

La salubrità nella Stalla 4.0
sinonimo di sostenibilità a tavola

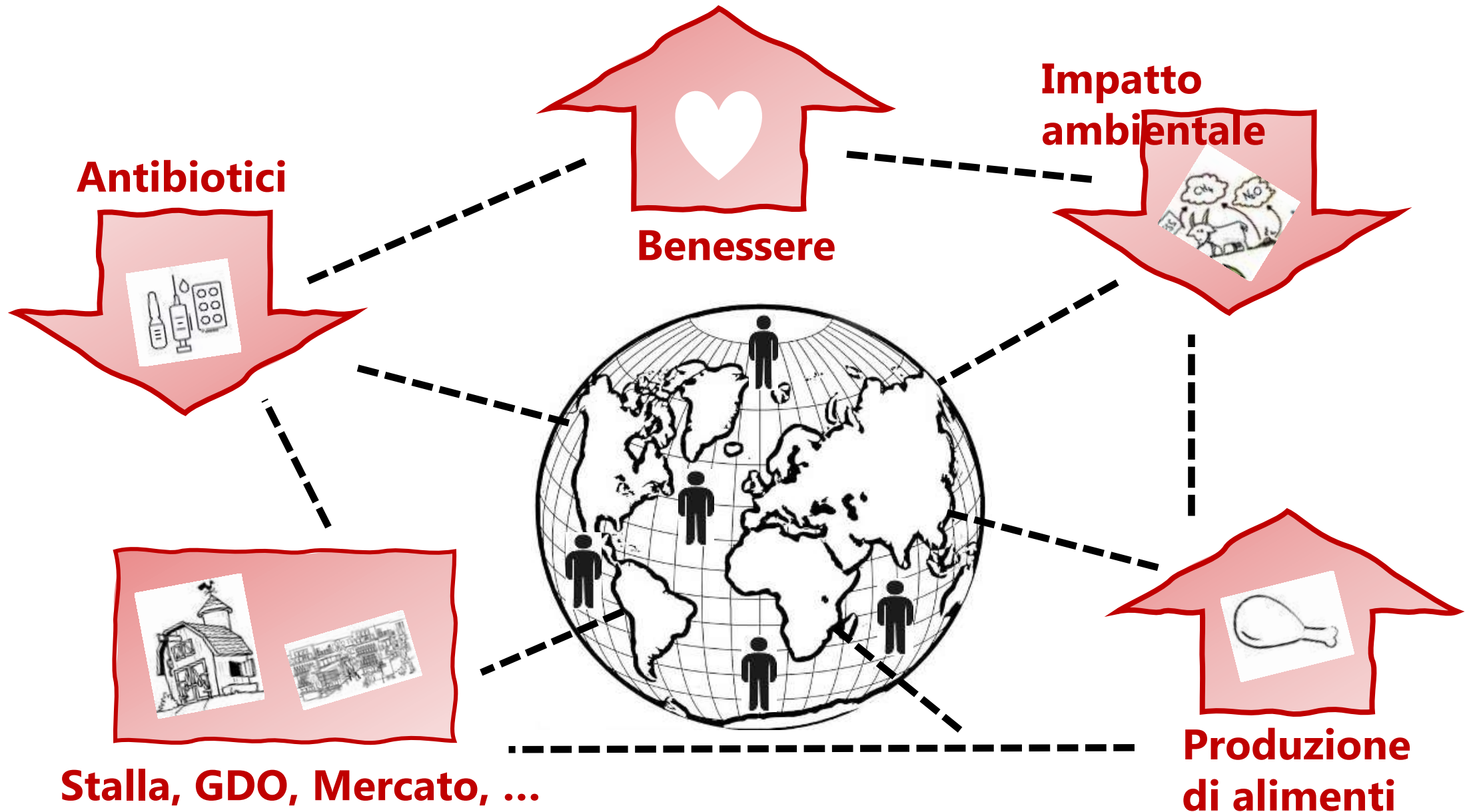
Carbon free - Resilienza mammaria - Lisato piastrinico - Lattoferrina - Latte A2A2
per un cibo di territorio sempre più etico

Sabato 2 ottobre 2021 ore 10.00
Fattoria Fratelli Pagiusco - Via Chiesa 5 - Bressanvido (Vi)

I risultati delle attività sui controlli funzionali 2020:
Carbon free, resilienza mammaria, lattoferrina, latte
A2A2

Proff. Massimo De Marchi & Mauro Penasa
Università degli Studi di Padova - DAFNAE

La sostenibilità nelle produzioni zootecniche ...



I risultati dei progetti aggiuntivi 2020

	Impatto ambientale	Benessere	Antibiotici	Produzione di alimenti	Stalla, GDO, Mercato, ..
Resilienza mammaria		X	X		X
CH ₄	X				X
Lattoferrina				X	X
β -Caseina A2A2				X	X

I risultati dei progetti aggiuntivi 2020

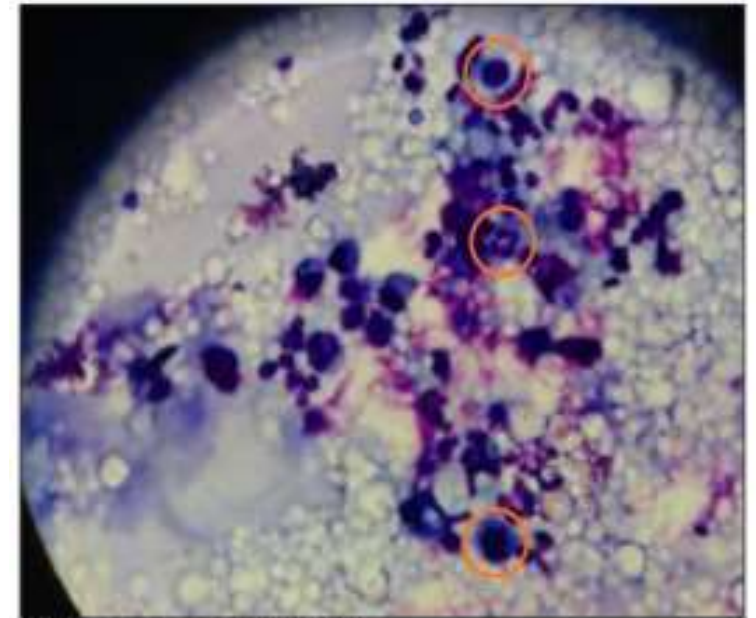
1. Resilienza mammaria (Dott. Cendron, Dott. Bobbo)
2. CH4 (Dott. Callegaro, Dott. Niero)
3. Lattoferrina (Dott. Niero)
4. β -Caseina A2A2 (Dott. Cendron)

I risultati dei progetti aggiuntivi 2020

1. Resilienza mammaria (Dott. Cendron, Dott. Bobbo)
2. CH4 (Dott. Callegaro, Dott. Niero)
3. Lattoferrina (Dott. Niero)
4. β -Caseina A2A2 (Dott. Cendron)

Resilienza mammaria

Cosa sono le cellule differenziali (DSCC)?

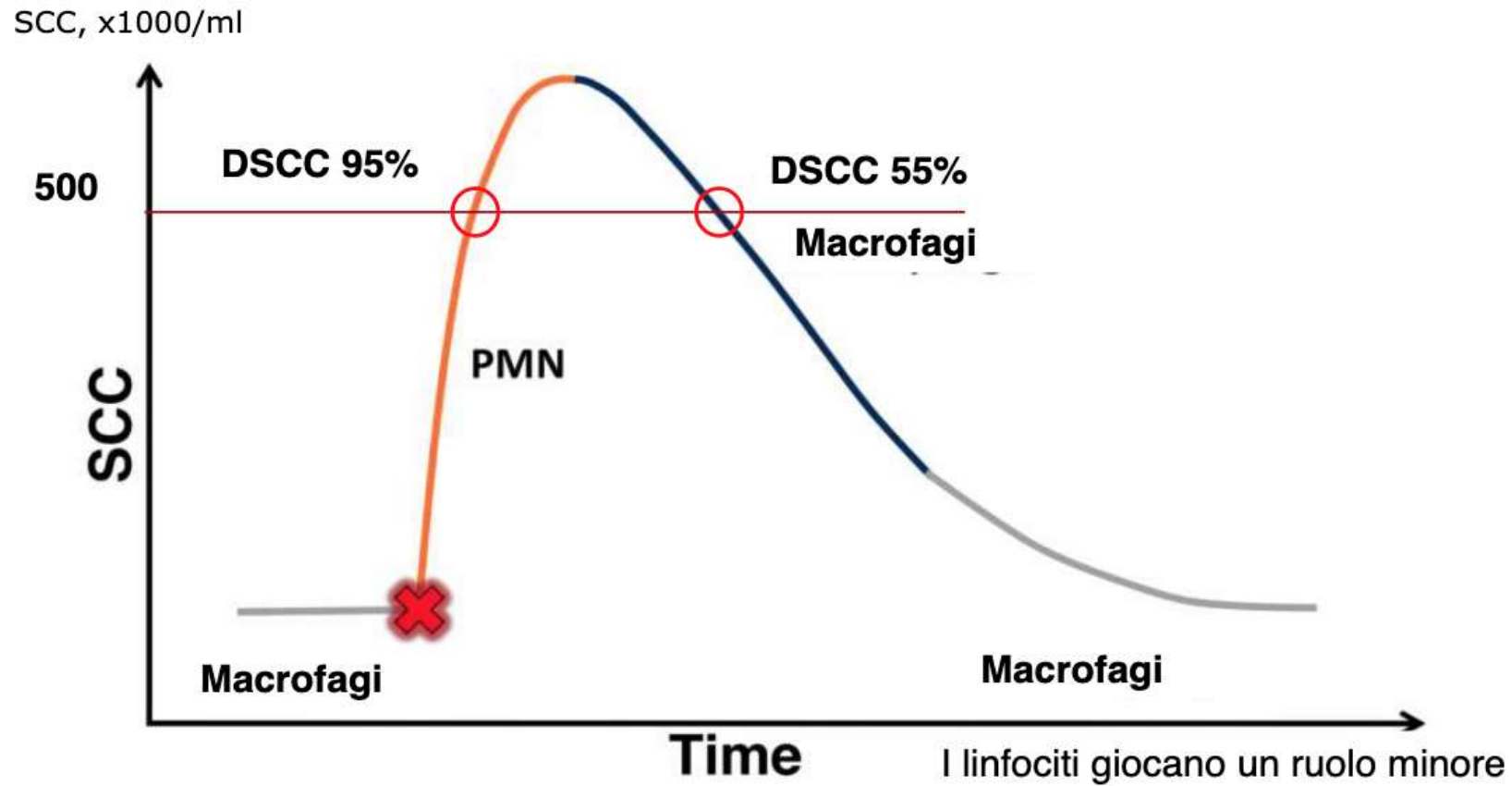


Microscope spot, milk slide

Il valore delle cellule differenziali (DSCC) indica la percentuale di leucociti polimorfonucleati neutrofili e linfociti sul totale della conta leucocitaria e per differenza il resto ad arrivare a 100 rappresenta la percentuale di macrofagi

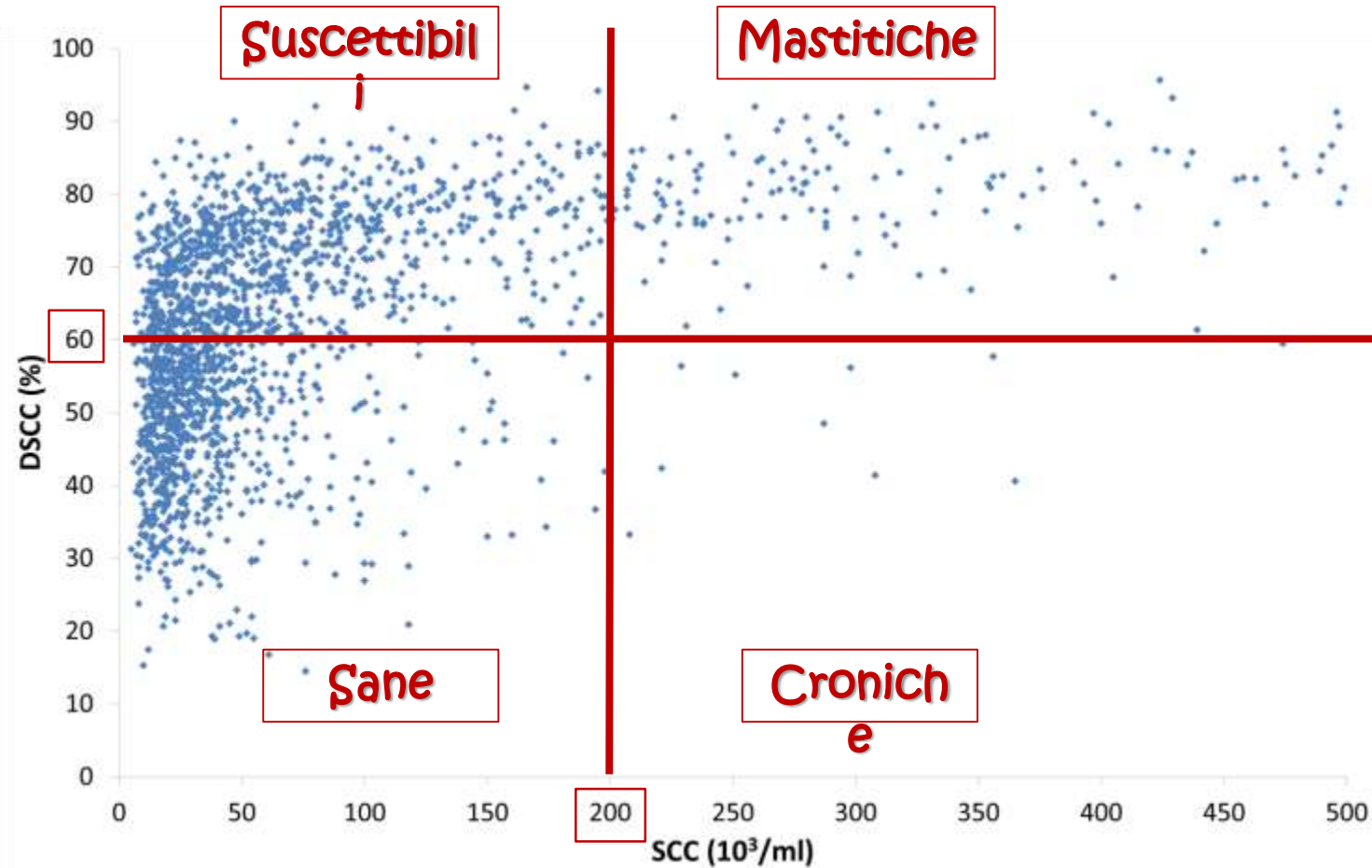
Resilienza mammaria

Andamento delle cellule differenziali nel latte dopo un infezione



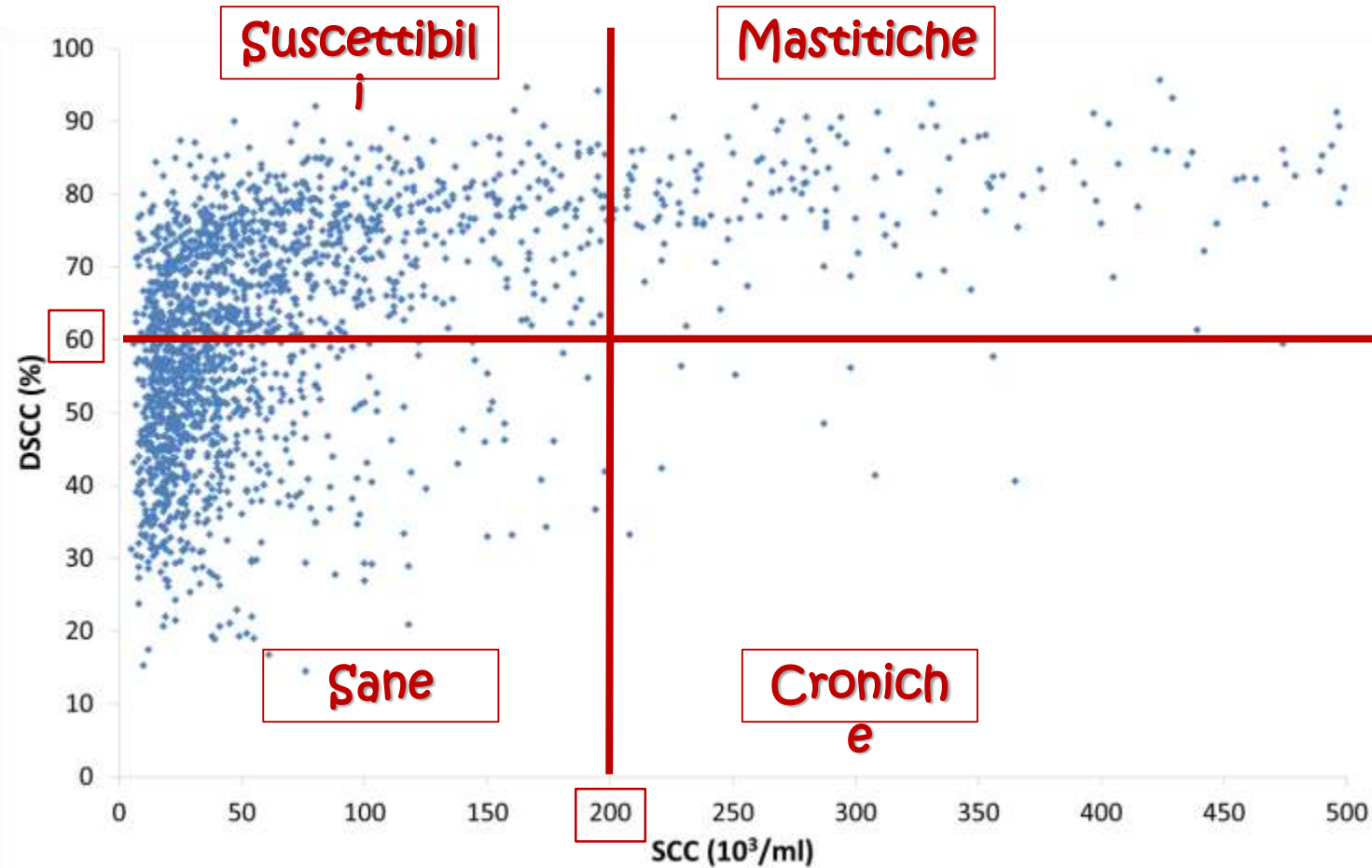
Resilienza mammaria

Come possono essere utili le cellule differenziali (DSCC)?



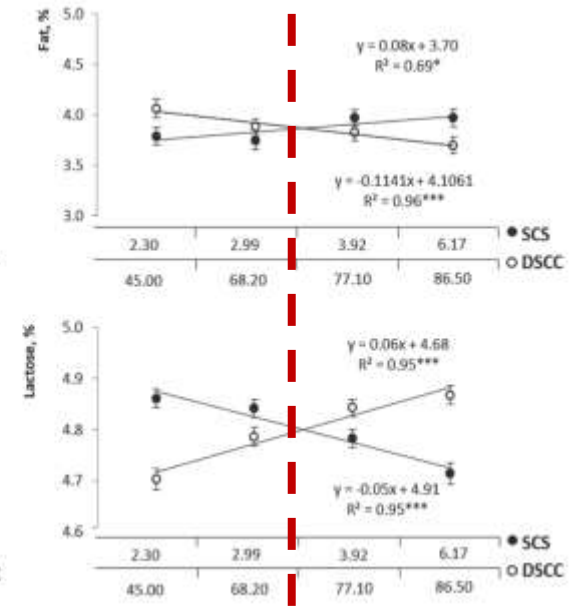
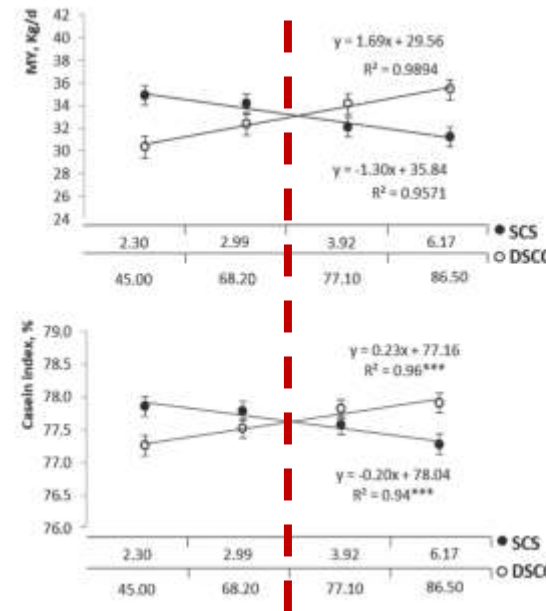
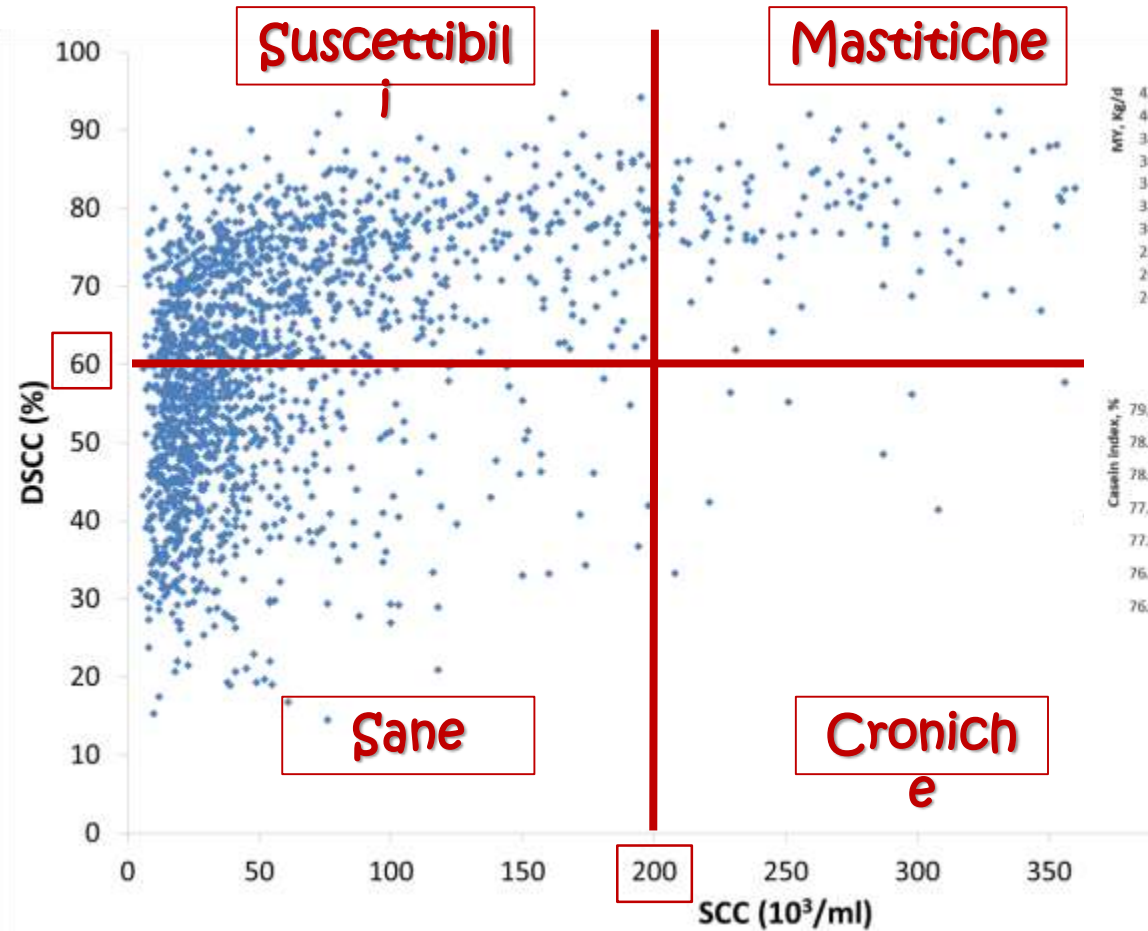
Resilienza mammaria

Come possono essere utili le cellule differenziali (DSCC)?



Resilienza mammaria

Come possono essere utili le cellule differenziali (DSCC)?



J. Dairy Sci. 104:4822–4836
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19084>

© 2021 American Dairy Science Association[®]. Published by Elsevier Inc. and FASS Inc. All rights reserved.

Associations between differential somatic cell count and milk yield, quality, and technological characteristics in Holstein cows

Resilienza mammaria

Analisi dei patogeni attraverso kit qPCR

I numeri lombardi

36.500 euro

le perdite annue per azienda
in presenza di *S. aureus*

55 %

degli allevamenti con infezioni
da batteri contagiosi

2,6 kg

di latte/giorno/capo la perdita produttiva
negli allevamenti con *S. agalactiae*

445.000 cellule/mL

negli allevamenti con *S. agalactiae*

**qPcr, diagnosi di più patogeni
nella stessa analisi**

La metodica analitica della qPcr è molto pratica e con esiti in tempi brevissimi per diversi patogeni anche di difficile diagnosi, ha una sensibilità pari o superiore a quella dei metodi convenzionali e può essere effettuata con campioni di latte con conservante e senza l'obbligo di una catena del freddo

supplemento a *L'Informatore Agrario* • 27-28/2018

Analisi dei patogeni attraverso kit qPCR

Valutazione della presenza di infezioni attraverso qPCR (kit Mastit 4): ricerca rapida e mirata basata sulla presenza di DNA batterico

- Staphylococcus aureus
- Streptococcus agalactiae
- Streptococcus dysgalactiae
- Streptococcus uberis
- Mycoplasma bovis
- Mycoplasma species
- Beta-Lactamase gene
- CNS
- Prototheca
- E.coli
- Klebsiella
- Enterococcus / Lactococcus lactis

Analisi dei patogeni attraverso kit qPCR

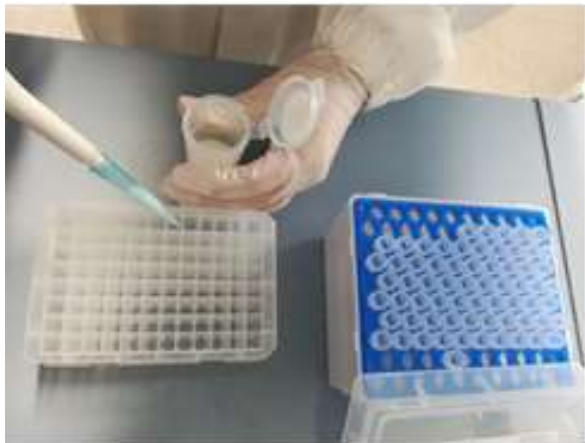
Valutazione della presenza di infezioni attraverso qPCR (kit Mastit 4): ricerca rapida e mirata basata sulla presenza di DNA batterico

- **Staphylococcus aureus**
 - **Streptococcus agalactiae**
 - Streptococcus dysgalactiae
 - Streptococcus uberis
 - Mycoplasma bovis
 - Mycoplasma species
 - Beta-Lactamase gene
 - CNS
 - Prototheca
 - E.coli
 - Klebsiella
 - Enterococcus /Lactococcus lactis
- Fra i più importanti patogeni contagiosi

Analisi dei patogeni attraverso kit qPCR

Analisi dei profili microbiologici attraverso l'uso del kit "Mastit4" in campioni di latte di 2.112 bovine allevate in Veneto ed analisi di SCC e DSCC.

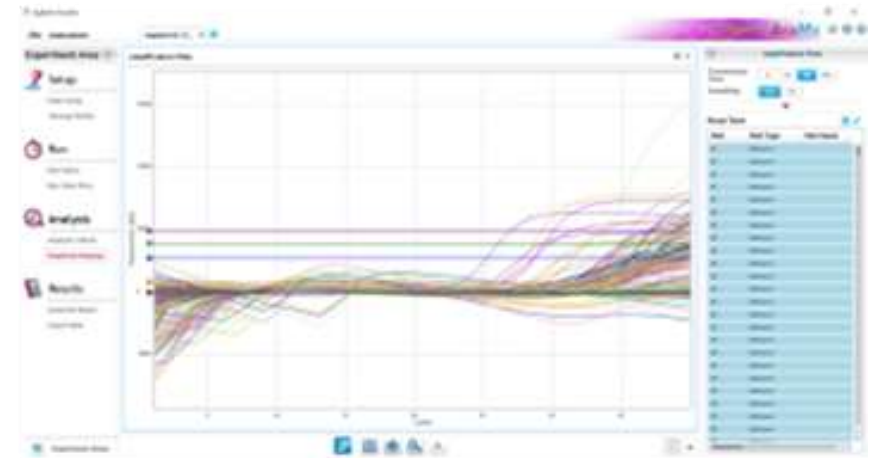
Estrazione del
materiale genetico



qPCR



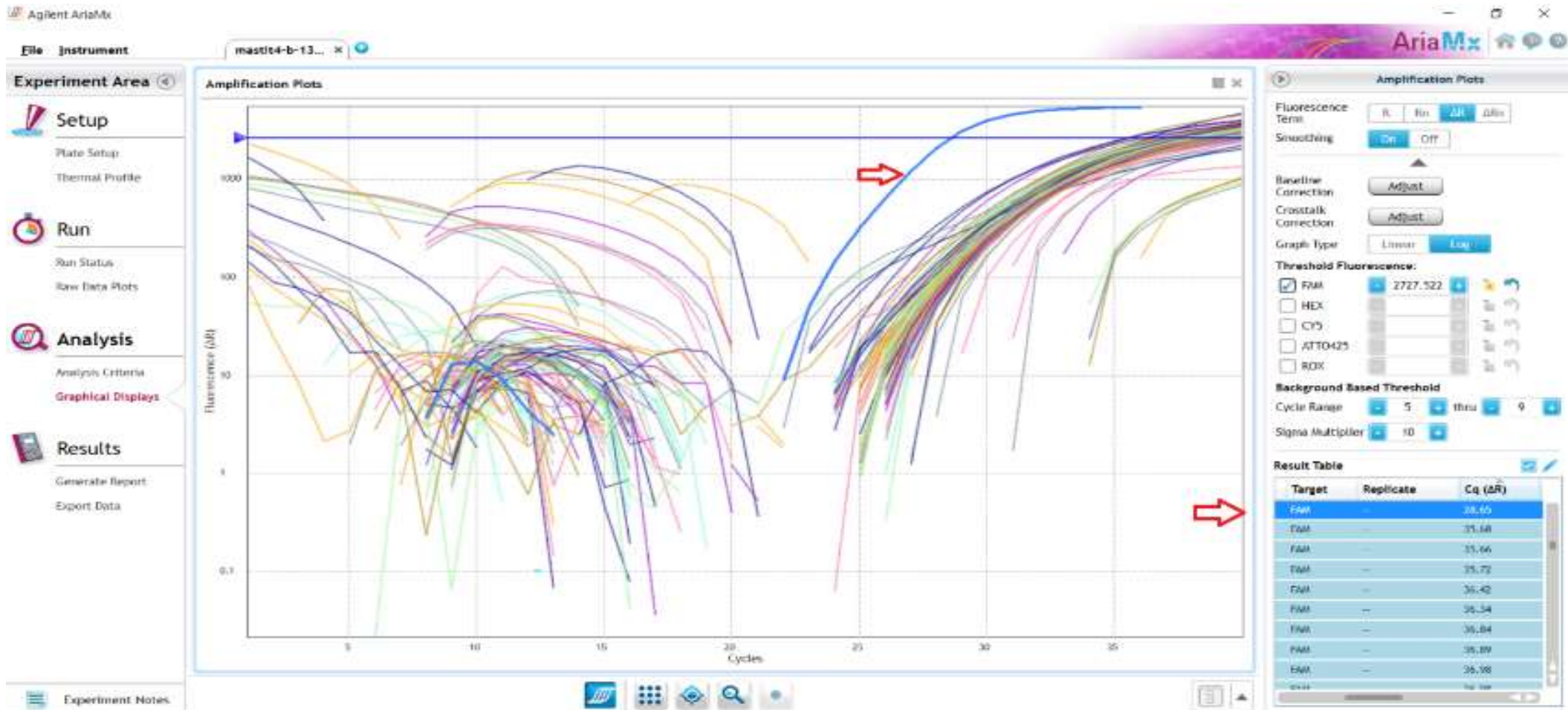
Analisi dei risultati



Per ciascuno dei 2.112 campioni analizzati sono state ottenute 12 curve specifiche (una per ciascun patogeno), per un totale di 25.344

curve

Analisi dei patogeni attraverso kit qPCR



Le curve di amplificazione permettono di definire una soglia numerica (Cq) che, se inferiore a 37, indica la presenza del patogeno.

Analisi dei patogeni attraverso kit qPCR

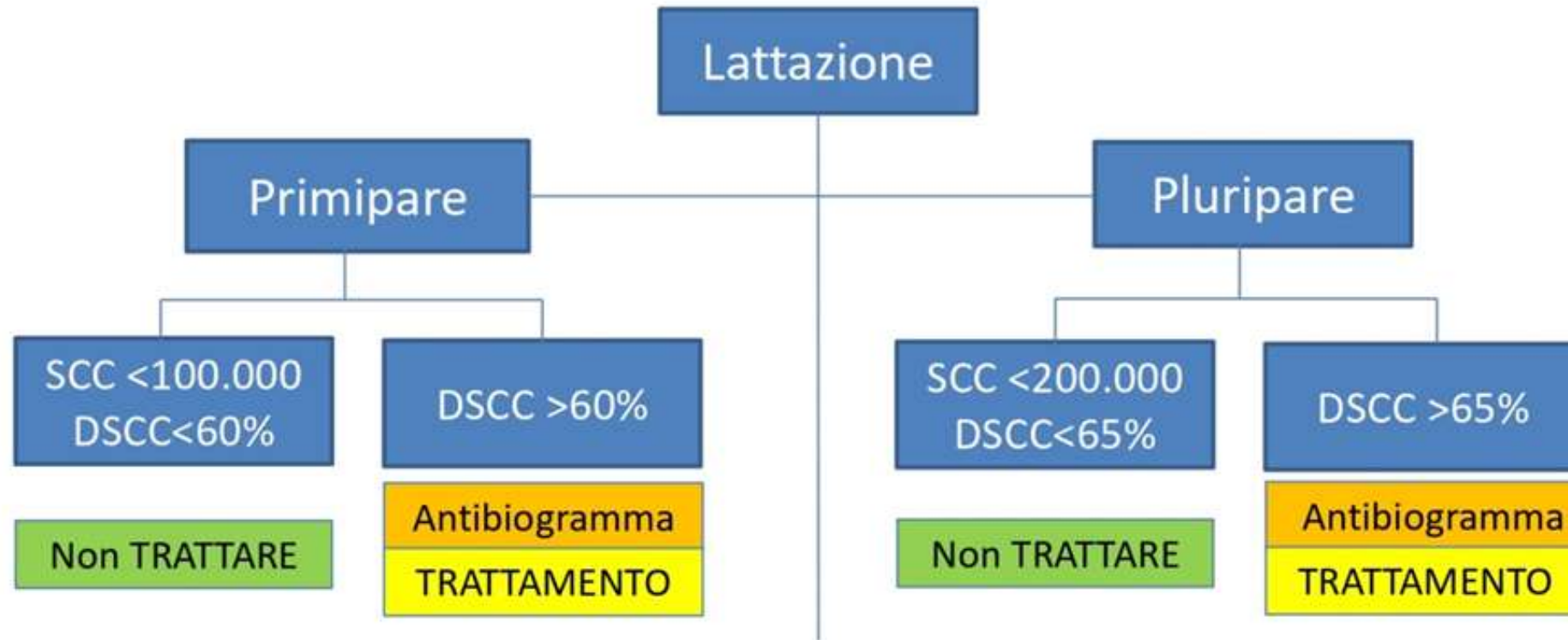
Patogeno	Frequenza totale (%)
Mycoplasma bovis	94,1
Staphylococcus aureus	8,2
Streptococcus uberis	22,4
Streptococcus agalactiae	6,9
Streptococcus dysgalactiae	99,9
CNS	64,0
Mycoplasma species	0,3
Beta-Lactamase gene (Staphylococci)	24,9
Escherichia coli	23,0
Enterococcus e Lactococcus lactis	49,5
Prototheca	0,0
Klebsiella	5,9

Analisi dei patogeni attraverso kit qPCR

Patogeno	Frequenza sane (%)	Frequenza suscettibili (%)	Frequenza mastitiche (%)	Frequenza croniche (%)
Staphylococcus aureus	6,0	7,4	15,2	7,2
Streptococcus uberis	18,7	35,8	31,7	18,0
Streptococcus agalactiae	5,0	7,9	10,2	6,2

Analisi dei patogeni attraverso kit qPCR

Protocolli per la riduzione dei farmaci in lattazione e asciutta



In asciutta si consiglia il trattamento con sigillante ai capezzoli

Controllare la bovina 2 settimane dopo il parto (analisi microbiologica e/o DSCC-SCC)

Analisi dei patogeni attraverso kit qPCR

- L'analisi combinata di SCC e DSCC (indicatori di stato infiammatorio della mammella) e dei patogeni causa di infezione consente di migliorare il benessere delle bovine agendo tempestivamente e in modo mirato, consentendo inoltre la riduzione dell'uso dei trattamenti in stalla.
- Laboratorio di analisi (analisi patogeni nell'ambito dei CF PA2021) e tempestività dei campionamenti (pre-asciutta e post-partum) rappresentano dei punti per il miglioramento delle condizioni di benessere, della riduzione dell'utilizzo degli antibiotici e della redditività delle stalle.
- Non perdiamo di vista ... management ambiente, sala e routine di mungitura, gestione della mammella, 'storia della bovina'

I risultati dei progetti aggiuntivi 2020

1. Resilienza mammaria (Dott. Cendron, Dott. Bobbo)
2. CH4 (Dott. Callegaro, Dott. Niero)
3. Lattoferrina (Dott. Niero)
4. β -Caseina A2A2 (Dott. Cendron)

Misurazione Metano (CH₄)

Obbiettivi dello studio:

Misurare le emissioni di gas serra (metano) a livello dei singoli animali in allevamento attraverso lo strumento Laser Methane Mini (<https://youtu.be/wNRj9A6yK4M>).



Misurazione Metano (CH₄)

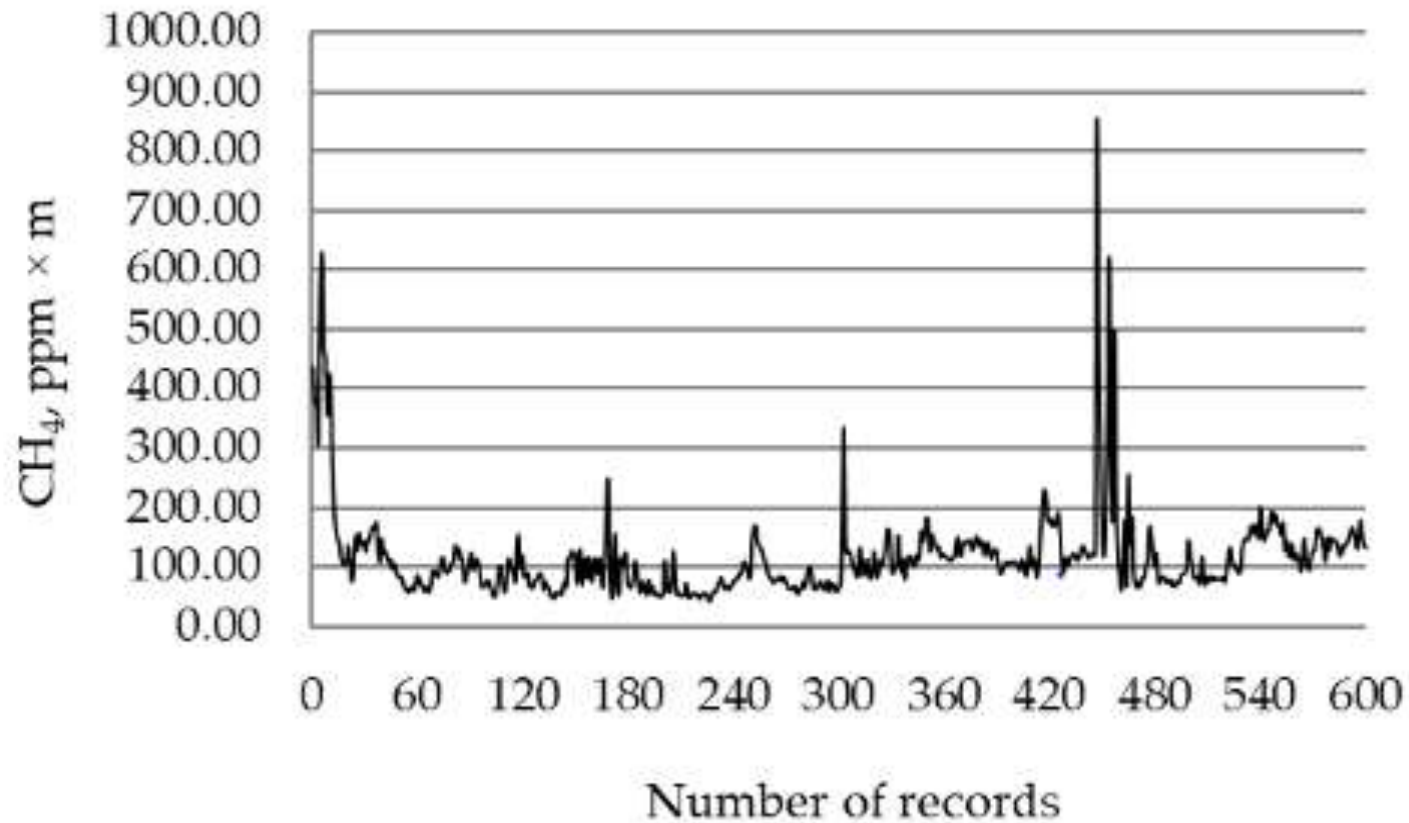
Obiettivi dello studio:

Misurare le emissioni di gas serra (metano) a livello dei singoli animali in allevamento attraverso lo strumento Laser Methane Mini (<https://youtu.be/wNRj9A6yK4M>).

Materiali e metodi:

- Le misure devono essere effettuate puntando il laser sul musello dell'animale mentre l'animale è in cattività, o durante la mungitura del mattino/sera, o comunque mentre l'animale è fermo;
- Le misure devono avere una durata di 5 minuti (a 3 metri di distanza) e lo strumento effettua una rilevazione ogni 0,5 secondi. Ciascuna misura sarà quindi composta da più di 600 osservazioni;
- Ogni misura è inviata via Bluetooth dal dispositivo laser a un tablet (Android) e l'applicazione Gas:

Misurazione Metano (CH₄)



Metanogramma rappresentante le osservazioni ($n = 600$) delle emissioni di CH₄ (ppm × m) raccolte durante una singola misurazione del laser (Niero et al., 2020).

Misurazione Metano (CH₄)

Razza	Numerosità capi	Percentuale
Frisona	333	71.77
Pezzata rossa	54	11.64
Rendena	40	8.62
Jersey	14	3.02
Incrocio	23	4.96

Totale vacche misurate 464 vacche (16 aziende venete).

Misurazione Metano (CH₄)

Variabile	N	Media	Dev std	Min	Max
Emissioni CH ₄ , ppm x m	457	82.15	37.16	7.58	225.84
Numerosità picchi, n	453	17.25	16.02	0.00	94.00
Media picchi di emissione, ppm x m	454	397.00	123.02	0.00	866.68

Emissioni medie di metano (ppm m) sui 464 Capi misurati.

Misurazione Metano (CH₄)

- Considerando i picchi delle emissioni di CH₄ tra le diverse razze coinvolte, risultano delle differenze negli animali in termini di valore medi e di numero dei picchi di emissione. Il numero di picchi può essere considerato un fenotipo per discriminare gli animali ad alta emissione con quelli a bassa.
- I risultati del presente studio indicano che le misure effettuate con il laser sono influenzate da diversi fattori ambientali, se viene applicata in condizioni di campo. L'utilizzo della laser methane come uno strumento per la misurazione delle emissioni di CH₄ merita ulteriori approfondimenti.

I risultati dei progetti aggiuntivi 2020

1. Resilienza mammaria (Dott. Cendron, Dott. Bobbo)
2. CH4 (Dott. Callegaro, Dott. Niero)
3. Lattoferrina (Dott. Niero)
4. β -Caseina A2A2 (Dott. Cendron)

Aspetti fenotipici e genetici - Lattoferrina

Vacche da latte n = 2625 (2034 HF, 347 PRI, 154 RE, 25 J)

Stalle coinvolte n = 44

Quantificazione della lattoferrina tramite metodologia «Immuno Diffusione Radiale» (Radial Immuno Diffusion, RID) (Figura - Piastra per saggio 24 campioni)

Produzione giornaliera di latte (kg/giorno)

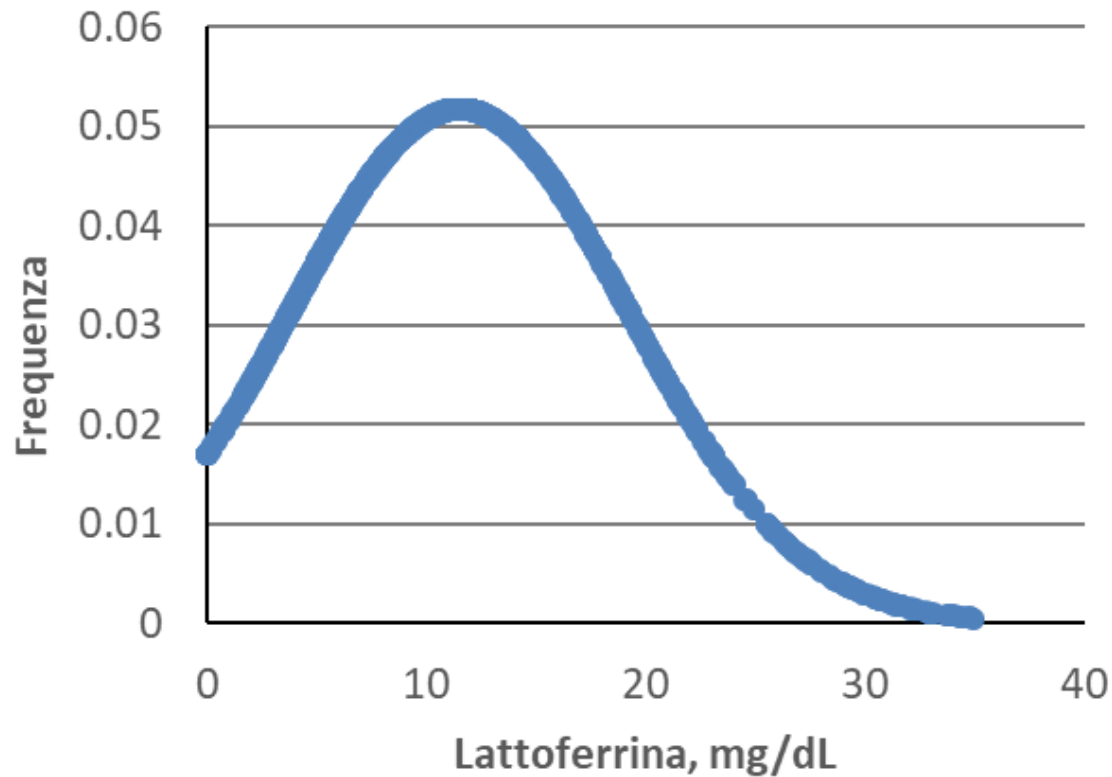
Grasso, proteina, caseina, lattosio (%)

SCC, cellule/ml e DSCC, %

Urea (mg/dL), β -idrossibutirrato (mmol/L)



Aspetti fenotipici e genetici - Lattoferrina



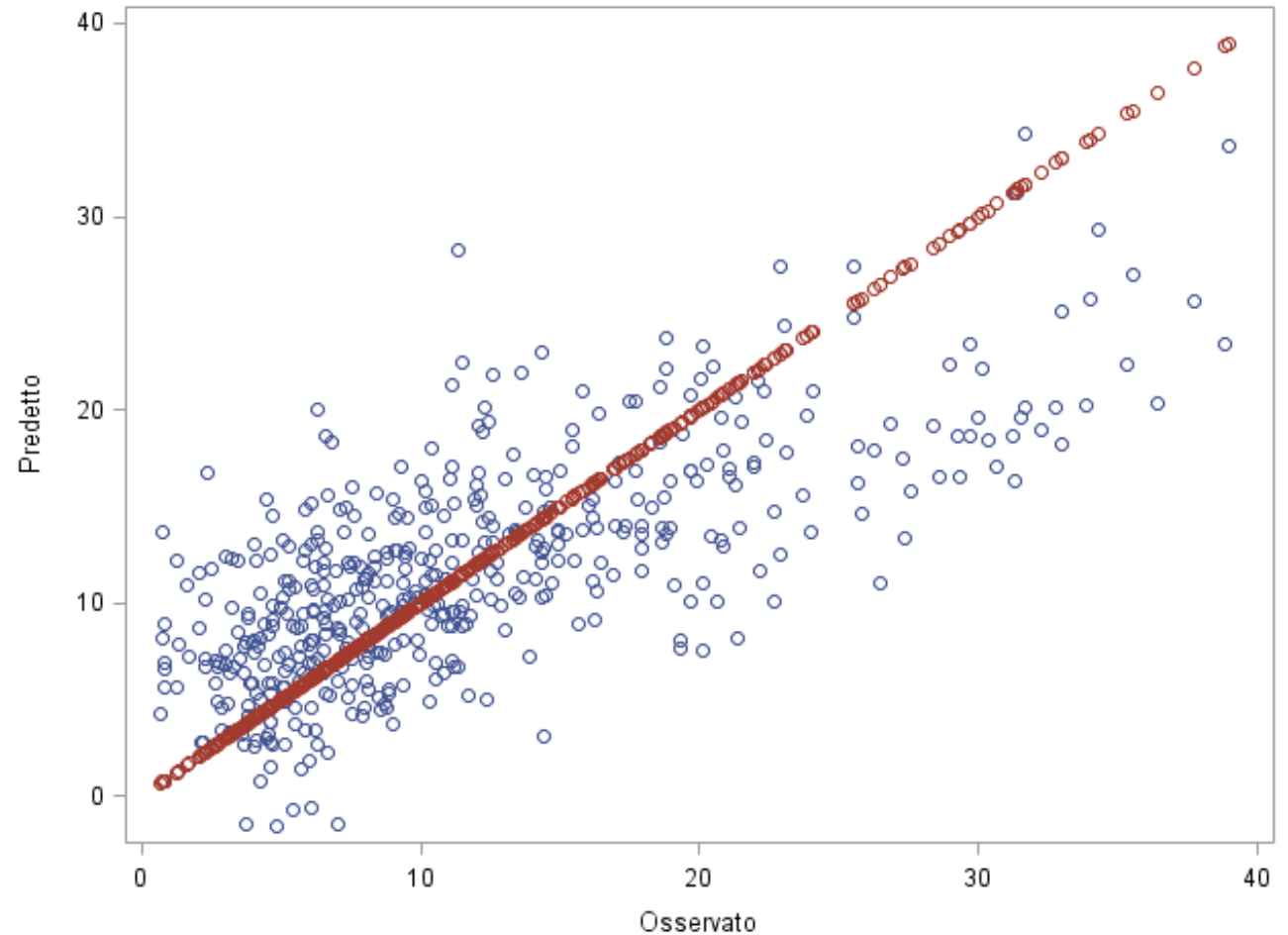
Lattoferrina	Media = 11.53 (SD = 7,71)
Carattere	r
Latte, kg/g	-0.30
Grasso, %	0.12
Proteina, %	0.33
Caseina, %	0.31
Lattosio, %	-0.41
Cellule somatiche (SCC), cellule/ml	0.33
Cellule somatiche differenziali (DSCC), %	0.17
Urea, mg/dl	0.06

Figura 2. Distribuzione del contenuto di lattoferrina nei campioni analizzati

Aspetti fenotipici e genetici - Lattoferrina

Accuratezza dei modelli di predizione basati sulla spettroscopia nel medio infrarosso (Milkoscan, Lab. Latte ARAV)

$RMSE_{cv}$	R^2_{cv}	$RMSE_v$	R^2_v
5.22	0.58	7.11	0.39



Aspetti fenotipici e genetici - Lattoferrina

- Primo studio fenotipico e genetico a livello nazionale
- La lattoferrina → indicatore di benessere della mammella
- Lab ARAV → predizione lattoferrina

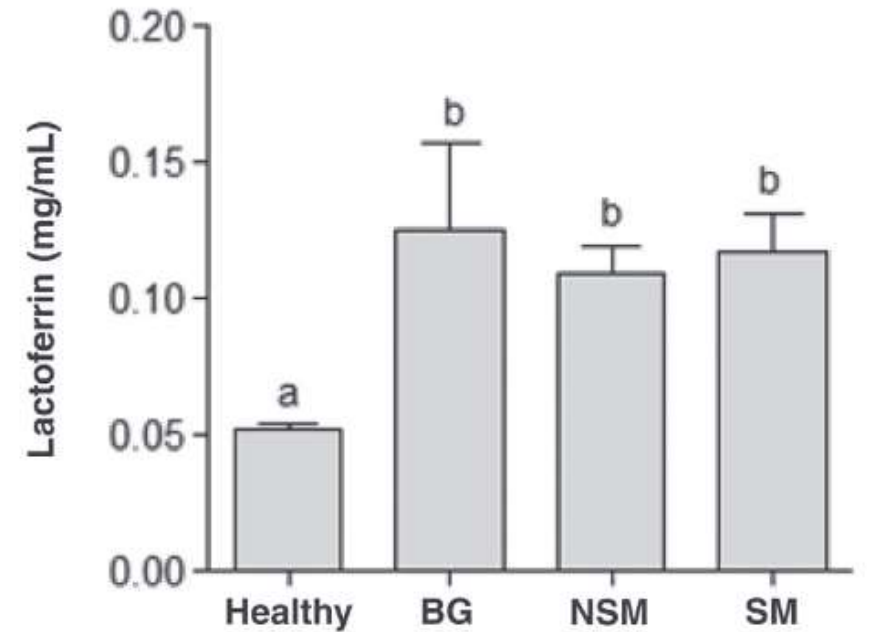


Figure 3. Lactoferrin in healthy and diseased quarters. Lactoferrin concentration (mean \pm SEM) in healthy quarters and quarters positive for presence of bacterial growth (BG), nonspecific mastitis (NSM), or subclinical mastitis (SM). Different letters (a and b) indicate significant differences ($P < 0.001$).

Aspetti fenotipici e genetici - Lattoferrina

- Primo studio fenotipico e genetico a livello nazionale
- La lattoferrina → indicatore di benessere della mammella
- Lab ARAV → predizio lattoferrina
- Industrie



Milk and dairy

Sustainability

Innovation

Our farmers

About FrieslandCampina



FrieslandCampina Ingredients significantly expands its lactoferrin production capacity

10 September 2020

FrieslandCampina Ingredients today reveals it is to increase its lactoferrin production capacity in Veghel (Netherlands) by 60 metric tonnes (mt) in 2022 to enable strategic growth in its Early Life Nutrition and Adult Nutrition segments. Bringing its total capacity to 70 mt per annum, the expansion will make FrieslandCampina Ingredients the largest lactoferrin producer in the world.

I risultati dei progetti aggiuntivi 2020

1. Resilienza mammaria (Dott. Cendron, Dott. Bobbo)
2. CH4 (Dott. Callegaro, Dott. Niero)
3. Lattoferrina (Dott. Niero)
4. β -Caseina A2A2 (Dott. Cendron)

Caratterizzazione genetica genotipo β -Caseina A2A2

Parmigiano Reggiano prodotto con latte A2A2 acquistabile anche online

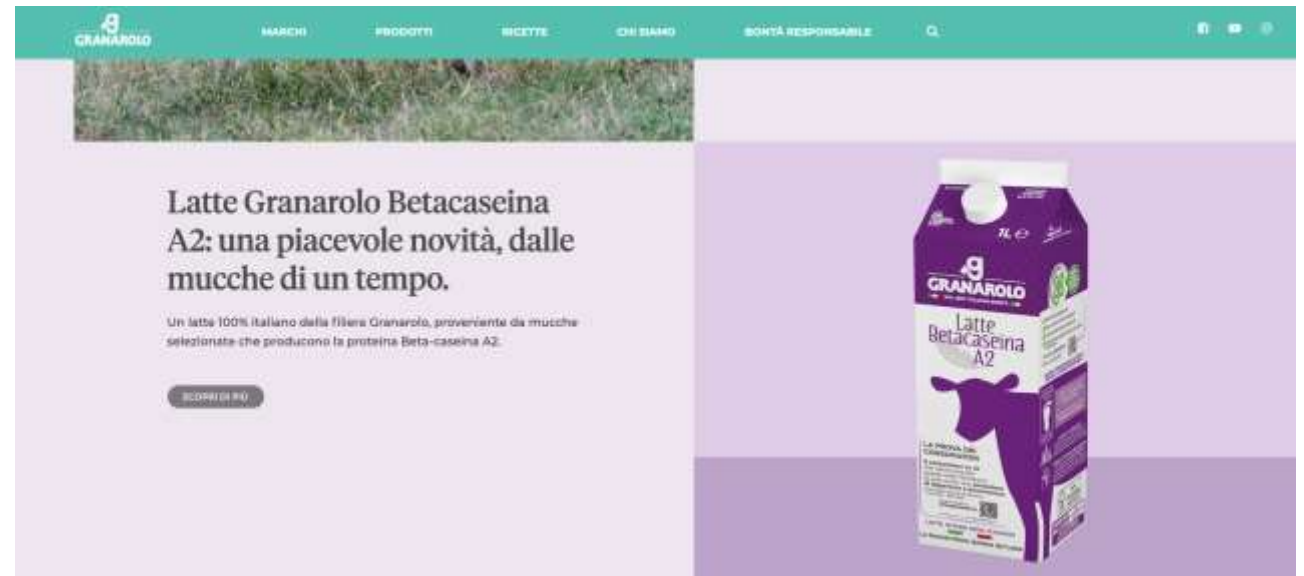
Le innovazioni della misura 16 del Psr



Il progetto Parmaggrega per la produzione di Parmigiano Reggiano con solo latte A2A2, cioè latte con beta caseina A2A2 (anziché A1A1), considerato più digeribile

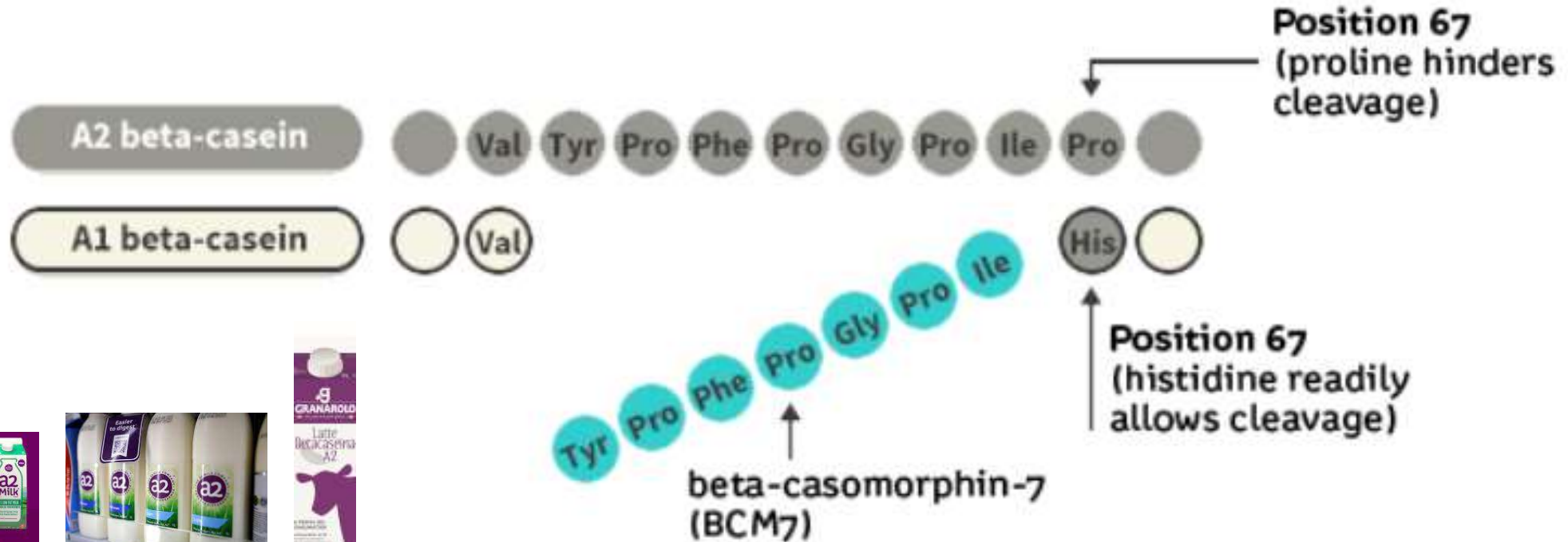
Fonte foto: Agronotizie

Creare innovazione di prodotto anche con una Dop dalla storia quasi millenaria come il Parmigiano Reggiano è stato uno degli obiettivi che si è posto il progetto Parmaggrega.



Caratterizzazione genetica genotipo β -Caseina A2A2

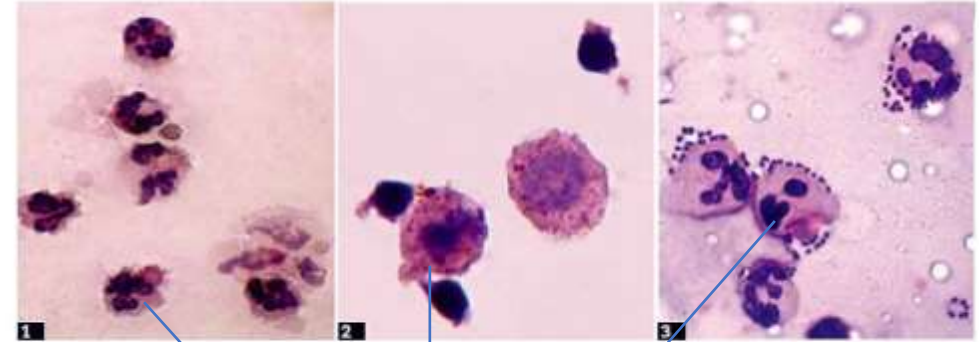
La β -Caseina può essere presente nel latte in due varianti alleliche: A1 e A2



β -Casomorfine di tipo 7 rappresentano la causa, a livello intestinale, di una reazione infiammatoria. Il contenuto di BCM7 sembra essere 4 volte più alto nel latte A2A1 rispetto al latte A2A2.

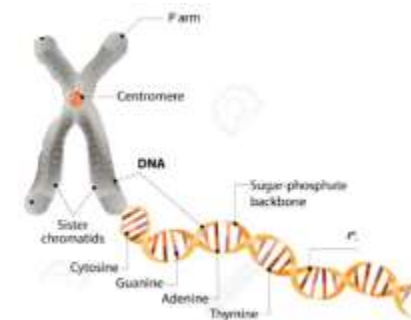
Caratterizzazione genetica genotipo β -Caseina A2A2

Sviluppo di 2 METODI



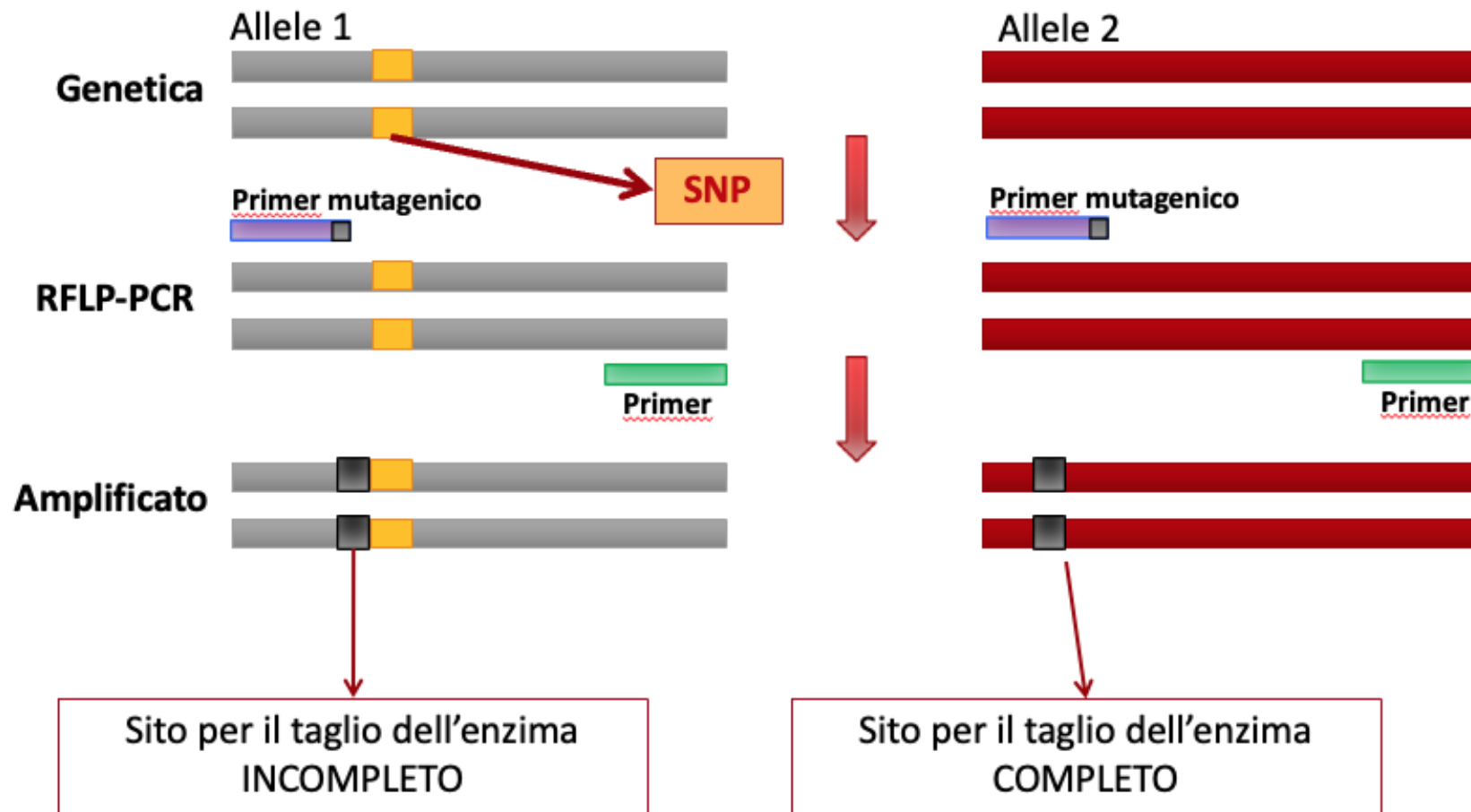
1. Leucociti polimorfonucleati neutrofil del latte. 2. Linfociti (cellule blu scuro) e macrofagi (cellule grandi) isolati dal latte bovino. 3. Leucociti polimorfonucleati neutrofil del latte che stanno fagocitando alcune cellule batteriche.

RFLP - PCR
ARMS - PCR



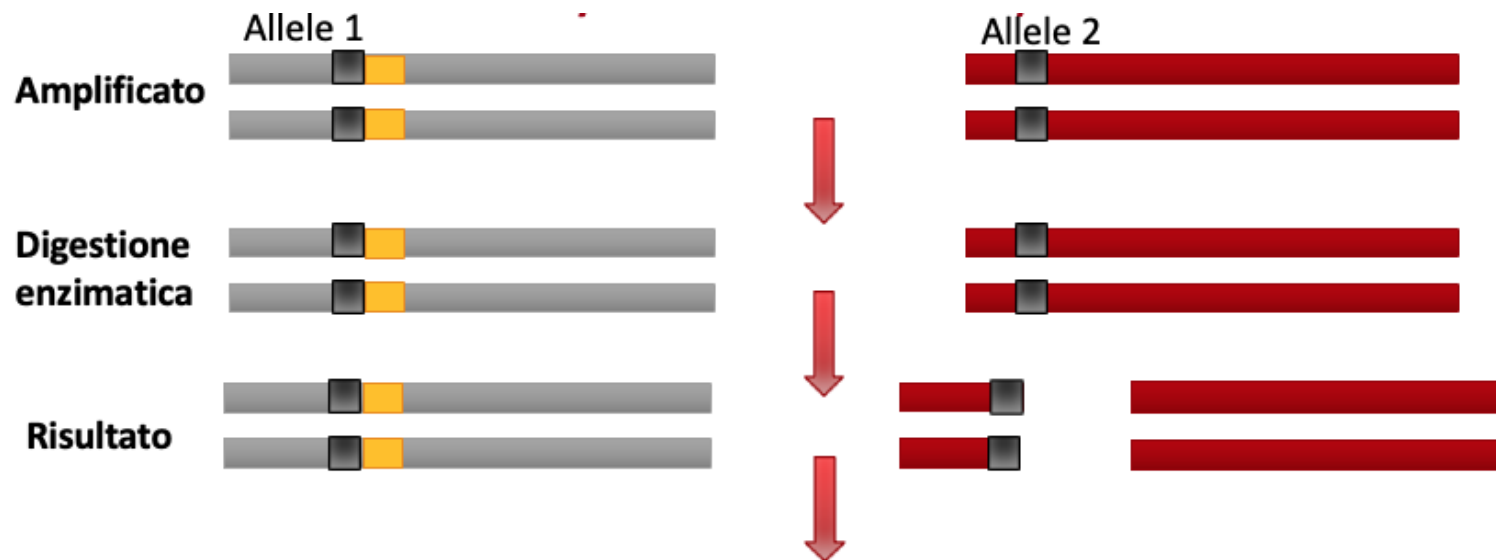
Caratterizzazione genetica genotipo β -Caseina A2A2

Analisi mediante RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism - Polymerase Chain Reaction)

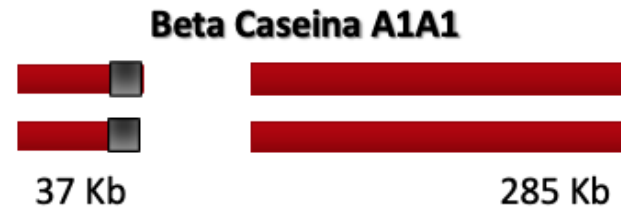
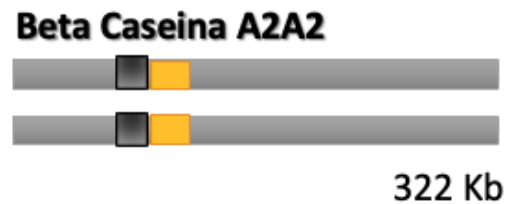


Caratterizzazione genetica genotipo β -Caseina A2A2

Analisi mediante RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism - Polymerase Chain Reaction)

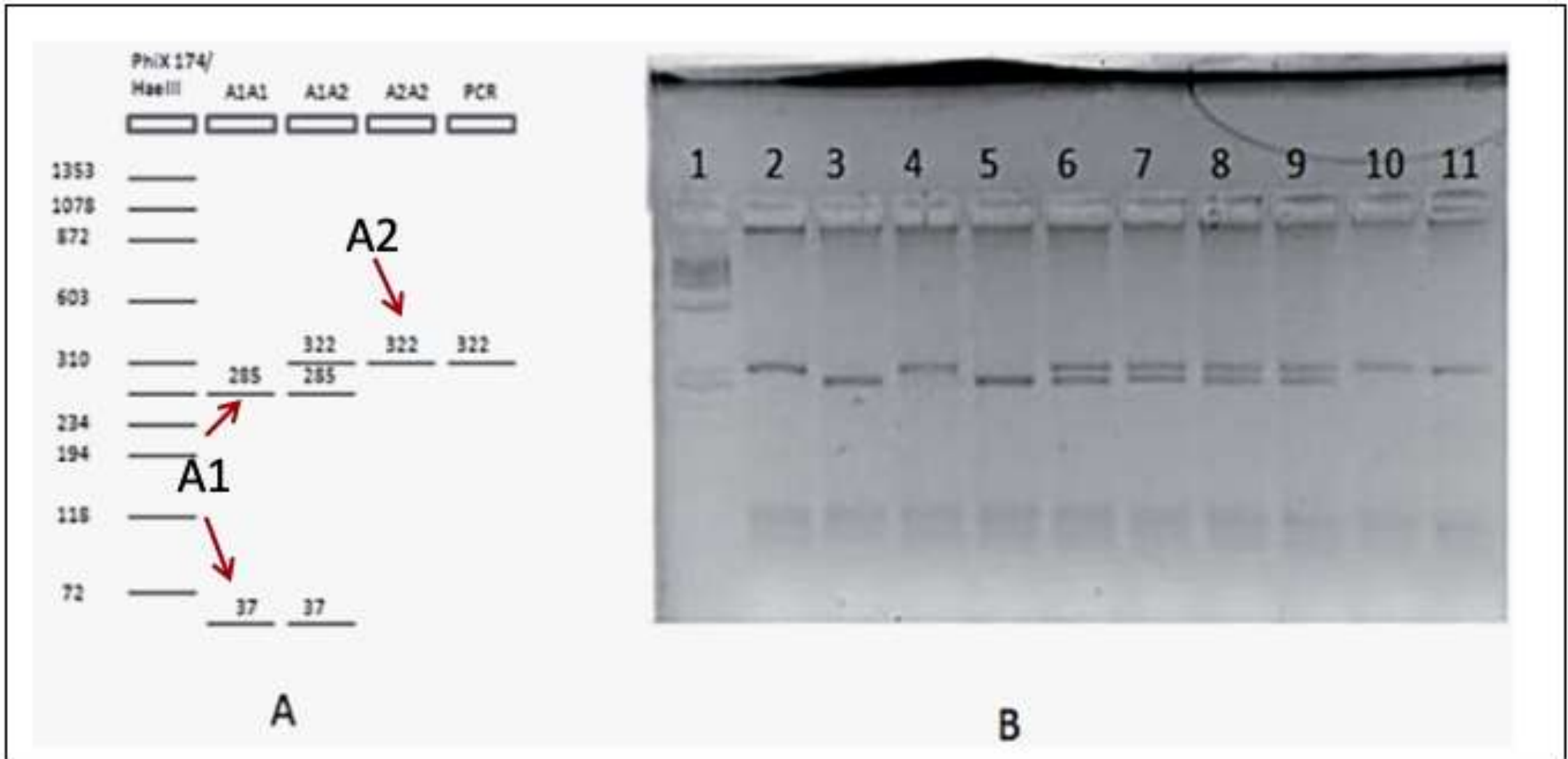


Corsa Elettroforetica su Gel di Agarosio



Caratterizzazione genetica genotipo β -Caseina A2A2

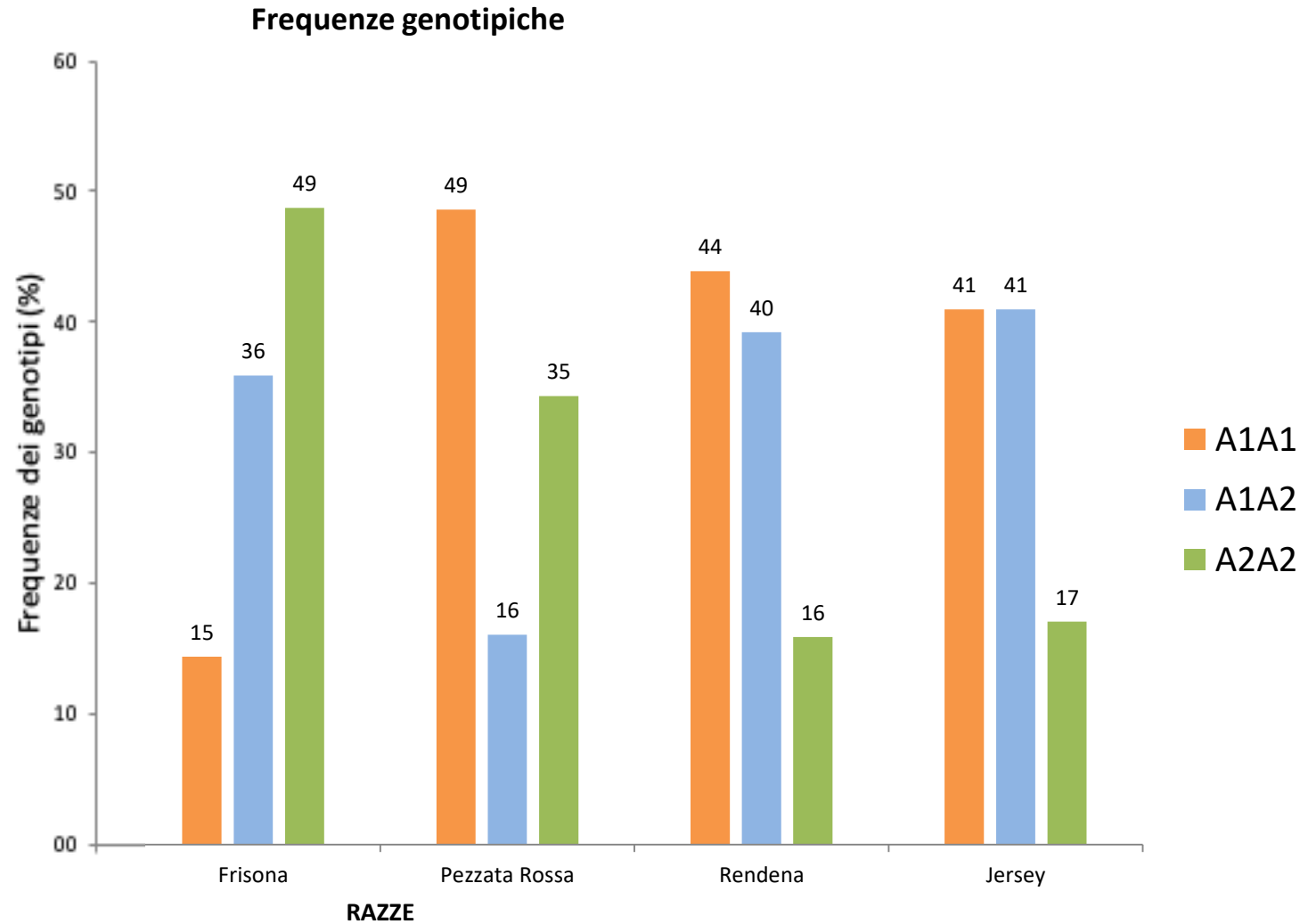
Esempio di risultato



Caratterizzazione genetica genotipo β -Caseina A2A2

Razze	Numero animali analizzati	Numero allevamenti
Frisona	1288	22
Jersey	58	3
Rendena	212	6
Pezzata Rossa	222	9
Altre	63	8
Totale	1843	48

Caratterizzazione genetica genotipo β -Caseina A2A2



Caratterizzazione genetica genotipo β -Caseina A2A2

- La razza frisona mostra una frequenza di β -Caseina (A2A2) superiore rispetto alle altre razze analizzate (\rightarrow futuri ed ulteriori approfondimenti)
- Sono state implementate 2 metodiche che permettono la determinazione della β -Caseina (A2A2) utilizzando i campioni di latte CF
- Ampliando lo screening nelle stalle 'favorevoli' sulla base del tipo di β -Caseina (A2A2) potrebbero essere sviluppati 'nuovi' prodotti lattiero-caseari

I risultati dei progetti aggiuntivi 2020

Conclusioni

I risultati dei progetti aggiuntivi 2020

- Le attività di ricerca svolte su indicazioni ed in collaborazione con le ANA hanno fornito informazioni (fenotipi) di interesse genetico
- Le attività sono state sviluppate nell'ottica di garantire queste conoscenze (= analisi e/o protocolli) agli allevatori attraverso la concreta implementazione nel Laboratorio ARAV per futuro utilizzo in campo (es. patogeni)
- Le attività di ricerca hanno dimostrato vantaggi ed in alcuni casi dei punti critici rispetto all'approccio sperimentale e metodologico sviluppato (this is science!!!)
- Le tematiche affrontate possono rappresentare un punto di partenza per l'identificazione di nuovi prodotti (es. β -Caseina A2A2, lattoferrina)



Innovare – "può esistere solo in un contesto di cose che si fanno"

S.M. 2013