

Mastiti bovine: metodi innovativi per il controllo in campo

Quaderni della Ricerca
n. 161 - Giugno 2014



Regione Lombardia
Agricoltura

Sperimentazione condotta nell'ambito del progetto di ricerca n. 1745
"Applicazione di sistemi molecolari innovativi per il controllo in campo delle mastiti bovine" (MastField)
finanziato con il Programma Regionale di ricerca in campo agricolo 2010-2012 di Regione Lombardia.

Testi a cura di:

Mario Luini ⁽⁵⁾, Bianca Castiglioni ⁽⁴⁾, Rossana Capoferri ⁽³⁾, Fausto Vezzoli ⁽⁵⁾, Paola Cremonesi ⁽⁴⁾, Renata Piccinini ⁽⁶⁾,
Emanuele Capra ⁽⁴⁾, Stefano Biffani ⁽²⁾, Marcello Del Corvo ⁽²⁾, Andrea Pedretti ⁽²⁾, Giulietta Minozzi ⁽²⁾, John Williams ⁽²⁾

Coordinamento editoriale:

Davide Ederle ⁽²⁾, Marco Menga ⁽²⁾

Progetto grafico:

Stefano Mario Canti ⁽²⁾, Davide Ederle ⁽²⁾

Foto a cura di:

Luciana Colombo, Lucio Zanini, Janice Haney Carr, CDC/ Matthew J. Arduino, DRPH, SXCphoto

Hanno realizzato le attività sperimentali:

(1) Consorzio di Ricerca e Sperimentazione degli Allevatori (CRSA) - AIA

Sede legale: via Tomassetti 9, 00161 Roma - Tel. 02 76111101 / Fax 02.76111108

Referente: Cesare Bonacina - E-mail: cesare.bonacina@istitutospallanzani.it

(2) Parco Tecnologico Padano srl (PTP)

Via Einstein - Loc. Cascina Codazza, 26900 Lodi - Tel. 0371 4662200 / Fax 0371 4662217

Referente: John Williams - E-mail: john.williams@tecnoparco.org

(3) Istituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani" (ISILS)

Località "La Quercia", 26027 Rivolta d'Adda (Cremona) - Tel. 0363 78883 / Fax 0363 371021

Referente: Cesare Bonacina - E-mail: cesare.bonacina@istitutospallanzani.it

(4) Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (CNR-IBBA)

Via Einstein - Loc. Cascina Codazza, 26900 Lodi - Tel. 0371 4662505 / Fax 0371 4662501

Referente: Bianca Castiglioni - E-mail: casti@ibba.cnr.it

(5) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Umbertini" (IZSLER)

Sezione di Lodi, via Einstein - Loc. Cascina Codazza, 26900 Lodi - Tel. 0371.439354/ Fax 0371.438043

Referente: Mario Vittorio Luini - E-mail: mariovittorio.luini@izsler.it

(6) Università degli Studi di Milano - Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica (DIVET)

Via dell'Università 6, 26900 Lodi - Tel. 02 50318069 / Fax 02 50318079

Referente: Renata Piccinini - E-mail: renata.piccinini@unimi.it

(7) Associazione Regionale Allevatori della Lombardia (ARAL)

Via Kennedy 30, 26013 Crema - Tel. 0373 89701 / Fax 0373 81582

Referente: Vittorio Cacciatori - E-mail: v.cacciatori@aral.lom.it

*Si ringraziano gli allevatori, i veterinari e i tecnici SATA (Servizio di Assistenza Tecnica agli Allevamenti)
che hanno collaborato allo svolgimento del progetto:*

Lucio Zanini, Rosangela Garlappi, Carla Cattaneo e Giorgio Oldani

Per Informazioni:

Regione Lombardia - Direzione Generale Agricoltura

U.O. Sviluppo di innovazione, cooperazione e valore delle produzioni

Struttura Sviluppo e promozione delle produzioni, ricerca, innovazione tecnologica e servizi alle imprese

Piazza Città di Lombardia n.1 - 20124 Milano

Tel: +39.02.6765.3790 fax +39.02.6765.8056

e-mail: agri_ricerca@regione.lombardia.it

Referente: Elena Brugna, Giovanna Praderio e Gianpaolo Bertoncini

e-mail: elena_brugna@regione.lombardia.it



Mastiti bovine: metodi innovativi per il controllo in campo

Quaderni della Ricerca
n. 161 - Giugno 2014

Indice

Presentazione	5
Abstract	6
Sintesi	7
Capitolo 1 - La mastite negli allevamenti	8
Premessa	9
La mastite	9
Problematiche legate alle mastiti	10
Il patogeno <i>S. aureus</i>	13
Selezione di animali maggiormente resistenti alla mastite	14
Capitolo 2 - Il progetto MastField	18
Obiettivi	19
Partner	19
Articolazione della ricerca	20
Allevamenti coinvolti	21
Capitolo 3 - Fattori di resistenza genetica alla mastite	22
Identificazione della popolazione di validazione	23
Raccolta campioni biologici, scelta dei marcatori e genotipizzazione	26
Validazione dei polimorfismi	27
Messa a punto di un pannello per l'analisi genetica	27
Capitolo 4 - Marcatori molecolari per <i>S. aureus</i>	30
Selezione degli allevamenti	31
Caratterizzazione molecolare dei ceppi di <i>S. aureus</i>	32
Analisi comparativa dei risultati ottenuti	37
Pannello diagnostico MastField	38
Altri obiettivi	39
Conclusioni	42
Bibliografia	46

Presentazione

Il latte e tutta la sua filiera rappresentano un elemento caratterizzante dell'agroalimentare italiano. In questo panorama gioca un ruolo di primo piano Regione Lombardia con le sue 6.500 stalle di bovini da latte, tra cui 3.500 aziende specializzate e un parco di sole frisone che supera i 500.000 capi, con una produttività media annua per capo che sfiora i 100 quintali/anno, capace di coprire da sola il 40% dell'intera produzione nazionale. Questa eccellenza produttiva rappresenta la base su cui sono nati alcuni dei più importanti prodotti DOP del nostro agroalimentare, oltre che un traino per l'innovazione dell'intera filiera, dalla mangimistica all'industria lattiero-casearia. Un'innovazione che deve consentire ai nostri allevatori di produrre un latte di alta qualità e sanità e allo stesso tempo di poter vedere remunerato il loro lavoro.

Senza dubbio la mastite, oggetto di questo quaderno, rappresenta oggi uno dei problemi più rilevanti dell'allevamento delle bovine da latte, impattando sia sul benessere animale e sulla qualità del prodotto latte, sia sul reddito dell'allevatore a causa dei costi per la gestione veterinaria della patologia, senza considerare le perdite causate dall'uscita anticipata delle bovine dal ciclo produttivo. Sostenendo il progetto "Applicazione di sistemi molecolari innovativi per il controllo in campo delle mastiti bovine - MASTFIELD", Regione Lombardia ha voluto rafforzare le azioni di ricerca sulla mastite. In questa pubblicazione sono raccolti e presentati i risultati di tre anni di sperimentazione.

In particolare i risultati del progetto offrono agli allevatori da un lato l'opportunità di disporre di un sistema innovativo, basato su marcatori molecolari, per selezionare animali che presentano valori costantemente alti o bassi di cellule somatiche, misura correntemente usata come indicatore di mastite; dall'altro un sistema diagnostico rapido in grado di identificare direttamente in allevamento tra i ceppi del batterio *Staphylococcus aureus*, responsabile della patologia, quelli maggiormente patogeni e diffusivi, per una lotta più mirata, tempestiva ed efficace.

Direzione Generale Agricoltura
Regione Lombardia

Abstract

A major problem for dairy farmers is mastitis, an inflamatory disease of the udder. The disease causes health problems and also reduces production. Mastitis presents both as a clinical disease and as a sub-clinical disease which is difficult to detect.

The Mastfield project used two distinct, but complementary, approaches to study mastitis in Lombardy dairy farms in order to reduce disease incidence. The project has tested genetic markers associated with somatic cell score, which is correlated with the presence of mastitis. In addition the project has established procedures and diagnostic tests, for individual animals or bulk milk, in order to distinguish between more or less contagious strains of *Staphylococcus aureus*, the most diffused mastitis pathogen.

Objective 1 - Genetic factor associated with mastitis resistance
Results from the first objective have facilitated:
<ul style="list-style-type: none">- The contribution of environmental factors, identifying large effects of the day of sampling an the farm which explain 50% and 30% of the variation observed respectively;- The estimation of the reduction in production associated with somatic cell score which is equivalent to € 0.2 per day for each point in the linear score for multi-parous cows;- The validation of 26 genetic markers (SNPs, Single Nucleotide Polymorphism) with respect to the association with SSC (Somatic Cell Count), of which 10 had a significant effect, with the first 6 explaining 3.5% of the genetic variation. Among these significant markers one was in the gene DGAT1 which is associated with difference in the fat content of milk and milk yield. The allele of DGAT1 associated with reduced SCC was also associated with increased milk yield;- The development of a low cost assay to genotype these markers.

Objective 2 - Molecular markers for <i>S. aureus</i> detection
The second objective of the Mastfield project has:
<ul style="list-style-type: none">- Allowed the comparison of diverse systems (RS-PCR, Multiplex-PCR, MLST, IDENTIBAC-MRSA, Ribotyping, PFGE, Proteomics) to evaluate the pathogenicity of <i>S. Aureus</i> present in farms and to evaluate the ease of use and costs of each approach;- Identified that RS-PCR is a diagnostic method that is realatively simple and cost effective (about €10) to accurately identify the presence of high (group B) virulence strains of <i>S. aureus</i> in farms;- Developed a new diagnostic panel of 8 markers and an associated software, that can identify with better than 90% accuracy, the presence of contagious <i>S. aureus</i> in a farm.

Sintesi

Uno dei problemi più rilevanti nell'allevamento delle bovine da latte è la mastite, patologia infiammatoria che colpisce l'apparato mammario delle bovine e che è in grado di creare problematiche sanitarie e produttive anche in presenza di forme sub-cliniche.

L'attività del progetto Mastfield ha utilizzato due approcci metodologici distinti, ma complementari, per studiare negli allevamenti lombardi come ridurre l'incidenza della mastite nelle bovine da latte. Nell'ambito del progetto sono stati validati, su bovine di razza Frisona allevate in Lombardia, marcatori genetici associati alla presenza di alti valori di Conta delle Cellule Somatiche (CCS), un valido indicatore indiretto di resistenza o suscettibilità alle mastiti. Contemporaneamente, è stato messo a punto un test per il riconoscimento diretto di ceppi altamente diffusivi di *S. aureus*, il più importante e diffuso patogeno intramammario.

Obiettivo 1 - Fattori di resistenza genetica alla mastite
Il primo obiettivo del progetto ha consentito di:
<ul style="list-style-type: none">- Pesare l'importanza relativa dei diversi effetti ambientali sulla CCS, sottolineando come abbiano un effetto preponderante il giorno di prelievo per l'analisi e i fattori aziendali nel loro complesso (i quali da soli sono in grado di spiegare rispettivamente il 50% e il 30% dell'intera variabilità ambientale legata alla CCS (Figura 3.2));- Stimare le perdite produttive in relazione alla CCS su bovine primipare e pluripare. La perdita in termini economici è stimabile in 0,2€/giorno per ogni punto di Linear Score (Tabella 3.1) per le bovine primipare, 0,4€/giorno per ogni punto di Linear Score per le pluripare (Figura 3.5);- Validare 26 marcatori molecolari (SNP) per la loro correlazione con la CCS identificandone 10 con un ruolo significativo sul carattere. I primi 6 di questi risultano essere responsabili del 3,5% della variabilità osservabile sul carattere (Figura 3.7). Uno di questi risulta collegato al gene DGAT1 che è collegato al contenuto in grasso e alla produzione di latte. L'allele di DGAT1 collegato ad una conta inferiore delle cellule somatiche risulta inoltre collegato anche a una maggior produzione di latte;- Sviluppare un test, del costo di poche decine di Euro, che consente di conoscere l'assetto di questi marcatori nelle bovine da latte.

Obiettivo 2 - Marcatori molecolari per <i>S. aureus</i>
Il secondo obiettivo del progetto ha consentito di:
<ul style="list-style-type: none">- Mettere a confronto diversi metodi di genotipizzazione per una rapida classificazione dei ceppi di <i>S. aureus</i> (RS-PCR, PCR Multiplex, MLST, IDENTIBAC-MRSA, Ribotipizzazione, PFGE, MALDI-TOF) isolati da mastite e verificarne attendibilità, semplicità di utilizzo oltre che costi operativi;- Identificare nel metodo RS-PCR un metodo diagnostico semplice ed economico (costo stimato di 10 Euro) che, classificando i ceppi di <i>S. aureus</i> in genotipi, permette di accertare la presenza di ceppi patogeni ed altamente diffusivi (Genotipo B) negli allevamenti;- Sviluppare un nuovo metodo predittivo, basato su 8 marcatori molecolari e un software dedicato, che consente di classificare un ceppo di <i>S. aureus</i> presente in stalla come patogeno e altamente diffusivo con una probabilità pari o superiore al 90%.

La mastite negli allevamenti

Premessa

A livello nazionale, il settore del bovino da latte ricopre un ruolo di primaria importanza. Con 50.337 allevamenti e circa 1.895 realtà operanti nel settore industriale è, infatti, al primo posto per volume di fatturato tra i settori dell'agroalimentare. **Solo in Lombardia gli allevamenti di bovine di razza Frisone sono 3.465, per un totale di 535.000 capi** e una produzione di 9.675 kg di latte per capo (dati ANAFI 2012). L'allevamento del bovino da latte, oltre alla rilevanza economica per il settore agroalimentare, ricopre un ruolo strategico per importanti processi produttivi quali l'industria mangimistica e l'industria lattiero casearia.

Tra i fattori che contribuiscono ad assegnare al latte e ai suoi derivati un ruolo di primo piano non vanno dimenticati i moderni stili di consumo, i numerosi marchi DOP legati al territorio, la domanda internazionale di prodotti made in Italy e la costante richiesta di latte fresco da parte dei consumatori. Non mancano criticità, dovute in particolare ad un aumento dei costi di produzione non compensato da un adeguato aumento dei ricavi. Tale situazione ha reso più fragile questo settore produttivo. **In Lombardia, dove si produce il 40% del latte italiano, in buona parte destinato alla trasformazione di formaggi tipici DOP**, la ricaduta economica di tali problematiche è stata sentita maggiormente rispetto ad altre regioni italiane a minore vocazione zootecnica. Considerate le esigenze del mercato e la fragilità dell'economia aziendale, **gli interventi per l'allevamento dovrebbero porsi come principali obiettivi una diminuzione dei costi di produzione a livello aziendale e una maggiore qualità e sanità del latte prodotto.**

In questo contesto, **assume un notevole significato strategico ed economico il controllo delle mastiti**, uno dei problemi più rilevanti nell'allevamento delle bovine da latte. La patologia infiammatoria colpisce l'apparato mammario dell'animale, provocando ricadute molto negative dal punto di vista economico sui bilanci aziendali. I costi dovuti alla mastite non si limitano infatti solo agli interventi sanitari, ma incidono anche a livello qualitativo e quantitativo sulla produzione di latte. Ulteriori costi sono dovuti alla gestione e all'eliminazione anticipata degli animali infetti. Tutti questi aspetti si inseriscono, inoltre, nell'ambito di un contesto europeo orientato verso una maggiore attenzione nei confronti del benessere animale e una riduzione dell'uso di farmaci in stalla, in particolare antibiotici. Di conseguenza la risoluzione delle problematiche legate alla mastite assume un interesse prioritario nell'allevamento del bovino da latte italiano.

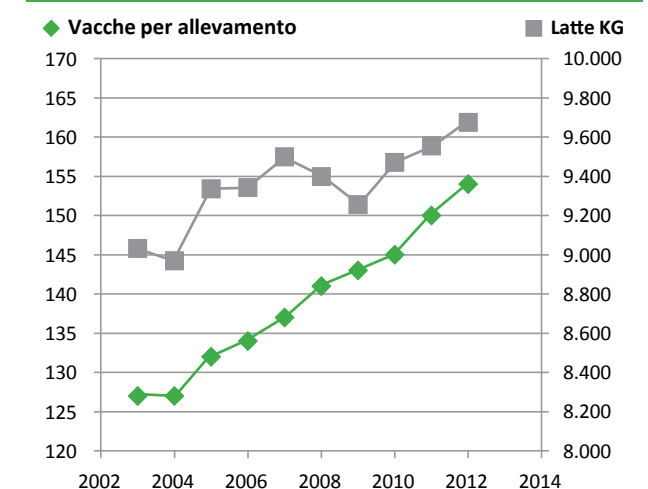
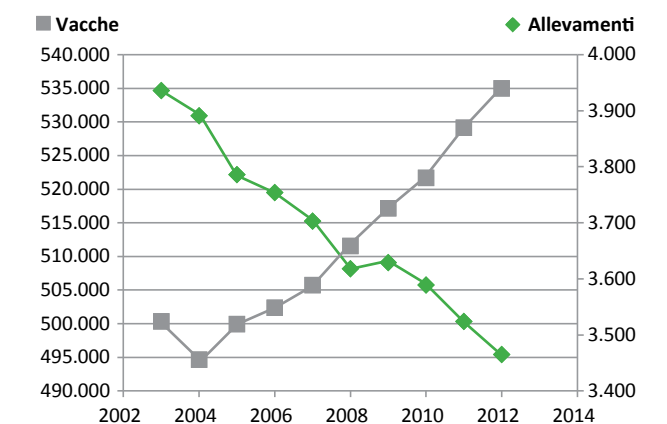
In Italia è stato stimato che, **in caso di mastite, la perdita di produzione può ammontare a 1,8 quintali per lattazione, con costi variabili tra i 50 e i 350 Euro**

all'anno per capo, in base all'entità dell'infezione. Il latte derivato da bovine affette da mastite clinica non può essere commercializzato, mentre, in caso di mastiti subcliniche, presenta parametri qualitativi più bassi con conseguenze negative sulla stabilità ai trattamenti termici di pastorizzazione e sterilizzazione e sulla resa alla caseificazione.

La mastite

La mastite è una delle principali problematiche nell'allevamento della bovina da latte, sia per la frequenza con cui si presenta, sia per l'elevata incidenza dal punto di vista produttivo ed economico. La mammella è l'organo più sottoposto a "stress funzionale" nella bovina da latte: da una parte sintetizza tutti i componenti del

Figura 1.1



I numeri dell'allevamento delle bovine da latte in Lombardia

Numero capi allevati: 535.000

Dimensione media aziendale: 254 capi

Valore della produzione media aziendale: 252.350 Euro
(Istat. 6° Censimento generale dell'agricoltura)

latte a partire dalle molecole presenti nella circolazione sanguigna, dall'altra subisce una manipolazione meccanica quotidiana dovuta alla mungitura. Per rispondere a questi stress possiede diversi meccanismi naturali di difesa in particolare contro microorganismi che possono causare infezione.

La prima barriera è rappresentata dal tessuto cheratinizzato che circonda il canale del capezzolo e, in particolare, dall'attività del muscolo dello sfintere che mantiene l'orifizio capezzolare chiuso nell'intervallo tra le mungiture. Quando i microrganismi riescono a penetrare nel canale del capezzolo e ad arrivare nella cisterna, la successiva linea di difesa è rappresentata dai leucociti, nello specifico dai granulociti neutrofili; questi, insieme ai linfociti, ai macrofagi e ad una piccola percentuale di cellule epiteliali derivanti dallo sfaldamento del tessuto ghiandolare mammario, compongono le cellule somatiche del latte. **In un animale sano, il valore normale di cellule somatiche è inferiore a 100.000 cellule/mL. Quando subentra un'infezione, il numero di tali cellule aumenta drasticamente** a causa dell'arrivo di granulociti. Queste cellule svolgono il compito di fagocitare ed eliminare il patogeno.

In molti casi la mastite è subclinica ed è caratterizzata soltanto da un aumento delle cellule somatiche, in assenza di sintomatologia evidente. Si calcola che per ogni mastite clinica vi siano dieci mastiti subcliniche. In relazione alla gravità dello stato infiammatorio, si determina una riduzione della funzionalità ghiandolare,

Box 1.1 - Fattori della patologia

AMBIENTE

OSPITE

PATOGENI

La mastite è una patologia multifattoriale, la cui insorgenza e gravità è il risultato di una complessa interazione tra:

- Aspetti ambientali e gestionali dell'allevamento
- Caratteristiche di resistenza dell'animale
- Azione dei patogeni responsabili dell'insorgenza della malattia

che si traduce in una produzione di latte ridotta, o addirittura azzerata, come conseguenza di:

- Alterazioni patologiche della permeabilità delle membrane di scambio fra il circolo sanguigno e la mammella;
- Riduzione dell'attività di sintesi da parte del tessuto secretorio;
- Distruzione delle strutture cellulari della mammella.

L'aumento delle cellule somatiche e i fattori di virulenza dei microrganismi patogeni determinano così una serie di alterazioni della composizione del latte, quali la diminuzioni di lattosio, caseina e grasso, mentre la quantità totale di proteine cambia solo leggermente per effetto del contemporaneo incremento delle immunoglobuline. Questo perchè sia le tossine batteriche, sia i mediatori dell'infiammazione, possono danneggiare le cellule mammarie secernenti, e ridurre la sintesi e la secrezione dei costituenti del latte, con conseguente scadimento della sua qualità e un decremento della resa alla trasformazione. **Le conseguenze sull'efficienza produttiva delle bovine possono permanere anche dopo la regressione della malattia.**

Dal punto di vista legislativo, il regolamento (CE) n. 853/2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, nella sezione IX (latte crudo e prodotti lattiero-caseari trasformati), pone dei limiti per garantire sia la sanità degli animali, e specificatamente della mammella, sia le caratteristiche igienico-sanitarie del latte. Nel dettaglio, in base alla normativa, **il latte bovino di massa (raccolto in un unico allevamento) deve avere un valore della conta delle cellule somatiche (CCS) inferiore a 400.000 cell/mL e una carica batterica totale inferiore a 100.000 UFC/mL.**

Problematiche legate alle mastiti

La mastite si traduce in una riduzione della produzione latte, uno scadimento della qualità, una perdita economica e un rischio sanitario per il consumatore.

Perdite produttive

Numerosi ricercatori hanno studiato le conseguenze degli stati infiammatori della mammella, già da alcuni anni sono disponibili dati che stimano le perdite produttive in base al contenuto in cellule somatiche del latte per singola bovina. In media, **la perdita di latte in caso di mastiti cliniche è di circa il 5% sull'intera lattazione** (Tabella 1.2). La mastite bovina ha inoltre un costo diretto di cura che

comprende gli interventi veterinari, i farmaci necessari per il trattamento, la manodopera per la loro applicazione, il latte non vendibile per la presenza di residui di farmaci e che deve essere scartato nel rispetto dei tempi di sospensione, le analisi di laboratorio, l'eventuale morte di animali colpiti da forme acute, i danni alla mammella. Una valutazione di queste spese su allevamenti del Nord Italia ha prodotto una **stima dei costi tra i 42 e i 120 Euro per singolo caso, per una media di 75 Euro, a cui si devono aggiungere le perdite di produzione stimate in circa 140 e 223 Euro**, rispettivamente per lattazione effettiva e prevista. Altri dati indicano impatti economici anche superiori (Tabella 1.1). Uno studio effettuato in alcune aziende lombarde ha quantificato la perdita di latte prodotto. A seconda della dimensione dell'allevamento le perdite andavano dai 158 litri/vacca/anno in allevamenti con più di 100 capi, ai 198 litri/vacca/anno in allevamenti con meno di 50 capi. Considerando il prezzo del latte € 0,3357/L, **il danno economico era compreso tra 5.000 € e 6.600 € per vacca per anno.**

Le perdite, seppur meno evidenti, più diffuse e di maggiore frequenza sono quelle causate dalla **mastite subclinica**, per la quale è invece più complesso quantificare i costi. In questo caso, infatti, le perdite sono solitamente più nascoste e indirette, come ad esempio la perdita del premio (il pagamento del latte in base alla qualità) per l'eccessivo tenore in cellule somatiche, un parametro utilizzato non solo per valutare la qualità del latte, ma anche come indicatore di mastite. Esistono in ogni caso dati che indicano un impatto significativo sulle produzioni anche in presenza di

Tabella 1.1	
Impatto economico 2009	
(€/kg di latte)	0,13
Perdite per latte scartato (€/kg di latte)	0,18
Costo degli antibiotici (€/trattamento)	35
Costo della visita veterinaria (€/visita)	26
Costo del lavoro (€/h)	20
Costi per mastite clinica (€/caso)	208
Costi per le bovine riformate (€/vacca)	480
Conseguenze delle mastiti cliniche	
Perdite produttive (% per lattazione)	5
Durata del trattamento (giorni)	3
Tempi di sospensione addizionali (giorni)	3
Visite veterinarie (% per mastiti cliniche)	5
Riforme (% per mastiti cliniche)	15
Fonte: T.J.G.M. Lam et al. 2013	

Tabella 1.2				
RELAZIONE TRA NUMERO DI CELLULE SOMATICHE NEL LATTE E PERDITA DI PRODUZIONE				
LS	MEDIA CCS	INTERVALLO CCS	PERDITA LATTE (KG/LATTAZIONE)	
			PRIMA	SUCC.
0	12.500	0 - 17.000	0	0
1	25.000	18.000 - 34.000	0	0
2	50.000	35.000 - 70.000	0	0
3	100.000	71.000 - 140.000	90	180
4	200.000	141.000 - 282.000	180	360
5	400.000	283.000 - 565.000	270	540
6	800.000	566.000 - 1.130.000	360	720
7	1.600.000	1.131.000 - 2.262.000	450	900
8	3.200.000	2.263.000 - 4.525.000	540	1.080
9	6.400.000	> 4.526.000	630	1.260
LS = Linear Score. È indice del numero di cellule somatiche del latte. È stato introdotto per poter lavorare meglio da un punto di vista statistico ma anche, più praticamente, per fornire agli allevatori un sistema di punteggio più immediato. CCS = Numero di celle somatiche.				

mastiti subcliniche. Per questo è estremamente importante intervenire a diversi livelli, in modo sinergico e interdisciplinare, per ridurre la diffusione di questa malattia.

Come già accennato, **il parametro più utilizzato per valutare le mastiti è la conta delle cellule somatiche (CCS)** che possono variare in modo significativo a seconda dello stato di salute degli animali. I valori possono andare dalle poche decine di migliaia per millilitro a diversi milioni negli animali malati. **La CCS viene spesso rappresentata per comodità con una scala logaritmica che va da 0 a 9 e che prende il nome di Linear Score (LS)** (Tabella 1.2).

In generale la CCS presenta una dinamica caratteristica con incrementi nel periodo caldo insieme a un calo produttivo e una progressiva riduzione autunnale e invernale (Figura 1.3). Ciò è dovuto soprattutto alla combinazione tra l'aumento di infezioni mammarie e di stress della bovina che si riflette sulla funzionalità mammaria tipica dei periodi più caldi. Dai rilevamenti compiuti da IZSLER negli ultimi anni, il valore medio annuale di CCS appare in progressiva riduzione sebbene miglioramenti significativi e duraturi per questo parametro siano tutt'altro che semplici e rapidi da ottenere da parte degli allevatori (Figura 1.5). Inoltre l'ottenimento di miglioramenti significativi appare via via più difficile al decrescere dei valori medi complessivi registrati.

Rischi per la salute pubblica

Il latte mastitico pone anche un problema sanitario. **Alcuni batteri coinvolti nelle mastiti possono causare patologie anche gravi nell'uomo.** Nonostante la pastorizzazione consenta l'eliminazione di tutti i microrganismi patogeni,

Figura 1.2

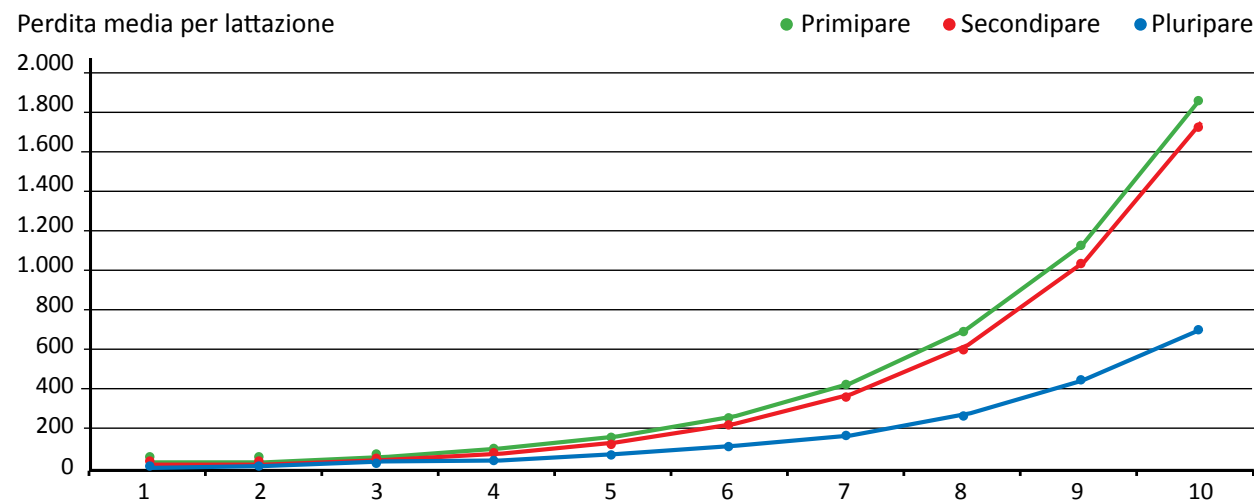


Figura 1.3

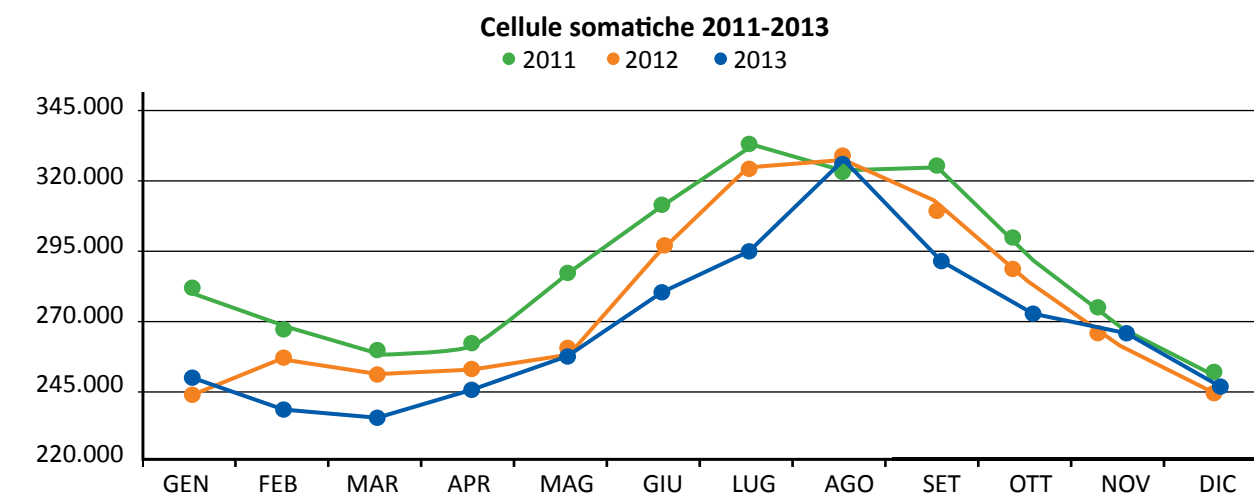
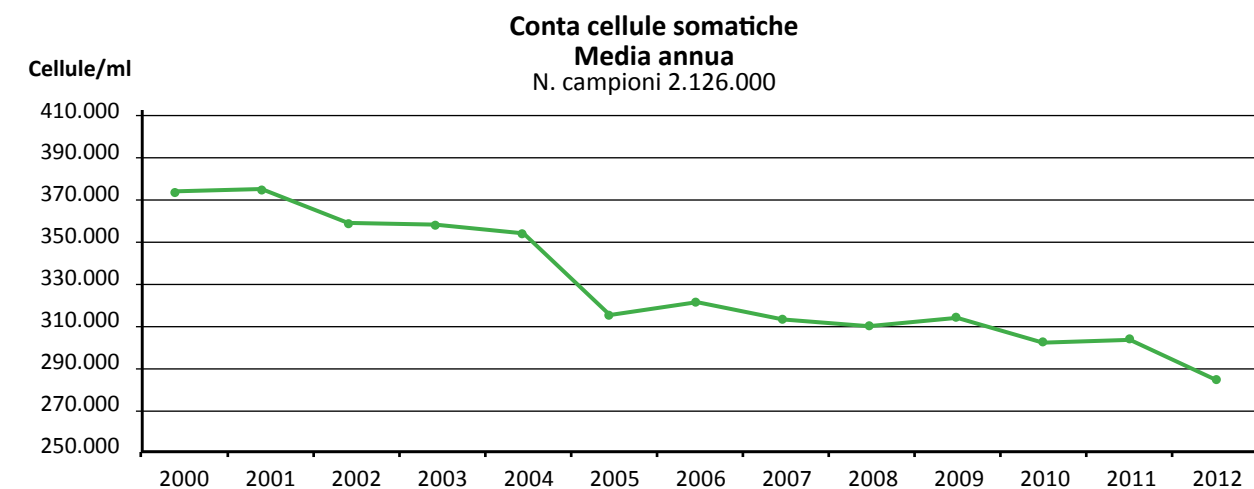


Figura 1.4

Box 1.4 - Batterio: *Staphylococcus aureus*

Tassonomia: il genere *Staphylococcus* (dal greco stafùle: grappolo e coccus: acino) appartiene alla famiglia delle *Micrococcaceae* e comprende cocci Gram positivi del diametro di 0.5-1 mm, non mobili e aerobi facoltativi.

Storia: nel 1884, per la prima volta Rosenbach descrisse due tipi diversi di colonie isolate dalla cute, una bianca, che chiamò *Staphylococcus albus*, l'altra gialla a cui diede il nome di *Staphylococcus aureus*.

Patogenesi e trasmissione: l'infezione avviene sempre attraverso il canale del capezzolo. *Staphylococcus aureus* è un batterio contagioso, che si trasmette da un animale all'altro tramite le mani del mungitore, la macchina mungitrice contaminata, e, sia pure in misura minore, la lettiera infetta. Fattori di virulenza e patogenicità possono indurre una risposta infiammatoria e un decorso dell'infezione differente.

Fattori di virulenza: proteasi, fosfolipasi e lipasi, clumping factor, coagulasi libera, termonucleasi, catalasi, ialuronidasi, stafilocinasi, betalattamasi.

Fattori tossici: enterotossine, toxic shock syndrome toxin-1, leucocidine, esfoliatine, emolisine.

Sintomatologia: nella maggioranza dei casi la mastite è di tipo subclinico e cronicizza interessando tutta la lattazione e, in caso di mancata guarigione durante il periodo dell'asciutta, la lattazione successiva.

Diagnosi: la diagnosi si basa sull'esame batteriologico del latte preferibilmente da singoli quarti, in quanto il patogeno si trova spesso nel latte in carica molto bassa, addirittura inferiore al limite di rilevamento delle normali tecniche batteriologiche.

Prevenzione e controllo: si basa sull'identificazione degli animali infetti e sulla loro separazione fisica dai sani, mungendoli per ultimi in un gruppo a parte. Altri elementi del controllo sono la sistematica terapia in asciutta e l'eliminazione dei capi "cronici".

ci può essere un problema nel caso di consumo di latte crudo o nel caso in cui vi siano microrganismi resistenti alla pastorizzazione. **Alcuni ceppi di *Staphylococcus aureus* possono produrre inoltre enterotossine resistenti al calore.**

In caso di mastiti cliniche severe il latte presenta anomalie macroscopiche che possono essere prontamente osservate dall'allevatore o dal mungitore, consentendo lo scarto immediato del latte che non entrerà nella catena alimentare. Nel caso di mastiti subcliniche i cambiamenti sono meno evidenti.

Date queste premesse è estremamente importante intervenire a diversi livelli, in modo sinergico e interdisciplinare, per ridurre la diffusione di questa malattia. Un ulteriore rischio per la salute pubblica è rappresentato dalla possibilità che le mastiti bovine siano causate da ceppi di *S. aureus* multiresistenti agli antibiotici (ceppi MRSA) che possono determinare infezioni negli addetti agli allevamenti e entrare nella catena alimentare.

Il patogeno *S. aureus*

Lo studio della mastite si basa sul parallelo approfondimento delle conoscenze del patogeno e dei meccanismi dell'ospite che consentono all'animale di reagire all'infezione.

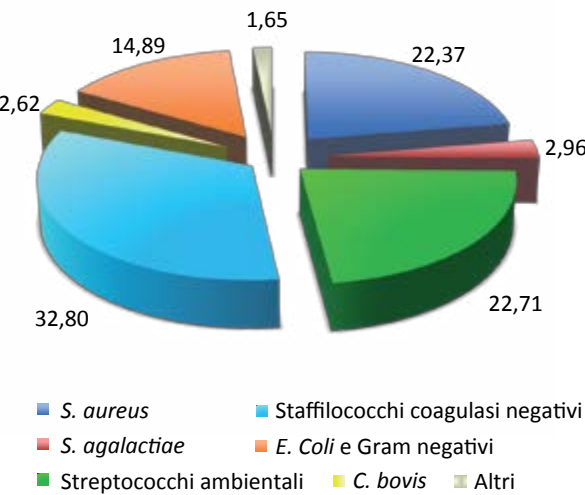
I microrganismi che possono causare la mastite sono più di 100, e sono rappresentati in massima parte da batteri (Figura 1.6). Essi vivono sull'animale, sulla mammella e nell'ambiente (pavimento, lettiera, feci, suolo, alimenti, macchina mungitrice, ecc.) e possono penetrare nella ghiandola mammaria attraverso il canale del capezzolo. Tra le cause di mastite, **l'infezione da *Staphylococcus aureus* è, senza dubbio, la più significativa.** Tale microrganismo tende a dare mastiti subcliniche di lunga durata (croniche), che si possono trasmettere da bovina a bovina durante la mungitura e che progrediscono fino ad interessare una percentuale variabile delle vacche in lattazione. **Nelle mastiti subcliniche croniche si registra un persistente rialzo della CCS e solo sporadicamente si hanno sintomi clinici** evidenti che poi regrediscono nuovamente a uno stato subclinico.

Trattandosi di una mastite subclinica spesso ci si accorge della presenza dell'infezione solo in seguito a un marcato rialzo della CCS nel latte di massa. Infatti, le infezioni subcliniche, caratterizzate da modeste alterazioni del latte, provocano l'intervento del sistema immunitario che determina un aumento delle cellule somatiche nel latte.

Gli animali sani presentano cellule somatiche inferiori a 200 mila per millilitro (nella maggior parte dei casi anche inferiori a 100 mila per millilitro). Nel caso in cui si verifichi un aumento di questo valore significa che la mammella ha un processo infiammatorio in corso. L'aumento delle

Figura 1.6

Batteri contagiosi	Batteri ambientali
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Klebsiella spp</i>
<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Citrobacter spp</i>
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Enterobacter spp</i>
	<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>



Percentuale relativa di microorganismi isolati da 75.000 quarti

cellule somatiche è strettamente correlato anche alla produzione dei componenti principali del latte. A tale proposito è noto che i mediatori dell’infiammazione possono danneggiare le cellule mammarie secernenti e ridurre la sintesi e la secrezione di costituenti quali lattosio, caseina e grassi: questo comporta un peggioramento della qualità del latte e un decremento della resa alla trasformazione, che può permanere anche dopo la regressione della malattia.

Diagnosi e caratterizzazione del patogeno

Diagnosticare in tempi rapidi l’insorgenza di mastite in un allevamento rappresenta un’esigenza sia per le ripercussioni sulla salute animale, sia per le conseguenze economiche di questa patologia. È stato osservato che, accanto ad allevamenti dove l’infezione da *S. aureus* si diffonde rapidamente, vi sono allevamenti dove *S. aureus* sembra avere una bassa contagiosità e patogenicità. Questo può dipendere da fattori legati alle caratteristiche di patogenicità e contagiosità del ceppo batterico coinvolto nell’infezione

Box 1.5 - Patogenicità e diffusività

La conoscenza più approfondita dei caratteri che determinano la patogenicità e diffusività dei ceppi di *S. aureus* può fornire informazioni molto utili per la scelta di strategie di intervento personalizzate, con un rapporto costo-beneficio favorevole.

o da fattori legati alla resistenza degli animali della mandria. La diffusione dei microrganismi contagiosi può naturalmente anche essere condizionata dal livello di management specifico della mungitura. Dal momento che la contagiosità di un ceppo sembra dipendere dal suo corredo di fattori di virulenza lo studio di questi fattori può, in parte, spiegare la diversa abilità di alcuni ceppi di *S. aureus* a produrre alterazioni dei tessuti mammari, a colonizzare specie ospiti differenti o a diffondersi più o meno velocemente in un allevamento. Un fattore indiretto di virulenza può essere considerata la resistenza agli antibiotici dei ceppi MRSA (Methicillin Resistant *S. aureus*) recentemente riscontrata anche in Italia. L’identificazione degli animali infetti da *S. aureus* si basa su indagini batteriologiche classiche che presentano però qualche limite. Con un singolo campionamento in condizioni di infezione sperimentale la sensibilità diagnostica è stimata intorno al 75%. Uno dei motivi della ridotta sensibilità dell’esame colturale nei confronti dello *S. aureus* è legato al fatto che l’eliminazione da parte dell’animale del microorganismo è intermittente. Una sensibilità più elevata (98%) può essere raggiunta solo attraverso l’analisi di almeno tre campioni consecutivi distanziati nel tempo.

Negli ultimi anni sono state sviluppate tecniche di biologia molecolare che permettono di differenziare i vari ceppi di *S. aureus*.

Selezione di animali maggiormente resistenti alla mastite

In questi ultimi anni, diversi studi di associazione genetica sono stati finalizzati a individuare e caratterizzare le varianti genomiche alla base della suscettibilità di un bovino a contrarre malattie multifattoriali come la mastite. Per impostare tali studi è fondamentale stabilire i caratteri fenotipici, vale a dire osservabili, associabili alla caratteristica genetica indagata. Le misure fenotipiche della presenza di mastite sono solitamente suddivise in due gruppi:

- **Misure dirette** corrispondenti alla diagnosi dell’infezione: esame batteriologico positivo e osservazione dei casi clinici.
- **Misure indirette** che sono comunque associate allo stato infiammatorio della mammella: conta delle cellule somatiche (CCS), conducibilità del latte.

Nel caso di mastiti subcliniche, altri indicatori indiretti di infezione possono essere il **calo della quantità di latte** prodotto e l’**alterato rapporto grassi-proteine**.

Misure dirette

L’analisi batteriologica del latte è il criterio diretto più accurato per determinare lo stato di infezione e il patogeno coinvolto. Sono però necessari esami ripetuti e risultano relativamente costosi da applicare su larga scala. Per questo motivo tali analisi sono scarsamente utilizzate. L’osservazione dei casi di mastite clinica e tutti i trattamenti che ne conseguono invece sono relativamente facili da registrare a livello aziendale, ma l’interpretazione dei dati può presentare dei limiti, quali, per esempio, la difficoltà nel distinguere la ricorrenza della stessa infezione da una nuova, inoltre il rilievo clinico non fornisce alcuna informazione sulla maggior parte delle mastiti che determinano perdite produttive, essendo di natura subclinica.

Misure indirette

Numerosi lavori scientifici pubblicati hanno dimostrato che esistono basi genetiche per la suscettibilità di un animale ad alcune patologie. Anche nel caso della mastite esistono fattori genetici che influiscono sulla resistenza ai patogeni scatenanti la malattia.

Il carattere fenotipico maggiormente utilizzato per la mastite è la conta delle cellule somatiche (CCS).

Le mastiti di natura subclinica sono, infatti, associate al rialzo persistente della conta delle cellule somatiche, la cui rilevazione ripetuta nel tempo per ciascuna bovina presente in azienda costituisce un parametro molto affidabile da utilizzare negli studi genetici. Le bovine con un CCS ripetutamente superiore alle 200.000 cellule per millilitro di latte hanno, infatti, una probabilità 20 volte superiore di avere una mastite subclinica.

Sebbene l’ereditabilità del carattere (CCS elevata nel tempo) non sia alta, varia da 0,17 a 0,25, vista la sua importanza, la selezione genetica per la resistenza alla mastite viene fatta in molti paesi, in particolare Danimarca, Finlandia, Norvegia e Svezia. L’esperienza nella mastite dimostra che la raccolta dei dati è ampiamente diffusa per gli animali in selezione, anche quando l’ereditabilità è relativamente bassa, per questo

Box 1.6 - Genoma bovino e marcatori genetici

Il **genoma bovino** è al momento la **sequenza più curata tra quelle disponibili per le specie da allevamento**. In totale sulla sequenza del genoma bovino, composta da 3 miliardi di basi (una dimensione molto simile a quella del genoma umano), sono stati identificati 26.740 geni.

Su di esso sono stati identificati diversi marcatori genetici ossia sequenze o differenze di sequenza nel DNA. Per il bovino sono stati sviluppati diversi pannelli di marcatori a bassa, media e alta densità. Un tipico pannello di marcatori a bassa densità ne possiede 7.000 (circa 1 ogni 400.000 basi), uno a media 54.000 (1 ogni 50.000), mentre 1 ad alta 800.000 (1 ogni 4.000).

i dati della CCS delle figlie sono inseriti nel calcolo degli indici genetici dei tori per la suscettibilità alla mastite.

Per aumentare l’accuratezza della stima, gli indici genetici vengono calcolati contemporaneamente anche per latte, grasso e proteine, sfruttando, in questo modo, le informazioni sulle correlazioni genetiche.

Nonostante le diverse strategie messe in campo per comprendere i fattori che controllano i caratteri di resistenza, tali approcci hanno portato alla scoperta solo di un numero limitato di geni in grado di spiegare la variazione fenotipica.

Oggi, le nuove tecniche di sequenziamento del DNA mettono a disposizione strumenti molto potenti che consentono un maggior progresso nella scoperta di geni utili per la selezione. Oltre alla genealogia classica (*pedigree*), la selezione genomica utilizza, infatti, le informazioni ottenute dai marcatori molecolari per ottimizzare e incrementare la precisione degli schemi selettivi classici e contemporaneamente diminuire l’intervallo di generazione dei singoli riproduttori. Molti studi hanno utilizzato marcatori molecolari a bassa densità (box 1.6), identificando fattori genetici correlati alla resistenza e suscettibilità alla mastite a partire dai dati fenotipici, la CCS e i casi di mastite clinica. Ora, la disponibilità di marcatori ad alta densità offre l’opportunità di rafforzare questi risultati rendendoli più accurati e affidabili.

I geni candidati a marcatori molecolari per la mastite, testati all’interno del progetto MastField, derivano da un’analisi del genoma a media densità di oltre 2.000 tori di razza frisona (svolta all’interno dei progetti SELMOL e PRO.ZOO) che ha permesso di individuare, grazie all’analisi della CCS delle loro figlie, le regioni genomiche

Box 1.7 - Pro.Zoo e SelMol



SelMol (Selezione Molecolare) è il progetto dedicato alla “Ricerca e innovazione nelle attività di miglioramento genetico animale mediante tecniche di genetica molecolare per la competitività del sistema zootecnico nazionale” finanziato per 3 anni, a partire dal 2007 dal MiPAAF al consorzio delle Associazioni Allevatori (CRSA) e che ha coinvolto unità di ricerca appartenenti a 16 Università e 4 Centri di Ricerca in collaborazione con le Associazioni Allevatori (ANA). L’obiettivo generale del progetto è stato il potenziamento del miglioramento genetico delle popolazioni animali allevate in Italia, diretto sia ai caratteri già sotto selezione sia a nuovi caratteri riguardanti la qualità dei prodotti e le condizioni di salute, il benessere e la fertilità degli animali. Il progetto ha inoltre promosso una forte interazione tra i ricercatori italiani che operano nel campo della genetica molecolare in Italia.



Pro.Zoo nasce focalizzato sulla zootecnia lombarda e sceglie di concentrarsi solo su due specie: bovini di razza frisona e suini. Il progetto, finanziato da Fondazione Cariplo, Regione Lombardia e Fondazione Banca Popolare di Lodi vede la partecipazione del Parco Tecnologico Padano e del CRSA già coinvolti in SelMol, e le associazioni degli allevatori, l’Istituto Spallanzani, l’Università di Milano, l’Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna oltre ai Centri di Fecondazione Assistita. L’obiettivo generale è il miglioramento dei caratteri funzionali (resistenza alle patologie, benessere e qualità delle produzioni) in bovine da latte e suini, in particolare la comprensione delle basi genetiche di alcuni caratteri complessi, e poco caratterizzati, che però hanno un ruolo importante nel determinare il reddito agricolo e il benessere animale. Tra questi la fertilità, le mastiti o le laminiti o ancora la presenza di contaminanti microbiologici nel latte o di patogeni negli allevamenti. Il lavoro di caratterizzazione genetica ha riguardato 1800 tori e 500 vacche di razza frisona.

I risultati di Pro.Zoo e Selmol hanno dato il via a moltissimi nuovi progetti, a livello nazionale ed internazionale, tra i quali MastField, espressamente dedicato allo studio molecolare della mastite, che hanno rilanciato l’Italia nella panorama mondiale della ricerca zootecnica avanzata.

Pubblicazioni scientifiche sviluppate da SelMol e Pro.Zoo che hanno contribuito al progetto Mastfield:

Minozzi G., E.L. Nicolazzi, F. Strozzi, A. Stella, R. Negrini, P. Ajmone-Marsan and J. L. Williams (2011). *Genome wide scan for somatic cell counts in holstein bulls*. BMC Proceedings 2011, 5 (Suppl 4): S17

Pintus MA, Nicolazzi EL, Van Kaam JBGHM, Biffani S, Stella A, Gaspa G, Dimauro C, Macciotta NPP (2013) *Use of different statistical models to predict direct genomic values for productive and functional traits in Italian Holsteins*. J Anim Breed Genet. 130(1):32-40

Minozzi G, Nicolazzi EL, Stella A, Biffani S, Negrini R, Lazzari B, Ajmone-Marsan P, Williams JL. (2013) *Genome wide analysis of fertility and production traits in Italian Holstein cattle*. PLoS One. 12;8(11).

Biscarini G, Biffani S, Morandi N, Nicolazzi EL, Stella A (2014) *Using Runs of Homozygosity to Detect Genomic Regions Associated with Susceptibility to Infectious and Metabolic Diseases in Dairy Cows under Intensive Farming Conditions*. Elares.

Fontanesi L, Calò DG, Galimberti G, Negrini R, Marino R, Nardone A, Ajmone-Marsan P, Russo V. (2014) *A candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle*. Anim Genet. doi: 10.1111/age.12164

associate agli EBV (*Estimated Breeding Values*, stima di valori riproduttivi) collegate a questo carattere. I circa 2.000 riproduttori erano stati genotipizzati con il BovineSNP50 BeadChip dell’Illumina che permette di rilevare contemporaneamente 54.000 SNPs, ossia

differenze genetiche di una singola base del DNA. MastField, partendo da queste conoscenze, ha sviluppato due linee di progetto per studiare come accrescere la resistenza genetica alla mastite e comprendere meglio uno dei suoi principali agenti causali: *S. aureus*.



Il Progetto MastField

Obiettivi

L'attività del progetto si è focalizzata su due approcci complementari, per ridurre l'incidenza della mastite nelle bovine da latte. Il primo approccio riguarda l'uso della genetica ed in particolare l'identificazione di marcatori molecolari utili per la selezione di animali con una minor predisposizione alla mastite; il secondo consiste nell'allestimento di un test molecolare per la diagnosi diretta di patogenicità di *S. aureus* dal latte di bovina e dal latte di massa.

La sinergia dei due approcci permette di utilizzare il *know-how* generato dal progetto nel contesto più ampio dei programmi di selezione assistita da marcatori e di piani sanitari con lo scopo comune di ridurre la prevalenza e l'incidenza della mastite.

Partner

CRSA

Il Consorzio di Ricerca e Sperimentazione degli Allevatori (CRSA) costituisce uno strumento di coordinamento operativo e di programmazione progettuale per le attività di ricerca e sviluppo nel settore della riproduzione e selezione animale.

Siedono nel Consiglio di Amministrazione del CRSA i presidenti delle principali Associazioni Allevatori Nazionali di Specie (suina, ovina, caprina e bufalina) e di Razze Bovine (Frisona, Bruna, razze a duplice attitudine, razze bovine italiane da carne) oltre ad importanti esponenti del mondo accademico, del MiPAAF, il presidente ed il direttore del Consiglio della Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura (CRA). Ha coordinato le attività del progetto MastField.

PTP

Il Parco Tecnologico Padano, coordinatore del progetto, è un parco scientifico e tecnologico che opera nel settore agroalimentare, della bioeconomia e delle scienze della vita. Al suo interno operano diversi gruppi di ricerca che si occupano dello studio dei genomi animali in collaborazione con altri centri nazionali e internazionali. Oltre all'attività di ricerca, il Parco supporta la nascita di nuove imprese innovative e offre servizi e alle aziende e al mondo allevatorio per promuoverne l'innovazione e la competitività. Il Parco opera all'interno del Polo della Ricerca di Lodi, in sinergia con l'Università di Milano, il CNR, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia e diversi distretti regionali lombardi. All'interno del progetto MastField ha costruito strumenti per la gestione dei dati, ha prodotto i dati genotipici oltre che le analisi statistiche.

IZSLER

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna opera nell'ambito del sistema sanitario nazionale come strumento tecnico-scientifico dello Stato e delle due Regioni di giurisdizione, garantendo ai Servizi Veterinari le prestazioni e la collaborazione in materia di igiene e sanità pubblica.

Per garantire tale operatività nel corso degli anni l'Istituto ha realizzato una rete di 17 Sezioni diagnostiche distribuite nel proprio territorio di competenza, rispettivamente 9 in Lombardia e 8 in Emilia Romagna, strettamente collegate alla Sede di Brescia.

La missione è quella di operare a favore della salute pubblica e delle attività produttive del settore agro-alimentare nel rispetto dei valori etici, al fine dello sviluppo socio-economico del paese. All'interno del progetto MastField si è occupato della pianificazione dei campionamenti, delle analisi batteriologiche e della valutazione dei test diagnostici sul latte.

CNR-IBBA

L'Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria è un istituto del Consiglio Nazionale delle Ricerche. La sua missione è quella di migliorare le conoscenze relative alle basi molecolari che regolano il funzionamento dei sistemi biologici di interesse agrario (vegetale, animale, microbico), a diverso livello di organizzazione (cellula, organismo), come base per programmi indirizzati ad un loro migliore e diversificato utilizzo e per un aumento della qualità delle produzioni.

L'IBBA ha come primario obiettivo una espansione delle conoscenze di base, presupposto per la conoscenza e la valorizzazione della biodiversità nonché per tutte le applicazioni genetiche, tecnologiche e biotecnologiche in campo agrario. Particolare attenzione viene dedicata alla formazione di giovani ricercatori, attraverso assegni di ricerca, tesi di dottorato e tesi di laurea. All'interno del progetto MastField si è occupato dell'analisi epidemiologica, della messa a punto delle PCR diagnostiche, delle analisi molecolari sui ceppi di aureus e delle analisi statistiche dei risultati.

UNIMI-DIVET

L'Università di Milano è una delle più antiche scuole dedicate allo studio delle malattie degli animali e del loro allevamento.

Il Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica (DIVET) svolge attività di ricerca e didattica nell'ambito della medicina veterinaria, della sanità pubblica e della sicurezza degli alimenti. Obiettivo è la promozione della salute e del benessere dell'animale e dell'uomo, anche nella loro interazione con l'ambiente. All'interno del progetto MastField si è occupata delle analisi di

patogenicità dei ceppi isolati mediante IDENTIBAC array.

ARAL

L'Associazione Regionale Allevatori della Lombardia è un'associazione che si occupa di selezione, di miglioramento degli allevamenti, di consulenza tecnica e di quanto possa favorire il miglioramento del reddito delle aziende agro-zootecniche. Opera in armonia con la programmazione agricola regionale e con gli indirizzi selettivi delle Associazioni Nazionali Allevatori (ANA). All'interno del progetto MastField ha fornito i contatti con gli allevatori, i dati storici di infezione e si è occupato della raccolta dei campioni di latte e sangue. Ha inoltre effettuato la conta delle cellule somatiche.

Istituto Sperimentale Italiano “Lazzaro Spallanzani”

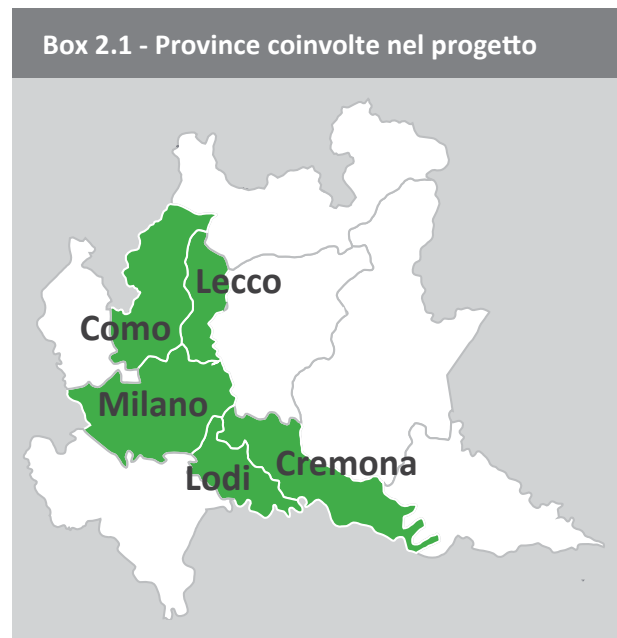
L'Istituto è un ente morale senza fine di lucro riconosciuto giuridicamente con finalità di ricerca scientifica, di sperimentazione e di servizi nei seguenti settori: *Riproduzione e Selezione* con i laboratori di Seminologia, Embriologia, Citometria, Criobiologia e Citogenetica; *Acquacoltura* interamente dedicato alla ricerca applicata di nuove tecnologie sia per specie di acqua dolce che marina, finalizzate all'applicazione di schemi di selezione e alla salvaguardia di specie in via d'estinzione; *Qualità e Sicurezza delle Produzioni* con il Laboratorio Qualità dei Prodotti che si occupa dello studio della qualità, tipicità e sicurezza dei prodotti di origine animale e il Laboratorio di Genetica Molecolare, trasversale a tutti i settori, dove le biotecnologie e la genomica trovano applicazione nello sviluppo delle attività di ricerca e di servizio. All'interno del progetto MastField ha seguito il campionamento, l'estrazione del DNA, il sequenziamento e l'elaborazione dei dati.

Articolazione della ricerca

Il progetto ha affrontato il problema della mastite da due punti di vista diversi, ma complementari:

- La genetica dell'animale
- Il principale patogeno, *S. aureus*

In particolare, sono stati testati su bovine di razza Frisona allevate in Lombardia marcatori genetici di resistenza alla malattia (obiettivo 1) e contemporaneamente, è stata determinata, attraverso sequenziamento del DNA, la costituzione genetica del patogeno *S. aureus* presente



negli allevamenti, in modo da mettere a punto test rapidi per l'individuazione dei ceppi più aggressivi (obiettivo 2).

Obiettivo 1

Il primo obiettivo del progetto MastField si è concentrato sulla correlazione tra CCS e marcatori genetici di resistenza, il progetto ha concentrato la sua attenzione sullo studio delle componenti genetiche bovine che determinano il tipo di risposta dell'animale all'infiammazione mammaria causata dalla mastite. A tal fine, distinti marcatori molecolari (SNPs - differenze di una singola base del DNA) sono stati validati in campo su bovine da latte di razza Frisona Italiana con valori costantemente alti o bassi di cellule somatiche. Le informazioni genetiche così raccolte hanno costituito la base per:

- Creare un test molecolare per l'identificazione di animali più resistenti alla malattia.
- Impostare programmi di selezione assistita da marcatori molecolari.

Obiettivo 2

Il secondo obiettivo del progetto MastField è stato quello di sviluppare un test molecolare in grado di identificare nei singoli animali e nel latte di massa, i sottotipi genetici di *S. aureus* associabili alle forme di infezioni mammarie più gravi e diffuse. Nello stesso tempo, il test consente di individuare i sottotipi del ceppo batterico che probabilmente non rappresentano un pericolo per la mandria. Tale metodica può essere utilizzata come sistema di screening diagnostico per affrontare il controllo dell'infezione in allevamento.

Altri obiettivi

Il progetto MastField ha inoltre raggiunto altri due obiettivi secondari creando:

- Una bio-banca contenente sia i DNA degli animali studiati, sia tutti i ceppi di *S. aureus* isolati e caratterizzati durante lo svolgimento del progetto.
- Un database contenente tutte le informazioni epidemiologiche raccolte.

Allevamenti coinvolti

Nel progetto sono state prese in considerazione 186 aziende di bovine da latte, localizzate nelle province di Lodi, Milano, Como, Lecco e Cremona.

Fattori di resistenza genetica alla mastite

L'obiettivo 1 del progetto si proponeva di testare su di una popolazione di vacche di razza Frisona l'effetto delle regioni genomiche identificate in altri lavori e di alcuni geni candidati di cui si era ipotizzato un ruolo nell'insorgenza della mastite. Le differenze genetiche (polimorfismi) che hanno confermato la loro significatività sono state poi utilizzate per mettere a punto sistemi di diagnosi di suscettibilità genetica all'infezione.

Identificazione della popolazione di validazione

I dati di partenza dai quali estrarre un campione significativo sono stati ottenuti dall'Associazione Regionale Allevatori Lombardia (ARAL) che ha fornito una serie di archivi contenenti le informazioni produttive di 33.083 bovine allevate nelle province di Milano e Lodi. Le informazioni produttive si riferivano ai controlli funzionali eseguiti mensilmente dall'Associazione Allevatori e che includevano anche il conteggio delle cellule somatiche per ogni singola bovina.

In totale erano disponibili 822.478 record relativi a **33.083 bovine distribuite in 186 aziende** nelle province di Lodi e Milano.

Al fine di massimizzare il potere statistico del campione, inteso come capacità di determinare con il minor errore possibile l'effetto investigato, la scelta degli animali da campionare è stata condotta in due tappe successive.

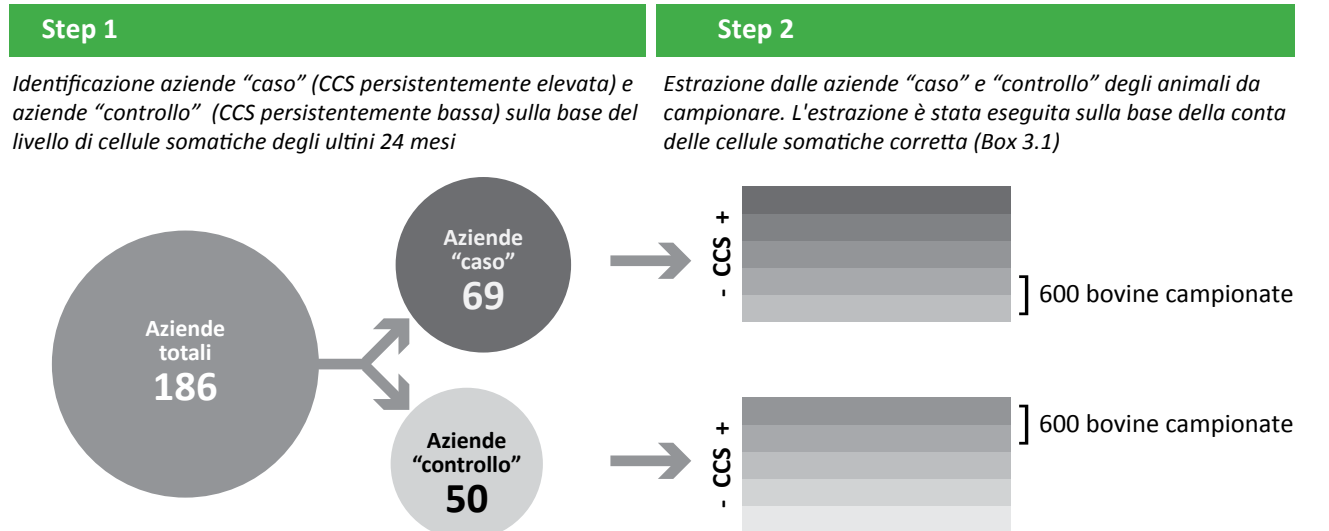
In un primo momento le aziende sono state divise in aziende "caso" con una media nella CCS alta ed aziende "controllo" con una media nella CCS bassa, sulla base del livello medio di cellule somatiche osservato in ciascuna azienda negli ultimi due anni (figura 3.1). Questo per ottenere due gruppi di aziende distinte partendo dall'ipotesi che un livello persistentemente elevato di cellule somatiche sia correlato ad un alto problema/incidenza di mastite e viceversa. Da questo primo campionamento **sono stati identificati 68 allevamenti "caso"** (45 nella provincia di Lodi e 24 in quella di Milano) **e 50 allevamenti "controllo"** (38 in provincia di Lodi e 12 in provincia di Milano). Dai dati di questi allevamenti, prima di procedere alla selezione degli animali, sono stati eliminati quelli con meno di 6 controlli per lattazione. Una volta ottenuti i due gruppi di aziende, sono state estratte circa 600 bovine per ciascun gruppo. Gli animali sono stati scelti considerando che il livello di cellule somatiche è fortemente influenzato da fattori ambientali, come l'età della bovina, l'ordine di parto o lo stadio di lattazione oltre che dall'animale stesso. Prima di effettuare il campionamento, i livelli di cellule somatiche di ciascun animale sono stati "aggiustati" attraverso l'utilizzo di un modello matematico.

Il modello matematico

Prima dell'analisi, il parametro conta cellule somatiche è stato trasformato nel cosiddetto *Linear Score* in modo tale da rendere più semplice l'interpretazione dei dati. Ad un Linear Score di 5, ad esempio, corrisponde una conta delle cellule somatiche pari a 400 mila/ml, con un intervallo di variazione da 283 mila a 565 mila per ml (v. Tabella 1.2).

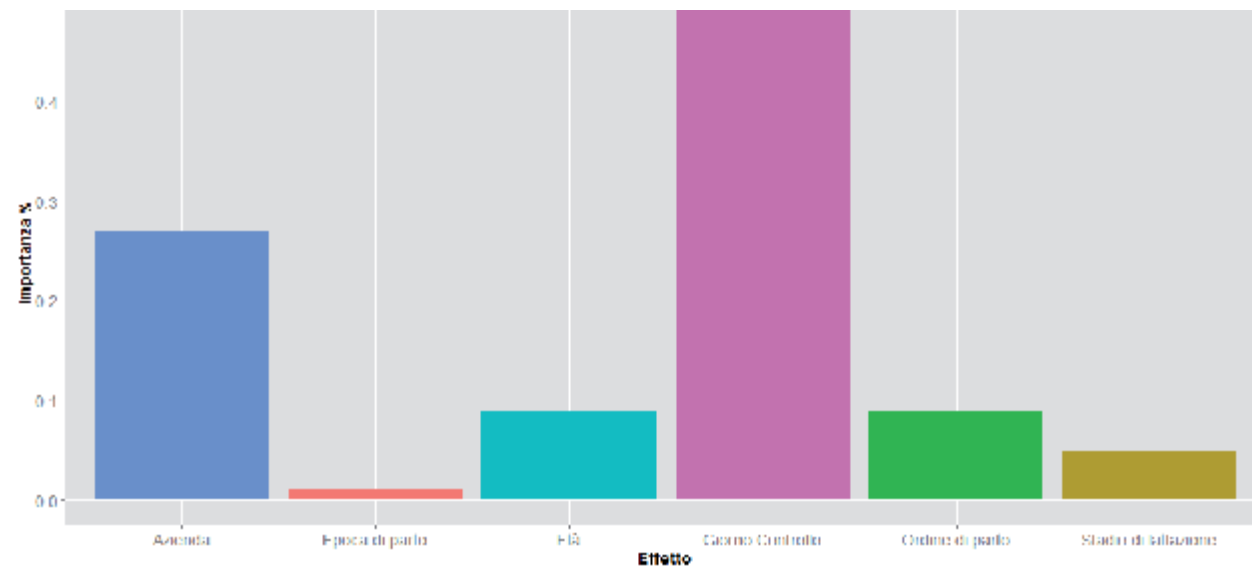
Tutti gli altri effetti considerati dal modello adottato

Figura 3.1



Schema di Campionamento Animali utilizzato per scegliere le bovine da analizzare.

Figura 3.2



Impatto percentuale dei diversi fattori ambientali sul livello di cellule somatiche.

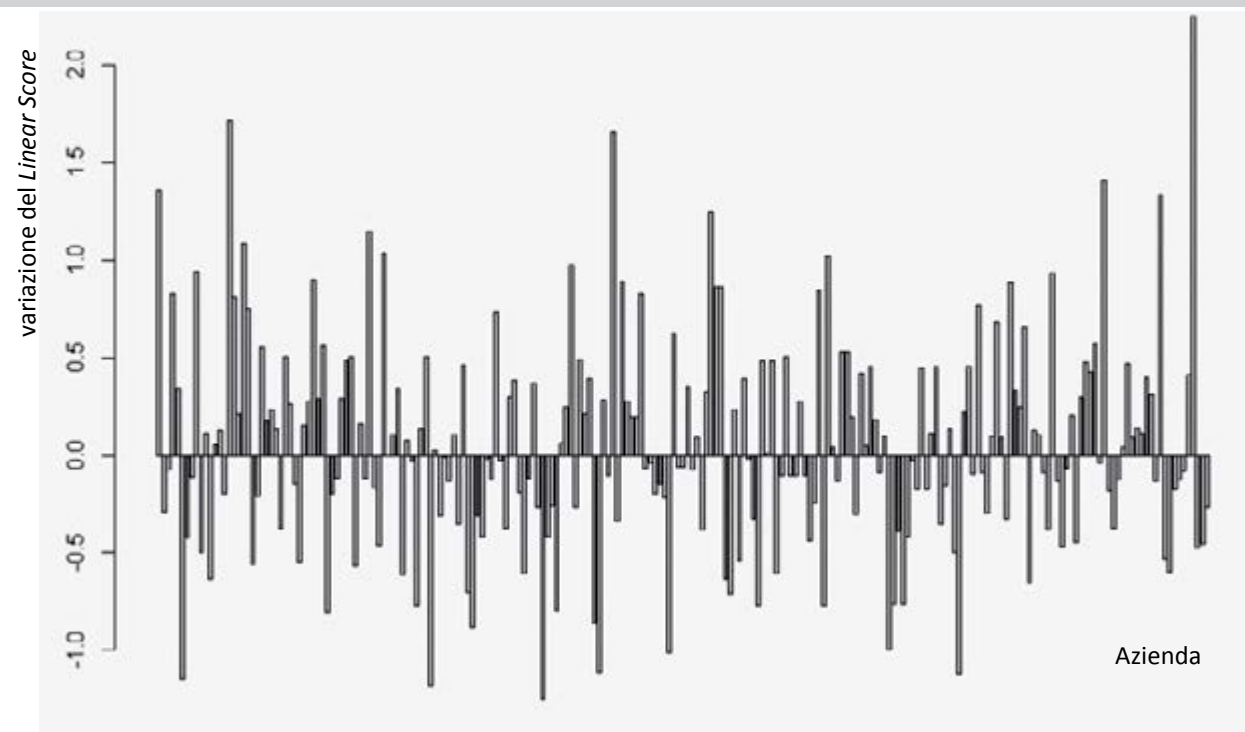
servivano per poter confrontare le bovine tra di loro e poter quindi scegliere quelle che, a parità di condizioni, esprimevano resistenza o suscettibilità.

Tutti gli effetti inseriti nel modello sono risultati significativi, confermando che la CCS è fortemente influenzata da aspetti non genetici e che quindi il “management” gioca un ruolo determinante.

Non tutti gli effetti ambientali hanno però lo stesso impatto sulla CCS e può essere interessante capire quali influiscono maggiormente (Figura 3.2).

Il giorno del controllo ha senza dubbio l'impatto più elevato, perché le condizioni ambientali possono variare significativamente da un giorno con l'altro (una giornata calda, un problema di mungitura). Anche l'azienda ha un

Figura 3.3



Effetto dovuto all'azienda di appartenenza sul Linear Score.

impatto significativo (Figura 3.3), pari a quasi il 30% sulla variabilità osservata nella CCS dovuta alla componente ambientale. La variabilità dovuta all'azienda (e quindi al management) è notevole, con aziende che riescono ad avere livelli di conta cellulare ben al di sotto della media ed altre molto al di sopra.

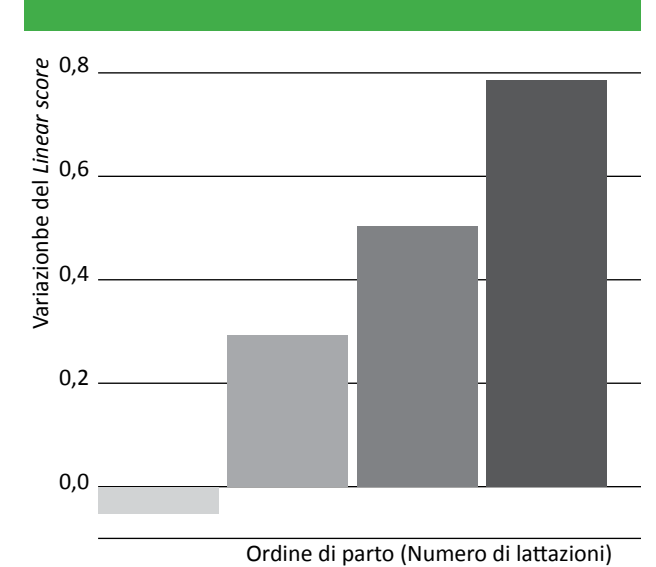
L'ordine di parto (Figura 3.4), l'età dell'animale e lo stadio di lattazione sono effetti che contribuiscono, insieme, anch'essi per un 25-30% alla variazione della CCS.

Il modello ha confermato inoltre l'impatto negativo dell'aumento delle cellule somatiche sulla produzione di latte, in funzione anche dello stadio di lattazione e dell'ordine di parto con perdite produttive più elevate a fine lattazione e negli ordini di parto più avanzati. Nella figura 3.4 è riportato l'effetto dell'ordine di parto sulle cellule somatiche in cui si evidenzia un aumento negli animali con più lattazioni.

Questi effetti hanno ovviamente ricadute economiche. Nella figura 3.5 è riportata la perdita, in kg di latte, all'aumentare di 1 punto di Linear Score (LS) per ordine di parto. Come si può osservare l'aumento è lineare, e cioè il calo produttivo è progressivo. Non solo, le perdite maggiori si hanno sulle vacche pluripare. Nel caso di una primipara un aumento di 1 punto di LS porta ad una perdita di 0.4 kg di latte al giorno, mentre nel caso delle pluripare il calo è più del doppio (0.9 kg di latte al giorno per 1 punto di LS).

Considerando un prezzo medio alla stalla di 0,44 €/kg, ogni punto di LS provoca un danno economico di 0,20 €/giorno per una primipara e di circa 0,40€/giorno per

Figura 3.4



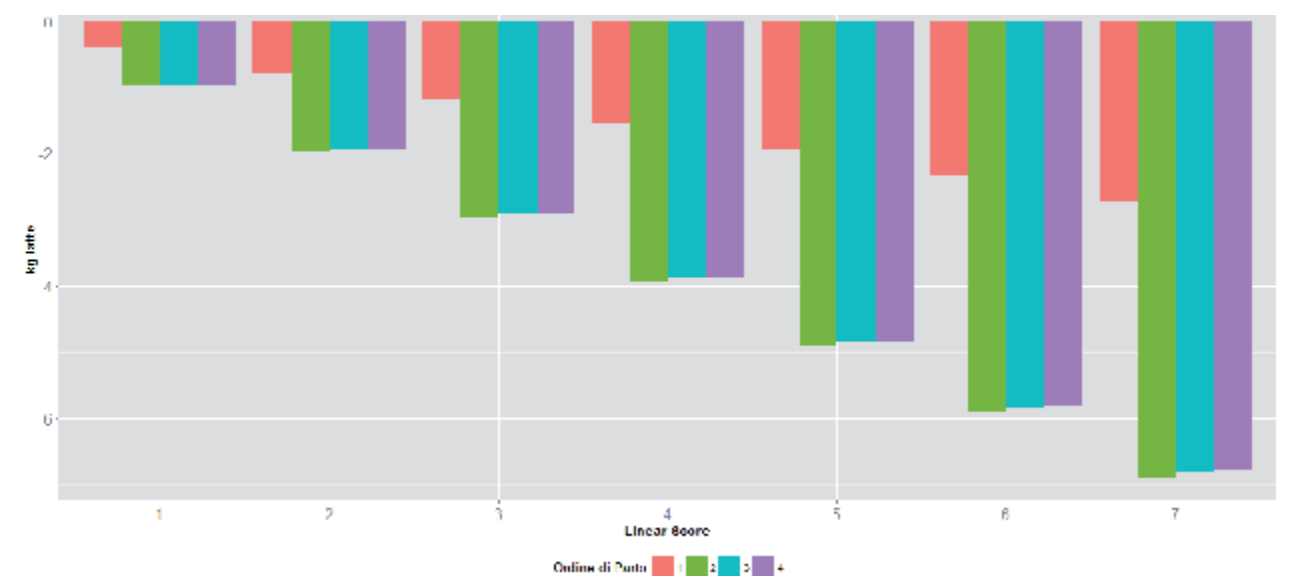
Primipare Secondipare Terzipare Pluripare

Variazione del Linear Score dovute all'ordine di parto

una pluripara. Ciò che è importante sottolineare è che già a bassi livelli di cellule avvengono perdite produttive che portano a delle perdite economiche significative.

Una volta ottenuto per ciascuna bovina il valore delle cellule somatiche “aggiustato”, si è proceduto al campionamento degli animali nei due gruppi di aziende. Il criterio scelto è stato quello di identificare in maniera incrociata animali con valori di CSS persistentemente

Figura 3.5



Perdita di latte in kg all'aumentare delle cellule somatiche.

Raccolta campioni biologici, scelta dei marcatori e genotipizzazione

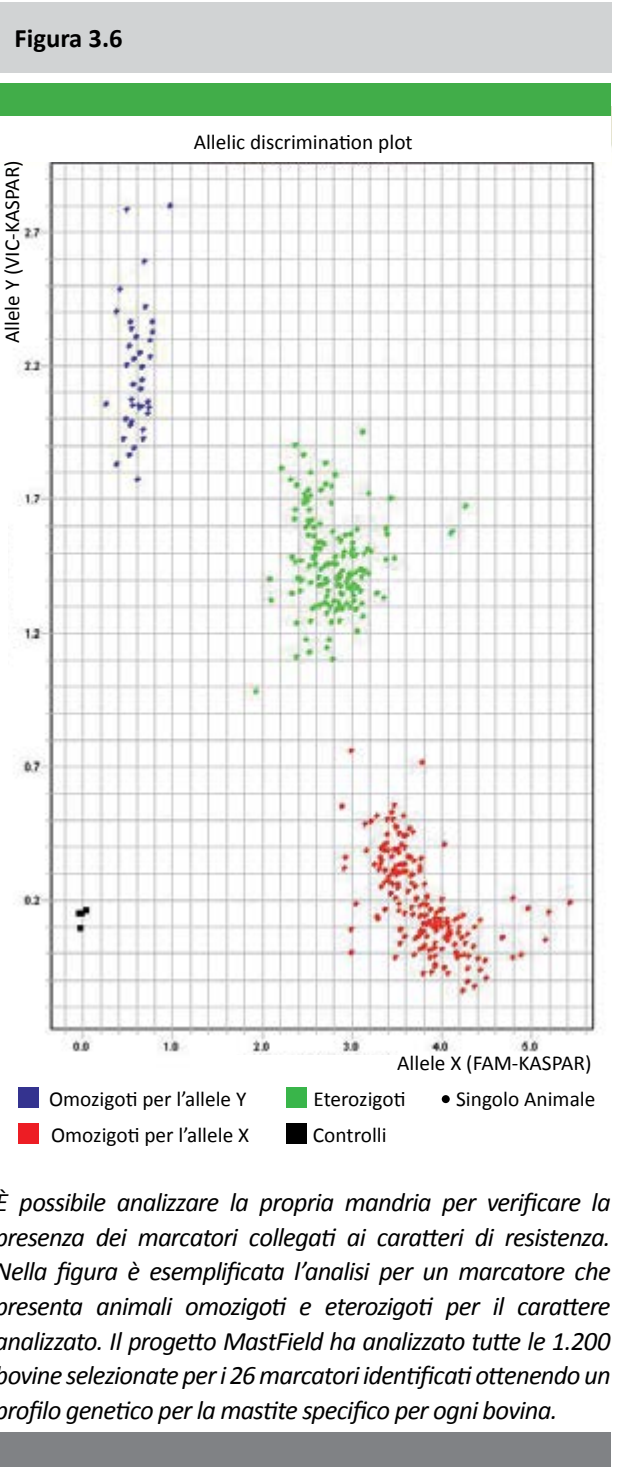
Una volta identificate le 1.200 bovine da utilizzare nel test di validazione, i veterinari dell'ARAL si sono occupati dei prelievi ematici necessari all'estrazione del DNA. Sui campioni di DNA così raccolti sono stati testati diversi marcatori molecolari presenti in regioni associate agli EBV (*Estimated Breeding Value*) per le cellule somatiche nei tori di razza Frisone Italiana. In particolare sono state identificate **due regioni cromosomiche con delle associazioni molto forti con la CCS: una regione sul cromosoma 14 con alta significatività ed una regione sul cromosoma 6 con significatività moderata.**

Lo **differenza genetica (SNP) significativamente collegata alla CCS sul cromosoma 14 è risultata molto vicina al gene DGAT1, che è sotto forte selezione per il quantitativo di grasso e la produzione di latte.** Selezionando per DGAT1, gene associato all'aumentato contenuto di grasso, si seleziona anche (seppur non

volutamente) per un allele deleterio per la CCS. Questo ha quindi suggerito la verifica dell'effetto di questo marcatore.

Sono stati presi in considerazione anche alcuni geni candidati per la resistenza alla mastite quali il recettore dell'Interleuchina 10 (IL10R) e quello della Pentraxina 3 (PTX3), identificati grazie ai progetti Pro.Zoo e SELMOL (Box 1.7) che hanno valutato l'associazione di alcuni geni coinvolti nella risposta alla mastite in un gruppo di 130 tori con EBV estremi per la CCS.

A questi sono stati aggiunti l'IL10 (interleukin 10), CXCR1



(chemokine C-X-C motif receptor) e MBL1 (mannose binding lectin 1). Esistono infatti lavori che illustrano come il gene MBL1 possa contribuire alla resistenza alle infezioni batteriche e possa essere usato come marcatore nel controllo delle mastiti. Vacche con un particolare allele del gene CXCR1 risultavano avere un'alta incidenza di mastite e una diminuita produzione di latte.

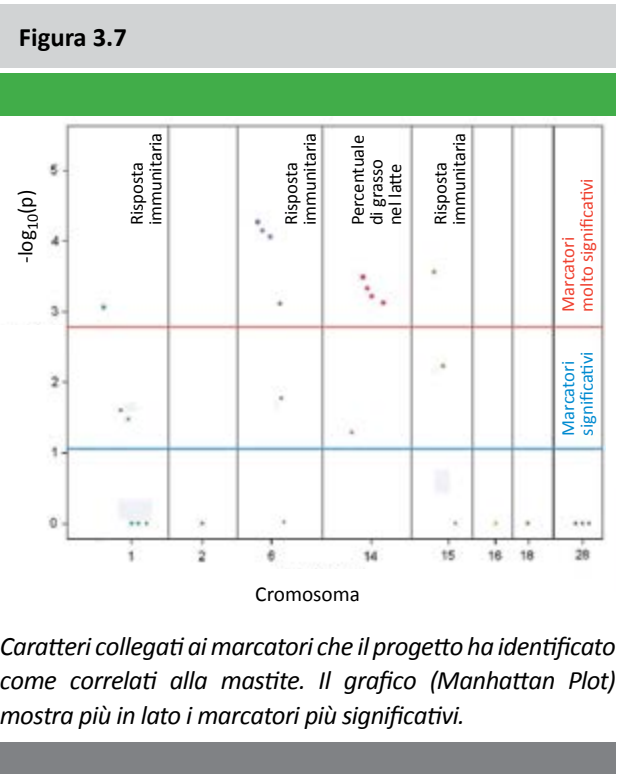
Complessivamente sono stati selezionati **26 marcatori localizzati sui cromosomi 1, 2, 6, 14, 15, 16, 18 e 28** e per questi marcatori sono stati messi a punto i saggi per la genotipizzazione utilizzando il sistema KASPar (Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system - figura 3.6). Questa metodica è in grado di riconoscere specificamente le sequenze di ogni differenza genetica e permette anche di individuare il suo genotipo (omozigote o eterozigote).

Tutte le 1.200 bovine sono state genotipizzate per tutti i 26 SNPs considerati.

Validazione dei polimorfismi

I risultati dell'analisi dei 26 SNP sono rappresentati in figura 3.7, chiamata Manhattan Plot, che rappresenta graficamente quanto i 26 SNP testati sono statisticamente significativi.

Sull'asse delle ascisse sono riportati gli 8 diversi cromosomi (separati da linee verticali) sui quali erano



localizzati i 26 SNP considerati, mentre sull'asse delle ordinate è riportato il livello di significatività statistica. **In corrispondenza del cromosoma 6 si rileva la presenza di ben 4 SNP con alta o buona significatività, ed altri 4 picchi più bassi, localizzati ancora sul cromosoma 14, 1 e 15.** Complessivamente **i primi 6 SNP spiegano circa il 3.5% della varianza fenotipica del carattere suscettibilità alle mastiti.** Considerando che in letteratura, l'ereditabilità del carattere è intorno al 15%, l'effetto degli SNP selezionati può essere considerato rilevante.

I primi due marcatori, che presentano il più alto grado di significatività, sono situati sul cromosoma 6 e si trovano all'interno o nelle immediate vicinanze del gene SLC4A4. Questo gene codifica per una proteina direttamente coinvolta nella via di secrezione della bile, un pathway che risulta fondamentale per la digestione e l'assorbimento dei lipidi influenzando la percentuale di grasso nel latte e quindi la sua qualità.

Anche gli SNP presenti nelle vicinanze del gene DGAT1, che è sotto forte selezione per il quantitativo di grasso e per la produzione di latte, hanno evidenziato un effetto significativo confermando studi precedenti che indicavano un legame tra produzione e cellule somatiche. È in corso di valutazione quali alleli di DGAT1 siano correlati ad una maggiore produzione e quali ad una maggiore incidenza di mastite.

Lo SNP ss104807645 situato sul cromosoma 15, nel gene che codifica per il recettore dell'interleuchina 10 (*IL-10*), è risultato significativo. È noto che durante le infezioni di *E. coli*, *S. aureus* o *Mycoplasma bovis*, i livelli di *IL-10* aumentano nei tessuti della ghiandola mammaria e nel latte. Inoltre, studi sui roditori, hanno dimostrato che la somministrazione di *IL-10* riduce la risposta alla febbre in ratti che presentano i sintomi dell'infezione.

Messa a punto di un pannello per l'analisi genetica

Il presente studio aveva tra i suoi obiettivi anche quello di individuare i migliori marcatori molecolari associati alla CCS per consentirne **un uso direttamente in azienda.**

L'analisi di associazione ha confermato la significatività di alcuni marcatori e tra questi quelli localizzati sul cromosoma 6 e sul cromosoma 14. Questi marcatori possono quindi rappresentare un set di marcatori molecolari da utilizzare in un test genotipico per coadiuvare l'allevatore nello screening dei suoi animali,

indicando quei soggetti che geneticamente sono più o meno predisposti ad infezioni mammarie.
Va ricordato che molta della variabilità osservata nella resistenza/suscettibilità alla mastite è dovuta a fattori non genetici e quindi il controllo degli effetti ambientali gioca un ruolo fondamentale.

Il sistema di genotipizzazione per i marcatori qui descritti è stato ottimizzato ed è oggi disponibile presso la Piattaforma Genomica del Parco Tecnologico Padano che possiede il protocollo validato e il know-how

necessario per fornire un servizio di analisi su richiesta e ad un costo di poche decine di Euro.
Il sistema è approcciabile da laboratori di biologia molecolare che abbiano in dotazione uno strumento di Real Time PCR.

Il Parco Tecnologico Padano sta anche valutando la possibilità di poter eseguire il test su un dispositivo portatile di real-time PCR tramite l'utilizzo di nuove ed innovative macchine per la diagnostica in campo. Questa attività è ancora in fase di sviluppo.

E' possibile approfondire gli aspetti tecnici delle analisi svolte e dei risultati ottenuti consultando il Rapporto di Ricerca del progetto disponibile sul sito di Regione Lombardia:
www.agricoltura.regione.lombardia.it

4

4 Marcatori molecolari per *S. aureus*

L'obiettivo 2 del progetto si proponeva di individuare un pannello ristretto di marcatori molecolari per il riconoscimento dei ceppi di *S. aureus* associabili alle infezioni mammarie più gravi e maggiormente diffuse. Il riconoscimento di questi ceppi consente di distinguere fra le situazioni di infezione da *S. aureus* che necessitano di severe misure di controllo, e quelle che invece possono non rappresentare un pericolo per la mandria. Il sistema diagnostico sviluppato può essere applicato anche sul latte di massa, per individuare in modo rapido a livello aziendale la presenza dell'infezione da *S. aureus*, distinguendone i sottotipi genetici potenzialmente più pericolosi.

Selezione degli allevamenti

Sono state prese in considerazione **118 aziende di bovine da latte, localizzate nelle provincie di Como, Cremona, Lecco, Lodi e Milano** che, sulla base di esami batteriologici eseguiti nei 12 mesi precedenti su latte individuale o latte di massa, evidenziavano la presenza di infezioni mammarie da *S. aureus* e non presentavano altre infezioni intercorrenti da altri patogeni contagiosi, quali *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma bovis*. In

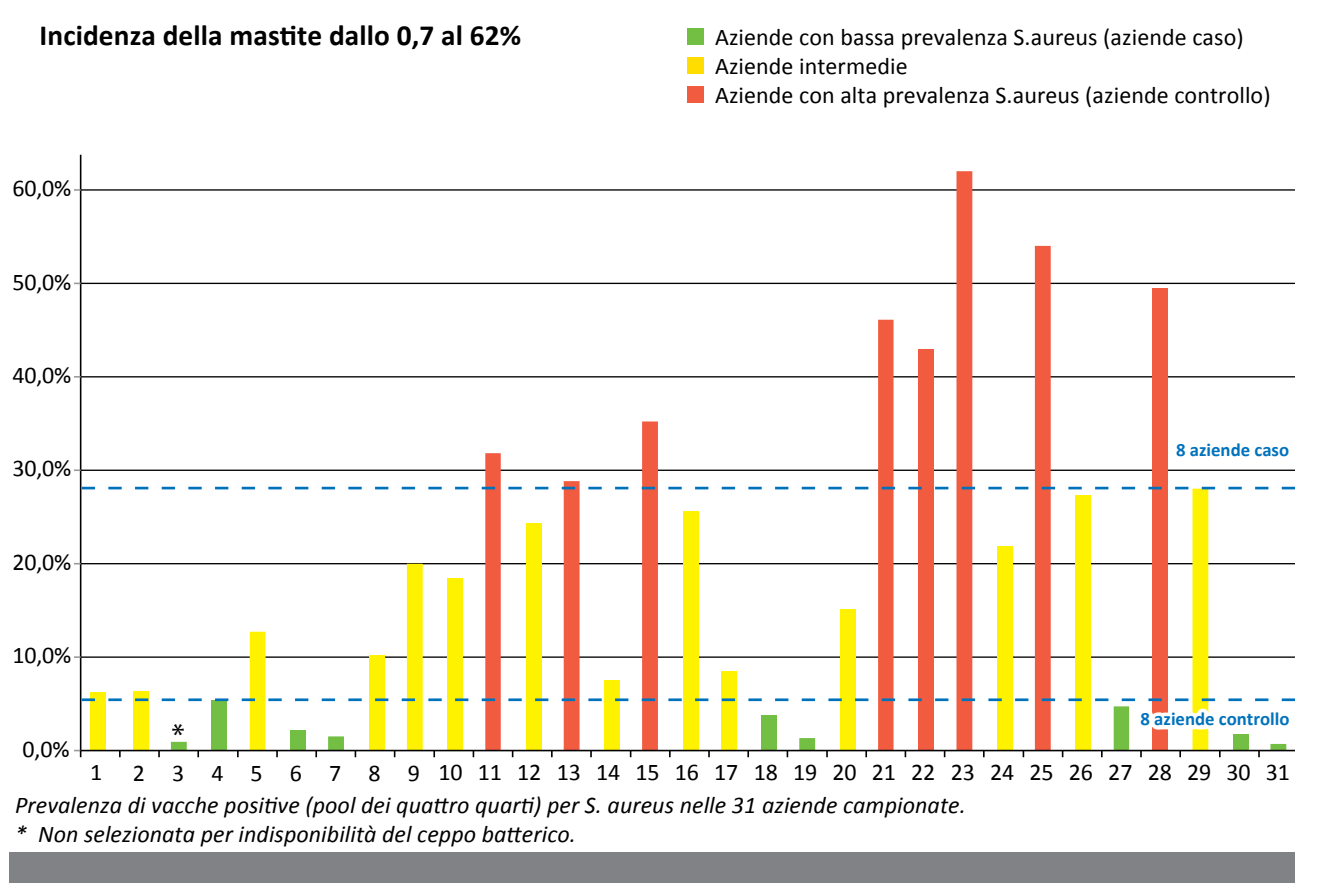
seguito all'analisi dei dati derivanti dai controlli funzionali eseguiti dalla Associazione Allevatori e relativi alla CCS individuale, **sono state selezionate 31 aziende**: 16 in aziende con > 40% di vacche con CCS >200.000 e 15 in aziende con < 20% di vacche con CCS >200.000 (figura 4.1).

Campionamenti di latte e diagnostica batteriologica

Tutti i campionamenti e i rilievi aziendali sono stati eseguiti da 3 veterinari operanti da anni nei Piani di "Qualità Latte" delle Associazioni Allevatori, sotto il coordinamento del SATA della Associazione Regionale Allevatori Lombardia (ARAL). I campionamenti di latte sono stati eseguiti asetticamente previa pulizia e disinfezione dei capezzoli, eliminazione dei primi getti per l'osservazione di eventuali alterazioni legate alla presenza di mastite e raccolta del latte in contenitori sterili per le analisi batteriologiche e la conta delle cellule somatiche.

I campioni sono stati recapitati al laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico - Sezione di Lodi entro 24 ore dal prelievo e processati per l'analisi il giorno del conferimento o il giorno successivo. I campioni sono stati quindi sottoposti ad analisi batteriologica secondo metodi di routine applicati presso l'IZSLER.

Figura 4.1



Primo campionamento

Tutti gli animali delle 31 aziende selezionate sono stati campionati con prelievo sterile del latte in pool dei quattro quarti, al fine di stabilire la prevalenza dell’infezione da *S. aureus*. Sono così stati raccolti **3.311 campioni di latte**. **Gli esami batteriologici hanno confermato la presenza di *S. aureus*, evidenziando prevalenze di positività comprese fra lo 0,7% e il 62%.**

Contemporaneamente gli esami hanno permesso di escludere la presenza di altri agenti patogeni contagiosi e di fornire comunque agli allevatori coinvolti nel progetto un quadro dei microrganismi causa di mastite anche non contagiosa (ad esempio, stafilococchi, streptococchi, *E. coli*, etc) presenti in quel momento nell’allevamento e la sensibilità agli antibiotici per una corretta terapia mirata.

Analisi delle condizioni ambientali e valutazione della routine di mungitura

Per ciascuno dei 31 allevamenti considerati, nel corso di una visita veterinaria, è stata compilata una scheda contenente le informazioni generali sull’allevamento e sui programmi di gestione sanitaria e di biosicurezza. La raccolta di tali informazioni è servita per verificare che nel gruppo di aziende da arruolare non vi fossero differenze significative tali da influenzare significativamente la diffusione di *S. aureus*. Sono stati presi in considerazione i seguenti indicatori: numero medio di Lattazioni (NL) nella mandria al momento del prelievo, il livello di pulizia della mammella e le condizioni dei capezzoli (*Teat score*).

È noto infatti che il *Teat score*, ovvero il grado di infiammazione e la presenza di lesioni con particolare riferimento alla ipercheratosi e alla estroflessione dell’orifizio capezzolare può essere messo in relazione con eventuali difetti dell’impianto di mungitura. È altresì noto che lo stadio della lattazione e l’età degli animali, intesa come numero di lattazioni effettuate, sono significativamente associate al rischio di mastite. In particolare è dimostrato che, anche per *S. aureus*, negli stadi avanzati della lattazione il rischio aumenta, così come aumenta con l’aumentare del numero di lattazioni. Lo scopo di queste registrazioni è stato quello di ridurre al minimo gli errori di valutazione della contagiosità dei ceppi di *S. aureus* circolanti in allevamento, a causa di carenze igieniche o di problemi nell’impianto e nella routine di mungitura.

Scelta delle aziende

In base ai risultati delle analisi effettuate al primo campionamento su pool dei quattro quarti, sono state selezionate le 16 aziende **(8+8) che rappresentavano i**

due estremi della prevalenza di infezione, quelle ad alta prevalenza in cui l’ipotesi era della circolazione di ceppi di *S. aureus* altamente patogeni e contagiosi (**aziende caso**) e quelle a bassa prevalenza nelle quali l’ipotesi era della circolazione di ceppi poco patogeni e contagiosi (**aziende controllo**). L’analisi delle condizioni ambientali ed i rilievi clinici (*Hygiene score* e *Teat score*) (box 3.1) hanno evidenziato che le 16 aziende selezionate erano caratterizzate da un livello uniforme di gestione della biosicurezza specifica delle mastiti e in tal senso si è potuto concludere che **non vi fosse una influenza significativa dei fattori ambientali e manageriali sulla successiva analisi dei risultati**. I due gruppi di aziende non presentavano neppure differenze significative per numero di lattazioni (LN).

Secondo campionamento

Il secondo campionamento previsto dal progetto ha riguardato **le 8 aziende caso e le 8 controllo**. Le bovine risultate positive per *S. aureus* al primo campionamento e ancora presenti in azienda, sono state ricampionate dopo 1-3 settimane per singolo quarto per un nuovo esame batteriologico finalizzato all’isolamento dei ceppi di *S. aureus* da sottoporre a caratterizzazione molecolare e per la creazione della biobanca. Nelle aziende “controllo”, 23 su 28 bovine risultate positive per *S. aureus* al primo campionamento sono state ricampionate per singolo quarto per un totale di 89 quarti mammari. Nelle aziende “caso” 358 su 366 bovine positive sono state ricampionate per singolo quarto per un totale di 1.402 quarti mammari. In totale sono stati oggetto del secondo campionamento **381 animali e 1.491 quarti mammari: 379 sono risultati nuovamente positivi per *S. aureus* su almeno uno dei 4 quarti mammari** (21 su 23 nelle aziende controllo e 358 su 358 nelle aziende caso).

Nelle aziende “controllo” sono risultati positivi 24 quarti mammari su 89 (27%) e 5 vacche su 21 sono risultate positive per *S. aureus* su più di un quarto mammario (23,8%). **Nelle aziende “caso” sono risultati positivi 626 quarti su 1402 campionati (44,6%)** e 186 su 358 vacche sono risultate positive su più di un quarto (45,3%).

Caratterizzazione molecolare dei ceppi di *S. aureus*

La genotipizzazione di *S. aureus* isolato da latte di bovine mastitiche consente di capire come si diffonde questo patogeno all’interno dell’allevamento. La conoscenza dei

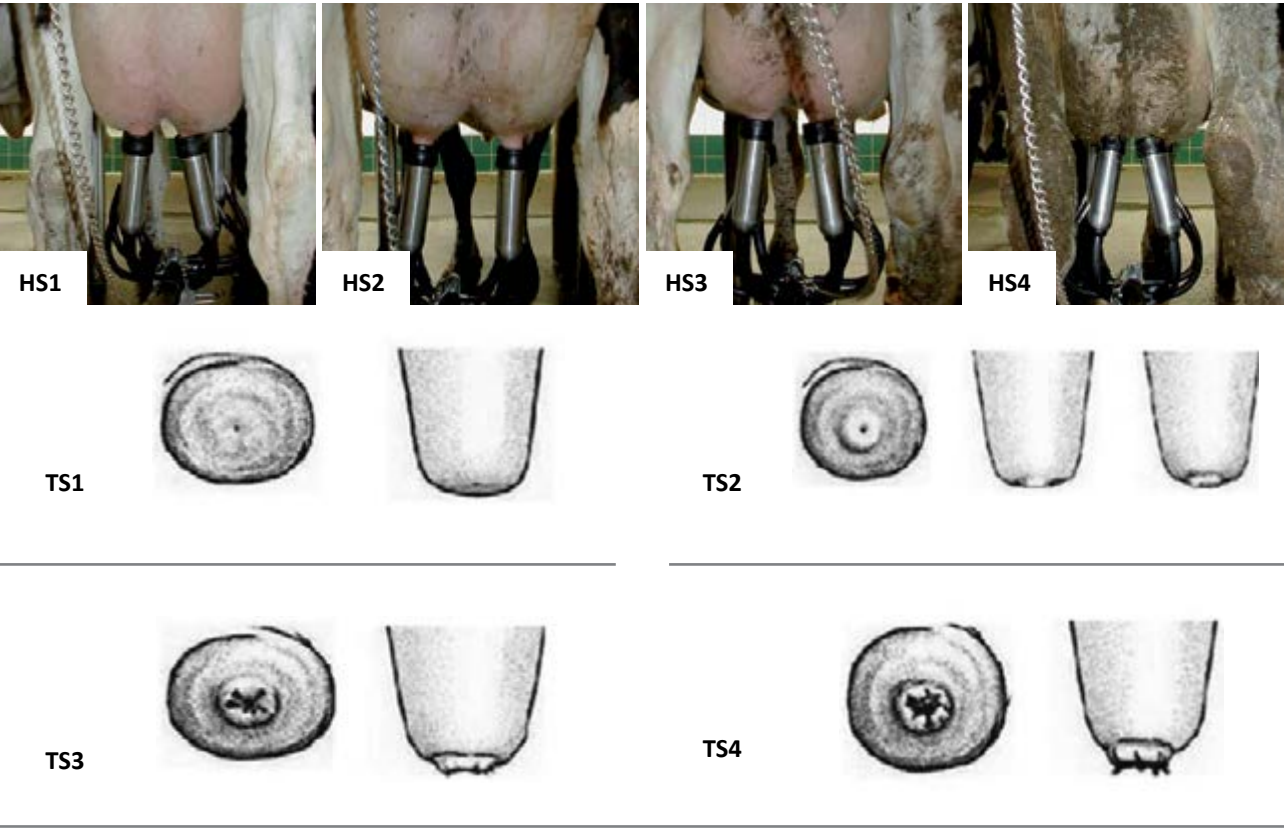
Box 4.1 - Indici di valutazione

Numero di Lattazioni (LN, Lactation Number) Si tratta di un valore medio ottenuto calcolando il numero di lattazioni, compreso quella in corso, delle vacche presenti in azienda al momento della rilevazione.

Pulizia della mammella (HS, Hygiene Score) Si tratta di una valutazione semi-quantitativa del livello di igiene della mammella, valutato in sala di mungitura per un numero significativo di animali per ciascuna mandria. Si basa sulla presenza e sulla estensione dell’imbrattamento fecale o da lettiera dell’apparato mammario. La valutazione è basata su un punteggio (Score) a 4 livelli, nel quale il primo livello corrisponde ad un livello ottimale di igiene con una virtuale assenza di residui fecali (HS1), fino ad arrivare al livello (HS4) dove oltre il 50% della cute della mammella e degli arti posteriori è vistosamente imbrattata.

Condizioni dei capezzoli (TS, Teat Score) Si tratta di un esame dei 4 capezzoli delle vacche effettuato in sala di mungitura, con riferimento al colore della cute come espressione dello stato di vascolarizzazione del capezzoli, dello stato della cute per presenza di indurimento o fessurazioni e dello stato dell’orifizio capezzolare riferito alla presenza ed al grado di ipercheratosi. Il punteggio a 4 livelli da noi utilizzato è riferibile a quest’ultimo aspetto visibile come una presenza di un anello lieve di retrazione cutanea (livello TS1 e TS2), fino alla presenza di gravi deformazioni dell’orifizio capezzolare per presenza di marcata ipercheratosi (TS4).

Gli schemi di punteggiatura utilizzati per la valutazione delle condizioni igieniche della mammella (Hygiene score) e delle condizioni di salute dei capezzoli (Teat score), sono quelli proposti dal National Mastitis Council, esemplificati in figura.



Punteggi di valutazione dell’igiene della mammella (HS) e della condizione dei capezzoli (TS) espressi come valori medi per ciascuna azienda e come percentuale di animali presenti che hanno ottenuto un punteggio sfavorevole (HS4, TS4). Esemplificazione dei sistemi di punteggio utilizzati per la valutazione dell’igiene della mammella (Hygiene Score - HS) e delle condizioni dei capezzoli (Teat Score - TS)

Box 4.2 - Metodiche di genotipizzazione

Elettroforesi pulsata su gel di agarosio (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE): è considerata la tecnica di riferimento per la genotipizzazione. Il DNA del patogeno viene tagliato con specifici enzimi di restrizione che lo frammentano in un numero limitato di parti generalmente compreso tra 10 e 25. Questi frammenti vengono quindi separati in base alla loro dimensione con una corsa elettroforetica pulsata.

RS-PCR (Repetive Sequence - PCR): si basa sull'amplificazione del DNA presente tra i geni che codificano per l'r-RNA 16S e l'r-RNA 23S. I profili così ottenuti vengono poi confrontati con un database che consente di risalire al genotipo del campione analizzato.

Spa typing: consiste nella tipizzazione per sequenziamento di un singolo locus, una regione del gene codificante per la proteina A di *S. aureus*.

Multilocus Sequence Typing (MLST): si basa sull'analisi di sequenza di 7 diversi geni costitutivi di *S. aureus*.

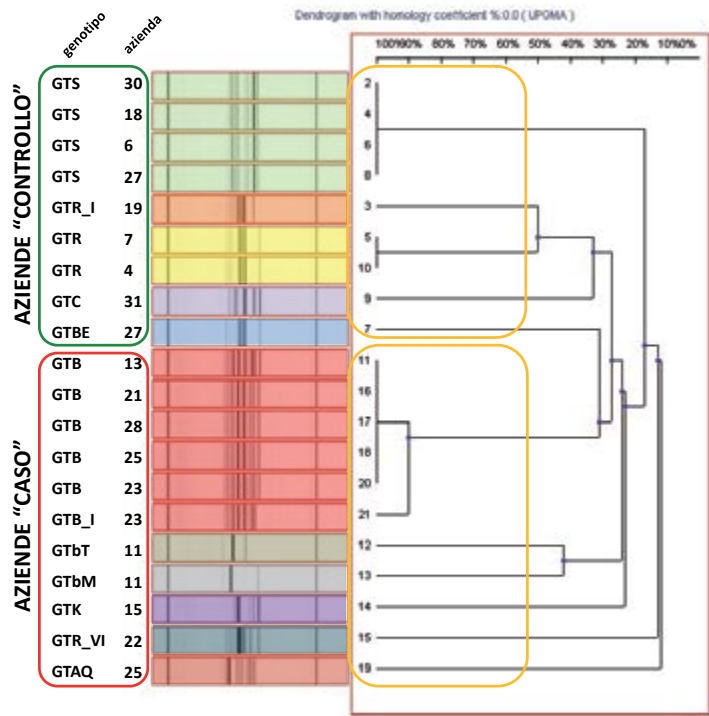
Ribotipizzazione: permette l'identificazione e la caratterizzazione rapida di una vasta gamma di batteri, discriminando anche i singoli ceppi, attraverso l'analisi delle differenze genomiche degli rRNA.

Multiplex PCR: consente di caratterizzare i diversi ceppi analizzando i geni associati ai fattori di virulenza e patogenicità.

RS-PCR

Per una prima caratterizzazione molecolare dei ceppi di *S. aureus* è stato utilizzato il metodo di genotipizzazione RS-PCR. I profili ottenuti sono stati confrontati con un database per risalire al genotipo del campione in esame. L'analisi dei 650 isolati (24 dalle aziende "controllo", 626 dalle aziende "caso") ha mostrato la presenza di cinque profili differenti nelle stalle "controllo" e sei differenti profili nelle stalle "caso" (Figura 4.2).

Figura 4.2



Dendrogramma di similarità dei profili RS-PCR ottenuti dall'analisi dei ceppi di *S. aureus* isolati nelle 8 aziende "controllo" e aziende "caso". Nelle aziende caso si evidenzia un'alta prevalenza di rilevamenti del ceppo Genotipo B (in rosso).

Nelle aziende "controllo" erano circolanti i genotipi S, R_I, C, R e BE. Di questi il genotipo S è risultato il più frequente in quanto presente in quattro delle otto aziende analizzate. Nelle aziende "caso" è stata evidenziata la presenza in particolare del genotipo B che è risultato essere predominante nelle aziende "caso" in quanto identificato in cinque delle otto stalle analizzate (con una percentuale complessiva dello 66,1%).

Sulla base dei risultati ottenuti è stato selezionato un sottoinsieme di 55 ceppi rappresentativi delle stalle "caso" e "controllo".

Questi ceppi sono stati analizzati utilizzando le altre tecniche molecolari disponibili per verificare la capacità della RS-PCR di discriminare tra i ceppi.

PCR multiplex

Tutti i 650 ceppi di *S. aureus* sono risultati positivi per i geni codificanti per la termonucleasi (*nuc*) e per la coagulasi (*coa*), geni costitutivi di *S. aureus* che confermano che i ceppi analizzati siano effettivamente appartenenti alla specie *S. aureus*.

Il DNA estratto dai 55 ceppi rappresentativi delle aziende "caso" e "controllo" è stato quindi analizzato per verificare la presenza di geni associati ai fattori di

virulenza e patogenicità (Box 4.3).

Tutti i 55 campioni sono risultati positivi per i geni codificanti per la leucotossina E (*lukE*), per il gene *cna* e per il gene PVL-ED e negativi per altri fattori di virulenza. Il 100% e il 40% dei ceppi isolati rispettivamente dalle aziende "caso" e "controllo" presentavano due o più geni codificanti per differenti enterotossine.

L'analisi dei geni *fmbb*, *scn* e *chp* non ha mostrato una differenza significativa tra gli isolati provenienti dalle stalle "controllo" e quelli provenienti dalle aziende "caso", in quanto rispettivamente il 92,7%, il 49% e il 70,9% dei ceppi analizzati possiede questi specifici geni.

Multi Locus Sequence Type (MLST)

Il Multi Locus Sequence Type (MLST) è un metodo di caratterizzazione con elevato potere discriminante per differenziare tra loro isolati diversi e per permettere allo stesso tempo di studiare le relazioni evolutive tra gli isolati e classificarli in "SequenceTypes" (ST). Si basa sull'analisi di sequenza di sette diversi geni costitutivi di *S. aureus*. Differenti sequenze contraddistinguono alleli diversi di questi geni, e ciascun isolato viene identificato da un determinato profilo allelico. L'analisi viene svolta

Box 4.3 - Geni testati con PCR multiplex

I geni codificanti per la coagulasi (*coa*) e per la proteina A (*spa*) sono polimorfici. Le differenze presenti in questi poliformismi possono essere un valido marcatore per la caratterizzazione dei ceppi di *S. aureus* nelle indagini epidemiologiche.

I geni codificanti per la sindrome da shock tossico (*tsst*).

I geni codificanti per le tossine esfoliative A (*eta*) e B (*etb*), responsabili di lesioni a livello della cute.

I geni codificanti per le leucotossine E (*LukE*), *LukE-LukD* e *LukM*, proteine in grado di promuovere la diffusione del microrganismo nei tessuti.

I geni codificanti per la Pantone Valentine leucocidina (*LukS-LukF/PV*), tossina che agisce a livello dei neutrofili e macrofagi determinando l'insorgenza di lesioni dermo-necrotiche.

Il gene codificante per il clumping factor (*clfA*), proteina di membrana in grado di legarsi al fibrinogeno.

Il gene per la meticillina resistenza (*mecA*).

Il gene codificante per gli inibitori della fagocitosi (*scn*).

I geni codificanti per le enterotossine *sea*, *seb*, *sec*, *see*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sel*. Le enterotossine sono in grado di resistere ai processi di pastorizzazione e sterilizzazione del latte e, se ingerite determinano un'intossicazione alimentare.

Il gene codificante per la stafilocinasi (*sak*), che in fase di infezione interagisce con le proteine difensive dell'ospite riducendone le proprietà battericide.

Il gene codificante per una proteina di membrana associata all'antibiotico resistenza (*fmbB*).

Il gene codificante per la risposta alle chemochine (*chp*).

Il gene codificante per una collagen binding-protein (*cna*), fattore di virulenza che favorisce l'adesione batterica.

definendo dei “Complessi Clonali” (CC), ovvero gruppi di ceppi accomunati dall’identità di sequenza per un certo numero di loci.

Sono stati amplificati e sequenziati i seguenti sette geni: carbamate kinase (arcC), shikimate dehydrogenase (aroE), glycerol kinase (glpF), guanylate kinase (gmk), phosphate acetyltransferase (pta), triosephosphate isomerase (tpi) and acetyl coenzyme A acetyltransferase (yqil).

L’analisi mediante MLST sul subset di 55 ceppi rappresentativi delle aziende “caso” e “controllo” ha permesso di identificare sei differenti Sequence Type (ST) nelle aziende “controllo” e cinque ST nelle aziende “caso”. Nove isolati delle aziende “controllo” appartenevano al ST398 (16,4 %) mentre 21 isolati dalle aziende “caso” al ST8 (38,2%).

IDENTIBAC-MRSA array

Il kit commerciale “S. aureus Genotyping Kit 2.0 array” viene utilizzato per l’identificazione, attraverso l’analisi di 336 geni, di fattori di patogenicità e resistenza agli antibiotici e ai disinfettanti, che possono essere presenti nei ceppi di S. aureus. Grazie a questa caratterizzazione molecolare, i ceppi analizzati vengono assegnati ad un Complesso Clonale (CC), che comprende batteri con genotipi strettamente correlati, analogamente a quanto avviene per MLST.

Un dato emerso dall’analisi dei 55 ceppi è l’elevata sensibilità alla maggior parte degli antibiotici fatta eccezione per il β-lattamici; infatti 8 ceppi (14,5%) sono risultati meticillino-resistenti (MRSA). La maggior parte dei ceppi meticillino sensibili apparteneva al CC8 (38%), mentre la maggior parte dei ceppi resistenti al CC398 (9%).

Ribotipizzazione

La ribotipizzazione viene eseguita con lo strumento RiboPrinter® e analizza le differenze nei frammenti genomici ottenuti dalla digestione enzimatica degli operoni rRNA presenti in numerose copie sul cromosoma batterico. Il risultato della ribotipizzazione dei 55 ceppi di S. aureus è illustrato nella figura 4.3.

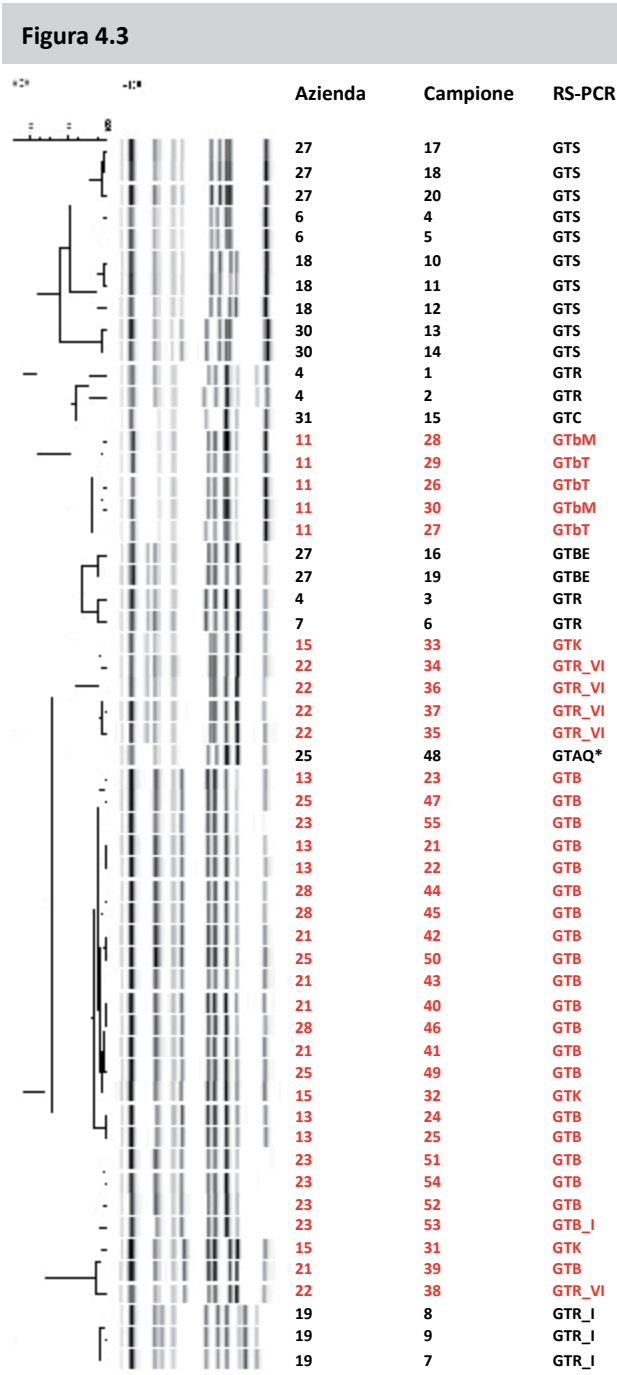
PFGE

La PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) è una tecnica in grado di separare frammenti di DNA ad alto peso molecolare (fino a 10 Mb), ottenuti in seguito a digestione con enzimi di restrizione. Questa metodica consente di identificare i batteri dal punto di vista genotipico ed è considerata la tecnica di riferimento per l’elevata capacità differenziale e l’ottima riproducibilità,

pur richiedendo tempi di esecuzione mediamente lunghi (fino ad alcuni giorni) e una certa perizia tecnica da parte dell’operatore.

MALDI-TOF

La caratterizzazione proteomica dei microrganismi attraverso il confronto di profili proteici ottenuti mediante la tecnologia MALDI-ToF è sempre più utilizzata



Esempio di dendrogramma di similarità. I ceppi di S. aureus ottenuti per ribotipizzazione sono messi a confronto con i risultati della RS-PCR. I ceppi isolati nelle aziende “caso” sono indicati in rosso. Analoghi dendogrammi sono stati realizzati per tutte le metodiche utilizzate all’interno del progetto.

in diagnostica clinica in quanto permette di ottenere una rapida identificazione batterica a basso costo.

La caratterizzazione in MALDI-ToF dei 55 ceppi di S. aureus ha permesso di costruire un dendrogramma di similarità solo parzialmente sovrapponibile a quello ottenuto da una classificazione molecolare, come ad esempio la RS-PCR. Ciò nonostante, pur non essendo possibile distinguere con questo metodo i ceppi aventi alta e bassa diffusività nell’allevamento, è comunque da notare come i ceppi di S. aureus circolanti in ogni allevamento vengano clusterizzati insieme.

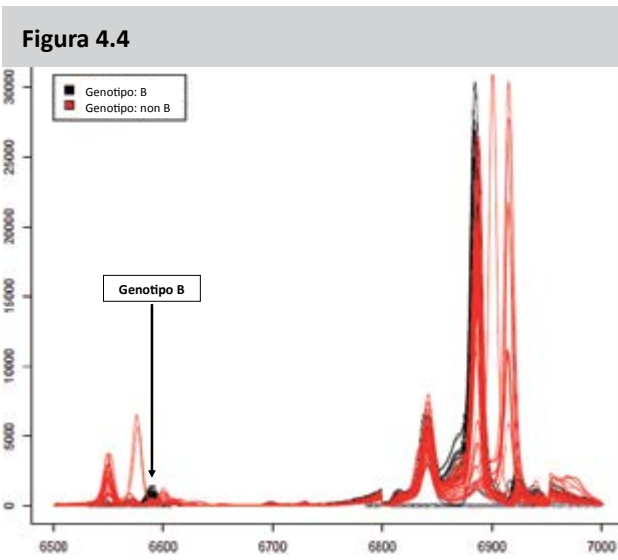
È stata inoltre condotta la ricerca di marcatori differenzialmente espressi nei soli ceppi appartenenti al genotipo B (maggiormente diffuso negli allevamenti “caso”). L’analisi ha permesso di ottenere un marcatore proteico a 5.9 KDa che è prevalentemente espresso nei ceppi aventi genotipo B (Figura 4.4).

Analisi comparativa dei risultati ottenuti

I metodi di genotipizzazione utilizzati per la caratterizzazione molecolare dei ceppi (PFGE, Ribotipizzazione, MLST, IDENTIBAC e RS-PCR) hanno evidenziato tutti un elevato potere discriminante e sono stati tutti in grado di distinguere i ceppi fra di loro, raggruppandoli per similarità in modo coerente con la variabilità biologica attesa e con risultati in linea di massima sovrapponibili. In particolare, i ceppi provenienti da mastiti contagiose diffuse nella stessa azienda sono stati correttamente raggruppati insieme. Tutti i metodi utilizzati si sono dimostrati validi per studi di epidemiologia molecolare finalizzati al riconoscimento e alla tracciabilità di ceppi. Questi dati possono dunque essere utilizzati per ipotizzare l’origine del contagio, ad esempio un acquisto incauto di animali infetti, oppure per stabilire a distanza di tempo se, dopo una apparente eradicazione della mastite, una nuova ricomparsa è frutto di una reintroduzione dall’esterno o di una recrudescenza di infezioni croniche subcliniche.

Dei metodi considerati, la PFGE rappresenta il “Gold standard” per la genotipizzazione dei batteri in generale, essendo un sistema potenzialmente applicabile ed economicamente accessibile per tutti i laboratori attrezzati per tecniche di biologia molecolare, pur prevedendo un procedimento di preparazione del campione poco standardizzabile in quanto basato su procedure interamente manuali.

La Ribotipizzazione, al contrario, è un sistema molto più standardizzato la cui applicazione è subordinata alla



Comparazione degli spettri di massa tra i ceppi di S. aureus appartenenti al genotipo B e non B.

disponibilità di una apparecchiatura (RiboPrinter®) e di consumabili estremamente costosi.

Attualmente a livello internazionale il metodo di elezione per la genotipizzazione di molti batteri, compreso quelli appartenenti al genere Stafilococco, è la MLST. Anch’esso risulta però piuttosto complesso e costoso, se effettuato su un elevato numero di campioni, oltre che lungo nella preparazione.

Una valida alternativa è rappresentata dalla caratterizzazione mediante IDENTIBAC, in grado di fornire una panoramica completa dei fattori di patogenicità dei ceppi e di raggrupparli in complessi clonali come la MLST. L’aspetto negativo è rappresentato dal costo della singola analisi.

A differenza delle tecniche sopra descritte, il metodo RS-PCR presenta il notevole vantaggio di essere basato su una semplice reazione di PCR e quindi rapido e relativamente poco costoso. Questa metodica richiede l’interpretazione del dato con un software disponibile presso i partner del presente progetto. I risultati ottenuti indicano che la RS-PCR ha dimostrato di avere lo stesso potere discriminante delle altre metodiche citate, ma, avendo costi inferiori può essere utilizzata su grandi numeri ed applicato in modo routinario. I risultati ottenuti sono stati utilizzati per sviluppare un sistema per l’individuazione di sottotipi genetici di S. aureus associati alle forme di infezione più grave e maggiormente diffusiva o per indagini di tipo epidemiologico. I test sono applicabili a colture di S. aureus ottenute da latte di singole bovine o dal latte di massa aziendale, partendo dal presupposto che i ceppi di S. aureus ottenuti dal latte di massa siano rappresentativi di quelli all’origine delle Infezioni Intra-Mammarie (IMI).

Pannello diagnostico Mastfield

I risultati ottenuti hanno confermato che la RS-PCR è in grado di identificare con precisione la presenza di ceppi di *S. aureus* ad elevata diffusività appartenenti al genotipo B. Questo genotipo è stato rintracciato in ben 5 degli 8 allevamenti “caso”, mentre è risultato sempre assente da quelli “controllo”.

Questa tecnica risulta pertanto un buon metodo per identificare ceppi ad alta virulenza e diffusività e, grazie ai suoi costi contenuti (circa 10 Euro) e alla sua semplicità può essere utilizzata rutinariamente per questo tipo di indagine.

Anche altri metodi hanno dimostrato di essere in grado di rintracciare i ceppi di *S. aureus* appartenenti al genotipo B. Infatti tutti i ceppi isolati dalle aziende “caso”, indipendentemente dal genotipo RS-PCR o dal *Sequence Type*, analizzati con Multiplex PCR, risultavano possedere geni codificanti per le enterotossine e presentavano polimorfismi genetici anch’essi caratteristici di ceppi patogeni e diffusivi.

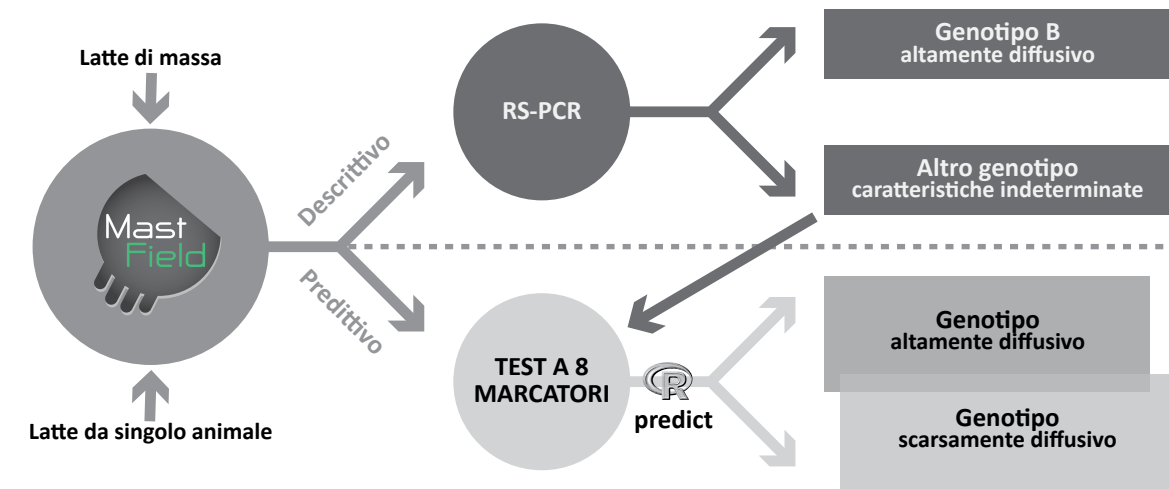
Un software diagnostico

I risultati ottenuti con le analisi di Multiplex PCR (pannello di 19 geni) e con l’array IDENTIBAC-MRSA (pannello di 336 sonde) hanno permesso di individuare profili genetici riconducibili, con elevata probabilità, a situazioni di alta diffusibilità (situazione delle aziende “caso”) piuttosto che a diffusione sporadica (situazione delle aziende “controllo”).

Trattandosi di metodiche costose all’interno del progetto Mastfield è stato sviluppato, applicando tecniche statistiche *ad-hoc*, un sistema con un ridotto numero di marcatori da poter utilizzare come predittori per classificare un campione di *S. aureus* come patogeno e altamente diffusivo. Nel caso del pannello utilizzato per la multiplex PCR, si è riusciti a ridurre il numero di marcatori ad 8, mentre nel caso dell’IDENTIBAC MRSA array, il numero di marcatori è stato ridotto a 53.

Il software sviluppato (Figura 4.5), utilizzando il pannello da 8 marcatori, è in grado classificare un ceppo di *S. aureus* come patogeno e altamente diffusivo con una probabilità del 90%, mentre attraverso il pannello IDENTIBAC ridotto la probabilità è leggermente più alta (91%), ma al tempo stesso la probabilità di ottenere un

Figura 4.6



Schema di accertamenti diagnostici sviluppato all’interno del progetto MastField per i ceppi isolati in aziende sia da latte di singoli animali con mastite sia da latte di massa. Gli accertamenti possono prevedere uno screening rapido con RS-PCR (Descrittivo), in grado di evidenziare direttamente la presenza del genotipo B sicuramente altamente diffusivo. E’ possibile prevedere anche un test con 8 marcatori (Predittivo) in grado di predire, probabilisticamente, la presenza di un genotipo altamente diffusivo (anche diverso dal genotipo B).

falso positivo è del 5%, contro lo 0,1% di falsi positivi del pannello con 8 marcatori.

Applicazione in campo

Sia la metodica RS-PCR che il pannello ridotto di 8 marcatori (che sono correlati a vari fattori di virulenza e antibiotico-resistenza) **permettono un utilizzo in campo per classificare un ceppo di *S. aureus* come patogeno e altamente diffusivo.**

In particolare, il pannello con 8 marcatori, ora in corso di validazione su di numero di allevamenti più ampio rispetto a quelli coinvolti nel progetto, può essere utilizzato a scopi predittivi in allevamento fornendo informazioni importanti per la gestione della salute della mandria. In caso di presenza di ceppi molto aggressivi è necessario attivare misure di controllo più stringenti come la separazione dei capi positivi da quelli negativi, il trattamento antibiotico mirato e programmato dei capi infetti e una attenta revisione della routine di mungitura, oltre ad un controllo approfondito del corretto funzionameto dell’impianto di mungitura.

In figura 4.6 è rappresentato uno schema di accertamenti diagnostici sui ceppi isolati in aziende da latte di singoli animali con mastite o da latte di massa può prevedere quindi uno **screening rapido con RS-PCR**, in grado di **evidenziare direttamente** (descrittivo) il genotipo B sicuramente diffusivo.

È comunque possibile anche eseguire **un test predittivo**

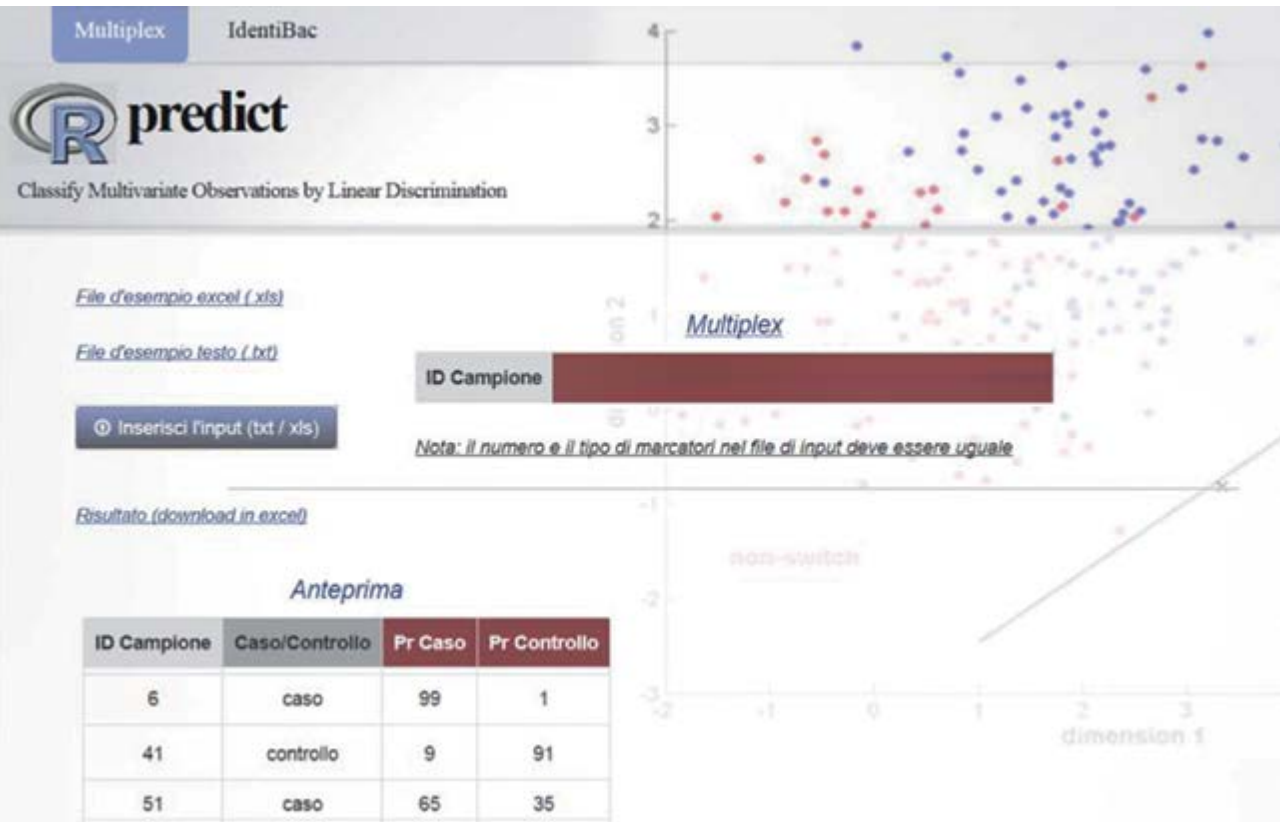
basato sull’utilizzo del pannello ridotto di 8 marcatori e del software interpretativo appositamente sviluppato nel corso del progetto MastField.

Altri Obiettivi

Il progetto MastField ha raggiunto anche altri due obiettivi secondari portando alla creazione di:

- **Una bio-banca contenente sia il DNA e il sangue degli animali studiati, sia i ceppi e il DNA di tutti gli *S. aureus* isolati** e caratterizzati durante lo svolgimento del progetto. I **1.200 campioni di sangue e i DNA** estratti degli animali campionati all’interno dell’Obiettivo 1 sono conservati nella BioBanca di Lodi (in comune tra Parco Tecnologico e CNR), mentre i **ceppi vitali e il DNA di 650 *S. aureus* isolati nelle aziende** selezionate come caso e controllo e campionate per l’Obiettivo 2 sono conservati nella biobanca di IZSLER insieme ai **294 ceppi di *S. aureus* isolati nelle aziende non selezionate per lo studio finale.** Tutti questi campioni sono disponibili per ulteriori indagini che dovessero venire suggerite dai risultati ottenuti o per allargarle in funzione della disponibilità di nuovi finanziamenti.
- **Un database contenente tutte le informazioni epidemiologiche raccolte nelle aziende sotto studio.** Il database contiene tutti i dati registrati dal sistema

Figura 4.5



Un esempio di risultato con tre campioni. Il campione 6 è stato identificato come altamente contagioso (“caso”) con una probabilità del 99%, così come il campione 41 è stato invece classificato come a bassa contagiosità (“controllo”) con una probabilità del 91%. Il campione 51 è invece un campione “dubbio” in quanto ha una probabilità di solo 65% di essere campione altamente contagioso (“caso”), spetta a quel punto al veterinario e all’allevatore decidere se proseguire le indagini con altri metodi o se non adottare ulteriori misure.

delle APA e dei “controlli funzionali” (elenco dei dati produttivi e riproduttivi di ogni animale) registrati nel periodo considerato. In aggiunta, per le aziende indagate per l’Obiettivo 2, sono registrati i dati sulle caratteristiche generali degli allevamenti e sul management aziendale, con particolare riferimento all’igiene degli ambienti di allevamento, alla sanità

della mandria e alla igiene e routine di mungitura. Sono raccolti nel database anche i risultati degli esami batteriologici del latte di ciascun animale/quarto mammario campionato, il relativo conteggio delle cellule somatiche e i punteggi registrati relativi alla pulizia della mammella e alle condizioni dei capezzoli (*hygiene score* e *teat condition score*).

E’ possibile approfondire gli aspetti tecnici delle analisi svolte e dei risultati ottenuti consultando il Rapporto di Ricerca del progetto disponibile sul sito di Regione Lombardia:
www.agricoltura.regione.lombardia.it

Conclusioni

Uno dei problemi rilevanti nell'allevamento delle bovine da latte è la mastite, patologia infiammatoria che colpisce l'apparato mammario delle bovine, che provoca ricadute negative dal punto di vista sanitario con effetti significativi anche sui bilanci aziendali. I costi non si limitano infatti ai soli interventi sanitari, ma interessano anche il livello qualitativo della produzione di latte. Nella realtà italiana è stato stimato che la perdita di produzione per mastiti cliniche, che negli allevamenti da latte si stima colpisca il 20-40 % delle vacche presenti in stalla durante l'anno, può ammontare a 1,8 quintali per lattazione, con costi variabili dai 50 ai 350 euro all'anno per capo in base all'entità dell'infezione. Il latte derivato da bovine affette da mastite ha inoltre parametri qualitativi più bassi con conseguenze negative sulla stabilità ai trattamenti termici e sulla resa alla caseificazione. Ulteriori costi sono dovuti alla gestione e all'eliminazione anticipata degli animali infetti. La mastite incide per il 15-20% sulle cause di riforma anticipata delle bovine. Tutte queste problematiche si inseriscono nell'ambito di un contesto europeo che spinge verso una maggiore attenzione nei confronti del benessere animale oltre che verso una maggior qualità e sanità del prodotto latte e derivati. Nella maggioranza dei casi però la mastite si presenta in forma subclinica con costi ancora spesso sottostimati.

L'attività del progetto Mastfield ha utilizzato **due approcci metodologici distinti, ma complementari**, per ridurre l'incidenza della mastite nelle bovine da latte. Nell'ambito del progetto, sono stati validati su bovine di razza Frisona allevate in Lombardia **marcatori genetici associati alla presenza di alti valori di Conta delle Cellule Somatiche (CCS)**, che rappresentano un valido indicatore indiretto di resistenza o suscettibilità alle mastiti, e, contemporaneamente, è stato messo a punto **un test per la diagnosi diretta di patogenicità di *S. aureus***, il più importante e diffuso patogeno intramammario, dal latte di bovina e dal latte di massa.

Primo Obiettivo

In questi anni, diversi studi di associazione genetica sono stati finalizzati a individuare e caratterizzare le varianti genomiche alla base della suscettibilità di un bovino alla mastite. **Il carattere fenotipico maggiormente utilizzato per la mastite è la conta delle cellule somatiche (CCS)**. Le mastiti di natura subclinica sono, infatti, associate al rialzo persistente della conta delle cellule somatiche, la cui rilevazione costituisce un parametro molto affidabile da utilizzare negli studi genetici. Il primo obiettivo ha riguardato in questo contesto la **validazione in campo di 26 marcatori SNP**, ossia differenze di singole basi del DNA, **localizzati sui cromosomi 1, 2, 6, 14,15, 16, 18 e 28** su bovine che presentavano valori persistentemente alti o bassi di CCS. Questi 26 marcatori del DNA, per la maggior parte identificati all'interno di due precedenti progetti di ricerca, SelMol e Pro.Zoo, sono stati testati su 1.200 bovine da latte nelle quali era stata messa in evidenza una conta di cellule somatiche o persistentemente alta o persistentemente bassa. Il progetto ha permesso di raccogliere indicazioni importanti non solo per la selezione di animali meno suscettibili alla mastite, ma anche per la gestione della patologia in campo. In particolare, all'interno del primo obiettivo realizzativo si sono ricavate tre informazioni rilevanti:

I costi della mastite: se i costi della mastite clinica, come si è visto, sono per lo più noti e studiati, meno indicazioni sono disponibili per quelli legati alla mastite subclinica che però porta ugualmente a perdite produttive significative e spesso sottostimate. Sulla base dei dati raccolti all'interno del progetto e appositi modelli matematici è stato possibile stimare il costo per l'allevatore, legato alla minor produzione di un animale affetto da mastite anche subclinica, sulla base dei suoi valori di CCS. Nel caso di una vacca primipara il costo è stimabile in 0.2€/giorno per ogni punto di *Linear Score*, un costo che raddoppia nel caso di una pluripara.

Gli effetti ambientali: le analisi hanno confermato che gli effetti ambientali giocano un ruolo decisivo nella comparsa e nel prosieguo dell'infezione. Questo impatto non è legato solo alla gestione di ogni singola stalla, ma è influenzato in maniera significativa anche dalla variabilità esistente da un giorno all'altro. Paradossalmente, pur utilizzando un test genetico come quello sviluppato da MastField, un allevatore potrebbe non ottenere comunque risultati apprezzabili



se la routine di mungitura non è ottimale. Riuscire a standardizzare al massimo le attività, in particolare in sala di mungitura, può consentire di ridurre anche del 50% la comparsa di questa patologia.

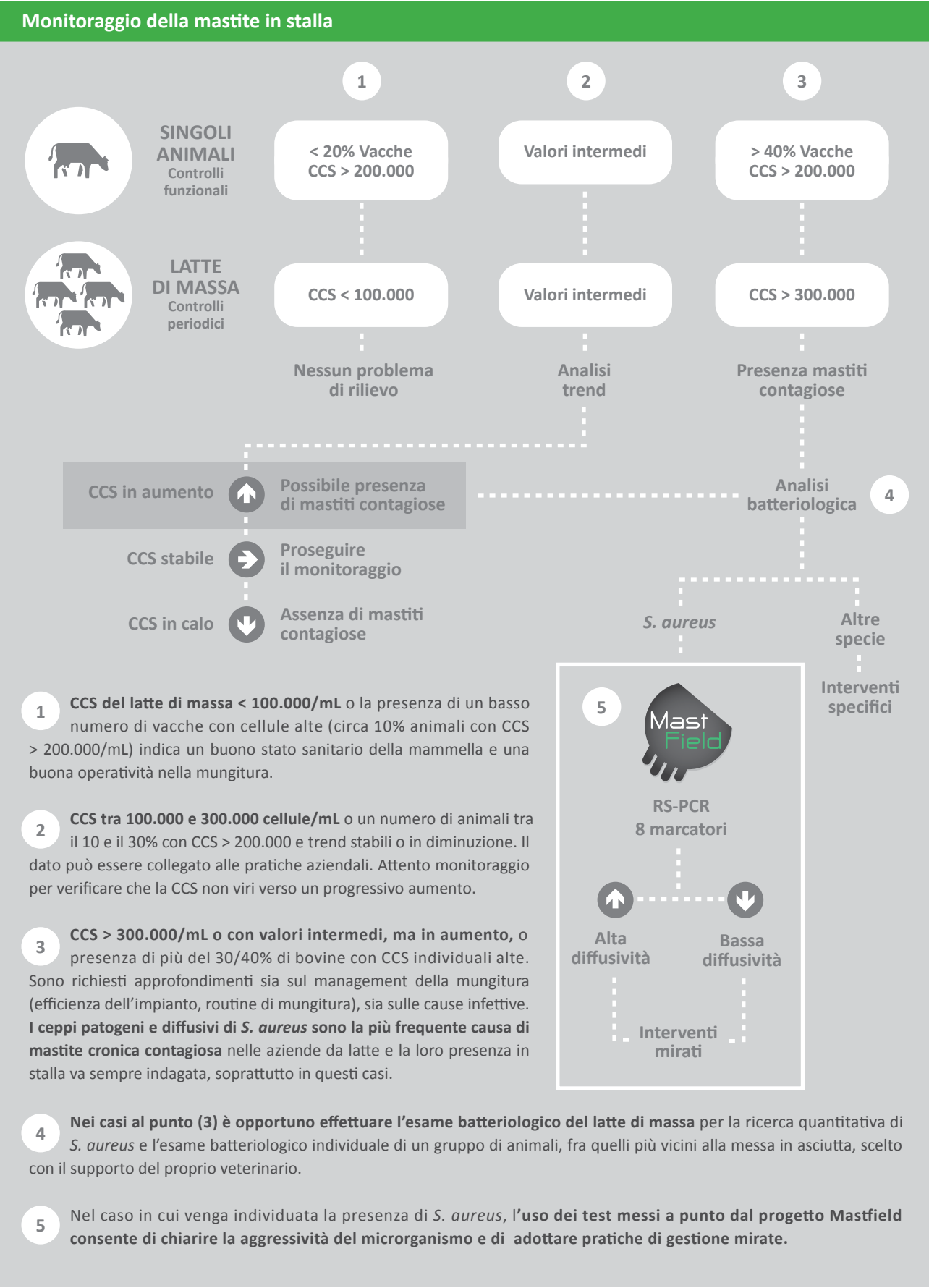
Il contributo dalla genetica: sebbene la componente ambientale sia predominante, anche la genetica può contribuire al controllo delle mastiti. Può farlo aiutando nell'identificazione degli animali più o meno suscettibili. Partendo dai risultati ottenuti in due precedenti progetti, ProZoo e SelMol, che avevano permesso di identificare 2 regioni cromosomiche sul cromosoma 6 e 14 collegate alla mastite, è stato possibile identificare 10 marcatori genetici che permettono di discriminare animali con maggiore o minore livello di cellule somatiche. Analizzando questi marcatori per le singole bovine in stalla, quali quelli disponibili presso i laboratori del Parco Tecnologico Padano di Lodi, è possibile conoscere il livello di predisposizione di un certo animale e quindi intraprendere azioni mirate per la gestione della mandria, ad esempio aumentando i controlli sugli animali più suscettibili, eliminando l'animale o accoppiandolo con un riproduttore adeguato. Questi marcatori possono quindi rappresentare uno strumento per coadiuvare l'allevatore nell'analisi dei suoi animali, indicando quei soggetti che geneticamente sono più o meno predisposti ad infezioni mammarie. In particolare i marcatori collegati al gene **DGAT1**, associato al contenuto in grasso e produzione di latte che ha dimostrato di essere correlato alla CCS, possono dare un'informazione che può essere utilizzata per la scelta dei tori da utilizzare. Molto interessanti sono risultati anche i marcatori associati al gene **SLC4A4** sul cromosoma 6, che codifica per una proteina coinvolta nella digestione e nell'assorbimento dei lipidi, influenzando la percentuale di grasso nel latte e la sua qualità. Il sistema di genotipizzazione per i marcatori qui descritti è stato ottimizzato ed è oggi disponibile presso la Piattaforma Genomica del Parco Tecnologico Padano che possiede il protocollo validato e il know-how necessario per fornire un servizio di analisi su richiesta ad un costo di poche decine di euro. Il sistema è utilizzabile anche da laboratori di biologia molecolare che abbiano in dotazione uno strumento di Real Time PCR. Il Parco sta inoltre lavorando allo sviluppo di un sistema che consenta anche l'analisi "sul campo".

Secondo Obiettivo

Il secondo obiettivo ha riguardato la messa a punto di un sistema diagnostico innovativo per il riconoscimento di sottotipi genetici di *S. aureus* associabili alle forme di infezione mammaria più grave e maggiormente diffusiva. All'interno di questo obiettivo il progetto ha dimostrato che sia la metodica RS-PCR che il test sviluppato a partire da 8 marcatori (correlati a vari fattori di virulenza e antibiotico-resistenza) permettono di classificare un ceppo di *S. aureus*, isolato dal latte di massa o di singolo animale, in base alla sua patogenicità e diffusività. Questo sistema si inserisce come **valore aggiunto al normale monitoraggio che gli allevatori operano attraverso i servizi di assistenza tecnica** alle aziende, come quello offerto dal SATA. I dati di produzione derivanti dal controllo periodico sul latte di massa, e i controlli periodici sui singoli animali effettuati con i controlli funzionali **consentono di tenere sotto controllo la salute della mammella**.

Lo **screening rapido con RS-PCR** consente di accertare se il genotipo di *S. aureus* in stalla appartiene al tipo B, sicuramente diffusivo. La presenza di genotipi diversi dal B rende sempre consigliabile la caratterizzazione attraverso il **test con 8 marcatori** e il software interpretativo appositamente sviluppato nel corso del progetto MastField, in qualità di test predittivo.

L'applicazione sistematica dei test ai ceppi di *S. aureus* isolati nel corso delle operazioni di monitoraggio periodico, è in grado di orientare le azioni degli allevatori, che dovranno operare con **particolare rigore in presenza di *S. aureus* sicuramente diffusivi**, mentre potranno considerare come **“falso allarme” quei ceppi di *S. aureus* con scarsa attitudine**



Bibliografia

AKineden O., et al. (2001). *Toxin genes and other characteristics of Staphylococcus aureus isolates from milk of cows with mastitis*. Clin Diagn Lab Immunol 8: 959-964

Ashwell, M. S., Da, Y., Van Tassell, C. P., Vanraden, P. M., Miller, R. H., and Rexroad, C. E. Jr. (1998). *Detection of putative loci affecting milk production and com- position, health, and type traits in a United States Holstein population*. J. Dairy Sci. 81, 3309-3314

Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC et al (2004). *Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit differential innate immune responses following intramammary infection*. Clin Diagn Lab Immunol 11: 463-472

Basim E. et Basim H. (2001). *Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology* Turk J Biol (2001) 25: 405-418

Benedetti V., et al. (2010). *Staphylococcus aureus meticillino-resistenti (MRSA) da campioni di latte bovino*. Large Animal Rev., 16: 67-70

Biscarini G, Biffani S, Morandi N, Nicolazzi EL, Stella A (2014) *Using Runs of Homozygosity to Detect Genomic Regions Associated with Susceptibility to Infectious and Metabolic Diseases in Dairy Cows under Intensive Farming Conditions*. Elares.

Bishop S. C., Doeschl-Wilson A.B. and Woolliams J.A. (2012). *Uses and implications of field disease data for livestock genomic and genetics studies*. Front.Gene. 3: 114

Bloemhof, S., de Jong, G., and de Haas, Y. (2009). *Genetic parameters for clinical mastitis in the first three lactations of Dutch Holstein cattle*. Vet. Microbiol. 134, 165-171

Bruce, J. L. (1996). *Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food*. Food Technol. 50: 77-81

Carlen, E., Strandberg, E., and Roth, A. (2004). *Genetic parameters for clini- cal mastitis, somatic cell score, and production in the first three lactations of Swedish Holstein cows*. J. Dairy Sci. 87, 3062-3070
Cartmell T, Ball C, Bristow AF, Mitchell D, Poole S (2003). *Endogenous interleukin-10 is required for the defervescence of fever evoked by local lipopolysaccharide-*

induced and Staphylococcus aureus induced inflammation in rats. J Physiol 549: 653-664

Cherkaoui, J. Hibbs, S. Emonet, M. Tangomo, M. Girard, P. Francois, J. Schrenzel (2010). *Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level*. J Clin Microbiol. 48: 1169-1175

Cremonesi P., et al. (2005). *Development of a multiplex PCR assay for the identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products*. Mol Cell Probes 19: 299-305

Croxatto A, Prod’hom G, Greub G. (2012). *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS Microbiol Rev.; 36: 380-407

Enright MC., et al. (2000). *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 38 (3): 1008-15

Fontanesi L, Calò DG, Galimberti G, Negrini R, Marino R, Nardone A, Ajmone-Marsan P, Russo V. (2014) *A candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle*. Anim Genet. doi: 10.1111/age.12164

Fournier C., et al. (2008). *Bovine Staphylococcus aureus: Association of virulence genes, genotypes and clinical outcome*. Res. Vet., 85: 439-448

G. James et al. (2013). *An Introduction to Statistical Learning: with Applications in R*, Springer Texts in Statistics 103

Graber HU., et al. (2009). *Mastitis-related subtypes of bovine Staphylococcus aureus characterized by different clinical properties*. J Dairy Sci 92 (4) 1442-1451

Hagnestam-Nielsen C., Emanuelson U., Berglund B., Strandberg E. (2009). *Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation*. J Dairy Sci. 92 (7): 3124-33

Harmsen D., et al. (2003). *Typing of methicillin-resistant*

Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. J Clin Microbiol., 41: 5442-5448.

Haveri M., et al. (2007). *Virulence genes of bovine Staphylococcus aureus from persistent and nonpersistent intrammary infections with different clinical characteristics*. J. Appl. Microbiol. 103, 993-1000.

Hayes and Goddard, *Genome* (2010). 53 (11): 876-83

Heringstad, B., Klemetsdal, G., and Ruane, J. (2000). *Selection for mastitis resis- tance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries*. Livest. Prod. Sci. 64, 95-106

Heyen, D. W., Weller, J. I., Ron, M., Band, M., Beever, J. E., Feldmesser, E., et al. (1999). *A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle*. Physiol. Genomics 1, 165-175.

Jarraud S., et al., (2002). *Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease*. Infect Immun 70: 631-641

Jerome Friedman, Trevor Hastie, Robert Tibshirani (2010). *Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent*. Journal of Statistical Software, 33 (1), 1-22. URL <http://www.jstatsoft.org/v33/i01/>

Jorgensen HJ., et al., (2005). *The occurrence of Staphylococcus aureus on a farm with small-scale production of raw milk cheese*. J. Dairy Sci. 88: 3810-3817

Kauf AC, Rosenbusch RF, Paape MJ, Bannerman DD (2007). *Innate immune response to intramammary Mycoplasma bovis infection*. J Dairy Sci 90: 3336-3348

Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, McDowall M, Shah HN. (2004). *Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases*. Infect Genet Evol.; 4: 221-42

L'allevamento bovino da latte (2006). ISMEA

Le mastiti costano molto all'allevatore (2006). Informatore Agrario

Majcherczyk PA. et al. (2006). *The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett., 255: 233-239

McClure JA., et al. (2006). *Novel multiplex PCR assay*

for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci. J Clin Microbiol 44: 1141-1144

Meredith, B. K., F. J. Kearney, E. K. Finlay, D. G. Bradley, A. G. Fahey, D. P. Berry and D.J. Lynn (2012). BMC Genetics 2012, 13: 21

Middleton J., et al. (2002). *Use of pulsedfield gel electrophoresis for detecting differences in Staphylococcus aureus strain populations between dairy herds with different cattle importation practices*. Epidemiol. Infect. 129: 387-395

Minozzi G., E.L. Nicolazzi, F. Strozzi, A. Stella, R. Negrini, P. Ajmone-Marsan and J. L. Williams (2011). *Genome wide scan for somatic cell counts in holstein bulls*. BMC Proceedings 2011, 5 (Suppl 4): S17

Minozzi G, Nicolazzi EL, Stella A, Biffani S, Negrini R, Lazzari B, Ajmone-Marsan P, Williams JL. (2013) *Genome wide analysis of fertility and production traits in Italian Holstein cattle*. PLoS One. 12;8(11).

Monday e Bohac (1999). *Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates*. J Clin Microbiol 37: 3411-3414

Moroni P., et al. (2009). *Chapter 18. Staphylococcus aureus*. In: “Molecular Detection of Foodborne Pathogens” by Dongyou Liu, CRC Press, Taylor & Francis

Mrode, R. A., and Swanson, G. J. T. (1996). *Genetic and statistical properties of somatic cell count and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle*. Anim. Breed. Abstr. 64, 847-857

NMC Research Committee. (2007). *Guidelines for Evaluating Teat Skin Condition*. <http://nmconline.org/docs/teatskincondguide.pdf>

O’Halloran F., et al. (2009). *Characterisation of single nucleotide polymorphisms identified in the bovine lactoferrin gene sequences across a range of dairy cow breeds*. Biochimie, 91: 68-75

Paape, M. J., Bannerman, D. D., Zhao, X., and Lee, J. (2003). *The bovine neu-trophil: structure and function in blood and milk*. Vet. Res. 34, 597-627

Pantoja J.C.F., et al. (2009). *Dynamics of somatic cell counts and intramammary infections across the dry period*. Preventive Veterinary Medicine, 90: 43-54

Patton, M. Q. (1990). *Qualitative evaluation and research*

methods (2nd ed.). Newbury Park, CA: Sage Publications

Piccinini R., et al. (2009). *The role of teat skin contamination in the epidemiology of Staphylococcus aureus intramammary infections*. J Dairy Res. 76 (1): 36-41

Pinto B., et al. (2005). *Identification and typing of food-borne Staphylococcus aureus by PCR-based techniques.* Syst Appl Microbiol 28: 340-352

Pintus MA, Nicolazzi EL, Van Kaam JBGHM, Biffani S, Stella A, Gaspa G, Dimauro C, Macciotta NPP (2013) *Use of different statistical models to predict direct genomic values for productive and functional traits in Italian Holsteins*. J Anim Breed Genet. 130(1):32-40

Pongolini (2005). *Lettera di informazione CEREV n. 60 - Giugno 2005*

Razze e animali da reddito allevate in Lombardia (2004). ARAL
Reneau JK., (1986) J Dairy Sci. 1986 Jun; 69 (6): 1708-
20. *Effective use of dairy herd improvement somatic cell
counts in mastitis control*

Ripley, B. D. (1996). *Pattern Recognition and Neural Networks*. Cambridge University Press

Rupp, R., and Boichard, D. (2003). *Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle*

Schreiner DA, Ruegg PL. (2003). *Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis*. J Dairy Sci. 86 (11): 3460-5

Schukken, Y. H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M. C., Goetze, L., Holst, O., et al. (2011). *Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows*. Vet. Immunol. Immunopathol. 144, 270-289

Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Animal Welfare (2009). EFSA Journal

Seegers H., et al. (2003). *Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds*. Vet. Res., 34: 475-491

Shook G. & A. Seaman (1983). *Relationship between SCC Linear Score (LS), Somatic Cell Count and Estimated Daily Milk Losses*. JDS 39 (12)

Sommerhauser J., et al. (2003). *The epidemiology of Staphylococcus aureus infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme*. Vet Microbiol. 2003 Oct 8; 96 (1): 91-102

Strandberg Lutzow Y et al. (2008). *Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to Staphylococcus aureus*

infection. BMC Veterinary Research, 4: 18

Sung JM., et al. (2008). *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. Microbiology 154: 1949-1959

Syring C., et al. (2012). *Bovine mastitis: the diagnostic properties of a PCR-based assay to monitor the Staphylococcus aureus genotype B status of a herd, using bulk tank milk*. J Dairy Sci 95 (7) 3674-3682

Venables, W. N. and Ripley, B. D. (2002). *Modern Applied Statistics with S. Fourth edition*. Springer.

Verbeke J., Piepers S, Peelma L, Van Poucke M, De Vlieghe S. (2012). *Pathogen-group specific association between CXCR1 polymorphisms and subclinical mastitis in dairy heifers*. J Dairy Res. 2012 Aug; 79 (3): 341-51

Verschoor CP, Pant SD, Schenkel FS, Sharma BS, Karrow NA. (2009). *SNPs in the bovine IL-10 receptor are associated with somatic cell score in Canadian dairy bulls. Mamm Genome*. Jul; 20 (7): 447-54

Verschoor CP, et al. (2009). *SNPs in the bovine IL-10 receptor are associated with somatic cell score in Canadian dairy bulls*. Mamm. Genome, 20: 447-454

Woese, C.R. (1987). *Bacterial evolution*. Microbiology Review 51: 221-271

Yang Y.C., et al. (2009). *Rapid identification of Staphylococcus aureus by surface enhanced laser desorption and ionization time of flight mass spectrometry*. J. Microbiol. Methods, 77: 202-206.

Yuan Z, Li J, Li J, Gao X, Xu S., (2013). *SNPs identification and its correlation analysis with milk somatic cell score in bovine MBL1 gene*. Mol Biol Rep. 2013 Jan; 40 (1): 7-12

Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Wellenbreg GJ, Gröhn YT, Schukken YH. (2001). *Cow- and quarter-level risk factors for Streptococcus uberis and Staphylococcus aureus mastitis*. J Dairy Sci. 84 (12): 2649-63

Zautner AE, Masanta WO, Tareen AM, Weig M, Lugert R, Groß U, Bader O. (2013) *Discrimination of multilocus sequence typing-based Campylobacter jejuni subgroups by MALDI-TOF mass spectrometry*. BMC Microbiol.; 13: 247

Zecconi A., et al. (2006). *Role of several Staphylococcus aureus virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland*. Microb Pathog 40: 177-183

Note

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

[illegible]



RegioneLombardia

Agricoltura

Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura
www.agricoltura.regione.lombardia.it