottenere un analogo incremento della SCC, hanno confermato che l'LPS è un induttore di citochine e di altri fattori infiammatori significativamente più potente rispetto all'LTA (*Lipoteichoic acid*) (Bruckmaier e Wellnitz, 2017). La febbre compare esclusivamente nei soggetti trattati con LPS, verosimilmente in conseguenza della marcata induzione di TNF- α non osservata in risposta all'LTA. La crescita intramammaria di *S. aureus* risulta inoltre molto più lenta rispetto a quella di *E. coli*, anche quando ciascun quarto viene infettato con la medesima concentrazione di unità formanti colonia (UFC) (Bruckmaier e Wellnitz, 2017).

Qualora i patogeni riescano a eludere il sistema immunitario innato, acquista importanza la risposta immunitaria adattativa, i cui componenti riconoscono determinanti antigenici specifici dei patogeni e sono rappresentati principalmente da linfociti e immunoglobuline. Il contributo del sistema immunitario specifico nel supportare la risposta innata durante un'infezione intramammaria dipende dal trasferimento di immunoglobuline dalla circolazione sanguigna attraverso la barriera emato-mammaria verso la ghiandola infetta, indipendentemente dal fatto che tali immunoglobuline si siano sviluppate attraverso un precedente contatto con il patogeno o in risposta ad una strategia vaccinale. Durante la mastite, nel latte aumenta l'afflusso di IgG totali sia IgG1 che IgG2 un indicatore di una barriera permeabile; la IgG2 diventa la principale immunoglobulina trasferita attraverso la barriera permeabile e funge da principale opsonina per la fagocitosi nella ghiandola mammaria (Bruckmaier e Wellnitz, 2017).

Processo infiammatorio e alterazioni della barriera emato-mammaria

Una barriera intatta tra sangue e latte è fondamentale per la funzione mammaria, in quanto previene lo scambio incontrollato di componenti tra i due compartimenti, permette all'acqua di muoversi lungo un gradiente osmotico dal sangue al latte e impedisce la perdita di nutrienti secreti specificamente nel latte. Tale barriera emato-mammaria è costituita da cellule endoteliali, tessuto connettivo, membrana basale e cellule epiteliali; queste ultime sono strettamente connesse tra loro da giunzioni serrate, desmosomi e giunzioni aderenti.

Le giunzioni aderenti e i desmosomi forniscono principalmente una connessione che aiuta a resistere alle forze di taglio, mentre le giunzioni serrate sono generalmente riconosciute come le strutture più critiche per prevenire lo scambio incontrollato di costituenti tra sangue e latte, separando i compartimenti contenenti latte dalla vascolarizzazione circostante. Durante la mastite, l'integrità della barriera emato-mammaria viene compromessa a causa del danno tissutale e dell'infiltrazione di cellule immunitarie (Bruckmaier e Wellnitz, 2017).

La risposta patogeno-specifica determina un'apertura differenziale della barriera emato-mammaria: anche impostando dosi di LPS e LTA tali da indurre un analogo incremento della SCC, l'aumento di altri componenti ematici nel latte quali albumina sierica, LDH e IgG, risulta significativamente più pronunciato in seguito a stimolazione con LPS da *E. coli* rispetto alla stimolazione con LTA da *S. aureus*. Per ottenere una risposta quantitativamente simile in termini di SCC con LTA rispetto all'LPS, è necessario somministrare una quantità di LTA molto superiore a quella di LPS (Bruckmaier e Wellnitz, 2017).

Nelle infezioni spontanee, *E. coli* determina un considerevole aumento di IgG e LDH nel latte rispetto alle infezioni mammarie da batteri Gram-positivi. Pertanto, nelle infezioni da LPS o da *E. coli*, vengono trasferiti nel latte componenti sia dell'immunità innata sia di quella adattativa, comprese le immunoglobuline. Al contrario, nelle infezioni da LTA o da *S. aureus*, vengono attivati prevalentemente i componenti del sistema immunitario innato, mentre le immunoglobuline non vengono trasferite dal sangue al latte. I risultati suggeriscono che l'incremento della permeabilità della barriera emato-mammaria possa rappresentare un meccanismo a supporto della risposta immunitaria, consentendo un maggiore trasferimento di anticorpi specifici nel latte e favorendo così il controllo delle infezioni da batteri Gram-positivi (Bruckmaier e Wellnitz, 2017).

La permeabilità della barriera emato-mammaria può essere modificata anche mediante agenti farmacologici. I glucocorticoidi, come il prednisolone, sono noti per stabilizzare le strutture delle giunzioni serrate, aumentando la resistenza elettrica transepiteliale e l'espressione della proteina occludina delle giunzioni serrate nelle cellule epiteliali mammarie, determinando una riduzione della permeabilità della barriera emato-mammaria. La somministrazione intramammaria di prednisolone durante la mastite si è dimostrata in grado di ridurre l'infiammazione e di ripristinare la qualità del latte più rapidamente rispetto alla sola terapia antibiotica. L'ossitocina somministrata a dosi sovralfisiologiche elevate pari a 100 UI determina invece un'apertura della barriera, verosimilmente per lo stress meccanico esercitato sulle giunzioni cellulari dalla massima contrazione mioepiteliale. In

combinazione con una stimolazione intramammaria con LPS, l'ossitocina ha causato concentrazioni più elevate di SCC, IgG, LDH e albumina sierica nel latte rispetto ai quarti trattati con solo LPS; nei quarti trattati con LTA, l'ulteriore somministrazione di ossitocina ha causato un maggiore trasferimento di IgG, LDH e albumina sierica dal sangue al latte. Tale meccanismo potrebbe risultare particolarmente utile nelle infezioni subcliniche da batteri Gram-positivi, dove l'aumento spontaneo di IgG nel latte è molto ridotto (Bruckmaier e Wellnitz, 2017).

Alterazioni della composizione del latte

L'infezione intramammaria e il conseguente processo infiammatorio si ripercuotono in modo sostanziale sulla composizione e sulle caratteristiche del latte. Nelle forme cliniche si osservano variazioni evidenti di colore, consistenza e aspetto, con possibile presenza di grumi, latte acquoso o sangue nel latte. La mastite determina alterazioni nella distribuzione proteica, con aumento della quota di proteine del siero a scapito della caseina, una riduzione del contenuto di grasso e lattosio, e modificazioni nella concentrazione dei minerali, in particolare una riduzione del calcio. Tali modificazioni sfavorevoli della composizione del latte hanno effetti negativi sulla sua qualità e sull'attitudine alla trasformazione, con riduzione della consistenza della cagliata, del recupero di nutrienti nel caglio e delle proprietà di coagulazione. È stato riportato che il latte prodotto da bovine con mastite clinica risulta inadatto alla trasformazione, con conseguenti perdite economiche legate alla necessità di scartare tale latte superiori a quelle derivanti dalla sola riduzione della produzione (Stanek et al., 2024).

Il trasferimento di componenti ematiche nel latte in seguito alla compromissione della barriera emato-mammaria comporta l'accumulo di molecole che fungono da indicatori diagnostici del danno infiammatorio. La lattato-deidrogenasi (LDH: *Lactate Dehydrogenase*) è stata proposta come marcatore dell'integrità della barriera emato-mammaria e del conseguente trasferimento di IgG dal sangue al latte, ed è attualmente impiegata come indicatore commerciale di mastite, in particolare negli impianti di mungitura automatica. L'albumina sierica, pur non svolgendo funzioni immunitarie note nella ghiandola mammaria, segnala la presenza di una barriera compromessa quando rilevata nel latte. L' α -lattoalbumina, proteina del siero e subunità della lattosio-sintasi, è correlata all'intensità della sintesi del lattosio e pertanto rappresenta un marcatore dell'attività secretoria della ghiandola mammaria; può essere rilevata nel sangue in condizioni di aumentata

permeabilità della barriera, sia durante la fase colostrale sia nel corso di episodi mastitici. Tra gli altri parametri alterati nel latte in corso di mastite figurano il lattato, gli ioni cloruro e sodio, le cui concentrazioni aumentano quando la barriera emato-mammaria è compromessa (Bruckmaier e Wellnitz, 2017).

Nelle forme subcliniche, le alterazioni del latte non sono visibili a occhio nudo, ma comprendono un aumento della SCC, una riduzione della produzione di latte e modificazioni della composizione e della qualità. Poiché il latte proveniente da quarti subclinici non presenta alterazioni apparenti, gli allevatori ne riducono involontariamente la qualità del latte di massa mescolando tale latte con quello proveniente da bovine sane. L'aggiunta di latte con mastite subclinica contribuisce a un aumento delle cellule somatiche nel latte di massa, a una riduzione della qualità del latte e all'introduzione di patogeni nel latte normale (Haxhiaj et al., 2022). Le perdite produttive associate alla mastite subclinica risultano complessivamente superiori a quelle delle forme cliniche, in ragione della loro lunga durata e della persistente riduzione della produzione al di sotto del potenziale dell'animale. Diversi autori hanno peraltro osservato che la mastite riduce la produzione di latte non soltanto durante l'episodio infiammatorio, ma per l'intera durata della lattazione (Stanek et al., 2024).

4 Principali agenti eziologici

Gli agenti eziologici responsabili vengono classificati, in base alla loro epidemiologia, in patogeni contagiosi e patogeni ambientali (Figura 3). I microrganismi appartenenti al gruppo dei patogeni contagiosi sono *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma bovis*, si trasmettono da un animale all'altro principalmente durante le operazioni di mungitura. In questi casi, i soggetti già infetti fungono da veri e propri *reservoir* (serbatoi) per il resto della mandria, facilitando la diffusione del patogeno che può causare sia forme cliniche che sub-cliniche di mastite (Li et al., 2026). I patogeni ambientali sono microrganismi ubiquitari in grado di vivere e moltiplicarsi nell'ambiente in cui soggiornano gli animali, come la lettiera, l'acqua di lavaggio e le infrastrutture della stalla. Tra i principali agenti isolati si riscontrano: *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*, coliformi, inclusi *Escherichia coli* e varie specie di *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*), *Pseudomonas spp.* e Stafilococchi coagulasi negativi, questi ultimi spesso considerati patogeni opportunisti facenti parte della microflora cutanea (Sgorbini et al., 2014).

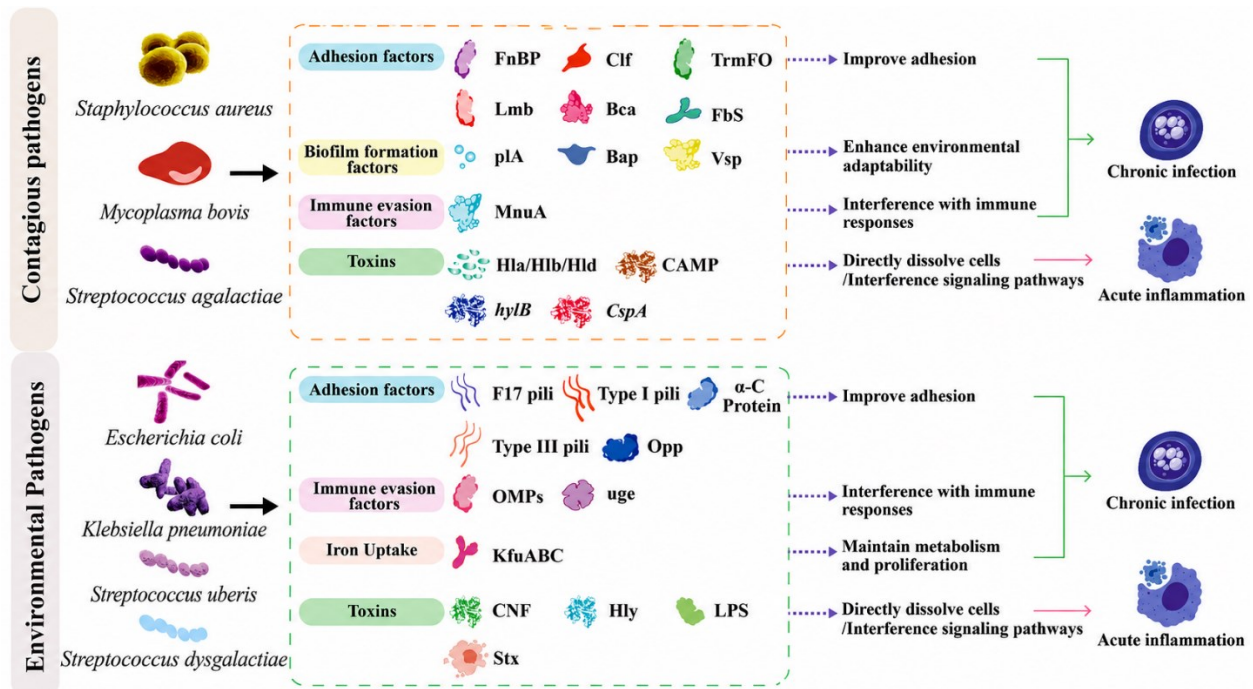


Figura 3: Patogeni contagiosi e ambientali che mediano infezioni croniche e infiammazione acuta attraverso i rispettivi fattori di virulenza (Li et al., 2026).

4.1 Patogeni contagiosi

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus (Figura 4) è un cocco Gram-positivo che si presenta, sui terreni di coltura selettivi e differenziali in incubazione aerobica a 35–37 °C per 18–48 ore, sotto forma di colonie con tipica pigmentazione giallo-dorata, dotate di attività emolitica su agar sangue. Il microrganismo è catalasi-positivo, coagulasi-positivo e in grado di fermentare il mannitolo, caratteristiche biochimiche di base impiegate per la sua identificazione presuntiva (Touaitia et al., 2025). Si tratta di un patogeno a diffusione contagiosa, il cui principale serbatoio è costituito dal quarto mammario infetto, a partire dal quale la trasmissione avviene prevalentemente per via orizzontale *cow-to-cow* durante le operazioni di mungitura. Le manze e le bovine primipare rappresentano tuttavia un ulteriore *reservoir* di rilievo, potendo risultare già infette prima ancora dell'inizio della lattazione: in bovine primipare è stata rilevata una prevalenza di infezione compresa tra il 12 e il 15%, spesso mantenuta in forma non rilevata per l'intera lattazione, così che questi animali fungono da fonte occulta di diffusione per il resto della mandria (Cobirka et al., 2020). Sul piano clinico, *S. aureus* è riconosciuto a livello mondiale come uno dei principali agenti di infezione intramammaria, responsabile soprattutto di forme subcliniche associate a un incremento della conta delle cellule somatiche, sebbene non sia infrequente l'insorgenza di episodi di mastite clinica manifesta (Monistero et al., 2018); nel complesso, questo patogeno risulta responsabile di circa il 10-12% dei casi di mastite clinica diagnosticati (Cobirka et al., 2020). L'impatto sulla produzione lattea risulta inoltre variabile in funzione dello stadio di carriera produttiva dell'animale: le infezioni insorte durante la prima o la seconda lattazione determinano un calo produttivo più marcato rispetto a quelle diagnosticate dalla terza lattazione in avanti (Yu et al., 2025). Tra i fattori di virulenza più rilevanti troviamo i geni codificanti proteine di adesione alla matrice extracellulare dell'ospite (*clfA*, *cna* e *fntB*), risultati tra i più diffusi nelle popolazioni di isolati bovini a livello globale, insieme a leucotossine ed enterotossine; questi determinanti, associati alla capacità del patogeno di formare *biofilm* e di eludere la risposta immunitaria dell'ospite, favoriscono la persistenza dell'infezione a livello del singolo quarto (Touaitia et al., 2025). Tra i meccanismi di elusione immunitaria si segnala inoltre la secrezione della proteina A stafilococcica, capace di legare la porzione Fc delle immunoglobuline G e di interferire così con l'opsonizzazione e la fagocitosi mediate dall'ospite (Yu et al., 2025). *S. aureus* costituisce una criticità significativa per la sua capacità di persistere a lungo in allevamento: la localizzazione intracellulare del batterio a livello dell'epitelio mammario limita l'accessibilità ai farmaci antimicrobici, cosicché la terapia in

asciutta ottiene tassi di guarigione solo moderati, compresi tra il 30 e il 50%, mentre la matrice del *biofilm* può rendere le cellule batteriche fino a mille volte più resistenti al trattamento rispetto alla forma planctonica (Touaitia et al., 2025). A ciò si aggiunge la capacità del patogeno di organizzarsi in microascessi all'interno del tessuto ghiandolare, che costituiscono un'ulteriore barriera fisica alla penetrazione degli antimicrobici e rappresentano una delle principali cause della scarsa efficacia terapeutica in vivo, spesso rendendo necessario il ricorso all'abbattimento selettivo degli animali cronicamente infetti (Cobirka et al., 2020). Non va infine trascurato il risvolto di sanità pubblica legato a questo patogeno: gli isolati bovini di *S. aureus* sono stati identificati come agenti causali rilevanti di malattie a trasmissione alimentare, con il latte di massa e i prodotti lattiero-caseari crudi che rappresentano vettori significativi per la trasmissione all'uomo (Yu et al., 2025).

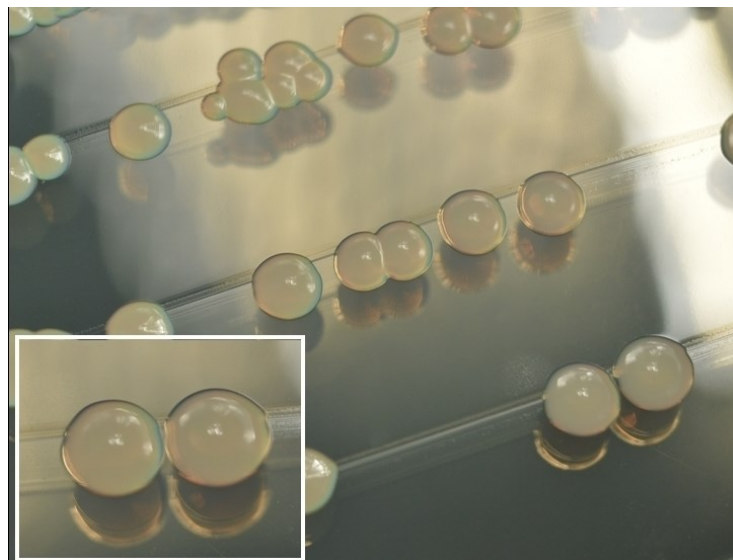


Figura 4. *Staphylococcus aureus*

Streptococcus agalactiae

Streptococcus agalactiae (Figura 5) è un cocco Gram-positivo di forma sferica (0,5–2 μm), disposto tipicamente in coppie o catene e inquadrato, sulla base della classificazione sierologica di Lancefield, nel gruppo B. Dal punto di vista colturale il microrganismo è generalmente descritto come beta-emolitico e presenta un fenotipo CAMP-positivo, sebbene siano stati riportati anche ceppi non emolitici. Si tratta di un patogeno a carattere contagioso il cui serbatoio principale è rappresentato dalla ghiandola mammaria, all'interno della quale il batterio è in grado di persistere indefinitamente grazie alla formazione di *biofilm*; ulteriori nicchie ambientali secondarie sono state individuate a livello del tratto

gastrointestinale bovino e dell'ambiente di stabulazione (pavimentazioni, lettiere, acqua di abbeverata) (Kabelitz et al., 2021). A differenza di altri patogeni contagiosi, *S. agalactiae* non è in grado di replicarsi o proliferare al di fuori della mammella, ma può sopravvivere per un breve periodo sulle mani degli operatori, sulle attrezzature di mungitura e sulle superfici dei capezzoli; tale intervallo, per quanto limitato, risulta comunque sufficiente a garantire la trasmissione dell'agente patogeno tra bovine sane durante le operazioni di mungitura (Yu et al., 2025). Sotto il profilo clinico, *S. agalactiae* è fortemente associato a forme di mastite subclinica e a decorso cronico, con incrementi della conta cellulare somatica che, in corso di infezione, possono superare il milione di cellule per millilitro (Kabelitz et al., 2021); il patogeno è inoltre descritto come dotato di elevata infettività, rapida capacità di diffusione all'interno della mandria e comportamento clinicamente silente, elementi che ne facilitano la persistenza inosservata in allevamento. Le bovine primipare, sebbene generalmente più resistenti nei confronti dei patogeni contagiosi, possono comunque ospitare il microrganismo per periodi prolungati senza manifestazioni evidenti, fungendo da *reservoir* occulto per la diffusione dell'infezione al resto della mandria (Cobirka et al., 2020). È stato peraltro dimostrato, attraverso il confronto di ceppi isolati da mastiti bovine e da infezioni umane, che tali isolati condividono un grado di similarità genetica non trascurabile (58% di similarità complessiva, con un raggruppamento in *cluster* che indica una similarità del 70%), a sostegno di un potenziale ruolo del personale di mungitura come vettore di trasmissione indiretta; è interessante notare come le infezioni causate da ceppi di origine umana mostrino una maggiore tendenza alla guarigione spontanea rispetto a quelle causate da ceppi trasmessi per via animale-animale, per i quali il tasso di autoguarigione risulta invece molto contenuto (Cobirka et al., 2020). La patogenicità del microrganismo è sostenuta da un insieme di fattori di virulenza che comprende proteine di adesione alla matrice extracellulare, quali le proteine leganti il fibrinogeno FbsA e FbsB e la proteina legante la laminina Lmb, la proteina di superficie α -C (Bca), il fattore CAMP codificato dal gene *cfb* con azione *pore-forming* sulla membrana della cellula ospite, e ulteriori fattori di elusione immunitaria come l'ialuronidasi HylB e la proteasi serinica CspA (Li et al., 2026). La capacità del patogeno di localizzarsi a livello intracellulare nella ghiandola mammaria e di dare origine a formazioni ascessuali ne complica l'eradicazione farmacologica e predispone l'infezione a un'evoluzione cronica. Ciononostante, la terapia intramammaria a base di antibiotici β -lattamici, trattamento di elezione per le mastiti streptococciche, raggiunge per le forme subcliniche da *S. agalactiae* percentuali di guarigione relativamente elevate, nell'ordine del 90% (Kabelitz et al., 2021). Risultato coerente con la buona risposta di questo patogeno alla

terapia antibiotica e con la possibilità concreta della sua eradicazione dall'allevamento mediante misure di controllo quali la terapia in asciutta e la disinfezione post-mungitura dei capezzoli (*teat dipping*) (Yu et al., 2025). Tra le strategie di eradicazione più diffuse figura la cosiddetta *blitz therapy*, che prevede il trattamento simultaneo di tutti i soggetti della mandria indipendentemente dal loro stato infettivo; si tratta tuttavia di un approccio potenzialmente favorente l'insorgenza di resistenze, per cui viene spesso sostituito da protocolli più selettivi mirati ai soli animali risultati positivi (Cobirka et al., 2020). Proprio grazie all'applicazione di programmi di controllo efficaci, la prevalenza di *S. agalactiae* risulta oggi significativamente ridotta in molte aree dell'Europa e del Nord America (Yu et al., 2025).

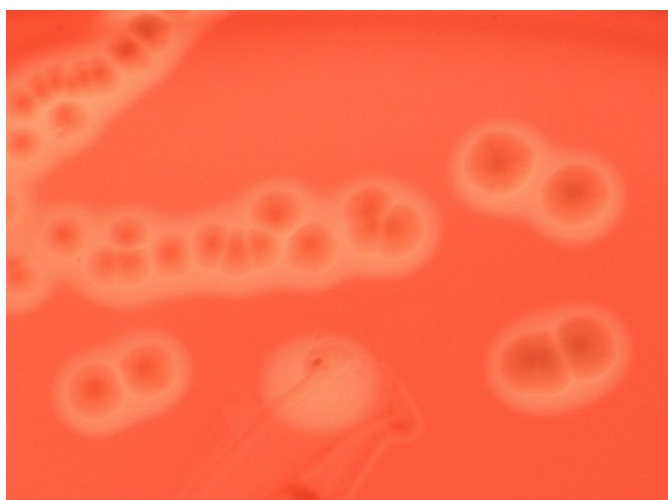


Figura 5. *Streptococcus agalactiae* (<https://www.microbiologyinpictures.com/index.php>)

Mycoplasma bovis

Mycoplasma bovis (Figura 6) precedentemente noto come *Mycoplasma agalactiae subsp. bovis*, è l'agente eziologico più comune di mastite da micoplasma ed è considerato una malattia emergente a livello globale. È un microrganismo appartenente alla famiglia *Mycoplasmataceae* e alla classe *Mollicutes*, la cui caratteristica biologica principale è la totale assenza di parete cellulare che lo rende intrinsecamente resistente agli antibiotici beta-lattamici, possedendo inoltre un genoma ridotto (0.58–1.4 Mbp). Si tratta di un organismo a crescita lenta che richiede terreni e condizioni colturali specifiche: tempi di incubazione prolungati (7-10 giorni) a 37°C in atmosfera arricchita di CO₂, manifestando tipicamente su agar un aspetto a "uovo fritto" dovuto all'infossamento della parte centrale della colonia nel terreno (Gielgi et al., 2024).

Viene classificato come un patogeno contagioso, il cui serbatoio principale è la ghiandola mammaria, sebbene possa risiedere anche nelle vie respiratorie, nel tratto riproduttivo e in altri siti anatomici, diffondendosi principalmente da vacca a vacca durante la mungitura o tramite colostro e sperma (Gielgi et al., 2024). La manifestazione clinica tipica della mastite da *M. bovis* include alterazioni del latte, che appare acquoso o purulento con presenza di scaglie, ma è frequente il riscontro di forme subcliniche o croniche in cui gli animali, pur apparendo sani, presentano un elevato numero di cellule somatiche (SCC) e possono eliminare il patogeno in modo intermittente. Tuttavia, l'infezione può presentarsi anche con sintomi sistemici e localizzazioni extra-mammarie quali polmonite, artrite, endocardite e otite.

La virulenza di questo patogeno è garantita da meccanismi complessi, quali l'adesione e l'invasione delle cellule epiteliali mammarie, l'espressione di proteine di superficie variabili (Vsps) per eludere il sistema immunitario, la capacità di formare biofilm e la secrezione di nucleasi che degradano le trappole extracellulari dei neutrofili (NETs: *Neutrophil Extracellular Traps*) (Gielgi et al., 2024). Tra i fattori di adesione è stata identificata la proteina TrmFO, che lega la fibronectina; la nucleasi specifica MnuA è stata descritta come responsabile della degradazione delle NETs (Li et al., 2026). L'impatto zootecnico è estremamente rilevante a causa delle gravi perdite economiche derivanti dal calo produttivo e dall'alto tasso di riforma degli animali infetti (Gielgi et al., 2024). Il controllo terapeutico risulta ad oggi inefficace, non solo per la mancanza di vaccini commerciali validi, ma anche per la crescente resistenza verso diverse classi di antibiotici; sono stati riportati tassi di resistenza molto elevati (fino al 100%) per agenti come kanamicina e ossitetraciclina. Per questo motivo la ricerca si sta orientando anche verso lo sviluppo di vaccini attenuati o ricombinanti come potenziali alternative ai trattamenti convenzionali (Li et al., 2026).

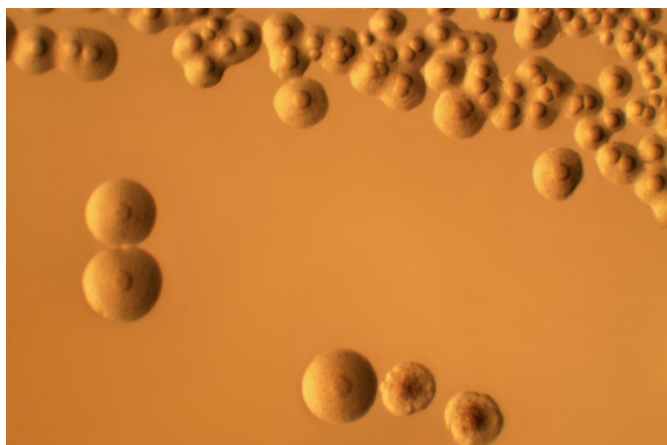


Figura 6. *Mycoplasma bovis* (vetmyco.org)

4.2 Patogeni ambientali

Streptococcus uberis

Streptococcus uberis (Figura 7) è un batterio Gram-positivo di forma sferica, con diametro compreso tra 0,5 e 2 μm , che tende ad organizzarsi in coppie o brevi catenelle. Dal punto di vista colturale, la specie si presenta prevalentemente alfa-emolitica, sebbene siano stati descritti anche ceppi non emolitici; la sua identificazione biochimica è complicata da un fenotipo CAMP variabile e da una classificazione di Lancefield non univoca, potendo alcuni isolati risultare positivi ai gruppi E, G, P o U (Kabelitz et al., 2021). Si tratta di un microrganismo dotato di notevole flessibilità nutrizionale, che gli consente di colonizzare nicchie ecologiche molto diverse tra loro, essendo stato isolato dalla cute, dalle labbra, dalle tonsille, dal cavo orale, dal rumine, dal retto e dal tratto respiratorio dei bovini, oltre che dagli stessi quarti mammari infetti e dalle feci (Fessia & Odierno, 2021). *S. uberis* è classicamente definito un patogeno ambientale, sebbene non manchino segnalazioni di comportamento contagioso; alcuni autori ritengono anzi che la trasmissione diretta *cow-to-cow* possa costituire, in determinati contesti, la via di diffusione predominante rispetto alla classica origine ambientale. A tale proposito, è stato suggerito che il comportamento di suzione reciproca tra bovine possa rappresentare una delle modalità attraverso cui il patogeno si trasmette da soggetti infetti a soggetti sani (Cobirka et al., 2020). Il suo principale serbatoio è rappresentato dal materiale di lettiera, con concentrazioni particolarmente elevate nella paglia rispetto a sabbia o segatura, mentre le aree di riposo e decubito costituiscono i punti d'accesso privilegiati del patogeno alla mammella (Kabelitz et al., 2021). Ulteriori fonti ambientali comprendono il latte di scarto, le acque di lavaggio e il pascolo, quest'ultimo confermato come *reservoir* primario del patogeno negli allevamenti basati su sistemi di pascolamento. *S. uberis* è responsabile di un ampio spettro di forme di mastite, sia subclinica sia clinica, in bovine in lattazione e in asciutta (Fessia & Odierno, 2021); la sua capacità di persistere nell'ambiente mammario ne fa un agente frequentemente associato a infezioni croniche, con durata media dell'episodio di circa 12 giorni ma con possibile prolungamento oltre i 300 giorni nei casi cronicizzati (Kabelitz et al., 2021). Analogamente a quanto osservato per altri patogeni ambientali, la maggior parte delle infezioni da *S. uberis* si instaura durante il periodo di asciutta in forma subclinica, per poi evolvere in forma clinica acuta nella successiva lattazione: secondo alcune stime, fino al 56% dei casi di mastite diagnosticati durante la lattazione avrebbe avuto origine proprio nel periodo di asciutta. Le probabilità di guarigione da tali infezioni risultano peraltro più elevate nelle bovine di prima e seconda lattazione rispetto ai soggetti più anziani (Cobirka et al., 2020). L'attitudine alla

cronicizzazione è confermata dalla capacità del patogeno di annidarsi profondamente nel tessuto mammario, rendendosi difficilmente raggiungibile dalla terapia antibiotica (Bütthe et al., 2025). Da un punto di vista patogenetico, è stato osservato come il danno al tessuto alveolare, con conseguente fibrosi, possa manifestarsi già a partire dal sesto giorno di infezione, in modo analogo a quanto descritto per *S. aureus*; tale rapidità di danno tissutale potrebbe contribuire a spiegare la risposta talvolta insoddisfacente alla terapia antibiotica riportata per questo patogeno (Cobirka et al., 2020). Tra i determinanti di patogenicità meglio caratterizzati figura il complesso genico *has*, responsabile della sintesi di una capsula di acido ialuronico (HasC) che maschera gli antigeni di superficie proteggendo il batterio da opsonizzazione e fagocitosi. Le proteine Sua e Vru sono in grado di legare la lattoferrina antimicrobica presente nel latte, riducendone l'azione battericida e agevolando l'internalizzazione nelle cellule epiteliali mammarie tramite la molecola di adesione SUAM; non a caso, ceppi privi del gene sua hanno mostrato una capacità patogena nettamente ridotta rispetto ai ceppi selvatici in prove sperimentali (Kabelitz et al., 2021). Ulteriori fattori includono PauA e SkC, dotati di attività plasminogeno-attivante che favorisce la degradazione della matrice extracellulare e l'invasione epiteliale, oltre a capsula acida, ialuronidasi, C5a-peptidasi, proteine leganti fibronectina, e proteine di superficie ancorate tramite sortasi A (Fessia & Odierno, 2021). *S. uberis* è considerato dal punto di vista fenotipico un microrganismo generalmente sensibile agli antimicrobici, tanto che in una recente casistica bengalese solo il 30% degli isolati è risultato multiresistente, con elevata sensibilità a betalattamici, aminoglicosidi e cloramfenicolo (Hassan et al., 2023). Nondimeno, dati di meta-analisi su scala mondiale evidenziano tassi di resistenza tutt'altro che trascurabili e fortemente eterogenei, con stime aggregate pari a circa il 30,9% per la tetraciclina, 15,6% per l'eritromicina e 56,4% per la gentamicina (Miotti et al., 2023). Sul piano epidemiologico gestionale, in un'analisi retrospettiva ventennale condotta su oltre 100.000 campioni di latte bovino, *S. uberis* si è confermato il secondo patogeno più frequentemente isolato (14,8% dei campioni positivi), mostrando un *trend* di prevalenza in significativo aumento nel periodo 2005-2023, a differenza della maggior parte degli altri patogeni mastitogeni monitorati (Bütthe et al., 2025). Tale persistenza in allevamento, unita alla capacità di localizzazione intracellulare e alla formazione di ascessi mammari poco raggiungibili dai principi attivi, spiega perché nonostante la sensibilità farmacologica in vitro il tasso di guarigione clinica risulti spesso insoddisfacente e le recidive frequenti (Bütthe et al., 2025). A conferma di tale tendenza alla recidiva, è stato osservato un aumentato rischio

di reinfezione anche nei quarti mammari già trattati con successo per *S. uberis*, fenomeno peraltro descritto anche per le mastiti da *S. aureus* (Cobirka et al., 2020).

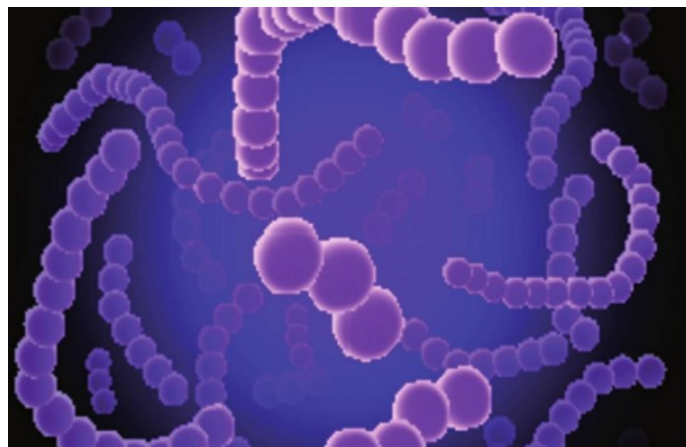


Figura 7. *Streptococcus uberis*

Streptococcus dysgalactiae

Streptococcus dysgalactiae subsp. *dysgalactiae* condivide con le altre specie del genere la morfologia cocciforme Gram-positiva organizzata in catenelle (Figura 8). Dal punto di vista colturale la maggioranza dei ceppi si presenta non emolitica, sebbene esistano eccezioni alfa-emolitiche. Fenotipicamente il microrganismo risulta CAMP-negativo, non idrolizza l'esculina ed è generalmente classificato nel gruppo C di Lancefield (Kabelitz et al., 2021). La collocazione epidemiologica di *S. dysgalactiae* risulta di difficile inquadramento, poiché il patogeno è in grado di sopravvivere sia all'interno dell'ospite sia nell'ambiente, ragion per cui viene generalmente descritto come agente "intermedio", a cavallo tra i contagiosi e gli ambientali. Un elemento peculiare della sua epidemiologia è rappresentato dal ruolo della mosca *Hydrotaea irritans*, coinvolta nella trasmissione e nel mantenimento delle infezioni mammarie, alla base del fenomeno noto come "mastite estiva", particolarmente diffuso nel Nord Europa e in Giappone. La specie è primariamente associata a infezioni bovine, sebbene possa colpire occasionalmente anche altri ruminanti quali capre e pecore (Kabelitz et al., 2021).

S. dysgalactiae causa sia mastiti croniche persistenti sia, in taluni casi, quadri clinici particolarmente severi: sono state segnalate infezioni associate a sindromi tossico-simil-shock in bovini. In un modello sperimentale murino di infezione intramammaria, il ceppo HLJ2019 di origine bovina ha determinato un'infezione persistente, non eliminata dall'ospite nell'arco di dieci giorni di osservazione, con carica batterica mantenuta costantemente

elevata nella ghiandola mammaria, a testimonianza della capacità del patogeno di instaurare forme di mastite di lunga durata (An et al., 2021). *S. dysgalactiae* dispone di un ampio corredo di fattori codificanti proteine leganti componenti dell'ospite, funzionali all'evasione della risposta immunitaria: la proteina M-simile DemA lega il fibrinogeno riducendo il rischio di opsonizzazione, analogamente al legame diretto con le IgG e con il complesso alfa-2-macroglobulina-tripsina mediato dalla proteina MAG. Il batterio è inoltre capace di legare proteine della matrice extracellulare quali la fibronectina, favorendo l'adesione e l'internalizzazione nel tessuto mammario, nonché la vitronectina, il cui legame risulta implicato nella modulazione della fagocitosi da parte dei polimorfonucleati bovini. Tra gli altri determinanti descritti figurano la streptochinasi, capace di attivare il plasminogeno favorendo la degradazione del tessuto connettivo e l'invasione tissutale profonda, la ialuronidasi, e un superantigene («*S. dysgalactiae-derived mitogen*») in grado di indurre un'eccessiva attivazione del sistema immunitario con quadri potenzialmente pericolosi per la vita dell'animale. È stata inoltre documentata la capacità di formare biofilm su superfici idrofile, processo cui contribuirebbe un gene simile a *brpA* (Kabelitz et al., 2021). Coerentemente con queste evidenze, isolati bovini di campo hanno mostrato di possedere un'ampia varietà di geni codificanti fattori di virulenza che mediano l'adesione alle cellule epiteliali dell'ospite e la resistenza all'opsonofagocitosi. Questo anche attraverso il legame del fibrinogeno e il rilascio massivo di citochine, mentre l'adesione alle cellule epiteliali e la presenza di proteine leganti il plasminogeno associate alla parete cellulare sono considerate prerequisiti indispensabili per l'instaurarsi dell'infezione streptococcica (An et al., 2021). Il profilo di antibiotico-resistenza di *S. dysgalactiae* si differenzia in parte da quello di *S. uberis*: dati di sorveglianza europea indicano come la resistenza più marcata sia quella nei confronti della tetraciclina (38,5%), mentre le resistenze verso eritromicina, lincomicina, kanamicina, enrofloxacin e streptomina si attestano su valori decisamente più contenuti (3-5%), con resistenza pressoché assente per oxacillina e gentamicina e una quota di ceppi multiresistenti limitata al 6%. Sul piano terapeutico generale, va peraltro rilevato come gli streptococchi mastidogeni, *S. dysgalactiae* compreso, permangano generalmente assai sensibili ai betalattamici, che restano pertanto la classe antimicrobica d'elezione nel trattamento delle mastiti streptococciche, con tassi di guarigione della forma subclinica riportati attorno al 90% per le infezioni sostenute da *S. agalactiae*, *S. uberis* e *S. dysgalactiae* (Kabelitz et al., 2021).

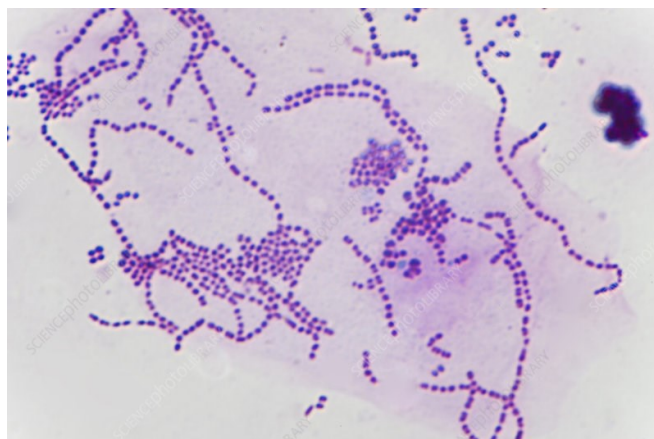


Figura 8. *Streptococcus dysgalactiae*

Escherichia coli

Escherichia coli (Figura 9) è un bacillo Gram-negativo asporigeno appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, la cui caratteristica biologica di maggior rilievo è l'elevata plasticità genomica, che ne ha consentito l'evoluzione da commensale ubiquitario del tratto gastrointestinale a patogeno opportunisto capace di colonizzare distretti extra intestinali, tra cui la ghiandola mammaria bovina (Goulart e Mellata, 2022). Una volta penetrato nella cisterna del capezzolo, il microrganismo è in grado di fermentare il lattosio, utilizzandolo come substrato energetico per una moltiplicazione particolarmente rapida, che può incrementare la carica batterica di 8-10 volte ogni due ore, pur senza necessariamente aderire alla superficie epiteliale, tendendo a permanere libero nel lume di cisterne, dotti e alveoli (Mori et al., 2026). In condizioni di risposta neutrofila ritardata, tale replicazione può risultare ancora più rapida, con un raddoppiamento della popolazione batterica stimato ogni 20 minuti circa e cariche che possono raggiungere concentrazioni fino a 10^8 unità formanti colonia per millilitro di latte (Cobirka et al., 2020). *E. coli* viene comunemente rinvenuto nel suolo, nelle acque, nelle feci e nei materiali di lettiera, ragione per cui viene classificato tra gli agenti eziologici ambientali della mastite bovina, in contrapposizione ai patogeni contagiosi trasmessi prevalentemente per via diretta durante la mungitura (Li et al., 2026). La contaminazione fecale della cute del capezzolo costituisce la principale via di accesso del microrganismo all'interno del parenchima ghiandolare (Goulart e Mellata, 2022). *E. coli* è responsabile prevalentemente di forme di mastite clinica acuta, generalmente di breve durata (10-30 giorni circa), che insorgono con maggiore frequenza nelle ultime due settimane del periodo di asciutta e nelle prime settimane di lattazione (Panchal et al., 2024). Tale associazione con il parto è confermata anche da altre casistiche, secondo le quali

fino al 65% dei casi di mastite clinica diagnosticati nei primi due mesi di lattazione avrebbe avuto origine proprio durante il periodo di asciutta, con una quota pari al 50% quando si considerano specificamente le infezioni causate da *E. coli* (Cobirka et al., 2020). Nella maggioranza dei casi l'infezione viene risolta dalla risposta immunitaria dell'ospite, mentre le forme più gravi, caratterizzate da coinvolgimento sistemico con febbre, depressione, anoressia e disidratazione, presentano una prognosi riservata e possono associarsi a un'alterazione marcata della secrezione lattea, con presenza di coaguli, fiocchi e odore anomalo (Panchal et al., 2024). Nelle forme più lievi, la guarigione avviene generalmente senza esiti significativi per il tessuto ghiandolare, mentre nei casi più gravi la forma iperacuta di mastite da *E. coli* è considerata la causa più comune di decesso tra le mastiti coliformi (Yu et al., 2025). L'esito clinico dell'infezione risulta peraltro condizionato, oltre che dalla gravità intrinseca del quadro, anche da fattori legati all'ospite quali il bilancio energetico negativo, eventuali carenze vitaminiche e lo stato vaccinale dell'animale (Cobirka et al., 2020). Il rilascio di endotossine da parte del batterio può inoltre determinare complicanze sistemiche quali zoppia, polmonite e peritonite, con ripercussioni rilevanti sia sulla produttività dell'allevamento sia sul benessere dell'animale (Panchal et al., 2024). Il microrganismo è tuttavia responsabile anche di una quota non trascurabile di mastiti subcliniche, condizione nella quale, insieme ad altri Gram-negativi quali *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*, contribuisce in maniera significativa all'incremento del numero di cellule somatiche nel latte (Goulart e Mellata, 2022). Dati raccolti su ampia scala in ambito diagnostico confermano una prevalenza rilevante (13,2% dei campioni positivi) tra gli agenti eziologici di mastite, con un progressivo aumento nell'arco di un ventennio, a differenza dell'andamento in lieve declino osservato per la maggior parte degli altri patogeni mastitogeni nello stesso periodo (Bütthe et al., 2025). Sul piano gestionale, è stato proposto un incremento della frequenza di mungitura come intervento di supporto nelle forme coliformi di grado lieve-moderato, poiché favorisce lo svuotamento della cisterna e la rimozione meccanica della carica batterica; tale approccio risulta tuttavia inefficace nelle forme più gravi, nelle quali la velocità di replicazione del patogeno supera la capacità di rimozione ottenibile con la sola mungitura (Cobirka et al., 2020). Sul piano dell'impatto produttivo, la mastite da *E. coli* è stata associata, in bovine di razza Holstein, a una riduzione della produzione giornaliera di latte prossima al 15%, corrispondente a una perdita media di circa 200 litri per capo nell'arco dei 305 giorni di lattazione; nelle forme persistenti tale perdita risulta considerevolmente più elevata, potendo raggiungere i 1.500 litri per capo con un calo della produzione giornaliera superiore al 30% (Goulart e Mellata, 2022). Per quanto

concerne i fattori di virulenza, i ceppi isolati da casi di mastite, talora indicati con l'acronimo MPEC (*Mammary Pathogenic E. coli*), esprimono strutture adesive quali le fimbrie di tipo 1 (fimH, fimA) e il pilo comune (ecpA), fattori di resistenza al siero (traT, ompT) ed emolisina (hlyA) (Li et al., 2026). Un ruolo determinante è svolto dai sistemi di acquisizione del ferro, elemento scarsamente disponibile nel latte poiché sequestrato da lattoferrina, transferrina e citrato: il sistema Fec, deputato alla captazione del ferro tramite ferrodicitrato, risulta essenziale per la crescita batterica nell'ambiente mammario, come dimostrato dall'incapacità di ceppi privi di tale sistema di indurre mastite sperimentale e, all'opposto, dall'acquisizione di potenziale patogeno da parte di ceppi commensali una volta dotati dello stesso apparato genico (Goulart e Mellata, 2022). Tale limitazione risulta particolarmente marcata durante il periodo di asciutta, fase nella quale la ghiandola mammaria bovina presenta concentrazioni elevate di lattoferrina, proteina in grado di sequestrare il ferro disponibile e di esercitare così un'azione antibatterica diretta nei confronti dei coliformi (Cobirka et al., 2020). È stato peraltro ipotizzato che proprio la dipendenza funzionale dal sistema Fec possa spiegare la relativamente scarsa prevalenza, negli isolati mastite-associati, di altri geni sideroforici quali *irp2* e *iucD* (Li et al., 2026). Nonostante l'identificazione di questi determinanti, analisi genomiche comparative condotte su isolati di campo non hanno individuato un profilo genetico né una distribuzione di *sequence type* in grado di distinguere in maniera consistente i ceppi mastite-associati da quelli commensali, a sostegno dell'ipotesi che il fenotipo MPEC non configuri un vero e proprio patotipo distinto, quanto piuttosto un comportamento opportunistico legato alla pressione selettiva esercitata dall'ambiente mammario (Laterza et al., 2025). La mastite da coliformi non richiede generalmente un trattamento antibiotico sistematico, in virtù dell'elevata frequenza di guarigione spontanea, fatta eccezione per le forme più gravi a insorgenza puerperale, per le quali sono indicati fluorochinoloni o cefalosporine di terza o quarta generazione, al fine di contenere la proliferazione batterica incontrollata e ridurre il rischio di batteriemia. A tale proposito, è stato dimostrato come la somministrazione precoce di antimicrobici ad alte concentrazioni, in presenza di basse cariche batteriche, sia associata a un rilascio significativamente inferiore di endotossina rispetto a trattamenti instaurati in presenza di cariche batteriche già elevate, condizione quest'ultima nella quale l'effetto protettivo della terapia risulta sensibilmente ridotto (Mori et al., 2026). Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza costituisce una criticità di crescente rilievo: sono stati descritti ceppi resistenti a numerose classi antimicrobiche, incluse aminopenicilline, polipeptidi, lincosamidi, macrolidi, tetracicline, cefalosporine, fluorochinoloni e sulfonamidi, con studi che riportano tassi di

resistenza multipla superiori al 70% in isolati mastite-associati (Panchal et al., 2024). Particolarmente preoccupante risulta la diffusione crescente di ceppi produttori di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL), la cui presenza nel latte pone anche un problema di sicurezza alimentare per il possibile rischio di trasmissione zoonotica. Infine, la capacità di *E. coli* di organizzarsi in *biofilm* sulla superficie del tessuto mammario infetto è stata proposta come possibile spiegazione della persistenza e della recidiva di alcune forme di mastite, anche in presenza di apparente sensibilità in vitro agli antimicrobici (Goulart e Mellata, 2022).



Figura 9. Colonie di *Escherichia coli* su terreno McConkey

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae (Figura 10) è, al pari di *E. coli*, un bacillo Gram-negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, dotato di una marcata capacità di sopravvivenza sia nell'ambiente esterno sia sulle superfici, caratteristica che ne favorisce una rapida diffusione all'interno della mandria (Panchal et al., 2024). Il patogeno trova il proprio *reservoir* primario soprattutto nei materiali di lettiera, in particolare nella segatura, sebbene anche l'acqua e il suolo possano fungere da substrati favorevoli alla sua sopravvivenza (Yu et al., 2025). Anche questo microrganismo viene classificato tra gli agenti eziologici ambientali della mastite bovina (Li et al., 2026), sebbene non sia da escludere, in alcune circostanze, una trasmissione occasionale da un capo infetto a un capo sano (Cobirka et al., 2020). *K. pneumoniae* è considerata responsabile delle forme di mastite più severe tra i patogeni Gram-negativi, con un grado di gravità che, secondo alcune osservazioni, risulterebbe addirittura superiore a quello di *E. coli*, mentre generi quali *Serratia* ed *Enterobacter* tenderebbero a determinare quadri clinici relativamente più

contenuti (Mori et al., 2026). Il microrganismo può tuttavia causare sia forme cliniche, con tumefazione, calore e dolore a carico dei quarti mammari colpiti, sia forme subcliniche, meno manifeste ma in grado di compromettere in maniera silente la produzione e la qualità del latte, oltre a rappresentare un potenziale serbatoio di infezione all'interno dell'allevamento qualora non tempestivamente identificate (Panchal et al., 2024). Sebbene la gravità delle infezioni da *Klebsiella* spp. si collochi generalmente a un livello clinico lieve o subclinico, sono stati descritti anche casi con esito fatale: in un caso di necropsia condotto su una bovina sottoposta a eutanasia per un quadro di mastite clinica grave, il microrganismo è stato isolato non solo dalla ghiandola mammaria ma anche da frammenti di tessuto polmonare, a testimonianza della possibilità, seppur rara, di una disseminazione sistemica del patogeno (Cobirka et al., 2020). *K. pneumoniae* possiede fimbrie di tipo I (fimABCDGH) e di tipo III (mrkABCD), rispettivamente coinvolte nell'adesione iniziale alle cellule dell'ospite e nella formazione di *biofilm*, quest'ultima funzionale al mantenimento di una colonizzazione persistente della ghiandola mammaria. La capsula polisaccaridica e le proteine di membrana esterna concorrono in maniera sinergica all'elusione della risposta immunitaria, mascherando gli antigeni di superficie e conferendo resistenza alla fagocitosi, mentre il gene *wabG*, coinvolto nella biosintesi del *core* lipopolisaccaridico, rappresenta un ulteriore determinante in grado di potenziare tale elusione. Analogamente a *E. coli*, anche per questa specie l'acquisizione del ferro riveste un ruolo cruciale nell'ambiente a bassa disponibilità marziale rappresentato dalla ghiandola mammaria, funzione assolta principalmente dall'operone *kfu* (Li et al., 2026). A tal proposito, *K. pneumoniae* risulta complessivamente più efficace della maggior parte dei ceppi di *E. coli* nel superare l'azione inibitoria della lattoferrina, il che contribuisce a spiegarne la capacità infettiva nei confronti della ghiandola mammaria (Cobirka et al., 2020). È stato inoltre osservato come i ceppi di *K. pneumoniae* associati a mastite bovina possiedano con una certa frequenza operoni per il metabolismo del lattosio, elemento che potrebbe conferire un vantaggio metabolico in un ambiente ricco di questo zucchero quale il tessuto mammario in lattazione (Li et al., 2026). Il trattamento delle infezioni da *K. pneumoniae* risulta particolarmente problematico a causa dello sviluppo di resistenza nei confronti di numerosi antimicrobici di uso comune, situazione che impone un approccio più strategico e ponderato nella scelta della terapia. Tale criticità trova riscontro anche a livello genetico, con la descrizione di determinanti di resistenza quali *blaTEM*, responsabile della produzione di beta-lattamasi con conseguente inattivazione delle penicilline, nonché di geni quali *mcr-1* e *mphA*, correlati rispettivamente a resistenza alla colistina e ai macrolidi, riscontrati sia in *K. pneumoniae* sia in *E. coli* (Panchal et al., 2024).

Dati raccolti su larga scala in ambito diagnostico confermano una presenza costante, sebbene quantitativamente minoritaria rispetto ad altri agenti eziologici, di *K. pneumoniae* tra le cause di mastite bovina (Büthe et al., 2025). Sotto il profilo dell'impatto produttivo, la mastite clinica da *K. pneumoniae* è stata associata, nelle bovine pluripare, a una riduzione della produzione giornaliera di latte stimata in circa 4,9 kg durante la settimana di insorgenza, con perdite che possono protrarsi per diverse settimane (Yu et al., 2025). Dati sperimentali ottenuti mediante inoculazione artificiale del patogeno hanno inoltre evidenziato un calo della produzione latte di circa il 60% già nella prima giornata successiva all'infezione, con valori che si attestano attorno al 15% rispetto al gruppo di controllo nella seconda giornata, senza un pieno recupero produttivo entro la fine del periodo di osservazione (Yu et al., 2025).



Figura 10. *Klebsiella pneumoniae* (immagini microscopio elettronico tratta da stock.adobe.com)

Stafilococchi coagulasi-negativi (CNS)

Gli Stafilococchi coagulasi-negativi (CNS: *Coagulase-Negative Staphylococci*) costituiscono un gruppo eterogeneo di specie cocciformi Gram-positive appartenenti al genere *Staphylococcus*, distinte dallo *Staphylococcus aureus* per l'incapacità di coagulare il plasma di coniglio (Taponen & Pyörälä, 2009). Attualmente il genere comprende oltre 39 specie caratterizzate, delle quali solo un numero ristretto si dimostra rilevante come agente di mastite bovina, tra cui *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. warneri* e *S. xylosus* (Elhaig et al., 2024), nonché *S. hyicus* e *S. haemolyticus* (Taponen & Pyörälä, 2009). L'identificazione fenotipica basata su test biochimici (es. API Staph ID 32) risulta spesso imprecisa, con una concordanza con la genotipizzazione molecolare (AFLP: *Amplified*

Fragment Length Polymorphism) che si attesta solo intorno al 66-75% (Taponen et al., 2006).

I CNS sono considerati normali componenti della microflora cutanea, colonizzando in particolare il canale del capezzolo, la cute della mammella e altri siti extramammari delle bovine (Taponen & Pyörälä, 2009). È interessante notare come le specie prevalenti nei campioni di latte (*S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. simulans*) differiscano parzialmente da quelle isolate più frequentemente dalla cute del capezzolo (*S. xylosus*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus*), suggerendo una parziale specificità di nicchia (Taponen & Pyörälä, 2009). *S. chromogenes* risulta particolarmente associato alle manze e alle bovine in prossimità del parto, mentre *S. simulans* prevale nelle infezioni insorte durante la lattazione avanzata (Taponen & Pyörälä, 2009). I CNS sono tradizionalmente classificati come patogeni minori, associati prevalentemente a forme subcliniche o a mastiti cliniche di grado lieve, caratterizzate da modesto innalzamento della conta di cellule somatiche (SCC) e assenza di sintomatologia sistemica (Taponen & Pyörälä, 2009). La SCC media in corso di infezione da CNS risulta significativamente inferiore rispetto a quella osservata nelle infezioni da *S. aureus* (Taponen & Pyörälä, 2009).

I CNS hanno la capacità di formare biofilm, mediata prevalentemente dal locus *ica* (*intercellular adhesion*), responsabile della sintesi del polisaccaride intercellulare adesivo (Elhaig et al., 2024). In uno studio condotto in Egitto, il 27,3% degli isolati di CNS hanno mostrato la capacità di formare biofilm, percentuale inferiore rispetto a quella riscontrata in *S. aureus* (63,2%) (Elhaig et al., 2024). Accanto al gene *ica*, è stato individuato anche il gene *bap* (*biofilm-associated protein*), identificato in isolati di *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans* e *S. hyicus* (Taponen & Pyörälä, 2009). I CNS possiedono inoltre capacità di adesione e internalizzazione nelle cellule epiteliali mammarie paragonabile a quella di *S. aureus*, sebbene con minore capacità invasiva (Taponen & Pyörälä, 2009). Dati derivati da isolati di mastite di origine bovina indicano una prevalenza di produzione di enterotossine stafilococciche e della tossina della sindrome da shock tossico (TSST-1) sovrapponibile a quella di *S. aureus* (Taponen & Pyörälä, 2009). La produzione di β -lattamasi rappresenta il principale meccanismo di resistenza descritto negli stafilococchi (Taponen & Pyörälä, 2009), mentre il gene *mecA*, associato alla meticillino-resistenza, è stato rilevato con frequenza notevole negli isolati mastitogeni, fino al 90,9% in un recente studio egiziano (Elhaig et al., 2024).

La risposta terapeutica dei CNS agli antimicrobici risulta nel complesso favorevole: i tassi di guarigione batteriologica riportati per i quarti trattati con antibiotici raggiungono l'85,9%, contro il 45,5% osservato nei quarti non trattati (Taponen & Pyörälä, 2009). Tale efficacia risulta però condizionata dalla produzione di β -lattamasi: i tassi di guarigione scendono infatti dall'88,4% negli isolati β -lattamasi-negativi al 66,7% in quelli β -lattamasi-positivi (Taponen et al., 2006). Va tuttavia segnalato un trend preoccupante di crescente resistenza antimicrobica: in un recente studio condotto in Egitto, gli isolati di *S. epidermidis* e *S. chromogenes* hanno mostrato un profilo di farmaco-resistenza estesa (XDR: *Extensively drug-resistant bacteria*). Nel complesso, gli isolati di CNS esaminati hanno mostrato elevata resistenza ad ampicillina (81,8%), tetraciclina (72,7%) e clindamicina (63,6%). La comparsa di ceppi CNS multidrug-resistant (MDR: *Multi-drug resistance*) portatori del gene *ica* rappresenta pertanto una concreta minaccia per il successo dei protocolli terapeutici convenzionali e per il controllo della mastite negli allevamenti (Elhaig et al., 2024).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa (Figura 11) è un bacillo Gram-negativo, mobile, ossidasi-positivo, dotato di elevata versatilità metabolica che gli consente di adattarsi a condizioni ambientali sfavorevoli (Huang et al., 2024). Sulle piastre di agar sangue e su terreni selettivi le colonie presentano un caratteristico odore "d'uva" (grape-like), morfologia mucoide con pattern di crescita metallico, comportamento β -emolitico e assenza di fermentazione del lattosio su Mac Conkey; la pigmentazione delle colonie (giallo-verde, blu-verde, rossastra o brunastra), dovuta alla produzione di piocianina, piomelanina, pioverdina e piorubina, è particolarmente variabile ed è influenzata da fattori genetici e ambientali (Schauer et al., 2021). *P. aeruginosa* è un patogeno ambientale ubiquitario, ampiamente diffuso in ambienti umidi. Le principali fonti di infezione individuate comprendono lettieri sporche, acqua contaminata (comprese le vasche di abbeverata), tubi di lavaggio degli impianti di mungitura, ma anche soluzioni disinfettanti per i capezzoli e panni riutilizzabili impiegati nella preparazione pre-mungitura, quando contaminati. A differenza dei patogeni contagiosi tipici, la trasmissione da bovina a bovina tramite l'impianto di mungitura risulta poco plausibile data la natura ambientale del microrganismo; tuttavia, in presenza di un'unica fonte puntiforme di contaminazione (ad esempio panni per capezzoli o soluzioni di lavaggio), un singolo ceppo può risultare responsabile della quasi totalità dei casi in un allevamento. Il quadro clinico della mastite da *P. aeruginosa* è estremamente variabile e dipende dalla dose di

esposizione, spaziando da forme di mastite tossica con sintomi severi di tossiemia, marcata tumefazione della mammella, ipertermia e secrezione latte acquosa con coaguli o sangue, fino a infezioni croniche non cliniche caratterizzate unicamente da innalzamento della conta di cellule somatiche. Il decorso più comune descritto è quello di una mastite inizialmente lieve che evolve verso uno stadio di infezione cronica, con conta cellulare somatica marcatamente elevata e progressiva riduzione della produzione latte. In uno studio su un focolaio austriaco, la mastite si è manifestata come infezione cronica e progressiva a livello di allevamento, senza tuttavia i segni acuti tipici della forma severa (Schauer et al., 2021). *P. aeruginosa* possiede numerosi fattori di virulenza, tra cui fattori di superficie (flagelli, ife, lipopolisaccaridi, alginato, proteine di membrana) e tossine secrete tramite i sistemi di secrezione di tipo I, II e III (Huang et al., 2024). Il sistema di secrezione di tipo III (TTSS) riveste un ruolo particolarmente rilevante nella patogenesi mammaria, iniettando direttamente nel citosol delle cellule ospiti proteine effettrici quali ExoU (citotossina ad attività fosfolipasica), ExoS ed ExoT (enzimi ADP-ribosilanti) ed ExoY (adenilato ciclasi), questi ultimi tre coinvolti in adesione, fagocitosi e diffusione sistemica del patogeno. Le forme "invasive" (exoU-/exoS+) e "citotossiche" (exoU+/exoS-) presentano pattern patogenetici distinti, e in campioni di latte mastitico contenenti ceppi citotossici/invasivi (exoU+/exoS+) è stata riscontrata una conta cellulare somatica significativamente più elevata rispetto agli altri genotipi (Park et al., 2014). Il ceppo possiede inoltre una spiccata capacità di formazione di biofilm, che agisce da barriera fisiologica proteggendo la popolazione batterica sia dai meccanismi di difesa immunitaria dell'ospite sia dall'azione degli antimicrobici. È stata inoltre documentata una correlazione inversa tra numero di geni di virulenza (in particolare *exoU* e *toxA*) e capacità di formazione del biofilm, suggerendo un trade-off adattativo tra virulenza acuta e persistenza a lungo termine (Huang et al., 2024). *P. aeruginosa* è intrinsecamente resistente a numerosi antimicrobici comunemente impiegati nella terapia della mastite, quali ampicillina, amoxicillina (anche in associazione con acido clavulanico), cefalosporine di prima e seconda generazione e trimetoprim (Schauer et al., 2021). Tale resistenza intrinseca è attribuibile alla bassa permeabilità della membrana esterna e alla presenza di pompe di efflusso e β -lattamasi (Huang et al., 2024). La formazione di biofilm determina un ulteriore, drastico incremento della resistenza agli antimicrobici, che può risultare fino a 1000 volte superiore rispetto alla condizione planctonica; la concentrazione minima di eradicazione del biofilm (MBEC) è risultata significativamente superiore alla concentrazione minima inibente (MIC) per tutti gli antibiotici testati, con rapporti MBEC/MIC particolarmente elevati per meropenem e ciprofloxacina

(Park et al., 2014). Coerentemente, il trattamento antibiotico della mastite da *P. aeruginosa* risulta generalmente inefficace anche quando i test di sensibilità antimicrobica in vitro indicano suscettibilità; in un focolaio descritto in Austria, il trattamento ad alto dosaggio con enrofloxacin non ha determinato guarigione clinica e batteriologica nella maggior parte delle bovine trattate, rendendo necessaria l'eliminazione dei soggetti infetti. Il patogeno tende, inoltre, a persistere a lungo negli allevamenti colpiti, come dimostrato dall'isolamento ripetuto dello stesso ceppo per l'intero periodo di osservazione (tre mesi) in un focolaio di mastite bovina, portando importanti implicazioni economiche legate alla cronicità dell'infezione e alla scarsa efficacia terapeutica. (Schauer et al., 2021)



Figura 11. *Klebsiella pneumoniae* (crescita su Cetrimide Agar)

5 Epidemiologia e fattori di rischio

Epidemiologia della Mastite Bovina

La mastite è definita come un processo infiammatorio della ghiandola mammaria, causato nella maggioranza dei casi da microrganismi specifici, ma anche da irritazioni chimiche o traumi fisici, che coinvolge diverse classi di agenti eziologici quali batteri, lieviti e alghe unicellulari in grado di penetrare nella mammella attraverso lo sfintere del capezzolo. Gli studi epidemiologici condotti su questa patologia perseguono tipicamente un duplice obiettivo: da un lato fornire un'enumerazione dei patogeni circolanti in una determinata giurisdizione sanitaria, dall'altro stimare le tendenze temporali di prevalenza e di antibiotico-resistenza, al fine di orientare le strategie di controllo (Guaita et al., 2026).

La rilevanza epidemiologica della mastite bovina risiede innanzitutto nel suo carattere multifattoriale, che rende la patologia particolarmente complessa da controllare e che richiede un approccio integrato capace di considerare simultaneamente la gestione zootecnica, le condizioni ambientali, la circolazione dei patogeni e l'impiego di antimicrobici (Guaita et al., 2026). Sotto il profilo clinico, la mastite viene classicamente distinta in una forma clinica e in una forma subclinica: la prima si manifesta con la presenza di coaguli o secrezioni acquose nel latte, associata a quarti tumefatti, caldi e dolenti, e nei casi più gravi può condurre alla morte dell'animale, con conseguente scarto precoce; la seconda, priva di segni clinici evidenti, è di più difficile individuazione, si associa a un incremento della conta cellulare somatica e a una riduzione della produzione latte, e presenta una durata più prolungata della forma clinica, permettendo così una maggiore diffusione dei patogeni all'interno della mandria (Morales-Ubaldo et al., 2023).

Dal punto di vista dell'impatto produttivo ed economico, la letteratura riporta stime concordi circa l'entità delle perdite associate a questa patologia. A livello globale, il costo economico annuo è stato stimato in circa 200 dollari statunitensi per vacca, mentre negli Stati Uniti l'impatto complessivo è stato valutato in 2 miliardi di dollari e in India in circa 98.228 milioni di dollari (Krishnamoorthy et al., 2021). Analisi più dettagliate condotte negli Stati Uniti hanno stimato, per i primi 30 giorni di lattazione, un costo economico complessivo di 444 dollari per caso, di cui 128 dollari attribuibili a costi diretti (diagnostica, terapia, latte non commercializzabile, servizio veterinario, manodopera, perdite per morte) e la restante quota a costi indiretti quali scarto precoce, sostituzione degli animali e perdita di produzione latte. Analoghe stime sono state riportate per le aziende olandesi e per la Serbia, con un costo

medio di 80,32 euro (Morales-Ubaldo et al., 2023). Le perdite di produzione risultano inoltre differenziate in funzione dell'agente eziologico coinvolto, con riduzioni giornaliere di latte fino a 2,30 kg per le infezioni da *Staphylococcus aureus*, di 3,5 kg per *Escherichia coli*, di 2,1 kg per *Streptococcus uberis* e di 2,0 kg per *Streptococcus dysgalactiae* (Morales-Ubaldo et al., 2023). È stato inoltre stimato che le infezioni da *S. aureus* possano determinare una riduzione della produzione lattea fino al 45% a livello di singolo quarto mammario e al 15% a livello di intera bovina (Krömker, 2008).

Distribuzione epidemiologica della mastite

Soltau e il suo gruppo di ricerca hanno dimostrato come la prevalenza apparente intra-mandria possa essere stimata sia a livello di quarto che a livello di capo, ottenendo valori sostanzialmente differenti: per *Staphylococcus aureus*, ad esempio, la prevalenza a livello di quarto era del 5,0% mentre a livello di capo raggiungeva il 12,8%, con un range di variabilità intra-mandria compreso fra 0,0% e 77,3%. (Soltau et al., 2017) Analogamente, per *Streptococcus uberis* la prevalenza di quarto era del 2,1% e quella di capo del 6,5%, mentre per *Streptococcus dysgalactiae* i valori corrispondenti erano dello 0,9% e del 2,7%. A livello di mandria, la stessa indagine ha mostrato che il 70,6% delle aziende esaminate risultava positivo per *S. aureus*, il 64,7% per *S. uberis*, il 47,1% per *S. dysgalactiae* e soltanto il 2,0% per *Streptococcus agalactiae*, evidenziando come quest'ultimo agente, storicamente considerato l'agente contagioso per eccellenza, sia oggi divenuto relativamente raro rispetto ad altri patogeni (Soltau et al., 2017).

La prevalenza della mastite bovina, e in particolare quella dei singoli agenti eziologici, varia inoltre in maniera significativa in funzione delle caratteristiche dell'allevamento, del sistema produttivo adottato e dell'area geografica considerata. A livello continentale, la meta-analisi di Krishnamoorthy ha stimato una prevalenza globale di mastite subclinica del 42% (*Confidence Interval*=IC 95% 38-45%) e di mastite clinica del 15% (IC 95% 12-19%), con una marcata eterogeneità fra i continenti: la prevalenza di SCM risultava più elevata in Nord America (46%) seguita da Africa (44%), Asia (42%), Europa (37%), Oceania (36%) e America Latina (34%), mentre per la CM il valore più elevato si registrava in Europa (29%) e il più basso in Oceania (5%) (Krishnamoorthy et al., 2021).

Tale variabilità geografica si riscontra anche a scala più ridotta: Bellato et al. (2025), analizzando allevamenti montani dell'Appennino settentrionale italiano, hanno osservato

differenze significative di prevalenza tra aree caratterizzate da un progressivo spopolamento zootecnico e riduzione dei servizi agricoli e veterinari, e aree in cui l'attività lattiero-casearia risulta invece in espansione grazie alla presenza di denominazioni di origine protetta, dimostrando come il contesto socio-produttivo e la disponibilità di assistenza tecnica influenzino direttamente la distribuzione dei patogeni (Bellato et al., 2025)

La variabilità della prevalenza riportata fra i vari studi è riconducibile, oltre ai fattori già menzionati, anche alla razza degli animali, al patrimonio genetico, al numero di parti, allo stadio di lattazione, al potenziale produttivo, alle pratiche gestionali e alle condizioni climatiche (Krishnamoorthy et al., 2021). In particolare, è stato osservato che vacche con sette o più parti presentano una prevalenza di mastite superiore, e che il numero di giorni di lattazione risulta associato a un incremento della prevalenza della malattia (Morales-Ubaldo et al., 2023).

Distribuzione dei principali patogeni

Gli agenti patogeni della mastite bovina vengono comunemente suddivisi in patogeni contagiosi trasmessi da quarti infetti a quarti sani principalmente durante la mungitura, come *S. aureus* e *S. agalactiae* e patogeni ambientali, che colonizzano la mammella a partire dalla lettiera, dal suolo e dalle deiezioni, come i membri della famiglia *Enterobacteriaceae*, *S. uberis* e *S. dysgalactiae*. A questi si aggiungono i patogeni opportunisti, che colonizzano la pelle del capezzolo di animali sani e determinano infezione in condizioni di ridotta risposta immunitaria dell'ospite, nonché alghe non fotosintetiche del genere *Prototheca* (Bellato et al., 2025). Anche le moderne tecnologie di mungitura sono state indicate come potenziale fattore di rischio nella trasmissione dei patogeni: il sistema di mungitura automatizzato (AMS), pur contribuendo al benessere animale, deve essere considerato un possibile vettore di trasmissione, nonostante le procedure di pulizia e disinfezione applicate tra le mungiture (Guaita et al., 2026).

Situazione europea

Nel Regno Unito, nel 1940, un allevamento medio contava circa 15 capi, con una stima di 23 casi di mastite annui dovuti principalmente a patogeni oggi classificati come contagiosi, quali *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, e con una conta cellulare somatica media del latte prossima a 750.000 cellule/ml (Bertocchi et al., 2012).

Analogamente, nella provincia di Brescia, che da decenni concentra circa il 10% della produzione lattiera nazionale, nel 1974 si registrava una percentuale del 75% di allevamenti con conta cellulare superiore a 1.000.000/ml e del 93% con problemi di infezione mammaria da *S. agalactiae* (Bertocchi et al., 2012). In un'indagine condotta su una mandria serba di 550 capi, hanno rilevato che, su 81 campioni di latte analizzati, 24 (29,62%) risultavano positivi per patogeni causa di mastite, mentre i restanti 57 (70,38%) risultavano negativi all'esame batteriologico; tra i campioni positivi, il patogeno più frequentemente isolato era *E. coli* (8,64%), seguito da *Serratia marcescens* (7,40%), da specie del genere *Streptococcus* (6,17%), da *Proteus mirabilis* (3,70%) e, con frequenza minore, da *S. uberis*, da stafilococchi e da *Klebsiella oxytoca* (ciascuno all'1,23%) (Tomanić et al., 2022). Tale distribuzione, in cui i patogeni ambientali e opportunisti prevalgono nettamente su quelli tradizionalmente contagiosi, appare coerente con quanto osservato in Germania, pur riscontrando una prevalenza di mandria ancora elevata per *S. aureus* (70,6% degli allevamenti positivi), hanno documentato una prevalenza altrettanto rilevante per *S. uberis* (64,7%) e una quasi totale scomparsa di *S. agalactiae*, isolato in un'unica mandria su 51 (2,0%) (Soltau et al., 2017). Un quadro per molti aspetti sovrapponibile emerge dalle Fiandre, in Belgio, dove un'ampia indagine condotta su 178.668 campioni di latte di quarto, raccolti nell'ambito di 1.087 screening trasversali di mandria svolti in tre anni consecutivi, ha rilevato che il 40% delle bovine presentava almeno un quarto positivo alla coltura batteriologica; oltre il 57% delle infezioni intramammarie complessive risultava attribuibile a stafilococchi non-aureus, mentre *S. aureus* era responsabile del 18,4% degli isolamenti e *S. agalactiae* risultava pressoché eradicato, essendo stato riscontrato in appena lo 0,3% dei campioni positivi. Tale netta prevalenza degli stafilococchi non-aureus si confermava, seppur in misura leggermente inferiore (41,1%), anche tra le bovine con conta cellulare somatica composta superiore a 250.000 cellule/ml, nelle quali *S. aureus* rappresentava comunque il 25% degli isolamenti. Questo progressivo spostamento della distribuzione eziologica a favore degli stafilococchi non-aureus e a scapito di *S. aureus* è stato peraltro documentato, anche in altri contesti nazionali: in Finlandia la prevalenza di stafilococchi non-aureus è passata dal 39,8% del 1988 al 49,6% del 2001, mentre quella di *S. aureus* si è ridotta dal 30,9% al 10,2% nello stesso periodo; nel Wisconsin la prevalenza di stafilococchi non-aureus è aumentata dal 12,7% (1994) al 17,5% (2001), mentre *S. aureus* è diminuito dal 17,7% al 9,7%; nei Paesi Bassi, infine, la proporzione di quarti clinicamente sani infetti da *S. aureus* si è ridotta dal 54,1% del 1950 al 33,8% del 2001 (Piepers et al., 2007).

L'analisi comparativa condotta da Krishnamoorthy e collaboratori a livello di singoli paesi europei evidenzia inoltre una marcata eterogeneità geografica nella prevalenza complessiva della patologia: il Regno Unito ha mostrato la prevalenza più elevata di mastite clinica tra tutti i paesi censiti a livello mondiale (74%), seguito dalla Finlandia (45%), mentre valori nettamente inferiori sono stati registrati in Ucraina (1%) (Krishnamoorthy et al., 2021).

Situazione italiana

Il territorio italiano, e in particolare l'area settentrionale corrispondente alla giurisdizione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER), dispone di due ampie serie storiche di dati epidemiologici che, sommate, coprono un arco temporale di quasi due decenni: Si fa riferimento allo studio di Bertocchi relativo al periodo 2005-2011 e a quello più recente di Guaita relativo al decennio 2015-2024. (Bertocchi et al., 2012; Guaita et al., 2026) A questi si affianca l'indagine trasversale di Bellato condotta nel 2021 su allevamenti montani distribuiti tra Piemonte, Toscana ed Emilia-Romagna, che consente di cogliere le differenze legate al contesto produttivo e gestionale all'interno dello stesso paese. (Bellato et al., 2025)

Lo studio di Bertocchi, basato sull'analisi di 1.186.148 campioni di latte pervenuti presso i 17 laboratori diagnostici dell'IZSLER tra il 2005 e il 2011, ha evidenziato come solamente il 26,93% dei campioni (319.387 su un totale di 1.186.148) fornisse un'indicazione eziologica utile, mentre il restante 73,07% risultasse privo di crescita batterica significativa o contaminato da flora polimorfa (Bertocchi et al., 2012). Tra i campioni informativi, l'analisi per gruppi epidemiologici ha rivelato una tendenza estremamente significativa: la prevalenza dei patogeni contagiosi (*S. agalactiae* e *S. aureus*) è scesa dal 47,6% nel 2005 al 29,3% nel 2011, mentre quella dei patogeni ambientali è aumentata dal 23,6% al 35,7% e quella dei patogeni minori (rappresentati principalmente dagli stafilococchi coagulasi-negativi) dal 13,0% al 24,7%. Scomponendo tale andamento per singolo agente, l'infezione da *S. aureus* è passata dal 35,1% al 22,1% delle isolazioni, corrispondente a una riduzione relativa del 37%, mentre quella da *S. agalactiae* è diminuita dal 12,6% al 7,2%, con una riduzione del 43%. Parallelamente, gli streptococchi fecali (comprendenti *S. uberis*, *Enterococcus faecalis* e altre specie affini) sono aumentati dal 12,3% al 20,5% (+66,6%), *E. coli* dal 5,7% al 6,6% (+15,8%) e, in modo particolarmente marcato, *Prototheca* spp. dall'1,7% al 6,0%, con un incremento relativo del 252%. Gli autori attribuiscono la riduzione dei patogeni contagiosi all'efficacia dei piani di identificazione dei soggetti infetti, di terapia

in asciutta e di eliminazione dei portatori cronici, evidenziando la possibilità di estendere tali strategie di eradicazione anche a livello di intere aree territoriali o filiere produttive (Bertocchi et al., 2012).

Il decennio successivo, documentato da Guaita sulla base di 104.820 campioni (analizzati mediante i terreni EBA e T.K.T.) nel periodo 2015-2024, conferma e prolunga tale tendenza. La prevalenza dei campioni positivi ottenuti con il terreno combinato EBA+T.K.T. è aumentata in modo significativo dal 20,4% del 2015 al 33,2% del 2024, con una corrispondente diminuzione dei campioni negativi dal 68,5% al 48,6%. L'analisi condotta specificamente sul terreno T.K.T., utilizzato per la ricerca selettiva di *S. agalactiae*, non ha invece mostrato variazioni significative nella prevalenza dei campioni positivi (dall'8,01% del 2015 al 7,83% del 2024), a testimonianza di una situazione ormai stabilizzata su livelli contenuti per questo specifico patogeno, mentre è stato osservato un incremento significativo dei campioni contaminati ($p=0,031$). Sul terreno *Baird Parker* con supplemento RPF, impiegato per la ricerca di *S. aureus*, si è invece registrata una significativa riduzione della prevalenza di campioni positivi, dal 10,7% del 2015 al 5,21% del 2024 (Guaita et al., 2026).

A livello di genere batterico, la prevalenza complessiva calcolata sull'intero decennio ha individuato *Staphylococcus* (23,90%) e *Streptococcus* (20,51%) come i generi maggiormente rappresentati, seguiti dalla famiglia *Enterobacteriaceae* (12,98%), da *Enterococcus* (10,85%), da *Prototheca* (9,25%), da *Bacillus* (7,26%), da *Corynebacterium* (5,06%), dai lieviti (3,38%), da *Serratia* (3,03%) e da *Klebsiella* (1,38%). L'analisi delle tendenze temporali ha rivelato un incremento statisticamente molto significativo per il genere *Streptococcus*, la cui prevalenza è passata dal 10,58% del 2015 al 28,78% del 2024, oltre a incrementi significativi per la famiglia *Enterobacteriaceae* (dal 9,97% al 17,84%; $p=0,0253$), per il genere *Serratia* (dal 2,89% al 4,19%; $p=0,0111$) e, in misura più contenuta, per *Staphylococcus* (dal 18,00% al 20,05%; $p=0,0182$); di converso, sono stati osservati decrementi significativi per *Enterococcus* (dal 19,85% al 7,78%; $p=5,88 \times 10^{-8}$), per *Prototheca* (dal 16,21% al 4,56%; $p=3,84 \times 10^{-5}$) e per i lieviti (dall'8,42% al 3,06%; $p=1,14 \times 10^{-5}$) come illustrato nell'andamento delle tendenze nella Figura 12 (Guaita et al., 2026).

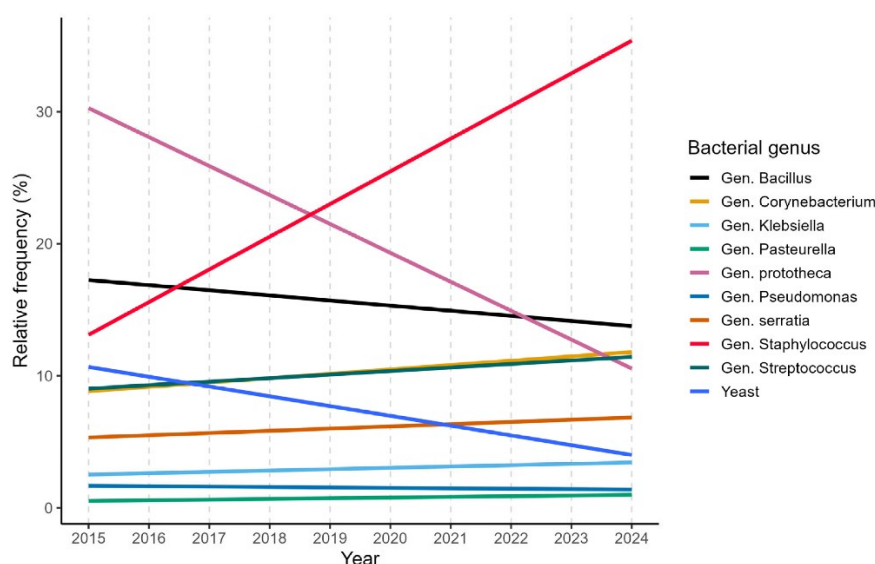


Figura 12: Trend lineari annuali dei 10 generi batterici più frequentemente isolati nel decennio 2015-2024 (Guaita et al. 2026)

A livello di singola specie, l'analisi condotta da Guaita et al. (2026) su 16.581 campioni identificati con precisione tassonomica ha confermato che *S. uberis* (13,66%) ed *E. coli* (12,23%) rappresentano complessivamente i patogeni più frequentemente isolati nell'intero decennio, seguiti da *S. aureus* (8,72%) e da *Enterococcus faecalis* (8,69%). Le tendenze temporali per singola specie ricalcano quelle osservate a livello di genere, con un aumento statisticamente molto significativo per *S. uberis* (dal 4,33% al 22,41%; $p=1,67 \times 10^{-8}$) e incrementi significativi per *E. coli* (dal 9,60% al 15,29%; $p=0,0478$) e per *Enterococcus faecium* (dall'1,29% al 2,35%; $p=0,0292$); parallelamente, si sono registrate riduzioni statisticamente significative per *Enterococcus faecalis* (dal 18,77% al 6,52%; $p=1,23 \times 10^{-9}$), per *S. agalactiae* (dal 3,48% al 2,01%; $p=0,0013$) e per *S. aureus* (dall'8,05% al 7,19%; $p=0,0019$). Questi mutamenti nella prevalenza delle singole specie sono visualizzati nel dettaglio delle tendenze decennali riportate in Figura 13 (Guaita et al., 2026). Un elemento interpretativo rilevante emerge dal confronto tra l'andamento del genere *Staphylococcus*, in aumento complessivo, e quello della specie *S. aureus*, in diminuzione: tale apparente discrepanza indica come la crescita del genere sia sostenuta principalmente da stafilococchi non-*aureus*, quali *Staphylococcus haemolyticus* (prevalenza media 2,75%, senza trend significativo), coerentemente con il fenomeno, già descritto a livello europeo, di espansione dei patogeni opportunisti a fronte del contenimento di quelli propriamente contagiosi. Gli autori attribuiscono la riduzione di *S. agalactiae* e *S. aureus* all'efficacia delle misure preventive e di controllo implementate nel territorio, in un quadro normativo definito dal

Regolamento (UE) 2019/6 e dal sistema di monitoraggio ClassyFarm, mentre l'aumento di *S. uberis*, *E. coli* ed *Enterococcus faecium* viene ricondotto principalmente alle condizioni di stabulazione, alla gestione della lettiera e all'igiene generale dell'allevamento, fattori che sottolineano la crescente importanza delle fonti ambientali di infezione (Guaita et al., 2026).

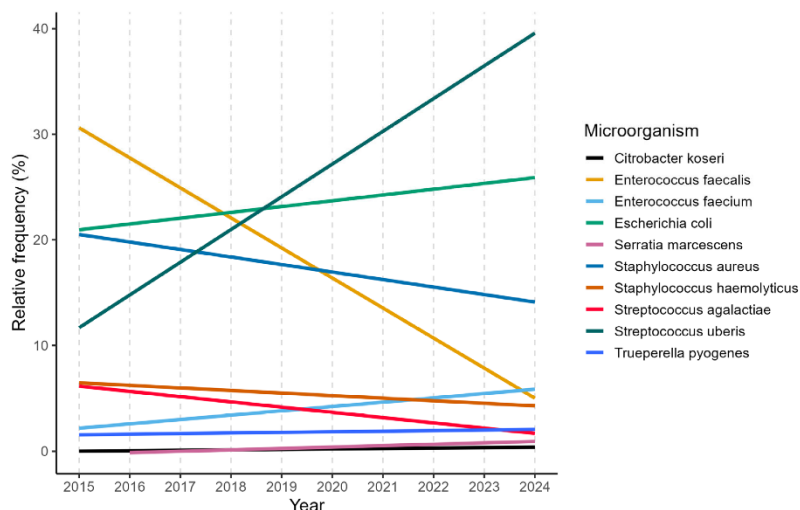


Figura 13: Trend lineari annuali dei 10 patogeni della mastite (singole specie) più frequenti (Guaita et al. 2026)

Per quanto riguarda la zona meridionale un'indagine condotta da Ferguson et al. (2007) nella provincia di Ragusa, in Sicilia, tra ottobre 2000 e giugno 2006, ha fornito un primo quadro rappresentativo del contesto zootecnico dell'Italia meridionale. Nello specifico, lo studio si è basato sull'analisi di 18.711 campioni di latte raccolti da 101 allevamenti siciliani, corrispondenti a 9.747 eventi di campionamento relativi a 5.285 bovine, ha rilevato una prevalenza grezza di infezione intramammaria a livello di bovina pari al 49,4%; tra i patogeni isolati, gli stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) risultavano i più frequenti (22,6% dei campioni di bovina), seguiti da *S. aureus* (20,6%), da altre specie di *Streptococcus non-agalactiae* (11,1%), da batteri coliformi (2,9%) e da *S. agalactiae* (2,3%) (Ferguson et al., 2007). Gli autori hanno documentato un'associazione significativa tra tipologia di lettiera e prevalenza di *S. aureus* e CNS, con un pattern opposto tra le due categorie: le bovine allevate senza lettiera presentavano una prevalenza di *S. aureus* superiore (24,5%) rispetto a quelle su lettiera organica (12,7%) o sabbiosa (12,3%), mentre per i CNS si osservava l'andamento inverso (13,1% in assenza di lettiera, contro 27,4% e 26,9% rispettivamente per lettiera organica e sabbiosa). La prevalenza di *Streptococcus spp.* ambientali risultava invece associata al sistema di stabulazione, con valori massimi nella stabulazione a posta

fissa (22,2%) e minimi nel paddock (7,1%). Dal punto di vista produttivo, un aumento della prevalenza mensile di *S. aureus* e di *Streptococcus spp.* a livello di mandria è risultato associato a una riduzione della produzione latte giornaliera, rispettivamente di 1,42 kg e di 1,31 kg per vacca, oltre che a un incremento del *linear score*; gli allevamenti con il miglior controllo della qualità del latte (*linear score* medio inferiore a 3,3) presentavano la prevalenza più bassa sia di mastite complessiva (35,8%) sia di *S. aureus* (5,9%), a fronte di valori rispettivamente del 64,5% e del 39,9% negli allevamenti con il controllo qualitativo peggiore. Infine, gli allevamenti che avevano aderito al programma di controllo della qualità del latte per più di un anno hanno mostrato una riduzione significativa della prevalenza dei patogeni contagiosi rispetto al primo anno di adesione, a conferma dell'efficacia, nel tempo, delle misure di monitoraggio e controllo (Ferguson et al., 2007).

Un quadro complementare, focalizzato sulle peculiarità gestionali degli allevamenti di montagna, è fornito da Bellato che hanno confrontato tre aree dell'Appennino settentrionale (provincia di Alessandria in Piemonte, alta valle del Serchio in provincia di Lucca in Toscana, e area di Castelnovo ne' Monti in provincia di Reggio Emilia in Emilia-Romagna) mediante l'analisi di 246 campioni di latte composito raccolti da 16 mandrie. (Bellato et al., 2025), La prevalenza complessiva di infezione intramammaria (IMI), corretta per giorni di lattazione e numero di parti, è risultata pari al 71,3% (IC 60,7-81,9%), senza differenze significative tra le tre aree. Tuttavia, la distribuzione per categoria eziologica ha rivelato differenze sostanziali: la prevalenza più elevata è stata osservata per i patogeni opportunisti (42,7%), seguiti da quelli ambientali (21,1%), da quelli contagiosi (19,4%) e da altri batteri minori (8,5%) (Bellato et al., 2025). In particolare, la prevalenza di patogeni contagiosi è risultata significativamente più elevata nelle aree di Alessandria (RR=11,41; IC 1,75-12,32) e di Lucca (RR=8,38; IC 2,27-10,77) rispetto a Reggio Emilia, con *S. aureus* quale specie contagiosa più frequentemente isolata (73,2% degli isolati contagiosi), seguita da *S. agalactiae* (22,0%) e da *Corynebacterium bovis* (9,8%); al contrario, la prevalenza di infezioni opportunistiche è risultata significativamente inferiore ad Alessandria (RR=0,40; IC 0,08-0,98) e a Lucca (RR=0,49; IC 0,23-0,83) rispetto a Reggio Emilia (Bellato et al., 2025). Tale distribuzione è il riflesso di una relazione più consistente e collaborativa tra allevatori e veterinari nell'area di Reggio Emilia, caratterizzata da una gestione sanitaria più accurata e da un migliore controllo delle infezioni contagiose, a fronte di una carenza di servizi diagnostici di routine nelle aree di Alessandria e Lucca, dove il progressivo spopolamento zootecnico e l'abbandono agricolo hanno ridotto l'accessibilità ai servizi veterinari specializzati (Bellato et al., 2025).

Le differenze osservate risultano inoltre coerenti con i diversi aspetti gestionali riscontrati nelle tre aree: dodici delle sedici mandrie esaminate erano allevate in stabulazione fissa con mungitura a impianto fisso, tre in stabulazione libera con sala di mungitura, e una impiegava un carrello di mungitura mobile. Tali osservazioni, unitamente al ruolo emergente dei sistemi di mungitura automatizzata quale potenziale vettore di trasmissione nei contesti più intensivi, confermano come, anche all'interno del contesto italiano, la distribuzione dei principali patogeni causa di mastite bovina sia strettamente correlata al sistema produttivo e gestionale adottato, oltre che al livello di integrazione tra allevatori e servizi veterinari territoriali (Guaita et al., 2026).

6 La diagnosi della mastite bovina

La mastite bovina rappresenta una delle patologie a maggiore impatto nell'allevamento da latte a livello mondiale, con conseguenze che si ripercuotono simultaneamente sulla salute dell'animale, sulla qualità del prodotto e sulla redditività aziendale. Sul piano produttivo, la malattia determina una significativa riduzione della funzione di lattazione, un calo della produzione di latte crudo e alterazioni della composizione del latte stesso, quali l'aumento della conta cellulare somatica e lo squilibrio del rapporto proteine/grassi. Tali modificazioni si traducono in un deterioramento della qualità e della sicurezza del prodotto, con conseguenti perdite economiche rilevanti per l'intero comparto zootecnico. Dal punto di vista economico, la mastite risulta responsabile di costi sia diretti, legati ai trattamenti farmacologici, allo scarto del latte e all'eventuale riforma degli animali cronicamente infetti, sia indiretti, riconducibili principalmente alla riduzione della produzione latte causata dalle forme subcliniche (Yu et al., 2025).

In tale contesto, la tempestività della diagnosi assume un ruolo determinante. Un programma di controllo della mastite efficace ed efficiente richiede infatti l'identificazione precoce dell'infezione, resa possibile dalla comprensione della patogenesi, dall'individuazione di test sensibili per lo screening precoce e dall'adozione di corrette pratiche gestionali finalizzate a ridurre la probabilità di trasmissione dell'infezione tra i quarti infetti e quelli malati. L'identificazione precoce della mastite e dell'agente eziologico responsabile risulta cruciale ai fini del controllo e del trattamento, in quanto consente di ridurre i costi, limitare le perdite in termini di resa e qualità del latte e incrementare il tasso di guarigione degli animali colpiti. Diversi studi hanno peraltro dimostrato che un trattamento tempestivo, conseguente a una diagnosi precoce, limita in maniera significativa la gravità della malattia e, in numerosi casi, previene la comparsa di segni clinici visibili (Tommasoni et al., 2023). Le tecniche diagnostiche disponibili per la mastite svolgono dunque un ruolo cruciale nell'individuazione precoce del patogeno, agevolando un trattamento tempestivo e riducendo la trasmissione della malattia all'interno della mandria (Ramuada et al., 2024).

L'approccio diagnostico ottimale dovrebbe pertanto essere caratterizzato da rapidità, precisione e tempestività, così da favorire un'identificazione e una gestione puntuali della patologia (Yu et al., 2025). Tale esigenza risulta ancora più marcata considerando che la forma subclinica della malattia, priva di segni clinici manifesti, risulta da 15 a 40 volte più prevalente rispetto alla forma clinica, tende a precedere quest'ultima, presenta una lunga

durata, è di difficile individuazione, riduce la produzione di latte e ne compromette la qualità (Islam et al., 2011). La diagnosi precoce della mastite subclinica risulta pertanto essenziale per prevenire la diffusione dell'infezione all'interno della mandria, minimizzare il danno al tessuto mammario e garantire il successo del trattamento (Ramuada et al., 2024). Sul piano del benessere animale, occorre inoltre sottolineare che la mastite clinica compromette in maniera significativa il comfort delle bovine colpite e ne condiziona negativamente le performance riproduttive, con effetti quali la riduzione del tasso di concepimento, l'allungamento dell'intervallo parto-prima inseminazione, l'aumento del tasso di aborti e il prolungamento dei giorni aperti (Yu et al., 2025).

6.1 Diagnosi clinica e indiretta

La diagnosi della mastite bovina si articola su più livelli, distinti in funzione della forma clinica considerata. La mastite clinica (CM) è caratterizzata da alterazioni infiammatorie visibili a carico del latte e del tessuto mammario, con o senza segni clinici sistemici, mentre la forma subclinica (SCM) non manifesta segni clinici evidenti ma determina un aumento della conta cellulare somatica (Ramuada et al., 2024). Nello specifico, la mastite clinica si manifesta con febbre, inappetenza e letargia nell'animale, unitamente a mammella tumefatta, calda e arrossata, latte acquoso o con presenza di fiocchi e coaguli, e una conta cellulare somatica significativamente elevata, superiore a 70.000 cellule/mL; la forma subclinica, al contrario, non presenta alterazioni fisiche, mammarie o del latte percepibili e può essere individuata unicamente mediante test specifici, pur essendo associata a una riduzione della produzione latte e a un incremento della conta cellulare somatica. Di conseguenza, mentre la diagnosi della forma clinica si fonda tipicamente su una combinazione di ispezione visiva e palpazione, con particolare attenzione ad arrossamento e tumefazione della mammella, anomalie del latte e dolore durante la mungitura, la forma subclinica richiede necessariamente il ricorso a strumenti diagnostici specifici (Yu et al., 2025). Le bovine affette da mastite subclinica possono inoltre rappresentare una fonte di infezione per gli altri soggetti sensibili presenti in mandria.

Tra gli strumenti impiegati per il monitoraggio della mandria a livello di campo, la Conta delle Cellule Somatiche (SCC) e il *California Mastitis Test* (CMT) costituiscono i due approcci indiretti maggiormente utilizzati e validati nella pratica diagnostica corrente (Ramuada et al., 2024).

La Conta delle Cellule Somatiche

Le cellule somatiche sono cellule prodotte dal sistema immunitario della bovina che migrano verso il tessuto mammario e il latte per contrastare l'infezione. La SCC (*somatic cell count*) costituisce un indicatore significativo per la previsione dell'infezione intramammaria (IMI: *intramammary infection*) e per la valutazione della qualità del latte crudo, poiché livelli elevati di cellule somatiche nel latte sono stati dimostrati indicativi di un rischio accresciuto di IMI, oltre a esercitare un'influenza diretta sulla qualità del latte crudo stesso (Yu et al., 2025). Per un quarto mammario non infetto, il valore di riferimento della SCC si attesta approssimativamente a 70.000 cellule, con una variabilità attorno a tale media che può aumentare in funzione dell'età dell'animale, della riduzione della produzione latte e dello stadio di lattazione. La SCC del latte di massa (*bulk tank*) rappresenta un indicatore generale della salute della mammella a livello di mandria e viene considerata una misura indiretta della qualità del latte. Livelli elevati di SCC risultano correlati a modificazioni della composizione del latte, con riduzione della caseina e aumento delle proteine sieriche, oltre a un incremento delle attività proteolitiche e lipolitiche (Savić et al., 2017).

Nonostante l'ampio impiego della SCC nel monitoraggio della qualità del latte e nello screening delle IMI, permane un notevole disaccordo in letteratura circa la soglia diagnostica più appropriata. Yu e collaboratori riportano, ad esempio, che alcuni autori individuano in una SCC pari o inferiore a 70.000 cellule/mL l'indicazione di una mammella non infetta, mentre valori superiori a 100.000 cellule/mL sarebbero associati a un calo della produzione latte; altri autori, invece, hanno proposto soglie ottimali differenti, pari a 150.000 cellule/mL per i campioni di latte composito e a 200.000 cellule/mL per i campioni di latte per quarto (Yu et al., 2025). Analogamente, Savić segnala come il valore "*gold standard*" della conta cellulare somatica sia stato fissato in letteratura a 100.000 cellule/mL, mentre valori superiori sarebbero associati a una riduzione della produzione e della qualità del latte durante la lavorazione; negli allevamenti in cui la SCC del latte di massa supera le 300.000 cellule/mL viene generalmente ipotizzata la presenza di un problema di mastite in mandria, con latte meno idoneo alla trasformazione casearia (Savić et al., 2017). Tommasoni e il suo gruppo indicano invece un valore soglia di 200.000 cellule/mL quale riferimento per la definizione di infezione mammaria, precisando che un innalzamento prolungato della SCC suggerisce uno stato di infiammazione cronica del quarto colpito, potenzialmente interferente con lo sviluppo del tessuto secernente (Tommasoni et al., 2023).

Sul piano gestionale, la SCC riveste un'importanza normativa rilevante, essendo stata individuata come componente chiave della regolamentazione nazionale e internazionale relativa alla qualità e alla commercializzazione del latte. Negli Stati Uniti, la *Food and Drug Administration* fissa la soglia ufficiale della SCC per il consumo interno a 750.000 cellule/mL, con un sistema di controllo che prevede il ritiro del permesso di commercializzazione qualora tre test su cinque superino tale limite. In ambito europeo, un *Health Certification Program* specifico per le aziende esportatrici verso l'Unione Europea individua invece una soglia di 400.000 cellule/mL. Nel quadro normativo UE, il latte crudo bovino è disciplinato dal Regolamento (CE) n. 853/2004, che per il latte di massa prevede un limite di 400.000 cellule somatiche/ml, calcolato come media geometrica su tre mesi con almeno un campione al mese. Il superamento del limite può comportare misure correttive e restrittive nell'ambito dei controlli ufficiali previsti dal Regolamento (UE) 2017/625, secondo le procedure applicative dell'autorità competente. A livello di singolo animale, 200.000 cellule/ml è comunemente considerata una soglia di riferimento per sospettare mastite subclinica e una compromissione della salute mammaria (Tommasoni et al., 2023).

La conta cellulare somatica non è tuttavia un parametro statico, risultando soggetta a variazioni fisiologiche nel corso della lattazione: essa raggiunge generalmente il picco attorno ai 30 giorni di lattazione, in concomitanza con il picco produttivo, per poi aumentare progressivamente nel periodo successivo (Tommasoni et al., 2023). Ulteriori fattori non direttamente riconducibili all'infezione intramammaria, quali razza, mese di campionamento, stagione, stadio di lattazione, età dell'animale, parità, frequenza di mungitura, alimentazione e stress, sono stati identificati come possibili determinanti di variazione della SCC, con conseguente impatto sulla sua accuratezza diagnostica (Yu et al., 2025). È stato inoltre osservato che l'andamento della SCC nel tempo può variare in funzione del patogeno coinvolto: le infezioni intramammarie sostenute da *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* risultano spesso caratterizzate da lunga durata e valori di SCC elevati, mentre la mastite da *Escherichia coli* si associa tipicamente a picchi di breve durata (Tommasoni et al., 2023).

Dal punto di vista della performance diagnostica, la sensibilità della SCC come indicatore di infezione intramammaria varia, secondo la letteratura, tra il 30% e l'89%, con una specificità compresa tra il 60% e il 90%. Utilizzando una soglia di 200.000 cellule/mL su un campione di latte composito, sono stati riportati valori di sensibilità e specificità pari rispettivamente al 44% e all'87% per le infezioni sostenute da un qualsiasi patogeno, e al 65% e al 73% per le infezioni da patogeni maggiori. È stato altresì evidenziato come la capacità diagnostica della

SCC risulti ottimale a livello di singolo quarto piuttosto che a livello di intero animale. Tra i limiti intrinseci del metodo, va segnalata la possibilità che i livelli di SCC rimangano elevati per un certo periodo anche dopo l'eliminazione dell'agente patogeno, generando risultati falsamente positivi per l'infezione intramammaria (Ramuada et al., 2024). Nonostante tali limiti, l'analisi del latte di massa continua a rappresentare uno strumento utile per il miglioramento della qualità del latte e della salute mammaria a livello di mandria: pur essendo i campioni individuali per singola bovina più definitivi ai fini diagnostici, l'analisi del latte di massa risulta meno costosa, più pratica e più rapida rispetto al campionamento di singoli animali o gruppi di vacche (Savić et al., 2017).

Il *California Mastitis Test*

Il *California Mastitis Test* (CMT) rappresenta uno dei metodi indiretti di stima della conta cellulare somatica maggiormente diffusi nella pratica di campo, in virtù della sua semplicità esecutiva, economicità e rapidità. Il test si fonda sull'azione di un tensioattivo, generalmente il dodecilsolfato di sodio, che, a contatto con le cellule somatiche presenti nel latte, ne determina la lisi con conseguente rilascio del DNA nucleare; tale processo genera la formazione di un gel la cui consistenza e stabilità risultano direttamente proporzionali al numero di cellule somatiche presenti nel campione, fungendo così da indicatore indiretto del grado di infezione e infiammazione a carico della mammella (Yu et al., 2025). Il tensioattivo impiegato agisce inoltre riducendo la tensione superficiale, modificando la struttura e la conducibilità della membrana e del nucleo cellulare, interferendo con l'equilibrio osmotico, bloccando l'ossidazione, stimolando gli enzimi proteolitici e incrementando la viscosità del latte (Tommasoni et al., 2023).

Sul piano operativo, il test viene condotto raccogliendo il latte, come si osserva nella Figura 14, nell'apposita paletta CMT e aggiungendo un volume equivalente di reagente, mescolato mediante movimento rotatorio orizzontale per circa 10-15 secondi. La formazione del gel riflette una conta leucocitaria compresa tra 200.000 e 5.000.000 di cellule, indicativa di infezione intramammaria; la colorazione porpora che caratterizza la reazione risulta inoltre generalmente più intensa nei campioni provenienti da quarti infetti, in ragione del pH basico o alcalino di tali campioni, con una colorazione porpora intensa indicativa di un'alterazione della composizione del latte riconducibile a infezione mammaria. Diversi studi hanno documentato una correlazione significativa tra i punteggi CMT e i valori di SCC, con punteggi

CMT più elevati corrispondenti a una tendenza crescente della conta cellulare somatica (Tommasoni et al., 2023).

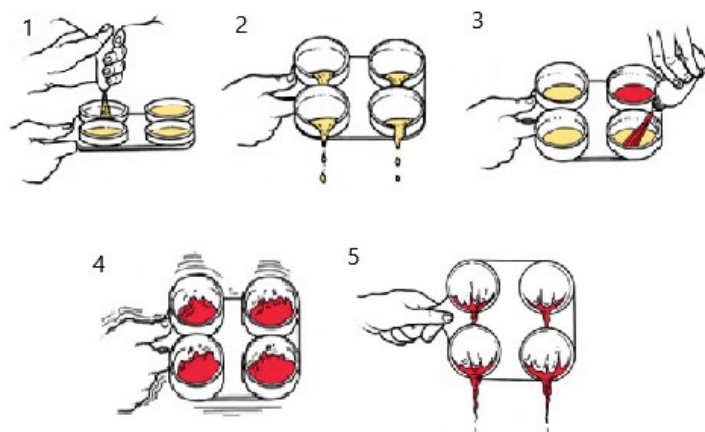


Figura 14: metodo di svolgimento del *California Mastitis Test (CMT)* (Blowey and Edmondson, 2010).

Per quanto concerne l'interpretazione dei risultati, è stato proposto un sistema di punteggio articolato su cinque livelli: un punteggio pari a 0, corrispondente a una consistenza normale del campione, indica l'assenza di infezione e una conta cellulare media stimata inferiore a 100.000 cellule/mL; un punteggio 1 ($\pm$), caratterizzato dalla formazione di un gel leggero che scompare dopo l'agitazione, segnala un rischio di infezione da patogeni minori con una conta stimata attorno a 300.000 cellule/mL; un punteggio 2 (+), con formazione di un gel persistente a filamenti, è indicativo di mastite subclinica con una conta stimata di circa 900.000 cellule/mL; un punteggio 3 (++), caratterizzato da un ispessimento immediato con formazione di un ammasso viscoso sul fondo del recipiente, indica mastite subclinica con una conta stimata di circa 2.700.000 cellule/mL; infine, un punteggio 4 (+++), con formazione di un gel denso di colore porpora scuro simile all'albume, è indicativo di mastite subclinica prossima all'espressione clinica, con una conta stimata di circa 8.100.000 cellule/mL (Islam et al., 2011).

Sotto il profilo della performance diagnostica, la letteratura ha ampiamente documentato l'utilità del CMT come test di riferimento primario per l'individuazione di bovine affette da mastite. Il test risulta il metodo di screening in azienda più accurato, pratico ed economico per la previsione della mastite subclinica al momento dell'asciutta. Una variante del test, il Wisconsin Mastitis Test (WMT), è stata sviluppata allo scopo di incrementare l'oggettività della misurazione della viscosità del latte, mantenendo il vantaggio di essere concepita per

lo screening in azienda o al momento della mungitura, con risultati ottenibili in pochi minuti e una misurazione semiquantitativa della conta cellulare somatica (Ramuada et al., 2024).

I dati relativi alla sensibilità e specificità del CMT variano peraltro in funzione del tipo di patogeno considerato e dello stadio di lattazione. In uno studio condotto in fase di lattazione precoce, la capacità del CMT di individuare infezioni intramammarie sostenute da patogeni maggiori (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. e organismi Gram-negativi) è risultata pari all'82,4% in termini di sensibilità e all'80,6% in termini di specificità; per le infezioni sostenute da patogeni minori, invece, la sensibilità si è attestata su valori inferiori, pari al 61%, mentre la specificità è rimasta costante all'80%. Un ulteriore studio, condotto al momento dell'asciutta a livello di singolo animale, ha riportato valori di sensibilità e specificità rispettivamente pari al 70% e al 48% (Ramuada et al., 2024). L'impiego del CMT per l'identificazione dei quarti infetti risulta ampiamente validato in bovine non in fase di lattazione precoce, e la possibilità di individuare non solo la forma clinica ma anche quella subclinica al termine della lattazione, prima dell'asciutta, assume particolare rilevanza ai fini dell'applicazione della terapia selettiva in asciutta (SDCT: *selective dry cow therapy*). In tal senso, uno studio ha dimostrato che punteggi CMT positivi rilevati alcune settimane prima dell'asciutta erano in grado di predire accuratamente la presenza di infezione intramammaria in oltre l'80% dei casi, mentre un ulteriore lavoro ha evidenziato un elevato valore predittivo negativo del CMT eseguito il giorno dell'asciutta per le infezioni sostenute da patogeni maggiori, pur in presenza di valori di specificità e di valore predittivo positivo relativamente contenuti (Tommasoni et al., 2023).

Va tuttavia sottolineato che il CMT, al pari della SCC su cui si basa concettualmente, risente dell'interferenza di fattori non infettivi quali la stagione, lo stress e lo stadio di lattazione, ragion per cui, pur risultando idoneo come strumento di *screening* preliminare, se ne raccomanda un utilizzo congiunto ad altri test di conferma ai fini di una diagnosi definitiva, non ritenendosi i suoi risultati, presi isolatamente, sufficienti a supportare decisioni gestionali di rilievo per la redditività dell'allevamento (Yu et al., 2025).

6.2 Diagnostica eziologica microbiologica e molecolare

L'esame colturale batteriologico e i sistemi di *On-Farm Culture*

L'identificazione dell'agente eziologico responsabile dell'infezione intramammaria costituisce il presupposto imprescindibile per l'impostazione di una corretta strategia

terapeutica e di controllo della mastite bovina. Storicamente, la diagnosi eziologica di laboratorio si è basata su una sequenza di test biochimici, quali la colorazione di Gram, il test della coagulasi in provetta e il test della catalasi, affiancati alla valutazione fenotipica delle colonie cresciute su terreni selettivi (Jahan et al., 2021). L'esame colturale batteriologico, condotto secondo le linee guida del *National Mastitis Council*, rimane tuttora considerato il *gold standard* per la diagnostica di laboratorio della mastite, poiché consente non solo l'identificazione del patogeno ma anche l'isolamento del ceppo necessario per l'esecuzione dell'antibiogramma (Soltan et al., 2017). Tale metodica presenta tuttavia limiti rilevanti: richiede personale esperto, necessita di tempi di refertazione compresi tra le 24 e le 48 ore e risulta gravata da una quota non trascurabile di campioni privi di crescita batterica, stimata attorno al 25% dei casi di mastite clinica. A ciò si aggiunge una componente di soggettività interpretativa, anche in presenza di procedure standardizzate, e la possibilità che la presenza di residui di antibiotico nel latte esaminato inibisca la crescita dei patogeni target (Ramada et al., 2024).

Per superare la principale criticità dell'esame colturale di laboratorio, ovvero il ritardo nella refertazione, sono stati sviluppati sistemi di coltura *on-farm* (OFC: *On-Farm Culture*), che consentono di effettuare l'esame batteriologico direttamente in azienda, con un costo contenuto e un tempo di risposta di circa 24 ore (Sterrett e Bewley, s.d.). Il sistema di diagnosi rapida delle mastiti bovine si basa sull'utilizzo di piastre a tre settori (*tri-plate*) contenenti tre terreni di coltura selettivi e differenziali: il terreno M.S.A. (*Mannitol Salt Agar*), il terreno Gassner e il terreno T.K.T. (*Tallium Kristalviolette Tossin*), specificamente combinati per l'isolamento e l'identificazione precoce dei principali patogeni mammari. (Figura 15) (www.izsler.it). Questa distinzione di massima riveste un'importanza clinica considerevole, poiché le infezioni Gram-positive tendono a rispondere favorevolmente al trattamento antibiotico intramammario, mentre le infezioni Gram-negative non richiedono generalmente terapia intramammaria, salvo l'insorgenza di forme tossiche sistemiche (Sterrett e Bewley, s.d.). L'adozione degli OFC ha dimostrato di poter ridurre l'impiego di antibiotici intramammarici fino al 50% nei casi di mastite clinica, senza compromettere in modo significativo gli esiti clinici e batteriologici a breve termine (Tommasoni et al. 2023).



Figura 15: A: esempio di piastra a tre settori per il protocollo di diagnosi *On-Farm*. B: *Streptococcus dysgalactiae* su terreno TKT C: *Staphylococcus aureus* su terreno MSA. *Escherichia coli* su terreno Gassner. (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna www.izsler.it).

Va tuttavia sottolineato che gli OFC, pur rappresentando un valido strumento di supporto decisionale a livello aziendale, non possono sostituire l'esame colturale di laboratorio, in particolare quando è richiesta l'identificazione di specie strettamente correlate tra loro. È stato evidenziato che sistemi come il *Minnesota Easy Culture System II BiPlate* e *Tri-Plate* presentano un'elevata specificità a fronte di una ridotta sensibilità; di conseguenza, pur essendo affidabili per una classificazione macroscopica dei patogeni, risultano poco performanti nella discriminazione di specie filogeneticamente vicine. Un'evoluzione di questo approccio è rappresentata dai terreni cromogenici, che sfruttano la liberazione di un colorante a seguito dell'idrolisi di un substrato specifico da parte del microorganismo, consentendo la differenziazione presuntiva delle colonie in base al colore. È stata riportata per l'identificazione di *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae* una sensibilità dell'89,1%, una specificità del 96,3% e un'accuratezza del 95,6%, mentre per il complesso *Streptococcus uberis/Enterococcus spp.* i valori corrispondenti sono risultati pari al 90,5%, 92,5% e 92,3%. Tuttavia, è stata osservata una marcata variabilità diagnostica in funzione del patogeno considerato, con sensibilità pari al 50% per *Escherichia coli* mentre pari al 94% per *Staphylococcus aureus* e al 97% per il complesso *Streptococcus agalactiae/dysgalactiae*, a conferma del fatto che l'accuratezza di tali terreni non è uniforme ma dipende strettamente dalla specie batterica in causa (Ramuada et al. 2024).

La Polymerase Chain Reaction (PCR)

L'esigenza di superare i limiti intrinseci della coltura convenzionale, in particolare l'elevata quota di campioni negativi alla crescita nonostante la presenza di segni clinici di mastite, ha

favorito lo sviluppo e la diffusione di metodiche genotipiche basate sulla reazione a catena della polimerasi (Ramuada et al., 2024). Taponen e collaboratori, avevano già evidenziato che circa il 30% dei campioni di mastite clinica non presenta crescita batterica nella coltura convenzionale; la capacità della PCR di rilevare il DNA batterico anche in presenza di crescita inibita consente pertanto di ridurre significativamente il tasso di risultati falsi negativi (Ramuada et al., 2024).

La PCR in tempo reale (*real-time PCR* o *qPCR*) rappresenta oggi lo strumento molecolare più diffuso nella diagnostica di routine della mastite, offrendo tempi di risposta di poche ore rispetto alle 24-48 ore richieste dalla coltura, oltre a una sensibilità generalmente superiore nell'identificazione dei principali patogeni mammari. Nello studio condotto da Hiitiö su 294 campioni di latte di quarto, il saggio *multiplex real-time PCR PathoProof Mastitis Complete-12* ha mostrato una percentuale di campioni positivi (83,0%) sostanzialmente sovrapponibile a quella ottenuta con la coltura batteriologica approfondita (85,7%). Per entrambe le metodiche, gli stafilococchi coagulasi-negativi e lo *Staphylococcus aureus* sono risultati i patogeni isolati con maggiore frequenza. La sensibilità e la specificità della PCR nei confronti della coltura per *Staphylococcus aureus* sono risultate rispettivamente pari al 97,0% e al 95,8%, mentre per il gruppo degli stafilococchi coagulasi-negativi tali valori si sono attestati su cifre più contenute, pari all'86,7% e al 75,4%. Questo dato indica come la performance diagnostica della PCR non sia uniforme per tutte le categorie di patogeni, risultando particolarmente elevata per *Staphylococcus aureus* ma meno soddisfacente per i patogeni minori, per i quali il valore soglia di ciclo di soglia (Ct) attualmente impiegato (37,0) potrebbe necessitare di un affinamento (Hiitiö et al., 2015).

Un ulteriore aspetto critico nell'impiego della PCR riguarda l'incapacità di questa tecnica di discriminare tra batteri vitali, batteri vitali ma non coltivabili e batteri morti, il che può condurre a un incremento dei risultati falsi positivi, specialmente quando sono rilevate quantità minime di DNA target (Ramuada et al., 2024). Coerentemente, nella ricerca di Hiitiö si raccomanda che, in caso di impiego della PCR come unico strumento diagnostico, la rilevanza clinica dei risultati ottenuti, soprattutto per i patogeni minori rilevati con basse quantità di DNA, venga attentamente valutata prima di procedere a decisioni terapeutiche, suggerendo altresì l'opportunità di introdurre nella diagnostica molecolare un concetto di "campione contaminato" analogo a quello già impiegato nella batteriologia convenzionale (Hiitiö et al., 2015).

La possibilità di estendere l'applicazione della PCR al monitoraggio di mandria tramite l'analisi del latte di massa (*bulk tank milk*, BTM) è stata indagata da Soltau, i quali hanno dimostrato come il saggio *multiplex qPCR Mastit 4A*, mirato all'identificazione di *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*, presenti una sensibilità di gregge nettamente superiore rispetto alla coltura batteriologica del medesimo campione di latte di massa (rispettivamente 78,8-87,5% contro 0,0-33,3%). Per ottenere un risultato positivo affidabile mediante un singolo campionamento di BTM, è necessaria una prevalenza intra-mandria minima, variabile in funzione del patogeno considerato (ad esempio pari al 27,6% a livello di bovina per *Staphylococcus aureus*, contro il 9,2% per *Streptococcus dysgalactiae*, con probabilità di rilevazione del 90%), concludendo che l'esame del BTM mediante PCR risulta più adatto come strumento di sorveglianza per l'individuazione di nuovi patogeni emergenti in mandria piuttosto che per confermare che una mandria sia libera da un determinato patogeno. (Soltau et al., 2017).

La spettrometria di massa MALDI-TOF

Parallelamente alla diffusione della PCR, la spettrometria di massa MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) si è affermata come strumento di identificazione microbica di precisione, inizialmente sviluppato per la diagnostica clinica umana e successivamente trasferito all'ambito veterinario. Tale metodica si basa sulla generazione di un'impronta proteica caratteristica del microrganismo mediante ionizzazione laser, il cui confronto con un database di spettri di riferimento consente l'identificazione del profilo peptidico a livello di genere e specie. Rispetto ai metodi biochimici fenotipici tradizionali, la MALDI-TOF offre il vantaggio di tempi di refertazione più rapidi, di un costo contenuto per campione una volta ammortizzato l'investimento strumentale iniziale, e di un'accuratezza generalmente superiore, con un tasso di errori di classificazione ridotto (Ramuada et al., 2024).

Lo studio di validazione condotto da Jahan, che ha confrontato l'identificazione mediante MALDI-TOF con il sequenziamento del gene 16S rDNA su 481 isolati batterici di origine mammaria, ha evidenziato un livello di concordanza complessivamente elevato: al livello di genere è stata rilevata una concordanza del 93% (445/481 isolati), mentre al livello di specie la concordanza si è attestata al 74% (355/481 isolati). Inoltre, è stato osservato una differenza di prestazione tra i patogeni Gram-positivi e Gram-negativi: per i primi la MALDI-

TOF ha identificato correttamente il 96% dei ceppi a livello di genere e l'87% a livello di specie, mentre per i secondi tali percentuali sono scese rispettivamente all'85% e al 46%. Tale scarto è stato attribuito principalmente alla minore rappresentatività, all'interno del database *Biotyper*, di ceppi di origine mammaria bovina per talune specie Gram-negative, come dimostrato dal caso di *Escherichia fergusonii*, rappresentata da un unico ceppo di riferimento a fronte dei quattordici ceppi disponibili per *Escherichia coli*, situazione che ha condotto alla sistematica misidentificazione dei relativi isolati come *E. coli*. Fenomeni analoghi di errata classificazione sono stati riscontrati per specie filogeneticamente affini, quali *Shigella flexneri*, identificata erroneamente come *Escherichia coli* nel 100% dei casi, coerentemente con quanto osservato in altri studi relativi all'elevata omologia genomica tra questi due generi (Jahan et al., 2021).

Un ulteriore elemento di interesse riguarda la capacità della MALDI-TOF di correggere errori di classificazione propri dei metodi biochimici tradizionali. È stato documentato come diversi isolati originariamente classificati come stafilococchi coagulasi-negativi mediante metodi convenzionali siano stati successivamente riconosciuti come *Staphylococcus aureus* dalla MALDI-TOF, un dato di particolare rilevanza clinica data la natura contagiosa e la scarsa risposta terapeutica caratteristiche di tale patogeno rispetto alle specie non-aureus (de Souza Ferreira et al., 2025). Analogamente, è stato evidenziato come, nell'ambito del gruppo dei non-aureus Staphylococchi (NAS), la MALDI-TOF sia stata in grado di identificare correttamente a livello di specie 13 specie diverse su un totale di 157 isolati, con solamente quattro specie (*Staphylococcus hominis*, *S. agnetis*, *S. devriesei* e *S. cohnii*) non riconosciute a livello di specie ma comunque correttamente attribuite al genere corretto, dato che conferma la capacità della metodica di discriminare con buona accuratezza all'interno di un gruppo tassonomicamente eterogeneo e di rilevanza clinica in costante crescita (Jahan et al. 2021).

Va tuttavia segnalato come una quota non trascurabile di isolati rimanga non identificabile mediante MALDI-TOF anche dopo ripetute analisi: Jahan e i suoi collaboratori hanno riportato un tasso di identificazione inaffidabile pari al 3,3% del totale degli isolati esaminati, mentre il gruppo di de Souza Ferreira hanno osservato un tasso di mancata identificazione dell'8% (25/308), riconducibile principalmente al gruppo dei NAS. Tali insuccessi vengono generalmente attribuiti a lacune nel database di riferimento, sia in termini di specie assenti sia di sottorappresentazione di ceppi di origine specificamente mammaria bovina rispetto a ceppi di origine umana, ambientale o alimentare. Entrambi gli studi concordano nel suggerire che l'implementazione di database dedicati, arricchiti con spettri di riferimento

provenienti specificamente da isolati di origine mastitica bovina, rappresenterebbe un significativo margine di miglioramento per l'affidabilità diagnostica futura della tecnica (Jahan et al., 2021; de Souza Ferreira et al., 2025).

Diagnosi eziologica mirata e terapia selettiva

L'insieme delle tecniche diagnostiche descritte, pur con le rispettive limitazioni, converge verso un obiettivo comune di crescente rilevanza nella pratica zootecnica contemporanea: la possibilità di impostare una terapia antimicrobica mirata, basata sull'effettiva identificazione dell'agente eziologico, in sostituzione dell'approccio empirico o del trattamento indiscriminato (Ramuada et al., 2024). La distinzione tra infezioni sostenute da patogeni Gram-positivi, generalmente responsivi alla terapia intramammaria, e infezioni da patogeni Gram-negativi, per le quali il trattamento antibiotico non è generalmente indicato salvo la comparsa di segni sistemici, rappresenta il livello minimo di discriminazione clinicamente utile ottenibile già mediante i sistemi di OFC (Sterrett e Bewley, s.d.). Tuttavia, l'identificazione di specie più precisa, resa possibile dalla PCR e dalla MALDI-TOF, assume un'importanza determinante in scenari clinici specifici, quali la diagnosi differenziale tra *Staphylococcus aureus* e le specie non-aureus, data la natura contagiosa e la scarsa prognosi di guarigione del primo, che può richiedere provvedimenti gestionali quali l'eliminazione (*culling*) dell'animale infetto o la messa in asciutta selettiva del quarto, piuttosto che il mero trattamento antibiotico (Jahan et al., 2021).

La caratterizzazione eziologica di precisione risulta altresì fondamentale nell'ottica di un uso prudente del farmaco antimicrobico, obiettivo imposto dalla crescente pressione regolatoria e dalla necessità di contrastare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza (AMR), che rappresenta una priorità di sanità pubblica in ragione della natura talora zoonotica di alcuni patogeni mastitogeni e dell'impiego della mastite bovina come una delle principali indicazioni per la somministrazione di antimicrobici in zootecnia da latte. L'adozione di protocolli di terapia selettiva in asciutta, che riserva il trattamento antibiotico alle sole bovine o ai soli quarti con infezione intramammaria accertata, in sostituzione della terapia antibiotica indiscriminata (*Blanket Dry Cow Therapy*), dipende in modo sostanziale dalla disponibilità di strumenti diagnostici rapidi e affidabili in grado di orientare tale scelta. In questo contesto, sia gli OFC sia le metodiche molecolari concorrono a fornire l'informazione eziologica necessaria a evitare trattamenti antibiotici non giustificati, come dimostrato dalla

riduzione dell'impiego di antimicrobici intramammary osservata in seguito all'adozione degli OFC (Tommasoni et al., 2023).

Occorre tuttavia rimarcare che nessuna delle tecniche descritte è esente da limiti che condizionano l'affidabilità della diagnosi eziologica ai fini decisionali terapeutici. La PCR, pur offrendo un'elevata sensibilità analitica, non è in grado di discriminare tra DNA proveniente da batteri vitali e da batteri non vitali, aspetto che può condurre a un trattamento antimicrobico non necessario qualora il risultato positivo non venga interpretato criticamente alla luce del quadro clinico complessivo. La MALDI-TOF, dal canto suo, pur costituendo uno strumento affidabile per la caratterizzazione di genere e specie, non fornisce alcuna informazione sul profilo di sensibilità antimicrobica dell'isolato, rendendo comunque necessaria l'esecuzione di un antibiogramma complementare qualora si renda opportuna una valutazione della resistenza fenotipica (Ramuada et al., 2024).

6.3 Diagnostica rapida, sensoristica e automazione

L'evoluzione tecnologica degli ultimi decenni ha progressivamente spostato l'attenzione della ricerca dalla diagnostica di laboratorio verso sistemi di monitoraggio continuo, automatizzato e integrato nella routine di mungitura, capaci di fornire informazioni sullo stato di salute della mammella senza l'intervento diretto dell'operatore. Tale cambio di paradigma si inserisce nel più ampio contesto del *Precision Livestock Farming* (PLF), disciplina che mira ad automatizzare i processi di allevamento per ridurre i costi di manodopera e gestire mandrie di dimensioni crescenti con un numero contenuto di addetti (Rutten et al., 2013).

La conducibilità elettrica del latte

Tra i parametri impiegati per il monitoraggio in linea dello stato sanitario della mammella, la conducibilità elettrica (EC) del latte rappresenta uno degli indicatori storicamente più studiati e applicati. La conducibilità elettrica esprime la capacità di una soluzione di condurre corrente ed è determinata, nel latte, dalla concentrazione di anioni e cationi, in particolare sodio, potassio e cloro. Nel corso di un'infezione intramammary, l'integrità delle giunzioni serrate e del sistema di trasporto attivo di sodio, cloro e potassio, caratteristico dell'epitelio ghiandolare, viene compromessa, determinando il passaggio di tali ioni dal sangue al latte con conseguente incremento della conducibilità elettrica (Tommasoni et al., 2023). In termini analoghi, l'aumento della permeabilità della barriera emato-mammaria durante la mastite

consente la fuoriuscita di ioni sodio e cloro dal sangue verso il latte, incrementandone la concentrazione ionica complessiva (Yu et al., 2025).

Il test della conducibilità elettrica viene generalmente descritto come rapido e non invasivo ed è oggi ampiamente utilizzato come indicatore in linea nei sistemi di mungitura automatizzata (Ramuada et al., 2024). È stato suggerito che una conducibilità individuale superiore a 6,5 mS/cm, associata a una differenza tra il quarto con conducibilità più elevata e quello con conducibilità più bassa superiore a 1,0 mS/cm, possa costituire un criterio diagnostico (Tommasoni et al., 2023). Un ulteriore approccio, basato sull'analisi storica dei valori di conducibilità nell'arco di 14 giorni, è stato proposto come opzione economicamente vantaggiosa per il rilevamento della mastite, con generazione di segnalazione positiva quando la conducibilità elettrica supera di oltre il 10% la media registrata nei 14 giorni precedenti (Ramuada et al., 2024).

Nonostante la sua ampia diffusione, l'affidabilità diagnostica della conducibilità elettrica rimane oggetto di controversia in letteratura (Tommasoni et al., 2023). È stato osservato che le variazioni di EC non presentano una correlazione significativa con la conta cellulare somatica (SCC) e che il parametro risulta sensibile a numerosi fattori confondenti, tra cui razza, stagione e stadio di lattazione, con conseguente limitazione della specificità diagnostica (Yu et al., 2025). Anche il tenore di grasso del latte e diverse condizioni patologiche concomitanti come febbre da latte, chetosi, dislocazione dell'abomaso e ritenzione placentare, sono stati associati a incrementi significativi della conducibilità elettrica, complicando l'interpretazione del segnale in un contesto multifattoriale. È stato inoltre rilevato come diversi patogeni vengano individuati con efficacia disomogenea: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* risultano più agevolmente rilevabili rispetto ai batteri coagulasi-negativi, verosimilmente a causa del minor danno epiteliale e della minore risposta infiammatoria da questi ultimi indotta (Tommasoni et al., 2023). Un ulteriore limite intrinseco del metodo risiede nel numero circoscritto di patogeni identificabili, oltre alla sensibilità del dato a fattori quali la natura clinica o subclinica del caso e le fisiologiche variazioni della composizione del latte. Approcci più recenti, basati sull'analisi degli spettri dielettrici del latte crudo, hanno mostrato un potenziale nell'identificazione di casi negativi, debolmente positivi e positivi di mastite bovina in modo rapido e *in situ*, sebbene l'accuratezza di tali metodiche risulti condizionata dalla temperatura del campione e dal livello di SCC, risultando efficace solo quando la conta cellulare somatica supera le 500.000 cellule/mL (Ramuada et al., 2024).

Precision Livestock Farming

Il *Precision Livestock Farming* (PLF) ha aperto nuove prospettive per il monitoraggio continuo e non invasivo dello stato sanitario della mammella bovina, superando i limiti dei metodi diagnostici tradizionali (Rutten et al., 2013). La crescente domanda di prodotti di origine animale ha favorito la diffusione di tecnologie PLF capaci di fornire agli allevatori informazioni oggettive su benessere, salute, produzione e riproduzione della mandria. Rispetto ai dispositivi indossabili, soggetti a perdita, danneggiamento e stress per l'animale, la visione artificiale rappresenta un'alternativa economicamente vantaggiosa che sostituisce l'allevatore in numerose attività ripetitive senza alcun contatto diretto con il capo (Antognoli et al., 2025).

Dai sensori al supporto decisionale

Lo studio di Rutten ha proposto un quadro a quattro livelli crescenti di complessità: livello I (tecnica), in cui il sensore misura un parametro relativo alla vacca (es. conducibilità elettrica del latte); livello II (interpretazione dei dati), in cui un algoritmo produce un'informazione sullo stato sanitario (es. probabilità di mastite); livello III (integrazione dell'informazione), in cui il dato sensoriale viene combinato con informazioni non sensoriali per generare un consiglio operativo; livello IV (decisione), in cui la scelta è compiuta dall'allevatore o, nei sistemi più avanzati, in autonomia dal sistema. Questo schema, ripreso da Sani su un corpus di letteratura più recente, resta lo strumento più idoneo per valutare quanto la ricerca si sia avvicinata a un impiego pratico dei sistemi sensoristici (Figura 16).

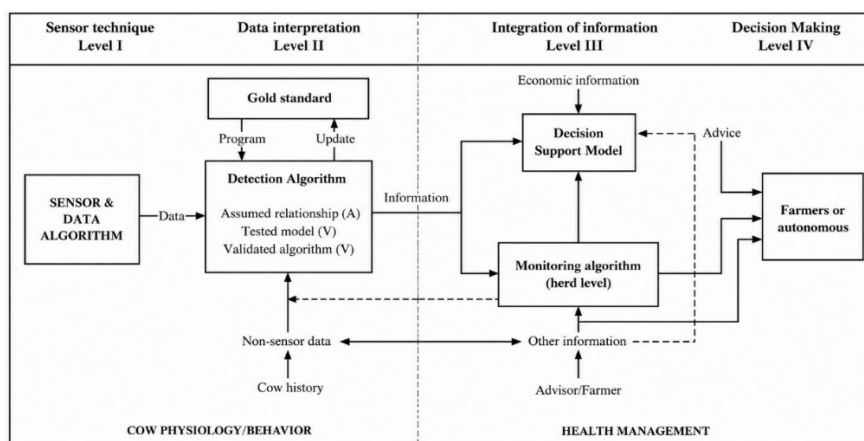


Figura 16: Schema di Rutten et al (2013) sui livelli di informazioni dei sensori nella gestione delle aziende lattiero-casearie (Sani et al., 2026)

Termografia a infrarossi e visione artificiale

La termografia a infrarossi (IRT: *Infrared Thermography*) costituisce una tecnologia non invasiva che consente la misurazione accurata della temperatura a distanza, ampiamente impiegata nelle scienze animali anche per la diagnosi precoce della mastite. Nonostante la comprovata capacità di rilevare la patologia, l'analisi manuale delle immagini termografiche risulta laboriosa e richiede la presenza di un operatore esperto; per superare questo limite sono stati sviluppati software in grado di localizzare automaticamente il pixel a temperatura più elevata nei termogrammi della mammella, distinguendo tra animali con SCC normale ed elevato. La valutazione automatica dei termogrammi in bovine sottoposte a infezione sperimentale intramammaria da *Escherichia coli* ha fornito risultati promettenti per la rilevazione della mastite clinica, validi anche nel confronto con il *gold standard* rappresentato dalla valutazione manuale; resta tuttavia inteso che la termografia a infrarossi debba essere impiegata come strumento di sorveglianza sanitaria automatica complementare, e non sostitutivo, dell'esame clinico del singolo animale (Silva et al., 2021).

Più recentemente l'IRT è stata integrata con algoritmi di *deep learning* per individuare *keypoint* sulla mammella nelle immagini termiche, mettendo in relazione temperatura e dimensioni. Il modello YOLOv5, basato sul confronto tra temperatura oculare e mammaria (soglia di 0,8°C) e tra quarti destro e sinistro (soglia di 0,72°C), raggiunge un'accuratezza dell'85,71%. Poiché la temperatura cutanea è influenzabile da fattori ambientali e igienici, è stata proposta la combinazione di YOLOv7 e CenterNet, che integra dimensioni e temperatura raggiungendo l'88,71% di accuratezza nella rilevazione e predizione del grado di mastite. Morfologia e dimensioni della mammella (attacco, altezza, larghezza) risultano correlate al rischio di mastite anche nelle fasi iniziali. È stata inoltre proposta una telecamera IR per immagini termiche 3D pre- e post-mungitura, utile a stimare il volume mammario e quindi la produzione di latte con un approccio a basso costo, sebbene meno accurato dei metodi tradizionali. Le pubblicazioni sulla visione artificiale in zootecnia da latte sono cresciute marcatamente nell'ultimo decennio (Antognoli et al., 2025).

Allevamento di precisione

I sistemi di mungitura automatizzata (AMS: *automated milking systems*) rappresentano il contesto privilegiato per l'integrazione della sensoristica mammaria, poiché l'assenza

dell'operatore richiede metodi alternativi al giudizio visivo sul primo getto di latte; già nel 2009 erano installate oltre 8.000 unità nel mondo, concentrate soprattutto in Europa occidentale (Rutten et al., 2013). La letteratura più recente conferma che la ricerca resta concentrata sugli algoritmi di interpretazione (livello II), mentre l'integrazione con dati economico-gestionali (livello III) e il supporto/automazione decisionale (livello IV) restano quasi inesplorati. I sensori da soli non generano valore gestionale significativo senza interventi mirati e una valutazione economica del loro impatto. Il progresso diagnostico dovrebbe derivare non tanto da sensori o algoritmi più sofisticati, quanto da un adattamento delle strategie di gestione sanitaria al potenziale già offerto dai sistemi esistenti. L'assenza di studi che quantifichino il beneficio economico (ad esempio la riduzione dei trattamenti antibiotici o dei relativi costi) ostacola l'adozione su larga scala, poiché gli allevatori basano le decisioni di investimento sul ritorno atteso; sono quindi necessari modelli di simulazione economica e una maggiore collaborazione tra ricercatori, fornitori di *software* e veterinari (Sani et al., 2026).

L'evoluzione dai sensori elettrochimici di prima generazione ai moderni sistemi di visione artificiale basati su reti neurali profonde testimonia una traiettoria di crescente sofisticazione tecnologica, sempre più integrabile con gli AMS e con gli altri strumenti di *precision livestock farming* (Antognoli et al., 2025; Sani et al., 2026).

7 Antibiotico-resistenza nella gestione della mastite

La mastite bovina rappresenta una delle problematiche più rilevanti dell'allevamento da latte non solo per il suo impatto economico diretto, ma anche per la sua centralità nell'ambito del paradigma One Health, poiché l'impiego di antimicrobici negli allevamenti da latte contribuisce all'emergenza e alla diffusione dell'antibiotico-resistenza (AMR: *antimicrobial resistance*) all'interfaccia animale-alimento-uomo (Ban-Cucerzan et al., 2026). È stato stimato che la mastite sia responsabile di circa il 60-70% del totale degli antimicrobici somministrati negli allevamenti da latte (Tommasoni et al., 2023).

Gli antimicrobici per via intramammaria costituiscono l'intervento terapeutico primario nei confronti della mastite bovina. Le principali classi impiegate comprendono i beta-lattamici (penicilline e cefalosporine), gli aminoglicosidi, le tetracicline, i sulfonamidi, i lincosamidi e i fluorochinoloni, con schemi posologici che prevedono sia la via intramammaria sia quella sistemica, intramuscolare o endovenosa, in funzione del patogeno, del profilo di resistenza locale e della normativa vigente. Nonostante l'impiego diffuso e prolungato nel tempo di questi principi attivi e la comprovata attività dimostrata in vitro, gli esiti clinici restano tuttavia variabili e spesso subottimali, in particolare nelle infezioni sostenute da *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e streptococchi ambientali (Ban-Cucerzan et al., 2026). Il successo della terapia antibiotica dipende, in condizioni fisiologiche, dalla capacità del principio attivo di raggiungere e mantenere concentrazioni superiori alla concentrazione minima inibente (MIC) nel focolaio infettivo per un tempo sufficiente a bloccare la proliferazione e la fase di produzione di tossine del patogeno responsabile; Tale obiettivo può essere ostacolato da diversi fattori, tra cui le alterazioni patologiche del parenchima mammario, nonché fattori legati ai batteri mastitogeni e alle loro caratteristiche (Tommasoni et al., 2023).

Per lungo tempo, la *blanket dry cow therapy* (BDCT) ha rappresentato l'approccio più diffuso nel controllo della mastite in fase di asciutta, prevedendo l'infusione, in tutti i quarti di tutte le bovine, di un antimicrobico intramammario a lunga durata d'azione al termine della lattazione. La terapia antibiotica praticata al momento dell'asciutta possiede un duplice scopo: da un lato un effetto curativo, volto a eliminare le infezioni intramammarie (IMI) già presenti nei quarti; dall'altro un effetto preventivo, mirato a impedire l'insorgenza di nuove infezioni nella fase iniziale del periodo di asciutta. Con il progressivo aumentare della preoccupazione per l'emergenza di patogeni antibiotico-resistenti, si è affermato un protocollo alternativo, la *selective dry cow therapy* (SDCT), che prevede il trattamento

esclusivo dei quarti con infezione intramammaria accertata al momento dell'asciutta. Dall'introduzione della SDCT sono stati proposti diversi criteri di selezione delle bovine o dei quarti infetti: l'esame colturale batteriologico di laboratorio, la conta delle cellule somatiche (SCC), l'impiego di strumenti diagnostici aziendali e/o l'anamnesi di pregressi episodi di mastite clinica. Diversi studi hanno dimostrato che il ricorso alla SDCT non incrementa il rischio di infezione intramammaria al parto, a condizione che vengano utilizzati sigillanti interni del capezzolo in tutte le bovine; la SDCT rappresenta pertanto un approccio efficace per ridurre il consumo di antimicrobici senza compromettere il benessere animale né l'economia aziendale. È stato osservato che punteggi positivi al *California Mastitis Test* (CMT), rilevati alcune settimane prima dell'asciutta, sono in grado di predire correttamente la presenza di IMI in oltre l'80% dei casi; analogamente, l'impiego della coltura aziendale (*on-farm culture*) per guidare le decisioni terapeutiche nella mastite clinica ha consentito, in alcuni studi, una riduzione del consumo di antimicrobici intramammari fino alla metà, con una tendenza alla riduzione anche dei tempi di sospensione del latte (Tommasoni et al., 2023).

Secondo il Regolamento (UE) 2019/6, che disciplina l'impiego dei medicinali veterinari, la somministrazione di antibiotici rappresenta attualmente l'unico trattamento riconosciuto come efficace per la mastite; tuttavia, l'uso convenzionale di antibiotici può favorire l'emergenza di ceppi resistenti, poiché un impiego eccessivo e spesso inappropriato ha contribuito alla diffusione di microrganismi multiresistenti (AMR). Per mitigare tali rischi sono state implementate diverse misure regolatorie e di monitoraggio: tra queste, il medesimo Regolamento (UE) 2019/6 ha introdotto il divieto di impiego degli antibiotici come promotori della crescita o a scopo preventivo, stabilendo condizioni prescrittive più rigorose. A tale regolamento si affianca il Regolamento (CE) n. 470/2009, che stabilisce i limiti massimi di residuo (MRL) per le sostanze farmacologicamente attive negli alimenti di origine animale. In Italia, il sistema *ClassyFarm*, introdotto nel 2017, consente il monitoraggio dell'uso di antimicrobici a livello di singolo allevamento, tenendo conto della classificazione antimicrobica elaborata dall'*Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group* (AMEG) (Guaita et al., 2026).

I lincosamidi, grazie a uno spettro d'azione relativamente ristretto, consentono un controllo mirato del patogeno con minima alterazione del microbiota mammario benefico, e vengono generalmente riservati ai casi in cui le terapie di prima linea (penicilline, cefalosporine o tetracicline) risultino inefficaci, o quando i test di sensibilità ne confermino la necessità. Nonostante la resistenza a questa classe rimanga comparativamente bassa, è stata

osservata un'associazione positiva tra i pattern di utilizzo della pirlimicina e l'aumento della prevalenza di resistenza tra i patogeni mastite-associati, a conferma della necessità di un impiego giudizioso all'interno di programmi di *antimicrobial stewardship*. Analogamente, sulfonamidi e fluorochinoloni occupano un ruolo selettivo, essendo generalmente riservati alle infezioni sostenute da Gram-negativi o ai casi in cui l'esame colturale e i test di sensibilità ne indichino l'efficacia come alternative terapeutiche, coerentemente con le raccomandazioni di gestione responsabile (*stewardship*) (Ban-Cucerzan et al., 2026).

La terapia antimicrobica dovrebbe sempre essere guidata dalla diagnosi eziologica e dall'identificazione dei fattori di rischio specifici dell'allevamento, al fine di ridurre il rischio di infezione e limitare l'insorgenza e la diffusione dell'antibiotico-resistenza (Guaita et al., 2026).

Antibiogramma e concentrazione minima inibente (MIC)

L'esame colturale batteriologico del latte rappresenta tuttora il metodo di riferimento (*gold standard*) per la diagnosi eziologica della mastite bovina. L'isolamento del microrganismo responsabile costituisce il presupposto indispensabile per la sua identificazione e per la successiva determinazione della concentrazione minima inibente (MIC: *minimum inhibitory concentration*), definita come la più bassa concentrazione di un agente antimicrobico in grado di inibire la crescita del microrganismo in esame. Tale determinazione può essere condotta contemporaneamente per un singolo ceppo batterico nei confronti di più antimicrobici appartenenti a classi diverse, quali beta-lattamici, cefalosporine, fluorochinoloni, macrolidi, aminoglicosidi, inibitori della diidrofolato reduttasi (trimetoprim-sulfonamidi), lincosamidi e rifamicine (Guaita et al., 2026).

La valutazione della sensibilità antimicrobica può essere condotta secondo due approcci: il metodo diffusimetrico (*disc diffusion*) e i metodi basati sulla stima della MIC, quali la diluizione in brodo (*broth dilution*) o la diluizione in agar (*agar dilution*) (Miotti et al., 2023). In uno studio decennale di monitoraggio condotto in Lombardia ed Emilia-Romagna, il metodo diffusimetrico di Kirby-Bauer è stato impiegato fino al 2021, per poi essere sostituito, a partire da gennaio 2022, dal metodo della MIC (Guaita et al., 2026). Anche in ambito diagnostico aziendale, i sistemi colturali di primo impiego, basati su piastre di agar sangue e agar MacConkey, consentivano la categorizzazione dei microrganismi in Gram-positivi, Gram-negativi o assenza di crescita entro 24-32 ore (Tommasoni et al., 2023).

L'interpretazione dei valori di MIC richiede il confronto con valori soglia clinici (*breakpoint*), confrontati con quelli riportati nelle linee guida CLSI o dall'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (Guaita et al., 2026). Nella pratica scientifica e diagnostica veterinaria, il *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) risulta il documento di riferimento più frequentemente adottato: in una recente metanalisi sulla resistenza antimicrobica di *Streptococcus uberis*, oltre tre quarti degli studi inclusi (76,6%) ha fatto riferimento a valori soglia clinici CLSI, mentre solo un numero esiguo di lavori ha impiegato i criteri EUCAST o quelli della *Société Française de Microbiologie*, singolarmente o in combinazione. È opportuno sottolineare come i *breakpoint* clinici nascano come strumento operativo destinato al laboratorio clinico per orientare la terapia del singolo paziente; ciò nonostante, il loro impiego per la valutazione scientifica dell'antibiotico-resistenza risulta ampiamente diffuso. Poiché non per tutti i patogeni veterinari sono disponibili *breakpoint* specifici, in alcuni casi vengono adottati, in via sostitutiva, i valori soglia validati in medicina umana; sebbene tale prassi presenti dei limiti intrinseci, l'applicazione di criteri uniformi a tutti gli studi considerati consente comunque un confronto coerente tra le diverse casistiche (Miotti et al., 2023).

Gli studi di modellizzazione farmacocinetica/farmacodinamica (PK/PD) dimostrano che numerose formulazioni antimicrobiche intramammarie non riescono a mantenere concentrazioni superiori alla MIC per la durata necessaria, sia essa espressa come tempo sopra la MIC ($T > MIC$), parametro rilevante per i beta-lattamici, sia come rapporto tra area sotto la curva concentrazione-tempo e MIC (AUC/MIC), parametro rilevante per gli antimicrobici concentrazione-dipendenti; tale esposizione subterapeutica rappresenta una delle principali cause di fallimento terapeutico. A titolo esemplificativo, per la rifaximina il raggiungimento di elevati tassi di guarigione richiede il mantenimento di un rapporto AUC/MIC superiore a 14.281,63 ore nei confronti di *Staphylococcus aureus* e a 57,80 ore nei confronti di *Escherichia coli*, con esiti fortemente influenzati dall'intervallo di dosaggio e dalle concentrazioni impiegate; analogamente, l'efficacia del cefquinome dipende dalla carica batterica e dallo schema posologico adottato, con target PK/PD variabili in funzione del patogeno e della dimensione dell'inoculo, il cui mancato raggiungimento può ridurre l'attività battericida e favorire la selezione di ceppi resistenti. Le implicazioni cliniche del fallimento PK/PD comprendono non solo l'insuccesso terapeutico, ma anche un aumento delle perdite economiche, rendendo necessaria un'ottimizzazione posologica basata su modelli PK/PD per migliorare i tassi di guarigione e limitare l'insorgenza di resistenza (Ban-Cucerzan et al., 2026). Una diagnosi accurata dell'agente eziologico responsabile del

singolo caso di mastite consentirebbe di rendere più efficienti le scelte terapeutiche e garantire tassi di guarigione più elevati (Miotti et al., 2023).

Un fattore determinante nel divario tra sensibilità in vitro ed esito clinico è rappresentato dalla formazione di biofilm, strutture che alterano profondamente i target PK/PD imponendo un'esposizione antimicrobica efficace ben superiore a quella ottenibile con le formulazioni intramammarie standard: le cellule batteriche inglobate nel biofilm possono infatti tollerare concentrazioni antibiotiche fino a 1000 volte superiori alla MIC, determinando la persistenza dell'infezione nonostante il riscontro di MIC favorevoli all'esame colturale. Tale fenomeno spiega perché alcuni quarti mammari non rispondano alla terapia antimicrobica anche quando i test di laboratorio indicano sensibilità del patogeno isolato. Un ulteriore limite è rappresentato dalla persistenza intracellulare di alcuni patogeni, in primis *Staphylococcus aureus*: molti antibiotici impiegati nella terapia della mastite, inclusi beta-lattamici e aminoglicosidi, penetrano scarsamente all'interno delle cellule ospiti, determinando concentrazioni intracellulari subterapeutiche e un'attività battericida limitata nei confronti dei batteri internalizzati; ciò contribuisce a spiegare i tassi di guarigione particolarmente bassi, talora compresi tra il 10% e il 30%, riportati per la mastite da *S. aureus* nonostante una selezione antimicrobica apparentemente appropriata (Ban-Cucerzan et al., 2026).

Nel complesso, tali evidenze indicano che il test di sensibilità in vitro condotto su batteri in forma planctonica costituisce un predittore incompleto, e talvolta fuorviante, dell'esito clinico, poiché l'esito terapeutico non è determinato unicamente dall'identità del patogeno o dalla sua sensibilità in vitro, bensì dall'effetto cumulativo di molteplici vincoli biologici che condizionano l'effettiva esposizione e l'efficacia dell'antimicrobico nel sito di infezione (Ban-Cucerzan et al., 2026). A ciò si aggiungono le alterazioni patologiche del parenchima mammario e i fattori legati al patogeno stesso, che possono ostacolare il raggiungimento e il mantenimento di concentrazioni efficaci nel focolaio infettivo (Tommasoni et al., 2023). Anche l'uso improprio degli antimicrobici, favorendo la sopravvivenza selettiva dei ceppi dotati di meccanismi di resistenza, può progressivamente rendere inefficaci trattamenti inizialmente supportati da un profilo di sensibilità favorevole (Miotti et al., 2023).

7.1 Principali fenotipi di resistenza nei patogeni della mastite

I patogeni responsabili di mastite bovina esprimono un ampio spettro di fenotipi di resistenza, la cui distribuzione varia sensibilmente in funzione della specie batterica, dell'area geografica e delle pratiche di gestione degli allevamenti (Kazemzadeh et al., 2025).

MRSA

La meticillino-resistenza in *S. aureus* (MRSA: *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) rappresenta uno dei fenotipi di maggiore rilevanza sanitaria, poiché associata a resistenza crociata verso un ampio ventaglio di classi antimicrobiche, tra cui aminoglicosidi, macrolidi, cloramfenicolo, tetracicline e fluorochinoloni. Il fenotipo MRSA è sostenuto principalmente dal gene *mecA*, che codifica la proteina legante la penicillina a bassa affinità PBP2a; un omologo, *mecC*, conferisce resistenza alle penicilline resistenti alle penicillinasi ed è prevalentemente associato a ceppi di origine zootecnica. La prevalenza di MRSA nei sistemi produttivi lattiero-caseari risulta estremamente eterogenea, con stime aggregate intorno al 4,12% (Kazemzadeh et al., 2025). Gli isolati MRSA associano frequentemente determinanti di virulenza e geni legati alla formazione di biofilm (*clfA*, *icaA/D*, *pvl*, *tsst-1*, *hly*, *lukMF*), fattori che ne amplificano la persistenza intramammaria e il potenziale zoonotico. Dati longitudinali tedeschi documentano inoltre un incremento della prevalenza MRSA dal 2% al 5% nell'arco di un decennio, a fronte di una riduzione della resistenza all'eritromicina (dal 53% all'8%), verosimilmente riconducibile a programmi di *stewardship* antimicrobica (Touaitia et al., 2025).

β -lattamasi

La produzione di β -lattamasi costituisce il meccanismo di resistenza più diffuso e clinicamente rilevante nei patogeni della mastite, poiché idrolizza l'anello β -lattamico inattivando penicilline e cefalosporine anche in presenza di picchi transitori di concentrazione superiori alla MIC. Negli stafilococchi, il gene *blaZ*, presente in molteplici varianti tra cui A–D, codifica la β -lattamasi PC1 (Kazemzadeh et al., 2025). I tassi di prevalenza sono sorprendentemente elevati, con una percentuale di portatori del gene *blaZ* che raggiunge il 91% negli stafilococchi coagulasi-negativi. In *S. aureus*, i tassi di resistenza fenotipica a penicilline e cefalosporine oscillano rispettivamente tra il 75–100% e il 50–57% (Ban-Cucerzan et al., 2026). È interessante notare come, in *Streptococcus uberis* e

Streptococcus dysgalactiae, la presenza del gene *blaZ* non si traduca necessariamente in resistenza fenotipica: studi condotti in Polonia e in Cina hanno documentato una scarsa correlazione tra genotipo e fenotipo, con la maggioranza degli isolati portatori del gene che rimane sensibile alla penicillina (Kazemzadeh et al., 2025). Coerentemente, la meta-analisi di Miotti ha stimato per *S. uberis* una proporzione aggregata di resistenza alla penicillina relativamente contenuta (5,9%; IC95% 2,9–11,5%), sebbene gravata da elevata eterogeneità tra studi e solo parzialmente spiegata dal continente di origine.

Nei patogeni Gram-negativi, in particolare *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., la produzione di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL: *extended-spectrum β -lactamase*) rappresenta il principale meccanismo di resistenza ai β -lattami, incluse le cefalosporine di terza e quarta generazione (Ban-Cucerzan et al., 2026). Le famiglie enzimatiche CTX-M, TEM e SHV sono le più frequentemente riscontrate, con il gene *blaTEM* responsabile di circa il 90% della resistenza all'ampicillina in *E. coli*, spesso in associazione con reservoir batteriofagici (Kazemzadeh et al., 2025). *coli* raggiungono il 95–100% verso le penicilline e il 70–97% verso le cefalosporine, mentre per *Klebsiella pneumoniae* la resistenza alle cefalosporine oscilla tra il 62% e il 75%, con resistenza penicillinica pressoché totale. L'uso di cefalosporine di terza generazione, come il ceftiofur, è stato specificamente associato a un incremento della prevalenza di ceppi ESBL-produttori negli allevamenti da latte, con implicazioni rilevanti in ottica One Health (Ban-Cucerzan et al., 2026).

Ridotta suscettibilità dei patogeni ambientali

La meta-analisi di Miotti, condotta specificamente su *Streptococcus uberis* quale patogeno ambientale di riferimento, ha evidenziato come la proporzione di resistenza sia estremamente variabile e verosimilmente influenzata da numerosi fattori non completamente esplorati nello studio stesso, rendendo problematica l'individuazione di una stima media univoca applicabile a questo patogeno (Miotti et al., 2023). Anche nei coliformi ambientali, sorveglianze quantitative mediante qPCR condotte su allevamenti europei al pascolo hanno rilevato la presenza di livelli bassi ma costantemente rilevabili di geni di resistenza (*aadA*, *sul1*, *tetM*) anche in assenza di recente esposizione antibiotica, configurando un "carico di fondo silente" di resistenza nel microbioma del latte crudo (Kazemzadeh et al., 2025). Per *Pseudomonas* spp., isolati da mastite mostrano generalmente sensibilità a gentamicina, ciprofloxacina, tetraciclina e levofloxacina, ma resistenza significativa a imipenem, trimetoprim-sulfametoxazolo, aztreonam,

cloramfenicolo e meropenem, con segnalazioni di multiresistenza (Kazemzadeh et al., 2025). Per quanto riguarda gli streptococchi ambientali, la dinamica di acquisizione della resistenza risulta più lenta rispetto a quella osservata nelle Enterobacteriaceae, verosimilmente a causa di una trasmissione orizzontale dei geni di resistenza più limitata, sebbene elementi coniugativi e trasposoni possano comunque disseminare determinanti di resistenza tra streptococchi. Ciò trova riscontro nella meta-analisi di Miotti, che ha documentato per *S. uberis* proporzioni di resistenza fortemente eterogenee e dipendenti dalla classe antimicrobica considerata: elevate per gentamicina (56,4%; ridotta a 51,4% dopo esclusione degli outlier) e tetraciclina (30,9–31,7%), intermedie per eritromicina (14,8–15,6%) e trimetoprim-sulfametossazolo (12,9–15,3%), contenute per ampicillina (6,5–8,4%), amoxicillina-acido clavulanico (1,7–3,4%) e cefalotina (1,5–2,1%). Tale variabilità, sottolinea come la ridotta suscettibilità dei patogeni ambientali sia il risultato di molteplici fattori locali, tra cui pratiche di gestione, sistemi di produzione zootecnica e storia naturale delle infezioni nell'allevamento, più che di un fenomeno omogeneo e prevedibile (Miotti et al., 2023).

7.2 One Health e antimicrobial stewardship

L'antibiotico-resistenza associata alla mastite bovina non costituisce una problematica confinata all'ambito veterinario, bensì rappresenta un nodo critico all'interno del paradigma *One Health*, che riconosce l'interconnessione tra salute umana, salute animale e salute ambientale, sottolineando come le criticità insorte in uno di questi ambiti si ripercuotano inevitabilmente sugli altri. L'uso di antibiotici veterinari, e in particolare il trattamento della mastite nei bovini da latte, rappresenta un esempio paradigmatico di tale interconnessione ed è stato riconosciuto come priorità globale dalla *World Organisation for Animal Health* (WOAH/OIE) e dalla *World Health Organization* (WHO), entrambe le quali hanno incluso l'uso antibiotico veterinario tra gli obiettivi centrali delle strategie di *antimicrobial stewardship*, raccomandando linee guida per un impiego responsabile, controlli sulla prescrizione e programmi di sorveglianza rafforzata (Khan et al., 2026).

Un aspetto direttamente rilevante per la sicurezza alimentare riguarda la contaminazione del latte da residui antibiotici. Il trattamento delle bovine mastitiche comporta l'obbligo di rispettare periodi di sospensione (*withdrawal period*), il cui mancato rispetto determina conseguenze economiche significative, mentre la contaminazione del latte da residui di beta-lattamici, tetracicline e aminoglicosidi rappresenta una delle principali preoccupazioni per la sicurezza alimentare, particolarmente nei paesi a basso e medio reddito dove le

infrastrutture di monitoraggio risultano spesso insufficienti (Khan et al., 2026). Analogamente, il rispetto dei corretti periodi di sospensione post-trattamento, finalizzato a prevenire la presenza di residui antimicrobici nel latte, rappresenta una sfida gestionale non trascurabile per gli allevamenti (Kazemzadeh et al., 2025). In tale contesto, le strategie non antibiotiche, tra cui gli interventi probiotici, offrono il duplice vantaggio di evitare le problematiche connesse ai residui farmacologici e di eliminare la necessità dei periodi di sospensione, incrementando sostanzialmente l'appetibilità pratica ed economica di tali approcci per i produttori (Khan et al., 2026).

L'ambiente di allevamento costituisce un rilevante *reservoir* (serbatoio) di batteri e geni di resistenza antimicrobica. Il trattamento antibiotico delle bovine mastitiche determina l'escrezione di antibiotici e batteri resistenti attraverso latte, feci e urine, con conseguente contaminazione del suolo, delle fonti idriche e delle strutture di stabulazione; tali *reservoir* ambientali perpetuano la circolazione dei geni di resistenza e favoriscono il trasferimento genico orizzontale tra popolazioni batteriche diverse, e diversi studi hanno dimostrato come i batteri resistenti possano persistere negli ambienti di allevamento per periodi prolungati, mantenendo pressione selettiva anche dopo la cessazione dell'uso antibiotico. Tale diffusione si estende oltre i confini aziendali: lo spandimento del letame sui terreni agricoli, pratica comune per il riciclo dei nutrienti, distribuisce batteri e geni di resistenza su scala territoriale più ampia, il dilavamento dei terreni concimati può contaminare acque superficiali e sotterranee con potenziali ripercussioni sulle fonti idriche potabili e sugli ecosistemi acquatici, ed è stata inoltre documentata la trasmissione per via aerea di batteri resistenti dagli allevamenti alle comunità circostanti, in particolare a partire dalle strutture di stoccaggio del letame (Khan et al., 2026). A livello molecolare tale fenomeno è sostenuto dal trasferimento genico orizzontale mediato da elementi mobili quali plasmidi, trasposoni e integroni, che veicolano i geni di resistenza tra specie batteriche differenti. Un'analisi metagenomica *shotgun* condotta su latte crudo bovino ha infatti evidenziato oltre 150 differenti geni di resistenza antimicrobica, comprendenti beta-lattamasi, enzimi modificanti gli aminoglicosidi e pompe di efflusso per le tetracicline, veicolati da plasmidi e trasposoni diversi, mentre un successivo studio metagenomico *whole-genome* ha dimostrato la presenza di geni di resistenza agli antibiotici (ARG) su *contig* recanti repliconi plasmidici o geni di ricombinasi associati a fagi, fornendo una prova diretta di un attivo trasferimento genico orizzontale (HGT) all'interno del microbioma del latte. (Kazemzadeh et al., 2025).

La trasmissione di batteri resistenti e dei relativi geni di resistenza dai bovini da latte all'uomo avviene attraverso molteplici vie. Il contatto diretto interessa in particolare gli operatori di

stalla, i veterinari e i loro nuclei familiari, che presentano un'esposizione regolare agli animali e all'ambiente aziendale; studi occupazionali hanno documentato tassi di colonizzazione da MRSA e da altri organismi resistenti significativamente più elevati tra i lavoratori del comparto lattiero-caseario rispetto alla popolazione generale. La trasmissione per via alimentare, attraverso il consumo di prodotti lattiero-caseari contaminati, rappresenta un'ulteriore via significativa, sebbene la pastorizzazione elimini efficacemente la maggior parte delle cellule batteriche vegetative; tuttavia, tossine termostabili prodotte da alcuni ceppi resistenti, quali le enterotossine stafilococciche, possono persistere nonostante il trattamento termico (Khan et al., 2026). In tale ambito, la presenza di MRSA e di *Escherichia coli* produttori di ESBL negli allevamenti da latte comporta significative difficoltà terapeutiche e rappresenta una minaccia per la salute pubblica, poiché tali ceppi resistenti possono essere trasmessi attraverso il consumo di latte crudo; è stato inoltre suggerito che il contenuto di geni di resistenza antimicrobica presente nei prodotti lattiero-caseari non trasformati e nel latte crudo contribuisca allo sviluppo di resistenza nei patogeni umani, incrementando il rischio di AMR per la popolazione, e sebbene la pastorizzazione riduca sensibilmente tale rischio per la salute pubblica, il consumo di latte crudo, ancora praticato in diverse aree del mondo per tradizioni locali o per presunti benefici nutrizionali, rinforza la trasmissione di batteri resistenti dagli animali mastitici all'uomo (Kazemzadeh et al., 2025). Non va infine trascurato che la resistenza è stata documentata anche nei confronti di antimicrobici di importanza critica per la medicina umana, quali le cefalosporine di terza generazione, i fluorochinoloni e i macrolidi, classi essenziali per il trattamento di infezioni umane gravi, la cui efficacia terapeutica risulta compromessa dall'insorgenza di resistenza in patogeni di origine mastitica (Khan et al., 2026).

Il contenimento della diffusione delle resistenze richiede l'adozione di misure di biosicurezza integrate a livello aziendale e normativo. Le risposte regolatorie alla minaccia dell'AMR si sono intensificate a livello globale: l'Unione Europea ha implementato normative stringenti che limitano l'uso profilattico degli antibiotici negli allevamenti e impongono la supervisione veterinaria per tutti i trattamenti antimicrobici, mentre diversi paesi hanno vietato l'impiego di antibiotici come promotori di crescita, riconoscendone il contributo allo sviluppo di resistenza; i piani d'azione nazionali sull'AMR includono peraltro sempre più frequentemente obiettivi di riduzione dell'uso antimicrobico in agricoltura e la promozione di approcci alternativi per la prevenzione delle malattie (Khan et al., 2026). A livello di singola azienda, la corretta gestione delle attrezzature di mungitura riveste un ruolo cruciale: è stato dimostrato come una pressione del vuoto inadeguata negli impianti di mungitura automatica

determini un incremento significativo dell'incidenza di mastite sia clinica che subclinica, rendendo necessaria la manutenzione e la calibrazione regolare delle apparecchiature. Analogamente, la standardizzazione delle procedure operative e della gestione igienica, inclusa la formazione mirata del personale addetto alla mungitura nella pulizia e disinfezione dei gruppi di mungitura, contribuisce a ridurre la prevalenza di batteri sporigeni nel latte di massa (Yu et al., 2025). Sul piano diagnostico, l'implementazione di test genici rapidi per la rilevazione *on-farm* dei principali geni di resistenza prima della somministrazione antibiotica potrebbe consentire ai veterinari di orientarsi verso terapie mirate anziché verso l'impiego di farmaci ad ampio spettro, mentre la sorveglianza genomica di routine, in particolare mediante metagenomica *shotgun* del latte di massa e screening qPCR mirato, potrebbe consentire il monitoraggio della prevalenza dei geni di resistenza e l'identificazione tempestiva di minacce emergenti nel comparto lattiero-caseario (Kazemzadeh et al., 2025).

La prevenzione della mastite, e la conseguente riduzione della pressione selettiva esercitata dall'uso antibiotico, dipendono in larga misura dall'adozione di un sistema di gestione sanitaria sistematico dell'allevamento. Il mantenimento di un ambiente di stabulazione pulito, asciutto e confortevole risulta fondamentale per la salute della mammella, e l'impiego di condizionatori batterici per la lettiera è stato dimostrato in grado di migliorarne la qualità e la composizione batterica, con conseguente riduzione della conta cellulare somatica del latte. Parallelamente, una gestione nutrizionale scientificamente fondata, volta a garantire un adeguato apporto energetico e un'appropriata integrazione di vitamine, risulta fondamentale nel potenziare la resistenza delle bovine alle infezioni mammarie. Tra le misure di intervento proattivo, la vaccinazione continua a rappresentare uno strumento tradizionale di prevenzione: protocolli recenti hanno dimostrato una riduzione significativa della prevalenza di mastite subclinica da *Staphylococcus aureus* e l'induzione di elevati livelli anticorpali specifici. Anche la somministrazione di additivi specifici, quali *Bacillus subtilis* o *Lactobacillus*, ha mostrato effetti favorevoli nell'ottimizzare la composizione del microbioma mammario e nel ridurre l'incidenza di mastite (Yu et al., 2025). In questa prospettiva, i probiotici sono stati individuati come un'alternativa strategicamente rilevante nel quadro One Health, poiché la loro azione, basata su meccanismi non farmacologici quali l'esclusione competitiva, la produzione di batteriocine e l'immunomodulazione, non esercita una pressione selettiva paragonabile a quella degli antibiotici, rendendoli intrinsecamente più sostenibili in un'ottica di *stewardship* a lungo termine. Riducendo la dipendenza dagli antibiotici per la prevenzione e il trattamento della mastite, gli interventi probiotici possono pertanto contribuire agli sforzi più ampi di mitigazione dell'AMR; gli stessi autori sottolineano

tuttavia come alcuni ceppi probiotici, in particolare quelli a base di *Enterococcus*, possano rappresentare un rischio potenziale in quanto portatori di determinanti di resistenza alla vancomicina trasferibili (*vanA*, *vanB*), agendo potenzialmente da donatori inavvertiti di resistenza verso i patogeni mastitici endogeni; per tale motivo, uno *screening* di sicurezza basato sul sequenziamento dell'intero genoma per l'identificazione di elementi di resistenza mobili risulta obbligatorio per qualsiasi candidato probiotico destinato all'applicazione veterinaria. Complessivamente, l'integrazione di strategie di prevenzione basate sul microbiota comprendenti l'ottimizzazione della disinfezione dei capezzoli, la gestione dietetica, la supplementazione con probiotici e prebiotici e un uso antimicrobico selettivo rappresenta la via più promettente per affrontare congiuntamente la salute animale e le problematiche di antibiotico-resistenza nel comparto lattiero-caseario (Khan et al., 2026).

8 Nuove prospettive terapeutiche e strategie innovative

La crescente antibiotico-resistenza tra i patogeni della mastite bovina rappresenta una delle principali criticità gestionali degli allevamenti da latte. Numerosi studi hanno documentato resistenze non solo verso molecole di uso corrente come penicillina, amoxicillina, tetraciclina, amikacina, gentamicina ed eritromicina, ma anche verso antimicrobici più recenti quali piperacillina, ceftazidima, cefquinome, tigeciclina, colistina e vancomicina (Morales-Ubaldo et al., 2023). A ciò si aggiungono le preoccupazioni relative ai residui farmacologici nel latte e al rischio di trasmissione di ceppi resistenti lungo la filiera, in un'ottica One Health. Hanno stimato che l'uso incontrollato di antimicrobici possa condurre, entro il 2050, a oltre dieci milioni di decessi annui per infezioni resistenti. Tali criticità hanno indirizzato la ricerca verso strategie terapeutiche alternative fitoterapia, batteriofagi e loro derivati, peptidi antimicrobici, nanotecnologie, probiotici, cellule staminali, immunoterapia, terapia fotodinamica, laserterapia e terapia acustica pulsata capaci di offrire efficacia comparabile riducendo il rischio di selezione di resistenze. La maggior parte di tali approcci risulta tuttavia validata prevalentemente in vitro o su modelli murini, mentre le evidenze cliniche su bovine da latte restano limitate (Askari et al., 2025).

Fitoterapia

L'impiego di piante officinali nel trattamento della mastite bovina si fonda sulle proprietà antibatteriche, antinfiammatorie e immunomodulanti di numerosi fitocomposti, associate a un rischio di resistenza contenuto e a bassa tossicità anche in caso di esposizione prolungata (Yu et al., 2025).

Numerosi estratti vegetali grezzi hanno mostrato attività sui principali patogeni della mastite. Estratti di *Quercus robur* e *Calluna vulgaris* hanno inibito *S. aureus*, *E. coli*, *S. agalactiae* e *S. uberis*, con attività attribuita al contenuto fenolico. Effetti battericidi e batteriostatici comparabili a penicillina e gentamicina sono stati documentati per l'estratto tannico di castagno dolce, mentre l'estratto fenolico di sorgo ha mostrato attività selettiva su *S. aureus*, *K. pneumoniae* ed *E. faecalis*, risultando inattivo su *E. coli*. Ulteriori estratti attivi comprendono *Terminalia chebula*, *Eucalyptus globulus*, *Rhodomyrtus tomentosa* e *Salvinia auriculata*. Il lignano nor 3'-demetossiisoguaiacina, isolato da *Larrea tridentata*, ha mostrato attività battericida particolarmente marcata su *S. aureus*, mentre diterpeni di *Salvia officinalis* (manuolo, acido *ent*-caurenoico e *ent*-copalico) sono risultati attivi e privi di

citotossicità significativa. La combinazione di *Angelica dahurica* e *Rheum officinale*, con efficacia attribuita a emodina, reina e polisaccaridi, si è dimostrata efficace in un modello bovino in vivo (Morales-Ubaldo et al., 2023).

Tra gli oli essenziali, quelli di *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum* e *Origanum vulgare*, il cui principio attivo principale è rappresentato da timolo e carvacrolo, hanno mostrato effetti inibitori e battericidi ad ampio spettro (Yu et al., 2025). L'olio di *Minthostachys verticillata* ha inibito *S. uberis* e la formazione di biofilm, mentre l'olio dell'albero del tè, associato a timolo e carvacrolo, ha mostrato effetti additivi su isolati clinici (Morales-Ubaldo et al., 2023).

L'associazione tra fitocomposti e antibiotici convenzionali ha evidenziato un potenziale sinergico, documentato per l'associazione di *E. globulus* con penicillina G, di *Ocimum tenuiflorum* con penicillina G, amoxicillina, cefazolina e gentamicina, e di *Plectranthus ornatus*, che ha ridotto fino a otto volte la concentrazione minima inibente di ampicillina, kanamicina e gentamicina. Tali evidenze suggeriscono un possibile impiego dei fitocomposti come coadiuvanti della terapia antibiotica, riducendo le dosi necessarie e il rischio di resistenza (Morales-Ubaldo et al., 2023).

Sono state inoltre sviluppate formulazioni fitoterapiche complesse. Gel erboristici a base di propoli ed estratti alcolici vegetali, somministrati per via intramammaria, hanno ridotto la carica batterica e la conta di cellule somatiche in bovine con mastite clinica e subclinica. La formulazione Phyto-Bomat, a base di oli essenziali di timo, origano e santoreggia, ha confermato la propria efficacia anche in un successivo studio clinico (Morales-Ubaldo et al., 2023).

Una ricerca più recente ha caratterizzato i meccanismi molecolari di singoli composti bioattivi. La baicaleina, incapsulata in chitosano e associata a β -lattamici, ha ridotto in vivo la conta leucocitaria e neutrofila e l'espressione di MMP-9; il suo derivato baicalina ha attenuato il danno ossidativo nelle cellule epiteliali mammarie bovine tramite la via Keap1/Nrf2. La curcumina ha attenuato stress ossidativo, infiammazione e morte cellulare indotti da lipopolisaccaride tramite la via NFE2L2, con formulazioni nanotecnologiche (nanocurcumina, complesso ZIF-8@CCM) che ne hanno potenziato l'efficacia agendo sulle vie Nrf2, NF- κ B e TLR2/TLR4. Il resveratrolo ha ridotto la produzione di citochine proinfiammatorie attivando la via Nrf2 e contrastando NF- κ B e MAPK, attenuando inoltre l'apoptosi cellulare tramite l'asse PGC1 α -SIRT3 (Yu et al., 2025).

La propoli, sostanza resinosa ad attività antibatterica, antivirale, antifungina e antinfiammatoria, presenta una composizione variabile in funzione dell'origine geografica, con un'attività generalmente superiore sui batteri Gram-positivi rispetto ai Gram-negativi. È stata documentata attività antimicrobica su circa il 41% dei patogeni testati, oltre a un effetto sinergico con la maggior parte degli antibiotici, ad eccezione di polimixina B e nistatina, con potenziale applicativo anche contro ceppi meticillino-resistenti (Askari et al., 2025).

Le saponine, composti glicosidici presenti in numerose specie vegetali, possiedono attività antifungina, antivirale, antinfiammatoria e antimicrobica. La saponina del tè ha inibito *S. agalactiae* e la formazione del relativo biofilm, riducendo l'espressione dei geni *srtA*, *fbsC*, *neuA* e *cpsE*, mentre il ginsenoside Rg1 ha ridotto, in un modello caprino, i mediatori infiammatori TNF- α , IL-1 β e IL-6 competendo con il lipopolisaccaride per il legame a TLR4 (Askari et al., 2025).

Batteriofagi

I batteriofagi sono virus a specificità per l'ospite batterico, dotati di genoma ridotto e dipendenti dal macchinario replicativo dell'ospite. Non essendo in grado di infettare cellule animali, presentano un profilo di sicurezza favorevole e, rispetto agli antibiotici, non alterano la microflora naturale, esercitano intensa attività litica e sono capaci di prevenire ed eradicare i biofilm batterici (Askari et al., 2025).

I fagi si distinguono in litici e temperati: questi ultimi, potendo integrarsi nel genoma batterico, comportano il rischio di trasferimento genico e di potenziamento della virulenza o della resistenza dell'ospite, per cui la fagoterapia tradizionale privilegia i fagi litici obbligati. La selezione dei fagi terapeutici richiede la verifica dell'efficacia litica in vitro, della stabilità di conservazione, dell'assenza di endotossine e geni tossici e dell'incapacità di trasduzione generalizzata (Askari et al., 2025).

Diversi studi hanno validato l'efficacia di fagi specifici. Sono stati isolati tre batteriofagi specifici per *E. coli*, la cui miscela ha ridotto carica batterica, cellule somatiche e fattori infiammatori. È stato inoltre dimostrato che il fago EcoM017 lisa i biofilm di *E. coli*, riducendone l'adesione. Per le infezioni stafilococciche, il preparato Fagomast ha mostrato un'efficacia del 71,4%, comparabile a quella antibiotica (66,7-100%), con tempi di sospensione del latte ridotti di 1,5 volte, mentre i fagi M8 e B4 hanno lisato efficacemente ceppi multiresistenti, meticillino-resistenti e produttori di biofilm anche in ambiente

lattiginoso. Non tutti gli approcci monoterapici risultano tuttavia soddisfacenti: la monoterapia con il fago K ha mostrato solo il 16,7% di guarigione in bovine con mastite subclinica da *S. aureus* (Yu et al., 2025).

I cocktail fagici, costituiti da più batteriofagi, riducono il rischio di resistenza e ampliano lo spettro d'azione: una combinazione di tre fagi anti-*K. pneumoniae* ha mostrato efficacia superiore, in vitro e in un modello murino, rispetto al singolo fago. La loro efficacia può tuttavia essere compromessa da resistenza crociata, per cui i cocktail più efficaci associano fagi con meccanismi infettivi diversificati. La resistenza batterica ai fagi si manifesta tramite mutazioni che riducono l'assorbimento fagico, vie molecolari di soppressione dell'infezione e sistemi di difesa competitivi, rendendo necessario l'aggiornamento periodico dei cocktail (Askari et al., 2025).

Le endolisine, peptidoglicano-idrolasi derivate dai fagi che degradano la parete batterica al termine del ciclo litico, risultano efficaci contro i patogeni Gram-positivi della mastite e possono essere impiegate mediante iniezione intramammaria in asciutta o come *teat dip* post-mungitura (Askari et al., 2025). È stata inoltre descritta la peptidasi CHAPK, derivata da batteriofago, quale agente in grado di disgregare rapidamente i biofilm stafilococcici, con una possibile applicazione nei disinfettanti post-mungitura (Sharun et al., 2021).

I limiti applicativi della fagoterapia comprendono una farmacocinetica imprevedibile, la limitata penetrazione tissutale, lo spettro d'azione ristretto, la necessità di replicazione in vivo, il possibile incremento della conta di cellule somatiche e l'inattivazione fagica da parte delle proteine del siero (Askari et al., 2025).

Peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici (AMPs: antimicrobial peptides), sono piccole molecole di 12-50 amminoacidi con residui idrofilici, idrofobici e cationici, svolgono un ruolo centrale nell'immunità innata, mostrando potenza, ampio spettro d'azione, capacità immunomodulante e sinergia con gli antibiotici convenzionali (Askari et al., 2025). Tra gli AMPs delle specie multicellulari, le β -defensine costituiscono la prima linea di difesa nei confronti delle infezioni, mentre le catelicidine, rilasciate dai neutrofili durante la degranulazione, esercitano attività ad ampio spettro; le catelicidine bovine BMAP-27 e BMAP-28 hanno mostrato attività su isolati di campo di *S. aureus* ed *E. coli* (Sharun et al., 2021).

Tra le batteriocine, prodotte dagli organismi unicellulari, la nisina un antibiotico prodotto da *Lactococcus lactis* che agisce legandosi al lipide precursore della parete cellulare, rappresenta la molecola più studiata, con attività su *S. aureus* e *S. agalactiae* e proprietà antinfiammatorie (Askari et al., 2025). La sua somministrazione intramammaria ha mostrato tassi di guarigione variabili in funzione del patogeno, più elevati per *S. agalactiae* (90,1%) rispetto a *S. aureus* (50%), con un'efficacia clinica comparabile a quella della gentamicina. La bovicina HC5 ha inibito la maggior parte degli streptococchi e stafilococchi, risultando inefficace su *E. coli* (Sharun et al., 2021). Bactofencina, nisina e reuterina hanno mostrato attività su isolati clinici multiresistenti (Askari et al., 2025).

Diversi peptidi specifici sono stati caratterizzati per l'attività antimastitica. Il peptide pm11 ha inibito *S. aureus*, *S. uberis*, *S. agalactiae* ed *E. coli*; l'aureocina A53, prodotta da *S. aureus*, si è dimostrata battericida e priva di citotossicità. Il peptide NZ2114 ha ridotto, in vivo, l'infiammazione e la carica batterica da *S. dysgalactiae*, mentre il suo derivato H18R ha inibito *S. aureus* con efficacia superiore alla vancomicina nell'inibizione intracellulare (Morales-Ubaldo et al., 2023). Il peptide fungino defensin-like-P2 ha disgregato la membrana plasmatica di *S. dysgalactiae* in maniera tempo- e dose-dipendente, riducendo in vivo la carica batterica e l'infiammazione (Morales-Ubaldo et al., 2023). Il peptide [I5, R8] mastoparan-like ha rapidamente depolarizzato la membrana di *S. aureus*, mentre il peptide del veleno di vespa Polybia MP-1 ha inibito fino al 70% degli isolati multiresistenti di *K. pneumoniae*. È stato inoltre sviluppato un vettore di espressione tessuto-specifico veicolante il peptide tracheale bovino (TAP), risultato efficace sia in vitro sia in vivo contro *S. aureus* (Yu et al., 2025).

L'impiego clinico degli AMPs incontra tuttavia rilevanti limiti: scarsa idoneità allo sviluppo farmaceutico, emivita breve, elevati costi di produzione, suscettibilità alla degradazione enzimatica e potenziale citotossicità (Askari et al., 2025). È stata inoltre documentata la possibilità di resistenza batterica agli AMPs, con fenomeni di resistenza crociata verso gli antibiotici convenzionali (Yu et al., 2025), aspetto che i sistemi di nano-veicolazione mirano a mitigare potenziando l'attività antibatterica e riducendo la citotossicità (Askari et al., 2025).

8.1 Immunomodulazione e vaccini di nuova generazione

La crescente diffusione dell'antibiotico-resistenza tra i patogeni responsabili di mastite bovina ha reso necessaria l'identificazione di approcci terapeutici alternativi, non fondati

sull'azione diretta antimicrobica, bensì sul potenziamento delle difese immunitarie dell'ospite. In quest'ottica, le terapie immunomodulanti e i vaccini di nuova generazione rappresentano strategie complementari, volte a ristabilire l'omeostasi immunitaria della ghiandola mammaria e a conferire una protezione duratura contro i principali patogeni contagiosi (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*) e ambientali (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus uberis*) (Li et al., 2026). Tuttavia, l'efficacia dei vaccini attualmente disponibili rimane controversa: i preparati commerciali e sperimentali sono stati concepiti prevalentemente per indurre una risposta anticorpale, mentre le evidenze più recenti dimostrano che la protezione della ghiandola mammaria richiede l'induzione di una solida immunità cellulo-mediata, in particolare di tipo T-helper 1 (Th1) e Th17. Tale limite intrinseco, unitamente alla scarsa efficacia dimostrata nei trial di campo e ai benefici economici limitati, giustifica l'interesse crescente verso approcci innovativi, quali l'immunoterapia diretta, i vaccini a subunità basati sui fattori di virulenza e le piattaforme vaccinali lievito-based (Danzelle et al., 2024).

Immunoterapia

L'immunoterapia si configura come un'alternativa immunologicamente basata alla terapia antibiotica convenzionale. Un esempio paradigmatico è rappresentato dal cosiddetto "Y-complex", costituito da microsfere veicolanti anticorpi specifici diretti contro i principali patogeni mastidogeni (*E. coli*, *S. dysgalactiae*, stafilococchi coagulasi-negativi) associati a un potenziatore della fagocitosi. In uno studio condotto su 32 vacche affette da mastite naturale, tale complesso ha dimostrato un'efficacia nell'eliminazione batterica sovrapponibile a quella della terapia antibiotica combinata (sulfadiazina più trimetoprim, oppure penicillina procaina più streptomina) e superiore rispetto al trattamento con soli farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS; NSAIDs: *non-steroidal anti-inflammatory drugs*), determinando inoltre una minore quantità di latte scartato rispetto al gruppo trattato con antibiotici. L'associazione di FANS, quali il meloxicam, alla terapia antibiotica ha migliorato significativamente la performance riproduttiva delle bovine trattate (Sharun et al., 2021).

La somministrazione sottocutanea di una singola dose di interleuchina-2 (IL-2) nella regione drenata dal linfonodo sopramammario, effettuata 3-5 giorni dopo il parto, ha determinato un incremento significativo di diversi marcatori legati alla funzionalità leucocitaria ed epiteliale nel latte, quali il conteggio delle cellule somatiche, l'amiloide sierica A, la lattoferrina e la N-

acetil- β -D-glucosaminidasi (NAGasi), suggerendo un'azione diretta della citochina anche sulle cellule epiteliali mammarie, con conseguente maggiore resistenza all'invasione patogena. L'associazione dell'IL-2 alla terapia antibiotica standard in asciutta, mirata contro *S. aureus*, ne ha potenziato l'efficacia, sebbene sia stato osservato un evento avverso di aborto nel 7,5% delle vacche trattate. Analogamente, l'infusione intramammaria di estratto di lievito *Saccharomyces cerevisiae* durante il periodo di asciutta ha indotto un incremento dell'attività delle cellule immunitarie residenti nella ghiandola, capaci di rispondere prontamente a una nuova infezione, riducendo potenzialmente il rischio di nuove infezioni intramammarie nel periodo perinatale (Sharun et al., 2021).

Parallelamente, gli approcci di immunizzazione passiva basati sull'impiego di immunoglobuline eterologhe hanno mostrato risultati promettenti in diversi studi *in vitro*. Le immunoglobuline del tuorlo d'uovo (IgY), ottenute mediante immunizzazione di galline con *E. coli* e *S. aureus* inattivati, hanno dimostrato la capacità di potenziare l'attività fagocitica nei confronti dei patogeni mastidogeni. In modo analogo, l'impiego di anticorpi diretti contro la molecola di adesione SUAM (*Streptococcus uberis* *adhesion molecule*) ha fornito evidenze dirette dell'efficacia protettiva dell'immunizzazione passiva: vacche infuse con ceppi di *S. uberis* opsonizzati mediante anticorpi anti-rSUAM purificati per affinità o sieri iperimmuni hanno mostrato sintomatologia clinica lieve o assente, minori conte batteriche nel latte e un numero inferiore di quarti mammari infetti rispetto agli animali di controllo infusi con batteri non opsonizzati (Sharun et al., 2021).

Vaccini di nuova generazione

L'identificazione dei fattori di virulenza conservati e funzionalmente indispensabili per la colonizzazione e la patogenesi dei principali agenti eziologici della mastite bovina ha aperto la strada allo sviluppo di vaccini a subunità, chimerici, a DNA e attenuati, concepiti per neutralizzare selettivamente i meccanismi patogenetici piuttosto che l'intero patogeno (Li et al., 2026). Questo approccio risponde alla necessità di superare i limiti dei vaccini convenzionali, storicamente sviluppati prevalentemente contro *S. aureus*, *S. uberis* ed *E. coli*, ma gravati da un'efficacia limitata e da costi elevati (Sharun et al., 2021).

Per quanto riguarda *S. aureus*, patogeno contagioso caratterizzato da sofisticati meccanismi di evasione immunitaria, sono stati sviluppati vaccini chimerici mediante la sostituzione del dominio tossico A1 della tossina colerica con i fattori di virulenza IsdA

(determinante di superficie regolato dal ferro) e ClfA (clumping factor A), generando le due proteine di fusione IsdA-CTA2/B e ClfA-CTA2/B. Tali costrutti hanno indotto anticorpi opsonizzanti e una risposta cellulare polarizzata in senso Th2, con un potenziamento dell'attività fagocitica confermato in saggi *in vitro*. Al fine di ampliare lo spettro di protezione, è stato sviluppato un ulteriore vaccino chimerico multivalente denominato GIT, ottenuto dalla fusione di una porzione tronca della proteina GapC di *S. dysgalactiae* (GapC1) con porzioni tronche di IsdB e della proteina TRAP (thrombin-sensitive protein) di *S. aureus*; tale costrutto ha indotto immunità crociata protettiva nel modello murino sia contro *S. aureus* sia contro gli streptococchi, evidenziando il potenziale delle strategie multi-antigeniche (Li et al., 2026).

Nel caso di *Mycoplasma bovis*, patogeno privo di parete cellulare e particolarmente elusivo per il sistema immunitario, sono stati esplorati sia approcci a vaccino vivo attenuato sia strategie a subunità. Il passaggio seriale *in vitro* per oltre 150 generazioni del ceppo selvaggio P1 ha permesso di ottenere la variante attenuata P150, che mantiene l'immunogenicità pur presentando una virulenza ridotta (Li et al., 2026).

Per quanto riguarda *E. coli*, i cui meccanismi patogenetici si fondano su lipopolisaccaride (LPS), adesine e sistemi di chelazione del ferro, sono stati sviluppati diversi candidati vaccinali a subunità mirati verso tali bersagli. Un vaccino a DNA denominato pcwaaF, basato sul gene *waaF* codificante la glicosiltransferasi II coinvolta nella sintesi dell'LPS, ha dimostrato sicurezza e immunogenicità in seguito a trasfezione in linee cellulari. Per contrastare l'adesione batterica, la proteina strutturale delle fimbrie F17, codificata dal gene *f17a*, è stata impiegata in un vaccino a subunità formulato con adiuvante MF59, che ha ridotto significativamente l'adesione batterica e mostrato efficacia protettiva nei modelli sperimentali. Infine, per contrastare l'acquisizione del ferro, essenziale per la proliferazione batterica nell'ambiente ferro-limitato del latte, è stato sviluppato un vaccino coniugato KLH-Ent, basato sul sideroforo enterobactina purificato da un ceppo mutante di *E. coli* e coniugato a KLH; tale formulazione ha indotto anticorpi specifici in grado di limitare efficacemente l'acquisizione di ferro batterico (Li et al., 2026).

Per *S. uberis*, patogeno ambientale responsabile di una quota rilevante delle mastiti cliniche, sono stati identificati come candidati antigenici la fruttosio-bifosfato aldolasi (FBA), le lipoproteine di superficie (SLP) e le proteine leganti zuccheri extracellulari ExsbP1 ed ExsbP2, selezionate sulla base della predizione di epitopi immunogenici a seguito di co-coltura del patogeno con cellule epiteliali mammarie bovine. Un vaccino a subunità formulato con le proteine ricombinanti rSlp, rExsbP1 e rExsbP2 ha mostrato un forte

riconoscimento e una intensa reattività con il siero di bovine guarite dall'infezione, confermandone l'immunogenicità e il potenziale impiego come antigeni vaccinali (Li et al., 2026). Parallelamente, è stato sviluppato il vaccino commerciale UBAC®, formulazione a subunità contenente acido lipoteicoico (LTA), componente essenziale della parete cellulare Gram-positiva e fattore di virulenza cruciale di *S. uberis*: studi *in vivo* hanno dimostrato che gli animali vaccinati presentano segni clinici più lievi in seguito a infezione sperimentale con un ceppo eterologo, un recupero più rapido della produzione latte, un minor incremento della temperatura corporea post-infezione (suggerendo un'attenuazione della risposta infiammatoria sistemica), nonché una significativa riduzione dei segni clinici, delle conte batteriche, della temperatura rettale e delle perdite produttive giornaliere, con un aumento significativo dei quarti privi di isolamento batterico e con SCC inferiore a 200.000 cellule/mL al termine dello studio (Tong et al., 2025).

Infine, nei confronti di *K. pneumoniae*, patogeno ambientale caratterizzato da elevata resistenza antimicrobica ed esiti clinici severi, è stato sviluppato un vaccino ricombinante basato sulla proteina *YidR*, antigene conservato tra i diversi ceppi di *K. pneumoniae* associati a mastite. Il gene codificante *YidR* è stato clonato ed espresso in *E. coli*, e la proteina purificata, formulata con idrossido di alluminio come adiuvante, ha dimostrato una robusta efficacia protettiva nel modello murino, con induzione di elevati titoli anticorpali, miglioramento della sopravvivenza e riduzione dei segni clinici quali sepsi e calo ponderale; tale vaccino ha inoltre contribuito a preservare la produzione latte in casi di mastite clinica da *E. coli*, evidenziando l'utilità di antigeni filogeneticamente stabili nel controllo delle mastiti da Gram-negativi (Li et al., 2026). Negli Stati Uniti è stato sviluppato un vaccino contenente la proteina recettoriale dei sideroforo e la porina, destinato alla prevenzione della mastite da *K. pneumoniae* (Tong et al., 2025).

Le piattaforme lievito-based come vettori vaccinali innovativi

I lieviti rappresentano un fronte innovativo come vettori vaccinali, capaci di superare il limite dei vaccini adiuvati convenzionali, ossia la scarsa induzione di immunità cellulo-mediata. Grazie alla natura immunogenica dei carboidrati di parete, non richiedono adiuvanti e inducono risposte Th1, Th17 e citotossiche T-mediate, superando la componente prevalentemente anticorpale dei vaccini tradizionali (Danzelle et al., 2024).

In bovine da latte, il ceppo *S. cerevisiae* EBY100 è risultato correttamente riconosciuto dalle cellule ematiche, inducendo marcatori infiammatori e di risposta T-cellulare (IFN- γ , IL-17, TNF- α) paragonabili a quelli indotti da *S. aureus* ed *E. coli* inattivati. Nella somministrazione intramammaria, EBY100 ha determinato un rilascio di citochine pro-infiammatorie inferiore rispetto ai patogeni mastitogeni, sia nelle cellule epiteliali mammarie sia negli espianti di capezzolo, perché i recettori per gli zuccheri fungini sono espressi soprattutto sulle cellule presentanti l'antigene, mentre le cellule epiteliali riconoscono prevalentemente *pattern* molecolari batterici. Ciò suggerisce che la vettorizzazione lievito-based possa innescare l'immunità adattativa nella ghiandola mammaria limitando il rischio di infiammazione eccessiva (Danzelle et al., 2024).

È stato quindi sviluppato un prototipo vaccinale (EBY100-OVA), ottenuto inserendo la sequenza dell'ovalbumina nel vettore pYD1, con espressione della proteina di fusione Aga2p-OVA in superficie dopo induzione con galattosio. La somministrazione intramuscolare seguita da richiamo intramammario si è dimostrata sicura, senza febbre o reazioni sistemiche, con infiammazione mammaria lieve-moderata limitata a 24-48 ore. Tuttavia, la vaccinazione ha indotto risposte IFN- γ , IL-17 e anticorpali dirette prevalentemente contro il vettore EBY100 e non contro l'antigene OVA, a differenza del gruppo di controllo immunizzato con OVA adiuvata in emulsione olio-in-acqua, che ha mostrato risposte verso entrambi. Questo fenomeno di immunodominanza degli antigeni di *S. cerevisiae* è coerente con osservazioni analoghe riportate per vettori vaccinali basati su *Listeria monocytogenes* e per vettori adenovirali. Gli autori concludono che, pur rappresentando i lieviti un'opportunità significativa per sicurezza, economicità e capacità adiuvante intrinseca, è necessario sviluppare strategie per contrastarne l'immunodominanza, quali l'ottimizzazione dei sistemi di espressione genica (ingegnerizzazione dei promotori, ottimizzazione dei codoni) e la modificazione della via secretoria per aumentare la produzione proteica (Danzelle et al., 2024).

Immunomodulazione mediata dai probiotici

I probiotici, microrganismi vivi che conferiscono un beneficio per la salute dell'ospite se somministrati in quantità adeguate, agiscono attraverso tre assi interdipendenti: modulazione della cascata infiammatoria, ristrutturazione del microbiota mammario e intestinale, e potenziamento delle difese antiossidanti cellulari (Khan et al., 2026).

Sul piano immunomodulatorio, alcuni ceppi di *Lactobacillus* incrementano l'espressione di regolatori negativi della segnalazione TLR (A20, IRAK-M, TOLLIP) nelle cellule epiteliali mammarie bovine, attenuando l'attivazione di NF- κ B e riducendo TNF- α , IL-1 β e IL-6. Va distinta la risposta locale da quella sistemica: la via intramammaria modula soprattutto l'immunità innata locale (reclutamento neutrofilico, segnalazione TLR epiteliale), mentre la via orale agisce principalmente tramite l'asse intestino-mammella, incrementando linfociti T CD4+, IgA secretoria e attività delle cellule dendritiche (Khan et al., 2026).

Nei modelli murini, *L. plantarum* riduce infiammazione tissutale, infiltrazione neutrofilica e citochine infiammatorie, mentre *L. casei* esercita un'azione anti-infiammatoria analoga nella mastite da *E. coli*, inibendo la traslocazione nucleare di NF- κ B e la fosforilazione della via MAPK. In allevamento, la somministrazione orale di *B. subtilis* a bovine con pregressa mastite ha ridotto cortisolo e stress ossidativo e aumentato linfociti T CD4+ e cellule dendritiche circolanti, indicando effetti sistemici oltre l'interazione locale (Khan et al., 2026).

L'infusione intramammaria di *L. lactis* ha indotto, in modello murino, un'infiammazione controllata (afflusso neutrofilico seguito da clearance del patogeno), a dimostrazione di un potenziale uso terapeutico dell'infiammazione stessa. Tuttavia, dosi elevate (10^7 CFU) dello stesso ceppo hanno causato sopravvivenza batterica, infiammazione marcata e danno tissutale variabile, evidenziando un rischio patogeno imprevedibile e la necessità di rigorosa valutazione di sicurezza prima dell'uso come alternativa antibiotica. Analogamente, il ceppo *L. lactis* LMG 7930, pur promettente in vitro (sensibilità antibiotica, attività antimicrobica, forte adesione epiteliale), ha indotto in vivo, in modello ovino, mastite clinica lieve-moderata nonostante l'attivazione dell'immunità innata (Khan et al., 2026).

8.2 Trattamenti biologici avanzati e antibiofilm

La formazione di biofilm rappresenta uno dei principali determinanti della cronicizzazione e della recidiva delle infezioni intramammarie, poiché la matrice polimerica extracellulare (EPS: *extracellular polymeric substance*) in cui i patogeni sono inglobati riduce drasticamente la penetrazione degli antimicrobici e protegge le sottopopolazioni batteriche dormienti dall'azione del sistema immunitario dell'ospite. Batteri quali *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* spp. sfruttano questa organizzazione strutturale per sopravvivere a concentrazioni antibiotiche fino a 1000 volte superiori alla minima concentrazione inibente richiesta per le forme planctoniche, rendendo insufficienti i protocolli terapeutici

convenzionali basati sulla sola somministrazione intramammaria. Per superare questi limiti, la ricerca si è progressivamente orientata verso approcci biologici innovativi, alternativi o complementari alla terapia antibiotica, capaci di agire direttamente sulla struttura del biofilm o di modulare la risposta rigenerativa e immunitaria dell'ospite (Ban-Cucerzan et al., 2026).

Enzimi litici e endolisine.

Tra le strategie biologiche più promettenti figurano i batteriofagi e le endolisine, enzimi litici da essi codificati e capaci di degradare la parete cellulare batterica. Le endolisine offrono un profilo d'azione più stabile e standardizzabile rispetto ai fagi interi, mostrando un'elevata attività nei confronti dei patogeni Gram-positivi, in particolare *S. aureus*, e una spiccata capacità di penetrare e disgregare i biofilm, caratteristica di primaria importanza nella gestione delle mastiti croniche. I recenti progressi nell'ingegneria proteica hanno permesso lo sviluppo di endolisine chimeriche e modulari, dotate di spettro d'azione ampliato e attività litica potenziata, mentre l'incapsulamento in nanoparticelle o liposomi ne ha migliorato la stabilità enzimatica, la biodisponibilità e la capacità di veicolazione all'interno dell'ambiente ricco di componenti lattee della ghiandola mammaria. Un ulteriore vantaggio di questi agenti risiede nella ridotta propensione allo sviluppo di resistenze, dovuta all'azione su strutture della parete cellulare altamente conservate, e nella possibile sinergia con antibiotici convenzionali; permangono tuttavia criticità legate alla scarsa stabilità nel latte, alla variabilità dell'efficacia in vivo e alla carenza di studi clinici su larga scala nella specie bovina (Ban-Cucerzan et al., 2026).

Gli studi condotti sui batteriofagi interi confermano il loro potenziale terapeutico. Sono stati isolati tre batteriofagi specifici da reflui di allevamento, la cui miscela ha determinato una significativa riduzione della carica batterica, della conta di cellule somatiche e dei fattori infiammatori in corso di mastite da *Escherichia coli*, mentre il fago EcoM017, isolato da acque reflue, si è dimostrato in grado di lisare i biofilm di *E. coli* e di ridurre l'adesione. Analogamente, il preparato fagico Fagomast ha mostrato un'efficacia terapeutica del 71,4% nella mastite clinica stafilococcica, sovrapponibile a quella dei trattamenti antibiotici tradizionali, con un tempo di sospensione del latte ridotto di circa 1,5 volte. I fagi Podoviridae M8 e B4, isolati da reflui caseari, hanno mantenuto attività litica anche nell'ambiente lattato, riducendo di circa 3 log la carica di *S. aureus* dopo 8 ore di incubazione e mostrando capacità litica nei confronti di ceppi multiresistenti (MDR: *Multi-Drug Resistant*), meticillino-resistenti (MRSA) e produttori di biofilm. Non tutti gli approcci monoterapici hanno tuttavia

fornito risultati soddisfacenti: la somministrazione intramammaria ad alto dosaggio del solo fago K per cinque giorni ha determinato un tasso di guarigione della mastite subclinica da *S. aureus* pari soltanto al 16,7%, evidenziando la necessità di ottimizzare le formulazioni fagiche prima di un impiego clinico su larga scala (Yu et al., 2025).

Strategie anti-biofilm

Accanto alla fagoterapia si stanno affermando strategie anti-biofilm basate su preparazioni postbiotiche derivate da batteri lattici (LAB: *Lactic Acid Bacteria*). I surnatanti privi di cellule e neutralizzati (nCFS: *neutralized cell-free supernatants*), ottenuti da *Lactococcus lactis* CNM81 e *Pediococcus pentosaceus* M46, hanno mostrato profili di attività anti-biofilm marcatamente differenziati in funzione del patogeno bersaglio: il preparato derivato da *L. lactis* CNM81 ha determinato un'eradicazione fino al 93% dei biofilm di *S. aureus* e riduzioni comprese tra il 63 e il 94% nei confronti di *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus epidermidis*, mentre il preparato da *P. pentosaceus* M46 si è rivelato più efficace contro i patogeni Gram-negativi, con un'eradicazione fino all'88% nei biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* e al 74% in quelli di *Klebsiella pneumoniae*. L'analisi al microscopio elettronico a scansione e la spettroscopia Raman hanno confermato una marcata disgregazione strutturale dei biofilm trattati, con riduzione dei segnali associati a carotenoidi e proteine di membrana, mentre il sequenziamento del genoma di *L. lactis* CNM81 ha rivelato un gene omologo all'enterolisina A e diversi cluster genici per la biosintesi di metaboliti secondari ad attività antimicrobica, quali peptidi RiPP e terpenoidi, suggerendo un'azione multifattoriale piuttosto che riconducibile a una singola molecola (Özdemir, 2026). Ulteriori strumenti anti-biofilm in fase di sviluppo comprendono sistemi di veicolazione nanoparticellare (liposomi, nanoparticelle polimeriche, nanogel) capaci di aumentare la stabilità e la penetrazione intramammaria di enzimi e peptidi antimicrobici, antimicrobici CRISPR-guidati capaci di colpire selettivamente i geni di resistenza con minima alterazione del microbiota commensale, nonché molecole riposizionate come il disulfiram e i composti a base di gallio, in grado rispettivamente di indurre stress ossidativo e di alterare l'architettura del biofilm interferendo con l'omeostasi del ferro batterico (Ban-Cucerzan et al., 2026).

Terapia cellulare

Un ulteriore ambito emergente è rappresentato dalla terapia cellulare basata sull'impiego di cellule staminali mesenchimali (MSC: *Mesenchymal stem cells*), dotate di proprietà rigenerative e immunomodulanti potenzialmente utili al ripristino dell'integrità strutturale della ghiandola mammaria danneggiata dal processo infiammatorio. Cellule staminali allogeniche derivate da midollo osseo (BMSC: *Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells*) e da tessuto adiposo (ADSC: *Adipose-Derived Stem Cells*) hanno determinato una significativa riduzione della carica batterica totale, inclusi *S. aureus* ed *Enterobacteriaceae*, e della conta di cellule somatiche nel latte. L'impiego di MSC derivate da cordone ombelicale (UCB-MSC) e delle relative vescicole extracellulari, ha prodotto una riduzione della SCC superiore a quella ottenuta con la terapia antibiotica, unitamente a una sovraregolazione dell'espressione di citochine antinfiammatorie, peptidi antimicrobici e geni angiogenici. La combinazione di acido caffeico e MSC da cordone ombelicale ha mostrato un effetto sinergico superiore a quello dei singoli trattamenti, mediato dal blocco della via p38-MAPK/NF- κ B $\leftrightarrow$ TNF- α ; sul piano della sicurezza, l'iniezione intramammaria di MSC derivate da tessuto adiposo (AT-MSC: *Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells*), si è dimostrata efficace nell'eliminazione di *S. aureus* dalla ghiandola mammaria senza determinare effetti collaterali significativi (Yu et al., 2025).

Nel loro insieme, questi approcci biologici avanzati condividono l'obiettivo di superare i limiti farmacocinetici e farmacodinamici intrinseci alla terapia intramammaria convenzionale, agendo su bersagli come la matrice del biofilm, i patogeni intracellulari, la risposta immunitaria e rigenerativa dell'ospite che gli antibiotici tradizionali non riescono a raggiungere efficacemente; la loro integrazione in protocolli terapeutici strutturati, guidati da criteri farmacocinetico/farmacodinamici e consapevoli del fenomeno della resistenza, rimane tuttavia subordinata a un'adeguata validazione clinica su larga scala nella specie bovina (Ban-Cucerzan et al., 2026).

9 Obbiettivi dello studio

La mastite bovina rappresenta una delle principali patologie degli allevamenti da latte, con importanti ripercussioni sul benessere animale, sulla qualità del latte e sulla sostenibilità economica delle aziende. La distribuzione degli agenti eziologici responsabili della malattia può variare nel tempo e tra differenti contesti territoriali, rendendo necessario un costante monitoraggio epidemiologico al fine di supportare le attività di prevenzione, controllo e gestione sanitaria degli allevamenti. In tale contesto, il presente studio è stato condotto mediante l'analisi dei dati microbiologici relativi ai campioni di latte bovino conferiti al laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – sede di Trento – nel periodo compreso tra gennaio e dicembre 2025. L'analisi dei dati raccolti permette di descrivere la frequenza di isolamento dei principali microrganismi nei campioni conferiti al laboratorio, fornendo un'indicazione orientativa del quadro eziologico locale, evidenziando la frequenza dei principali microrganismi responsabili di mastite e il loro andamento nel corso dell'anno. L'obiettivo generale dello studio è quello di valutare la distribuzione dei principali patogeni responsabili di mastite bovina isolati dai campioni di latte analizzati nel corso dell'anno 2025. Nello specifico, gli obiettivi dello studio sono:

- determinare la prevalenza dei diversi agenti eziologici isolati nei campioni analizzati, mediante il calcolo delle frequenze assolute e relative;
- descrivere la distribuzione dei principali patogeni nelle quattro stagioni dell'anno, al fine di evidenziare eventuali variazioni stagionali nella loro frequenza di isolamento;
- confrontare la distribuzione dei patogeni tra le diverse stagioni mediante analisi statistica (test del Chi-quadrato), valutando l'impatto del bias legato al conferimento e tenendo conto dell'effetto cluster dell'azienda di provenienza;
- confrontare i risultati ottenuti con i dati riportati nella letteratura scientifica, discutendo analogie ed eventuali differenze nella distribuzione degli agenti eziologici della mastite bovina.

I risultati ottenuti potranno contribuire ad ampliare le conoscenze sulla distribuzione dei principali patogeni responsabili di mastite bovina nel territorio di riferimento e fornire informazioni utili per l'interpretazione del quadro epidemiologico locale, rappresentando un supporto alle future strategie di monitoraggio e controllo della malattia.

10 Materiali e metodi

Nel presente capitolo vengono descritti la popolazione di campioni oggetto di studio, le metodiche diagnostiche di laboratorio impiegate per l'isolamento e l'identificazione dei microrganismi responsabili di mastite, e le modalità di elaborazione ed analisi statistica dei dati raccolti.

Campioni e Popolazione in Studio

I dati oggetto della presente indagine derivano dall'attività diagnostica di routine svolta dal laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), sede territoriale di Trento, nel periodo compreso tra gennaio e dicembre 2025. Sono stati considerati tutti i campioni di latte crudo bovino conferiti al laboratorio nel periodo di osservazione per l'esecuzione dell'esame batteriologico finalizzato alla diagnosi di infezione intramammaria (IMI), a prescindere dalla finalità del conferimento (accertamento diagnostico in presenza di sospetto clinico o subclinico di mastite, oppure monitoraggio della qualità del latte nell'ambito dei programmi aziendali di controllo).

Nel periodo considerato sono stati complessivamente processati $N = 11.002$ campioni. Di questi, 187 sono stati esclusi in quanto inquinati (crescita di microrganismi non correlabile a un quadro di infezione intramammaria, secondo i criteri interpretativi riportati in Tabella 1) e 2 per quantità di campione insufficiente all'esecuzione dell'analisi, con una popolazione finale di 10.813 campioni valutabili, pari al 98,3% della casistica complessiva.

I campioni valutabili provenivano da 401 aziende agricole zootecniche. È opportuno precisare che la casistica esaminata non deriva da un piano di campionamento probabilistico della popolazione bovina provinciale, bensì dall'insieme dei campioni conferiti spontaneamente al laboratorio da allevatori e veterinari aziendali, per finalità sia diagnostiche sia di monitoraggio. Di conseguenza, gli animali e le aziende rappresentati nello studio non costituiscono un campione casuale della realtà zootecnica provinciale, bensì il sottoinsieme di soggetti e allevamenti per i quali si è ritenuto opportuno l'accertamento batteriologico; tale caratteristica, comune alla generalità degli studi basati su dati diagnostici di laboratorio di routine, viene ripresa e discussa nel capitolo dedicato ai limiti dello studio.

Analisi Microbiologica e Diagnostica di Laboratorio

L'esame batteriologico dei campioni di latte è stato condotto secondo la procedura di prova standardizzata in uso presso il laboratorio dell'IZSve per la diagnosi di infezioni intramammarie da campioni di latte mediante metodica microbiologica, applicabile al latte crudo aziendale e al latte crudo individuale (pool o singolo quarto) di specie bovina.

Prima dell'esecuzione dell'analisi, i campioni, pervenuti al laboratorio in condizioni di refrigerazione o di congelamento, venivano portati a temperatura ambiente e accuratamente miscelati. La semina veniva eseguita su piastre di agar sangue esculina (ASE): per i campioni di latte individuale, mediante ansa calibrata da 10 µl, con suddivisione della piastra in quattro settori numerati corrispondenti ad altrettanti campioni; per i campioni di latte aziendale (pool), mediante distribuzione di 100 µl di latte sull'intera superficie della piastra con l'ausilio di un'ansa a L. Le piastre venivano incubate a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 16-24 ore, sottoposte a una prima lettura e quindi reincubate per ulteriori 16-24 ore per una seconda lettura, al fine di consentire l'evidenziazione anche dei microrganismi a crescita più lenta.

L'identificazione presuntiva dei microrganismi isolati si basava sulla valutazione delle caratteristiche morfologiche coloniali (dimensione, colore, aspetto), del tipo di emolisi su ASE e, ove pertinente, della reazione all'esame con lampada di Wood (idrolisi dell'esculina). I principali gruppi microbici considerati e le rispettive prove di conferma erano i seguenti:

Stafilococchi (cocchi Gram-positivi disposti a grappolo, catalasi-positivi): la distinzione fra stafilococchi coagulasi-positivi (SC+) e coagulasi-negativi (SC-) veniva effettuata mediante test della coagulasi in provetta su plasma di coniglio, con allestimento giornaliero di un controllo positivo costituito da un ceppo di riferimento ATCC di *Staphylococcus aureus*; in caso di esito dubbio, era previsto il ricorso a gallerie di identificazione biochimica in micrometodo oppure alla spettrometria di massa MALDI-TOF.

Streptococchi (cocchi Gram-positivi disposti a catena, catalasi-negativi): *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus canis* venivano identificati mediante CAMP test, sieroagglutinazione con kit per la determinazione del gruppo di Lancefield (gruppo B per *S. agalactiae*, gruppo G per *S. canis*) o MALDI-TOF; *Streptococcus dysgalactiae* veniva confermato mediante CAMP test negativo associato a sieroagglutinazione di gruppo C, oppure mediante MALDI-TOF. *Streptococcus uberis* e gli altri streptococchi ambientali esculina-positivi (*Enterococcus spp.*, *Lactococcus spp.*) venivano differenziati mediante

semina su terreno BEA (Bile Esculina Azide Agar) e, ove necessario, fermentazione del sorbitolo o identificazione mediante MALDI-TOF.

Trueperella pyogenes e *Corynebacterium* spp. (bacilli Gram-positivi disposti a palizzata): distinti sulla base della reazione della catalasi (negativa per *T. pyogenes*, positiva per *Corynebacterium* spp.), con eventuale conferma mediante galleria API CORYNE o MALDI-TOF.

Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica* (bacilli o coccobacilli Gram-negativi): identificati mediante test dell'ossidasi, semina su agar di MacConkey (per le *Enterobacteriaceae*) e gallerie biochimiche dedicate (API 20E per le *Enterobacteriaceae*; API 20NE per *Pseudomonas* spp., *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica*), o in alternativa MALDI-TOF.

Prototheca spp., microalga unicellulare eterotrofa non fotosintetica, identificata mediante esame microscopico a fresco o colorazione di Gram, sulla base delle caratteristiche morfologiche delle strutture algali osservate.

L'attribuzione dell'esito finale (negativo, inquinato, positivo) veniva effettuata secondo lo schema interpretativo in uso presso il laboratorio, che integra il numero di colonie isolate, la purezza della coltura (numero di morfotipi distinti presenti in piastra) e la natura del microrganismo identificato, classificato come patogeno contagioso, ambientale o minore, oppure come contaminante occasionale.

Ai fini della presente analisi è opportuno segnalare alcuni limiti intrinseci al protocollo diagnostico impiegato, comuni alla generalità degli esami batteriologici di routine per mastite. In primo luogo, l'identificazione degli stafilococchi non prevedeva, se non in casi selezionati, la tipizzazione sistematica a livello di specie, essendo condotta generalmente a livello di gruppo funzionale (coagulasi-positivi vs. coagulasi-negativi); tale approccio, pur adeguato alla finalità diagnostica di routine, comporta l'aggregazione di specie con comportamento epidemiologico potenzialmente distinto. In secondo luogo, il protocollo standard non prevede la ricerca sistematica di *Mycoplasma bovis*, agente eziologico di crescente rilevanza per la mastite contagiosa, la cui identificazione richiede terreni selettivi e condizioni colturali dedicate non incluse nell'esame di routine. Infine, l'identificazione di *Prototheca* spp. si basava sull'osservazione delle colonie eventualmente cresciute sui terreni standard (ASE), in assenza di terreni selettivi specifici per questo microrganismo, con una conseguente possibile sottostima della sua reale prevalenza.

Elaborazione dei Dati e Analisi Statistica

I risultati degli esami batteriologici sono stati estratti dal sistema informativo di laboratorio e organizzati in un database dedicato, comprensivo, per ciascun campione, dell'esito dell'analisi, del microrganismo o dei microrganismi isolati, della data di conferimento e del codice identificativo dell'azienda di provenienza.

Analisi descrittiva. Per ciascun patogeno e per ciascun raggruppamento epidemiologico (patogeni contagiosi, ambientali, minori/opportunisti, non batterici/contaminanti occasionali) sono state calcolate le frequenze assolute, corrispondenti al numero di isolamenti, e le frequenze relative, espresse sia come percentuale sul totale dei campioni valutabili ($n = 10.813$) sia come percentuale sul totale degli isolamenti ($n = 5.385$). Poiché una quota dei campioni positivi presentava una coltura mista, sostenuta cioè da due o più patogeni, le percentuali calcolate sui campioni non risultano additive: un campione con coltura mista viene infatti conteggiato in corrispondenza di ciascuno dei patogeni isolati, comparando pertanto in più righe della medesima tabella riassuntiva. Le percentuali calcolate sul totale degli isolamenti sono, al contrario, additive e sommano al 100%, poiché ciascun isolamento viene conteggiato una sola volta, indipendentemente dal numero di patogeni presenti nel campione di provenienza.

Suddivisione stagionale. Ai fini della valutazione della distribuzione stagionale, la data di conferimento di ciascun campione è stata attribuita a una delle quattro stagioni dell'anno solare, secondo la consueta suddivisione meteorologica: inverno (dicembre-febbraio), primavera (marzo-maggio), estate (giugno-agosto) e autunno (settembre-novembre). Per ciascuna stagione sono state calcolate le frequenze di isolamento dei principali patogeni, espresse sia in valore assoluto sia come percentuale dei campioni valutabili conferiti nella stagione corrispondente.

Analisi statistica di associazione. L'associazione tra la stagione dell'anno e la distribuzione degli agenti eziologici isolati è stata valutata mediante il test del Chi-quadrato (χ^2) di indipendenza, applicato a una tabella di contingenza 9×4 , costruita incrociando nove raggruppamenti patogeni (i principali microrganismi isolati con frequenza rilevante, unitamente a una categoria residuale comprendente i patogeni a bassa frequenza) con le quattro stagioni dell'anno. L'ipotesi nulla assumeva l'indipendenza tra la distribuzione dei patogeni e la stagione di conferimento, mentre l'ipotesi alternativa prevedeva una variazione della composizione eziologica tra i diversi periodi stagionali. Il livello di significatività è stato fissato al 5% ($\alpha = 0,05$). Prima dell'esecuzione del test è stata verificata la condizione di

validità relativa alle frequenze attese, richiedendo che nessuna cella della tabella di contingenza presentasse un valore atteso inferiore a 5; tale condizione è risultata pienamente soddisfatta, con un valore atteso minimo pari a 12,1.

Analisi di sensibilità per il controllo dell'effetto cluster/azienda. Poiché i campioni analizzati non costituiscono osservazioni statisticamente indipendenti, derivando da un numero limitato di aziende (401) con un contributo fortemente disomogeneo alla casistica complessiva, è stata condotta un'analisi di sensibilità volta a controllare il possibile bias legato al conferimento sproporzionato da parte di singole aziende. A tal fine, il dataset è stato aggregato a livello di coppia azienda-stagione, valutando ciascuna azienda una sola volta per ciascuna stagione e per ciascun patogeno considerato, indipendentemente dal numero di campioni effettivamente conferiti in quel periodo. Il test del Chi-quadrato di indipendenza è stato quindi ripetuto sulla tabella di contingenza così ottenuta, secondo le medesime modalità descritte per l'analisi grezza, consentendo il confronto tra i risultati ottenuti a livello di singolo campione e quelli ottenuti a livello di azienda, e la conseguente valutazione del contributo dell'effetto di raggruppamento aziendale alla significatività statistica osservata.

11 Risultati

Descrizione del campione

Tabella 1: Esito dell'esame batteriologico dei campioni di latte bovino, 2025.

	n	%
Campioni processati	11.002	—
Non valutabili (inquinati)	187	1,7
Non valutabili (quantità insufficiente)	2	0,0
Campioni valutabili	10.813	100,0
Positivi	4.813	44,5
– coltura pura (1 patogeno)	4.247	39,3
– coltura mista (≥ 2 patogeni)	566	5,2
Negativi	6.000	55,5
Isolamenti totali	5.385	—
Aziende rappresentate	401	—

Le colture miste corrispondono all'11,8% dei positivi: 560 campioni con due patogeni e 6 con tre.

Prevalenza di isolamento dei patogeni nei campioni analizzati

Tabella 2: prevalenza dei microrganismi isolati (n = 10.813 campioni valutabili; 5.385 isolamenti).

Patogeno	n	% campioni	% isolamenti	Gruppo
Stafilococchi coagulasi-negativi	2.657	24,57	49,34	Minori/opportunisti
<i>Enterococcus</i> spp.	870	8,05	16,16	Ambientali
Stafilococchi coagulasi-positivi	779	7,20	14,47	Contagiosi
<i>Streptococcus uberis</i>	436	4,03	8,10	Ambientali
<i>Corynebacterium</i> spp.	199	1,84	3,70	Minori/opportunisti
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	186	1,72	3,45	Ambientali
<i>Escherichia coli</i>	85	0,79	1,58	Ambientali
<i>Streptococcus agalactiae</i>	68	0,63	1,26	Contagiosi
<i>Proteus</i> spp.	32	0,30	0,59	Ambientali
<i>Bacillus</i> spp.	19	0,18	0,35	Altri
<i>Serratia liquefaciens</i>	10	0,09	0,19	Ambientali
<i>Serratia</i> spp.	10	0,09	0,19	Ambientali
<i>Klebsiella</i> spp.	9	0,08	0,17	Ambientali
Muffe	5	0,05	0,09	Altri
<i>Aerococcus viridans</i>	3	0,03	0,06	Ambientali
Lieviti	3	0,03	0,06	Altri
<i>Pseudomonas</i> spp.	3	0,03	0,06	Ambientali
<i>Lactococcus</i> spp.	2	0,02	0,04	Ambientali
<i>Pasteurella</i> spp.	2	0,02	0,04	Ambientali
Coltura mista non identificata	2	0,02	0,04	Non identificato
<i>Candida albicans</i>	1	0,01	0,02	Altri
<i>Corynebacterium bovis</i>	1	0,01	0,02	Minori/opportunisti
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0,01	0,02	Ambientali
<i>Enterobacteriaceae</i> non identificate	1	0,01	0,02	Non identificato
<i>Streptococcus canis</i>	1	0,01	0,02	Contagiosi
Totale	5.385	49,80	100,00	

Nota: La somma della colonna '% campioni' è pari al 49,80% (superiore alla percentuale di positività complessiva del 44,5%) in quanto i 566 campioni con coltura mista compaiono in più di una riga della tabella.

Tabella 3: Distribuzione degli isolamenti per gruppo epidemiologico (n = 10.813 campioni valutabili; 5.385 isolamenti).

Gruppo epidemiologico	n campioni	% campioni	n isolamenti	% isolamenti
Patogeni minori / opportunisti	2.846	26,32	2.857	53,05
Patogeni ambientali	1.622	15,00	1.649	30,62
Patogeni contagiosi	839	7,76	848	15,75
Altri (non batterici e contaminanti)	27	0,25	28	0,52
Non identificati	3	0,03	3	0,06
Totale isolamenti	—	—	5.385	100,00

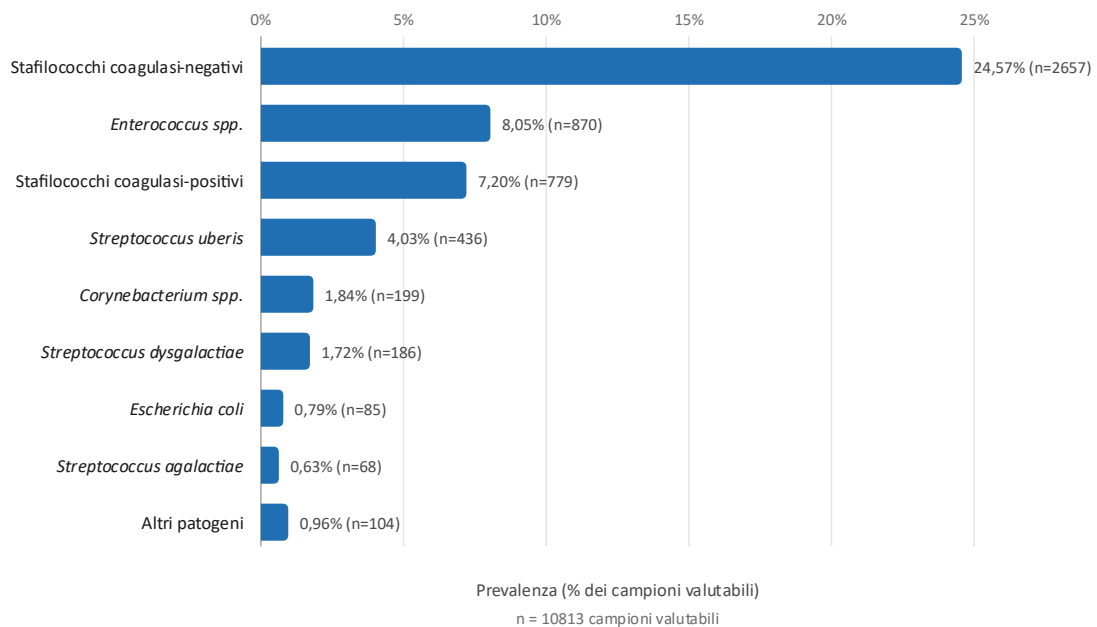
Nota: le percentuali sui campioni non sono additive, poiché un campione con coltura mista sostenuta da patogeni appartenenti a gruppi diversi è conteggiato in più righe; le percentuali sugli isolamenti sono invece additive e sommano a 100.

La classificazione degli isolamenti secondo i tradizionali raggruppamenti epidemiologici (Tabella 3) evidenzia una netta predominanza dei patogeni minori o opportunisti, che rappresentano il 53,05% del totale degli isolamenti e interessano il 26,32% dei campioni valutabili. Seguono i patogeni ambientali, pari al 30,62% degli isolamenti e al 15,00% dei campioni, e i patogeni contagiosi, pari al 15,75% degli isolamenti e al 7,76% dei campioni. I microrganismi non batterici e i contaminanti occasionali costituiscono una quota trascurabile (0,52% degli isolamenti).

L'analisi a livello di allevamento mostra che gli stafilococchi coagulasi-negativi sono stati isolati in 294 delle 401 aziende rappresentate (73,3%), gli stafilococchi coagulasi-positivi in 195 (48,6%), *Streptococcus uberis* in 146 (36,4%) e *Streptococcus agalactiae* in sole 22 aziende (5,5%). Complessivamente, almeno un patogeno contagioso è stato isolato nel 50,1% degli allevamenti.

Figura 14

Prevalenza dei principali patogeni sul totale dei campioni valutabili ($n = 10.813$). La voce "Altri patogeni" raggruppa le specie microbiologiche a bassissima frequenza (104 campioni positivi per un totale di 105 isolamenti).



Distribuzione stagionale

Tabella 4: i campioni e le positività suddivisi nelle quattro stagioni.

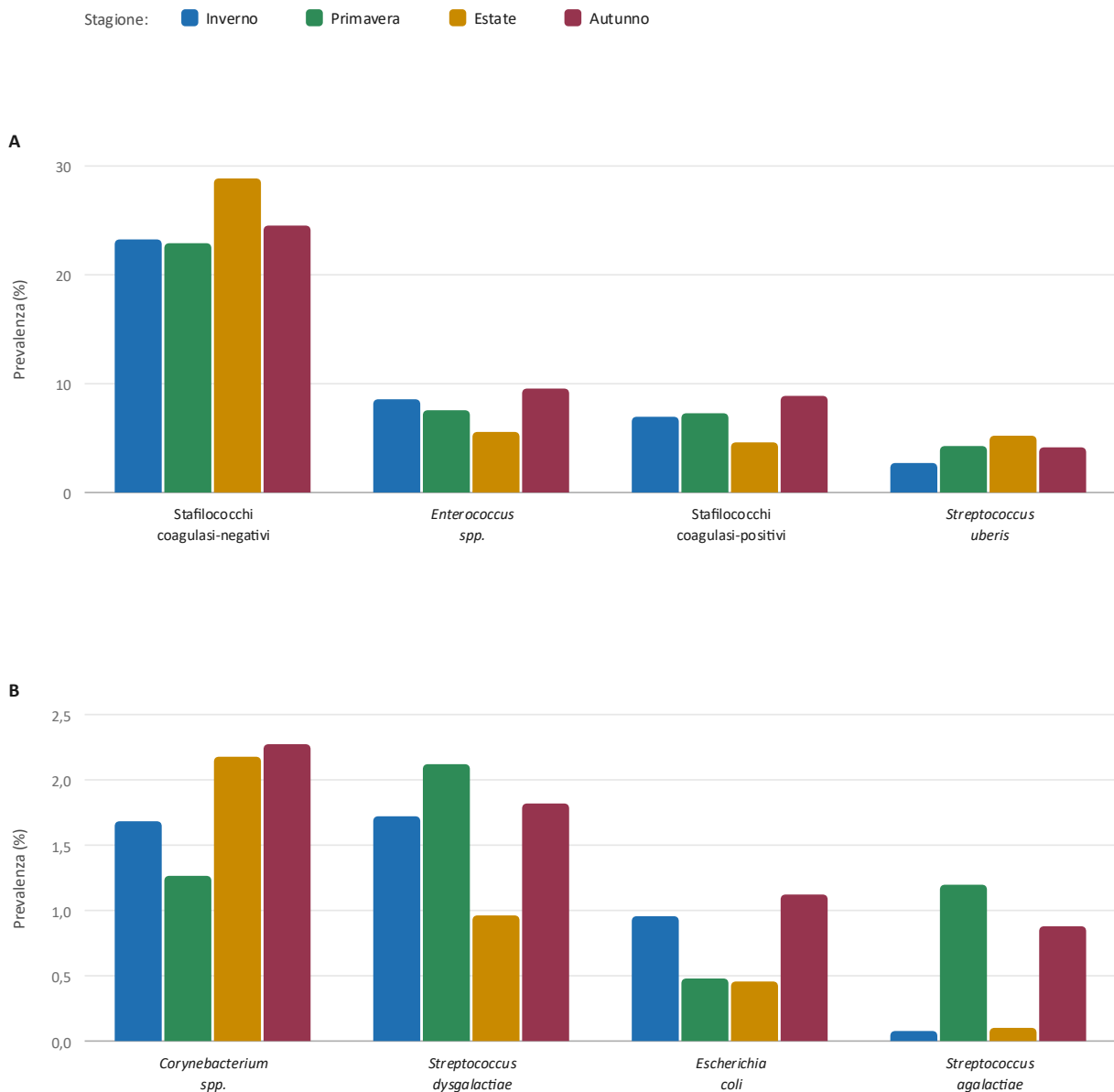
Stagione	Campioni	Positivi	% positivi	Isolamenti	Colture miste
Inverno	2.614	1.118	42,8	1.241	122
Primavera	2.925	1.258	43,0	1.406	147
Estate	1.975	868	43,9	959	90
Autunno	3.299	1.569	47,6	1.779	207
Totale	10.813	4.813	44,5	5.385	566

Tabella 5: Prevalenza dei principali patogeni per stagione, espressa come n (% dei campioni valutabili della stagione).

Patogeno	Inverno (n=2.614)	Primavera (n=2.925)	Estate (n=1.975)	Autunno (n=3.299)
Stafilococchi coagulasi-negativi	608 (23,26)	670 (22,91)	570 (28,86)	809 (24,52)
<i>Enterococcus</i> spp.	224 (8,57)	221 (7,56)	110 (5,57)	315 (9,55)
Stafilococchi coagulasi-positivi	182 (6,96)	213 (7,28)	91 (4,61)	293 (8,88)
<i>Streptococcus uberis</i>	71 (2,72)	125 (4,27)	103 (5,22)	137 (4,15)
<i>Corynebacterium</i> spp.	44 (1,68)	37 (1,26)	43 (2,18)	75 (2,27)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	45 (1,72)	62 (2,12)	19 (0,96)	60 (1,82)
<i>Escherichia coli</i>	25 (0,96)	14 (0,48)	9 (0,46)	37 (1,12)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2 (0,08)	35 (1,20)	2 (0,10)	29 (0,88)
Altri patogeni	40 (1,53)	29 (0,99)	12 (0,61)	24 (0,73)

Figura 15

Analisi a barre raggruppate per stagione, su due pannelli: A per i quattro patogeni più frequenti (scala 0–30%), B per i quattro meno frequenti (scala 0–2,5%). I pannelli A e B della Figura 15 adottano scale differenti per consentire la visualizzazione delle specie a bassa prevalenza

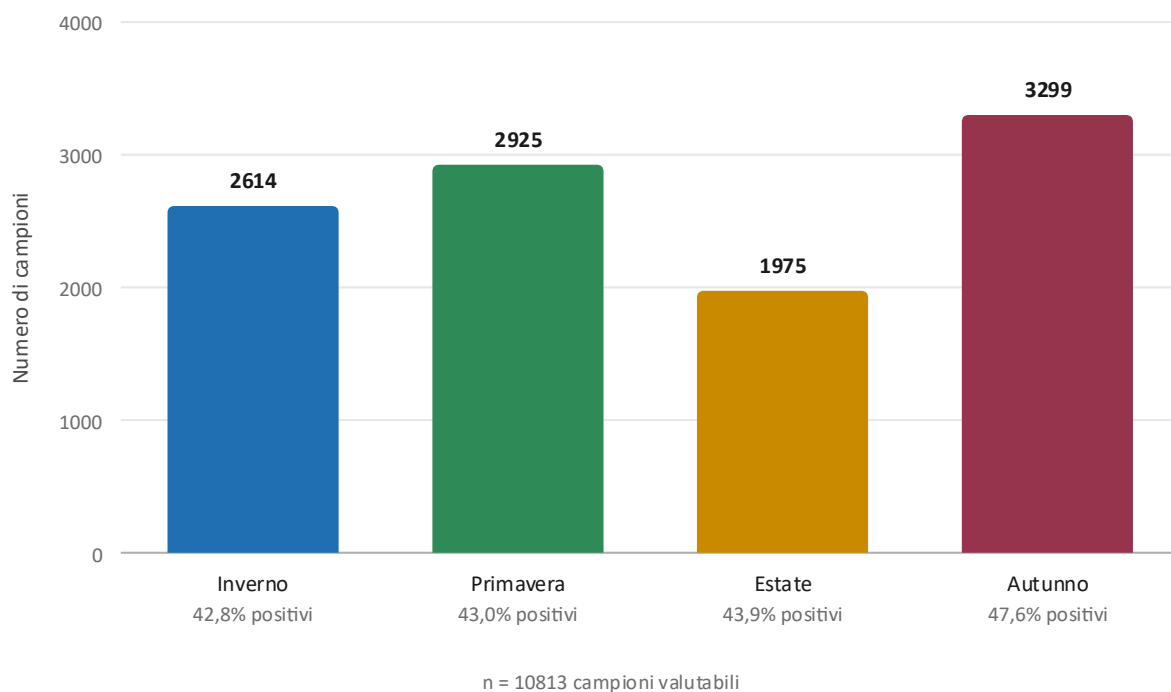


n = 10813 campioni valutabili (Inverno 2614, Primavera 2925, Estate 1975, Autunno 3299). I due pannelli hanno scale diverse.

Distribuzione dei campioni su base stagionale

Figura 16

Grafico a barre del numero di campioni valutabili distribuiti per stagione, con la percentuale di positivi sotto ciascuna.



Analisi statistica

Per valutare l'esistenza di un'associazione tra la stagione dell'anno e la distribuzione degli agenti eziologici isolati, le frequenze di isolamento sono state confrontate tra le quattro stagioni mediante il test del Chi-quadrato (χ^2) d'indipendenza su tabella di contingenza 9×4 (Tabella 6). L'ipotesi nulla (H_0) assume l'indipendenza tra la distribuzione delle specie batteriche e la stagione dell'anno, mentre l'ipotesi alternativa (H_1) prevede una variazione della composizione eziologica tra i diversi periodi stagionali.

Tabella 6: tabella di contingenza (isolamenti, 9×4):

Patogeno	Inverno	Primavera	Estate	Autunno	Totale
Stafilococchi coagulasi-negativi	608	670	570	809	2.657
<i>Enterococcus</i> spp.	224	221	110	315	870
Stafilococchi coagulasi-positivi	182	213	91	293	779
<i>Streptococcus uberis</i>	71	125	103	137	436
<i>Corynebacterium</i> spp.	44	37	43	75	199
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	45	62	19	60	186
<i>Escherichia coli</i>	25	14	9	37	85
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	35	2	29	68
Altri patogeni	40	29	12	24	105
Totale	1.241	1.406	959	1.779	5.385

Tabella 7: test del chi- quadrato

Test	χ^2	gdl	p	Esito
Patogeni × stagione (isolamenti)	167,00	24	$2,16 \times 10^{-23}$	H ₀ respinta
Patogeni × stagione (azienda-stagione)	30,56	24	0,167	H ₀ non respinta
Positività × stagione (campioni)	18,55	3	$3,39 \times 10^{-4}$	H ₀ respinta
Positività × stagione (azienda-stagione)	0,74	3	0,865	H ₀ non respinta

Le condizioni di validità del test del Chi-quadrato sono risultate pienamente rispettate, con un valore atteso minimo di 12,1 e nessuna cella con frequenza attesa inferiore a 5. L'analisi condotta sul totale degli isolamenti ($n = 5.385$) mostra una differenza altamente significativa nella composizione eziologica tra le quattro stagioni ($\chi^2 = 167,00$; $gdl = 24$; $p < 0,001$). L'esame dei residui standardizzati evidenzia scostamenti rilevanti dai valori attesi in particolari periodi dell'anno: in particolare, si osservano frequenze osservate superiori a quelle attese per gli Stafilococchi coagulasi-negativi in estate (+4,45) e per gli *Streptococcus agalactiae* in primavera (+4,09), a fronte di frequenze inferiori all'atteso per gli Stafilococchi coagulasi-positivi in estate (-4,05) e per *S. agalactiae* in inverno (-3,45). Tuttavia, considerando la presenza di misurazioni ripetute provenienti dalle medesime unità aziendali, è stata condotta un'analisi di sensibilità condotta a livello di azienda-stagione (valutando ciascuna azienda una sola volta per stagione). In questa seconda analisi, la significatività statistica decade ($\chi^2 = 30,56$; $gdl = 24$; $p = 0,167$). Analogamente, l'analisi della proporzione di campioni positivi nei diversi periodi stagionali riscontra una significatività nell'analisi grezza sui singoli campioni ($\chi^2 = 18,55$; $gdl = 3$; $p < 0,001$), che tuttavia non trova conferma nell'analisi di sensibilità a livello aziendale ($\chi^2 = 0,74$; $gdl = 3$; $p = 0,865$). In sintesi, pur evidenziando fluttuazioni apparenti nell'analisi condotta a livello di singolo campione, i dati non forniscono evidenza statistica a supporto di una reale variazione stagionale nella prevalenza o nella distribuzione degli agenti eziologici di mastite, suggerendo che le variazioni grezze osservate siano da imputare alla composizione e al volume dei conferimenti delle singole aziende nelle diverse stagioni.

12 Discussione

L'analisi di 10.813 campioni di latte bovino conferiti nel corso del 2025 ha evidenziato una positività complessiva del 44,5%, con l'isolamento di 5.385 microrganismi. Tale valore risulta sostanzialmente in linea con quanto riportato in letteratura per popolazioni di campioni a finalità diagnostica: Ferguson et al. (2007) documentavano, in Sicilia, una prevalenza grezza di infezione intramammaria a livello di bovina del 49,4%, mentre la meta-analisi di Krishnamoorthy et al. (2021) stimava una prevalenza globale di mastite subclinica del 42% (IC 95% 38–45%), con un valore europeo del 37%.

Il dato più rilevante emerso dal presente studio riguarda tuttavia la composizione eziologica. La distribuzione per gruppo epidemiologico mostra infatti una netta predominanza dei patogeni minori o opportunisti (53,05% degli isolamenti), seguiti dai patogeni ambientali (30,62%) e, a distanza considerevole, dai patogeni contagiosi (15,75%). Questo assetto conferma e accentua il trend storico ampiamente documentato nella letteratura italiana ed europea.

Il confronto con le serie storiche dell'IZSLER è particolarmente istruttivo. Bertocchi et al. (2012), analizzando 1.186.148 campioni raccolti tra il 2005 e il 2011, documentavano una progressiva inversione dei rapporti fra i gruppi: la quota dei patogeni contagiosi scendeva dal 47,6% al 29,3%, quella dei patogeni ambientali saliva dal 23,6% al 35,7% e quella dei patogeni minori dal 13,0% al 24,7%. I valori osservati nel presente studio si collocano coerentemente lungo la prosecuzione di queste traiettorie, con i patogeni contagiosi ulteriormente ridotti al 15,75% e i patogeni minori più che raddoppiati rispetto al 2011, fino a divenire il gruppo largamente dominante. In altri termini, il quadro rilevato in provincia di Trento nel 2025 rappresenta lo stadio avanzato del medesimo processo epidemiologico descritto in Lombardia ed Emilia-Romagna nel decennio precedente.

Un riscontro ancora più diretto proviene dallo studio di Bellato et al. (2025), condotto su allevamenti montani dell'Appennino settentrionale, che riporta una gerarchia identica a quella qui osservata: patogeni opportunisti al 42,7%, ambientali al 21,1% e contagiosi al 19,4%. La convergenza fra due contesti montani distinti — l'Appennino settentrionale e l'arco alpino trentino — suggerisce che tale profilo eziologico costituisca una caratteristica ricorrente dei sistemi zootecnici di montagna, verosimilmente legata alle dimensioni aziendali contenute, alla prevalenza della stabulazione fissa e a una minore intensificazione produttiva rispetto agli allevamenti di pianura.

Meno immediato risulta il confronto con i dati decennali di Guaita et al. (2026), che a livello di genere individuano *Staphylococcus* (23,90%) e *Streptococcus* (20,51%) come i gruppi più rappresentati, seguiti da *Enterobacteriaceae* (12,98%), *Enterococcus* (10,85%) e *Prototheca* (9,25%). Nel presente studio il genere *Staphylococcus* raggiunge il 63,81% degli isolamenti, *Enterococcus* il 16,16% e *Streptococcus* il 12,83%, mentre le *Enterobacteriaceae* si fermano al 2,75% e *Prototheca* risulta del tutto assente. Tali differenze non possono essere interpretate come sole divergenze epidemiologiche: esse riflettono in misura sostanziale la diversità dei protocolli diagnostici, poiché lo studio di Guaita si fonda sull'impiego combinato di terreni selettivi (EBA, T.K.T. e Baird-Parker con supplemento RPF) orientati alla ricerca mirata di specifici patogeni, mentre il presente lavoro si basa sull'esame batteriologico standard per mastite. La composizione della popolazione campionata, discussa al paragrafo sui limiti, contribuisce ulteriormente a spiegare tali scostamenti.

Merita una segnalazione specifica l'assenza di *Prototheca* spp., alga non fotosintetica considerata patogeno emergente e riportata da Guaita et al. (2026) con una prevalenza decennale del 9,25%, seppure in netta contrazione (dal 16,21% del 2015 al 4,56% del 2024). Nel presente studio i soli quattro isolamenti di *Prototheca* provenivano da campioni di controllo interlaboratorio, esclusi dall'analisi in quanto non rappresentativi della popolazione in esame. Pur non potendosi escludere una ridotta sensibilità dell'esame colturale standard nei confronti di questo microrganismo, il dato è compatibile con una circolazione effettivamente marginale nel territorio provinciale.

Gli stafilococchi coagulasi-negativi come gruppo dominante

Gli stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) rappresentano il reperto di gran lunga più frequente, essendo stati isolati nel 24,57% dei campioni valutabili e costituendo il 49,34% del totale degli isolamenti; in 2.227 campioni, pari al 46,3% dei positivi, essi risultano l'unico microrganismo isolato. A livello di allevamento, i CNS sono stati identificati nel 73,3% delle aziende rappresentate, a conferma di una diffusione pressoché ubiquitaria.

Tale predominanza è coerente con la natura di questo gruppo. I CNS sono componenti abituali della microflora cutanea, colonizzando il canale del capezzolo, la cute della mammella e altri siti extramammary; il loro isolamento riflette pertanto tanto un'infezione intramammaria effettiva quanto, in una quota non determinabile dei casi, una colonizzazione superficiale o una contaminazione al momento del prelievo. Sono tradizionalmente classificati come patogeni minori, associati prevalentemente a forme subcliniche o a mastiti

cliniche di grado lieve, caratterizzate da un modesto innalzamento della conta cellulare somatica e dall'assenza di sintomatologia sistemica (Taponen & Pyörälä, 2009). La loro elevata frequenza va quindi interpretata come indicatore di pressione infettiva a bassa intensità, e non come misura del carico di malattia clinica.

Il confronto con Ferguson et al. (2007), che riportavano una prevalenza di CNS del 22,6% dei campioni di bovina in Sicilia, mostra una notevole concordanza con il 24,57% qui osservato, a fronte di una prevalenza di *S. aureus* nettamente superiore nello studio siciliano (20,6% contro il 7,20% di stafilococchi coagulasi-positivi del presente lavoro). Il rapporto fra le due componenti del genere *Staphylococcus* si è dunque invertito nell'arco di un ventennio, e tale inversione costituisce probabilmente l'evidenza più eloquente dell'efficacia dei programmi di controllo della mastite contagiosa.

È opportuno segnalare che l'identificazione di specie all'interno del gruppo dei CNS non è stata effettuata in modo sistematico. Poiché le diverse specie presentano comportamenti epidemiologici distinti (*S. chromogenes* risulta associato alle manze e alle bovine in prossimità del parto, *S. simulans* alle infezioni insorte in lattazione avanzata), l'aggregazione in un unico gruppo comporta necessariamente una perdita di informazione. Va inoltre ricordato che l'identificazione fenotipica su base biochimica mostra una concordanza con la genotipizzazione molecolare limitata al 66–75% (Taponen et al., 2006), circostanza che rende la caratterizzazione di specie affidabile solo con metodiche molecolari o spettrometriche.

I patogeni ambientali e le implicazioni sulla gestione dell'ambiente di stabulazione

I patogeni ambientali costituiscono il 30,62% degli isolamenti. All'interno di questo gruppo, *Enterococcus spp.* rappresenta il reperto più frequente (8,05% dei campioni; 16,16% degli isolamenti), seguito da *Streptococcus uberis* (4,03%; 8,10%), *Streptococcus dysgalactiae* (1,72%; 3,45%) ed *Escherichia coli* (0,79%; 1,58%).

La rilevanza di *S. uberis*, isolato nel 36,4% degli allevamenti, è coerente con il ruolo di primo piano che questo patogeno ha assunto nella letteratura recente: Guaita et al. (2026) lo indicano come la specie più frequentemente isolata nel decennio 2015–2024 (13,66%), con un incremento particolarmente marcato, dal 4,33% del 2015 al 22,41% del 2024. Il valore osservato nel presente studio, pur inferiore in termini relativi, conferma la presenza consolidata del patogeno sul territorio provinciale.

Diversamente, la prevalenza di *E. coli* risulta contenuta rispetto ai riferimenti disponibili, che lo collocano fra i patogeni più frequenti (12,23% nel decennio IZSLER secondo Guaita et al., 2026; 8,64% dei campioni nell'indagine serba citata da Bertocchi et al., 2012). Tale differenza trova una spiegazione plausibile nella natura della popolazione campionata: la mastite coliforme si manifesta prevalentemente in forma clinica acuta o iperacuta, con decorso rapido, e viene frequentemente trattata sulla base del quadro clinico senza ricorso all'esame colturale; inoltre, la *clearance* batterica spontanea può rendere negativo il campione anche in presenza di infezione. Una casistica costituita in larga prevalenza da campioni raccolti nell'ambito di programmi di monitoraggio della qualità del latte tende quindi a sottostimare sistematicamente i patogeni a decorso acuto.

Sul piano gestionale, la predominanza congiunta di patogeni ambientali e opportunisti indirizza gli interventi verso l'igiene dell'ambiente di stabulazione più che verso il controllo della trasmissione durante la mungitura. I patogeni ambientali colonizzano la mammella a partire dalla lettiera, dal suolo e dalle deiezioni (Bellato et al., 2025) e penetrano attraverso il canale del capezzolo, in particolare nella fase immediatamente successiva alla mungitura, quando il canale rimane pervio per circa una o due ore (Cobirka et al., 2020). Ne discende che le misure prioritarie riguardano la qualità e il rinnovo del materiale di lettiera, la pulizia e il dimensionamento delle cuccette, la gestione dell'asportazione delle deiezioni, il drenaggio e la ventilazione degli ambienti, nonché l'adozione di accorgimenti che scoraggino il decubito immediato degli animali dopo la mungitura. L'impiego di condizionatori batterici per la lettiera si è dimostrato in grado di migliorarne la qualità microbiologica con conseguente riduzione della conta cellulare somatica del latte. A differenza delle forme contagiose, controllabili efficacemente mediante programmi di igiene della mungitura e terapia della messa in asciutta, i patogeni ambientali rappresentano una sfida persistente, poiché la loro presenza nell'ambiente di stabulazione non è eliminabile in modo completo (Cobirka et al., 2020).

I patogeni contagiosi residui

I patogeni contagiosi, pur riducendosi al 15,75% degli isolamenti, non sono scomparsi e mantengono una rilevanza sanitaria che il solo dato aggregato tende a mascherare. Gli stafilococchi coagulasi-positivi rappresentano il 7,20% dei campioni e sono stati isolati nel 48,6% degli allevamenti, mentre *Streptococcus agalactiae* interessa lo 0,63% dei campioni ma si concentra in sole 22 aziende, pari al 5,5% di quelle rappresentate.

Il dato relativo a *S. agalactiae* merita una lettura attenta. La sua prevalenza a livello di mandria (5,5%) è comparabile con il 2,0% riportato da Soltau et al. (2017), che già segnalavano come questo agente, storicamente considerato il patogeno contagioso per eccellenza, sia divenuto relativamente raro rispetto ad altri. Il contrasto con il dato storico italiano è netto: nella provincia di Brescia, nel 1974, il 93% degli allevamenti presentava problemi di infezione mammaria da *S. agalactiae* (Bertocchi et al., 2012). La concentrazione degli isolamenti in un numero ristretto di aziende riflette la biologia stessa del microrganismo, il cui serbatoio è rappresentato dalla ghiandola mammaria delle bovine infette e la cui trasmissione avviene tipicamente durante la mungitura, attraverso il latte infetto veicolato dalle mani dei mungitori, dai materiali per la pulizia o dai componenti dell'impianto (Cobirka et al., 2020). Ne consegue che, nel caso in cui il patogeno si insedia, tende a interessare una quota elevata di animali della mandria, configurando un problema di allevamento più che di singolo capo.

Analoga considerazione vale per gli stafilococchi coagulasi-positivi, presenti in quasi metà degli allevamenti esaminati. In proposito occorre precisare che, nella presente casistica, la tipizzazione di specie non è stata condotta in modo sistematico: *Staphylococcus aureus* è stato identificato come tale in un numero esiguo di casi, a fronte di 779 campioni positivi per stafilococchi coagulasi-positivi. Il dato è stato pertanto trattato a livello di gruppo, e come tale va confrontato con la letteratura. Il valore osservato risulta comunque inferiore sia al 20,6% riportato da Ferguson et al. (2007) sia alla prevalenza di mandria del 70,6% documentata da Soltau et al. (2017).

Sul piano operativo, la persistenza dei patogeni contagiosi in una quota non trascurabile di allevamenti giustifica il mantenimento delle misure classiche di controllo: ordine di mungitura con gli animali infetti munti per ultimi, impiego di guanti monouso e di materiale monouso per la detersione, disinfezione post-mungitura dei capezzoli, manutenzione e verifica periodica dell'impianto di mungitura, riforma selettiva dei soggetti cronicamente infetti e, sul versante della biosicurezza, controllo batteriologico degli animali di nuova introduzione. Va inoltre considerato che anche i sistemi di mungitura automatizzata, pur contribuendo al benessere animale, devono essere valutati quale potenziale vettore di trasmissione nonostante le procedure di pulizia e disinfezione applicate fra le mungiture (Guaita et al., 2026).

L'assenza di una reale variazione stagionale e l'effetto del raggruppamento aziendale

L'analisi della distribuzione stagionale costituisce, sul piano metodologico, l'aspetto più significativo del presente lavoro. Il test del chi-quadrato condotto sulla tabella di contingenza 9×4 relativa ai 5.385 isolamenti ha evidenziato una differenza altamente significativa nella composizione eziologica fra le quattro stagioni ($\chi^2 = 167,00$; gdl = 24; $p < 0,001$), con residui standardizzati di entità rilevante in corrispondenza di specifiche combinazioni patogeno-stagione. Un'interpretazione immediata di tale risultato porterebbe a concludere in favore dell'esistenza di una dinamica stagionale degli agenti eziologici della mastite.

Tale conclusione, tuttavia, non risulta sostenibile. Il test del chi-quadrato presuppone l'indipendenza delle osservazioni, condizione non soddisfatta nel presente dataset: i 5.385 isolamenti provengono da 4.813 campioni positivi, dei quali 566 hanno fornito due o tre microrganismi, e soprattutto l'insieme dei campioni si distribuisce su sole 401 aziende, con una mediana di 10 campioni per allevamento e un massimo di 590 campioni conferiti da una singola azienda, pari al 5,5% dell'intera casistica. I campioni provenienti dal medesimo allevamento condividono management, condizioni ambientali, routine di mungitura e patogeni circolanti, e non possono pertanto essere trattati come osservazioni indipendenti. Ripetendo l'analisi a livello di azienda-stagione, ossia conteggiando ciascun allevamento una sola volta per stagione e per patogeno, la significatività statistica viene meno in modo netto ($\chi^2 = 30,56$; gdl = 24; $p = 0,167$). Il medesimo comportamento si osserva per la proporzione di campioni positivi, significativa nell'analisi condotta sui singoli campioni ($\chi^2 = 18,55$; gdl = 3; $p < 0,001$) e priva di significatività in quella per azienda-stagione ($\chi^2 = 0,74$; gdl = 3; $p = 0,865$). Il fenomeno si presenta in modo sistematico per tutti i patogeni esaminati, senza eccezioni.

Il meccanismo sottostante è illustrato con particolare chiarezza dal caso di *S. agalactiae*: i 35 isolamenti primaverili provengono da 10 sole aziende e i 29 autunnali da altre 10, delle quali una ne fornisce da sola 10. Non si tratta pertanto di una stagione che favorisce la circolazione del patogeno, bensì di un ristretto numero di allevamenti infetti che hanno conferito campioni in determinati periodi dell'anno. Analogamente, l'allevamento più rappresentato ha conferito 220 campioni in inverno e 64 in primavera, cosicché il proprio profilo sanitario influenza in misura sproporzionata e del tutto arbitraria il dato stagionale complessivo.

Le fluttuazioni osservate nei dati grezzi sono dunque riconducibili a un *bias* di conferimento, ossia alla diversa composizione aziendale e al diverso volume dei campioni inviati al laboratorio nelle varie stagioni, e non a dinamiche epidemiologiche stagionali della

popolazione bovina provinciale. Questa conclusione presenta un duplice valore. Sul piano sostanziale, essa indica che nel contesto esaminato non emerge evidenza di una stagionalità degli agenti eziologici, diversamente da quanto talora riportato in letteratura per i patogeni ambientali in relazione a temperatura e umidità. Sul piano metodologico, essa richiama l'attenzione su un limite che interessa potenzialmente un'ampia parte degli studi epidemiologici basati su casistiche di laboratorio: in assenza di un controllo per il raggruppamento aziendale, l'analisi condotta sul singolo campione produce errori standard sottostimati e valori di p artificialmente ridotti, con conseguente rischio di attribuire significato biologico a differenze di natura puramente strutturale.

È utile precisare che l'analisi qui adottata consiste in una verifica di sensibilità mediante aggregazione dei dati a livello di azienda-stagione, e non nella stima di un modello a effetti misti. L'impiego di un modello lineare generalizzato con effetto casuale di allevamento consentirebbe di quantificare direttamente la correlazione intraclasse e di stimare l'effetto stagionale al netto della variabilità fra aziende, e rappresenta il naturale sviluppo metodologico del presente lavoro. Va inoltre rilevato che l'assenza di significatività non equivale alla dimostrazione dell'assenza di un effetto: la riduzione della numerosità conseguente all'aggregazione comporta necessariamente una minore potenza statistica, e un effetto stagionale di entità modesta potrebbe non essere rilevabile con la casistica disponibile.

Limiti dello studio

Il principale limite del presente lavoro risiede nella natura non probabilistica del campione. I dati analizzati derivano da campioni conferiti spontaneamente al laboratorio a fini diagnostici e non da un piano di campionamento casuale della popolazione bovina provinciale. La popolazione effettivamente rappresentata è pertanto quella dei soggetti per i quali allevatore o veterinario hanno ritenuto opportuno l'accertamento batteriologico, tipicamente animali con conta cellulare somatica elevata, con anamnesi di mastite o inseriti in programmi di monitoraggio, e non l'insieme delle bovine da latte allevate sul territorio. Le prevalenze riportate devono conseguentemente essere interpretate come frequenze di isolamento nei campioni analizzati e non come stime di prevalenza della mastite nella popolazione.

Tale limite è accentuato dalla concentrazione dei conferimenti: l'82,6% dei campioni proviene da un unico richiedente, con finalità di monitoraggio della qualità del latte, circostanza che orienta la casistica verso le forme subcliniche e contribuisce a spiegare sia

la predominanza dei patogeni opportunisti sia la sottorappresentazione dei patogeni a decorso clinico acuto. La marcata disomogeneità nella distribuzione dei campioni fra aziende, già discussa, comporta inoltre che il quadro complessivo rifletta in misura sproporzionata la situazione sanitaria di pochi allevamenti.

Ulteriori limiti riguardano il livello di dettaglio delle informazioni disponibili. L'unità di analisi è il campione e non l'animale: non essendo disponibile un identificativo individuale della bovina né l'indicazione del quarto mammario, non è possibile distinguere campioni ripetuti dallo stesso soggetto, né calcolare prevalenze a livello di capo o di quarto secondo l'impostazione adottata da Soltau et al. (2017). Non sono inoltre disponibili la conta cellulare somatica, lo stadio di lattazione, l'ordine di parto e la distinzione fra forma clinica e subclinica, elementi che la letteratura indica come determinanti significativi della prevalenza (Krishnamoorthy et al., 2021; Morales-Ubaldo et al., 2023).

Sul piano diagnostico, l'esame batteriologico standard per mastite non comprende la ricerca di *Mycoplasma bovis*, che richiede terreni e condizioni colturali specifiche: la prevalenza di questo patogeno contagioso emergente non è pertanto valutabile nel presente studio. L'identificazione, inoltre, è stata condotta prevalentemente a livello di genere o di gruppo, in particolare per gli stafilococchi, il che limita la confrontabilità con studi basati su identificazione di specie. Infine, l'1,7% dei campioni è risultato non valutabile per contaminazione; sebbene tale quota sia contenuta, essa rappresenta una perdita di informazione non necessariamente casuale, potendo riflettere condizioni di prelievo meno accurate in specifici contesti aziendali.

Implicazioni gestionali e uso razionale degli antimicrobici

I risultati ottenuti presentano ricadute concrete su tre piani distinti.

Sul piano della gestione sanitaria aziendale, il profilo eziologico rilevato indica che il baricentro del problema si è spostato dalla trasmissione durante la mungitura all'igiene dell'ambiente e alla protezione della cute del capezzolo. La predominanza di opportunisti cutanei e patogeni ambientali suggerisce di concentrare gli interventi sulla qualità della lettiera, sulla pulizia delle cuccette, sulla corretta preparazione pre-mungitura e sulla disinfezione post-mungitura, senza tuttavia dismettere le misure di controllo delle forme contagiose, che restano necessarie in circa metà degli allevamenti e indispensabili nel 5,5% che ospita *S. agalactiae*. Il fatto che i patogeni contagiosi si concentrino in un numero ristretto di aziende suggerisce inoltre l'opportunità di un approccio differenziato, con

protocolli intensivi riservati agli allevamenti effettivamente interessati anziché misure uniformi su tutto il territorio.

Sul piano dell'uso prudente degli antimicrobici, la caratterizzazione eziologica costituisce il presupposto della terapia mirata. L'adozione di protocolli di terapia selettiva della mazzetta in asciutta (*selective dry cow therapy*, SDCT), che riserva il trattamento antibiotico alle sole bovine o ai soli quarti con infezione intramammaria accertata in sostituzione della *blanket dry cow therapy*, dipende in modo sostanziale dalla disponibilità di informazione diagnostica affidabile (Tommasoni et al., 2023). In tale prospettiva, il riscontro che quasi la metà dei campioni positivi risulti sostenuta esclusivamente da stafilococchi coagulasi-negativi assume particolare rilievo: si tratta di microrganismi associati a forme subcliniche o cliniche lievi e caratterizzati da tassi di guarigione batteriologica complessivamente favorevoli (Taponen & Pyörälä, 2009), per i quali un trattamento antimicrobico sistematico risulta spesso non giustificato. La conoscenza del profilo eziologico aziendale consente pertanto di orientare la selezione dei soggetti da trattare in asciutta e di ridurre la pressione selettiva complessiva, obiettivo riconosciuto come prioritario nell'ambito del paradigma *One Health* e delle strategie di *antimicrobial stewardship* promosse da WOAH e WHO (Khan et al., 2026). Tale approccio assume ulteriore rilevanza alla luce dell'evidenza che il test di sensibilità in vitro su batteri in forma planctonica costituisce un predittore incompleto dell'esito clinico (Ban-Cucerzan et al., 2026), circostanza che rende la prevenzione preferibile alla correzione terapeutica.

Sul piano del monitoraggio territoriale, infine, il presente studio dimostra il valore informativo dei dati diagnostici di routine, purché sottoposti a un'adeguata elaborazione. La disponibilità di serie storiche consente di seguire l'evoluzione del quadro eziologico e di verificare l'efficacia delle strategie di controllo adottate, come documentato dalle esperienze pluriennali dell'IZSLER (Bertocchi et al., 2012; Guaita et al., 2026). L'esperienza qui condotta suggerisce tuttavia due condizioni per un impiego corretto di tali dati: la registrazione sistematica dell'identificativo aziendale, indispensabile per il controllo dell'effetto di raggruppamento, e l'integrazione con informazioni di contesto quali conta cellulare somatica, identificativo dell'animale e distinzione fra forme cliniche e subcliniche. L'arricchimento del flusso informativo in queste direzioni consentirebbe di trasformare l'attività diagnostica di routine in un vero e proprio strumento di sorveglianza epidemiologica territoriale.

13 Conclusioni

Il presente studio, condotto su 10.813 campioni di latte bovino conferiti nel 2025 al laboratorio dell'IZSve di Trento, restituisce un quadro eziologico della mastite bovina coerente con la traiettoria epidemiologica documentata a livello italiano ed europeo. La netta predominanza di patogeni minori/opportunisti (53,05% degli isolamenti) e ambientali (30,62%) rispetto ai contagiosi (15,75%, pur presenti in circa metà degli allevamenti) conferma che il baricentro del problema si è spostato dalla trasmissione durante la mungitura all'igiene dell'ambiente di stabulazione e alla protezione della cute del capezzolo.

Un contributo metodologico rilevante riguarda la distribuzione stagionale: la significatività statistica osservata a livello di singolo campione ($\chi^2=167,00$; $p<0,001$) decade una volta corretta per l'effetto cluster-azienda ($\chi^2=30,56$; $p=0,167$), a dimostrazione che le fluttuazioni apparenti riflettono la disomogenea distribuzione dei conferimenti fra allevamenti piuttosto che una reale dinamica stagionale dei patogeni. Tale evidenza richiama l'attenzione, più in generale, sulla necessità di considerare la struttura gerarchica dei dati negli studi epidemiologici basati su casistiche diagnostiche di routine.

Sul piano operativo, la caratterizzazione eziologica ottenuta supporta l'adozione di protocolli di terapia selettiva della messa in asciutta e un approccio differenziato, con misure di controllo intensive riservate agli allevamenti effettivamente interessati da patogeni contagiosi. I limiti legati alla natura non probabilistica del campione e all'assenza di dati individuali suggeriscono, come sviluppo futuro, l'impiego di modelli a effetti misti e l'integrazione con informazioni cliniche e di conta cellulare, così da trasformare l'attività diagnostica di routine in un vero strumento di sorveglianza epidemiologica territoriale.

14 Bibliografia

- Abdi, R.D.; Gillespie, B.E.; Ivey, S.; Pighetti, G.M.; Almeida, R.A.; Dego, O.K. Antimicrobial Resistance of Major Bacterial Pathogens from Dairy Cows with High Somatic Cell Count and Clinical Mastitis. *Animals* 2021
- Ali A, Rehman MU, Mushtaq S, Ahmad SB, Khan A, Karan A, Bashir Wani A, Ganie SA, Mir MUR. Biochemical and Computational Assessment of Acute Phase Proteins in Dairy Cows Affected with Subclinical Mastitis. *Curr Issues Mol Biol.* 2023
- An R, Gao M, Meng Y, Tong X, Chen J, Wang J. Infective mastitis due to bovine-associated *Streptococcus dysgalactiae* contributes to clinical persistent presentation in a murine mastitis model. *Vet Med Sci.* 2021
- Antognoli, V.; Presutti, L.; Bovo, M.; Torreggiani, D.; Tassinari, P. Computer Vision in Dairy Farm Management: A Literature Review of Current Applications and Future Perspectives. *Animals* 2025
- Askari S, Zomorodi AR, Aflakian F. Alternative treatment candidates to antibiotic therapy for bovine mastitis in the post-antibiotic era: a comprehensive review. *Microb Pathog.* 2025
- Ban-Cucerzan A, Morar A, Tîrziu E, Bucur IM, Popa SA, Imre K. Bovine Mastitis Therapy at a Crossroads: Pharmacokinetic Barriers, Biofilms, Antimicrobial Resistance, and Emerging Solutions. *Pharmaceuticals (Basel).* 2026
- Bellato A, Bergagna S, Moriconi M, Whitaker SH, Traverso F, Mannelli A. Prevalence of intramammary infection pathogens in dairy herds of the Northern Apennine mountains, Italy. *J Dairy Res.* 2025
- Bertocchi L, Vismara F, Hathaway T, Fusi F, Scalvenzi A, Bolzoni G, Zanardi G, Varisco G. Evoluzione dell'eziologia della mastite bovina nel Nord Italia dal 2005 al 2011. *Large Anim Rev.* 2012
- Blowey, R., & Edmondson, P. *Mastitis control in dairy herds (2nd ed.)*. (2010).
- Bruckmaier RM, Wellnitz O. TRIENNIAL LACTATION SYMPOSIUM/BOLFA: Pathogen-specific immune response and changes in the blood-milk barrier of the bovine mammary gland. *J Anim Sci.* 2017

Büthe T, Jessberger N, Schneider B, Kreienbrock L, Plötz M. Occurrence of mastitis pathogens in cow's milk samples from the Hanover region, north-western Germany - an overview of routine laboratory data from 2005 to 2023. *Vet Res Commun*. 2025

Cobirka M, Tancin V, Slama P. Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals (Basel)*. 2020

Danzelle C, Cunha P, Noletto PG, Gilbert FB, Santos KR, Staub C, Pinard A, Deslis A, Barbey S, Germon P, De Craene JO, Rainard P, Blondel M, Martins RP. *Saccharomyces cerevisiae* as a platform for vaccination against bovine mastitis. *Vaccine*. 2024

de Souza Ferreira, L., Showemimo, T., Juliano, L. B., Rodriguez, Z., & Ruegg, P. L. *Use of MALDI-TOF to identify cryopreserved mastitis pathogens collected from 2003 to 2011 that were originally identified using conventional microbiological methods. JDS Communications* 2025

Elhaig MM, El-Tarabili RM, Wahdan A. A report of coagulase-negative *Staphylococci* from clinically incurable cases of bovine mastitis: prevalence, biofilm formation, and resistance profile. *Iran J Vet Res*. 2024

Ferguson JD, Azzaro G, Gambina M, Licitra G. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *J Dairy Sci*. 2007

Fessia AS, Odierno LM. Potential factors involved in the early pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis: a review. *Folia Microbiol*. 2021

Gelgie AE, Desai SE, Gelalcha BD, Kerro Dego O. *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy cattle. *Front Vet Sci*. 2024

Gelgie AE, Desai SE, Gelalcha BD, Kerro Dego O. *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy cattle. *Front Vet Sci*. 2024

Goulart DB, Mellata M. *Escherichia coli* Mastitis in Dairy Cattle: Etiology, Diagnosis, and Treatment Challenges. *Front Microbiol*. 2022

Guaita, A.; Paterlini, F.; Posante, A.; Boldini, M.; Rolfi, C.; Daminelli, P. Monitoraggio decennale dei batteri responsabili della mastite bovina nell'Italia settentrionale e valutazione della resistenza antimicrobica nel latte crudo. *Microorganisms* 2026

- Hassan J, Bag MAS, Ali MW, Kabir A, Hoque MN, Hossain MM, Rahman MT, Islam MS, Khan MSR. Diversity of *Streptococcus* spp. and genomic characteristics of *Streptococcus uberis* isolated from clinical mastitis of cattle in Bangladesh. *Front Vet Sci*. 2023
- Haxhiaj, K.; Wishart, D.S.; Ametaj, B.N. Mastitis: What It Is, Current Diagnostics, and the Potential of Metabolomics to Identify New Predictive Biomarkers. *Dairy* 2022.
- Hiitiö H, Riva R, Autio T, Pohjanvirta T, Holopainen J, Pyörälä S, Pelkonen S. Performance of a real-time PCR assay in routine bovine mastitis diagnostics compared with in-depth conventional culture. *J Dairy Res*. 2015
- Huang, Y.; Chen, P.; Cao, H.; Zhou, Z.; Xu, T. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Bovine Mastitis in Northern Jiangsu Province and Correlation to Drug Resistance and Biofilm Formability. *Animals* 2024
- Islam, M. A., Islam, M. Z., Islam, M. A., Rahman, S. M., & Islam, M. T. Prevalence of subclinical mastitis in dairy cows in selected areas of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* (2011).
- Jahan NA, Godden SM, Royster E, Schoenfuss TC, Gebhart C, Timmerman J, Fink RC. Evaluation of the matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system in the detection of mastitis pathogens from bovine milk samples. *J Microbiol Methods*. 2021
- Jaswal, S.; Jena, M.K.; Anand, V.; Jaswal, A.; Kancharla, S.; Kolli, P.; Mandadapu, G.; Kumar, S.; Mohanty, A.K. Critical Review on Physiological and Molecular Features during Bovine Mammary Gland Development: Recent Advances. *Cells* 2022.
- Jember TF, Westman ME, Pant SD, Ghorashi SA. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Detection of Bacterial Bovine Mastitis: A Systematic Review. *Vet Med Sci*. 2026
- Kabelitz T, Aubry E, van Vorst K, Amon T, Fulde M. The Role of *Streptococcus* spp. in Bovine Mastitis. *Microorganisms*. 2021
- Kazemzadeh S, Korneeva O, Shabunin S, Syromyatnikov M. Antibiotic resistance in mastitis-causing bacteria: Exploring antibiotic-resistance genes, underlying mechanisms, and their implications for dairy animal and public health. *Open Vet J*. 2025

Khan MZ, Ullah A, Qadeer A, Alsharif KF, Alzahrani FM, Alzahrani KJ, Ma Q, Abuderman A, Wang C. Probiotics as Sustainable Alternatives to Mitigate Antibiotic Resistance in Bovine Mastitis Management. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2026

Kobayashi K. Culture Models to Investigate Mechanisms of Milk Production and Blood-Milk Barrier in Mammary Epithelial Cells: a Review and a Protocol. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2023.

Kour S, Sharma N, N B, Kumar P, Soodan JS, Santos MVD, Son YO. Advances in Diagnostic Approaches and Therapeutic Management in Bovine Mastitis. *Vet Sci*. 2023

Krishnamoorthy P, Goudar AL, Suresh KP, Roy P. Global and countrywide prevalence of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle and buffaloes by systematic review and meta-analysis. *Res Vet Sci*. 2021

Krömker V. Mastite nelle bovine da latte e analisi dei fattori di rischio. *Large Animal Review*. 2008

Laterza, G.; Meroni, G.; Soggiu, A.; Martino, P.A.; Sora, V.M.; Zaghen, F.; Bonizzi, L.; Colombo, L.; Zecconi, A. Bovine Clinical *E. coli* Mastitis in Italian Dairy Herds Is Not Associated with a Specific Pathotype. *Pathogens* 2025

Li H, Wang Z, Barkema HW, Li X, Song D, Ren M, Tong J, Liu M, Gao J and Cheng J Virulence factors of bovine mastitis pathogens: distribution, pathogenesis, and emerging vaccines targeting virulence factors: a literature review. 2026

Miotti C, Cicotello J, Suarez Archilla G, Neder V, Alvarado Lucero W, Calvinho L, Signorini M, Camussone C, Zbrun MV, Molineri AI. Antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis: Systematic review and meta-analysis. *Res Vet Sci*. 2023

Monistero V, Graber HU, Pollera C, Cremonesi P, Castiglioni B, Bottini E, Ceballos-Marquez A, Lasso-Rojas L, Kroemker V, Wente N, Petzer IM, Santisteban C, Runyan J, Veiga Dos Santos M, Alves BG, Piccinini R, Bronzo V, Abbassi MS, Said MB, Moroni P. *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis in Eight Countries: Genotypes, Detection of Genes Encoding Different Toxins and Other Virulence Genes. *Toxins (Basel)*. 2018

Morales-Ubaldo AL, Rivero-Perez N, Valladares-Carranza B, Velázquez-Ordoñez V, Delgadillo-Ruiz L, Zaragoza-Bastida A. Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. *Vet Anim Sci*. 2023

- Mori S, Kurumisawa T, Kawai M, Shinozuka Y, Kawai K. Effect of marbofloxacin and cefazolin concentrations and bacterial count on lipopolysaccharide (LPS) release by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from bovine clinical mastitis. *J Vet Med Sci*. 2026
- Özdemir FN. Lactic acid bacteria derived postbiotic preparations disrupt biofilm architecture of mastitis-related pathogens in vitro. *Microb Pathog*. 2026
- Panchal J, Patel A, Patel S, Goswami D. Understanding mastitis: Microbiome, control strategies, and prevalence - A comprehensive review. *Microb Pathog*. 2024
- Park HR, Hong MK, Hwang SY, Park YK, Kwon KH, Yoon JW, Shin S, Kim JH, Park YH. Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* related to bovine mastitis. *Acta Vet Hung*. 2014
- Piepers S, De Meulemeester L, de Kruif A, Opsomer G, Barkema HW, De Vliegher S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J Dairy Res*. 2007
- Ramuada, M., Tyasi, T. L., Gumede, L., & Chitura, T.. *A practical guide to diagnosing bovine mastitis: a review. Frontiers in Animal Science* (2024)
- Rutten C, Velthuis A, Steeneveld W, H. Hogeveen. **Invited review: Sensors to support health management on dairy farms** *Journal of Dairy Science*, 2013
- Ryman VE, Packiriswamy N, Sordillo LM. Ruolo delle cellule endoteliali nella salute e nelle malattie della ghiandola mammaria bovina. *Animal Health Research Reviews*. 2015.
- Sani MI, Voort MV, Tekinerdogan B, Hogeveen H. - Invited Review - Application of precision livestock farming: challenges and opportunities. *Anim Biosci*. 2026
- Savić, N. R., Mikulec, D. P., & Radovanović, R. S. Somatic cell counts in bulk milk and their importance for milk processing. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 2017
- Schauer B, Wald R, Urbantke V, Loncaric I, Baumgartner M. Tracing Mastitis Pathogens- Epidemiological Investigations of a *Pseudomonas aeruginosa* Mastitis Outbreak in an Austrian Dairy Herd. *Animals (Basel)*. 2021

Sgorbini, M., Bonelli, F., Fratini, F., Sbrana, A., Brombin, M., Meucci, V., Corazza, M., Ebani, V.V., Bertelloni, F., Turchi, B., Gatta, D., & Cerri, D. Diagnosi delle mastiti bovine: test di screening e batteriologia a confronto e loro indice predittivo. (2014).

Sharun K, Dhama K, Tiwari R, Gugjoo MB, Iqbal Yatoo M, Patel SK, Pathak M, Karthik K, Khurana SK, Singh R, Puvvala B, Amarpal, Singh R, Singh KP, Chaicumpa W. Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Vet Q.* 2021

Silva, S.R.; Araujo, J.P.; Guedes, C.; Silva, F.; Almeida, M.; Cerqueira, J.L. Precision Technologies to Address Dairy Cattle Welfare: Focus on Lameness, Mastitis and Body Condition. *Animals* **2021**

Soltau JB, Einax E, Klengel K, Katholm J, Failing K, Wehrend A, Donat K. Within-herd prevalence thresholds for herd-level detection of mastitis pathogens using multiplex real-time PCR in bulk tank milk samples. *J Dairy Sci.* 2017

Stanek, P.; Żółkiewski, P.; Januś, E. A Review on Mastitis in Dairy Cows Research: Current Status and Future Perspectives. *Agriculture* 2024.

Stanek, P.; Żółkiewski, P.; Januś, E. A Review on Mastitis in Dairy Cows Research: Current Status and Future Perspectives. *Agriculture* 2024

Sterrett e Bewley, s.d.
<https://afs.mqcafe.uky.edu/dairy/using-farm-culturing-system-identify-mastitis-causing-pathogens>

Taponen S, Pyörälä S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet Microbiol.* 2009

Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen HD, Pyörälä S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet Microbiol.* 2006.

Tomanić D, Božin B, Kladar N, Stanojević J, Čabarkapa I, Stilinović N, Apić J, Božić DD, Kovačević Z. Environmental Bovine Mastitis Pathogens: Prevalence, Antimicrobial Susceptibility, and Sensitivity to *Thymus vulgaris* L., *Thymus serpyllum* L., and *Origanum vulgare* L. Essential Oils. *Antibiotics* (Basel). 2022

- Tommasoni, C.; Fiore, E.; Lisuzzo, A.; Giancesella, M. Mastitis in Dairy Cattle: On-Farm Diagnostics and Future Perspectives. *Animals* 2023, 13, 2538
- Tong X, Barkema HW, Nobrega DB, Xu C, Han B, Zhang C, Yang J, Li X, Gao J. Virulence of Bacteria Causing Mastitis in Dairy Cows: A Literature Review. *Microorganisms*. 2025
- Touaitia R, Ibrahim NA, Touati A, Idres T. *Staphylococcus aureus* in Bovine Mastitis: A Narrative Review of Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Advances in Detection Strategies. *Antibiotics* (Basel). 2025
- Yu, W.; Zhang, Z.; Wang, Z.; Lin, X.; Dong, X.; Hou, Q. Comprehensive Prevention and Control of Mastitis in Dairy Cows: From Etiology to Prevention. *Vet. Sci.* **2025**
- Zhu S, Bian S, Lu J, Wang Y, Iqbal M, Kiani FA, Dong H, Zhang X, Yuan Z, Liu F, Li A. Pathogenesis of Bovine Mastitis and Influence of the Gut Microbiota: A Review. *J Agric Food Chem.* 2026.