



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione
Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e
Ambiente

Corso di Laurea Magistrale in
Biotechnologies for Food Science

Analisi metagenomiche e integrazione di dati multi-omici per lo studio della mastite subclinica nelle bovine da latte

Relatore:

Prof.ssa Sara Pegolo

Correlatori:

Prof.ssa Marianna Pauletto

Dott.ssa Vittoria Bisutti

Dott. Gabriele Giannotta

Laureanda:

Giulia Secchi

Matricola n.

2092302

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

RIASSUNTO

Il settore lattiero-caseario italiano è un pilastro fondamentale dell'economia nazionale, generando un fatturato di circa 17.880 milioni di euro, di cui l'8.2% deriva dal commercio estero. In questo contesto, la mastite bovina, una patologia ad eziologia multifattoriale, rappresenta uno dei principali problemi economici e sanitari riscontrabili negli allevamenti di bovine da latte, per via dell'aumento dei tassi di rimonta e dei costi di trattamento, nonché della diminuzione della resa latte. A questo proposito, la messa a punto di adeguate pratiche di gestione e sorveglianza sanitaria è essenziale per la salvaguardia della filiera lattiero-casearia. Per monitorare la presenza o l'assenza di batteri potenzialmente infettivi e valutare la gravità e lo stadio di avanzamento della patologia, i piani di monitoraggio per la diagnosi e lo *screening* prevedono l'utilizzo di specifici indicatori biologici. Per la diagnosi dell'infezione, il metodo *gold standard* è l'esame batteriologico colturale del latte, mentre per lo *screening* vi sono: la conta individuale e differenziale delle cellule somatiche (SCC, DSCC), il *California Mastitis Test* (CMT), il test della conducibilità elettrica (CE) e l'analisi di alcuni parametri ematici, tra cui le proteine di fase acuta (PAA).

Nonostante l'implementazione di rigorose strategie di controllo abbia ridotto significativamente l'incidenza della mastite, la sua gestione nel lungo termine rimane una sfida crescente per l'industria lattiero-casearia, comportando ripercussioni sanitarie sul benessere degli animali e finanziarie per gli allevatori, soprattutto a causa della capacità di adattamento dei microrganismi patogeni ai diversi contesti epidemiologici.

Il presente lavoro di tesi si articola in due sezioni: la prima si basa su un progetto di ricerca più ampio denominato "*MASTITOMIC*", che ha come oggetto di studio e tramite approcci molecolari, la mastite subclinica in bovine di razza Frisona, provenienti da un'azienda agricola situata a Villafranca Padovana (PD). Nello specifico, in questo progetto vengono investigate le relazioni tra la patologia subclinica, i marcatori genetici, il microbioma del latte e i *miRNA* degli esosomi del latte, al fine di identificare i meccanismi fisiologici e molecolari che regolano la suscettibilità/resistenza alla mastite, la risposta all'infezione e la sua evoluzione. La seconda metà dell'elaborato si concentra invece su uno studio bioinformatico integrativo di dati multi-omici molecolari (epigenomica e trascrittomica). Questo approccio combinato permette di esplorare in modo più dettagliato le interazioni complesse tra i diversi livelli di regolazione molecolare, con l'intento di costruire modelli predittivi più accurati e robusti per

la comprensione e la rilevazione della patologia subclinica. Attraverso l'integrazione di queste diverse fonti di dati, l'obiettivo finale è quello di identificare potenziali biomarcatori e meccanismi patogenetici, migliorando così la capacità di previsione del decorso della malattia e aprendo nuove prospettive per lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate.

Parole chiave: metagenomica, mastite subclinica, bovine da latte, biomarcatori, tecnologie omiche.

ABSTRACT

The Italian dairy sector is a fundamental pillar of the national economy, generating a turnover of approximately 17,880 million euros, 8.2% of which comes from foreign trade.

In this context, bovine mastitis, a disease with multifactorial etiology represents one of the main economic and health challenges encountered in dairy farms due to increased replacement rates, treatment costs, and reduced milk yield.

In this regard, the implementation of appropriate management and health monitoring practices is essential to safeguard the dairy supply chain. To monitor the presence or absence of potentially infectious bacteria and to assess the severity and stage of disease progression, monitoring plans for diagnosis and screening utilize specific biological indicators. For the diagnosis of infection, the gold standard method is bacteriological culture of milk, while for screening, there are: individual and differential somatic cell count (SCC, DSCC), the California Mastitis Test (CMT), the electrical conductivity test (EC), and the analysis of some blood parameters, including acute phase proteins (APP).

Despite the implementation of rigorous control strategies significantly reducing the incidence of mastitis, its long-term management remains a growing challenge for the dairy industry, with health implications for animal welfare and financial consequences for farmers, primarily due to the adaptive capacity of pathogenic microorganisms to various epidemiological contexts.

This thesis is divided into two sections: the first is based on a broader research project called "MASTITOMIC," which studies subclinical mastitis in Holstein-Friesian cows from a farm located in Villafranca Padovana (PD) using molecular approaches. Specifically, this project investigates the relationships between subclinical disease, genetic markers, the milk microbiome, and miRNAs from milk exosomes to identify the physiological and molecular mechanisms that regulate susceptibility/resistance to mastitis, the response to infection, and its progression. The second half of the thesis focuses on an integrative bioinformatics study of multi-omic molecular data (epigenomics and transcriptomics). This combined approach allows for a more detailed exploration of the complex interactions between different levels of molecular regulation, aiming to build more accurate and robust predictive models for understanding and detecting subclinical disease. By integrating these different data sources,

the ultimate goal is to identify potential biomarkers and pathogenic mechanisms, thereby improving the predictive capacity of the disease's progression and opening new avenues for the development of targeted therapeutic strategies.

Keywords: metagenomics, subclinical mastitis, dairy cows, biomarkers, omics technologies.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Rilevanza del settore lattiero-caseario in Italia: analisi di settore	1
1.2 Cenni di fisiologia dell'apparato mammario delle bovine da latte	2
1.3 Mastite: cos'è, agenti eziologici	4
1.3.1 Metodi di diagnosi e di <i>screening</i> per la rilevazione di mastite	6
1.3.1.1 Diagnosi di mastite: esame batteriologico del latte	6
1.3.1.2 Metodi di <i>screening</i> per la rilevazione di mastite	7
1.3.1.2.1 Conta individuale delle cellule somatiche (SCC)	7
1.3.1.2.2 Conta differenziale delle cellule somatiche (DSCC)	8
1.3.1.2.3 <i>California Mastitis Test</i> (CMT)	9
1.3.1.2.4 Valutazione dell'attività enzimatica	9
1.3.1.2.5 Test della Conducibilità Elettrica (CE)	10
1.3.1.2.6 Analisi delle proteine di fase acuta (APP)	10
1.3.2 Impatto della mastite nel settore lattiero-caseario	11
1.3.3 Tecnologie omiche per l'identificazione di biomarcatori di mastite nel latte ..	12
2. OBIETTIVI DELLA TESI.....	14
3. MATERIALI E METODI	15
3.1 MASTITOMIC.....	15
3.1.1 Disegno sperimentale	15
3.1.2 Preselezione degli animali da campionare.....	17
3.1.3 Metodologia di raccolta dei campioni di latte	18
3.1.4 Analisi molecolare del latte	19
3.1.4.1 Purificazione ed estrazione automatizzata del DNA batterico	20
3.1.4.2 Verifica della qualità e della quantità del DNA estratto	23
3.2 LATSAN	25
3.2.1 Il progetto <i>LATSAN</i> : Integrazione multi-omica per l'identificazione di biomarcatori di mastite subclinica	25
3.2.2 Derivazione del profilo trascrittomico ed epigenomico dell'ospite	28
3.2.2.1 Profilo trascrittomico dell'ospite	29
3.2.2.2 Profilo epigenomico dell'ospite	31

3.2.3 Integrazione multi-omica	33
4.RISULTATI E DISCUSSIONE	35
4.1 <i>MASTITOMIC</i>	35
4.2 <i>LATSAN: integrazione multi-omica</i>	42
CONCLUSIONI	52
BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA.....	54

1. INTRODUZIONE

1.1 Rilevanza del settore lattiero-caseario in Italia: analisi di settore

Le statistiche pubblicate dall'Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare (ISMEA) e aggiornate fino al 2022, attribuiscono al settore lattiero-caseario italiano un valore di circa 17.880 milioni di euro, di cui l'8.2% deriva dal commercio estero.

A livello nazionale, sono state censite 24.515 aziende ad orientamento produttivo latte, ciascuna composta in media da circa 1.483 bovine di età maggiore ai 24 mesi (ISMEA MERCATI, 2024).

La quantità di latte vaccino adibita alla trasformazione rappresenta il 9.8% dell'industria agroalimentare nazionale e parte di questa è riservata alla produzione di latte alimentare fresco e formaggi DOP e IGP, apprezzati dai consumatori per la conservazione delle tradizionali tecniche di lavorazione locali e artigianali (ISMEA, 2023).

Le consegne di latte vaccino da parte delle diverse regioni hanno superato, nello stesso anno, le 13 milioni di tonnellate, in particolare, la produzione si è concentrata nella zona settentrionale, comprendendo: Lombardia, Emilia-Romagna, Veneto e Piemonte (ISMEA, 2023).

In questo contesto socioeconomico, il grado di autoapprovvigionamento, calcolato come la percentuale della produzione interna rapportata al consumo nazionale, raggiunge l'81% (ISMEA, 2023).

Con una numerosità di 1.136.874 capi distribuiti in tutta la nazione e una media produttiva di 10.802 kg di latte per capo all'anno, nel 2023, la *Holstein-Friesian*, comunemente chiamata Frisone, si è confermata la razza bovina più produttiva e maggiormente allevata in Italia (ANAFIBJ, www.anafi.it).

Una caratteristica peculiare di questa razza è il parto precoce nelle bovine primipare, che si aggira intorno ai 26 mesi. Sebbene l'età prematura del primo parto massimizzi la carriera produttiva dell'animale, essa incide significativamente sulla qualità tecnologica e casearia del latte, che risulta meno ricco in grassi e proteine rispetto a quello prodotto da altre razze comunemente allevate in Italia, quali Bruna Alpina e Pezzata Rossa.

1.2 Cenni di fisiologia dell'apparato mammario delle bovine da latte

L'apparato mammario possiede caratteristiche anatomiche e fisiologiche proprie della specie di appartenenza. Contestualmente, una vacca lattifera presenta due paia di mammelle situate nella regione inguinale, separate sul piano mediano da un solco intermammario (cosiddetto "legamento sospenditore del complesso mammario") e su quello trasversale da tessuto connettivo elastico.

Da questa divisione anatomica derivano quattro unità distinte, denominate "quarti" (due anteriori e due posteriori) (Bortolami *et al.*, 2009).

Ciascuno di essi accoglie una porzione ghiandolare apocrina, a struttura tubulo-alveolare composta e definita "complesso mammario", che è indipendente e termina con il proprio capezzolo da cui viene secreto il latte (**Figura 1**).

Le unità funzionali secernenti di ciascuna ghiandola mammaria sono le cellule epiteliali; queste si organizzano in centinaia di alveoli che si uniscono a "grappolo", formando strutture lobulari.

Ciascun alveolo è ricoperto di cellule mioepiteliali saldamente adese fra loro in grado di ostacolare lo scambio ionico fra il comparto alveolare e il sistema circolatorio (**Figura 2**).

I lobuli presentano un dotto galattoforo comune, che, inserendosi in dotti collettori di diametro crescente, è in grado di riversare il latte derivante dal lume alveolare, in una cavità di contenimento chiamata "cisterna mammaria".

Da qui, uno sfintere di muscolatura liscia posto alla base del canale papillare regola il meccanismo di eiezione del latte.

In particolare, la distensione di questa valvola muscolare consente l'apertura dell'orifizio capezzolare, quindi la secrezione latte, mentre la sua contrazione ne favorisce l'occlusione.

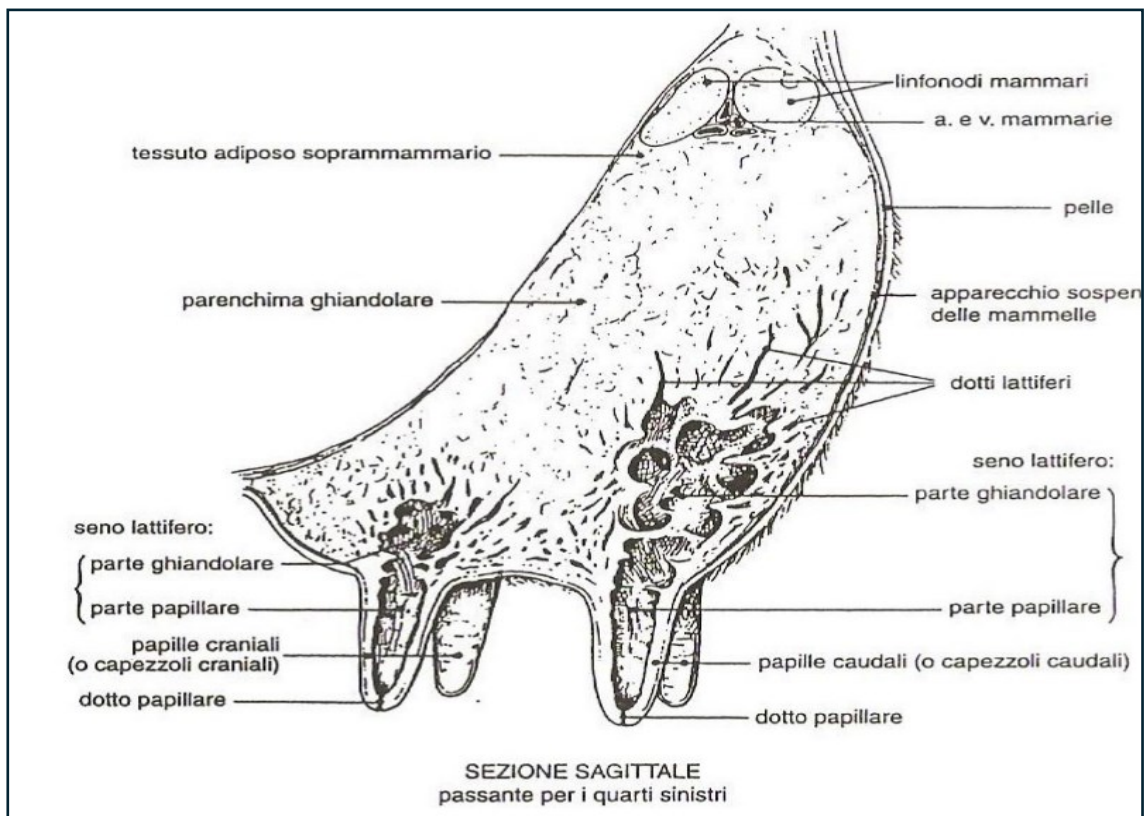


Figura 1. Conformazione interna delle mammelle di Vacca
(Fonte: Bortolami *et al.*, 2009)

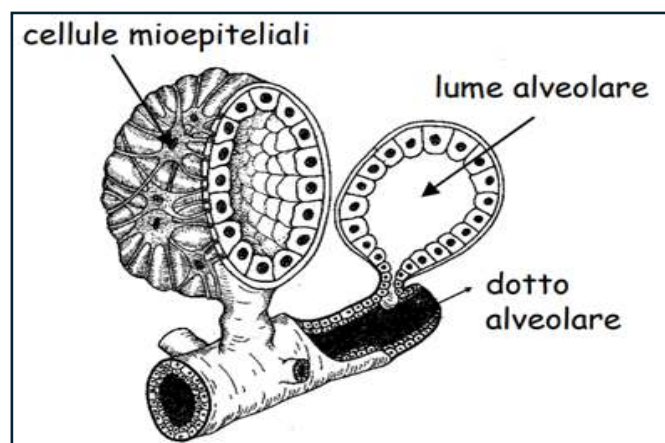


Figura 2. Rappresentazione schematica dell'alveolo mammario
(Fonte: Naitana *et al.*, 1992)

1.3 Mastite bovina: cos'è, agenti eziologici

Il termine “mastite bovina”, dal latino: “*mastos*” =mammella e “*itis*” =infiammazione, indica un qualsiasi processo infiammatorio a carico del parenchima mammario che porta ad un’alterazione del tessuto ghiandolare e/o delle caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche del latte.

È considerata una patologia ad eziologia multifattoriale, di natura infettiva o non infettiva, per via delle molteplici condizioni che contribuiscono alla sua insorgenza.

Generalmente si sviluppa come conseguenza ad infezioni intramammarie (IMI) da parte di microrganismi patogeni, specialmente di origine batterica ma, secondariamente possono concorrere alla sua comparsa anche: funghi, lieviti e alghe (Bradley, 2002).

Il processo di flogosi può talvolta derivare da una scorretta applicazione delle buone prassi igienico-operative in allevamento da parte del personale addetto.

Scarse condizioni di gestione e stabulazione dei capi potrebbero infatti comportare:

- lesioni e traumi accidentali del tessuto mammario;
- carenze nutrizionali derivanti da razionamenti sbilanciati e/o da somministrazioni ingiustificate di antibiotici, che incrementano l’antibiotico-resistenza dei batteri ai futuri trattamenti terapeutici.

L’insieme di queste variabili, spesso concomitanti, rende la mammella ancora più vulnerabile alla proliferazione di microrganismi potenzialmente infettivi (Ajose *et al.*, 2022).

Dal punto di vista epidemiologico, la mastite può essere classificata secondo le vie di trasmissione dell’agente eziologico in: contagiosa o ambientale.

Nel primo caso, la fonte di contaminazione più frequente è il latte di bovine infette e i patogeni maggiormente coinvolti sono: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) e *Streptococcus dysgalatiae* (*S. dysgalatiae*).

Questi sopravvivono all’interno della ghiandola mammaria (*reservoir*) causando infezioni intramammarie anche di un singolo quarto, e si diffondono da un capo all’altro durante o in prossimità del momento della mungitura (Bradley, 2002). In particolare, *S. aureus* è il più contagioso e sovente il più isolato nelle diagnosi di mastite bovina (Argaw, 2016).

La forma ambientale, al contrario, origina da agenti eziologici più o meno ubiquitari nell’ambiente di stabulazione.

Questi penetrano per via ascendente dal canale del capezzolo e colonizzano la mammella generalmente nel periodo compreso fra due mungiture consecutive, durante il quale l'orifizio risulta essere più suscettibile a contaminazioni, per contatto diretto con alcune superfici imbrattate, quali lettieri e suolo.

In questo intervallo di tempo il sistema immunitario dell'animale non è sempre in grado di rispondere adeguatamente all'offesa, permettendo così la sopravvivenza e la proliferazione dei microrganismi esogeni nella mammella (*reservoir*).

Fra gli agenti eziologici ambientali più comuni emergono: la famiglia delle *Enterobacteriaceae*, in particolare il coliforme fecale *Escherichia coli* (*E. coli*), ma anche bacilli, fra cui *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) (Bradley, 2002).

Sulla base della manifestazione clinica, la mastite può essere ulteriormente classificata in:

- Clinica (*clinical mastitis*, CM): è caratterizzata dalla presenza di alterazioni della ghiandola mammaria macroscopicamente percepibili, quali: arrossamento, aumento della temperatura e gonfiore. Possono presentarsi in casi gravi anche sintomi sistemici, quali: febbre, calo dell'appetito, blocco ruminale, minore produzione latte, anoressia e ipotermia (Bradley, 2002).

Dal punto di vista organolettico il latte varia per composizione, colore e consistenza. Appare più denso e può contenere sangue, scaglie o coaguli.

Il profilo clinico di questa patologia, in funzione della persistenza dei sintomi ad esso associati, viene catalogato in tre stadi: subacuto, acuto e iperacuto.

Un'ulteriore classificazione, basata sulla gravità dei segni clinici e sistemici della bovina sintomatica, discrimina le infiammazioni del parenchima ghiandolare mammario in: lievi, moderate e gravi (Haxhiaj *et al.*, 2022).

- Subclinica (*subclinical mastitis*, SCM): si distingue dalla precedente per l'assenza di segni clinici a carico della mammella e/o di alterazioni evidenti, ma non per questo assenti, nella composizione e resa del latte.

È possibile riscontrare le variazioni fisico-chimiche del secreto mediante test citologici e fra questi il più utilizzato è la conta delle cellule somatiche (*Somatic Cell Count*, SCC).

La forma asintomatica di questa patologia è infatti associata ad un contenuto

cellulare totale elevato, indicativo di una risposta immunitaria dell'ospite in atto contro l'infezione (Pinzón-Sánchez *et al.*, 2011).

La mastite subclinica è dalle 15 alle 40 volte più comune rispetto a quella clinica e sebbene passi inosservata, le sue conseguenze gravano significativamente sul settore lattiero-caseario, influenzando la resa latte e la sua attitudine alla caseificazione. (Kumari *et al.*, 2018; Argaw, 2016).

Quindi, oltre a causare ingenti perdite economiche agli allevatori, gli animali subclinicamente malati fungono da “serbatoio” di microrganismi mastitogeni.

1.3.1 Metodi di diagnosi e di *screening* per la rilevazione di mastite

Di norma, per l'acquisizione di informazioni significative sulla presenza o l'assenza di agenti potenzialmente infettivi e/o sulla rilevanza e stadio di avanzamento della mastite, i programmi di diagnosi e di *screening* prevedono l'utilizzo di specifici marcatori biologici.

1.3.1.1 Diagnosi di mastite: esame batteriologico del latte

Attualmente, il metodo di elezione (*gold standard*) per la diagnosi di un'infezione intramammaria è l'esame batteriologico colturale del latte, che permette l'isolamento e l'identificazione del patogeno coinvolto nella sua insorgenza.

I campioni di latte per l'analisi microbiologica possono provenire da un singolo quarto, dal *pool* dei quattro quarti o dal latte di massa, a seconda delle esigenze analitiche.

Sebbene questo parametro di riferimento sia utile per monitorare la mastite nei programmi di controllo, non esclude l'eventuale possibilità di ottenere dei falsi negativi. Perciò, anche se i campioni risultano negativi dall'isolamento, potrebbero comunque essere presenti agenti eziologici di mastite contagiosa in allevamento.

Per questo motivo, oltre all'esame colturale del latte, è necessario l'ausilio di indicatori di infiammazione supplementari più specifici.

1.3.1.2 Metodi di *screening* per la rilevazione di mastite

1.3.1.2.1 Conta individuale delle cellule somatiche (*Somatic Cell Count, SCC*)

Il termine “cellule somatiche” definisce la presenza cellulare totale nel campione di latte.

Le cellule somatiche sono principalmente composte da cellule del sistema immunitario (75%), quali: neutrofili, macrofagi e linfociti, presenti in proporzioni distinte sulla base dello stato sanitario della mammella; e da una piccola porzione di cellule epiteliali (25%) derivanti dallo sfaldamento della ghiandola mammaria (Sharma *et al.*, 2011).

Nei programmi di monitoraggio della prevalenza della mastite subclinica, la Federazione internazionale dei prodotti lattiero-caseari (IDF) ha stabilito che una concentrazione cellulare superiore al valore soglia di 200.000 cellule/mL è un valido predittore di infezione intramammaria, che riflette la risposta immunitaria al processo di flogosi mammaria.

Gli agenti chemiotattici, rilasciati dal tessuto mammario danneggiato, richiamano grandi quantità di leucociti polimorfonucleati (PMN), che migrano in massa al sito di infiammazione transitando tra le cellule epiteliali nel lume dell'alveolo.

Una volta giunti nel latte, i leucociti fagocitano attivamente i batteri patogeni invasori, ma anche globuli di grasso e caseina, diminuendo esponenzialmente la qualità tecnologica di coagulazione del latte stesso (Harmon, 2001).

Il conteggio cellulare può essere effettuato da un operatore, contando al microscopio le cellule presenti nell'aliquota, oppure mediante l'utilizzo di strumentazioni in grado di calcolare in autonomia questo parametro.

Il calcolo, strumentale o diretto, fornisce informazioni biologiche diverse a seconda della provenienza del latte testato:

- se il campione soggetto ad analisi è costituito da latte di massa, il conteggio delle cellule somatiche per mL fornisce indicazioni sulla salubrità del latte prodotto dall'intera mandria.

Il Regolamento (CE) n. 853/2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, ha definito per il latte di massa un *cut-off* di 400.000 cellule/mL, calcolato come media geometrica di almeno un campione al mese per tre mesi successivi (IZSLER, 2019).

- Al contrario, se il campione di latte deriva da un singolo capo, la stima della frazione cellulare descrive lo stato di salute della ghiandola mammaria della bovina stessa e rileva eventuali risposte infiammatorie in atto.

Non sempre però un'elevata concentrazione cellulare è indice di mastite, in minore misura può essere imputata ad altri fattori incidenti nella vita delle bovine, quali: età, stagione, stadio di lattazione, condizioni di stress, e momento in cui viene eseguito il conteggio cellulare (Harmon, 1994).

Sebbene la conta individuale delle cellule somatiche sia una metodica specifica e affidabile per il monitoraggio della salute della mammella, essa non garantisce un'elevata accuratezza come *marker* subclinico di mastite, per via della graduale diminuzione dell'SCC medio negli allevamenti di bovine da latte. Attualmente, infatti, evidenze scientifiche dimostrano che la maggioranza degli agenti eziologici di mastite contagiosa è caratterizzata da un SCC inferiore a 100.000 cellule/mL (Zecconi *et al.*, 2019).

1.3.1.2.2 Conta differenziale delle cellule somatiche (*Differential Somatic Cell Count*, DSCC).

I programmi di monitoraggio per la salute della mammella comprendono la conta differenziale delle cellule somatiche (DSCC) come indicatore ausiliario di mastite.

Questo parametro rappresenta la percentuale combinata di leucociti polimorfonucleati (PMN) e linfociti rispetto al totale delle cellule somatiche presenti nel campione di latte (Damm *et al.*, 2017).

Il conteggio viene effettuato mediante analizzatori ad alto rendimento, basati sulla citofluorimetria o sulla microscopia a fluorescenza, che permettono la rilevazione di singole popolazioni di cellule del sistema immunitario.

La **Figura 3** presenta le formule per calcolare rispettivamente le percentuali di cellule somatiche differenziate (DSCC) e di macrofagi (Damm *et al.*, 2017).

$$DSCC (\%) = \frac{\text{leucociti PMN} + \text{linfociti}}{SCC} \cdot 100$$

$$\text{Macrofagi} (\%) = 100 - DSCC (\%)$$

Figura 3. Rielaborazione dati tratti da: Damm *et al.* (2017)

L'SCC valutato singolarmente non garantisce un'elevata sensibilità nella fase di monitoraggio della salute mammaria, ma se utilizzato in combinazione con il DSCC diviene un efficace strumento di rilevazione precoce di mastite.

La conta differenziale delle cellule somatiche è quindi un parametro sensibile.

Tuttavia, è importante considerare la matrice di partenza, questo significa che, se una bovina presenta solo un quarto infetto e si analizza un campione di latte proveniente dal *pool* dei quattro quarti, i risultati potrebbero essere fuorvianti.

In questi casi, anche se il conteggio totale delle cellule somatiche rientra in un intervallo limitato, i valori di SCC e DSCC nel quarto infetto possono essere significativamente elevati, mascherando il processo infiammatorio effettivamente presente (Wall *et al.*, 2018; Schwarz *et al.*, 2020).

1.3.1.2.3 California Mastitis Test (CMT)

È un test di *screening* semplice ed economico che valuta la composizione cellulare del campione di latte, nello specifico fornisce una stima indiretta dell'SCC tramite una reazione gelificante che avviene tra l'acido nucleico delle cellule e un reagente detergente: l'alchilaril solfonato.

La prova può essere eseguita direttamente in allevamento al momento della mungitura, pertanto, i risultati sono disponibili nell'immediato, permettendo la rilevazione dei quarti caratterizzati da un SCC elevato.

Correlando il punteggio risultante dal *test* con la conta totale delle cellule somatiche nel campione di latte è possibile comprendere se il quarto in esame è sano oppure infetto (in modo lieve, evidente o conclamato) (Argaw, 2016).

1.3.1.2.4 Valutazione dell'attività enzimatica

Esistono bioindicatori di salute mammaria alternativi, che subiscono alterazioni durante l'infiammazione e possono essere misurati nel campione di latte.

In particolare, nel corso di un processo infiammatorio a carico del parenchima mammario, le cellule del tessuto danneggiato secernono enzimi intracellulari idrolitici e proteolitici, quali: lattato deidrogenasi (LDH), fosfatasi alcalina (ALP) e N-acetil- β -D-glucosaminidasi (NAGasi), β -glucuronidasi (β -GUS), catalasi (CAT) e plasmina (PLN), normalmente coinvolti in diversi processi metabolici.

Questi enzimi portano alla variazione delle caratteristiche fisico-chimiche del latte e, sebbene non sostituiscano i metodi convenzionali sopra descritti per il rilevamento precoce della mastite, la valutazione della loro attività catalitica è comunque considerata un indicatore di supporto utile a tale scopo (Marouf *et al.*, 2017; Nyman *et al.*, 2014).

1.3.1.2.5 Test della conducibilità elettrica (CE)

Durante un evento mastitico la concentrazione ionica varia in risposta ad un aumento della permeabilità di membrana delle cellule secernenti della mammella.

Questo processo influenza indirettamente la conducibilità elettrica (CE) del latte, nello specifico aumenta la concentrazione di sodio (Na^+) e cloro (Cl^-), mentre diminuisce quella del potassio (K^+).

L'alterazione di questo parametro può essere convertita in un segnale facilmente interpretabile con l'ausilio di specifici sensori.

Sebbene una variazione della conducibilità elettrica del latte sia spesso un indicatore precoce di infiammazione, ci sono anche altri fattori che possono influenzarne la variabilità quali: variazioni di pH, la diminuzione del contenuto lipidico nel latte, età e stadio di lattazione della bovina.

Si conclude quindi, che la valutazione di questo parametro acquisisce rilievo dal punto di vista clinico come biomarcatore precoce di mastite o IMI, solo una volta considerati tutti gli elementi in grado di condizionarlo (Pyörälä, 2003).

1.3.1.2.6 Analisi delle proteine di fase acuta (APP)

Durante una reazione di fase acuta, il quarto infetto è in grado di rilasciare specifiche glicoproteine che sono sintetizzate principalmente dal fegato e poi immesse in circolo.

Queste proteine plasmatiche fanno parte del sistema immunitario innato e aspecifico dell'ospite; modificano le loro concentrazioni sieriche per ristabilire l'omeostasi fisiologica in risposta ad un insulto di natura infiammatoria o traumatica.

Fra queste, le più sensibili sono l'aptoglobina (Hp, misurata con *test* biochimici) e la sieroamiloide A (SAA, valutata mediante *test* immunologici).

Altre proteine rilevabili includono l'albumina sierica bovina e l'inibitore tripsinico α -1.

La proteina di fase acuta sieroamiloide A, in particolare, è correlata positivamente con il processo patologico a carico del parenchima ghiandolare mammario e viene riversata nel latte a causa di un'alterata permeabilità della barriera emato-mammaria durante l'infiammazione (Pyörälä, 2003).

Studi scientifici basati su un modello di infezione sperimentale della mammella bovina con *Streptococcus uberis* hanno dimostrato che i livelli di sieroamiloide A aumentano significativamente nel latte prima che nel siero, anticipando la crescita esponenziale delle cellule somatiche nel latte ed evidenziando così l'elevata sensibilità di questo biomarcatore precoce di mastite (Pedersen *et al.*, 2003).

1.3.2 Impatto della mastite nel settore lattiero-caseario

L'implementazione di efficaci strategie di controllo ha evidenziato nel tempo una diminuzione significativa degli episodi mastitici negli allevamenti di vacche lattifere.

A livello globale circa il 40% delle bovine ad orientamento produttivo latte può essere affetto da mastite subclinica, mentre il tasso di incidenza della forma clinica varia dal 10% al 12% (Constable *et al.*, 2016).

Per quanto riguarda la situazione attuale in Italia, in letteratura scientifica sono presenti ancora dati esigui relativi all'incidenza della mastite bovina sul totale della filiera agroalimentare nazionale.

Tuttavia, la gestione di questa patologia rimane una sfida crescente per l'industria lattiero-casearia, comportando ripercussioni sanitarie sul benessere degli animali e finanziarie per gli allevatori, soprattutto a causa della capacità di adattamento dei microrganismi patogeni ai diversi contesti epidemiologici.

Dal punto di vista economico, si stimano perdite derivanti dai costi di trattamento, abbattimento e morte dei casi clinici, oltre a quelle dovute alla diminuzione della resa latte.

Spesso la mastite si presenta in forma subclinica, rendendo particolarmente ardua la sua identificazione e la successiva eradicazione.

L'intervallo di tempo che intercorre fra l'insorgenza della patologia e la sua diagnosi, che richiede indagini più approfondite per via dell'assenza di segni clinici evidenti nell'animale, consente la sua veloce diffusione tra i componenti della mandria e causa ingenti perdite monetarie agli allevatori.

Nello specifico, l'impatto economico più significativo è rappresentato dalla riduzione della produzione media di latte per capo. Nondimeno, incide sui costi aziendali anche l'alterazione del profilo lipoproteico e la diminuzione dei valori biologici e nutritivi del latte proveniente dai quarti infetti, riducendo in modo esponenziale le sue proprietà organolettiche e la qualità tecnologica di caseificazione.

Una delle principali complicazioni durante il *follow-up* delle mastiti è la loro tendenza alla cronicizzazione, spesso causata dalla somministrazione impropria e non giustificata di terapie antibiotiche, sistemiche o intramammarie.

Questa profilassi determina la presenza di elevate concentrazioni di sostanze antibiotiche nel latte e rappresenta un problema di *food safety* per la salute pubblica, favorendo il fenomeno dell'antibiotico-resistenza (AR).

I batteri resistenti potrebbero essere trasmessi all'uomo attraverso la catena alimentare, per questo motivo il latte proveniente da bovine infette non viene destinato all'alimentazione umana, né a quella dei vitelli a carne bianca.

La mastite rappresenta una delle principali cause di riforma precoce delle bovine da latte; diverse ragioni includono problematiche nella riproduzione, bassa resa latte, zoppie o altre malattie (USDA, APHIS, VS, 2002).

Durante lo stadio clinico della patologia, gli animali possono mostrare cali dell'appetito, che si riflettono in una diminuzione della copertura lipidica muscolare e delle riserve di glicogeno, influenzando così la qualità della carcassa in fase di riforma (Haxhiaj *et al.*, 2022).

1.3.3 Tecnologie omiche per l'identificazione di biomarcatori di mastite nel latte

Considerati i molteplici fattori di rischio legati all'insorgenza della mastite in allevamento, la messa a punto di adeguate pratiche di gestione e sorveglianza sanitaria è essenziale per la salvaguardia dell'industria lattiero-casearia.

A tal fine, negli ultimi decenni il rapido progresso scientifico e la diminuzione dei costi di sequenziamento hanno implementato l'applicazione di approcci multi-omici, come strumento di identificazione, fra diversi livelli di informazione, di potenziali biomarcatori significativi per la rilevazione precoce di mastite (Wang *et al.*, 2024).

Le discipline omiche coinvolte in questo approccio olistico di associazione includono:

- Genomica: studia il genoma nella sua complessità (struttura, funzioni, variazioni genetiche, evoluzione e mappatura).
- Trascrittomica: studia i trascritti del DNA (mRNA, rRNA, tRNA, ecc.), ne comprende le cause di variabilità e i meccanismi di funzionamento.
- Epigenomica: si occupa di comprendere l'insieme delle modificazioni trasmissibili (e reversibili) del DNA o delle proteine ad esso associate.
- Proteomica: viene impiegata per lo studio su larga scala del proteoma di un organismo dal punto di vista strutturale e funzionale.
- Metabolomica: studia e quantifica i metaboliti endogeni presenti in cellule, tessuti e liquidi biologici all'interno dell'organismo (LAR, 2014).

Tuttavia, prese singolarmente queste discipline sono in grado di fornire informazioni biologiche di certo rilevanti ma comunque insufficienti per la comprensione dei determinanti molecolari che sottendono l'insorgenza della patologia.

L'adozione di una strategia multi-omica permette invece di svolgere un'indagine più completa dei meccanismi biologici coinvolti nella regolazione della mastite, grazie all'integrazione e successiva interpretazione di *set* di dati biologici provenienti da studi omici distinti (Wang *et al.*, 2020).

2. OBIETTIVI DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi si sviluppa in chiave dicotomica, articolandosi in due sezioni principali:

la prima metà si basa su un progetto di ricerca più ampio, denominato “*MASTITOMIC*”, ideato e sviluppato dall’Università degli Studi di Padova, in collaborazione con l’Università degli Studi di Bologna.

L’esperimento proposto ha come oggetto di studio e tramite approcci molecolari, la mastite subclinica in bovine di razza Frisona, provenienti da un allevamento situato a Villafranca Padovana (PD). Nello specifico, in questo progetto vengono investigate le relazioni tra la patologia subclinica, i marcatori genetici, il microbioma del latte e i *miRNA* degli esosomi del latte, al fine di identificare i meccanismi fisiologici e molecolari che regolano la suscettibilità/resistenza alla mastite, la risposta all’infezione e la sua evoluzione.

La composizione del microbioma dei campioni di latte è stata eseguita mediante:

- Preselezione degli animali da campionare sulla base di specifici criteri di inclusione: *Breeding Value* (EBV, valore genetico) per SCC; dati fenotipici di SCC provenienti dalle lattazioni precedenti.
- Raccolta dei campioni di latte in azienda, svolta in tre momenti distinti: al T0 (*screening* batteriologico), al tempo 1 (T1) e al tempo 2 (T2).
- Estrazione del DNA batterico a partire dalla matrice di latte crudo.
- Verifica della qualità e della quantità del DNA estratto.
- Sequenziamento metagenomico *shotgun* del DNA estratto (in laboratori esterni).

La seconda metà dell’elaborato si concentra invece su uno studio bioinformatico integrativo di dati multi-omici molecolari (epigenomica e trascrittomica). Questo approccio combinato permette di esplorare in modo più dettagliato le interazioni complesse tra i diversi livelli di regolazione molecolare, con l’intento di costruire modelli predittivi più accurati e robusti per la comprensione e la rilevazione della patologia subclinica. Attraverso l’integrazione di queste diverse fonti di dati, l’obiettivo finale è quello di identificare potenziali biomarcatori e meccanismi patogenetici, migliorando così la capacità di previsione del decorso della malattia e aprendo nuove prospettive per lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate.

3. MATERIALI E METODI

3.1 MASTITOMIC

3.1.1 Disegno sperimentale

Come precedentemente accennato, il presente lavoro sperimentale fa parte di un progetto di ricerca più ampio, denominato “*MASTITOMIC*”, coordinato dal Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse naturali e Ambiente (DAFNAE) dell’Università degli Studi di Padova, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell’Università degli Studi di Bologna.

La prova sperimentale si è svolta in un allevamento commerciale con circa 1500 bovine di razza Frisona in lattazione, ubicata in provincia di Padova (PD), dove sono stati effettuati i prelievi di latte e di sangue necessari per le analisi di laboratorio.

Mediante questa indagine preliminare è stata rilevata la presenza, in allevamento, di due microrganismi coinvolti nella patogenesi della mastite, quali: *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Le bovine seguivano un regime alimentare prevalentemente intensivo, basato su una razione *unifeed* (**Tabella 1**). Questa dieta, composta da una miscela bilanciata di foraggi e mangimi concentrati, era progettata per soddisfare le esigenze nutrizionali durante la lattazione.

In **Figura 4** è riportato il disegno sperimentale, ideato al fine di riassumere graficamente l’intera sequenza cronologica di operazioni eseguite nel corso di questi mesi per raggiungere gli obiettivi della prova sperimentale.

Tabella 1. Tabella riassuntiva della composizione della razione (*unifeed*)
(Fonte: dati forniti dall'azienda agricola oggetto di studio)

ALIMENTI	TQ Kg	SS Kg	% SSI*
Silomais	20,000	6,180	23,34
Insilato	12,000	4,058	15,33
Pastone	5,000	3,700	13,97
Mais fiocco	3,500	3,068	11,59
Soia farina estr. 47% ¹	3,000	2,700	10,20
Medica fieno	2,800	2,477	9,36
Polpa di barbabietola	1,100	0,968	3,66
<i>Sugarfeed</i>	1,100	0,792	2,99
<i>Soyfull</i>	0,800	0,728	2,75
Paglia di frumento	0,500	0,459	1,73
Glicerolo 84%	0,400	0,389	1,47
Grasso idrogenato	0,350	0,347	1,31
Lattazione 200 ²	0,200	0,193	0,73
<i>Buffer</i> ³	0,430	0,421	1,59
<p>* Percentuale di Sostanza Secca Ingerita</p> <p>¹ Farina di estrazione di soia con il 47% di proteine</p> <p>² Integratore formulato per sostenere le bovine durante la fase di lattazione</p> <p>³ Sodio bicarbonato, calcio carbonato, magnesio ossido basso VB, sodio cloruro</p>			

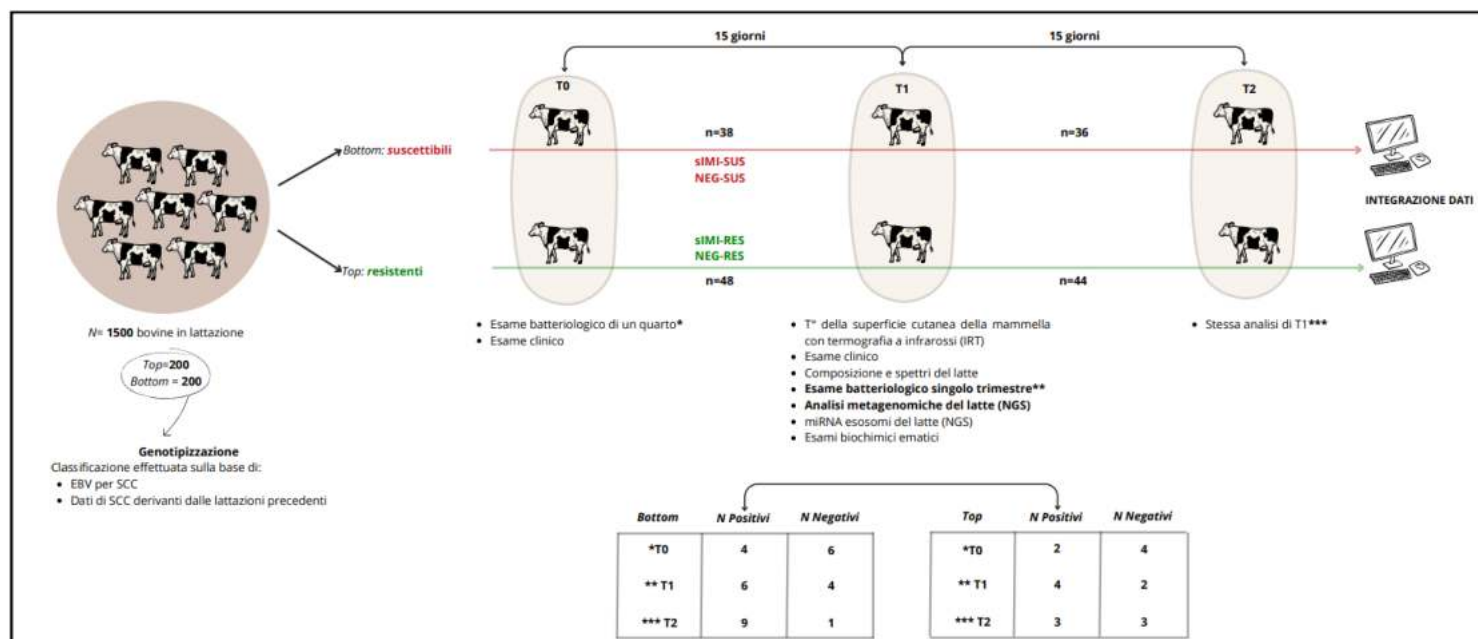


Figura 4. Workflow organizzativo del progetto MASTITOMIC

SCC, Somatic Cell count; EBV, Breeding Value

3.1.2 Preselezione degli animali da campionare

Poiché l'insorgenza della mastite è influenzata sia da variabili ambientali (prevalentemente) sia da una componente genetica, gli animali da campionare sono stati selezionati in base al *Breeding Value* (EBV, valore genetico) per SCC, e ai dati fenotipici di SCC provenienti dalle lattazioni precedenti.

L'ereditabilità del carattere mastite è molto bassa, circa il 2.5%, mentre per SCC è intorno al 10% (IZ - Informatore Zootecnico, 2015).

Sebbene in questo contesto diano maggiori informazioni i fattori ambientali (condizioni di stabulazione, alimentazione, igiene nella mungitura, *etc.*), è stato utile svolgere scelte selettive più mirate.

In particolare, sono state escluse: le bovine primipare; trattate con antibiotici; con segni clinici di mastite; o che hanno contratto la patologia nei sei mesi precedenti l'inizio della prova sperimentale.

Tenendo conto di tutte queste variabili sono state selezionate 400 bovine, da campionare al tempo 0 (T0), equamente distinte nelle due classi:

- “*Bottom*”, corrispondono agli animali potenzialmente suscettibili a mastite (i peggiori sulla base di EBV per SCC, e ai dati di SCC derivanti dalle lattazioni precedenti).
- “*Top*”, sono invece gli animali potenzialmente resistenti (i migliori sulla base di EBV per SCC, e ai dati di SCC derivanti dalle lattazioni precedenti).

3.1.3 Metodologia di raccolta dei campioni di latte

Per i prelievi di latte è stato seguito un protocollo preciso e ben definito.

Nello specifico, i campionamenti in azienda sono stati effettuati in tre momenti distinti: al T0 (*screening* batteriologico), al tempo 1 (T1) e al tempo 2 (T2).

Dal punto di vista cronologico, il T0 corrisponde al primo prelievo di latte; seguono rispettivamente il tempo T1 e T2, con un intervallo di 15 giorni tra ciascuno di essi.

Questa pianificazione temporale è stata adottata per monitorare l’evoluzione della patologia e la risposta dell’animale all’infiammazione intramammaria.

I campioni di latte sono stati raccolti manualmente in condizioni di sterilità, per singolo quarto, durante le quotidiane operazioni di mungitura in stalla; in particolare nel corso della seconda mungitura del pomeriggio.

Durante la mungitura per ogni quarto sono stati scartati i primi getti di latte, in quanto poco rappresentativi del secreto presente nella cisterna della mammella e potenzialmente contaminati, riducendo così il rischio di falsi positivi nell’analisi.

Al tempo T0 è stato effettuato il prelievo di latte sulle bovine preselezionate, per svolgere uno *screening* preliminare della prevalenza dei batteri mastitogeni di interesse, quali: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) e *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*).

I campioni di latte collezionati sono stati refrigerati a +4°C e inviati all’Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVE) entro 10 ore dalla raccolta, per l’analisi batteriologica.

Nei laboratori dell’IZSVE i campioni sono stati coltivati in ottemperanza alle linee guida del *National Mastitis Council* (NMC). Questo processo prevede lo strisciamento di 10 µL di latte su un terreno di agar esculina con sangue, seguito da un’incubazione di 16-18 ore a 37°C.

Successivamente, le colonie isolate sono state subcoltivate e caratterizzate mediante esami morfologici e test aggiuntivi (NMC, 2017).

La conferma dei patogeni mastitogeni caratterizzati è stata effettuata mediante spettrometria di massa a desorbimento/ionizzazione laser assistita da matrice a tempo di volo (*MALDI-TOF MS*).

Un punteggio $\log \geq 2$ è stato impiegato come soglia per l'identificazione a livello di specie. I campioni che presentavano più di due tipi diversi di colonie sono stati classificati come "contaminati".

L'esito dello *screening* microbiologico ha rivelato la presenza di 37 animali positivi per *S. aureus*, *S. uberis* o *S. dysgalactiae*.

Sulla base di questi risultati, sono stati selezionati per il prelievo 86 animali al tempo T1, mentre al tempo T2 sono stati esaminati solo 81 animali, anziché gli 86 inizialmente attesi. Tra le cinque bovine mancanti, alcune erano state riformate precocemente, mentre altre erano state messe in asciutta.

I campioni di latte prelevati ai tempi T1 e T2 sono stati analogamente sottoposti ad analisi batteriologica da parte dell'IZSVE, e successivamente analizzati dal punto di vista molecolare all'interno del laboratorio omico del Dipartimento DAFNAE.

I risultati delle colture batteriche hanno evidenziato la presenza di 27 animali positivi per *S. aureus*, *S. uberis* o *S. dysgalactiae* per quanto riguarda il tempo T1 e 28 animali positivi per le stesse specie al tempo T2.

Durante la raccolta, oltre ai prelievi di latte per singoli quarti, sono stati effettuati, per ogni tempo, anche:

- prelievi di latte mediante l'utilizzo di un lattometro, che permette di ottenere dei campioni che siano rappresentativi dell'intera mungitura e utili per le analisi della composizione chimica del latte, effettuate all'interno del laboratorio dell'Associazione Regionale Allevatori Veneto (ARAV).
- Prelievi ematici per: i) analisi di parametri metabolici e indicatori di infiammazione e stress ossidativo (analisi eseguite da IZSVE); ii) genotipizzazione per marcatori di suscettibilità/resistenza alla patologia.

3.1.4 Analisi molecolare del latte

Nel latte, il rilevamento molecolare di microrganismi, noti per essere coinvolti nella patogenesi della mastite bovina, si basa sull'amplificazione del DNA degli agenti patogeni

bersaglio. Di conseguenza l'estrazione e la purificazione del DNA batterico dalla matrice di latte crudo devono essere svolte con elevata precisione e accuratezza analitica (Cremonesi *et al.*, 2006).

3.1.4.1 Purificazione ed estrazione automatizzata del DNA batterico

Il protocollo seguito dal progetto sperimentale per la preparazione dei campioni biologici da analizzare è il “*MagMAX CORE Mastitis & Panbacteria Module*”, che permette l'estrazione e la purificazione automatizzata degli acidi nucleici da tutti i batteri, mediante l'utilizzo di un estrattore automatico.

Questo strumento, oltre a garantire una maggiore ripetibilità delle analisi, fornisce un elevato *throughput* di dati, processando contemporaneamente più campioni.

Il *workflow* di estrazione (**Figura 5**) è stato adattato e ottimizzato *ad hoc* per il disegno sperimentale. In sintesi, il metodo prevede di:

- Aliquotare in ciascun pozzetto della Fila A:
 - 75 µL di *Panbacteria Solution*;
 - 300 µL del campione di latte (e incubare per 5 minuti a T° ambiente);
 - 15 µL di *Proteinasi K*.
- Aliquotare 500 µL della prima soluzione di lavaggio “*Wash solution 1*” in ciascun pozzetto della Fila B.
- Aliquotare 250 µL della seconda soluzione di lavaggio “*Wash solution 2*” in ciascun pozzetto delle File C e D.
- Posizionare la *Tip Comb* nella Fila H della piastra.
- Inserire la piastra preparata nell'estrattore e avviare lo strumento, implementato per eseguire il processo di isolamento e purificazione degli acidi nucleici.
- Dopo 6 minuti, aggiungere 510 µL della soluzione di lisi (denominata “*Lysis/Binding/Bead Mix*” e preparata in anticipo) a ciascun pozzetto della Fila A, contenente il campione di latte.
- Riavviare lo strumento per completare il ciclo di estrazione.
- Verificare la qualità e la purezza del DNA batterico estratto utilizzando il fluorimetro “*Qubit*” e lo spettrofotometro “*Nanodrop*”.

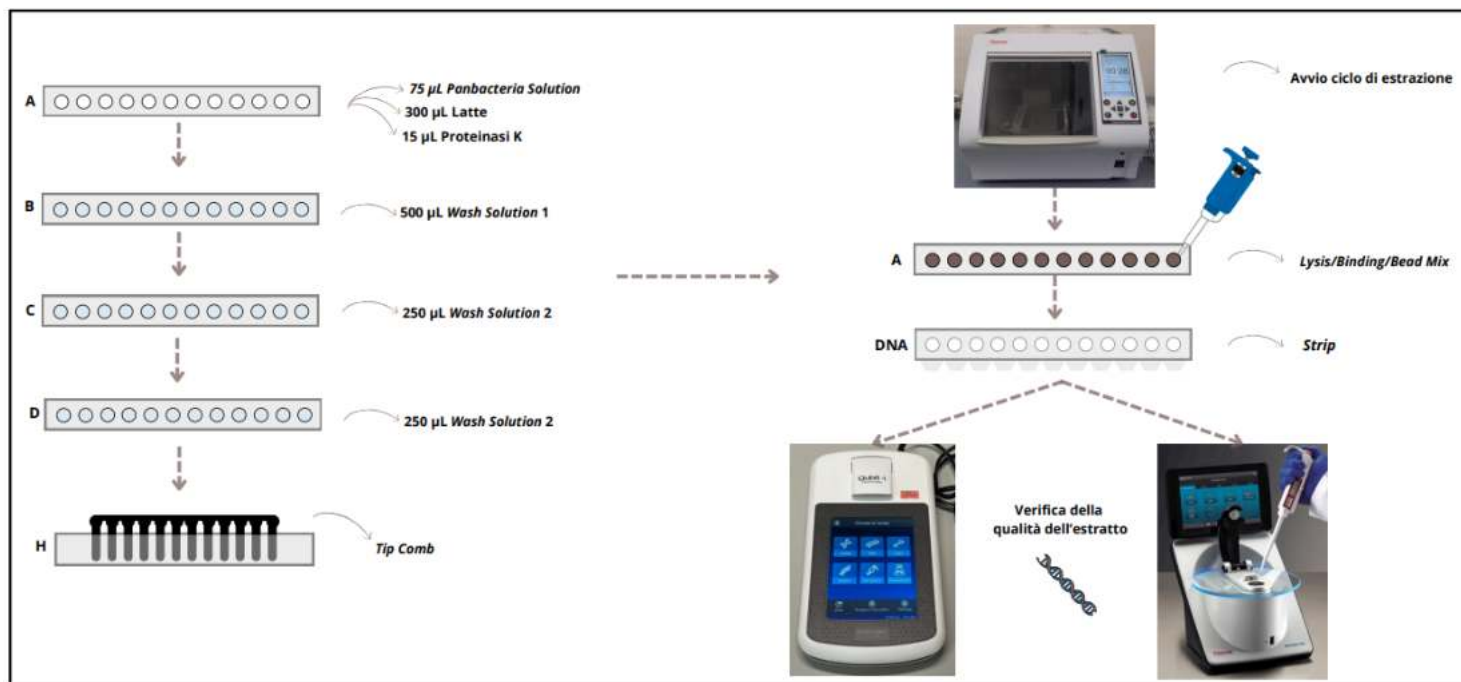


Figura 5. Workflow di estrazione

Nel dettaglio, in **Figura 6** viene illustrato graficamente il preciso schema di caricamento della piastra monouso che deve essere collocata nell'estrattore.

La piastra per l'estrazione automatizzata è costituita da 8 file (A-H), costituite da 12 pozzetti ciascuna.

Come da immagine, nella fila A viene aliquotato il campione di latte crudo tal quale insieme a due reagenti, che sono rispettivamente:

- *Panbacteria Solution*: una soluzione di lisi contenente detergenti anionici che coadiuvano la rottura delle membrane delle cellule batteriche, liberando l'acido nucleico intracellulare senza danneggiarlo.
- *Proteinasi K*: un enzima proteolitico che digerisce una vasta gamma di proteine, principalmente le nucleasi, in grado di frammentare e degradare il DNA.

Nella fila B, viene aggiunto il primo *buffer* di lavaggio (*Wash Solution 1*), costituito da un *mix* di soluzioni in grado di rimuovere i contaminanti presenti nel campione, che potrebbero potenzialmente interferire con la qualità e la quantità del DNA estratto.

Nelle file C e D viene addizionato il secondo *buffer* di lavaggio (*Wash Solution 2*), al fine di rimuovere eventuali impurità residue dal precedente lavaggio.

Infine, a livello dell'ultima fila H viene inserito una "*Tip Comb*", che permette allo strumento di effettuare sia la separazione del DNA legato alle impurità presenti, che il trasferimento delle soluzioni fra i diversi pozzetti della piastra, nelle fasi di attiva estrazione e purificazione del campione.

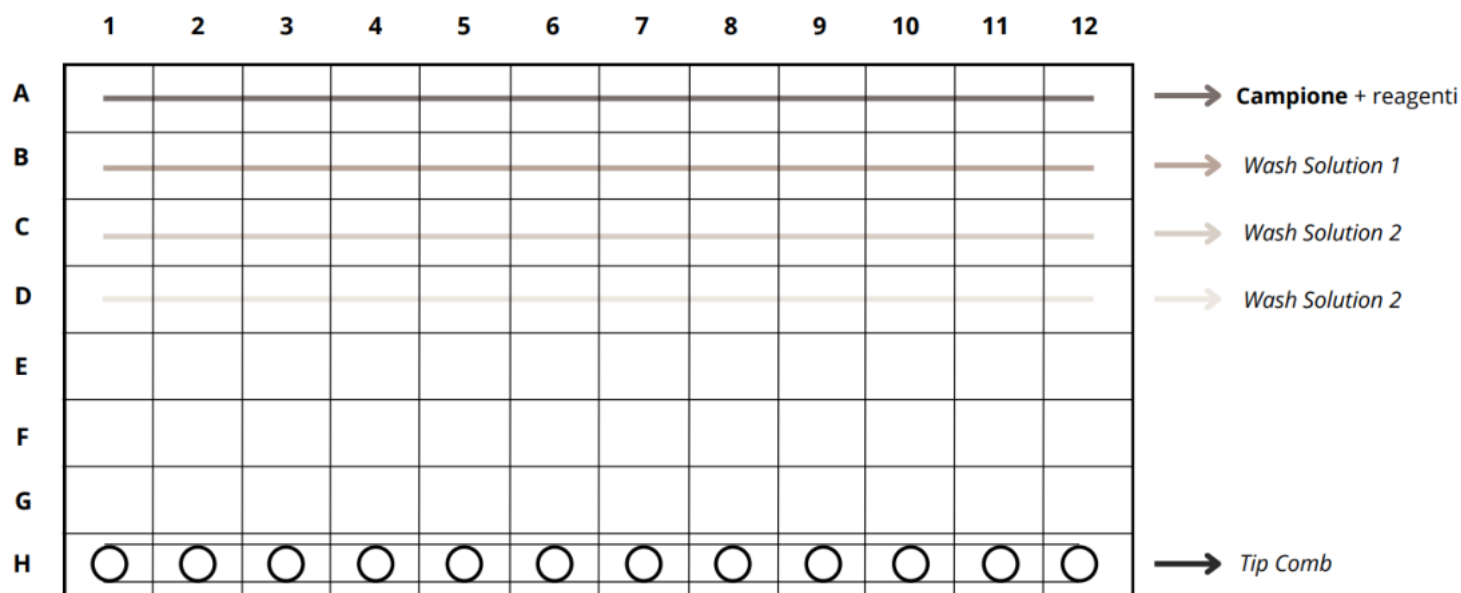


Figura 6. Illustrazione grafica del sistema di caricamento dei pozzetti nella piastra

Durante la stesura del protocollo sperimentale sono state effettuate delle scelte operative, basate sulla necessità di ottenere un'elevata quantità e qualità del DNA isolato ed estratto, partendo da una matrice biologica complessa come il latte.

Quest'ultimo infatti è ricco di sostanze nutrienti, quali proteine, lipidi e carboidrati, che possono ostacolare i processi di estrazione e purificazione dell'acido nucleico dalle cellule batteriche.

Per mitigare queste problematiche è stato adattato il volume del campione e dei reagenti da aliquotare nei pozzetti della piastra. In particolare, si è deciso di:

- Portare a 300 μ L il volume del campione di latte che deve essere addizionato a ciascun pozzetto della fila A. Questo consente di incrementare la concentrazione batterica e di conseguenza la quantità di DNA che può essere estratto.

- Distribuire equamente il volume totale di 500 μ L di *Wash Solution 2* nelle File C e D. Questo permette di effettuare un lavaggio più accurato delle impurità presenti nel campione.

Nei primi sei minuti di estrazione la *Tip Comb* si sposta a livello della fila A e oscillando verticalmente ad elevata velocità, mescola la soluzione contenente il campione e i reagenti di lisi. Questi ultimi attivandosi, degradano le membrane delle cellule batteriche liberando il DNA intracellulare.

Al termine di questa fase viene addizionata al campione, contenuto in ciascun pozzetto della fila A, una soluzione di lisi, denominata "*Lysis/Binding/Bead Mix*".

Questa viene preparata con anticipo e arricchita di biglie magnetiche in grado di coadiuvare la rottura meccanica delle membrane cellulari e il legame del DNA batterico libero in soluzione.

Dopo il caricamento della soluzione di lisi contenente le biglie magnetiche, lo strumento viene riavviato e inizia il vero e proprio processo di purificazione del DNA estratto, mediante le due soluzioni di lavaggio.

3.1.4.2 Verifica della qualità e della quantità del DNA estratto

Il ciclo di estrazione e purificazione dura circa 30 minuti, dopodiché l'estrattore si arresta automaticamente.

A questo punto è possibile prelevare dallo strumento la *strip* contenente le soluzioni di DNA isolato da ciascuno dei dodici pozzetti della fila A, per sottoporle ad un doppio controllo di qualità.

Nello specifico i primi undici pozzetti (numerati da 1 a 11) sono riservati ai campioni di latte, mentre il dodicesimo pozzetto (12) funge da "controllo negativo", composto da acqua *Milli-Q* alla quale vengono aggiunti gli stessi reagenti utilizzati per trattare i campioni.

Per la fase di verifica *post*-estrazione si utilizzano due strumenti, che sono rispettivamente:

- Il "*Qubit*", un fluorimetro utile per misurare la concentrazione di acido nucleico estratto.
Il fluoroforo, legandosi al DNA forma un complesso capace di emettere fluorescenza quando eccitato da una specifica lunghezza d'onda (λ) di luce.

L'intensità della fluorescenza emessa viene misurata dallo strumento ed è proporzionale alla concentrazione di DNA presente.

Il protocollo originale prevedeva la diluizione di 1 μL di campione in 199 μL di acqua. Tuttavia, poiché il latte è una matrice considerabile quasi sterile, si è deciso di adattare il metodo, per migliorare la sensibilità e la precisione della misurazione. Pertanto, il volume del campione è stato aumentato a 2 μL e quello del diluente è stato ridotto a 198 μL . Quest'ultimo, denominato "*Working Solution*" è costituito dal reagente di quantificazione e da un tampone di reazione.

L'adattamento del protocollo consente di ottenere una maggiore concentrazione di acido nucleico batterico nella soluzione finale, amplificando il segnale.

- Il "*Nanodrop*", uno spettrofotometro che, oltre a quantificare il DNA presente nell'estratto, è in grado di stimarne anche la purezza.

Per eseguire la lettura, un piccolo volume di campione, pari a 1 μL , viene aliquotato direttamente sulla superficie appositamente adibita dello strumento.

Questo sfrutta la spettrofotometria per rilevare l'assorbanza del DNA ad una specifica lunghezza d'onda (λ) e fornisce simultaneamente diversi *output*:

- Concentrazione in $\text{ng}/\mu\text{L}$ del DNA estratto, sulla base dell'assorbanza a 260 nm.
- Rapporto 260/280, fornisce informazioni sulla purezza del campione di acidi nucleici.

Idealmente il valore dovrebbe essere maggiore di 1.80 per poter considerare il DNA isolato "puro", scongiurando la presenza di impurità proteiche.

- Rapporto 260/230, è un altro indicatore di purezza dell'estratto. Minore è il suo valore e maggiore è la presenza di contaminanti nel campione di acidi nucleici, che potrebbero potenzialmente interferire con le applicazioni successive.

Sebbene il *Nanodrop* sia utile per stime rapide e per la verifica della purezza del DNA, non è il metodo ideale per una quantificazione accurata. Questo perché è in grado di

rilevare anche sequenze di DNA frammentate o parzialmente degradate, il che può portare a una sovrastima della concentrazione di acido nucleico.

3.2 LATSAN

3.2.1 Il progetto LATSAN: Integrazione multi-omica per l'identificazione di biomarcatori di mastite subclinica

La seconda metà del presente elaborato è stata condotta sulla base di un progetto di ricerca più ampio, denominato “LATSAN”, e coordinato dal Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse naturali e Ambiente (DAFNAE) dell'Università degli Studi di Padova, in collaborazione con: il Dipartimento di Medicina Animale Produzioni e Salute (MAPS), l'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVE) e l'Associazione Regionale Allevatori Veneto (ARAV).

Il disegno sperimentale del progetto LATSAN (**Figura 7**) nel suo complesso mirava ad investigare la mastite subclinica con diversi approcci sia fenotipici che molecolari, per lo sviluppo di strumenti innovativi utili a migliorare lo stato di salute della bovina da latte e la qualità del latte.

Sulla base di uno studio di prevalenza condotto dall'IZSVE, riguardante i microrganismi patogeni maggiormente impattanti in termini di mastite, quali: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. uberis* e *Prototheca spp.*, sono state selezionate nella regione Veneto 3 aziende, da cui sono state campionate un totale di 450 bovine di razza Frisone Italiana.

Con il latte raccolto sono state effettuate:

- Analisi di composizione (grasso, proteina, urea, ecc.), predizioni della conta cellulare (SCC, DSCC) da parte dell'ARAV.
- Analisi della resa casearia e delle proprietà coagulative, all'interno del laboratorio caseario di DAFNAE.
- Analisi microbiologiche, nei laboratori dell'IZSVE.

Oltre alle comuni analisi fenotipiche, sono state effettuate anche analisi molecolari multi-omiche sulle matrici biologiche raccolte da una sola delle tre aziende campionate.

L'allevamento in questione è stato selezionato sulla base della presenza contemporanea e accertata dallo *screening* batteriologico, di due specifici microrganismi patogeni coinvolti nell'insorgenza della mastite subclinica:

- *Prototheca spp.*, è un'alga unicellulare microscopica di origine ambientale, il cui meccanismo molecolare d'azione a livello di ghiandola mammaria rimane ancora poco studiato e conosciuto. In Italia, la prevalenza media di questo microrganismo nelle mandrie da latte è stimata essere dell'11.2% (Shave *et al.*, 2021).

Le bovine affette da mastite cronica prototecale eliminano ad intermittenza ingenti quantità di microalghe, complicando ulteriormente la diagnosi, che è di principio difficoltosa per via dell'assenza di segni clinici evidenti nella forma subclinica (Arrigoni *et al.*, 2010).

Prototheca spp. viene oggi considerata una minaccia emergente nel settore lattiero-caseario, in quanto si è dimostrata essere resistente alle terapie antibiotiche intramammarie; per questo motivo è necessario adottare un piano di prevenzione robusto ed efficace, che preveda la costante applicazione di corrette pratiche operative e condizioni adeguate di stabulazione degli animali in allevamento (Locatelli *et al.*, 2014).

- *S. agalactiae*, è un batterio Gram-positivo il cui *reservoir* di elezione è rappresentato dalla ghiandola mammaria della bovina.

Come riportato in letteratura, generalmente un singolo ceppo è il responsabile dell'insorgenza delle infezioni subcliniche contagiose, il che giustifica il numero limitato di studi sistematici di genotipizzazione condotti fino ad oggi allo scopo di comprenderne le caratteristiche biomolecolari e stimarne la prevalenza (Zadoks *et al.*, 2011).

In Italia, infatti, solo Emilia-Romagna e Lombardia hanno condotto studi di epidemiologia molecolare circa la presenza di questo patogeno contagioso nelle mandrie da latte e i risultati hanno comprovato una prevalenza significativa, intorno all'8% (Sora *et al.*, 2022).

Per gli studi di natura molecolare è stato previsto uno *screening* iniziale degli animali, volto a diminuire il più possibile le fonti di variazione che avrebbero potuto influenzare i risultati del lavoro. In particolare, sono state escluse dal *trial* le bovine primipare e quelle che si trovavano nella fase di picco della lattazione.

I criteri di selezione adottati sono giustificati dal fisiologico aumento della richiesta energetica e dalla contemporanea riduzione dell'assunzione di mangime all'inizio della lattazione.

Questi fattori potrebbero portare a una condizione di bilancio energetico negativo, che può anche influire anche sulla corretta attivazione del metabolismo delle cellule immunitarie in risposta all'invasione dei patogeni (Bisutti *et al.*, 2023).

Inoltre, sono state escluse tutte le bovine con segni clinici evidenti di infezione e trattate con terapie antibiotiche.

Per gli animali selezionati sulla base di questi criteri sono state raccolte diverse aliquote di latte con le quali si sono svolti studi di trascrittomica, epigenomica, peptidomica, *metabarcoding* e metabolomica, per esaminare la risposta dell'animale all'infezione intramammaria.

Inoltre, mediante immuno-cito-fluorimetria (collaborazione con BCA) è stata valutata la distribuzione delle diverse popolazioni leucocitarie negli animali negativi, positivi per *S. agalactiae* e per *Prototheca spp.* Lo studio ha evidenziato che negli animali positivi per *Prototheca spp.* la risposta immunitaria indotta sembrava essere più di tipo adattativa cellulo-mediata, con una maggiore presenza di linfociti T, volta a prevenire l'infezione intramammaria; mentre per *S. agalactiae* è stata evidenziata una risposta immunitaria innata, data dalla maggiore presenza di cellule polimorfonucleate e macrofagi (Pegolo *et al.*, 2022).

Per il presente elaborato di tesi, utilizzando i dati ottenuti dalle analisi multi-omiche svolte per il progetto di ricerca *LATSAN*, è stato condotto uno studio bioinformatico integrativo di dati epigenomici e trascrittomici, con l'obiettivo di individuare potenziali biomarcatori informativi in grado di discriminare gli animali sani da quelli affetti da mastite subclinica.

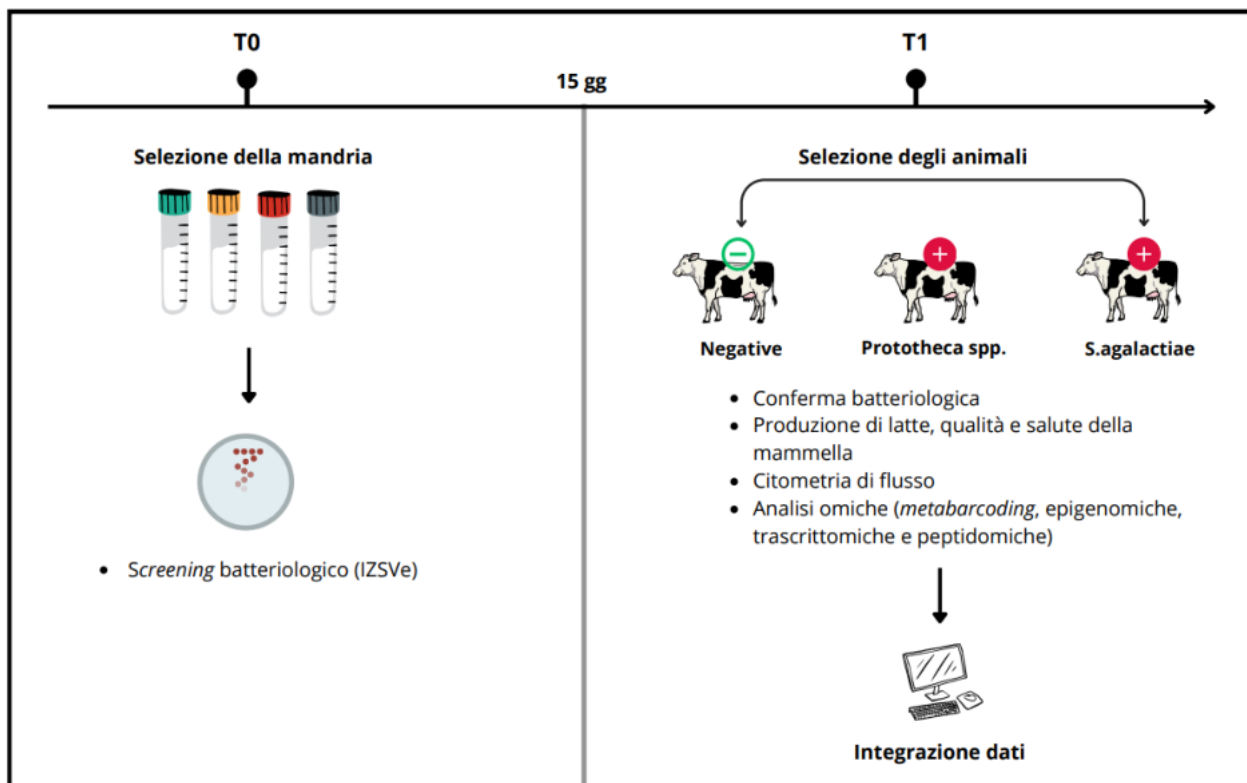


Figura 7. Disegno sperimentale del progetto LATSAN

3.2.2 Derivazione del profilo trascrittomico ed epigenomico dell'ospite

Le informazioni trascrittomiche ed epigenomiche relative all'ospite e necessarie per l'analisi statistica integrativa sono state ottenute mediante un *workflow* sperimentale specifico, adattato e ottimizzato *ad hoc* per le rispettive scienze omiche.

Come riportato in **Figura 8**, poiché la trascrittomica e l'epigenomica studiano aspetti differenti della biologia cellulare, le tecniche e le metodologie utilizzate sono specifiche per ogni disciplina.

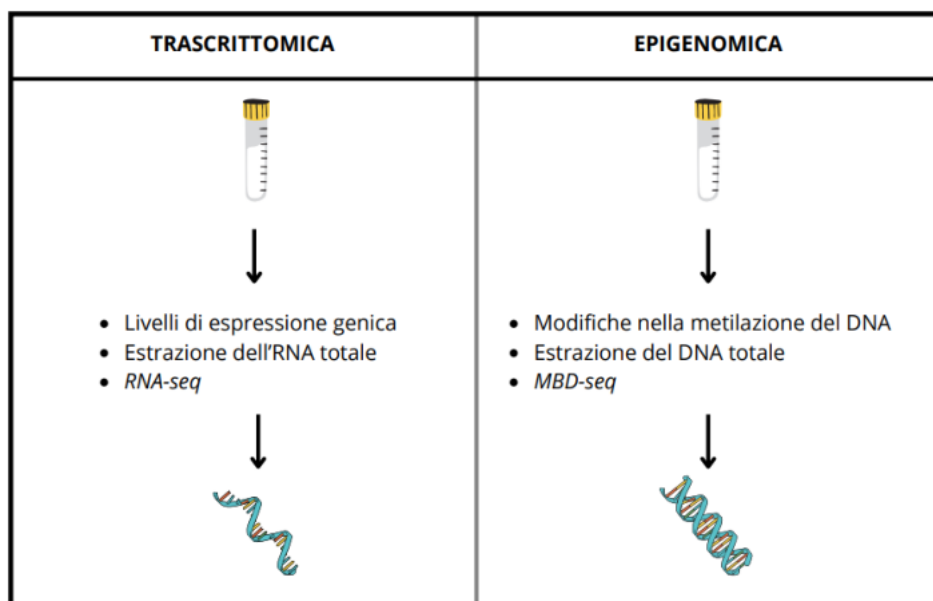


Figura 8. Confronto fra metodologie nelle discipline trascrittomiche ed epigenomiche

3.2.2.1 Profilo trascrittomico dell'ospite

Per lo studio relativo alla trascrittomica, come dettagliatamente riportato dal lavoro di Bisutti *et al.* (2023), il metodo prevede una serie di passaggi fondamentali che includono:

- Estrazione dell'RNA dalla popolazione leucocitaria (SCC) presente nel latte: le cellule somatiche sono state isolate da ciascuna aliquota di campione mediante centrifugazione a 2.000 x g per 10 minuti a 4°C.

Il surnatante, compreso lo strato di grasso formatosi in superficie, è stato scartato, mentre il *pellet* cellulare è stato lavato con una soluzione di PBS (pH 7.2).

Successivamente, i campioni sono stati sottoposti a una seconda centrifugazione a 1.500 x g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato nuovamente scartato, mentre il *pellet* cellulare è stato risospeso in 800 µL di *Trizol* e conservato a -80 °C.

Infine, l'RNA totale è stato isolato utilizzando il reagente *Trizol* e successivamente purificato con un *kit NucleoSPin miRNA*. La concentrazione e la qualità dell'RNA sono state valutate con il *Bioanalyzer Agilent 2100*. L'RNA estratto è stato conservato a -80 °C fino all'utilizzo.

- Preparazione delle librerie: i 31 campioni di RNA, suddivisi come segue:
 - gruppo di controllo (n=9);

- campioni positivi per *S. agalactiae* (n=11);
- campioni positivi per *Prototheca* (n=11);

sono stati inviati alla struttura di Nuova Genetica Italiana (NGI, Como, Italia) per la preparazione delle librerie e il sequenziamento.

Per massimizzare le *reads* informative durante il sequenziamento, eliminando l'rRNA ribosomiale, è stato impiegato il kit *MGIEasy rRNA Depletion V1.1* (MGI Tech Co., Ltd., Shenzhen, Cina).

La preparazione delle librerie *RNA-seq* è stata effettuata partendo da 500 ng di RNA totale, utilizzando il kit *MGIEasy RNA Library Prep Set V3.1* (MGI Tech Co., Ltd., Shenzhen, Cina), seguendo il protocollo del produttore.

Infine, il sequenziamento *RNA-seq* è stato eseguito su una piattaforma DNBSEQ-G400 ad alta capacità (MGI Tech Co., Ltd.), impiegando un approccio *paired-end* e utilizzando il kit di sequenziamento DNBSEQ-G400 (MGI Tech Co., Ltd., Shenzhen, Cina).

- Elaborazione e analisi dei dati di *RNA-seq*. La fase preliminare di *pre-processing* dei dati prevede:
 - Controllo qualità delle sequenze di RNA, mediante il *software FastQC*.
 - *Trimming*: le *clean reads* sono state ottenute rimuovendo le basi di bassa qualità e gli adattatori, tramite il *software TrimGalore*. Questo passaggio ha permesso di ottenere sequenze più accurate.
 - Allineamento delle sequenze di RNA: le *clean reads paired-end* sono state allineate al genoma di riferimento del *Bos taurus* (ARS-UCD1.2) dell'*USDA's Agricultural Research Service*, utilizzando il *software STAR*, con capacità di *splicing*. Questa fase consente la determinazione della posizione delle *reads* sul genoma di riferimento.
 - Quantificazione dei livelli di espressione genica, a partire dai dati di sequenziamento *RNA-seq*. La quantificazione è stata effettuata utilizzando il *software RNA-Seq by Expectation-Maximization (RSEM)*.

Inizialmente, RSEM ha preparato i *file* indicizzati del genoma, impiegando il genoma di riferimento e i *file* di annotazione genica in formato GTF (*Gene Transfer Format*). Successivamente, RSEM ha utilizzato questi *file* indicizzati insieme alle *reads* mappate dal *software* di allineamento, per stimare i livelli di espressione di ciascun gene.

- Normalizzazione dei dati e filtraggio dei conteggi. Questi passaggi sono stati eseguiti utilizzando il *software R Studio*. Inizialmente, la matrice dei conteggi del trascrittoma è stata normalizzata in base alla profondità di sequenziamento di ciascun campione.

Per confrontare i livelli di espressione genica tra campioni con diverse profondità di sequenziamento, sono stati calcolati i conteggi per milione (CPM). Successivamente, è stato necessario filtrare i geni per rimuovere quelli con bassa espressione. Questo filtraggio è stato eseguito utilizzando i pacchetti *edgeR* e *DESeq2*, con l'obiettivo finale di escludere i geni poco informativi e migliorare la qualità dell'analisi successiva.

- Analisi dei geni differenzialmente espressi (DEG): questa valutazione si riferisce all'identificazione di geni che presentano un livello di espressione significativamente distinto fra più condizioni sperimentali (Reiner *et al.*, 2003).

Questa analisi è stata svolta utilizzando il *software R Studio*, con i pacchetti *DESeq2* e *edgeR* al fine di identificare potenziali biomarcatori comuni tra infezioni causate da patogeni mastitogeni diversi.

Le comparazioni effettuate sono state: i) animali negativi vs. naturalmente infetti da *S. agalactiae*; ii) soggetti non infetti vs. infetti da *Prototheca spp.*; iii) individui infetti da *S. agalactiae* vs. infetti da *Prototheca spp.*; iv) individui sani vs malati (a prescindere dal microorganismo).

3.2.2.2 Profilo epigenomico dell'ospite

Per quanto riguarda la determinazione delle informazioni epigenomiche dell'ospite, il metodo, come dettagliatamente riportato dal lavoro di Giannuzzi *et al.* (2023), prevede una serie di passaggi fondamentali, inclusi:

- Estrazione del DNA dalle SCC del latte: Un'aliquota di 50 mL di ciascun campione è stata centrifugata inizialmente a $500 \times g$ per 10 minuti a 4°C . Dopo aver eliminato lo strato di grasso e il surnatante, il *pellet* cellulare è stato lavato con 50 mL di PBS (pH 7,2).

Successivamente, i campioni sono stati centrifugati nuovamente a $1.500 \times g$ per 10 minuti a 4°C ; il surnatante è stato eliminato e il *pellet* cellulare è stato conservato a -80°C fino all'estrazione del DNA.

Il DNA genomico è stato isolato dal *pellet* utilizzando il kit commerciale *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel, Düren, Germania), seguendo il protocollo del produttore, e una digestione con proteinasi K effettuata durante la notte. La qualità del DNA è stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio, mentre la concentrazione del DNA è stata quantificata utilizzando *PicoGreen* (Thermo Fisher, Waltham, MA).

- Preparazione delle Librerie e Sequenziamento: Circa 200 ng di DNA genomico per ciascun campione sono stati sottoposti a sonicazione utilizzando lo strumento *Covaris S220* (Covaris, Woburn, MA), per ottenere frammenti di DNA di dimensioni comprese tra 300 e 350 bp.

Successivamente, il DNA è stato arricchito per i domini di legame alla metilazione (MBD) utilizzando il *MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguendo il protocollo del produttore.

La preparazione delle librerie è stata effettuata con il *TruSeq Nano Library Preparation Kit* (Illumina, San Diego, CA). Successivamente, sono state quantificate e controllate per qualità con il *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), impiegando l'*High Sensitivity DNA Kit* (Agilent Technologies).

Infine, le librerie sono state sequenziate su un'*Illumina HiSeq X* (Macrogen, Seoul, Repubblica di Corea), che ha prodotto *reads* accoppiate di 150 basi, assicurando così una mappatura di alta precisione dei frammenti di DNA.

- Identificazione delle regioni metilate differenzialmente (*Differentially Methylated Regions*, DMR): questa fase dell'analisi bioinformatica si basa sull'individuazione di regioni genomiche caratterizzate da variazioni significative nella metilazione del DNA, che, nelle infezioni da *S. agalactiae* e *Prototheca spp.*, sono correlabili alla risposta immunitaria di base dell'animale.

Le differenze nei livelli di metilazione tra due condizioni sono state considerate significative sulla base di un *False Discovery Rate* (FDR) < 0,05.

Le regioni differenzialmente metilate possono essere localizzate in diverse aree del genoma, come introni, esoni o regioni promotoriali.

Quando una regione metilata differenzialmente si sovrapponeva a più di un gene, è stata stabilita una priorità per attribuire la regione ai geni.

In questi casi, è stata data priorità al gene più vicino al promotore della regione metilata, poiché le regioni promotoriali sono direttamente coinvolte nella regolazione dell'espressione genica.

Da questa valutazione sono state individuate diverse regioni differenzialmente metilate, associate a promotori genici.

Per semplificare l'interpretazione dei risultati e comprendere in che modo le modifiche epigenetiche siano coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria, le regioni promotoriali identificate sono state mappate su geni noti e consultabili su *database* pubblici (*i.e* *Ensembl*).

3.2.3 Integrazione multi-omica

I profili trascrittomici ed epigenomici evidenziati nei lavori di Bisutti *et al.* (2023) e Giannuzzi *et al.* (2023), sono stati utilizzati per l'approccio di analisi integrativa multi-omica. In particolare, sono stati selezionati 681 geni differenzialmente espressi e 678 regioni differenzialmente metilate, considerate come potenzialmente informative per acquisire maggiori informazioni sulla risposta immunitaria dell'animale all'infezione.

A livello pratico, l'analisi statistica integrativa è stata condotta utilizzando l'algoritmo di integrazione "*DIABLO*" (*Data Integration Analysis for Biomarker Discovery Using Latent Components*) del pacchetto R *mixOmics* (Rohart et al., 2017).

L'approccio pluridisciplinare è stato scelto perché consente di esplorare le complesse e interdipendenti relazioni tra i diversi livelli di regolazione molecolare, offrendo una visione olistica e approfondita dei meccanismi che agiscono in sinergia per modulare i sistemi biologici. Inoltre, questa metodologia coadiuva lo sviluppo di modelli predittivi robusti e accurati per la rilevazione della patologia nella sua forma subclinica.

Inoltre, sono state considerate le popolazioni leucocitarie del latte (leucociti, PMN, macrofagi, linfociti B, T-citotossici, T-*helper*), determinate tramite cito-fluorimetria dal dipartimento BCA (Biomedicina Comparata e Alimentazione) dell'Università degli Studi di Padova.

Queste ultime sono state incluse nella valutazione per via della loro rilevanza immunitaria. Infatti, il DNA e l'RNA utilizzati durante il presente lavoro sperimentale sono stati estratti a partire dalle cellule somatiche del latte, i cui valori tendono ad aumentare significativamente in termini di numerosità, durante i processi di flogosi a carico della ghiandola mammaria.

L'approccio utilizzato prevede lo studio delle relazioni esistenti fra le seguenti categorie di variabili, che per semplicità sono state definite:

- "*genes*": corrisponde ai geni differenzialmente espressi;
- "*met*": corrisponde alle regioni differenzialmente metilate;
- "*IS*": corrisponde alle popolazioni leucocitarie (*Immune System*);

Inoltre, per ciascuna di esse sono state estrapolate le variabili considerate maggiormente informative per la determinazione dello *status* di infezione dell'animale. In ultimo, sono state valutate le correlazioni esistenti tra tutte le variabili considerate, utilizzando una *threshold* di $r > |0.9|$.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 MASTITOMIC

Considerando i risultati dell'analisi batteriologica condotta dall'IZSve, per i tre tempi di campionamento T0, T1 e T2 (**Tabella 2**), si evince che *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) è il microrganismo patogeno maggiormente presente sia a livello di singolo quarto che di animale.

In Italia, un'indagine di prevalenza condotta su 150 allevamenti distribuiti su tutta la penisola ha dimostrato che questo batterio è caratterizzato da una frequenza di isolamento dal latte di singolo quarto del 59% durante i casi di mastite subclinica (Zecconi & Zanirato, 2013).

Oltre a *S. aureus*, fra gli agenti causali della mastite bovina, si annoverano: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*), *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) e *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*) (Oliver *et al.*, 2011).

S. uberis e *S. dysgalactiae* sono batteri ubiquitari del genere *Streptococcus* e vengono comunemente riscontrati nelle zone di elevata concentrazione fecale, come le lettiere di allevamenti dotati di scarse misure igienico-sanitarie.

Nonostante la loro natura ambientale, possono comportarsi come patogeni contagiosi, causando infezioni principalmente nel periodo di tempo compreso fra le due settimane prima e dopo il parto, quando le difese immunitarie delle bovine sono depresse e maggiormente suscettibili all'attacco dei patogeni (Constable *et al.*, 2016; Lundberg *et al.*, 2014).

Per lo *screening* batteriologico sono stati valutati anche i cosiddetti "patogeni minori", che, secondo studi bibliografici, sono considerati meno significativi nell'insorgenza di mastite poiché causano reazioni meno gravi rispetto ai microrganismi principali e generalmente l'infezione rimane subclinica.

Tra questi agenti ambientali, *Staphylococcus coagulans* negativo (CNS) è quello più frequentemente isolato dal latte bovino in diversi paesi (Pyörälä *et al.*, 2009).

Come riportato dalla matrice di dati, nell'intervallo di tempo compreso fra i campionamenti T1 e T2, si è verificato un aumento del numero delle bovine che si sono positivate per *S. dysgalactiae* e per i microrganismi ambientali minori.

Il peggioramento dello stato batteriologico delle ghiandole mammarie può essere attribuito a diverse cause, quali:

- L'instaurazione di condizioni di stabulazione ideali, in termini di umidità relativa (UR) e temperatura (T°), per la proliferazione degli agenti mastitogeni.
- L'errata applicazione delle corrette pratiche igieniche e operative durante i processi di mungitura, che favorisce la diffusione dei patogeni fra gli individui della mandria.
- L'introduzione di fattori di stress, come variazioni della razione o comportamenti non idonei da parte del personale aziendale, che influenzano negativamente le difese immunitarie delle bovine, rendendole più suscettibili alle infezioni intramammarie.
- Le caratteristiche individuali di contagiosità dei patogeni che migrano dai quarti di bovine infette a quelli di bovine sane.
- L'utilizzo improprio di terapie antimicrobiche, che favoriscono l'instaurarsi di fenomeni di antibiotico-resistenza (AR).
- Infine, l'assenza di un corretto piano di prevenzione, monitoraggio e gestione delle infezioni.

Tabella 2. Numero degli animali e dei quarti positivi all'esame batteriologico, nei tempi di campionamento T0, T1, T2.

	RISULTATI BATTERIOLOGICI											
	T0				T1				T2			
	N° animali	% ¹	N° quarti	% ²	N° animali	% ¹	N° quarti	% ²	N° animali	% ¹	N° quarti	% ²
Totale animali e quarti	350	-	1362	-	86	-	335	-	81	-	314	-
Totale positivi	37	10.57	50	3.67	27	31.40	37	11.04	28	34.57	41	13.06
<i>S. aureus</i>	26	7.43	39	2.86	23	26.74	33	9.85	23	29.63	34	10.83
<i>S. dysgalactiae</i>	6	1.71	6	0.44	1	1.16	1	0.30	3	3.70	5	1.59
<i>S. uberis</i>	5	1.43	5	0.37	3	3.49	3	0.90	2	2.47	2	0.64
Patogeni ambientali minori*	278	79.43	-	-	44	51.16	-	-	54	66.67	-	-
¹ Percentuale degli animali risultati positivi sul totale degli animali campionati ² Percentuale dei quarti risultati positivi sul totale dei campioni analizzati per singolo quarto												
<i>*Streptococcus spp., Staphylococcus spp., Acinetobacter spp. Staphylococcus chromogenes, Aerococcus viridans, Proteus spp., Serratia spp., Enterococcus, Klebsiella spp., Serratia marcescens, Bacillus, Staphylococcus coagulans negativo, Corynebacterium spp., Enterobacteriaceae, Lactococcus, E.coli.</i>												

Un'analisi più approfondita dello stato batteriologico delle bovine, ai tempi di campionamento T0, T1, T2 (**Tabella 3**), rivela differenze significative nell'andamento della positività, in particolare:

- 1) Una bovina che risultava negativa al tempo di campionamento T0 per i patogeni mastitogeni di interesse sperimentale ha sviluppato positività nell'intervallo di tempo compreso fra T0 e T1, mantenendo successivamente uno stato batteriologico invariato al tempo T2.

- 2) Tre bovine, che risultavano positive al tempo di campionamento T0 per i patogeni mastitogeni di interesse sperimentale, si sono negativizzate nell'intervallo di tempo compreso fra T0 e T1, per poi tornare nuovamente positive al tempo T2.

Questo fenomeno si ipotizza possa essere dovuto alle caratteristiche epidemiologiche di *S. aureus*.

Infatti, questo patogeno è in grado di evadere la risposta immunitaria innata e acquisita dell'animale ospite, grazie all'espressione di specifiche proteine di superficie e all'attuazione di diversi meccanismi di evasione (Campos *et al.*, 2022).

Di conseguenza, può manifestare una patogenesi dell'infezione definita "intermittente", caratterizzata da periodi alternati ed incostanti di presenza e assenza del batterio, che giustificano la sua variabilità nella capacità di eludere il sistema immunitario e di persistere nella ghiandola mammaria dell'ospite.

- 3) Sei bovine, che risultavano positive al tempo T0 per i patogeni mastitogeni di interesse sperimentale, si sono negativizzate nell'intervallo di tempo compreso fra T0 e T1, con risoluzione dell'infezione e mantenimento di uno stato batteriologico invariato al tempo T2.
- 4) Una singola bovina che risultava negativa al tempo T0 per i patogeni mastitogeni di interesse sperimentale ha mantenuto uno stato batteriologico invariato al tempo T1, per poi positivizzarsi nell'intervallo di tempo compreso fra T1 e T2.
- 5) Infine, 23 bovine, che risultavano positive al tempo T0 per i patogeni mastitogeni di interesse sperimentale, hanno mantenuto la positività anche nei successivi tempi T1 e T2.

Tabella 3. Andamento della positività, relative all'esame batteriologico, ai tempi di campionamento T0, T1, T2

N° aziendale	STATO BATTERIOLOGICO		
	T0	T1	T2
2582	+	-	-
2891	+	+	-
3129	+	+	+
3226	+	+	+
3232	+	+	+
3251	+	+	+
3265	+	+	+
3305	-	+	+
3334	+	+	+
3491	+	+	+
3508	+	+	+
3558	+	-	-
3571	+	+	+
3593	+	+	+
3622	+	-	+
3649	+	+	+
3650	+	-	-
3651	+	-	-
3699	+	+	+
3721	+	+	+
3764	+	-	+
3766	+	+	+
3971	+	+	+
4021	+	+	+

4104	+	+	+
4227	+	-	-
4253	+	+	+
4265	+	+	+
4275	+	-	-
4317	+	+	+
4325	-	-	+
4360	+	+	+
4374	+	+	+
4476	+	+	+
4599	+	-	+

Le **Tabelle 4 e 5** mostrano le medie dei risultati relativi alla qualità e alla quantità del DNA batterico estratto dai campioni di latte nei due tempi T1 e T2.

Si nota che i valori medi dei rapporti di assorbanza 260/280, misurati utilizzando il *Nanodrop* sono costantemente inferiori a 1.80, suggerendo una potenziale contaminazione proteica. Questo risultato è plausibile considerando la naturale composizione del latte, una matrice biologica complessa, ricca di proteine, calcio e lipidi emulsionati in una soluzione acquosa. Questi componenti possono interagire in modo aspecifico con l'acido nucleico, alterando i risultati della valutazione qualitativa.

Inoltre, la qualità e la purezza dell'estratto possono variare in base alla quantità di DNA batterico presente nel campione, e al grado di lisi cellulare, il quale riflette la robustezza delle cellule batteriche (Cremonesi *et al.*, 2006).

Lo studio di Dibbern *et al.* (2015), relativo alla valutazione delle prestazioni di quattro metodi di estrazione del DNA da *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) nel latte di bovine affette da mastite subclinica, ha dimostrato che tutti i metodi impiegati producono un rapporto di assorbanza 260/280 inferiore a 1.80.

Oltre a quanto discusso, è evidente che i valori medi relativi alla qualità e alla quantità del DNA batterico estratto dai campioni di latte positivi all'esame batteriologico, nei due tempi T1 e T2, risultano superiori rispetto a quelli ottenuti analizzando i campioni negativi.

Questa osservazione è coerente con la presenza confermata di batteri patogeni nei campioni positivi, dove, data l'elevata densità cellulare, ci si attende un'estrazione quantitativamente maggiore.

Nei campioni negativi invece, la minore densità di cellule batteriche determina una minore quantità di estratto.

La differenza nella concentrazione di DNA batterico tra i campioni positivi e negativi può essere suggestiva della presenza o dell'assenza di un'infezione e riflette sia l'efficacia dell'esame batteriologico nel determinare la qualità microbiologica del latte, sia la sensibilità del metodo di estrazione impiegato.

Nella presente prova sperimentale, i campioni sono stati processati seguendo il protocollo *MagMAX CORE Mastitis & Panbacteria Module*, specifico per la rilevazione di DNA batterico nel latte, il che può giustificare l'alta concentrazione di acido nucleico estratto dai campioni positivi.

L'ipotesi che la qualità e la quantità di DNA batterico isolato siano significativamente influenzati dal protocollo di laboratorio utilizzato, viene ulteriormente corroborata da uno studio di Cremonesi *et al.* (2021). In questo elaborato, sono stati confrontati tre diversi metodi di estrazione, rivelando, come ci si attende, che i kit *NucleoSpin* e *DNeasy PowerFood*, comunemente impiegati per substrati di diversa natura, hanno mostrato una bassa efficienza nell'estrazione del DNA batterico da latte bovino.

Al contrario, l'applicazione di un protocollo specifico per la rilevazione di agenti patogeni nei campioni di latte ha prodotto la concentrazione più alta di DNA batterico, sebbene con un rapporto di assorbanza 260/280 inferiore.

Tabella 4. Valori medi relativi alla qualità e alla quantità del DNA batterico estratto dai campioni di latte al tempo T1

	<i>Nanodrop</i>			<i>Qubit</i>
	ng/μL	260/280	260/230	-
MEDIA TOTALE	19,39	1,47	0,42	2,11
MEDIA POSITIVI	28,18	1,58	0,55	3,93
MEDIA NEGATIVI	15,15	1,41	0,36	1,23

Tabella 5. Valori medi relativi alla qualità e alla quantità del DNA batterico estratto dai campioni di latte al tempo T2

	<i>Nanodrop</i>			<i>Qubit</i>
	ng/μL	260/280	260/230	-
MEDIA TOTALE	22,23	1,52	0,31	3,93
MEDIA POSITIVI	28,65	1,59	0,42	8,14
MEDIA NEGATIVI	18,83	1,49	0,26	1,71

4.2 LATSAN: integrazione multi-omica

Sebbene in un primo momento gli studi di trascrittomica ed epigenomica, svolti nel corso del progetto *LATSAN*, abbiano evidenziato alcune variazioni patogeno-specifiche nei geni differenzialmente espressi e nelle regioni differenzialmente metilate, un'analisi più approfondita ha rivelato che molti dei geni e delle regioni identificate erano coinvolti in *pathways* che attivano una risposta immunitaria comune dell'animale, a prescindere dal tipo di infezione, suggerendo quindi una reazione non correlata al patogeno coinvolto.

Per questo motivo, nello studio di integrazione multi-omica è stata prevista una comparazione effettuata solo tra individui sani vs animali malati (a prescindere dal microorganismo).

Dal punto di vista grafico, dall'unione di più *dataset*, sono risultati diversi *plot* di covariazione altamente informativi, in relazione alle elevate capacità discriminatorie delle categorie

“*genes*”, “*met*” e “*IS*” dell’algoritmo, nel distinguere gli animali positivi (malati) dai negativi (sani).

Nel primo grafico (**Figura 9**) è stata osservata la covariazione più forte tra:

- i geni differenzialmente espressi e le regioni differenzialmente metilate della mastite ($r=0.92$);
- le regioni differenzialmente metilate della mastite e le popolazioni di cellule immunitarie ($r=0.72$);
- i geni principali differenzialmente espressi della mastite e le popolazioni di cellule immunitarie ($r=0.78$);

Il livello di covariazione tra le diverse categorie considerate può variare nell’intervallo di valori compreso fra 0 e 1.

Un valore vicino a 1 suggerisce la presenza di una relazione diretta e stretta, come in questo caso. Di conseguenza, una variazione a carico di una delle due categorie potrebbe riflettersi similmente anche nell’altra, implicando la presenza di *pattern* molecolari condivisi.

Al contrario, un valore vicino a 0 presuppone un basso livello di correlazione.

Inoltre, per ciascuna categoria (*genes*, *met*, *IS*), si osserva una netta separazione tra gli insiemi blu e rosa. Questa divisione rispecchia l’elevata capacità discriminativa delle stesse categorie, che sono in grado di distinguere efficacemente le bovine sane (rosa) da quelle affette da mastite (blu).

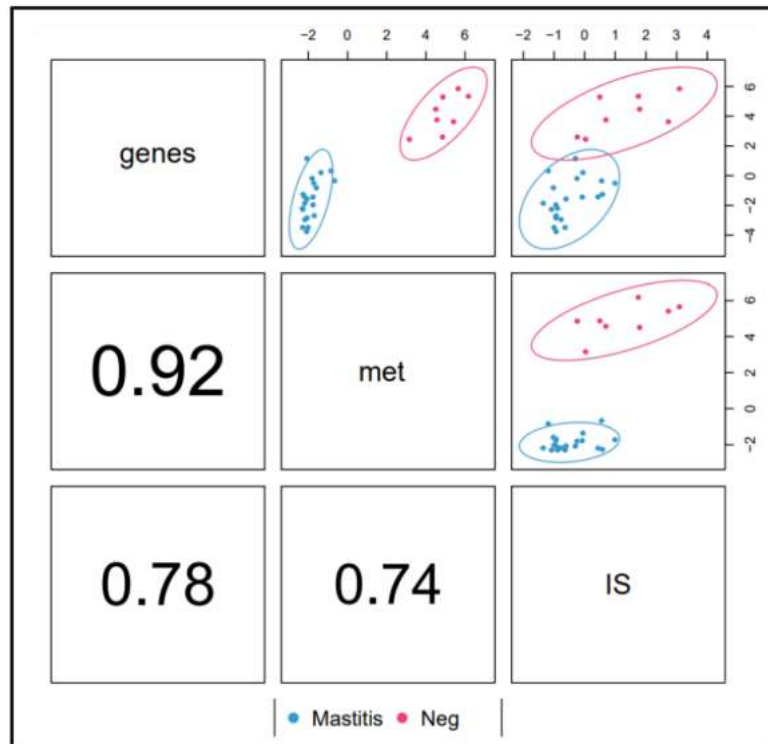


Figura 9. Grafico di integrazione delle informazioni trascrittomiche ed epigenomiche, ottenuto utilizzando l'algoritmo DIABLO

Una volta evidenziate le relazioni esistenti tra le diverse categorie di variabili, sono state investigate quelle che, all'interno di ogni categoria, risultavano essere potenzialmente più informative per la discriminazione dello *status* di infezione dell'animale.

In particolare, la **Figura 10** riporta i *top 20* DEGs selezionati dall'algoritmo.

Tra i geni sovraespressi, maggiormente informativi secondo l'algoritmo DIABLO, sono stati evidenziati:

- *PARM1* (*prostate androgen-regulated mucin-like protein 1*).

Lo studio di Cornet *et al.* (2003), riporta come la sovraespressione del gene *PARM1* nelle cellule epiteliali prostatiche di un gruppo sperimentale di ratti castrati, moduli l'espressione di geni secondari coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare.

In particolare, *PARM1* è un gene della risposta immunitaria innata, coinvolto nell'inibizione dell'apoptosi, principalmente durante la fertilità (Cochran *et al.*, 2013). Attualmente, nessuno studio scientifico dimostra l'associazione tra le variazioni nell'espressione di *PARM1* e l'insorgenza della mastite bovina. Tuttavia, questo gene

risulta correlato alle citochine infiammatorie, allo stress del reticolo endoplasmatico (ER) e all'apoptosi nei miociti cardiaci di ratto (Isodono *et al.*, 2010). Questi studi suggeriscono quindi che *PARM1* potrebbe essere indirettamente coinvolto nel processo infiammatorio della mastite.

- *SAMD9 (Sterile alpha motif domain containing 9).*

Come ampiamente discusso nello studio di He *et al.* (2019), i livelli di espressione genica di *SAMD9* in vivo, nei pazienti affetti da artrite reumatoide (AR), e in vitro, durante l'attivazione dei linfociti T, sono significativamente maggiori rispetto ad una situazione di controllo. Successivamente, il silenziamento del gene, in concomitanza ad una crescita tumorale, ha determinato un incremento esponenziale di specifiche citochine antinfiammatorie (IFN- α) in sito di flogosi.

- *LPCAT2 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 2).*

Il recente lavoro di Abate *et al.* (2020) dimostra tramite uno studio cellulare in vitro che una sovraespressione del gene *LPCAT2* determina, in risposta ad una stimolazione con LPS, l'aumento dell'espressione genica dei macrofagi e il conseguente rilascio di fattori ad attività infiammatoria (TNF- α , IL-6). Viceversa, la risposta infiammatoria dei macrofagi indotta da LPS decresce significativamente, in seguito ad una inibizione selettiva dell'espressione di *LPCAT2*.

In futuro, è auspicabile lo svolgimento di valutazioni più mirate, per studiare il coinvolgimento concreto di geni specifici, attivati o repressi dalla patologia, nella modulazione della risposta immunitaria a specifici fenomeni infettivi e infiammatori.

Sebbene non sia ancora stato dimostrato un ruolo definito dei geni *PARM1* e *SAMD9* nella patogenesi della mastite, considerata la loro rilevanza biologica nella proliferazione cellulare e nella regolazione della risposta infiammatoria, è plausibile supporre che il rilevamento, nei campioni di latte positivi, di elevati livelli di cellule immunitarie e cellule epiteliali mammarie, sia in parte determinato dalla sovraespressione di questi geni, in risposta alla flogosi.

Le bovine affette da mastite sono anche caratterizzate da una *down*-regolazione di geni legati a proteine di trasporto e transmembrana, tra cui:

- *GNA11* (*Guanine Nucleotide Binding Protein Subunit Alpha 11*): è un gene coinvolto nella modulazione di diverse vie di segnalazione transmembrana (NCBI, 2024).
Il lavoro di Pan *et al.* (2022), che mirava a identificare i *pathway* molecolari correlati alla nutrizione precoce dei vitelli, afferma che il gene *GNA11* è principalmente implicato nella regolazione del metabolismo lipidico (Bisutti *et al.*, 2023).
- *COQ10A* (*Coenzyme Q10A*): è un gene collocato nella membrana mitocondriale e coinvolto nella respirazione cellulare. Codifica per una proteina di trasporto degli elettroni (Navas *et al.*, 2021).

Anche in questo caso, è plausibile attribuire la *down*-regolazione dei geni *GNA11* e *COQ10A* nelle bovine affette da mastite, alla deviazione delle riserve energetiche verso *pathways* di difesa antiossidante coinvolti nella riparazione dei danni cellulari.

Di conseguenza, in futuro, è ragionevole effettuare studi diretti della *down*-regolazione di questi geni, finalizzati a dimostrare i legami molecolari che associano le vie di segnalazione energetica alla risposta immunitaria.

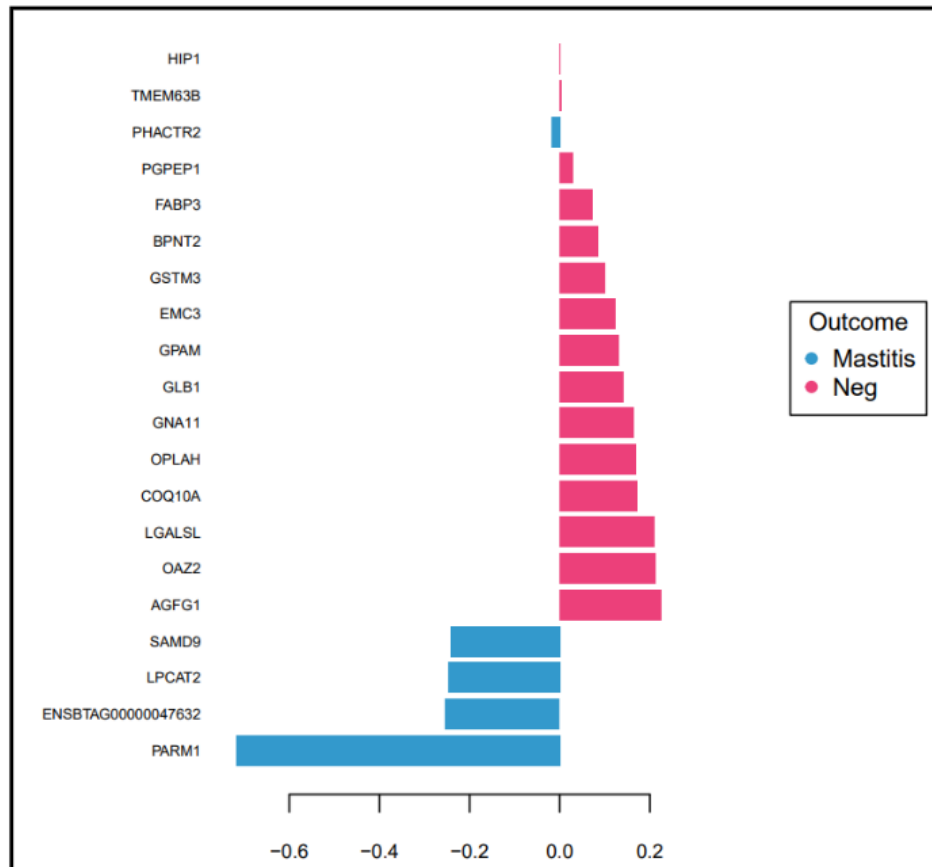


Figura 10. Grafico dei geni differenzialmente espressi (DEG).

La porzione in blu corrisponde alla sovraespressione del gene negli animali malati e la grandezza della barra è proporzionale all'informatività del gene stesso.

Il terzo grafico (**Figura 11**) rappresenta le 20 regioni maggiormente ipometilate negli animali affetti da mastite ($\log_2FC < 1$) rispetto ai negativi, individuate dal sistema statistico.

Queste regioni sono le più informative per la distinzione tra bovine sane e malate.

Per comprendere la rilevanza biologica di queste DMR, è ragionevole prendere in considerazione i geni ad esse associati.

In particolare, una delle DMR maggiormente ipometilate (19-44495202-44495802) era localizzata nel locus del gene *ADAM11*, che codifica per un membro della famiglia delle proteine disintegrine e metalloproteasi (*ADAM*) (Giannuzzi *et al.*, 2024).

L'ipermetilazione o, viceversa, l'ipometilazione di una regione promotoriale di un gene non è inevitabilmente associata alla *down*-regolazione o all'attivazione del gene stesso; diversi meccanismi epigenetici influenzano la modulazione dell'espressione genica.

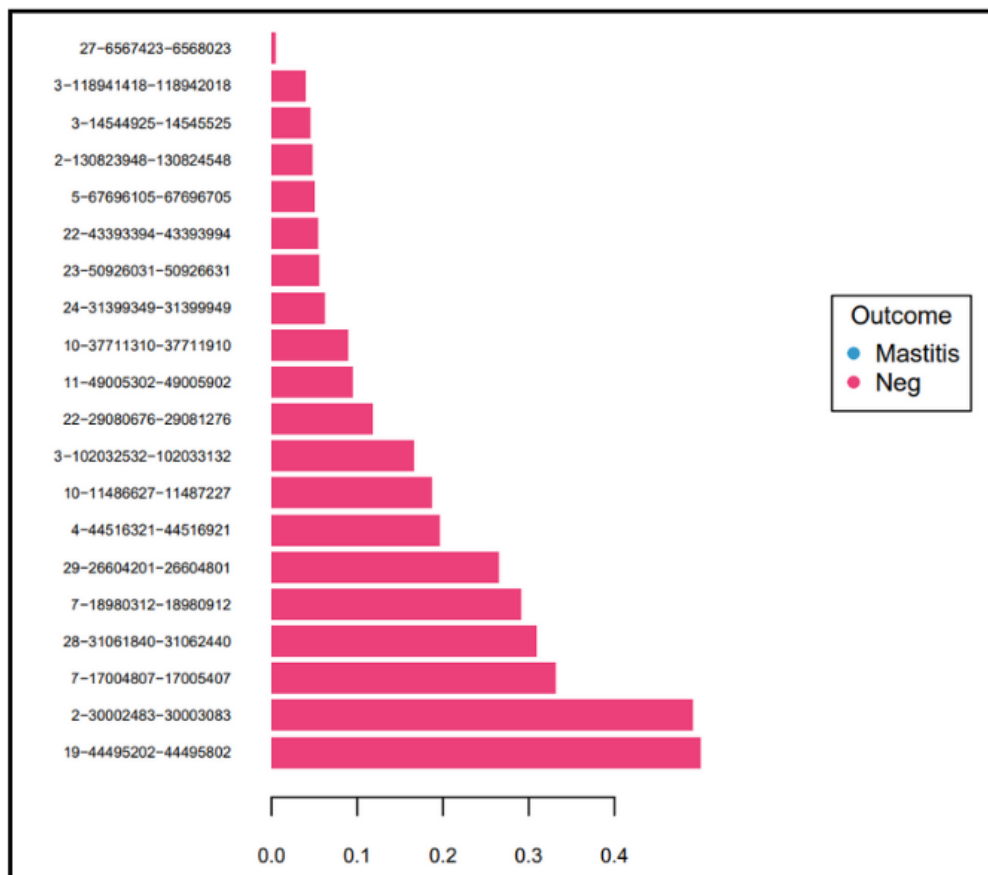


Figura 11. Grafico delle regioni differenzialmente metilate (DMR)

Il quarto grafico (**Figura 12**) riporta l'andamento delle popolazioni leucocitarie rilevate nei campioni di latte positivi per la mastite.

Come atteso, le bovine malate, rispetto alle sane, sono caratterizzate da variazioni sostanziali del rapporto cellulare.

L'induzione della risposta immunitaria, da parte dei patogeni della mastite, determina una massiva permeazione di leucociti e PMN (neutrofili polimorfonucleati) al sito di flogosi, per la risoluzione del danno. In minore misura aumenta anche l'infiltrazione di macrofagi, linfociti *T-helper* e B.

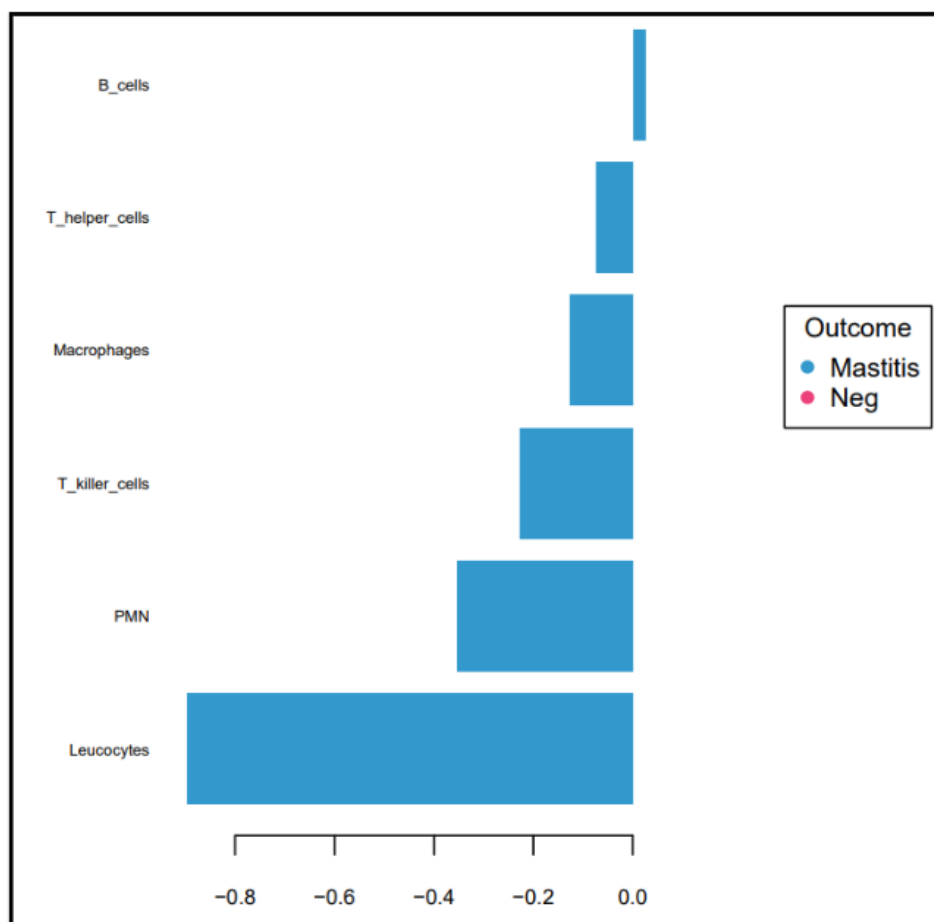


Figura 12. Grafico delle popolazioni leucocitarie

Il quinto grafico (**Figura 13**), evidenzia le correlazioni più informative, tra le categorie *genes* (viola), *met* (verde) e *IS* (blu), caratterizzate da $r \geq |0.9|$ (*correlation cut-off*).

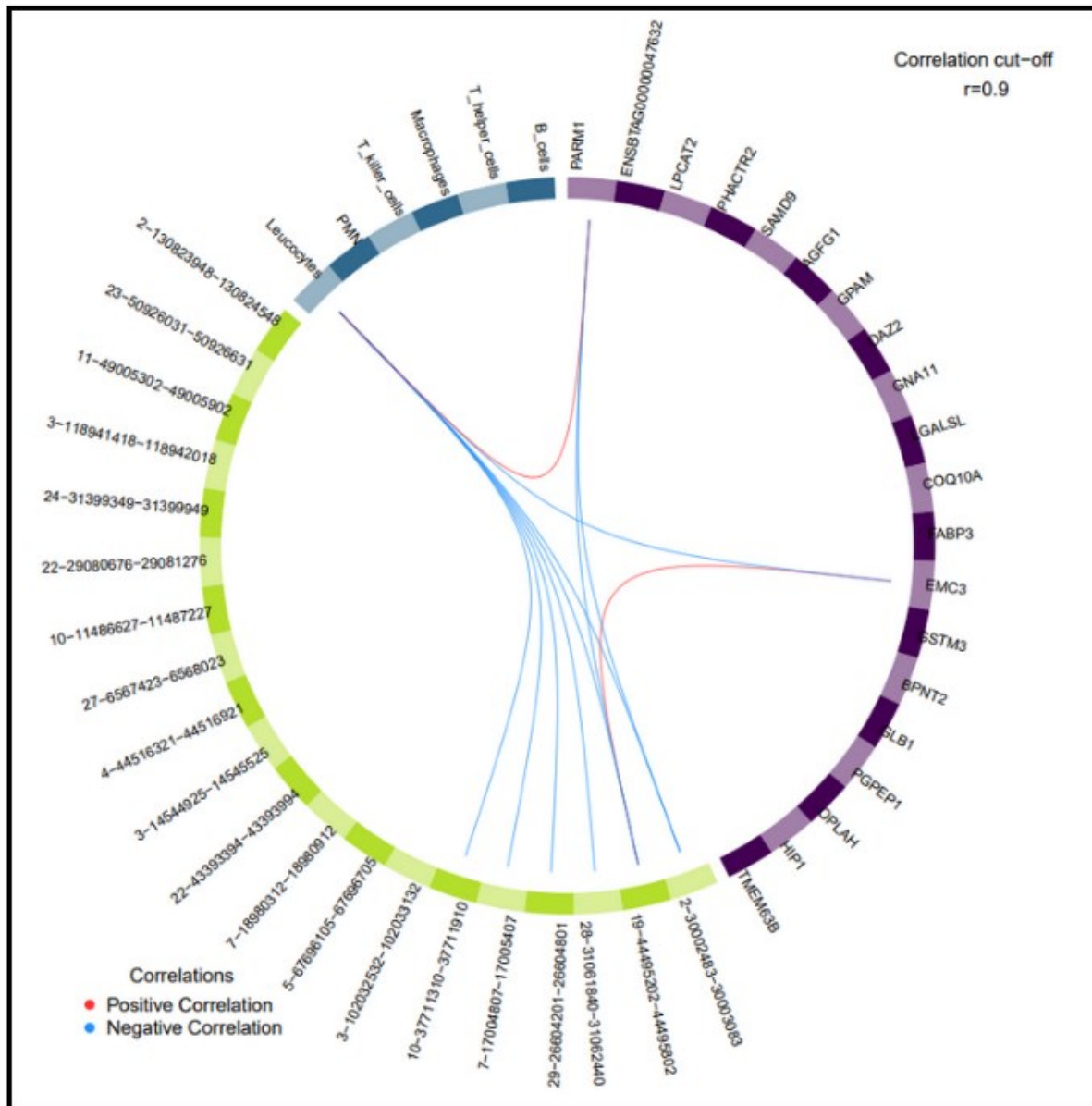


Figura 13. Grafico di correlazione tra le categorie: *genes*, *met*, *IS*

Nel grafico, le linee blu evidenziano una correlazione negativa fra due categorie, al contrario, le linee rosse corrispondono ad una correlazione positiva.

I dati più significativi rilevati dal programma dimostrano che:

- i leucociti sono correlati negativamente a diversi geni e regioni metilate, tra cui:

- i) il gene *EMC3* (*ER Membrane Protein Complex Subunit 3*) ($r=-0.89$), coinvolto nel trasporto di proteine all'interno della membrana del reticolo endoplasmatico (RE) (NCBI, 2024).

In questo caso, in concomitanza ad uno stato infiammatorio, con l'induzione dell'infiltrazione leucocitaria, diminuisce l'espressione di questo gene e potrebbero conseguire disfunzioni cellulari associate all'inefficienza delle proteine di membrana (Whittsette *et al.*, 2022);

- ii) la regione metilata 7-17004807-17005407 ($r=-0.90$), localizzata nel locus del gene *ANGPTL4* (*Angiopoietin-like 4*).

Come affermato nel lavoro di Zuo *et al.* (2023), sebbene non sia ancora stata compresa la concreta funzione di *ANGPTL4*, generalmente, l'espressione di questo gene aumenta nei tessuti infiammati, suggerendo un suo potenziale coinvolgimento nella mediazione della flogosi.

Idealmente quindi, la diapedesi leucocitaria, che avviene in corso di infiammazione, è proporzionale alla metilazione di *ANGPTL4*.

- La regione metilata 19-44495202-44495802 risulta positivamente correlata al gene *EMC3* ($r = 0.90$), e si trova, come citato in precedenza, co-localizzata nel locus del gene *ADAM11*.

Nelle bovine affette da mastite quindi, la sovraespressione di *ADAM11* potrebbe implicare l'induzione del gene *EMC3* fortemente correlato.

Se un gene e una regione metilata sono strettamente correlati (positivamente o negativamente), è possibile ipotizzare che la metilazione abbia un'influenza sull'espressione genica.

Sebbene l'ipermetilazione sia generalmente associata ad una *down*-regolazione genica, in relazione alla risposta immunitaria, una diminuzione dell'espressione genica potrebbe essere attribuita all'ipometilazione (Giannuzzi *et al.*, 2023).

CONCLUSIONI

Riassumendo i concetti fino ad ora analizzati, la mastite bovina rappresenta una sfida crescente per l'industria lattiero-casearia, sia dal punto di vista economico che sanitario; tuttavia, l'applicazione pratica dei risultati ottenuti da questo studio sperimentale, sebbene siano preliminari nell'ambito di un progetto più ampio, ha il potenziale di ottimizzare i processi di gestione e sorveglianza della salute mammaria delle bovine in lattazione.

In particolare, i dati collezionati dalle analisi di laboratorio forniscono informazioni rilevanti sui meccanismi fisiologici e molecolari coinvolti nella regolazione della suscettibilità o resistenza alla mastite.

Queste informazioni migliorano l'accuratezza nella diagnosi e nelle previsioni sul rischio di insorgenza della patologia nella sua forma subclinica.

L'adozione di un approccio preventivo potrebbe ridurre l'incidenza della mastite, contribuendo così a mitigare le perdite economiche e a migliorare il benessere animale in allevamento.

I risultati, derivanti dalle iniziali analisi molecolari, svolte nel presente lavoro di tesi e relative al progetto "*MASTITOMIC*", rientrano in un intervallo di valori considerato accettabile, nonostante l'attesa sterilità della matrice di partenza e le caratteristiche epidemiologiche dei microrganismi, patogeni e alteranti, presenti nel latte, che potrebbero influenzare significativamente la qualità e la quantità del materiale genetico estratto.

Alla luce dei dati collezionati durante questo studio sperimentale, in futuro, potrebbe essere utile procedere con un'accurata ottimizzazione dei protocolli di laboratorio per l'estrazione molecolare del DNA batterico, adattandoli alle caratteristiche proprie della matrice e dei microrganismi in essa contenuti.

Questo approccio mirato potrebbe determinare una maggiore accuratezza e riproducibilità dei risultati, favorendo lo sviluppo di metodologie diagnostiche più precise per la rilevazione di patogeni, potenzialmente mastitogeni, nel latte.

Rispetto allo studio di integrazione di dati epigenomici e trascrittomici, relativo al progetto sperimentale "*LATSAN*", l'analisi integrata dei geni e delle regioni metilate, coinvolti nella risposta immunitaria alla mastite, ha dimostrato, come atteso, l'esistenza di una forte correlazione tra il trascrittoma, il metiloma e le popolazioni leucocitarie.

In particolare, le variabili più informative che sono state evidenziate potrebbero essere utilizzate in futuro come indicatori predittivi per lo *screening* e la rilevazione precoce delle infezioni intramammarie subcliniche (IMI), previa validazione su una popolazione più ampia. Inoltre, sarà importante svolgere in futuro studi sperimentali, più mirati e finalizzati a comprendere come la metilazione possa influenzare positivamente o negativamente l'espressione di tali geni.

BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA

- Abate, W., Alrammah, H., Kiernan, M., Tonks, A. J., Jackson, S. K. (2020). *Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 (LPCAT2) co-localises with TLR4 and regulates macrophage inflammatory gene expression in response to LPS*. Scientific reports, 10(1), 10355.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-67000-x>
- Adkins, P. R., & Middleton, J. R. (2017). *Laboratory handbook on bovine mastitis*. National Mastitis Council, Incorporated.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2000.tb11869.x>
- Ajose, D. J.; Oluwarinde, B. O.; Abolarinwa, T. O.; Fri, J.; Montso, K. P.; Fayemi, O. E.; Ateba, C. N. (2022). *Combating bovine mastitis in the dairy sector in an era of antimicrobial resistance: ethno-veterinary medicinal option as a viable alternative approach*. Frontiers in veterinary science, 9, 800322.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.800322>
- ANAFIBJ. (2023). *Medie Produzioni Nazionali Frisone 2023*. Tratto da <https://www.anafi.it/it/pubblicazioni-statistiche/medie-produzioni-nazionali-2023>
- Argaw, A. (2016). *Review on Epidemiology of Clinical and Subclinical Mastitis on Dairy Cows*. Food Science and Quality Management, 52(6), 56-65.
- Bisutti, V., Mach, N., Giannuzzi, D., Vanzin, A., Capra, E., Negrini, R., Pegolo, S. (2023). *Transcriptome-wide mapping of milk somatic cells upon subclinical mastitis infection in dairy cattle*. Journal of Animal Science and Biotechnology, 14(1), 93.
<https://doi.org/10.1186/s40104-023-00890-9>
- Bortolami, R., Callegari, E., Clavenzani, P., Beghelli, V. (2019). *Anatomia e fisiologia degli animali domestici*. Casa Editrice Ambrosiana.

- Bradley, A. J. (2002). *Bovine mastitis: an evolving disease*. Veterinary Journal, 164(2), 116–128.
<https://doi.org/10.1053/tvjl.2002.0724>
- Bradley, A. J. (2002). *La mastite da coliformi (I): considerazioni generali ed epidemiologia*. Large Animals Review, 8(1), 39-47.
- Campos, B., Pickering, A. C., Rocha, L. S., Aguilar, A. P., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira Mendes, T. A., de Oliveira Barros Ribon, A. (2022). *Diversity and pathogenesis of Staphylococcus aureus from bovine mastitis: Current understanding and future perspectives*. BMC Veterinary Research, 18(1), 115.
<https://doi.org/10.1186/s12917-022-03197-5>
- Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., Done, S. H., Grünberg, W. (2016). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Elsevier Health Sciences.
- Cochran, S. D., Cole, J. B., Null, D. J., Hansen, P. J. (2013). *Single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertilizing ability of sperm and subsequent embryonic development in cattle*. Biology of reproduction, 89(3), 69-1.
- Cornet, A. M., Hanon, E., Reiter, E. R., Bruyninx, M., Nguyen, V. H., Hennuy, B. R., Closset, J. L. (2003). *Prostatic androgen repressed message-1 (PARM-1) may play a role in prostatic cell immortalisation*. The Prostate, 56(3), 220-230.
[https://doi.org/10.1016/S1078-1439\(03\)00169-8](https://doi.org/10.1016/S1078-1439(03)00169-8)
- Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C., Moroni, P., Luzzana, M. (2006). *Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk*. Journal of Dairy Science, 89(1), 163-169.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72080-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72080-X)

- Cremonesi, P., Severgnini, M., Romanò, A., Sala, L., Luini, M., & Castiglioni, B. (2021). *Bovine milk microbiota: Comparison among three different DNA extraction protocols to identify a better approach for bacterial analysis*. *Microbiology Spectrum*, 9(2), e00374-21.
<https://doi.org/10.1128/Spectrum.00374-21>
- Damm, M., Holm, C., Blaabjerg, M., Bro, M. N., Schwarz, D. (2017). *Differential somatic cell count - A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs*. *Journal of dairy science*, 100(6), 4926–4940.
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-12409>
- Dibbern, A. G., Botaro, B. G., Viziack, M. P., Silva, L. F. P., & Santos, M. V. D. (2015). *Evaluation of methods of DNA extraction from Staphylococcus aureus in milk for use in real-time PCR*. *Genet Mol Res*, 14(1), 227-233.
<https://doi.org/10.4238/2015.January.16.6>
- Commissione Europea. (2004). *Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale*. *Gazz Uff*, 55-205.
<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2004:0196:FIN:IT:PDF>
- Giannuzzi, D., Capra, E., Bisutti, V., Vanzin, A., Marsan, P. A., Cecchinato, A., & Pegolo, S. (2024). *Methylome-wide analysis of milk somatic cells upon subclinical mastitis in dairy cattle*. *Journal of Dairy Science*, 107(3), 1805-1820.
<https://doi.org/10.3168/jds.2023-23821>
- Harmon, R. J. (1994). *Symposium-mastitis and genetic evaluation for somatic-cell count-physiology of mastitis and factors affecting somatic-cell counts*. *Journal of dairy science*, 77(7), 2103-2112.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77153-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77153-8)

Harmon, R.J. (2001). *Somatic cell counts: A primer*. National Mastitis Council Annual Meeting Proceeding (Vol. 40, pp. 3-9). National Mastitis Council; 1999.

Haxhiaj, K., Wishart, D.S., Ametaj, B.N. (2022). *Mastitis: What It Is, Current Diagnostics, and the Potential of Metabolomics to Identify New Predictive Biomarkers*. Dairy, 3(4), 722-746.
<https://doi.org/10.3390/dairy3040050>

He, P., Wu, L. F., Bing, P. F., Xia, W., Wang, L., Xie, F. F., ... & Deng, F. Y. (2019). *SAMD9 is a (epi-) genetically regulated anti-inflammatory factor activated in RA patients*. Molecular and Cellular Biochemistry, 456, 135-144. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03499-7>

ISMEA. (2023). *Lattiero Caseari* – Scheda di Settore.

ISMEA MERCATI. (2024). *Latte e derivati bovini – I numeri del settore*. Tratto da <https://www.ismeamercati.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/3723>

Isodono, K., Takahashi, T., Imoto, H., Nakanishi, N., Ogata, T., Asada, S., Matsubara, H. (2010). *PARM-1 is an endoplasmic reticulum molecule involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rat cardiac myocytes*. PLoS one, 5(3), e9746.

IZ - Informatore Zootecnico. (2015). *Genetica: La selezione per la resistenza alla mastite*. Tratto da <https://informatorezootecnico.edagricole.it/bovini-da-latte/genetica-la-selezione-per-la-resistenza-alla-mastite/>

IZSLER. (2019). *Cellule somatiche*. Tratto da <https://www.izsler.it/creflatte/dati-analitici-qualita-del-latte/cellule-somatiche/>

Kumari, T., Bhakat, C., Choudhary, R. K. (2018). *A review on subclinical mastitis in dairy cattle*. Int. J. Pure Appl. Biosci, 6(2), 1291-1299.
<http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.6173>

LAR. (2010). Convegno Nazionale SIVAR. *Mastite bovina da Prototheca*. 16: 39-43

LAR. (2014). XXI CONGRESSO NAZIONALE S.I.P.A.O.C. Società Italiana di Patologia ed Allevamento degli Ovini e dei Caprini

Locatelli, C., Cremonesi, P., Rota, N., Scaccabarozzi, L., Pollera, C., Castiglioni, B., Moroni, P. (2014). *Stato dell'arte sulla mastite bovina da Prototheca spp.* SUMMA ANIMALI DA REDDITO, 7, 11-19.

Lundberg, Å., Nyman, A., Unnerstad, H. E., Waller, K. P. (2014). *Prevalence of bacterial genotypes and outcome of bovine clinical mastitis due to Streptococcus dysgalactiae and Streptococcus uberis*. Acta veterinaria scandinavica, 56, 1-11.
<http://doi.org/10.1186/s13028-014-0080-0>

Marouf, S. H., Ahmed, H. M., Mosalem, T. (2017). *ASSESSMENT OF LACTATE DEHYDROGENASE AND ALKALINE PHOSPHATASE AS BIOMARKERS FOR DETECTION OF SUBCLINICAL MASTITIS IN CATTLE*. Institute of animal reproduction, El-Harm, Ministry of Agriculture, Egypt.
<http://doi.org/10.1007/s11259-007-3539-x>

Naitana, S., Nuvole, P., Marongiu, A. *Lattazione*. In Aguggini, G., Beghelli, V., Giulio L. F. (1992). *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*. Torino: UTET.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2024). *EMC3 ER membrane protein complex subunit 3 (Homo sapiens)*. NCBI Gene.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55831>

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2024). *GNA11 guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 (Homo sapiens)*. NCBI Gene.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2767>

- Navas, P., Cascajo, M. V., Alcázar-Fabra, M., Hernández-Camacho, J. D., Sánchez-Cuesta, A., Rodríguez, A. B. C., Santos-Ocaña, C. (2021). *Secondary CoQ10 deficiency, bioenergetics unbalance in disease and aging*. Biofactors, 47(4), 551-569.
<https://doi.org/10.1002/biof.1733>
- Nyman, A. K., Waller, K. P., Bennedsgaard, T. W., Larsen, T., Emanuelson, U. (2014). *Associations of udder-health indicators with cow factors and with intramammary infection in dairy cows*. Journal of Dairy Science, 97(9), 5459-5473.
<https://doi.org/10.3168/jds.2013-7885>
- Oliver, S. P., Pighetti, G. M., Almeida, R. A. (2011). *Mastitis Pathogens| Environmental Pathogens*. Encyclopedia of Dairy Sciences, 1728-1734
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00301-0>
- Pan, C., Yang, C., Ma, Y., Sheng, H., Lei, Z., Wang, S., Ma, Y. (2022). *Identification of key genes associated with early calf-hood nutrition in subcutaneous and visceral adipose tissues by co-expression analysis*. Frontiers in Veterinary Science, 9, 831129.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.831129>
- Pedersen, L. H., Aalbaek, B., Røntved, C. M., Ingvarsen, K. L., Sorensen, N. S., Heegaard, P. M., Jensen, H. E. (2003). *Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to Streptococcus uberis*. Journal of comparative pathology, 128(2-3), 156-164.
<https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0620>
- Pegolo, S., Toscano, A., Bisutti, V., Giannuzzi, D., Vanzin, A., Lisuzzo, A., Cecchinato, A. (2022). *Streptococcus agalactiae and Prototheca spp. induce different mammary gland leukocyte responses in Holstein cows*. JDS communications, 3(4), 270-274.
<https://doi.org/10.3168/jdsc.2022-0216>

- Pinzón-Sánchez, C., Ruegg, P. L. (2011). *Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis*. Journal of dairy science, 94(7), 3397–3410.
<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3925>
- Pyörälä, S. (2003). *Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis*. Veterinary research, 34(5), 565-578.
<https://doi.org/10.1051/vetres:2003026>
- Pyörälä, S., Taponen, S. (2009). *Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens*. Veterinary microbiology, 134(1-2), 3-8.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.015>
- Reiner, A., Yekutieli, D., & Benjamini, Y. (2003). *Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures*. Bioinformatics, 19(3), 368-375.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btf877>
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., & Lê Cao, K. A. (2017). mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. PLoS computational biology, 13(11), e1005752.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>
- Schwarz, D., Santschi, D. E., Durocher, J., Lefebvre, D. M. (2020). *Evaluation of the new differential somatic cell count parameter as a rapid and inexpensive supplementary tool for udder health management through regular milk recording*. Preventive veterinary medicine, 181, 105079.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105079>
- Sharma, N., Singh, N. K., Bhadwal, M. S. (2011). *Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 24(3), 429-438.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10233>

Shave, C.D., L. Millyard, and R.C. May. (2021). *Now for something completely different: Prototheca, pathogenic algae*. PLoS Pathog. 17:1–7.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009362>

Sora, V.M., S. Panseri, M. Nobile, F. Di Cesare, G. Meroni, L.M. Chiesa, and A. Zecconi. (2022). *Milk Quality and Safety in a One Health Perspective: Results of a Prevalence Study on Dairy Herds in Lombardy (Italy)*. Life 12:1–10.

<https://doi.org/10.3390/life12060786>

USDA, APHIS, VS. (2002). Part I: *Reference of Dairy Health and Management in the United States*.

Wall, S. K., Wellnitz, O., Bruckmaier, R. M., Schwarz, D. (2018). *Differential somatic cell count in milk before, during, and after lipopolysaccharide- and lipoteichoic-acid-induced mastitis in dairy cows*. Journal of dairy science, 101(6), 5362–5373.

<https://doi.org/10.3168/jds.2017-14152>

Wang, D., Liu, L., Augustino, S. M. A., Duan, T., Hall, T. J., MacHugh, D. E., Dou, J., Zhang, Y., Wang, Y., Yu, Y. (2020). *Identification of novel molecular markers of mastitis caused by Staphylococcus aureus using gene expression profiling in two consecutive generations of Chinese Holstein dairy cattle*. Journal of animal science and biotechnology, 11, 98.

<https://doi.org/10.1186/s40104-020-00494-7>

Wang, M., Yang, N., Laterrière, M., Gagné, D., Omonijo, F., Ibeagha-Awemu, E. M. (2024). *Multi-omics integration identifies regulatory factors underlying bovine subclinical mastitis*. Journal of animal science and biotechnology, 15(1), 46.

<https://doi.org/10.1186/s40104-024-00996-8>

Whittsette, A. L., Wang, Y. J., Mu, T. W. (2022). *The endoplasmic reticulum membrane complex promotes proteostasis of GABAA receptors*. Iscience, 25(8).

- Zadoks, R. N., Middleton, J. R., McDougall, S., Katholm, J., & Schukken, Y. H. (2011). *Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans*. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 16(4), 357–372.
<https://doi.org/10.1007/s10911-011-9236-y>
- Zecconi, A., Vairani, D., Cipolla, M., Rizzi, N., Zanini, L. (2019). *Assessment of subclinical mastitis diagnostic accuracy by differential cell count in individual cow milk*. *Italian Journal of Animal Science*, 18(1), 460-465.
<https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1533391>
- Zecconi, A., Zanirato, G. (2013). *Il controllo delle mastiti per un allevamento sostenibile*. Filiera AQ—Università degli Studi di Milano: Bologna, Italy.
- Zuo, Y., He, Z., Chen, Y., Dai, L. (2023). *Dual role of ANGPTL4 in inflammation*. *Inflammation Research*, 72(6), 1303-1313.
<https://doi.org/10.1007/s00011-023-01753-9>