izs
istituto zooprofilattico sperimentale
della puglia e della basilicata

IZS PB 08/21 RC

"Studio metagenomico ed analisi della diversità microbica nel latte di bovini sani ed affetti da mastite"

Responsabile Scientifico: Dott.ssa L. Capozzi

Relatore Convegno Ricerca e Territorio 2025 IZSPB: Dott.ssa Bianco Angelica

La mastite, un'infiammazione a carico dell'apparato del tessuto mammario di bovine, è una delle malattie più comuni e diffuse che colpiscono il settore lattiero-caseario. Ne deriva che il controllo della mastite nel settore lattiero-caseario ha un'importanza cruciale non solo per l'economia delle aziende, ma anche per gli animali. Scopo del progetto di Ricerca Corrente RC08/2021 intitolato "Studio metagenomico ed analisi della diversità microbica nel latte di bovini sani ed affetti da mastite" è la caratterizzazione del microbiota del latte prodotto in allevamenti principalmente ubicati in Puglia. Tale obbiettivo è stato realizzato mediante un approccio integrato che ha combinato prove microbiologiche e molecolari, fino all'applicazione dell'analisi bioinformatica dei dati. Sono stati prelevati campioni di latte da oltre un migliaio di vacche provenienti da diversi allevamenti (Figura 1). Tutti i campioni raccolti sono stati sottoposti ad estrazione del DNA e a screening molecolare mediante saggio multiplex in Real-Time PCR, per la rilevazione simultanea di 15 agenti mastidogeni ed un gene di resistenza alle penicilline; i campioni sono stati in seguito sottoposti alla conta delle cellule somatiche (SCC). Dai risultati ottenuti in questa prima fase è stato possibile selezionare 59 campioni da sottoporre al sequenziamento metagenomico della porzione *V3-V4* del gene rRNA16S ripartiti in 4 categorie: "affected"; "unaffected"; "unknown"; "control". Le analisi degli Amplicon Sequence Variants (ASV) ha evidenziato un'alta complessità microbica dei campioni studiati senza però rilevare divergenze significativamente rilevanti tra classi confrontati (Figura 2). In seguito le attività sono proseguite con il sequenziamento genomico di alcuni isolati batterici (N=30) con lo scopo di definire il profilo genico di resistenza antimicrobica focalizzando l'attenzione sulle classi di antibiotici comunemente utilizzate in ambito zootecnico.

Alla luce dei dati ottenuti nell'ambito del progetto di ricerca è possibile affermare che i risultati hanno confermato la grande eterogeneità e complessità del microbiota del latte. Circa il 60% dei campioni testati mediante screening molecolare è risultato positivo ad almeno un target di patogeni. I batteri più frequentemente rilevati sono quelli appartenenti al genere *Staphylococcus* spp e alla specie *Escherichia coli* e *Corynebacterium bovis*. Nel 99.5% dei campioni risultati negativi al saggio di RT-PCR multiplex è stato riscontrato un numero di SCC inferiore al 200.000/mL, corrispondente al valore soglia fissato, sulla base di dati di letteratura, per differenziare i campioni di latte mastitico (SCC >200.000/mL) da latte non mastitico (SCC<200.00/mL). Il sequenziamento genomico ha permesso di indentificare circa 450 generi differenti evidenziando un alto grado di complessità del microbiota del latte. Il sequenziamento genomico, seppure condotto su un numero limitato di isolati,

ha permesso di identificare geni di resistenza ad antibiotici di uso comune in allevamento, come tetracicline, penicilline e sulfamidici, un dato preoccupante sull'esito dell'efficacia dei futuri trattamenti antibiotici. Ne consegue che politiche di gestione più rigorose e critiche devono essere adottate per regolamentare l'uso degli antibiotici, al fine di contenere la diffusione della resistenza.

In conclusione il progetto ha fornito dati di prevalenza di microorganismi circolanti negli allevamenti coinvolti nello studio e informazioni sul profilo di resistenza di un numero limitato di isolati. I dati raccolti sono stati divulgati mediante presentazione orale e poster al 76° Congresso SISVET e saranno oggetto di future pubblicazioni su riviste indicizzate.

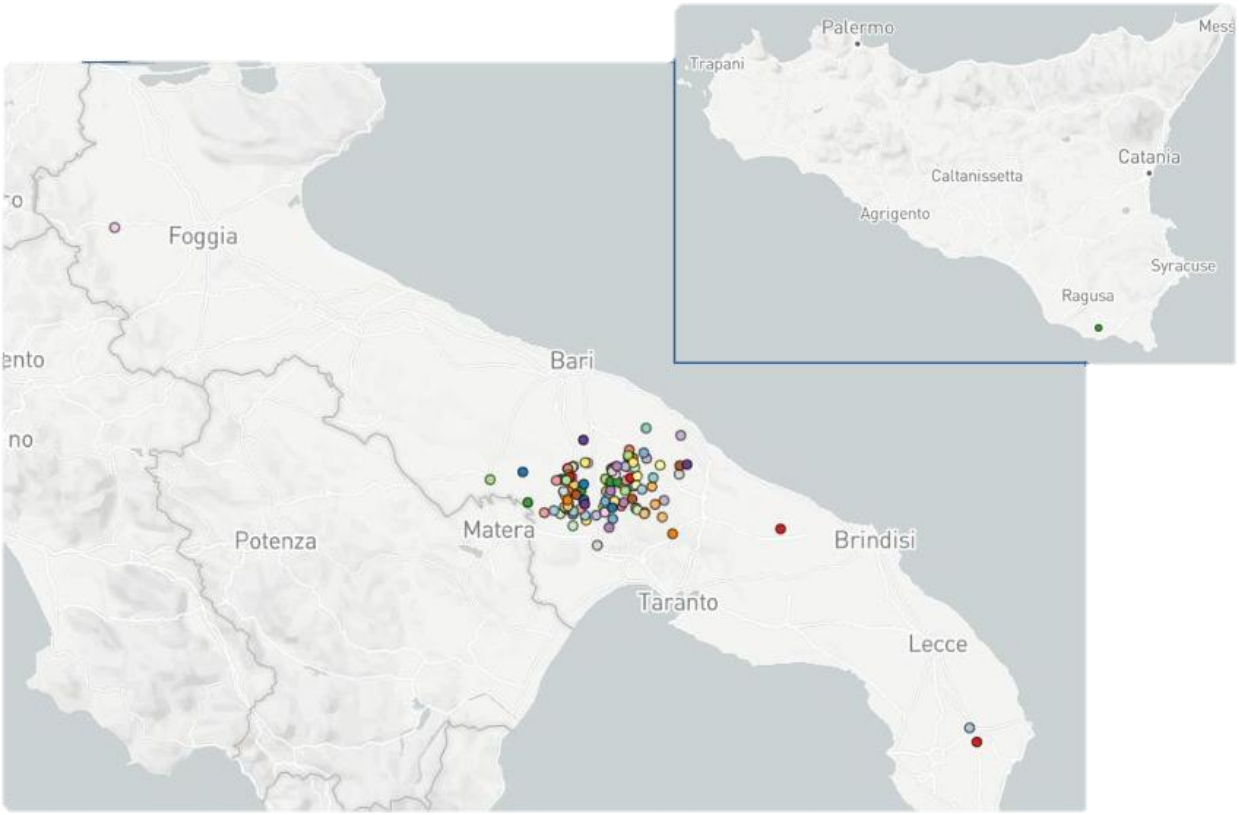


Figura 1. Mappa delle aziende zootecniche coinvolte nel campionamento del latte da singolo capo.

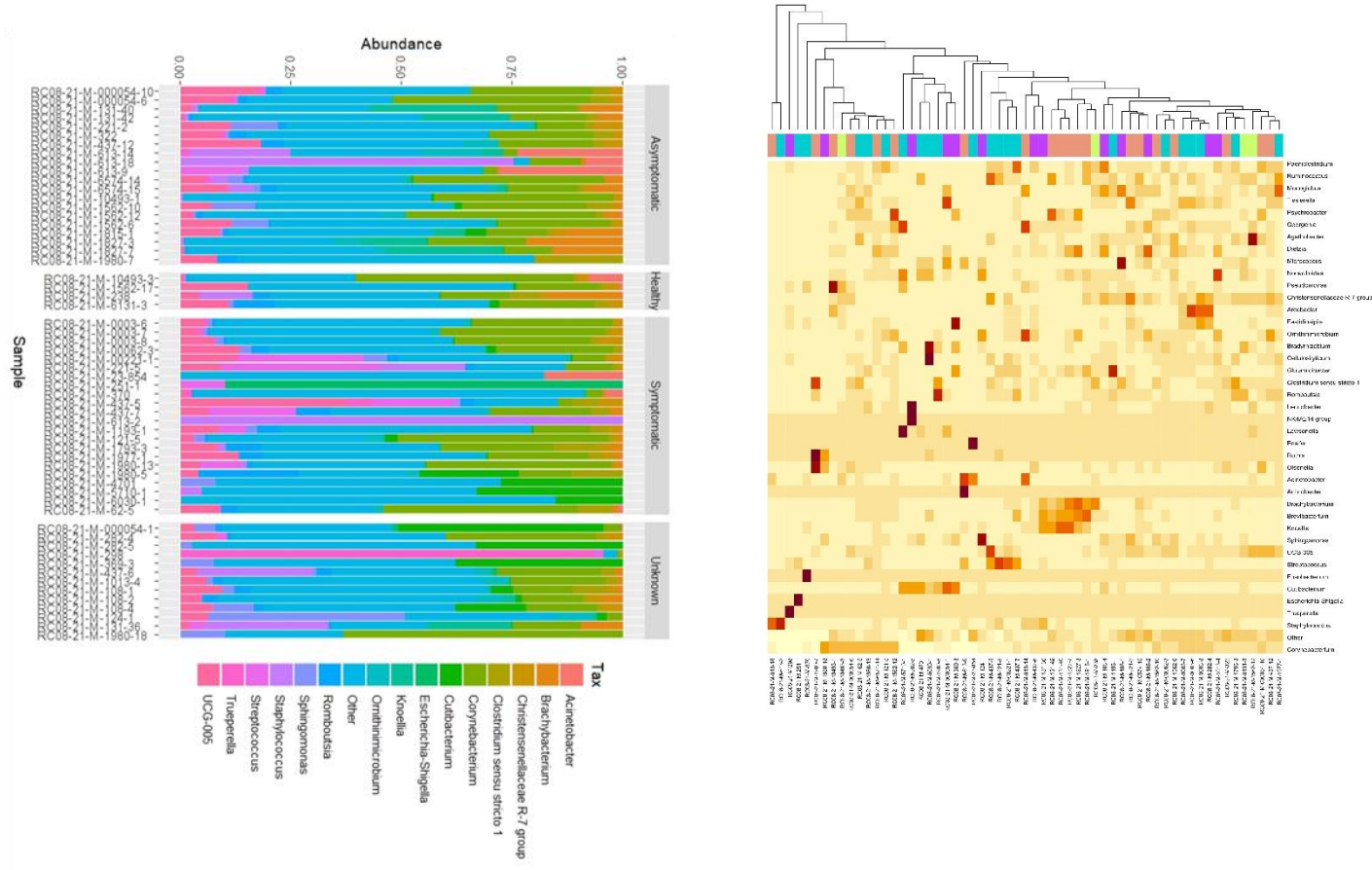


Figura 2. Abbondanza relativa (Top 15 generi batterici più rappresentati) nelle quattro categorie di campioni analizzati (A), e clusterizzazione dei profili di abbondanza relativa dei principali generi per tutti i campioni sottoposti ad approccio metagenomico (B).

Bibliografia essenziale:

Zecconi A. and Zanirato G. Il controllo delle mastiti per un allevamento sostenibile. Litografia SAB-Budrio (BO), pp. 1-69 (2013).

Oikonomou, G. et al. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. PloS one 9, e85904 (2014).

Oikonomou, G., Machado, V. S., Santisteban, C., Schukken, Y. H. &Bicalho, R. C. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. PLoS One 7, e47671, doi: 10.1371/journal.pone.0047671 (2012).

Iorio, L., et al. "Antimicrobial resistance and mastitis in dairy farms: A focus on Staphylococcus aureus and Escherichia coli." Frontiers in Microbiology, 10: 2275 (2019).