



La Stalla 4.0 per un Sistema Allevatori di avanguardia  
tra salute degli animali, tutela del consumatore,  
sostenibilità ambientale!

Utilizzo dei risultati delle attività dei Controlli Funzionali  
nell'ambito del miglioramento genetico della salute  
della mammella e del contenuto di iodio nel latte

**Prof. Massimo De Marchi**

Bressanvido (VI) – 08 Ottobre 2022

1222-2022  
800  
ANNI



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**DAFNAE**

Department of Agronomy, Food,  
Natural resources, Animals and Environment



**ANARE.**

ASSOCIAZIONE NAZIONALE  
ALLEVATORI BOVINI  
DI RAZZA RENDENA

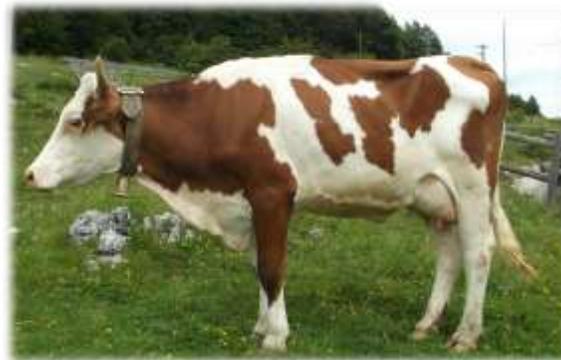
# SALUTE DELLA MAMMELLA



## QUARTI STERILI



- ✓ Campioni di latte da singolo quarto in sterilità
- ✓ 3239 campioni
  - 1589 Frisona Italiana
  - 625 Pezzata Rossa
  - 559 Rendena
  - 466 Jersey
- ✓ 9 aziende



## CONTROLLO FUNZIONALE



- ✓ Campione «simile» Controllo Funzionale
- ✓ 8890 campioni
  - 7991 Frisona Italiana
  - 409 Pezzata Rossa
  - 379 Rendena
  - 111 Jersey
- ✓ 148 aziende
- ✓ Vacche in pre-asciutta e post-parto



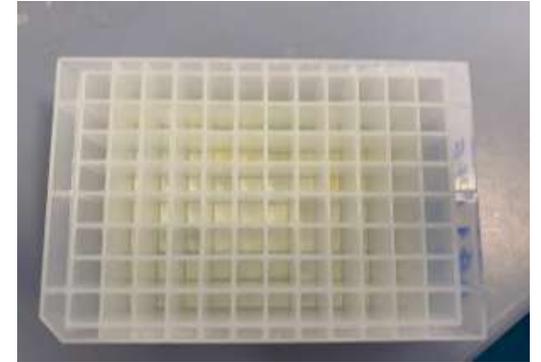
# ANALISI MOLECOLARE



Caricamento 0,5 mL di latte



Estrazione DNA

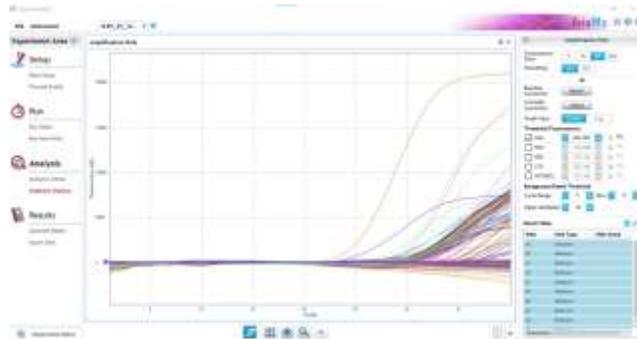


**Kit Mastit 4 BDFT:** identificazione del DNA di 12 patogeni

- ✓ Analisi su campione di latte fresco o congelato
- ✓ ~400 analisi al giorno



Real-Time PCR

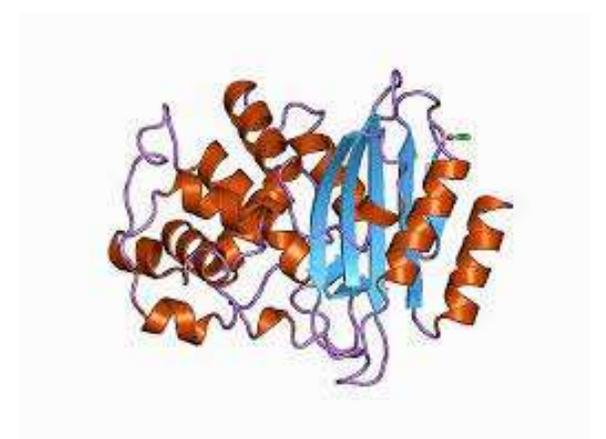


Interpretazione dei risultati:  
**ASSENZA/PRESENZA del patogeno**

# 12 PATOGENI CONSIDERATI

Gruppo	Specie	Serbatoio prevalente	Mastite prevalente:
CONTAGIOSI	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Mammella bovina infetta	Subclinica
	<i>Staphylococcus aureus</i>		Subclinica
	<i>Mycoplasma bovis</i>		Latente
	<i>Mycoplasma spp.</i>		Clinica
AMBIENTALI	<i>Streptococcus uberis</i>	Ambiente (lettieria)	Clinica lieve e moderata
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>		Clinica lieve e moderata
	<i>Klebsiella spp.</i>		
	<i>Enterococcus spp.</i> + <i>Lactococcus lactis ssp. lactis.</i>		
	<i>Escherichia coli</i>		Clinica grave
OPPORTUNISTI	Coagulase Negative Staphylococci	Cute capezzolo	Latente
ALTRO	<i>Prototheca spp.</i>	Feci, ambiente	Subclinica
	Penicillin resistance $\beta$ -lactamase gene		

*Penicillin resistance gene  $\beta$ -lactamase:*



PATOGENI CON GENE  $\beta$ -LACTAMASE RESISTENTE ALLA PENICILLINA -> BATTERI CHE PRESENTANO IL GENE CODIFICANTE PER L'ENZIMA  $\beta$ -LATTAMASI PER LA RESISTENZA ALLA PENICILLINA.

L'enzima  $\beta$ -Lattamasi, prodotto da alcuni batteri, inattiva l'attività degli antibiotici  $\beta$ -lattamici (come le penicilline), idrolizzando l'anello  $\beta$ -lattamico, rendendo il principio attivo poco funzionale.

## FREQUENZE DI CAMPIONI INFETTI NEI DUE DIVERSI PROGETTI

Specie	Quarti sterili	Controllo Funzionale
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3.1%	2.9%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.0%	1.5%
<i>Mycoplasma bovis</i>	5.2%	8.3%
<i>Mycoplasma spp.</i>	0.2%	0.9%
<i>Streptococcus uberis</i>	9.6%	16.5%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1.0%	1.3%
<i>Klebsiella spp.</i>	0.3%	0.8%
<i>Enterococcus spp.</i> + <i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. lactis.</i>	1.0%	14.2%
<i>Escherichia coli</i>	0.5%	0.8%
Coagulase Negative Staphylococci	26.6%	13.8%
<i>Prototheca spp.</i>	0.6%	0.4%
Penicillin resistance $\beta$ -lactamase gene	4.4%	5.3%

# FREQUENZE DI CAMPIONI INFETTI NEI DUE DIVERSI PROGETTI

**CONFRONTO**



Specie	Quarti sterili		Controllo Funzionale
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3.1%	=	2.9%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.0%	=	1.5%
<i>Mycoplasma bovis</i>	5.2%	<	8.3%
<i>Mycoplasma spp.</i>	0.2%	<	0.9%
<i>Streptococcus uberis</i>	9.6%	<	16.5%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1.0%	=	1.3%
<i>Klebsiella spp.</i>	0.3%	=	0.8%
<i>Enterococcus spp.</i> + <i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. lactis.</i>	1.0%	<	14.2%
<i>Escherichia coli</i>	0.5%	=	0.8%
Coagulase Negative Staphylococci	26.6%	>	13.8%
<i>Prototheca spp.</i>	0.6%	=	0.4%
Penicillin resistance $\beta$ -lactamase gene	4.4%	=	5.3%



## TAKE AT HOME MESSAGE:



Le analisi svolte >12.000 dimostrano che solo per alcuni patogeni (es. ambientali) esiste una significativa differenza fra prelievi svolti secondo la modalità quarti sterili e controllo funzionale



Laboratorio ARAV può fornire in routine l'analisi dei patogeni sui campioni individuali di latte raccolti nell'ambito del circuito dei CONTROLLI FUNZIONALI

## FREQUENZE DI CAMPIONI INFETTI PER RAZZA

Specie patogeno	Frisona	Pezzata Rossa	Rendena	Jersey
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3%	5%	10%	0%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1%	3%	5%	0%
<i>Mycoplasma bovis</i>	8%	9%	14%	14%
<i>Mycoplasma spp.</i>	1%	1%	0%	10%
<i>Streptococcus uberis</i>	16%	16%	14%	37%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1%	0%	2%	1%
<i>Klebsiella spp.</i>	1%	0%	1%	1%
<i>Enterococcus spp.</i> + <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> .	13%	24%	21%	25%
<i>Escherichia coli</i>	1%	0%	0%	0%
Coagulase Negative Staphylococci	14%	14%	15%	5%
<i>Prototheca spp.</i>	0.4%	0.5%	1%	0%
Penicillin resistance $\beta$ -lactamase gene	5%	4%	9%	0%
<b>Numero di vacche</b>	7991	409	379	111
<b>Prod. Latte (kg/d)</b>	33.21±1.40	25.28±9.83	20.18±8.02	21.83±8.27
<b>SCS</b>	2.81±2.00	2.77±1.99	2.95±1.95	4.08±1.92
<b>DSCC (%)</b>	62.65±15.88	61.90±15.93	63.79±14.56	60.30±15.59

# FREQUENZE DI CAMPIONI (QUARTI) INFETTI PER AZIENDA

Specie patogeno	Azienda								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	19%	0%	0%	3%	0%	0%	3%	0%	0%
<i>Staphylococcus aureus</i>	0%	0%	3%	0%	8%	1%	1%	0%	0%
<i>Mycoplasma bovis</i>	17%	4%	1%	17%	0%	0%	0%	0%	6%
<i>Mycoplasma spp.</i>	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
<i>Streptococcus uberis</i>	7%	2%	8%	12%	10%	12%	13%	8%	12%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2%	2%	1%	0%	3%	1%	0%	0%	2%
<i>Klebsiella spp.</i>	0%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Enterococcus spp. + Lactococcus lactis ssp. lactis.</i>	1%	1%	4%	0%	0%	0%	0%	1%	1%
<i>Escherichia coli</i>	1%	1%	0%	0%	1%	0%	0%	1%	0%
Coagulase Negative Staphylococci	4%	27%	54%	38%	2%	27%	16%	35%	19%
<i>Prototheca spp.</i>	3%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%
Penicillin resistance $\beta$ -lactamase gene	1%	5%	15%	1%	2%	1%	2%	5%	5%
Razze presenti	RE	HF+SI+RE	SI	HF	SI	HF	JE	HF	HF

## FREQUENZE DI CAMPIONI INFETTI PER AZIENDA (TOTALE AZIENDE 148)

Specie patogeno	N° aziende in cui è presente	Media	Min	Max
<i>Streptococcus agalactiae</i>	53	7%	1%	35%
<i>Staphylococcus aureus</i>	44	4%	1%	17%
<i>Mycoplasma bovis</i>	124	10%	1%	31%
<i>Mycoplasma spp.</i>	46	3%	1%	14%
<i>Streptococcus uberis</i>	136	19%	3%	75%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	50	3%	1%	11%
<i>Klebsiella spp.</i>	132	15%	2%	67%
<i>Enterococcus spp.</i> + <i>Lactococcus lactis ssp. lactis.</i>	125	16%	2%	44%
<i>Escherichia coli</i>	31	3%	1%	14%
Coagulase Negative Staphylococci	132	15%	2%	67%
<i>Prototheca spp.</i>	28	2%	1%	6%
Penicillin resistance $\beta$ -lactamase gene	100	7%	1%	38%



## MEDIE STIMATE RAZZA FRISONA

### QUARTI STERILI

	Numero di vacche	Prod. Latte (kg/d)	SCC (*1000 cell/mL)	SCS	DSCC(%)
No patogeni	213	30.70±1.98 <sup>a</sup>	17±129 <sup>c</sup>	1.80±0.27 <sup>c</sup>	55.30±1.99 <sup>c</sup>
P. opportunisti	228	30.30±1.95 <sup>a</sup>	138±121 <sup>bc</sup>	2.42±0.26 <sup>bc</sup>	57.90±1.77 <sup>bc</sup>
P. ambientali	73	29.30±2.24 <sup>a</sup>	633±178 <sup>a</sup>	3.61±0.37 <sup>a</sup>	67.10±2.98 <sup>a</sup>
P. contagiosi	68	32.50±2.89 <sup>a</sup>	136±274 <sup>abc</sup>	2.43±0.57 <sup>abc</sup>	64.20±4.74 <sup>abc</sup>
P. opportunisti, P. ambientali, P. contagiosi	260	30.70±1.99 <sup>a</sup>	406±0127 <sup>ab</sup>	2.81±0.27 <sup>ab</sup>	62.20±1.95 <sup>ab</sup>

### CONTROLLO FUNZIONALE

	Numero di vacche	Prod. Latte (kg/d)	SCC (*1000 cell/mL)	SCS	DSCC(%)
No patogeni	4659	32.50±0.25 <sup>a</sup>	195±16.1 <sup>c</sup>	2.45±0.04 <sup>d</sup>	60.10±0.37 <sup>c</sup>
P. opportunisti	639	30.70±0.40 <sup>bc</sup>	369±24.4 <sup>a</sup>	3.26±0.08 <sup>ab</sup>	65.40±0.70 <sup>ab</sup>
P. ambientali	1913	30.90±0.29 <sup>bc</sup>	396±24.4 <sup>a</sup>	3.05±0.05 <sup>bc</sup>	63.50±0.47 <sup>b</sup>
P. contagiosi	736	31.90±0.40 <sup>ab</sup>	294±39.4 <sup>b</sup>	2.88±0.08 <sup>c</sup>	63.50±0.70 <sup>b</sup>
P. opportunisti, P. ambientali, P. contagiosi	876	30.60±0.36 <sup>c</sup>	429±35.9 <sup>a</sup>	3.35±0.07 <sup>a</sup>	66.10±0.63 <sup>a</sup>



## MEDIE STIMATE RAZZA FRISONA

Specie		Numero di vacche	Produzione di Latte (kg/d)	SCC (*1000 cell/mL)	SCS	DSCC(%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Assenza	9122	31.80±0.24 <sup>a</sup>	277±13 <sup>b</sup>	2.75±0.04 <sup>b</sup>	62.00±1.19 <sup>b</sup>
	Presenza	349	30.60±0.64 <sup>b</sup>	467±69 <sup>a</sup>	3.34±0.14 <sup>a</sup>	65.20±0.34 <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Assenza	9224	31.80±0.24 <sup>a</sup>	277±13 <sup>b</sup>	2.75±0.04 <sup>b</sup>	62.00±0.34 <sup>b</sup>
	Presenza	247	30.50±0.82 <sup>a</sup>	664±97 <sup>a</sup>	4.23±0.19 <sup>o</sup>	72.80±1.56 <sup>a</sup>
<i>Streptococcus uberis</i>	Assenza	7615	32.00±0.24 <sup>a</sup>	237±13 <sup>b</sup>	2.62±0.04 <sup>b</sup>	61.20±0.34 <sup>b</sup>
	Presenza	1856	30.30±0.32 <sup>b</sup>	514±28 <sup>a</sup>	3.57±0.06 <sup>a</sup>	67.30±0.53 <sup>a</sup>
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Assenza	9263	31.80±0.24 <sup>a</sup>	280±13 <sup>b</sup>	2.76±0.04 <sup>b</sup>	62.10±0.34 <sup>b</sup>
	Presenza	208	31.80±0.93 <sup>a</sup>	444±99 <sup>a</sup>	3.18±0.21 <sup>a</sup>	66.30±1.75 <sup>a</sup>
Coagulase Negative Staphylococci	Assenza	7851	32.0±0.24 <sup>a</sup>	261±14 <sup>b</sup>	2.67±0.04 <sup>b</sup>	61.50±0.34 <sup>b</sup>
	Presenza	1620	30.50±0.33 <sup>b</sup>	406±30 <sup>a</sup>	3.35±0.07 <sup>a</sup>	66.00±0.56 <sup>a</sup>
<i>Prototheca spp.</i>	Assenza	9410	31.80±0.24 <sup>a</sup>	281±13 <sup>b</sup>	2.76±0.04 <sup>b</sup>	62.10±0.34 <sup>a</sup>
	Presenza	61	29.40±1.39 <sup>a</sup>	403±168 <sup>a</sup>	3.64±0.33 <sup>a</sup>	64.20±2.69 <sup>a</sup>

# UTILIZZO DEI CF PER IL RILEVAMENTO DEI PATOGENI TRAMITE ANALISI MOLECOLARE



- ✓ Utilizzo del circuito (CF)
- ✓ Screening completo della mandria o delle vacche sospette
- ✓ Minori costi rispetto al campionamento quarto sterile

- ✓ < accuratezza rispetto al campionamento quarto sterile
- ✓ Alcuni patogeni amb. non possono essere considerati perché sovrastimati (*Enterococcus spp.* + *Lactococcus lactis ssp. lactis.*)
- ✓ Solo assenza/presenza

Implementare campionamento CF per evitare contaminazioni

Possibilità di fare una semi-quantificazione dei patogeni





Possibilità di utilizzare il campione del CF per eseguire l'analisi molecolare su gruppi di patogeni specifici su:

✓ tutta l'azienda

✓ animali specifici in base:

- Giorni di lattazione (asciutta, post-partum, ...)
- Cellule somatiche / Cellule differenziali
- Mastite



Strumento oggettivo per razionalizzare l'utilizzo degli antibiotici nelle stalle di vacche da latte e supporto per l'allevatore per l'asciutta selettiva



Miglioramento genetico della salute della mammella

Master mix	qPCR target
M4B	<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Mycoplasma bovis</i>
	IAC
M4D	<i>Mycoplasma species</i>
	Penicillin resistance gene $\beta$ -lactamase from Staphylococci
	Coagulase Negative Staphylococci
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
	IAC
M4F	Prototheca
	Klebsiella
	Enterococcus + Lactococcus lactis ssp. lactis
	E-coli
	IAC
TBC4	Bacillus + Clostridium
	Streptococcus species
	Pseudomonas
	Enterobacteriaceae + Enterococcus

Per evitare possibili contaminazioni soprattutto di patogeni ambientali è molto importante il ruolo:



Dell'**allevatore** per la pulizia della sala di mungitura e dell'impianto di mungitura



Del **controllore** che deve evitare possibili contaminazioni del campione



Esempio: evitare contaminazioni di *Streptococcus uberis*-> patogeno presente nell'apparato digerente dell'animale e quindi presente nel materiale fecale



Contaminazione tramite feci

# CONTENUTO DI IODIO NEL LATTE



## Dai Controlli Funzionali:

- ✓ Campioni dei controlli funzionali
- ✓ >12 000 campioni di latte bovino
- ✓ Razze: Frisona Italiana  
Pezzata Rossa  
Rendena  
Jersey





Determinazioni quantità' di iodio  
tramite metodo di riferimento ICP-MS

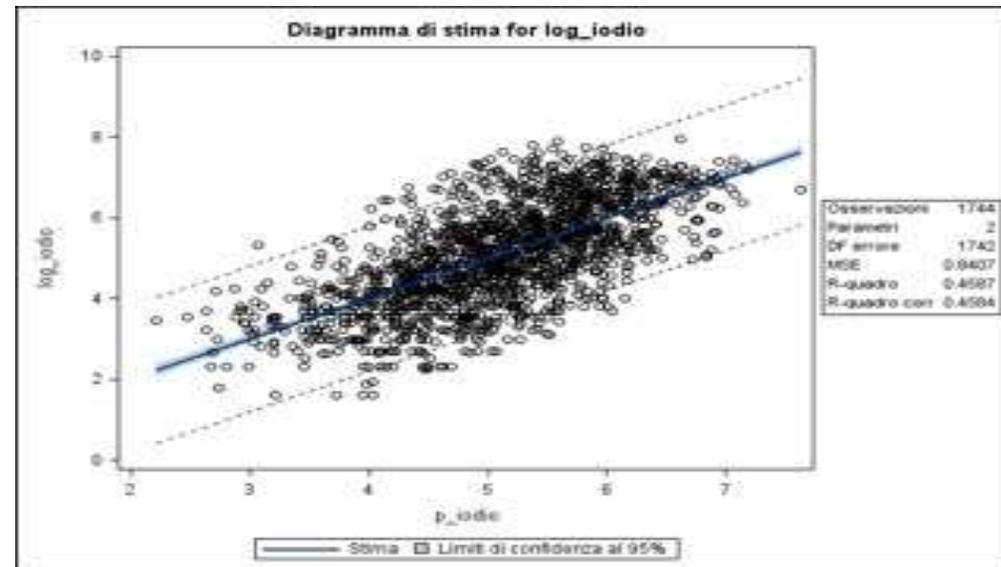
4.003 CAMPIONI



Spettri MIRS da Milkoscan 7DC

### MODELLO DI PREDIZIONE

Sviluppo della metodologia MIRS per la predizione del contenuto di  
iodio attraverso la combinazione di spettri e dati di riferimento



restanti  
~8.000 CAMPIONI



Il modello sviluppato è stato usato per predire il contenuto di iodio in un set di campioni di latte bovino individuale il cui spettro è stato preventivamente stoccato

CORRELAZIONI  
FENOTIPICHE

	Grasso, %	Proteina, %	Lattosio, %	Cellule somatiche, n/mL	Urea, mg/dL
Iodio ( $\mu\text{g/L}$ )	0,012 ( <i>P</i> =0,490)	-0,062 ( <i>P</i> <0,001)	0,004 ( <i>P</i> =0,835)	0,016 ( <i>P</i> =0,356)	-0,034 ( <i>P</i> =0,053)

STATISTICHE  
DESCRITTIVE

Razza ( $\mu\text{g/L}$ )	Media	Deviazione Standard	Minimo	Massimo
Frisona Italiana	242,23	240,23	4,00	995,00
Jersey	191,25	259,79	25,00	900,00
Pezzata Rossa Italiana	189,09	209,94	6,00	994,81
Rendena	214,01	210,75	15,00	810,00

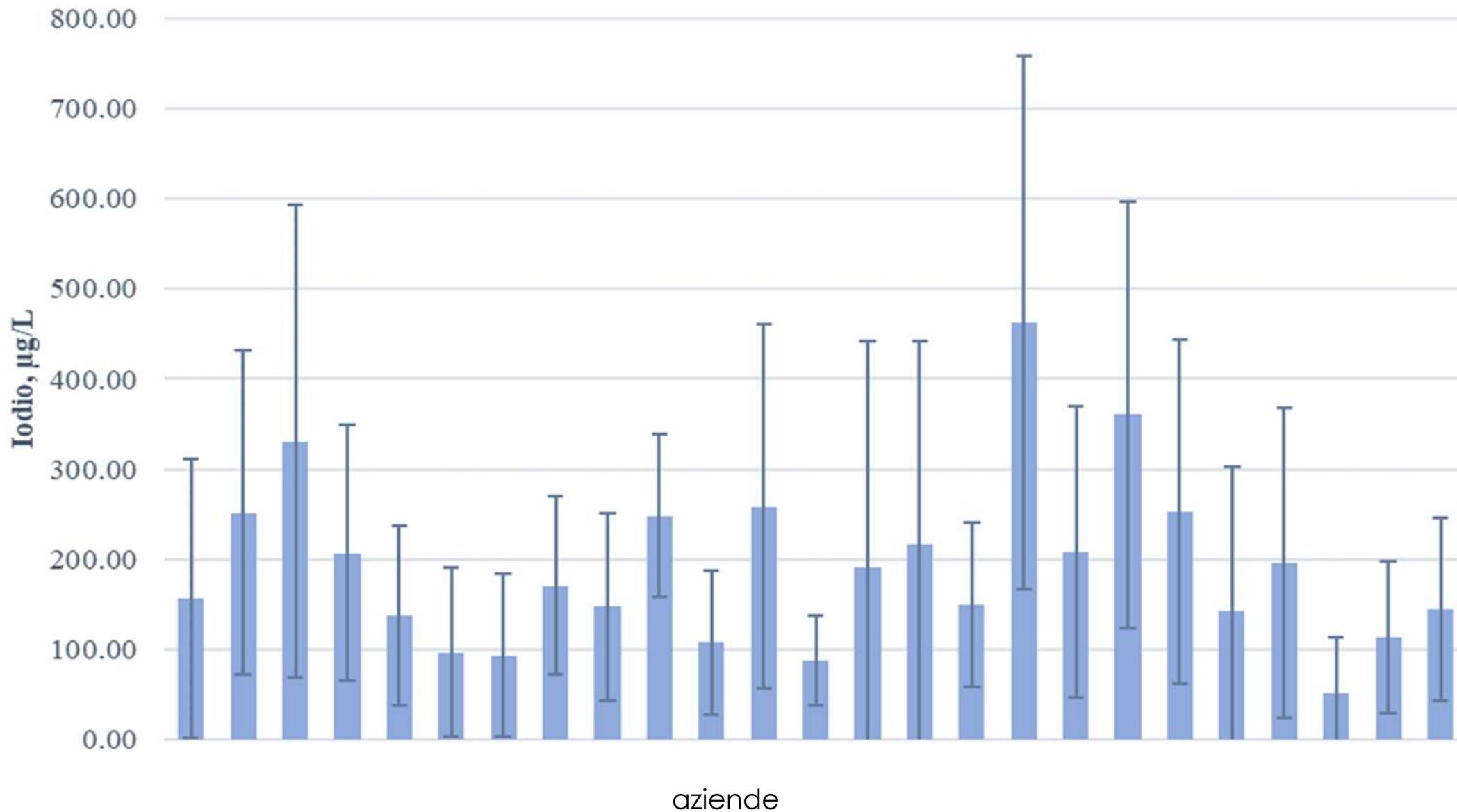
## CONTENUTO DI IODIO ( $\mu\text{g/L}$ ) NEL LATTE IN DIVERSI FASI DELLA LATTAZIONE

Classe di giorni di lattazione	Media	Deviazione Standard	Minimo	Massimo
0-10	140,29	155,25	5,00	715,00
11-30	199,17	198,93	4,00	985,00
31-60	250,91	229,42	6,50	986,15
61-90	251,16	245,22	8,50	965,00
91-120	258,78	262,01	6,00	994,81
121-180	267,44	274,11	5,00	985,00
181-240	248,60	243,62	5,00	980,00
241-300	244,31	240,79	5,00	995,00
301-360	211,85	224,15	5,00	995,00
>360	200,93	205,19	5,00	955,00

## CONTENUTO DI IODIO ( $\mu\text{g/L}$ ) NEL LATTE NEI DIVERSI ORDINI DI PARTO

Ordine di parto	Media	Deviazione Standard	Minimo	Massimo
1	235,43	237,33	4,00	986,15
2	236,31	234,64	5,00	990,00
3	240,91	244,09	5,00	995,00
$\geq 4$	221,84	215,51	5,00	994,81

# CONTENUTO DI IODIO NELLE AZIENDE CON UN NUMERO ELEVATO DI CAMPIONI (min 70)





Determinazioni quantità' di iodio  
tramite metodo di riferimento ICP-MS

## ANALISI RAGGI-X

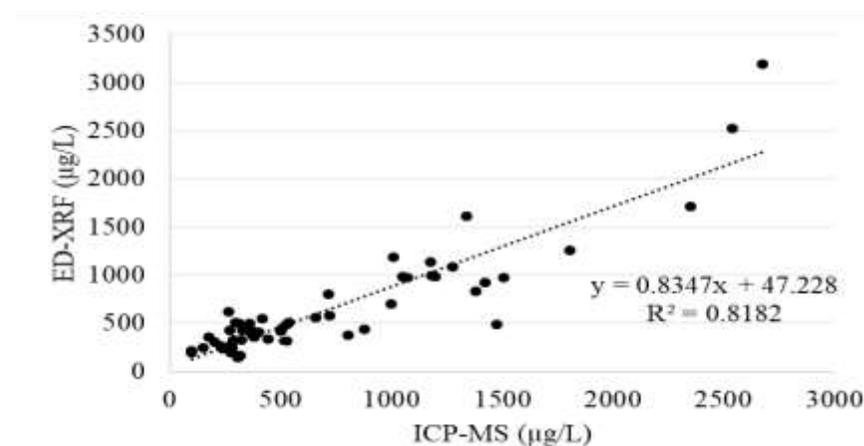


Spettrometro a fluorescenza a raggi  
X a dispersione di energia (ED-XRF)



## MODELLO DI PREDIZIONE

sviluppo della metodologia MIRS per la predizione del contenuto di  
iodio avvalendosi di spettri e dato di riferimento





## TAKE AT HOME MESSAGE:



Caratterizzazione della presenza di Iodio nelle razze studiate (specializzate da latte > duplice) ed effetto stalla (razione) rilevante per il contenuto di iodio



Sviluppate ed implementate due tecnologie (infrarosso e raggi X) per l'analisi rapida (senza preparativa del campione) e a basso costo del contenuto di iodio nel latte vaccino. Le accuratezze dei modelli di predizione per la tecnologia a raggi X (XRF) migliori rispetto alla tecnologia all'infrarosso (MIRS)



La tecnologia all'infrarosso nell'ambito dei CF può fornire la predizione del contenuto di iodio per le ANA (utilizzi genetici)

# CONCLUSIONI

- Lo sviluppo e l'implementazione di nuove metodologie di analisi (PCR real-time, Infrarosso, Raggi-X) rappresenta il punto di partenza a supporto delle ANA (FENOTIPI), degli allevatori (informazioni nell'ambito dei CF) e dei tecnici/veterinari
- Formazione degli operatori legati alla stalla di vacche da latte (es. operatori di stalla, tecnici, ecc.)
- Condivisione delle conoscenze (Iodio) con altri ambiti della filiera attraverso l'interazione con altre competenze (es. Medicina) e altri progetti di ricerca (Sustaln4Food – POR Regione Veneto)

1222-2022  
800  
ANNI



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



# RINGRAZIAMENTI

- UNIPD – Silvia Magro, Elena Chiarin, Marta Pozza, Alberto Guerra, Elena Visentin, Filippo Cendron, Angela Costa, Giovanni Niero
- ARAV – Personale di laboratorio & Tecnici di stalla
- ANAFIBJ, ANAPRI e ANARE
- Regione Veneto

[massimo.demarchi@unipd.it](mailto:massimo.demarchi@unipd.it)

1222-2022  
800  
ANNI



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**DAFNAE**  
Department of Agronomy, Food,  
Natural resources, Animals and Environment

