



**SOCIETÀ ITALIANA
DI DIAGNOSTICA
DI LABORATORIO VETERINARIA**



REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



X Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.

Alghero

Hotel Calabona

22-24 Ottobre 2008

PROGRAMMA PRELIMINARE

INDAGINE SULLA PRESENZA DI *PROTOTHECA SPP.* IN ALLEVAMENTI DI BOVINE DA LATTE DEL NORD ITALIA

Cammi G.¹, Arrigoni N.¹, Belletti GL.¹, Garilli F.², Ricchi M.¹, Vicari N.¹, Tamba M.¹, Galletti G.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Ubertini".

²Corso di Laurea in "Tecnologie delle Produzioni animali e sicurezza degli alimenti" Facoltà di Medicina Veterinaria. Università di Parma.

Key words; *Prototheca spp.*, latte di massa, mastite bovina

Summary

Bulk tank milk samples collected from 350 dairy herds located in the Po Valley (Northern Italy) were investigated for *Prototheca spp.* All samples were cultured on PIM at 30 °C for 72 h for total number of *Prototheca* cells and analyzed also for total bacteria count and somatic cells count. *Prototheca spp.* was isolated in milk sample from 54 (15,43%) dairy herds.

No statistical correlation resulted between *Prototheca spp.* isolation and bulk tank milk somatic cell counts and total bacterial count.

Introduzione

Al genere *Prototheca* appartengono microalghe unicellulari strettamente correlate alle alghe verdi del Genere *Chlorella*, ma incapaci di attività fotosintetica. Largamente diffuse nell'ambiente come saprofiti, esse prediligono habitat umidi e ricchi di sostanza organica. In taluni casi possono assumere il ruolo di patogeni opportunisti per uomo ed animali. In campo animale la patologia da *Prototheca* più conosciuta è sicuramente la mastite sostenuta da *Prototheca zopfii*, descritta per la prima volta da Lerche nel 1952. Segnalata in passato come forma sporadica, questa patologia del bovino, sta assumendo in molti Paesi, tra cui il nostro, un andamento endemico nell'ambito dell'allevamento colpito, arrivando a provocare significative perdite economiche (1, 2, 3, 5, 7). Essa si manifesta generalmente con una forma clinica di lieve entità, con modeste alterazioni del latte, senza sintomi sistemici o in forma sub-clinica con solo rialzo cellulare. In molti casi si ha anche diminuzione significativa della produzione latte. Inoltre, l'assoluta assenza di risposta alle terapie antibiotiche, con conseguente evoluzione cronica della patologia, rende necessario allontanare gli animali colpiti dall'allevamento (5). *P. zopfii* viene considerata primariamente un patogeno ambientale; infatti può trovare nell'allevamento bovino habitat favorevoli a livello di abbeveratoi (acqua e zone circostanti), mangiatoie (alimenti quali mangimi, foraggi, insilati), feci e lettiera, liquidi di percolazione, latte infetto, tettarelle, impianti di mungitura. Una gestione igienico-sanitaria non ottimale dell'allevamento, specialmente a livello di mungitura, può favorire la comparsa della mastite in forma contagiosa.

La diagnosi di mastite da *Prototheca*, impossibile da un punto di vista clinico, richiede il supporto di esami di laboratorio. La messa in evidenza di *Prototheca spp.*, viene effettuata con esami microbiologici, sia sul latte delle singole bovine che sul latte di massa, come pure da diverse tipologie di campioni ambientali (acqua di abbeverata, acqua di lavaggio dell'impianto di mungitura, lettiera, feci, tamponi di superfici, foraggi ed altri tipi di alimenti, ecc.).

Scopo del lavoro è presentare i dati relativi alla diffusione dell'infezione da *Prototheca* nell'allevamento bovino da latte.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati per presenza di *Prototheca spp.*, 350 campioni di latte di massa, prelevati da altrettanti allevamenti, nel mese di maggio 2008, per la determinazione dei parametri merceologici previsti nei piani di controllo per il pagamento del latte secondo qualità. 314 allevamenti erano

situati nella Regione Emilia-Romagna, 36 nella Regione Lombardia (Tabella 1).

Trattandosi di campioni di latte conferiti per le analisi merceologiche con presenza del conservante Sodio Azide (0,016 g/100 ml di latte), è stato necessario, in via preliminare, valutare l'eventuale impatto di questa sostanza ad azione batteriostatica, sulla sopravvivenza nel latte e sullo sviluppo in vitro di *Prototheca spp.* A questo scopo, campioni di latte di massa bovino (controllati per l'assenza di *Prototheca spp.*) con e senza il conservante, sono stati contaminati con la medesima sospensione di un ceppo di campo di *Prototheca spp.* e quindi conservati a temperatura di refrigerazione (0-4°C) per un periodo di 13 giorni. Il confronto tra le conte delle cariche di *Prototheca spp.*, effettuate periodicamente dalle due tipologie di campioni, ha permesso di verificare che il Sodio Azide non ha alcun effetto di tipo batteriostatico sulla microalga.

L'esame per la ricerca di *Prototheca spp.* è stato condotto, dopo opportuna agitazione del campione, inoculando direttamente 0,5 ml di latte in una piastra di PIM, (*Prototheca Isolation Medium*) (6), successivamente incubata a 30 °C per 72 ore in condizioni di aerobiosi (soglia di rilevabilità: 2 ufc/ml). In questo modo è stato possibile rilevare la presenza anche di una sola bovina infetta su 100, qualora eliminasse almeno 200 ufc di *Prototheca spp.* /ml di latte (valore minimo di ufc/ml da noi rilevato in vacche infette). Terminato il periodo di incubazione, le colonie cresciute sulle piastre sono state osservate allo stereomicroscopio per valutarne la morfologia e quindi sottoposte a colorazione di Gram. Le colonie di *Prototheca spp.* sono state contate fino ad un massimo di 300 per piastra (corrispondenti a 600 ufc/ml di campione). I conteggi delle piastre con un numero superiore di colonie, sono state espressi come superiori a 600 ufc/ml di campione.

Da ciascuna delle piastre con sviluppo di *Prototheca spp.* sono state prelevate una o più colonie con morfologia rappresentativa, e trapiantate su Tryptone Soya Yeast Extract Agar Slant per la successiva identificazione mediante PCR.

I ceppi isolati sono stati sottoposti ad identificazione mediante PCR, amplificando una regione conservata del RNA 18S con primers Proto18-4f e Proto18-4r, secondo la metodica descritta da Roesler et al. (2006) (8). Per ogni campione controllato, sono stati registrati anche i dati relativi alla Carica batterica totale ed alla conta delle cellule somatiche, determinati rispettivamente mediante Bactoscan FC (tecnica optofluorometrica) e Fossomatic 5000 (conta diretta in optofluorometria). Infine, sulla base del numero di vacche in lattazione, gli allevamenti sono stati inseriti in tre fasce di consistenza: fino a 50, 51-100, >100 bovine in lattazione.

Tabella 1: Provenienza e consistenza degli allevamenti sottoposti a monitoraggio

Vacche in lattazione		≤50	51-100	>100	Tot. Allev.
Allevamenti	in Emilia-Romagna	171	78	65	314
	in Lombardia	12	11	13	36
	Tot.	183	89	78	350

Risultati

All'esame microbiologico sono risultati positivi 54 campioni, tutti confermati in PCR come appartenenti al Genere *Prototheca*. La percentuale di positività per presenza di *Prototheca spp.* nel latte di massa è stata quindi del 15,43%. La positività ha interessato allevamenti appartenenti alle tre fasce di consistenza individuate, con una leggera superiorità in quelli con un numero di bovine in lattazione superiore a 100 (Tabella 2). E' stata individuata una debole relazione tra la consistenza di capi in lattazione e la presenza di *Prototheca spp.*: $p < 0.01$ al test χ^2 considerando le tre classi di consistenza individuate (≤ 50 , 51-100, > 100); OR=1,0071, risultato di una regressione logistica tra presenza/assenza di *Prototheca spp.* e consistenza degli allevamenti

Tabella 2: Allevamenti positivi per presenza di *Prototheca spp.* nel latte di massa

Vacche in lattazione	≤ 50	51-100	> 100	Totale
Allevamenti controllati	183	89	78	350
Allevamenti positivi	17 (9,28%)	12 (13,48%)	25 (32,05 %)	54 (15,43%)

Nessuna relazione risulta tra il valore di cellule somatiche e la presenza/assenza di *Prototheca spp.* ($p > 0.05$ al test χ^2).

Non è stata rilevata alcuna relazione neppure tra l'entità della contaminazione del latte da *Prototheca spp.* (ufc/ml) ed il valore di cellule somatiche (l'analisi della varianza non ha rilevato differenze significative all'interno dei tre gruppi definiti sulla base delle ufc/ml di *Prototheca* nel latte, ≤ 10 , 11-100, > 100) (Tabella 3).

Tabella 3: Entità della contaminazione da *Prototheca spp.* nel latte di massa degli allevamenti positivi

ufc <i>Prototheca spp.</i> /ml	≤ 10	11-100	> 100	Tot.
Allevamenti positivi	13	22	19	54

Il 76% degli allevamenti positivi ha presentato valori di carica batterica inferiori alle 50.000 ufc/ml nel latte di massa; i campioni positivi e negativi si distribuivano in maniera sovrapponibile nelle classi di frequenza individuate per la carica batterica (fino a 20, 20-50, 50-100, 100-200, 200-300, > 300 ufc/ml x 1000).

Conclusioni

L'indagine condotta ha evidenziato la presenza di *Prototheca spp.* nel 15,43% degli allevamenti, con un numero di ufc/ml compreso tra 2 ed oltre 600.

Pur non essendo disponibili dati sulla situazione sanitaria degli allevamenti, è possibile comunque ipotizzare che la positività riscontrata sia riferibile primariamente alla presenza di animali infetti eliminatori, che rappresentano la principale fonte di contaminazione del latte. Infatti, bisogna considerare che un'elevata contaminazione dell'ambiente da *Prototheca* è legata alla presenza di animali infetti ed eliminatori. Negli allevamenti in cui non vi sono casi di mastiti da *Prototheca*, la presenza dell'alga nell'ambiente è generalmente limitata (4, 9). La percentuale di positività riscontrata rileva una evidente diffusione dell'infezione nell'allevamento da latte nel nostro territorio. Il dato richiede sicuramente ulteriori indagini per individuare le cause che hanno permesso il diffondersi

dell'infezione, approfondendone gli aspetti epidemiologici ed eziologici.

Dai risultati dell'indagine effettuata, emerge inoltre, la necessità di introdurre la ricerca di *Prototheca spp.* nella routine diagnostica della mastite bovina; infatti, il modo più efficace per controllare questo tipo di infezione, resta la precocità della diagnosi e la repentina applicazione delle specifiche misure igienico-sanitarie e, se possibile, l'eliminazione degli animali infetti. A questo riguardo va sottolineato che il latte di massa si conferma un campione estremamente valido, oltre che pratico e poco costoso, per rilevare in tempi rapidi la presenza di *Prototheca* in allevamento.

L'altro dato che emerge dall'indagine effettuata è la mancata correlazione tra il valore delle cellule somatiche e della carica batterica totale del latte di massa con la presenza/assenza di *Prototheca spp.*; il dato si spiega tenendo presente che questi parametri sono influenzati dalla prevalenza di infezione, dall'entità dell'eliminazione della microalga dalla mammella oltre che dalla gestione igienico-sanitaria generale dell'allevamento e da quella relativa alla mastite.

Negli allevamenti con infezione largamente diffusa e persistente, secondo la nostra esperienza (2) ed in accordo con quanto segnalato da altri Autori (1), vi è generalmente una ripercussione negativa sui valori di carica batterica e cellule somatiche del latte di massa che possono andare ben oltre i limiti di legge.

Bibliografia

1. Allodi S., Bertocchi L., Moroni P., Miranda Ribera A., Pisoni G., Casula A., Scaccabarozzi L., Toni F., Bronzo V. (2006). Prevalenza delle infezioni mammarie da *Prototheca spp.* in un allevamento di bovine da latte. *Buiatria. Journal of the Italian Association for Buiiatrics.* 2, 39-44.
2. Bertocchi L., Arrigoni N., Bolzoni G., Marchi V., Bronzo V., Varisco G. (2007) *Prototheca zopfii* intramammary infections control in a high prevalence herd: preliminary results. 46th National Mastitis Council Meeting, Texas, 228-229.
3. Costa E.O., Carciofi A.C., Melville P.A., Prada M.S., Schalh U., (1996). *Prototheca sp.* Outbreak of bovine mastitis. *J. Vet. Med. B.* 43, 321-324.
4. Costa, E.O., Melville P.A., Ribeiro A.R., Watanabe E.T., Parolai M.C. (1997). Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. *Mycopathologia* 137, 33-36.
5. Janosi S., Ratz F., Szigeti G., Kulcsar M., Kerényi J., Lauko T., Katona F. (2001). Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *The Vet. Quart.* 23, 2, 58-61
6. Pore S.R. (1973). Selective medium for the isolation of *Prototheca*. *Appl. Microbiol.* 26, 4, 648-649.
7. Pore, R.S., Shahan T.A., Pore M.D., Blauwiekel R. (1987). Occurrence of *Prototheca zopfii*, a mastitis pathogen, in milk. *Vet. Microbiol.* 15, 315-323
8. Roesler, U., Moller A., Hensel A., Baumann D., Truyen U., (2006). Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *P. zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1419-1425
9. Rosignoli C., Nigrelli A.D., Franzini G., Nardi M., Guizzardi S., Bottoli E., Favalli F. (2006). Indagine preliminare sulla presenza ambientale di *Prototheca zopfii* in allevamenti di bovine da latte. *Buiatria. Journal of the Italian Association for Buiiatrics.* 2, 45-53