

# **PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2020”**

## **RELAZIONE FINALE**

**N. identificativo progetto: IZS LT 05/20 RC**

**Progetto presentato da:**

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE**  
**LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”**

**Area tematica:** Sanità animale

**Titolo del progetto:** “Utilizzo di markers per l’identificazione precoce di mastiti subcliniche, studio di geni correlati alla resistenza genetica alle mastiti e controllo delle cellule somatiche nel latte in allevamenti ovini e bufalini”

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

**Responsabile Scientifico:** Dr Gianluca Fichi

## SINTESI

**Utilizzo di markers per l'identificazione precoce di mastiti subcliniche, studio di geni correlati alla resistenza genetica alle mastiti e controllo delle cellule somatiche nel latte in allevamenti ovini e bufalini**

Parole chiave: mastiti, early-detection, genetica

L'aumento della Conta delle Cellule Somatiche (SCC) nel latte ha un effetto negativo sulla coagulazione, sulla resa e sulla qualità del formaggio da esso prodotto. Nelle forme subcliniche di mastite, non vi sono alterazioni del latte, della mammella o segni clinici visibili, ma è presente un aumento della SCC. La SCC è un test di screening su larga scala usato correntemente per i programmi del controllo delle mastiti; non è però presente un valore di cut-off riguardo la SCC nel latte ovino e bufalino per discriminare tra una mammella sana e una mastitica. Altri markers di mastite subclinica sono poco studiati e la loro automazione sarebbe un vantaggio nell'analisi del latte di queste specie. Inoltre, alcuni polimorfismi del singolo nucleotide (SNPs) dei geni che codificano per fattori immunitari, stanno diventando marker genetici per ridurre l'incidenza delle mastiti nel bovino e potrebbero essere applicati anche alla specie ovina e bufalina.

Nel presente studio, nel latte ovino e bufalino, è stato investigato il cut-off del valore di SCC, è stata effettuata la validazione del marker Conta Differenziale delle Cellule Somatiche (DSCC) con l'identificazione del suo valore di cut-off e investigato il marker procalcitonina. Inoltre, sono stati investigati i geni LTF e MBL2 come marker genetici di resistenza alle mastiti nelle due specie oggetto dello studio. Infine, è stato effettuato uno studio preliminare per l'automazione del marker Milk Amyloid A nello spettro infrarosso.

Il cut-off del valore di SCC è risultato pari a  $500 \times 10^3$  cell./ml nello studio che ha interessato 2037 pecore in lattazione di razza Lacaune, Sarda e Comisana, mentre per la specie bufalina il cut-off è risultato pari a  $149 \times 10^3$  cell./ml su 439 animali campionati. Il cut-off del valore di DSCC è risultato essere intorno al 70% per la specie ovina e al 60% per la specie bufalina a seconda del discriminante considerato. La ripetibilità del metodo DSCC è risultata migliore di quanto riportato in letteratura per il bovino, ma la robustezza è risultata inferiore per entrambe le specie. La correlazione tra il valore di procalcitonina nel plasma e la mastite subclinica non è risultata significativa nelle due specie e la predittività della MAA nello spettro infrarosso non è risultato accettabile. Nel gruppo di pecore di razza Comisana sono stati riscontrati 6 polimorfismi nella *promoter region* del gene *LTF* e 3 degli alleli dell'esone 1 del gene *MBL2* riportati in letteratura. Nella popolazione di Bufala Mediterranea Italiana studiata, invece, non sono stati evidenziati polimorfismi nella *promoter region* del gene *LTF* ma sono stati riscontrati 8 polimorfismi della *promoter region* del gene *MBL2*.

Nel presente studio, per la prima volta sono stati investigati i marker di mastite subclinica DSCC e procalcitonina nelle specie in oggetto dello studio ed è stata effettuata la validazione del metodo FOSS DSCC che migliorerà lo screening delle mastiti subcliniche e aprirà la strada a una migliore comprensione di questa patologia così importante per queste specie animali a vocazione lattifera. Infine, per la prima volta sono state indagate le regioni MBL2 nella specie ovina e LTF nella bufalina. Sebbene non si evincano associazioni tra i polimorfismi e i parametri utilizzati per valutare la suscettibilità o resistenza alla mastite, le regioni dei geni indagate nella popolazione ovina Comisana e Bufala Mediterranea Italiana hanno evidenziato una discreta variabilità genetica nonostante le ridotte dimensioni del campione e la provenienza da un limitato numero di aziende.

## SUMMARY

### ***Use of markers for the early detection of subclinical mastitis, study of genes related to genetic resistance to mastitis and control of somatic cell count in milk in sheep and buffalo farms***

Key words: mastitis, early-detection, genetics

The increase of Somatic Cell Count (SCC) in milk has a negative effect on coagulation, yield, and quality of the cheese. In subclinical forms of mastitis, there are no changes in milk, in udder, or visible clinical signs, but there is an increase in SCC. The SCC is a large-scale screening test currently used for mastitis control programs but there is no cut-off value for SCC in sheep and buffalo milk to discriminate between a healthy and a mastitis udder. Other markers of subclinical mastitis are little studied, and their automation would be an advantage in the analysis of milk from these species. Furthermore, some single nucleotide polymorphisms (SNPs) of genes coding for immune factors are becoming genetic markers to reduce the incidence of mastitis in cattle and they could also be applied to sheep and buffalo species.

In the present study, the cut-off of the SCC value in sheep and buffalo milk was investigated and the validation of the marker Differential Somatic Cell Count (DSCC) in sheep and buffalo milk was carried out and its cut-off value was identified. Procalcitonin was investigated as mastitis marker in sheep and buffalo species. Furthermore, the *LTF* and *MBL2* genes were investigated as genetic markers of resistance to mastitis in the two species under study. Lastly, a preliminary study was carried out for the automation of the Milk Amyloid A marker in the infrared spectrum.

The cut-off of the SCC value was  $500 \times 10^3$  cells/ml in the sheep species in this study that involved 2037 lactating ewes of the Lacaune, Sarda and Comisana breeds, while for the buffalo the cut-off was  $149 \times 10^3$  cells/ml on 439 animals. The cut-off of the DSCC value was around 70% for the sheep and 60% for the buffalo species, depending on the considered discriminant. The repeatability of the DSCC method was better than that reported in the literature for cowmilk, but the robustness was lower. The correlation between the value of procalcitonin in the plasma and subclinical mastitis was not significant in the two species, and the predictivity of the MAA in the infrared spectrum was not acceptable. In the group of Comisana sheep, 6 polymorphisms were found in the *promoter region* of the *LTF* gene and 3 of the alleles of exon 1 of the *MBL2* gene reported in the literature. On the contrary, in the Italian Mediterranean buffalo population studied, no polymorphisms were highlighted in the *promoter region* of the *LTF* gene, but 8 polymorphisms were found in the *promoter region* of the *MBL2* gene.

In the present study, for the first time the markers of subclinical mastitis DSCC and procalcitonin were investigated in the two species under study and the validation of the FOSS DSCC method was carried out. In particular, the DSCC marker will allow to improve mastitis screening and will provide a better understanding of this very important pathology for these dairy-producing animal species. Lastly, for the first time, the *MBL2* regions in sheep and *LTF* in buffalo were investigated. Although there are no associations between the polymorphisms and the parameters used to evaluate susceptibility or resistance to mastitis, the gene regions investigated in the Comisana sheep and in the Italian Mediterranean Buffalo population showed a genetic variability despite the small size of the sample and the origin from a limited number of companies.

## INTRODUZIONE

Le cellule somatiche del latte sono soprattutto cellule infiammatorie, come i linfociti, macrofagi e polimorfonucleati (PMN), che giocano un ruolo essenziale nella difesa della ghiandola mammaria (Kaskous et al., 2022). La diminuzione dello stato di salute della mammella è responsabile dell'aumento della Conta delle Cellule Somatiche (SCC) con effetto negativo sulla coagulazione del