

# **MARKERS INNOVATIVI PER LA DIAGNOSI DELLA MASTITE BOVINA**

***De Matteis Giovanna – Grandoni Francesco***

***Council for Agricultural Research and Economics – CREA***

***Research Centre for Animal Production and Aquaculture, Monterotondo (Rome) - Italy***



## Laboratorio di citofluorimetria

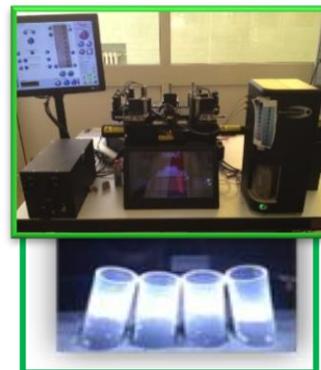


## Principali aree di ricerca:

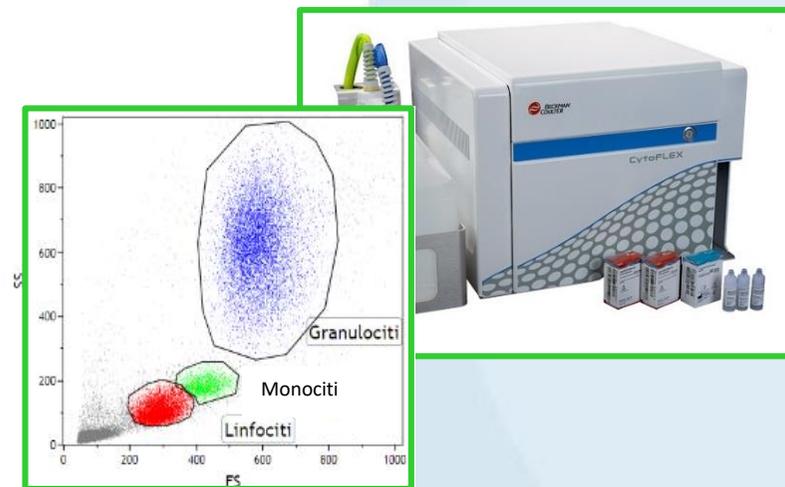
1. Sistemi di allevamento
- 2. Immunità e benessere animale**
3. Genetica
4. Prodotti animali
5. Acquacoltura

# Identificazione di biomarcatori nel sangue e nel latte

## Trascrittomica



## Citofluorimetria e Cell Sorting



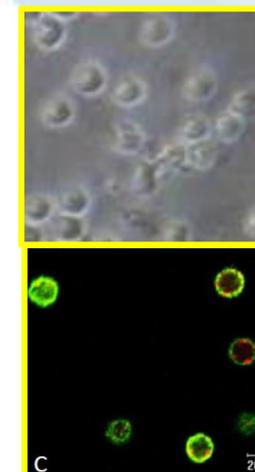
## Proteomica

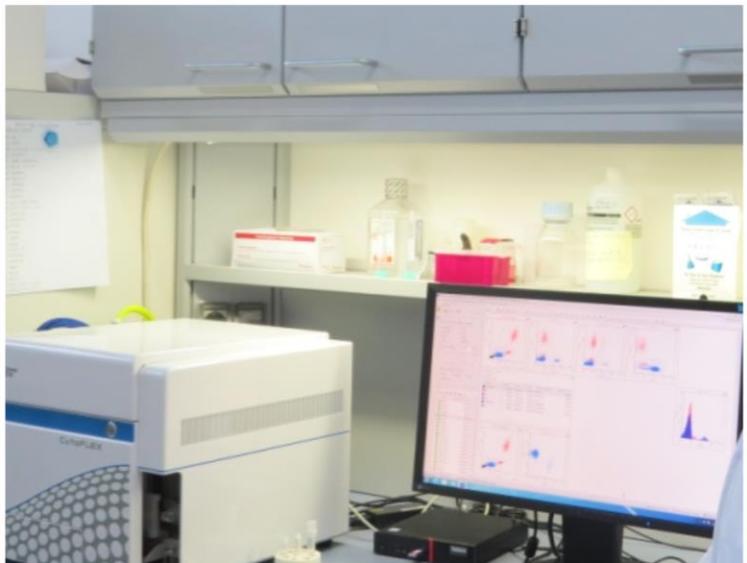


## Colture Cellulari



## Microscopia





## ➤ Progetto Mastmark

Impiego della citofluorimetria per la valutazione di marcatori da utilizzare nella diagnosi precoce delle mastiti

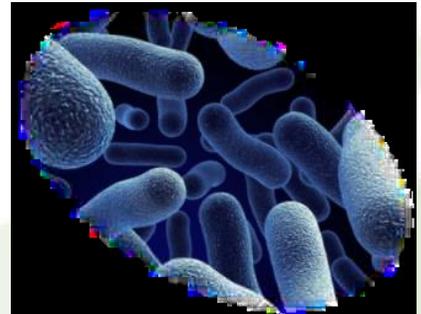
## ➤ Progetto IMMA

Studio della risposta immunitaria nel periparto di una mandria sperimentale di: Frisona, Pezzata Rossa, Fri x Pri

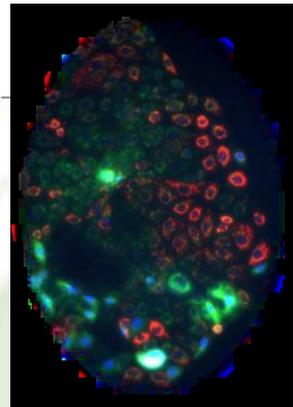
## ➤ Buffalo Project (CREA-WSU-IZSM-AlexU)

Studio del sistema immunitario nella specie *Bubalus bubalis*





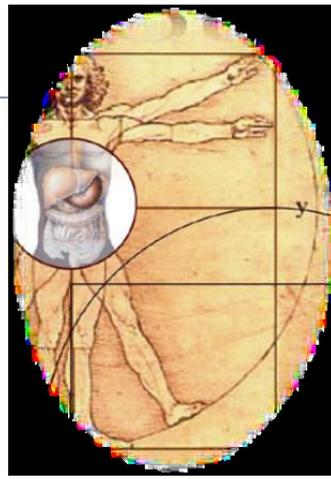
Microbiologia



Modelli in vitro



Modelli animali



Clinica umana



Clinica veterinaria

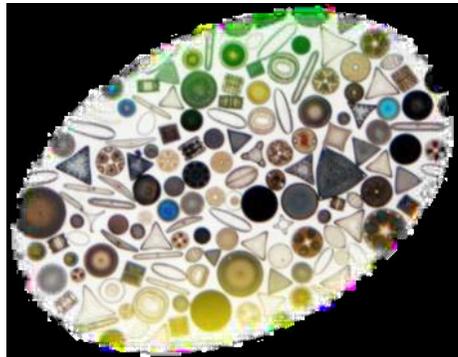
# Citometria di flusso: Ambiti di applicazione



Biotecnologie



Industria alimentare



Ecologia



Botanica



Allevamento

La citometria di flusso (FCM) è una tecnica molto potente che permette l'analisi quali-quantitativa di numerosi parametri di singoli elementi (cellule e/o particelle)

## Caratteristiche:

- **Multiparametricità**
- **Rapidità**
- **Versatilità**
- **Accuratezza**
- **Riproducibilità**



## Strumenti di nuova generazione:

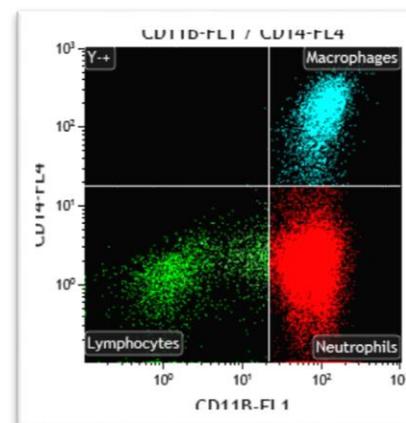
- Riduzione costi
- Analisi citometrica più semplice
- Molteplici applicazioni anche in ambito veterinario



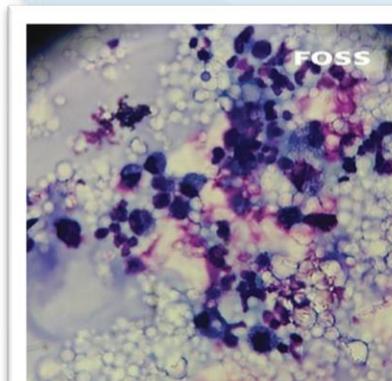
La citofluorimetria è il metodo di routine per la conta delle cellule somatiche nel latte (SCC)



La conta differenziale delle cellule somatiche (DCC) consente di distinguere le diverse popolazioni leucocitarie fornendo maggiori informazioni sullo stato di salute della mammella (Schwarz et al., 2011; Pilla et al., 2013)



La DSCC è stata recentemente proposta come alternativa alla SCC + analisi batteriologica per identificare le mastiti (Damm et al., 2017)



Differential Somatic Cell Count with the Fossomatic 7 DC

Recupero cellule  
del latte mediante  
centrifugazione



Eliminazione del grasso  
e della frazione liquida  
del latte



Lavaggio e filtrazione  
del pellet cellulare



marcatura  
con mAb e  
sonde  
fluorescenti



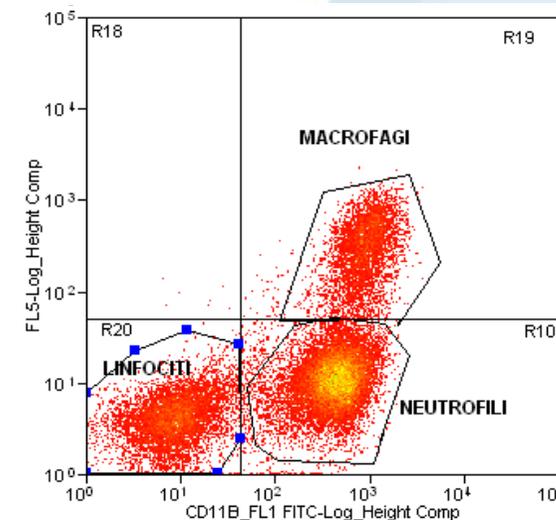
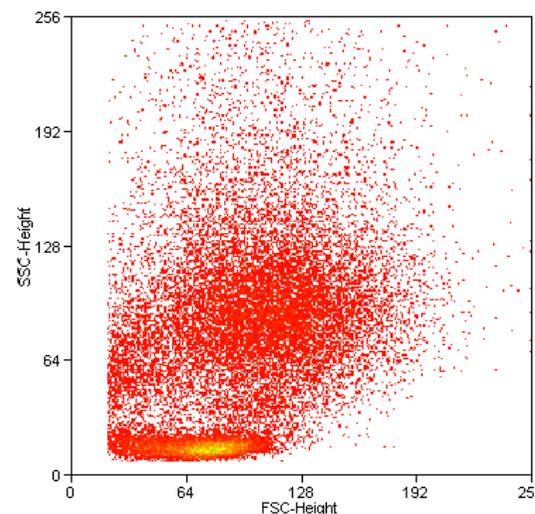
**Pannello a 6 parametri (2 fisici + 4 fluorescenze) utilizzato per differenziare le popolazioni leucocitarie nel latte**

Marcatore	Cellula target
CD45	All leukocytes
CD14	Monocyte/Macrophages
CD11b	Monocyte/Macrophages; PMN
Live/Dead	Cellule vive

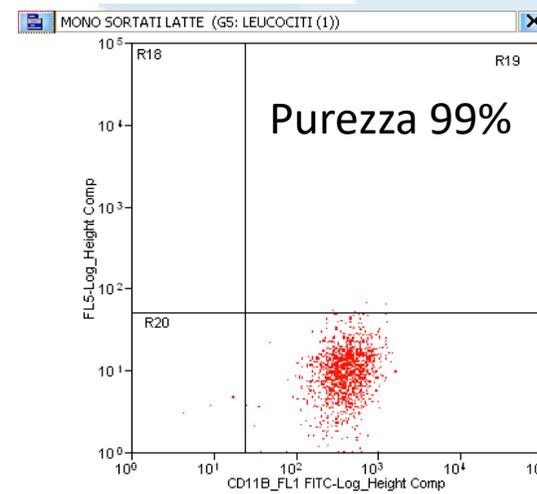
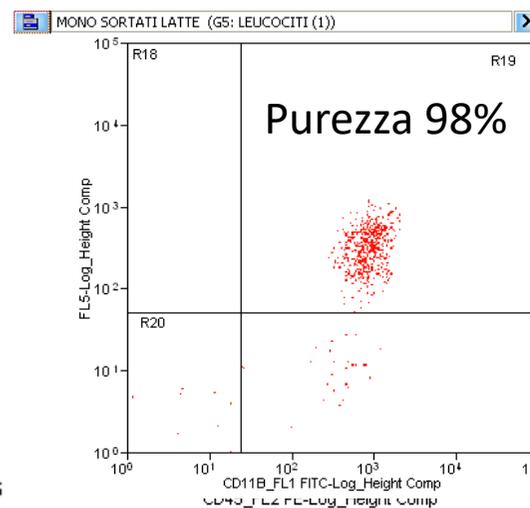
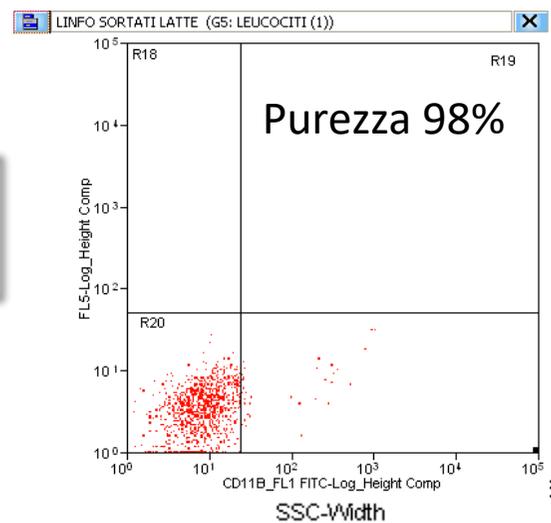


**Pannello a 6 parametri (2 fisici + 4 fluorescenze) utilizzato per differenziare le popolazioni leucocitarie nel latte**

Marcatore	Cellula target
CD45	All leukocytes
CD14	Monocyte/Macrophages
CD11b	Monocyte/Macrophages; PMN
Live/Dead	Cellule vive



**Sorting Cellulare**



## OBIETTIVO

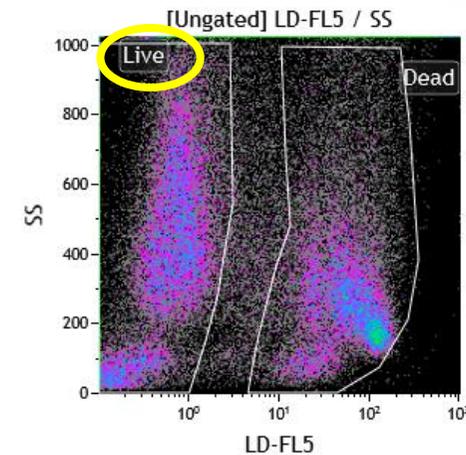
Individuazione di marcatori per la diagnosi precoce della mastite nei bovini da latte

## OBIETTIVO

Individuazione di marcatori per la diagnosi precoce della mastite nei bovini da latte

Messa a punto di pannelli citofluorimetrici multicolore per valutare:

- Vitalità cellulare (vive/morte)

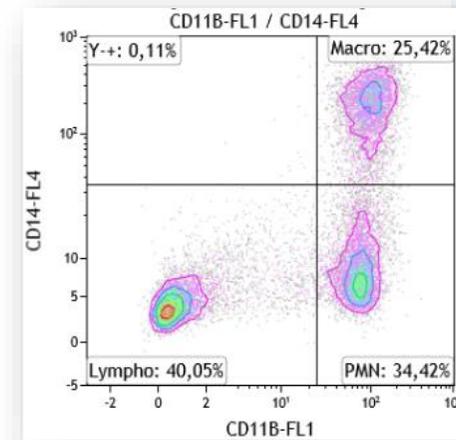


## OBIETTIVO

Individuazione di marcatori per la diagnosi precoce della mastite nei bovini da latte

Messa a punto di pannelli citofluorimetrici multicolore per valutare:

- Vitalità cellulare (vive/morte)
- **Percentuale di leucociti vivi (L-DCC)**

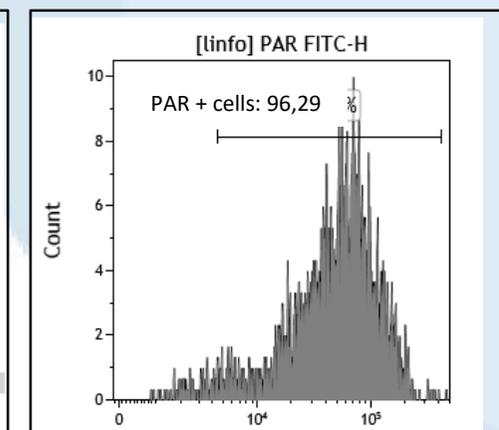
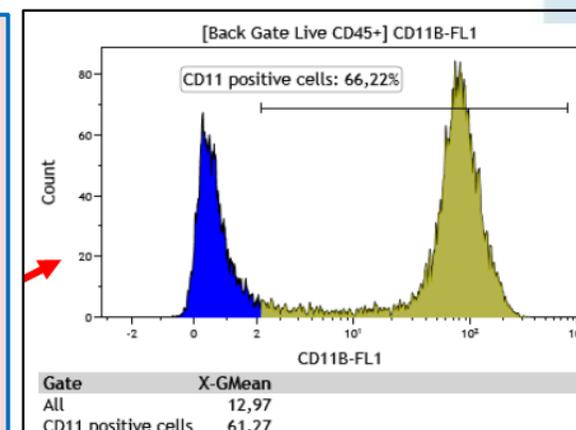


## OBIETTIVO

Individuazione di marcatori per la diagnosi precoce della mastite nei bovini da latte

Messa a punto di pannelli citofluorimetrici multicolore per valutare:

- Vitalità cellulare (vive/morte)
- Percentuale di leucociti vivi (L-DCC)
- **Espressione di marcatori di infiammazione (CD11b, PAR)**



## OBIETTIVO

Individuazione di marcatori per la diagnosi precoce della mastite nei bovini da latte

Messa a punto di pannelli citofluorimetrici multicolore per valutare:

- Vitalità cellulare (vive/morte)
- Percentuale di leucociti vivi (L-DCC)
- Espressione di marcatori di infiammazione (CD11b, PAR)
- **Correlazione con i parametri di stalla (SCC, conducibilità elettrica, velocità di flusso)**

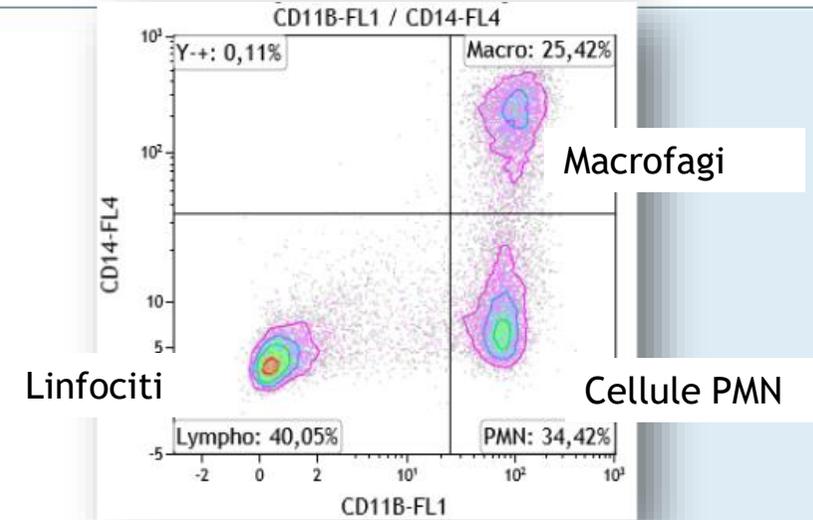


<https://www.alfasystemsrl.com/sites>



### Caratterizzazione dei subsets di leucociti vivi (L-DCC).

La proporzione relativa delle cellule vive del latte gioca un ruolo importante nell'immunità della ghiandola mammaria.

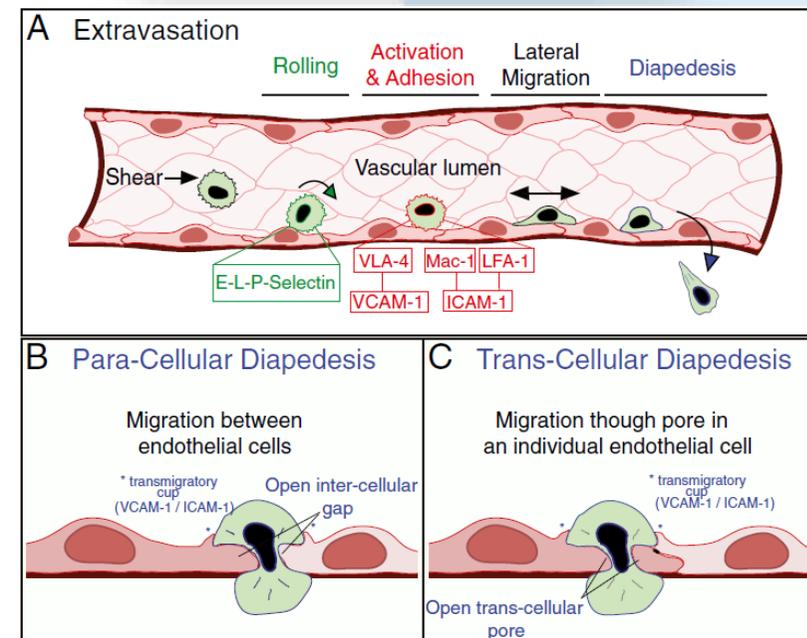
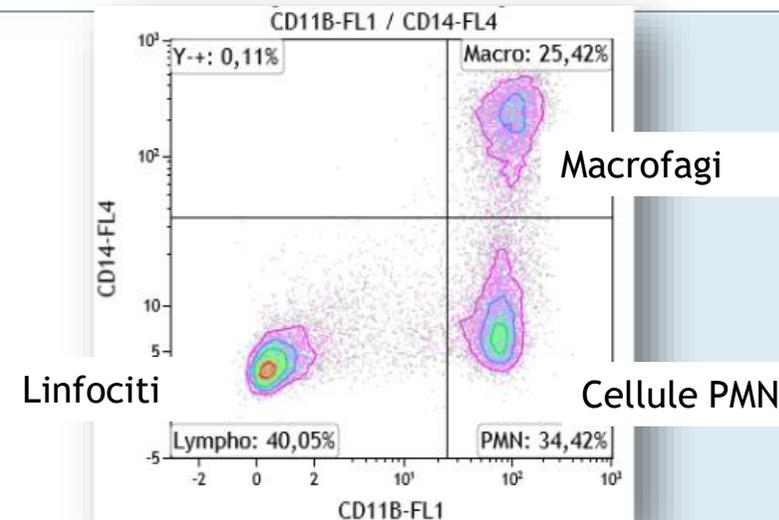


## Caratterizzazione dei subsets di leucociti vivi (L-DCC).

La proporzione relativa delle cellule vive del latte gioca un ruolo importante nell'immunità della ghiandola mammaria.

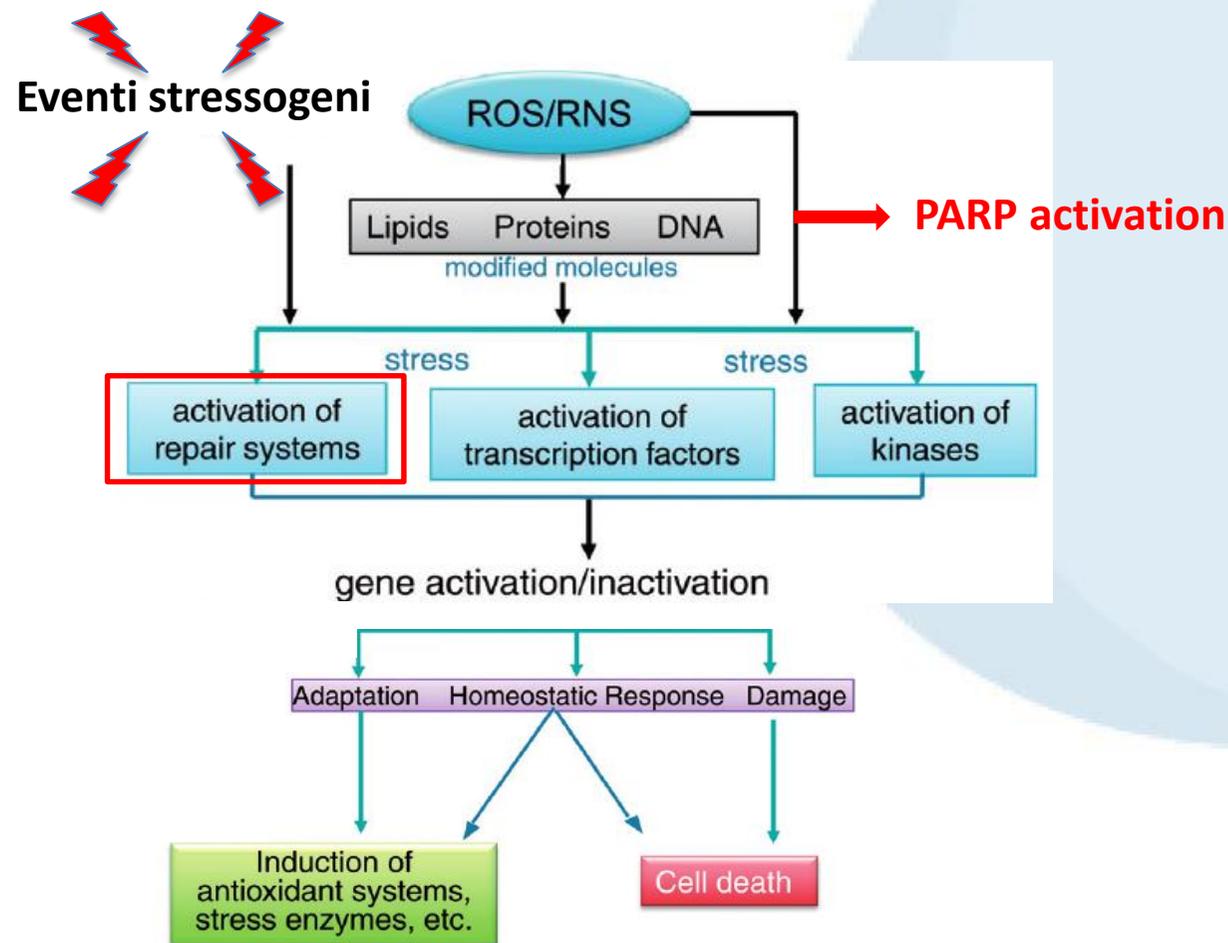
## L'espressione della $\beta$ -integrina CD11b sulla superficie dei leucociti.

Il CD11b è coinvolto nella migrazione dei monociti e dei PMN dal sangue al sito di infezione. La sua up-regolazione è associata a condizioni infiammatorie sia nell'uomo che in modelli murini (Duan et al., 2015).



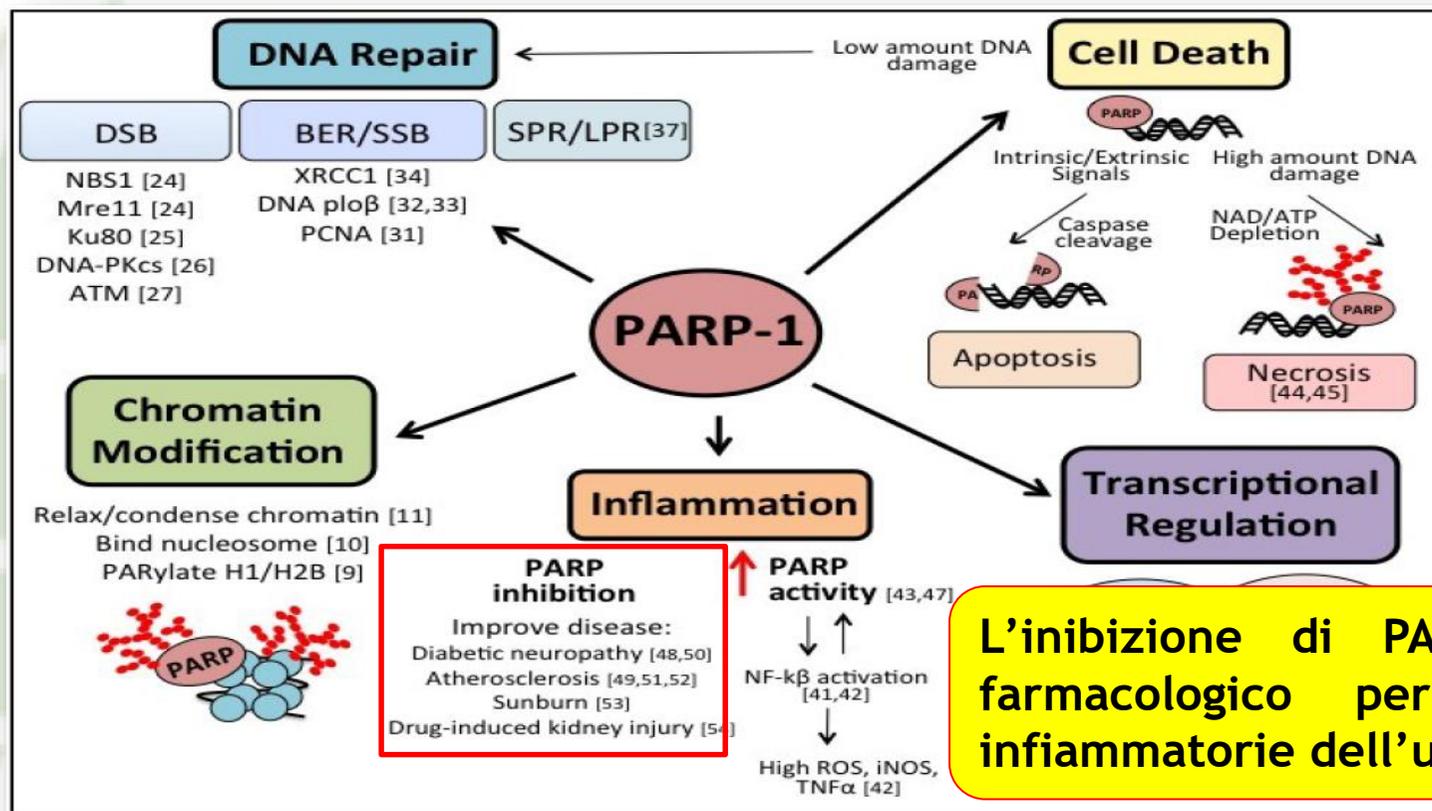
## L'enzima PARP-1 ha un ruolo chiave nell'infiammazione

Durante l'infiammazione, i fagociti infiltrati nella ghiandola mammaria producono ROS che ossidano macromolecole come lipidi, proteine e DNA e causano danno cellulare ossidativo. In queste condizioni di stress si attiva l'enzima PARP-1.



Adapted from *Crit Rev Toxicol.* 1993;23(1):21-48.  
*Free radicals as mediators of tissue injury and disease.*  
 Kehrer JP.

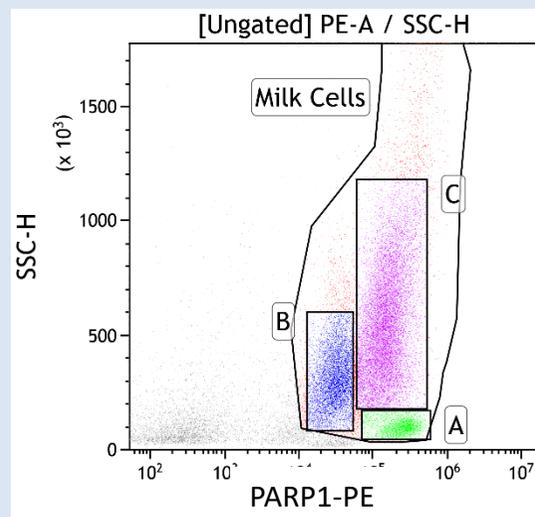
# PARP-1: potenziale marcatore di mastite



L'inibizione di PARP-1 è un approccio farmacologico per la cura delle malattie infiammatorie dell'uomo

Swindall · et al., 2013.  
*Cancers* 2013, 5(3), 943-958

## Brevetto Italiano N.102017000100555



### 43 Bulk Milk samples erano divisi in:

- 2 gruppi: infetti (n=9) e non infetti (n=34), sulla base dei test microbiologici
- 3 gruppi sulla base del numero di cellule somatiche:
  - Gruppo A (n=15) campioni con SCC  $\leq 100,000$  cells/mL
  - Gruppo B (n=11) campioni con SCC  $> 100,000 < 300,000$  cells/mL
  - Gruppo C (n=17) campioni con SCC  $> 300,000$  cells/mL



Somatic Cell  
Count (DeLaval)



Citofluorimetria  
(Beckman Coulter)



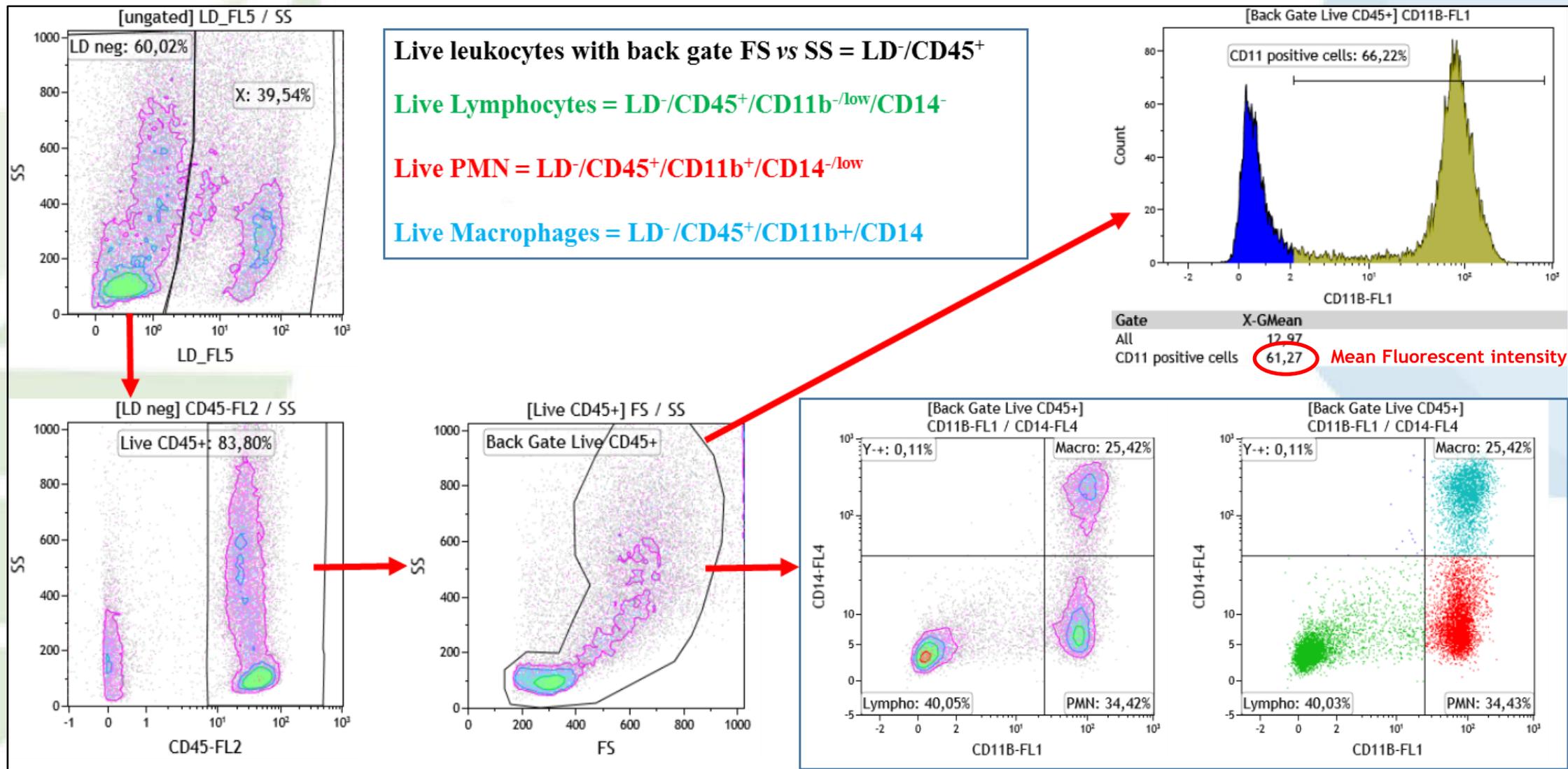
Test  
microbiologici



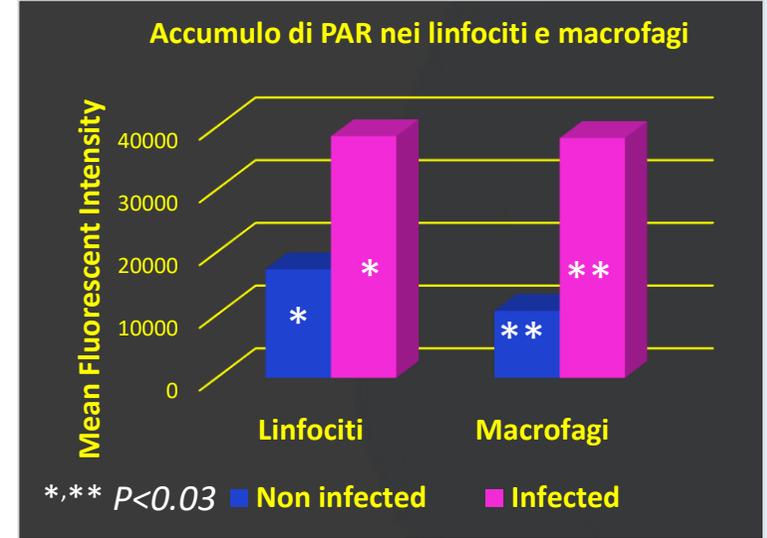
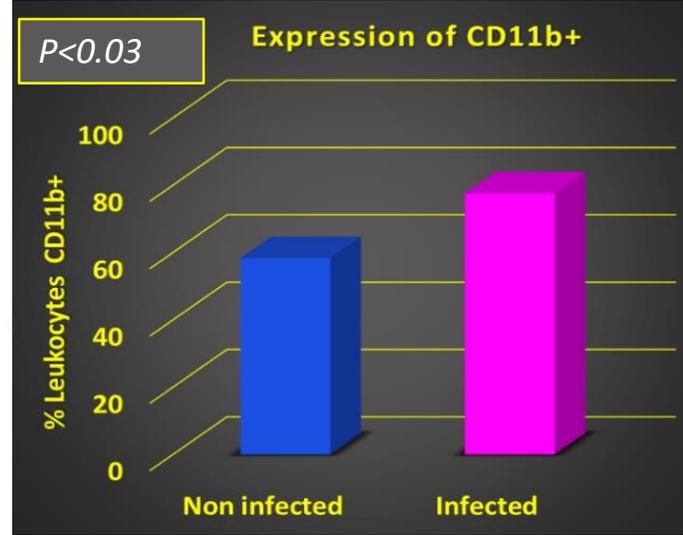
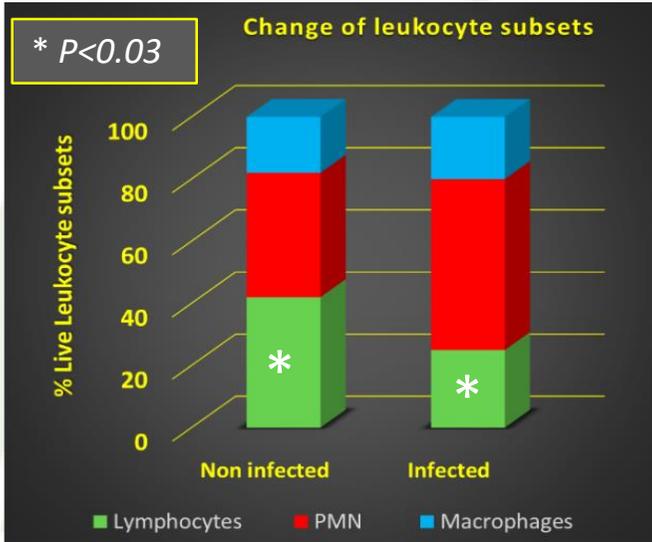
Kit Mastite MAA  
(Bentley Instruments)



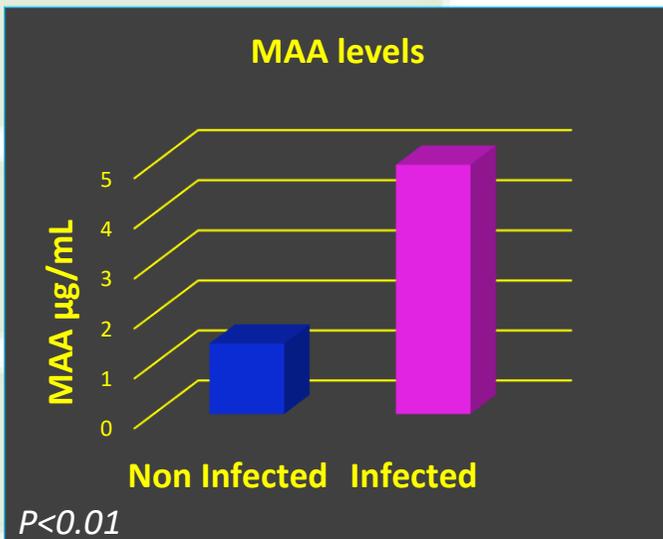
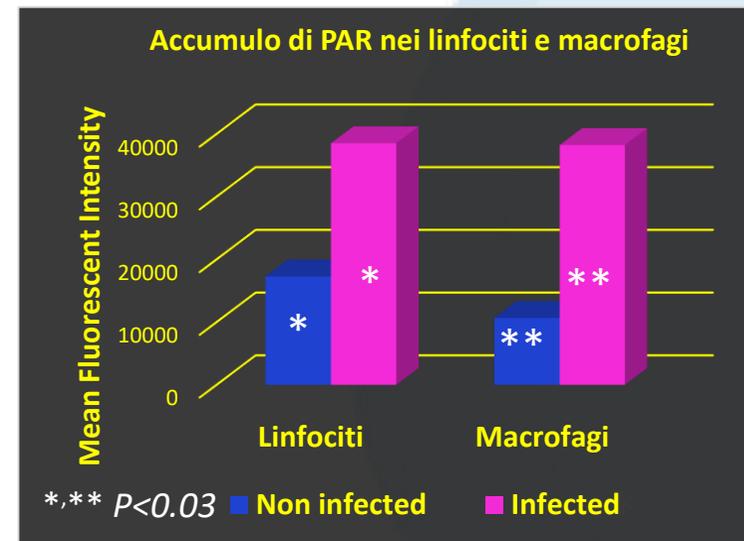
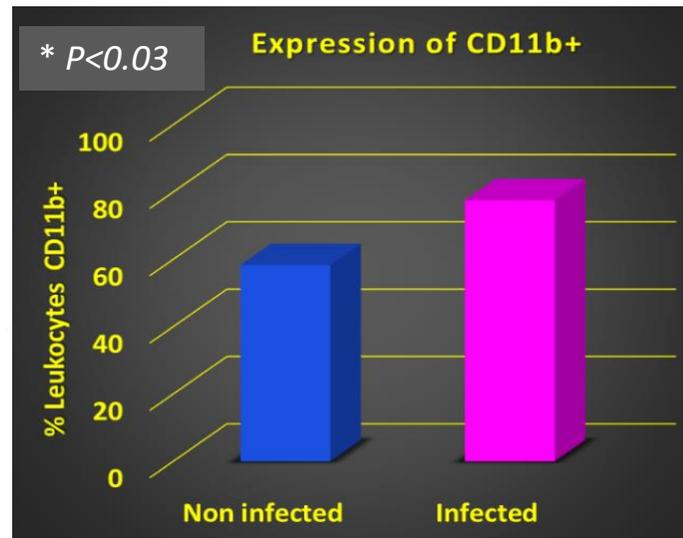
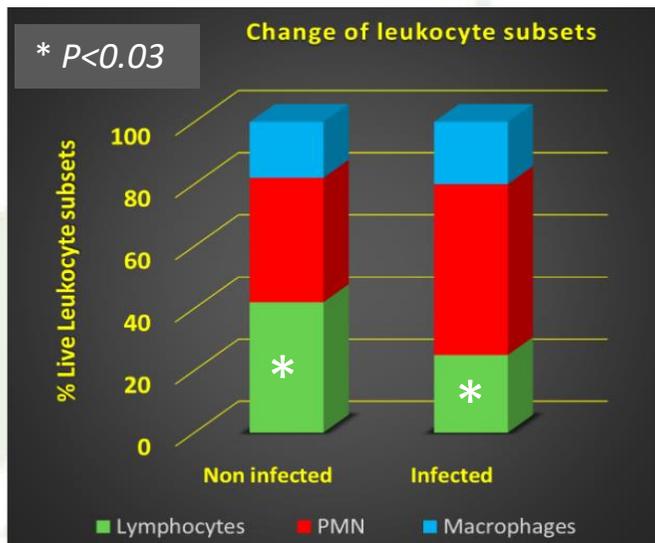
Conducibilità elettrica e  
Velocità di Flusso  
(DeLaval)



# Risultati: campioni Non Infetti vs Infetti

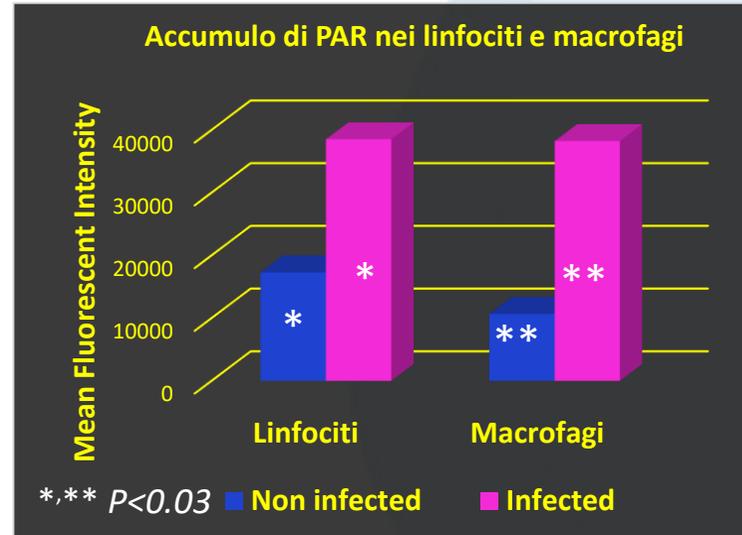
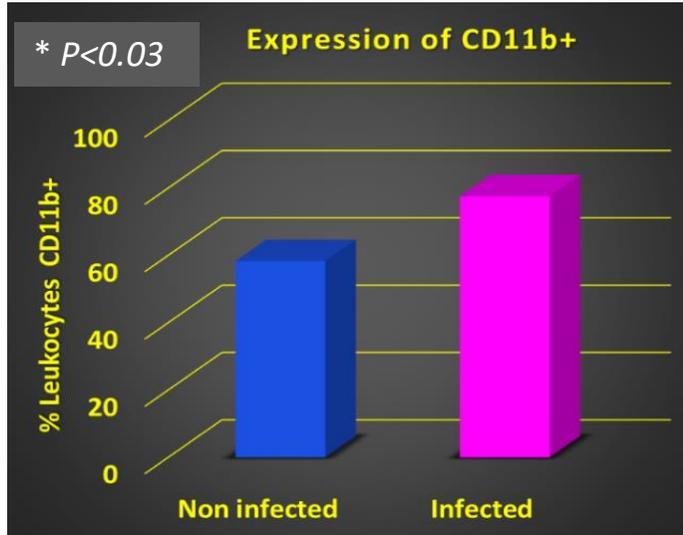
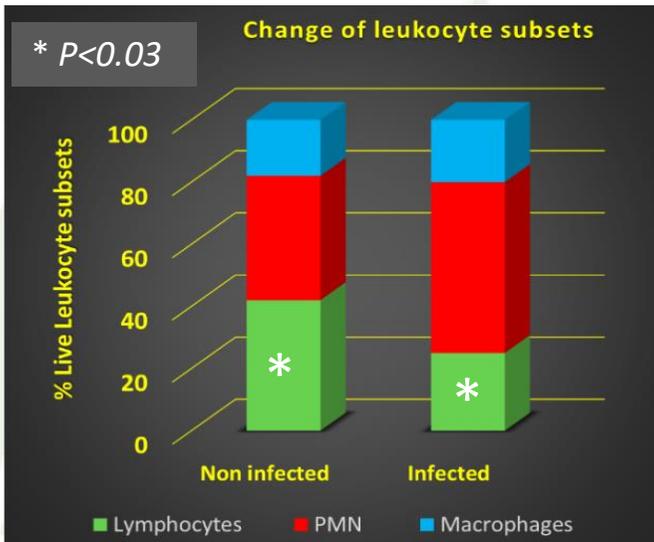


# Risultati: campioni Non Infetti vs Infetti

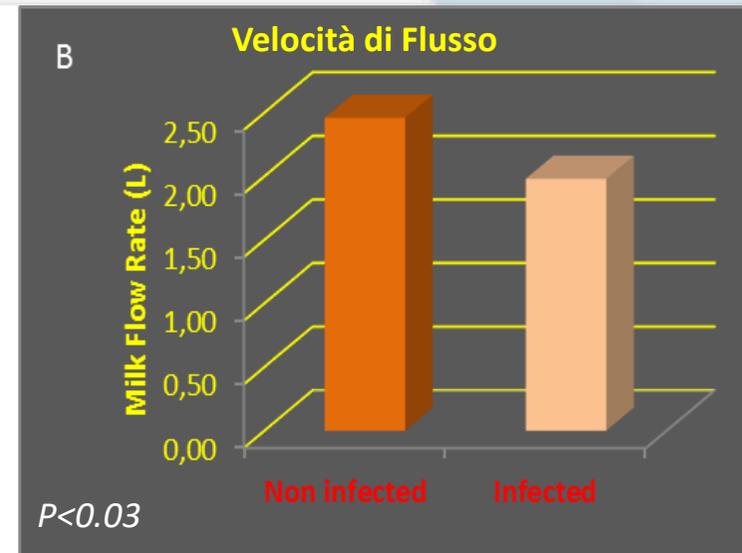
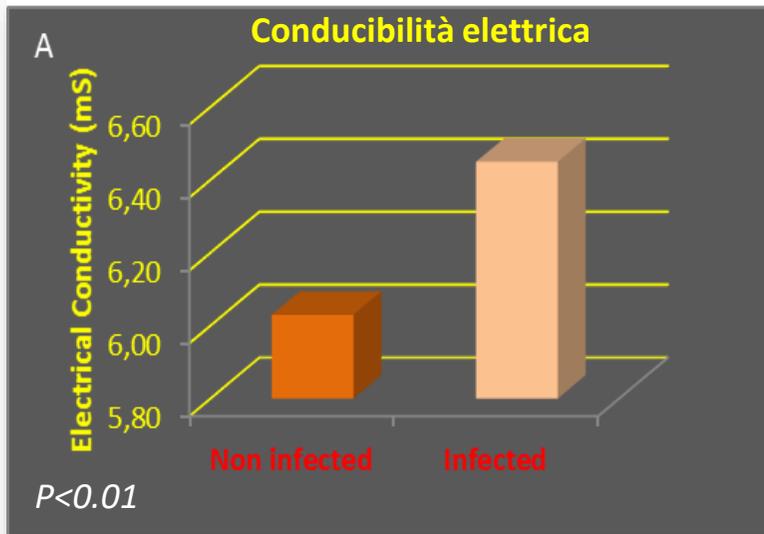


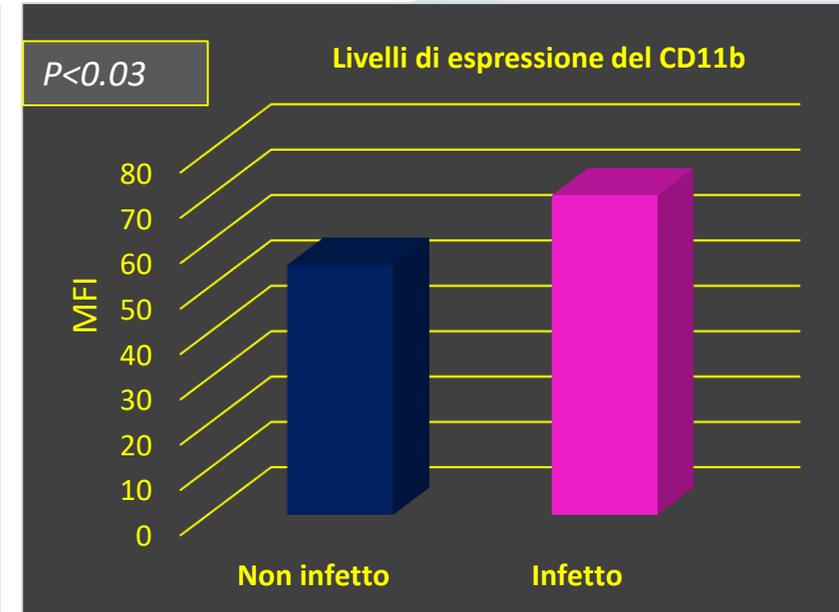
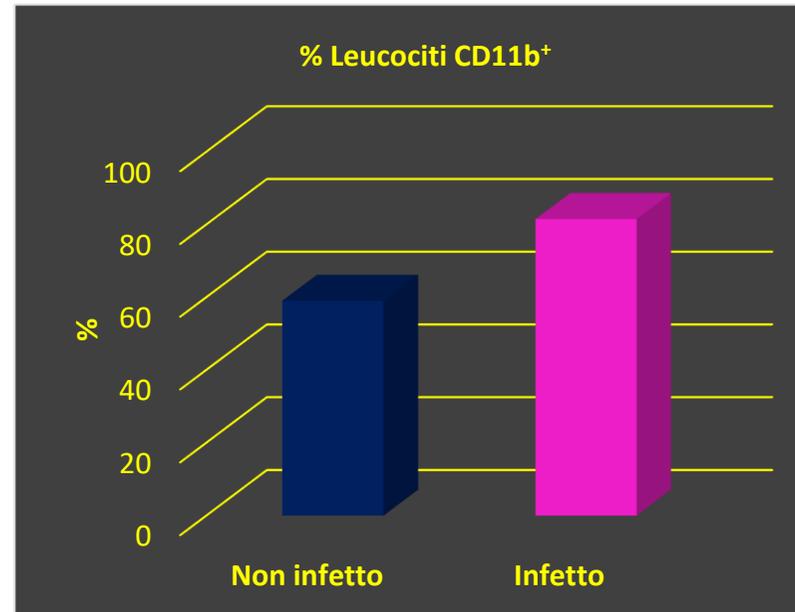
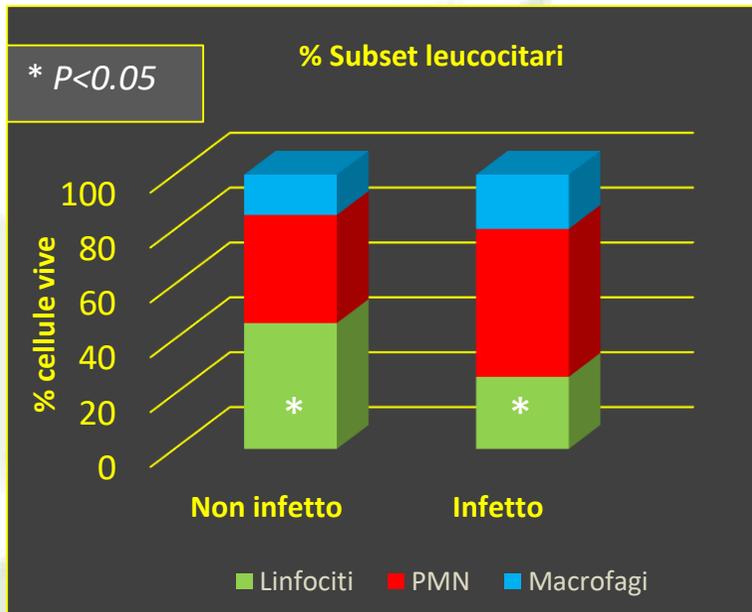
**MAA correlazione:**  
 SCC 0.80 ( $P = 0.003$ )  
 Espressione CD11b 0.81 ( $P = 0.002$ )

# Risultati: campioni Non Infetti vs Infetti

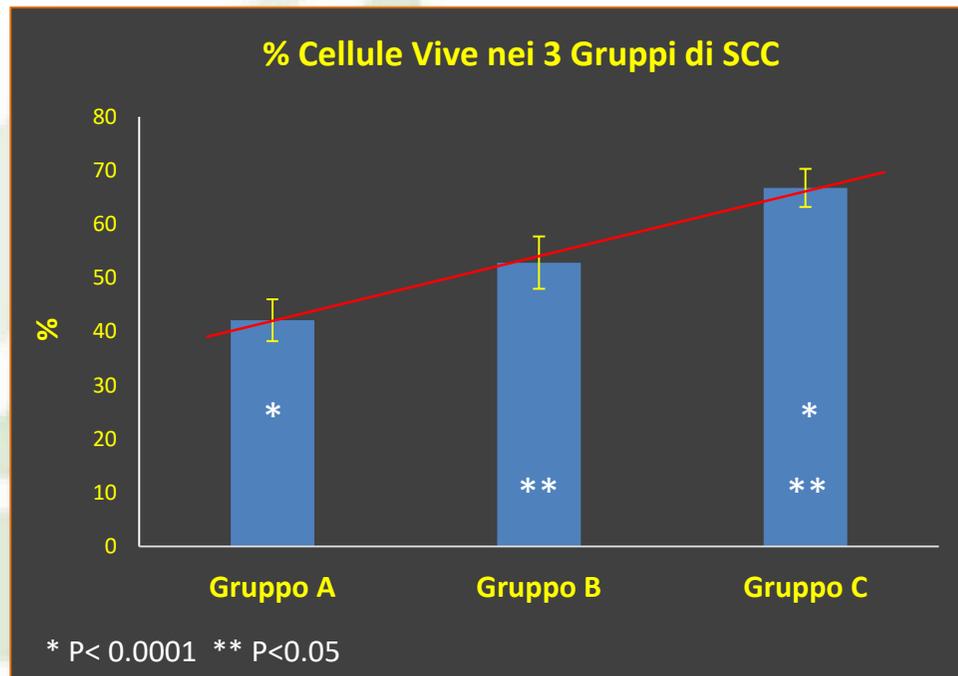


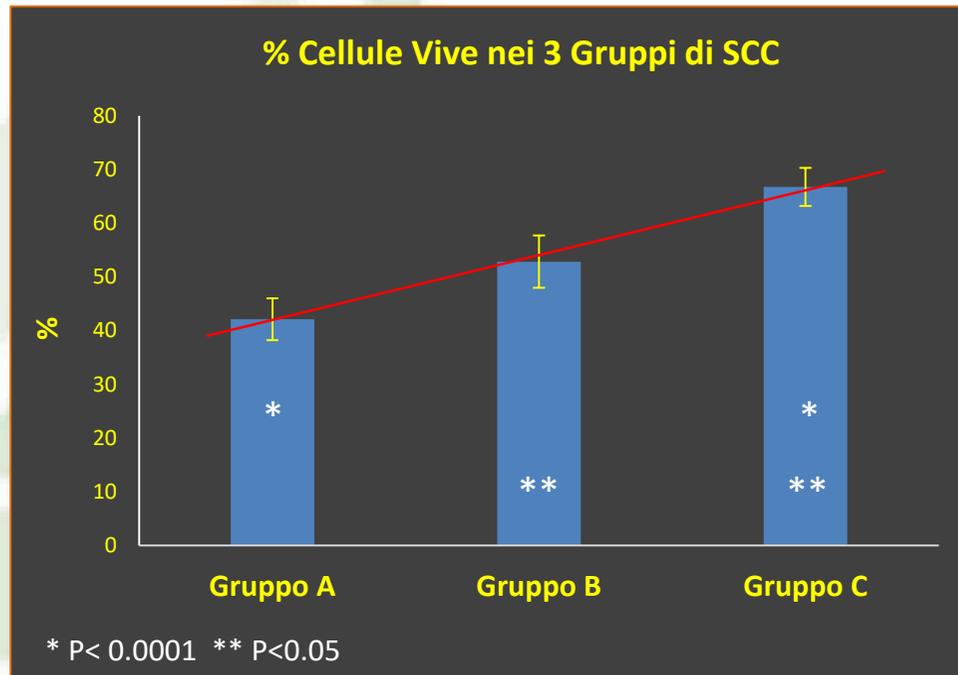
**CE correlazione:**  
**Espressione CD11b 0.77 ( $P = 0.001$ )**





**L'espressione del CD11b sui leucociti del latte aumenta in condizioni di mastite sub-clinica**





## Correlazioni

	Parametri di stalla	b	P
% Leucociti Vivi	Conducibilità Elettrica	-0.37	0.020
	Produzione	-0.32	0.047
	Velocità di Flusso	-0.45	0.004
	Picco del flusso	-0.44	0.004

L'analisi citofluorimetrica mostra che nei campioni di latte infetti:

L'analisi citofluorimetrica mostra che nei campioni di latte infetti:

1. La percentuale dei **linfociti vivi diminuisce**

L'analisi citofluorimetrica mostra che nei campioni di latte infetti:

1. La percentuale dei **linfociti vivi diminuisce**
2. La **L-DCC cambia** e l'espressione del **marcatore CD11b aumenta** anche in condizioni sub-cliniche

L'analisi citofluorimetrica mostra che nei campioni di latte infetti:

1. La percentuale dei **linfociti vivi diminuisce**
2. La **L-DCC** cambia e l'espressione del **marcatore CD11b aumenta** anche in condizioni sub-cliniche
3. L'espressione del **CD11b** correla con la **MAA**

### L'analisi citofluorimetrica mostra che nei campioni di latte infetti:

1. La percentuale dei **linfociti vivi diminuisce**
2. La **L-DCC** cambia e l'espressione del **marcatore CD11b aumenta** anche in condizioni sub-cliniche
3. L'espressione del **CD11b** correla con la **MAA**
4. L'attività dell'enzima infiammatorio **PARP-1 aumenta**

### L'analisi citofluorimetrica mostra che nei campioni di latte infetti:

1. La percentuale dei **linfociti vivi diminuisce**
2. La **L-DCC** cambia e l'espressione del **marcatore CD11b aumenta** anche in condizioni sub-cliniche
3. L'espressione del **CD11b** correla con la **MAA**
4. L'attività dell'enzima infiammatorio **PARP-1 aumenta**
5. La **conducibilità elettrica** e la **velocità di flusso** mostrano significativa associazione con i parametri immunologici

### La FCM applicata alla matrice latte:

### La FCM applicata alla matrice latte:

1. Consente di identificare e caratterizzare **nuovi marcatori** di mastite

### La FCM applicata alla matrice latte:

1. Consente di identificare e caratterizzare nuovi marcatori di mastite
2. Ha evidenziato che **la percentuale delle cellule vive aumenta** all'aumentare delle cellule somatiche

### La FCM applicata alla matrice latte:

1. Consente di identificare e caratterizzare nuovi marcatori di mastite
2. Ha evidenziato che la percentuale delle cellule vive aumenta all'aumentare delle cellule somatiche
3. Permette di identificare precocemente gli animali con **processi infiammatori in atto** anche in assenza di segni clinici e con SCC nel range considerato fisiologico

### La FCM applicata alla matrice latte:

1. Consente di identificare e caratterizzare nuovi marcatori di mastite
2. Ha evidenziato che la percentuale delle cellule vive aumenta all'aumentare delle cellule somatiche
3. Permette di identificare precocemente gli animali con processi infiammatori in atto anche in assenza di segni clinici e con SCC nel range considerato fisiologico
4. Correla bene con i **parametri di stalla**

### La FCM applicata alla matrice latte:

1. Consente di identificare e caratterizzare nuovi marcatori di mastite
2. Ha evidenziato che la percentuale delle cellule vive aumenta all'aumentare delle cellule somatiche
3. Permette di identificare precocemente gli animali con processi infiammatori in atto anche in assenza di segni clinici e con SCC nel range considerato fisiologico
4. Correla bene con i parametri di stalla
5. Ha una potenziale applicabilità in **condizioni di campo**

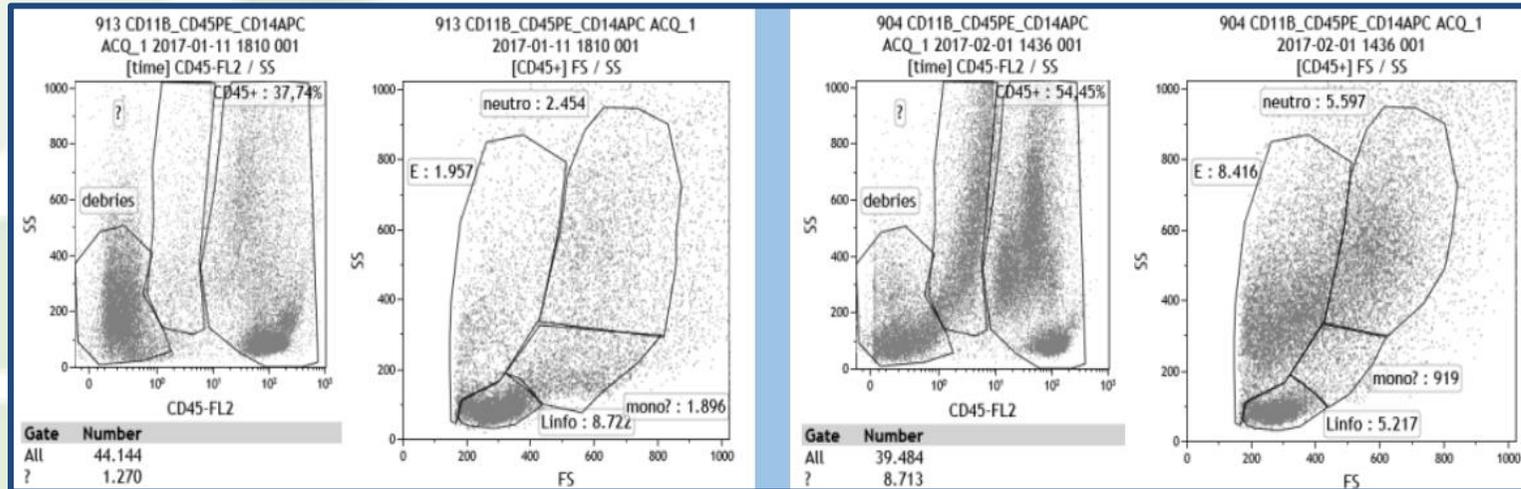
### La FCM applicata alla matrice latte:

1. Consente di identificare e caratterizzare **nuovi marcatori** di mastite
2. Ha evidenziato che **la percentuale delle cellule vive aumenta** all'aumentare delle cellule somatiche
3. Permette di identificare precocemente gli animali con **processi infiammatori in atto** anche in assenza di segni clinici e con SCC nel range considerato fisiologico
4. Correla bene con i **parametri di stalla**
5. Ha una potenziale applicabilità in **condizioni di campo**



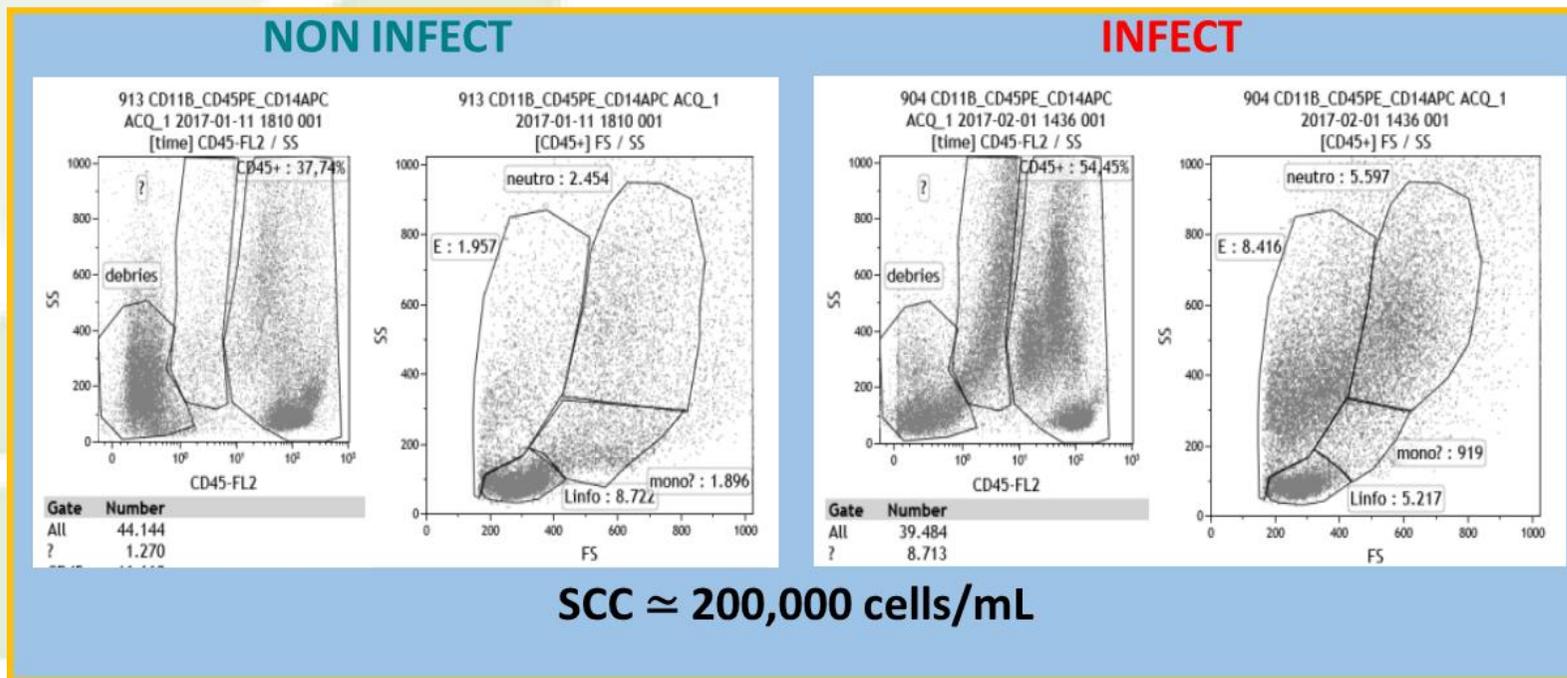
## APPROCCIO CITOFLUORIMETRICO MULTISTEP:

➔ Step 1: 2 Parametri fisici + 1 parametro di fluorescenza



## APPROCCIO CITOFLUORIMETRICO MULTISTEP:

➔ Step 1: 2 Parametri fisici + 1 parametro di fluorescenza

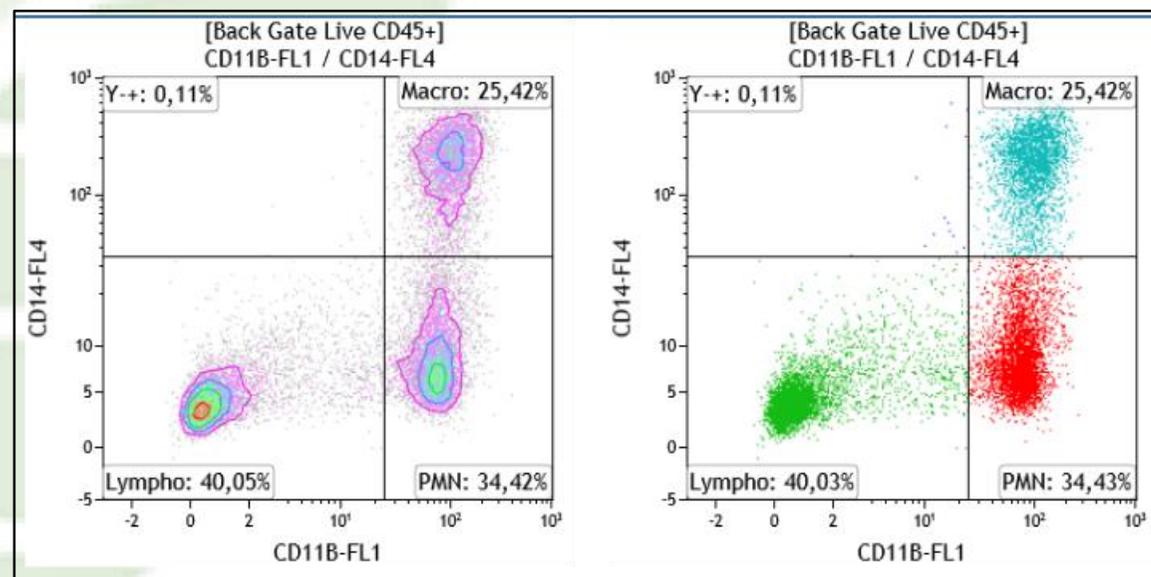


## APPROCCIO CITOFLUORIMETRICO MULTISTEP:

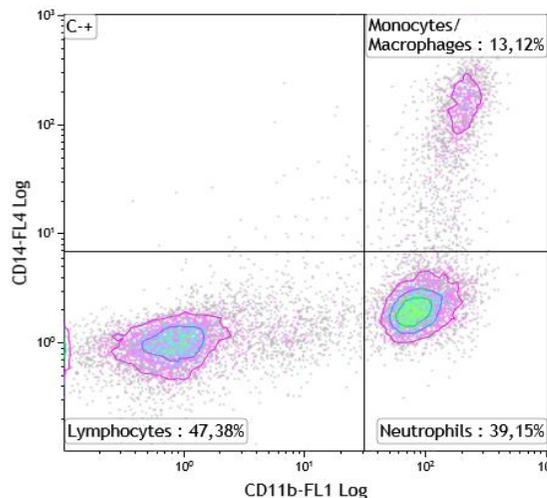
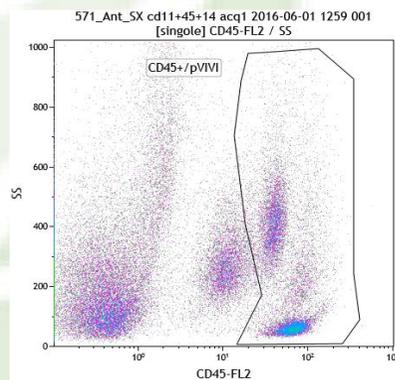
Step 1: 2 Parametri fisici + 1 parametro di fluorescenza

→ Step 2: 2 Parametri fisici + 4 parametri di fluorescenza

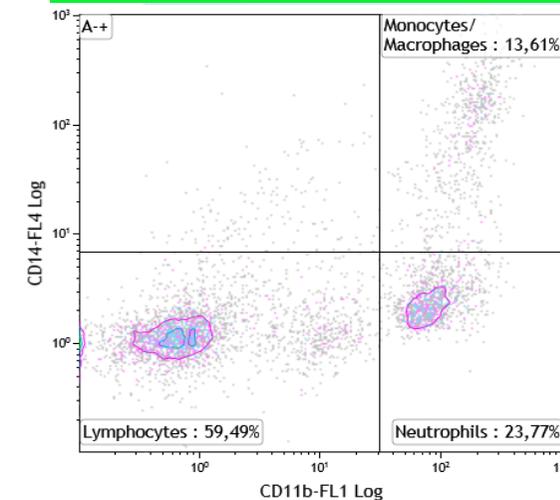
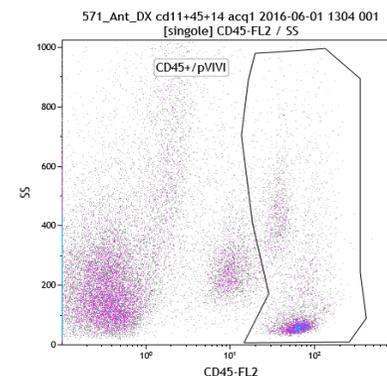
Marcatore	Cellula target
CD45	All leukocytes
CD14	Monocyte/Macrophages
CD11b	Monocyte/Macrophages; PMN
Live/Dead	Cellule vive



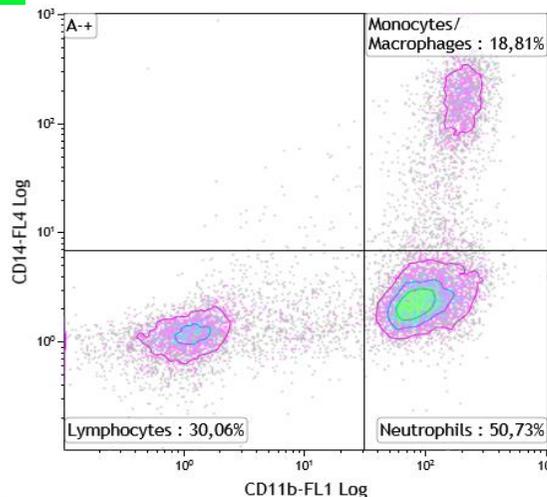
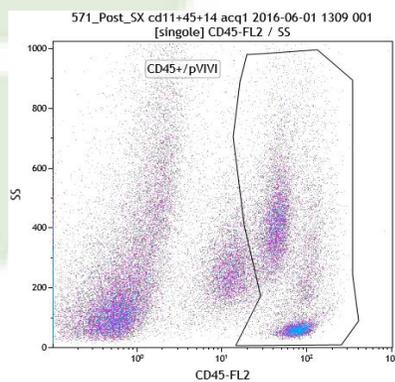
## ASX (SCC=92,000)



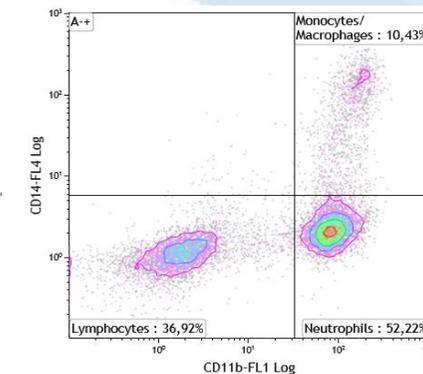
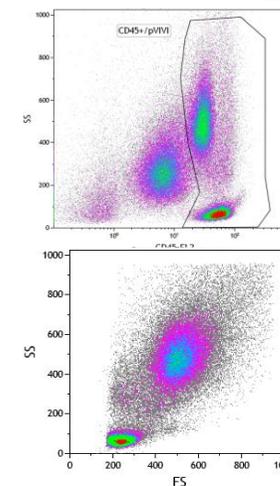
## ADX (SCC=115,000)



## PSX (SCC=142,000)



## PDX (SCC=937,000)

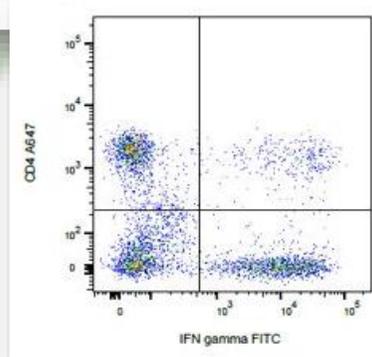
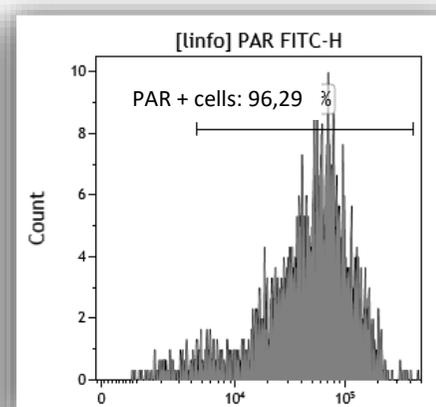
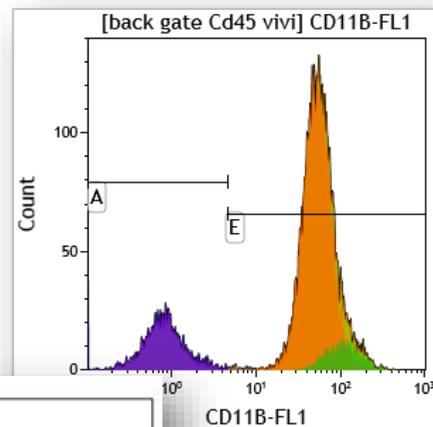
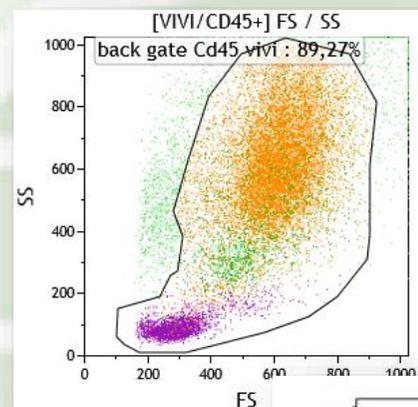


## APPROCCIO CITOFLUORIMETRICO MULTISTEP:

Step 1: 2 Parametri fisici + 1 parametro di fluorescenza

➔ Step 2: 2 Parametri fisici + 4 parametri di fluorescenza

➔ Step 3: 2-3 Parametri fisici + 4-6 parametri di fluorescenza



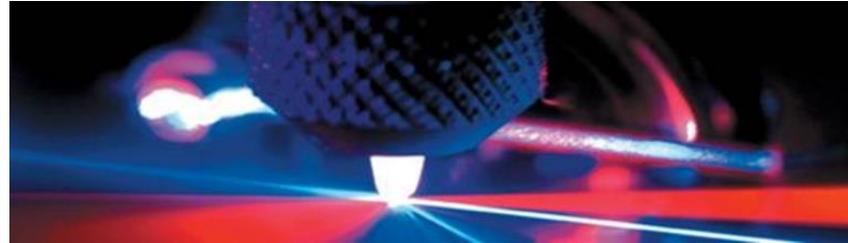
## Valutazione di biomarcatori di membrana e intracitoplasmatici

- Espressione di molecole di adesione ( $\beta$ -integrine, L-Selectina)
- Espressione di molecole di attivazione
- Espressione di citochine
- Valutazione di attività enzimatiche

1. Identificare e dosare direttamente nella matrice latte (senza purificare le cellule) le **molecole solubili** associate all'infiammazione
2. Utilizzo di nuovi **kit diagnostici**
3. Valutare la **qualità del latte** attraverso la **misurazione di attività enzimatiche** legate ai processi di morte cellulare (apoptosi e/o necrosi)
4. Applicare i protocolli proposti e validare i marcatori trovati anche in **condizione di campo**



- Risultati promettenti circa l'applicabilità della citofluorimetria anche in ambito zootecnico.
- I marcatori identificati potrebbero essere utilizzati per la formulazione di kit o di protocolli diagnostici utilizzabili anche in condizioni di campo



**Giovanna De Matteis**

[giovanna.dematteis@crea.gov.it](mailto:giovanna.dematteis@crea.gov.it)



**Francesco Grandoni**

[francesco.grandoni@crea.gov.it](mailto:francesco.grandoni@crea.gov.it)



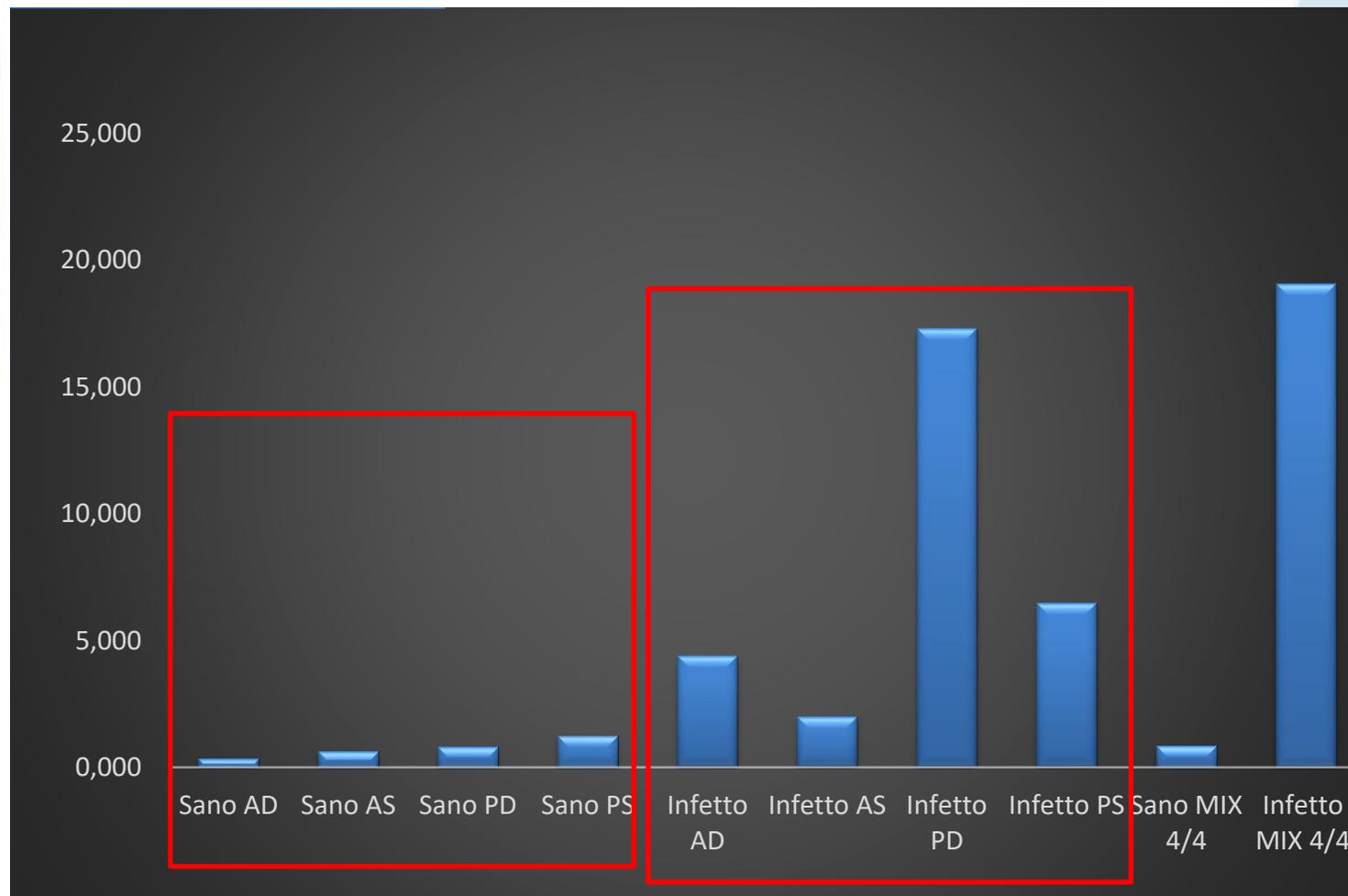
**Maria Carmela Scatà**

[mariacarmela.scata@crea.gov.it](mailto:mariacarmela.scata@crea.gov.it)



**Grazie per l'attenzione**

# Livelli di MAA nel latte di singoli quarti



Sano MIX 4/4  
Infetto MIX 4/4

Frisona Pura 1° lattazione 12 gg parto  
Meticcio 50:50 2° lattazione Primi 10 gg