



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE**

**Dottorato di Ricerca in Scienze Veterinarie per la Salute  
Animale e la Sicurezza Alimentare**

*Ciclo XXVIII*

**TESI DI DOTTORATO**

**Mastiti dei piccoli ruminanti: studio eziologico  
e approcci terapeutici innovativi mediante  
l'utilizzo di batteri lattici**

**Presentata da: Dott.ssa Liliana Spuria**

**Tutor: Prof.ssa Maria Teresa Capucchio**

**Coordinatore del Dottorato: Prof. Mario Baratta**

**Anni Accademici: 2013-2016**

# INDICE

<b>1. RAZIONALE DEL PROGETTO</b> .....	1
<u>PARTE GENERALE</u>	
<b>2. ALLEVAMENTO OVI-CAPRINO</b> .....	4
2.1 CONTESTO NEL BACINO MEDITERRANEO .....	4
2.2 CONTESTO ITALIANO .....	7
<b>3. GHIANDOLA MAMMARIA</b> .....	9
<b>4. MASTITE</b> .....	9
4.1 MASTITE CLINICA E SUBCLINICA .....	10
4.2 FATTORI DI RISCHIO .....	11
<b>5. AGENTI PATOGENI DELLA MASTITE</b> .....	13
5.1 INFEZIONI BATTERICHE .....	13
5.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
5.1.2 <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
5.1.3 <i>Mannheimia</i> e <i>Pasteurella</i> spp .....	16
5.1.4 <i>Streptococcus</i> spp .....	17
5.1.5 <i>Trueperella pyogenes</i> .....	17
5.1.6 Stafilococchi coagulasi-negativi .....	18
5.1.7 <i>Micoplasmi</i> .....	19
5.2 INFEZIONI VIRALI .....	19
5.2.1 <i>Lentivirus</i> .....	20
5.2.2 <i>Orf virus</i> .....	21
5.3 INFEZIONI MICOTICHE .....	22
<b>6. MECCANISMI DI DIFESA DELLA GHIANDOLA MAMMARIA</b> .....	23
6.1 CELLULE SOMATICHE .....	24
<b>7. TERAPIA DELLE MASTITI</b> .....	25
<b>8. ANTIBIOTICO RESISTENZA</b> .....	27
<b>9. RESUI DEGLI ANTIBIOTICI NEL LATTE</b> .....	29
<b>10. ALTERNATIVE AGLI ANTIBIOTICI</b> .....	30
10.1 PROBIOTICI .....	30
10.2 BATTERIOCINE .....	31
10.3 VALUTAZIONE DI UN POTENZIALE PROBIOTICO .....	33
10.4 PROBIOTICI E BATTERIOCINE UTILIZZATI NELLA MASTITE DEI RUMINANTI .....	34

## PARTE SPERIMENTALE

### **RICERCA I**

<b>11. INFUSIONE INTRAMAMMARIA DI UNA COLTURA VIVA DI <i>L. LACTIS</i> IN PECORE CON MASTITE DA STAFILOCOCCI</b> .....	37
11.1 INTRODUZIONE e SCOPO .....	37

11.2 MATERIALI E METODI .....	39
11.2.1 Selezione degli animali e progettazione dello studio .....	39
11.2.2 Studio 1 .....	39
11.2.3 Studio 2 .....	40
11.2.4 Protocolli di trattamento .....	41
11.2.5 Osservazioni cliniche .....	42
11.2.6 Campionamento e analisi del latte .....	42
11.2.7 Esame istologico .....	43
11.2.8 Analisi statistica .....	43
11.3 RISULTATI .....	44
11.3.1 Studio 1 .....	44
11.3.2 Esame microbiologico .....	44
11.3.3 Misurazioni delle cellule somatiche .....	47
11.3.4 Produzione di latte .....	51
11.3.5 Studio 2 .....	54
11.3.6 Alterazioni macroscopiche nelle mammelle e nel latte .....	54
11.3.7 Esame microbiologico .....	54
11.3.8 Misurazione delle cellule somatiche .....	57
11.3.9 Risposta dei granulociti neutrofili .....	61
11.3.10 Produzione di latte .....	63
11.3.11 Esame istologico .....	66
11.4 DISCUSSIONE .....	66

## **RICERCA II**

<b>12. UTILIZZO DI UN MODELLO MURINO DI MASTITE PER STUDIARE GLI EFFETTI DELL'INFUSIONE INTRAMAMMARIA DI UN CEPPO DI <i>L. LACTIS</i> DI ORIGINE ALIMENTARE .....</b>	<b>74</b>
12.1 INTRODUZIONE E SCOPO .....	74
12.2 MATERIALI E METODI .....	74
12.2.1 Ceppi batterici .....	74
12.2.2 Topi .....	75
12.2.3 Modello murino d'infezione mastitica .....	75
12.2.4 Coltura microbiologica delle ghiandole mammarie .....	76
12.2.5 Indagine istologica .....	76
12.2.6 Analisi delle citochine .....	77
12.2.7 Analisi statistica .....	77
12.3 RISULTATI .....	77
12.3.1 Indagini microbiologiche da tessuto ghiandolare .....	77
12.3.2 Alterazioni isto-patologiche .....	78
12.3.3 Gli effetti di <i>L. lactis</i> sulla produzione di citochine pro-infiammatorie .....	79
12.4 DISCUSSIONE .....	80

### **RICERCA III**

<b>13. STUDIO MICROBIOLOGICO E ANATOMO-PATOLOGICO IN GHIANDOLE MAMMARIE MACROSCOPICAMENTE SANE E PATOLOGICHE DI PICCOLI RUMINANTI</b> .....	83
13.1 INTRODUZIONE e SCOPO .....	83
13.2 MATERIALI E METODI .....	83
13.2.1 Raccolta dei campioni studio 1 .....	83
13.2.2 Raccolta dei campioni studio 2 .....	84
13.2.3 Campionamento .....	84
13.2.4 Batteriologia .....	85
13.2.5 Micologia .....	86
13.2.6 Virologia .....	86
13.2.7 Istologia .....	87
13.2.8 Analisi statistica .....	87
13.3 RISULTATI .....	88
13.3.1 Studio 1 .....	88
13.3.2 Studio 2 .....	95
13.4 DISCUSSIONE .....	101
13.5 CONCLUSIONI .....	105
<b>14. BIBLIOGRAFIA</b> .....	106
<b>15. SITOGRAFIA</b> .....	121
<b>PERCORSO FORMATIVO</b> .....	122
<b>ARTICOLI PUBBLICATI INERENTI AL DOTTORATO</b> .....	

# 1. RAZIONALE DEL PROGETTO

La mastite è una delle principali patologie riscontrabile negli allevamenti ovi-caprini da latte. Essa è causa di ingenti perdite economiche dovute alla riduzione della produzione latte, alle alterazioni qualitative del latte e ai costi sanitari sostenuti dall'allevatore.

L'incidenza annuale delle mastiti cliniche nei piccoli ruminanti - ovis e capris - è generalmente inferiore al 5%, ma può, in rari casi, superare il 30-50%, causando mortalità o tassi di rimonta fino al 90% del gregge (Bergonier e Berthelot, 2003). La prevalenza delle mastiti subcliniche è stata stimata intorno al 5-30% nelle greggi da carne e al 20-30% in quelle da latte (Bergonier e Berthelot, 2003).

Gli stafilococchi sono tra i più comuni agenti eziologici di mastite. *Staphylococcus aureus* è quello più frequentemente isolato nei casi clinici (Mørk et al., 2007; Olechnowicz e Jaśkowski, 2014), mentre gli stafilococchi coagulasi-negativi (SCN) vengono maggiormente isolati nelle mastiti subcliniche (Contreras et al., 2007; Arsenault et al., 2008; Ergün et al., 2009; Onni et al., 2010; Onni et al., 2011; Olechnowicz et al., 2014).

La terapia comunemente utilizzata per la cura della mastiti si basa sull'utilizzo degli antimicrobici. Nell'ultimo decennio, periodo in cui è cresciuta l'antibiotico resistenza, è notevolmente aumentato l'interesse nei confronti dei microrganismi probiotici. Essi, oltre a migliorare le proprietà della microflora autoctona dell'organismo ricevente, hanno la capacità di produrre le "batteriocine", peptidi policiclici a spiccata attività antimicrobica, in grado di degradare le membrane cellulari dei batteri sensibili. Le batteriocine hanno riscosso un crescente interesse per il loro possibile impiego sia in campo clinico che come conservanti alimentari. In campo clinico potrebbero rappresentare un'alternativa alle terapie antibiotiche. Infatti, grazie al loro limitato spettro d'azione, possono agire specificatamente su determinati agenti patogeni riducendo il rischio di trasmissione dell'antibiotico resistenza sia al microbiota che ai potenziali patogeni, evitando il depauperamento della flora commensale presente dell'organismo e annullando, allo stesso tempo, i rischi connessi ai residui di antibiotici nel latte.

Recentemente, numerosi studi *in vivo* nelle vacche, hanno rivelato il potenziale probiotico dell'infusione intramammaria di colture vive di batteri lattici (LAB) per il trattamento della mastite. Tale terapia risulta essere in grado di suscitare una rapida risposta immunitaria della ghiandola mammaria (Crispie et al., 2008; Klosterman et al., 2008; Frola et al., 2013). Non sono invece attualmente disponibili in letteratura informazioni sull'utilizzo dei LAB per il controllo degli agenti mastidogeni nei piccoli ruminanti.

Il primo obiettivo dell'attività di dottorato è stato analizzare i dati forniti dagli Istituti Zooprofilattici della Sardegna e della Sicilia al fine di individuare i più comuni agenti mastidogeni degli ovis che circolano sul territorio delle due regioni. Gli agenti maggiormente riscontrati sono stati gli stafilococchi coagulasi-negativi (SCN), seguiti dallo *Staphylococcus aureus*.

Il secondo obiettivo è stato testare il potenziale probiotico del *Lactococcus lactis* LMG 7930 (un ceppo produttore di nisina) nei confronti di mastiti indotte dai due patogeni precedentemente rilevati. A tal

fine, sono state eseguite due sperimentazioni *in vivo* (nella specie ovina e in quella murina), con lo scopo di indagare il suo possibile utilizzo come alternativa terapeutica nel trattamento della mastite nei piccoli ruminanti.

Il terzo obiettivo è stato valutare quali fossero i principali agenti patogeni che causano mastite nei piccoli ruminanti in Piemonte. Sono state campionate, presso due mattatoi (uno della provincia di Cuneo e l'altro della provincia di Torino), ghiandole mammarie provenienti da ovi-caprini regolarmente macellati. È stata eseguita un'indagine microbiologica e anatomo-patologica su mammelle sane (nessuna lesione visibile) e affette da mastite macroscopicamente evidente, con lo scopo di valutare gli agenti biologici (batteri, funghi e virus) presenti nel parenchima e correlarne la presenza con le lesioni istologiche osservate. Infatti, nonostante la mammella rappresenti l'organo specializzato nella produzione del latte, non sono attualmente disponibili in letteratura lavori riguardanti la flora microbica della ghiandola mammaria sana dei piccoli ruminanti e tantomeno non ci sono studi in cui si cerchi di correlare gli agenti biologici con le lesioni istologiche infiammatorie.

# **PARTE GENERALE**

## 2. ALLEVAMENTO OVI-CAPRINO

I primi animali ad essere stati addomesticati dagli esseri umani all'interno di un allevamento zootecnico sono stati le capre e poi le pecore circa 10.000 anni fa. Originarie a partire da poche razze ancestrali selvatiche nella regione che oggi comprende Iraq, Iran, Siria e Turchia orientale, le capre e le pecore si sono diffuse in tutto il mondo in centinaia di differenti razze, per un totale attuale di oltre 750 milioni di capre e 1 miliardo di pecore (Haenlein, 2007).

Gli ovi-caprini da millenni costituiscono quindi una risorsa fondamentale per l'economia di molti Paesi del mondo per la produzione di latte, carne e lana.

### 2.1 CONTESTO NEL BACINO MEDITERRANEO

Valutando i dati più recenti, la produzione mondiale del latte di ovino è stata di 10.429.155 tonnellate nell'anno del 2014 ([www.fao.org/faostat/en/#home](http://www.fao.org/faostat/en/#home), ultimo accesso 13 settembre 2017); una piccola quantità se paragonata alla produzione di latte bovino di 652.351.920 tonnellate nello stesso anno ([www.fao.org/faostat/en/#home](http://www.fao.org/faostat/en/#home), ultimo accesso 13 settembre 2017). I maggiori produttori di latte di origine ovina sono l'Asia con il 50%, segue l'Europa con il 31% e una percentuale minore spetta all'Africa con il 19% (Carta et al., 2009). Se si considera la produzione di latte ovino a livello mondiale, si può affermare che circa il 46% di essa deriva dal Bacino del Mediterraneo (Carta et al., 2009; Todaro et al., 2015). I Paesi mediterranei europei più importanti per numero di ovi-caprini e produzione latte sono indicati nella Tabella 1 ([www.fao.org/faostat/en/#home](http://www.fao.org/faostat/en/#home), ultimo accesso 13 settembre 2017).

**Tabella 1.** Ovini e caprini allevati nel bacino del Mediterraneo

<b>PAESE</b>	<b>Ovini da latte (N°)</b>	<b>Latte di pecora (tonnellate)</b>	<b>Capre da latte (N°)</b>	<b>Latte di capra (tonnellate)</b>
<b>Europa</b>				
<b>Grecia</b>	7.254.000	772.072	3.350.000	351.209
<b>Italia</b>	5.468.990	372.526	658.800	28.463
<b>Spagna</b>	2.800.000	592.800	1.260.000	477.400
<b>Francia</b>	1.297.651	266.500	944.210	604.400
<b>Nord Africa</b>				
<b>Algeria</b>	13.848.690	363.238	2.578.950	313.936
<b>Turchia</b>	11.561.144	1.113.937	3.033.111	463.270
<b>Egitto</b>	2.260.000	103.176	1.240.000	19.788
<b>Libia</b>	2.235.800	63.074	520.000	17.568

Tradizionalmente l'allevamento di ovini da latte si è sviluppato e concentrato maggiormente nella zona del Bacino del Mediterraneo: in Europa meridionale (Francia, Italia, Spagna, Grecia), in quella

centrale (Ungheria, Repubblica Ceca e Repubblica Slovacca) e orientale (Turchia), e nei Paesi del vicino Oriente (Iran) (de Rancourt et al., 2006; Zygoyiannis, 2006).

Il sistema ovi-caprino, seppur legato a condizioni agro-climatiche ben definite e abbastanza comuni a tutta l'area mediterranea, mostra una diversa connotazione e importanza all'interno dei singoli Paesi. Tale diversità risale alla coesistenza di sistemi tradizionali e moderni derivati dalle differenti dinamiche socio-economiche delle aree del bacino del Mediterraneo (Carta et al., 2009).

Le produzioni ovina e caprina nelle aree mediterranee sono estremamente importanti dal punto di vista economico, ambientale e sociale (de Rancourt et al., 2006).

L'allevamento ovino comunemente si sviluppa in zone svantaggiose, collinari o di montagna, dove gli animali pascolano su terreni scoscesi e aridi, poco idonei per essere sfruttati dai bovini o per le coltivazioni di tipo intensivo, contribuendo a mantenere l'equilibrio ecologico e naturale del paesaggio. Inoltre, l'allevamento di ovini da latte contribuisce a sostenere l'attività economica e il mantenimento della popolazione nelle zone rurali. In diversi Paesi, infatti, il latte viene ancora prodotto per l'autoconsumo con tradizionali tecniche di allevamento, soprattutto a bassa produttività, con razze a duplice attitudine. Le pecore vengono ancora munte a mano e gli agnelli allevati manualmente somministrandogli il latte e poi ingrassati per produrre carne, rappresentando un'importante fonte di reddito per l'agricoltore. Negli ultimi decenni, tuttavia, ci sono stati notevoli miglioramenti in agricoltura nei Paesi del bacino mediterraneo (Boyazoglu e Morand-Fehr, 2001); infatti molti allevamenti si sono stanziati verso le basse zone collinari e di pianura, dove la produzione è aumentata notevolmente per le nuove e moderne tecniche di allevamento, passando dal tipo estensivo a quello intensivo, dalla mungitura manuale a quella meccanica (Carta et al., 2009).

Il ciclo produttivo ovi-caprino tradizionale nelle zone mediterranee è strettamente legato al clima, caratterizzato da inverni miti, con precipitazioni che si verificano soprattutto in autunno e in primavera, e da estati molto secche. Pertanto, la disponibilità di foraggio fresco è scarsa in autunno e abbondante in primavera. Il sistema di allevamento prevede un parto all'anno; la stagione dell'accoppiamento inizia in estate per le pecore adulte e nei primi mesi autunnali per le giovani pecore (circa il 20% del gregge); queste ultime si accoppiano con successo solo quando il loro peso corporeo è circa il 65-70% del peso normale di un adulto. Il parto avviene tra ottobre e dicembre (autunno, inizio inverno) per sfruttare al meglio la crescita stagionale della vegetazione. Solitamente le pecore adulte partoriscono prima, mentre in inverno partoriscono le primipare. In genere, soltanto il 75% delle giovani pecore rimane gravido in seguito al primo accoppiamento, le altre si accoppiano con successo la primavera seguente finendo per partorire in autunno insieme alle pecore adulte (Todaro et al., 2015).

Negli ultimi anni, a seguito della intensivizzazione di questo settore zootecnico, si stanno diffondendo sistemi di allevamento che prevedono una media di 3 parti ogni 2 anni, come ad esempio in alcune regioni dell'Italia (in Toscana) (Todaro et al., 2015), della Spagna (in Castilla-La Mancha e Castilla-Leon) (Milán et al., 2011) e Israele (Galal et al., 2008). In questi casi, le pecore hanno una produzione lattea continua, anche nei periodi estivi in cui, solitamente, le condizioni climatiche sono sfavorevoli.

Inoltre la produzione di più agnelli fornisce un importante contributo all'incremento dei profitti dell'allevatore (Carta et al., 2009; Todaro et al., 2015).

Gli agnelli sono generalmente macellati o svezziati dopo circa 30 giorni al termine dell'allattamento. Finito lo svezzamento degli agnelli, le madri sono munte normalmente due volte al giorno, fino a tarda primavera, inizio estate. In questo momento, sia le pecore giovani che quelle adulte, nonostante abbiano partorito in momenti differenti, sono destinate ad entrare in asciutta a causa della stagione secca (Carta et al., 2009; Todaro et al., 2015). Per evitare ciò, alle greggi viene somministrata un'integrazione alimentare con foraggi, fieno e concentrati, possibile soltanto dove sussiste l'opportunità di irrigazione dei terreni.

Riguardo al montone e all'agnello, molti Paesi mediterranei producono tradizionalmente agnelli da latte o agnelli giovani da ingrasso (esempio Italia, Grecia, Portogallo, Tunisia e Marocco), con un peso della carcassa di circa  $10\pm 12$  kg. In questi Paesi la produzione di carne di agnello e capretto può essere considerata come sottoprodotto del settore dei piccoli ruminanti da latte. In alcuni Paesi è preferita la carne di montone (esempio Egitto, Algeria, Libia, Cipro, Israele, Giordania), mentre in qualche caso sono presenti entrambe le forme di produzione (esempio Francia e Spagna). Nonostante questa diversità, c'è in media un definito trend riguardo alle carcasse più pesanti di circa  $15\pm 25$  kg. D'altra parte, la carne di capra, particolarmente quella di capretti precocemente svezziati, è sempre stata molto apprezzata dalla maggior parte delle popolazioni del Mediterraneo (Boyazoglu et al., 2001).

Al giorno d'oggi, i sistemi di allevamento degli ovi-caprini da latte variano da quelli di tipo estensivo (caratterizzati da una produzione di latte stagionale, razze a duplice attitudine, poche integrazioni alimentari, pratica della transumanza, mungitura a mano) a quelli di tipo intensivo (caratterizzati da produzione di latte stagionale o continua, miglioramento genetico delle razze locali e incroci, alimentazione a base di foraggi, mangimi e integrazioni, mungitura meccanica) (Carta et al., 2009; Todaro et al., 2015).

Gli allevamenti estensivi continuano a essere la realtà dell'allevamento di pecore e capre che sono in grado di sfruttare le aree marginali del territorio. Anche in questo tipo di sistema di allevamento, dove la produzione di latte è altamente stagionale, è possibile programmare l'attività di accoppiamento con tecniche di riproduzione e pianificare il periodo dei parti per ottenere latte fresco tutto l'anno, specialmente nella stagione estiva. Comunque, bisogna sottolineare che alle latitudini alte e medie, la temperatura annuale e il fotoperiodo sono le due variabili fondamentali, insieme con la disponibilità di cibo, che controllano il ciclo produttivo stagionale degli ovi-caprini. Infine, ampie aree del bacino del Mediterraneo sono caratterizzate da temperature ambientali in tarda primavera, estate, che spesso superano la zona termica neutrale delle pecore ( $5-25$  °C) (Todaro et al., 2015).

In molti Paesi europei, l'allevamento ovino si basa sulle razze locali che si sono ben adattate alle loro zone, ai sistemi di gestione e all'ambiente in cui vivono, spesso allevate in specifiche aree geografiche, dando origine a prodotti di alta qualità (soprattutto formaggi e carni, spesso protetti da marchi di qualità) (Carta et al., 2009).

I piccoli ruminanti sono i trasformatori più efficienti di foraggio di bassa qualità in prodotti di origine animale di alta qualità con diversa composizione chimica e caratteristiche organolettiche. Per questo, si punta molto sia sull'utilizzo di pascoli naturali, sia sull'integrazione dell'alimentazione con mangimi e supplementi (Zervas e Tsiplakou, 2011).

L'allevamento ovi-caprino ha un ruolo economico innegabilmente importante: il latte di pecora viene destinato per la maggior parte alla trasformazione, mentre il latte di capra per le sue caratteristiche dietetiche viene destinato sia alla trasformazione che all'uso diretto (Rovai et al., 2014), in quanto oltre ad essere altamente digeribile è utile per individui che presentano intolleranza al latte vaccino (Fatima et al., 2013).

L'allevamento ovi-caprino svolge anche un ruolo ambientale fondamentale, tra cui la preservazione delle zone meno fertili e la salvaguardia del paesaggio e di ecosistemi sensibili, e contribuisce a proteggere la fauna selvatica e a ripulire gli spazi naturali dalla materia vegetale secca (il che è essenziale nei paesi mediterranei ai fini della prevenzione degli incendi) (de Rancourt et al., 2006).

## **2.2 CONTESTO ITALIANO**

Il profilo che emerge dai dati del 6° Censimento generale dell'Agricoltura 2010 ([www.istat.it/it/censimento-agricoltura/agricoltura-2010](http://www.istat.it/it/censimento-agricoltura/agricoltura-2010), ultimo accesso 13 settembre 2017) è il risultato di un processo pluriennale di concentrazione dei terreni agricoli e degli allevamenti in un numero sensibilmente ridotto di aziende. L'effetto delle politiche comunitarie e dell'andamento dei mercati ha determinato l'uscita di piccole aziende dal settore, favorendo la concentrazione dell'attività agricola e zootecnica in unità di maggiori dimensioni e avvicinando il nostro Paese alla struttura aziendale media europea.

Il settore ovi-caprino è concentrato nel Sud e nelle isole dove è localizzato il 66% delle aziende e il 74,4% dei capi. In particolare, nel 2010 le aziende con ovini risultano 51 mila, con un patrimonio di 6,8 milioni di capi allevati. Le aziende con caprini sono poco meno di 23 mila con una consistenza pari a 862 mila capi. Per entrambe le specie si registra una forte riduzione del numero di aziende allevatrici (-42,7% per gli ovini e -44,6% per i caprini), mentre il patrimonio ovino risulta costante rispetto a dieci anni fa e quello caprino in lieve riduzione (-5%).

Per gli ovini le due Regioni insulari vantano il maggiore numero di aziende (12,6 mila unità in Sardegna e 5,6 mila unità in Sicilia) e di capi allevati (3 milioni in Sardegna e 732 mila in Sicilia). Altre Regioni incidono sulla consistenza nazionale dei capi ovini: nel Lazio e in Toscana sono allevati poco più di un milione di capi (Tabella 2).

Per i caprini la Sardegna, la Calabria e la Sicilia vantano il maggior numero di allevamenti e il maggior patrimonio allevato (Tabella 2).

**Tabella 2.** Aziende italiane con allevamenti e relativi capi di ovini e caprini per Regione. Dati ISTAT, 6° Censimento Generale dell'Agricoltura 2010.

REGIONI	Ovini		Caprini	
	Aziende	Capi	Aziende	Capi
	2010	2010	2010	2010
<b>Piemonte</b>	1.526	91.967	2.210	46.554
<b>Valle d'Aosta</b>	129	2.256	224	3.528
<b>Lombardia</b>	1.653	105.328	2.212	57.656
<b>Liguria</b>	414	10.845	361	6.643
<b>Trentino-Alto Adige</b>	1.902	57.300	1.267	18.518
<b>Veneto</b>	512	43.031	491	9.382
<b>Friuli-Venezia Giulia</b>	127	11.290	142	3.300
<b>Emilia-Romagna</b>	1.013	63.758	530	8.486
<b>Toscana</b>	2.452	416.656	730	12.296
<b>Umbria</b>	1.472	107.009	243	3.240
<b>Marche</b>	1.251	150.040	362	5.270
<b>Lazio</b>	3.135	588.096	713	27.547
<b>Abruzzo</b>	3.160	210.573	649	14.497
<b>Molise</b>	1.334	69.164	423	6.494
<b>Campania</b>	3.159	221.527	1.450	36.024
<b>Puglia</b>	1.948	226.829	1.061	51.786
<b>Basilicata</b>	3.693	262.202	1.792	58.798
<b>Calabria</b>	3.892	246.914	2.996	132.840
<b>Sicilia</b>	5.628	732.376	2.070	117.189
<b>Sardegna</b>	12.632	3.008.632	2.615	237.270
<b>ITALIA</b>	<b>51.032</b>	<b>6.625.793</b>	<b>22.541</b>	<b>857.318</b>

Gli allevamenti dei piccoli ruminanti in Piemonte, nonostante la consistenza non sia particolarmente elevata, 91.967 ovini e 46.554 caprini (6° Censimento generale dell'Agricoltura 2010, [www.istat.it/it/censimento-agricoltura/agricoltura-2010](http://www.istat.it/it/censimento-agricoltura/agricoltura-2010), ultimo accesso 13 settembre 2017), rappresentano una importante risorsa dal punto di vista zootecnico ed economico per le zone marginali collinari e montane della regione dove, grazie alla produzione di latte e formaggi la cui tipicità e qualità sono ampiamente riconosciute, è stato possibile evitare l'abbandono di molti territori. Nel complesso, l'importanza del settore zootecnico ovi-caprino si rivela oggi più che mai strategica per lo sfruttamento delle risorse foraggere disponibili in aree importanti quali l'arco alpino e altre zone marginali del sud Italia. In tali ambienti, infatti, le caratteristiche climatiche, geomorfologiche, ambientali del territorio, spesso limitano fortemente le possibilità di utilizzazione dei pascoli con i bovini e rendono quindi gli ovi-caprini il più conveniente strumento gestionale disponibile. L'allevamento di tali categorie di animali gioca dunque un ruolo fondamentale nella gestione e manutenzione delle molte aree svantaggiate d'Italia che altrimenti sarebbero destinate all'abbandono.

### **3. GHIANDOLA MAMMARIA**

Le ghiandole mammarie sono ghiandole sudoripare modificate che producono latte per il nutrimento della prole. I piccoli ruminanti hanno due ghiandole (sinistra e destra separate dal solco intermammario) ciascuna con un capezzolo e si trovano nella regione inguinale. Il capezzolo è scarsamente ricoperto da peli sottili (Frandsen et al., 2009).

Il parenchima ghiandolare è responsabile della produzione di latte ed è costituito da ghiandole tubulo-alveolari. Relativamente all'organizzazione anatomica, essa ha due principali componenti: il parenchima che comprende l'epitelio e le cellule mioepiteliali, e lo stroma che coinvolge i componenti non cellulari, come collagene ed elastina, cellule muscolari lisce e vasi. L'anatomia e l'istologia della ghiandola mammaria subiscono modificazioni durante il ciclo di lattazione, guidato principalmente dal sistema neuroendocrino. Infatti, ci sono tre stadi della biologia mammaria che caratterizzano i cicli di gestazione/lattazione: proliferazione, secrezione e involuzione. Durante la fine della gestazione, così come durante l'inizio e a metà lattazione, si verifica l'espansione della ghiandola mammaria. Questa espansione consiste in un aumento del numero delle cellule epiteliali e dell'area del lume, che porta a un incremento del parenchima tissutale e a una concomitante riduzione dello stroma. Di conseguenza, la ghiandola mammaria aumenta di dimensione. Durante fine lattazione, la ghiandola mammaria diminuisce di volume. Questa diminuzione è principalmente dovuta all'involuzione delle strutture secernenti (Lérias et al., 2014).

### **4. MASTITE**

La mastite è l'infiammazione della ghiandola mammaria causata quasi sempre dall'invasione di microrganismi, di solito batteri, in grado di scatenare una reazione infiammatoria.

La mastite è una delle più frequenti patologie che colpiscono tutti i mammiferi, in particolare i ruminanti da latte.

Essa è considerata la malattia più costosa per gli allevatori a livello mondiale a causa della riduzione nella quantità e nella qualità del latte. Una riduzione della quantità del 58% e del 30% del latte è stata segnalata rispettivamente in ovini e caprini (Marogna et al., 2010). La riduzione della qualità si ripercuote direttamente sul prezzo del latte e indirettamente sulle sue proprietà con una minor resa casearia. A questo bisogna aggiungere i costi per il trattamento degli animali (spese di consulenze veterinarie, esami diagnostici, acquisto dei farmaci e spese di manodopera per i trattamenti) e quelli per la sostituzione degli animali (Pezzanite et al., 2009). Infine, la patologia può aumentare la mortalità degli agnelli o diminuirne il tasso di crescita (Marogna et al., 2010; Blagitiz et al., 2013).

Risulta pertanto un problema di notevole importanza in termini di sicurezza igienico-sanitaria per il settore lattiero-caseario e di perdite economiche dei produttori di latte e formaggi destinati al consumo

umano. Questa problematica si estende soprattutto alle specie bovina e ovi-caprina produttrici di latte (Moroni et al., 2005) ed è stata confermata recentemente anche da un lavoro sul “Benessere negli ovini” ad opera del *panel* di esperti di Salute e Benessere Animale dell’Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare, il quale indica come la mastite risulti essere uno tra i tre problemi più importanti per quanto concerne le avversità che affliggono il benessere negli ovini, in ambito di produzione e sistema di gestione di questo settore (EFSA, 2014).

Per il consumatore i rischi sanitari derivano non solo dagli agenti patogeni presenti nel latte, che possono essere distrutti attraverso un processo termico prima del libero consumo, ma anche dalle tossine che in alcuni casi possono essere termostabili, ad esempio alcune enterotossine stafilococciche, e possono permanere nei prodotti caseari derivati, anche se il latte è stato pastorizzato o sterilizzato precedentemente (Little e de Louvois, 1999).

L’incidenza annuale delle mastiti cliniche nei piccoli ruminanti - ovini e caprini - è generalmente inferiore al 5%, ma può, in rari casi, superare il 30-50%, causando mortalità o tassi di rimonta fino al 90% del gregge (Bergonier e Berthelot, 2003). La prevalenza delle mastiti subcliniche è stata stimata intorno al 5-30% nelle greggi da carne e al 20-30% in quelle da latte (Bergonier e Berthelot, 2003).

Il rischio di sviluppare mastite aumenta in scarse condizioni igieniche, infezioni sistemiche o traumi inflitti dalla prole. La mastite può presentarsi come una condizione acuta o cronica, e può essere localizzata a una singola ghiandola o a entrambe (Pezzanite et al., 2009).

#### **4.1 MASTITE CLINICA E SUBCLINICA**

La mastite è universalmente classificata come mastite clinica e subclinica (López et al., 2015).

La mastite clinica è rilevabile visivamente, essa si manifesta principalmente con alterazioni del latte (presenza di fiocchi, coaguli di sangue, frustoli di fibrina, ridotta o assente secrezione latte) e/o della mammella quali aumento di volume, iperemia, calore, dolore, edema, ascessi, nonché segni sistemici sull’animale, inclusi febbre, aumento della frequenza cardiaca, perdita di appetito, disidratazione, depressione, coma, fino alla morte (Bergonier e Berthelot, 2003). Di solito le conseguenze della mastite clinica sono la tossiemia e la necrosi gangrenosa della mammella (Olechnowicz e Jaśkowski, 2014).

La mastite subclinica è caratterizzata da assenza di segni clinici visibili nel latte o nella mammella. In alcuni casi, possono subire alterazioni la produzione e la composizione del latte, specialmente si può registrare un aumento delle cellule somatiche (Bergonier e Berthelot, 2003).

Attualmente, la diagnosi di mastite nei piccoli ruminanti è basata principalmente sull’esame clinico delle ghiandole mammarie, sulla conta delle cellule somatiche (CCS) del latte e sugli esami batteriologici del latte. L’esame clinico sistematico della mammella e del capezzolo è relativamente poco costoso e veloce, e fornisce preziose informazioni. L’esame batteriologico rappresenta la tecnica analitica di elezione volta a isolare e identificare il microrganismo responsabile del processo infiammatorio a carico della mammella.

## 4.2 FATTORI DI RISCHIO

Esistono vari aspetti associati alla gestione delle pecore che sono stati segnalati come possibili fattori di rischio per la mastite, di questi alcuni possono essere imputabili ad agenti batterici specifici (Gelasakis et al., 2015).

I fattori di rischio più significativi sono elencati di seguito.

- **Igiene dell'ovile**

Tra i problemi più rilevanti si riscontrano un'elevata densità di animali, un insufficiente spazio sulla lettiera e una ventilazione limitata (Caroprese, 2008). Questi possono causare un aumento delle concentrazioni di batteri all'interno dell'ovile con aumentato rischio di infezioni intramammarie (Bergonier et al., 2003). La mancanza di una regolare rimozione del letame e un'inefficace disinfezione dell'ambiente possono compromettere ulteriormente l'igiene dell'ovile (Gelasakis et al., 2015).

- **Pratiche di mungitura**

Pratiche non corrette di mungitura manuale o meccanica, eseguite da personale non qualificato, predispongono alla mastite. Devono essere evitati sia l'eccessiva mungitura che il ristagno di latte nella cisterna della ghiandola, dal momento che entrambe promuovono la moltiplicazione dei batteri. Analogamente, durante la mungitura meccanica una inappropriata regolazione e/o un mal funzionamento del sistema di mungitura possono predisporre a infezioni intramammarie (Albenzio et al., 2003; Contreras et al., 2007). Una pulitura e disinfezione inefficiente del sistema di mungitura possono portare all'accumulo di patogeni che possono risalire attraverso il dotto mammario nella cisterna mammaria. Inoltre, la mungitura manuale può favorire infezioni intramammarie mediante la trasmissione di batteri dalle mani del mungitore, generalmente stafilococchi. Infine, se le procedure del pre e post dipping non sono praticate routinariamente prima e dopo la mungitura aumenta il tasso di nuove infezioni (Contreras et al., 2007).

- **Alimentazione**

Un'alimentazione inappropriata può favorire l'insorgenza della mastite. È stato riportato un maggiore rischio di incidenza di mastite clinica e subclinica in pecore con deficienza di vitamina A nella dieta, che causerebbe una riduzione dell'integrità e della funzionalità delle difese dell'epitelio nella ghiandola mammaria (Koutsoumpas et al., 2013). Similmente, la deficienza di selenio (Giadinis et al., 2011) contribuisce allo sviluppo di mastite a causa di una diminuita difesa cellulare a livello mammario. Infine, è stato riconosciuto come fattore di rischio una ridotta disponibilità di energia negli alimenti (Barbagianni et al., 2015).

- **Conformazione della mammella**

La posizione del capezzolo e la conformazione della mammella possono predisporre a infezioni intramammarie. Mammelle con capezzoli piccoli e posizionati orizzontalmente,

insieme a una conformazione inappropriata della mammella (mammella lunga e pendente) possono predisporre alla mastite (Casu et al., 2010; Gelasakis et al., 2012). La mungitura meccanica di queste mammelle è di difficile attuazione, poiché vi è una frequente caduta del gruppo dei pendicapezzoli e quindi un'alta quantità di latte ritenuto nella cisterna (Gelasakis et al., 2012).

- **Stato di salute**

Pecore immunocompromesse sono più suscettibili alle malattie, inclusa la mastite. Lo stress immunologico può essere l'effetto di problemi di salute o di una produzione eccessiva. Quest'ultima causa un incremento del fabbisogno nutrizionale dell'animale e una concomitante riduzione dell'efficacia del sistema immunitario (Houdijk et al., 2003), che è almeno in parte responsabile dell'aumentata incidenza delle infezioni intramammarie durante lo stadio iniziale della lattazione (Bergonier et al., 2003). La riduzione dell'immunità nel periodo del periparto (Barger, 1993; Coop e Kyriazakis, 1999) può essere responsabile dell'aumentato rischio di incidenza della mastite osservata nel periodo immediatamente dopo il parto (Mavrogianni et al., 2014). In generale, vari problemi di salute, sia sistemici che locali, possono essere associati con lo sviluppo di mastite. Le distocie possono aumentare l'incidenza di mastiti nel *post partum* (Waage e Vatn, 2008). Anche massive infestazioni parassitarie, ad esempio sostenute da trematodi nel periparto, possono predisporre a mastiti nel periodo della lattazione (Mavrogianni et al., 2014).

- Le lesioni del capezzolo possono anche avere un effetto nello sviluppo delle infezioni mammarie; l'accumulo di batteri sulla cute screpolata dei capezzoli dovuta all'uso di disinfettanti troppo concentrati o all'esposizione ad acqua fredda possono facilitare l'invasione batterica intramammaria (Fragkou et al., 2007). Pecore con lesioni sui capezzoli dovute a infezioni da parte del virus dell'ectima contagioso sono predisposte alla mastite clinica (Mavrogianni et al., 2006; Mavrogianni e Fthenakis, 2007) a causa della deplezione delle difese locali.

- **Fattori genetici**

Alcuni fattori genetici possono essere coinvolti nell'incremento della suscettibilità alla mastite delle pecore (Gelasakis et al., 2015).

## 5. AGENTI PATOGENI DELLA MASTITE

La mastite può essere causata da batteri, virus, funghi e lieviti. Tuttavia, le cause più comuni sono attribuibili a batteri.

### 5.1 INFEZIONI BATTERICHE

I microrganismi responsabili di mastite, a seconda della loro origine, possono essere distinti in:

- **batteri patogeni contagiosi:** presenti nella mammella infetta, generalmente sopravvivono con difficoltà nell'ambiente. Si diffondono tra gli animali con le procedure di mungitura attraverso la mungitrice meccanica. I principali batteri patogeni contagiosi sono: *Staphylococcus aureus*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Trueperella pyogenes* e micoplasmi;
- **batteri ambientali:** sono ubiquitari, presenti nel tratto gastro-intestinale, nel suolo, nelle acque e nelle lettiere. Moltiplicandosi nelle guaine degli impianti di mungitura favoriscono il diffondersi dell'infezione fra gli animali. Possono dar luogo a quadri clinici di diversa gravità, da mastiti acute, con febbre, depressione, anoressia e morte degli animali nei casi più gravi, fino a mastiti croniche, con presenza di noduli e ispessimenti del tessuto mammario, riduzione del volume dell'emimammella interessata con conseguente diminuzione della produzione del latte. Possono, inoltre, essere riscontrate forme asintomatiche individuabili esclusivamente mediante esami di laboratorio. I principali batteri ambientali responsabili di mastite negli ovini e caprini da latte sono: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp., *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Bacillus* spp.;
- **batteri opportunisti:** sono microrganismi che costituiscono la flora microbica cutanea degli animali. Definiti da molti autori come patogeni minori, sono i maggiori responsabili delle mastiti subcliniche. I principali batteri appartenenti a questa categoria sono rappresentati dagli stafilococchi coagulasi-negativi (SCN), in particolar modo *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus haemolyticus* che, essendo dotati di patogenicità variabile, possono causare quadri clinici diversi;
- **altri microrganismi:** sono coinvolti in modo meno frequente e talvolta possono causare malattia nell'uomo. I principali sono *Listeria* spp., *Streptococcus zooepidemicus*, *Nocardia farcinica* e *Aspergillus fumigatus*;  
(Cannas e Dore, 2016).

#### 5.1.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* è il più comune patogeno legato alle mastiti negli ovini (Bergonier et al., 2003; Mørk et al., 2005; Mavroggianni et al., 2011). L'infezione intramammaria sostenuta da questo agente

batterico è responsabile sia di forme acute cliniche (mastite gangrenosa) sia di forme subcliniche (Contreras et al., 2003; Contreras et al., 2007).

La mastite gangrenosa (Figura 1) si verifica in particolare durante la lattazione, ma anche durante l'ultima settimana di gestazione; i segni clinici si osservano a livello di capezzolo o parenchima mammario, i quali diventano freddi ed edematosi. La mammella assume inizialmente un colore rossastro, poi bluastro e il secreto mammario risulta acquoso e rossastro con bolle e gas. I linfonodi sovramammari sono aumentati in volume, edematosi ed emorragici. L'animale colpito può manifestare ipertermia, diminuzione dell'appetito e fenomeni di zoppia (Plummer e Plummer, 2012). Le conseguenze possono essere la morte dell'animale entro le 24 ore dall'insorgenza della malattia o la ripresa con la presenza di una netta linea di demarcazione a livello mammario tra la zona sana e quella infetta che essendo necrotica si staccherà spontaneamente.



**Figura 1.** Ovino. Mastite gangrenosa.

*S. aureus* rilascia diverse tossine che contribuiscono alla patogenesi delle mastiti e rappresentano anche un rischio per la salute del consumatore poiché, anche dopo la pastorizzazione o sterilizzazione, le enterotossine termostabili possono persistere nel latte (Zadoks et al., 2011; Kadariya et al., 2014). Esse non sono solo prodotte dai ceppi isolati dalle mastiti cliniche, ma anche da quelli isolati dalle mastiti subcliniche (Contreras et al., 2007).

Dato che la mastite da *S. aureus* risulta difficile da debellare, questi animali dovrebbero essere abbattuti o comunque munti per ultimi per prevenire la diffusione dell'infezione. Inoltre il batterio è rilasciato in modo intermittente, per cui una singola coltura negativa non significa necessariamente che quell'animale non sia infetto. Infatti prima di rimettere l'animale nella catena di mungitura, bisogna accertarsi del risultato negativo eseguendo una serie di esami colturali e riscontrando un valore persistentemente basso nella conta delle cellule somatiche (CCS) (Plummer e Plummer, 2012). Lo *S. aureus* infatti è responsabile di un considerevole aumento della CCS (Contreras et al., 2003).

Nella capra *S. aureus* mostra una bassa prevalenza e una scarsa capacità di trasmissione (Contreras et al., 2003). Le greggi in cui è presente, in genere, hanno solo pochi animali infetti (ad eccezione

delle epidemie causate da alterazioni della macchina di mungitura o legate ad altre circostanze eccezionali). Va ancora chiarito se questa bassa capacità di trasmissione sia dovuta alla resistenza della capra o alle caratteristiche dei ceppi caprini. Genotipizzando questi ultimi ceppi si potrebbe far luce su questa problematica, verificando se sono legati a ceppi di origine bovina (e quindi la resistenza potrebbe essere dovuta alle caratteristiche della capra) o a ceppi umani veicolati da portatori sani. Anche se non sono ancora state fatte analisi approfondite, la bassa trasmissione durante la mungitura, osservata in greggi di capre infette, suggerisce che i ceppi di *S. aureus* caprini siano meno contagiosi di quelli bovini (Contreras et al., 2003). Invece, nelle greggi di pecore da latte, il passaggio dell'infezione durante la mungitura risulta un importante meccanismo per la diffusione di questo microrganismo (Mørk et al., 2007).

L'esame istopatologico del tessuto mastitico rivela necrosi variabile di gruppi di lobuli, emorragie, infiltrati infiammatori misti, fenomeni di trombosi vascolare e proliferazione di tessuto connettivo (Plummer e Plummer, 2012).

Nelle fasi iniziali della malattia si può agire con antiinfiammatori, antibiotici per via sistemica e fluidoterapia di supporto (Plummer e Plummer, 2012). Gli ovini vengono generalmente vaccinati contro la mastite gangrenosa. L'efficacia del vaccino contro la mastite da *S. aureus* nelle capre non è stata invece segnalata, per cui la terapia durante l'asciutta, l'eliminazione degli animali con infezione cronica e l'igiene di mungitura restano i principali metodi di controllo per limitare nuove infezioni (Contreras et al., 2003).

### **5.1.2 *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa***

Uno dei batteri Gram negativi che può causare mastite nella pecora è l'*Escherichia coli* (Leitner e Krifucks, 2007; Gelasakis et al., 2015). I Gram negativi sono meno comuni nelle capre rispetto ai bovini, ma quando compaiono di solito causano grave mastite acuta clinica che può portare a sintomi simili a quelli causati da *S. aureus*, quindi mastiti acute gangrenose.

*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* sono i bacilli Gram negativi più frequentemente isolati nelle capre (Contreras et al., 2003).

Occasionalmente, ci sono stati importanti problemi dovuti a *Pseudomonas* spp. Questi sono stati legati a greggi di pecore in cui vi era una non corretta igiene di mungitura, presenza di acqua contaminata, lettiera umida, disinfettanti contaminati utilizzati per il dipping dei capezzoli e procedure non idonee per i trattamenti intramammary (Contreras et al., 2003).

Dal punto di vista istologico, *Escherichia coli* provoca mastiti parenchimatose acute, che devono il loro nome al fatto che le manifestazioni cliniche legate a questa forma sono talvolta particolarmente imponenti (abbattimento del sensorio, ipertermia e talora morte). Il parenchima risulta iperemico con aree di necrosi, emorragie ed essudato purulento-emorragico (Guarda et al., 2013).

### 5.1.3 *Mannheimia* e *Pasteurella* spp.

*Pasteurella* and *Mannheimia* sono microrganismi Gram negativi appartenenti alla famiglia *Pasteurellaceae*. I germi di questa famiglia si sono adattati a vivere sulle superfici mucosali del tratto gastro-enterico, respiratorio e genitale dei mammiferi. Molti di questi microrganismi sono opportunisti e invasori secondari, altri manifestano preferenze per specifici distretti e ospiti. Da una rivalutazione e analisi genetica è emerso che i biotipi A e T di *Pasteurella haemolytica* sono stati riclassificati come *Mannheimia haemolytica* (biotipo A) e *Pasteurella trehalosi* (biotipo T). Per ogni isolamento di *M. haemolytica* e di *P. trehalosi* sono identificati biotipo e sierotipo; ad esempio *Mannheimia haemolytica* A2 è il gruppo più comune isolato nella pastorellasi respiratoria di ovini e caprini ed è normalmente riportato nei casi di mastite nella pecora (Merck, 2012).

*Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* e *Mannheimia ruminalis* sono batteri isolati da casi di mastite acuta nelle pecore (Omaleki et al., 2010; Omaleki et al., 2011). Tra gli agenti di infezione intramammaria è stata riportata anche *Pasteurella multocida* (Leitner e Krifucks, 2007).

*M. haemolytica* è ritenuta la più comune causa di mastite nei sistemi di allevamento da carne (Arsenault et al., 2008; Koop et al., 2010; Omaleki et al., 2010), a differenza degli allevamenti da latte in cui questo microrganismo è stato riscontrato solo nell'11% dei casi (Mavrogianni e Fthenakis, 2007). Essa causa solitamente casi gravi di mastite clinica, seguita da tossiemia e necrosi gangrenosa della mammella. Non esiste vaccino che possa prevenire l'infezione e lo scatenarsi della mastite, soprattutto della sua forma iperacuta, rendendo qualsiasi tipo di trattamento vano o comunque senza successo (Omaleki et al., 2011).

I segni clinici, come aumento della temperatura, indurimento e iperemia mammaria con dolorabilità, sono visibili entro le 12 ore dall'inoculazione sperimentale nella ghiandola mammaria di 10-2000 UFC (Unità Formanti Colonie) di *Mannheimia haemolytica* (Elmasannat et al., 1991). La sintomatologia sistemica, che include anoressia, depressione, tachipnea e piressia, può apparire il primo giorno dopo l'inoculazione e può diventare molto grave con diarrea al giorno terzo o quarto (Elmasannat et al., 1991). Segni gravi di mastite gangrenosa possono apparire al terzo o quarto giorno, con una variazione di colore della cute mammaria da rosea a bluastra-nerastra, con una linea netta di separazione tra il tessuto necrotico e quello sano. Poche decine di UFC di *Mannheimia haemolytica* possono indurre una mastite gangrenosa. La desquamazione del tessuto necrotico della mammella con mastite gangrenosa si manifesta una settimana dopo l'inoculazione (Elmasannat et al., 1991).

Al fine di ridurre la trasmissione della malattia si può agire sulla gestione dell'allevamento ovi-caprino limitando le interazioni tra i soggetti e procedendo allo svezzamento precoce dei piccoli che potrebbe ridurre il numero di portatori di batteri a livello di nasofaringe. L'utilizzo di vaccini commerciali serve inoltre per controllare l'infezione del tratto respiratorio negli agnelli e capretti permettendo di prevenire l'insorgenza di mastiti. Sono inoltre previsti studi per mettere in atto piani di prevenzione e controllo della mastite, senza dover necessariamente ricorrere al trattamento dei soggetti colpiti (Omaleki et al., 2011).

#### **5.1.4 *Streptococcus* spp.**

I batteri del genere *Streptococcus* spp. sono considerati patogeni sporadici nelle mastiti ovine (Zdragas et al., 2005; Contreras et al., 2011). L'incidenza di mastite sostenuta da questi microrganismi è associata a inappropriate condizioni di allevamento o a inadeguate pratiche di mungitura, come è stato riscontrato in numerosi studi italiani o tedeschi che riportano un'incidenza del 23-31% di queste infezioni (Marogna et al., 2010; Cuccuru et al., 2011; Kern et al., 2013).

Le specie di questo genere riconosciute come causa di mastite nei piccoli ruminanti sono *Streptococcus agalactiae* (Keefe, 1997), *Streptococcus dysagalactiae* (Scott, 2000), *Streptococcus uberis* (Shouman et al., 1986) e più recentemente *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (Las Heras et al., 2002).

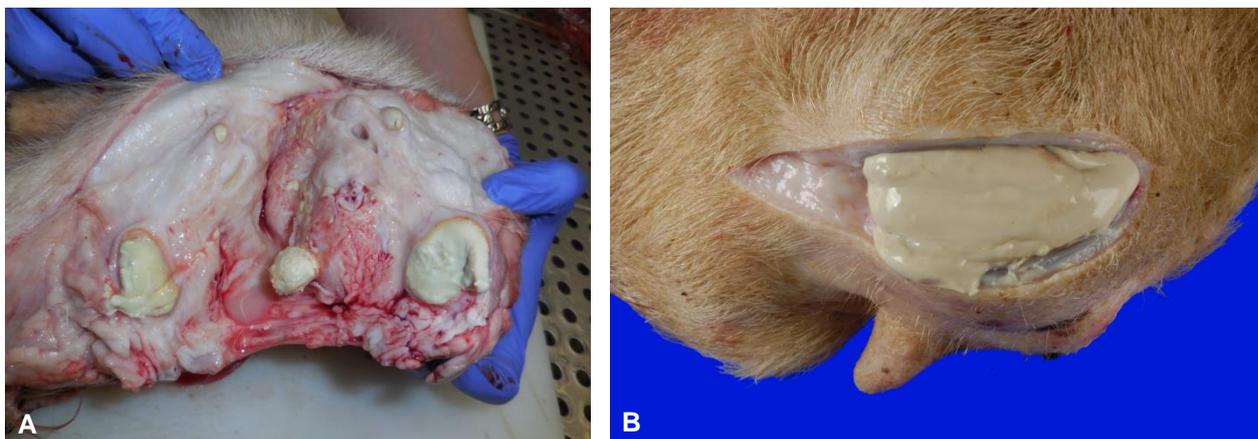
Uno studio del 2005 indica che *Str. agalactiae* si debba considerare un patogeno significativo che induce mastite nelle pecore. La malattia è caratterizzata da alta morbilità, facile trasmissione tra capi e rapida riduzione della produzione di latte (Zdragas et al., 2005). Esso è da considerarsi un patogeno intramammario stretto, ma è anche in grado di sopravvivere per un tempo limitato nell'ambiente o sulla cute degli animali (Keefe, 1997). *Str. agalactiae* è descritto anche come causa di mastite cronica nelle capre (Tripathi e Chattopadhyay, 1993).

#### **5.1.5 *Trueperella pyogenes***

*Trueperella pyogenes* è considerato tra i comuni germi che vivono nelle alte vie aeree e nel tratto genitale degli animali domestici (Ramos et al., 1997; Ertafi et al., 2005).

È anche un germe considerato opportunisto, responsabile di infezioni suppurative in molte specie di animali domestiche (Timoney et al., 1988), oltre che uccelli e uomo. *T. pyogenes* è implicata in malattie economicamente significative e in diverse sindromi nel bovino come ascessi epatici (Lechtenberg et al., 1988), mastiti (Hillerton e Bramley, 1989), aborto e infertilità (Semambo et al., 1991) e infezioni uterine nel *post partum* (Ruder et al., 1981).

Si può isolare nelle forme cliniche di mastite ovina e caprina (Mørk et al., 2007; Hadimli et al., 2010; Contreras et al., 2003) come agente di mastiti purulente (Figura 2A-B).



**Figura 2 (A e B).** Ovino. Mastite purulenta cronica, parenchima mammario in sezione con numerosi ascessi isolati e ben capsulati contenenti essudato purulento di colore verdastro. *Trueperella pyogenes*.

### 5.1.6 Stafilococchi coagulasi-negativi

Gli Stafilococchi coagulasi-negativi (SCN) sono da considerarsi germi opportunisti o comunque potenziali patogeni di minore virulenza associati a molti casi (oltre il 50%) d'infezione intramammaria subclinica negli ovini (Contreras et al., 2003; Contreras et al., 2007; Bonnefont et al., 2011; Gelasakis et al., 2015). Più raramente possono anche causare una forma di mastite clinica (Fthenakis e Jones, 1990).

Le specie più comunemente isolate sono *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus* e specie con una minore prevalenza, quali *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus muscae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus warneri* (Gelasakis et al., 2015).

*Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus caprae* sono tra i microrganismi causali più diffusi nelle capre, mentre *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus simulans* sono quelli più comunemente isolati nelle pecore (Bergonier et al., 2003; Contreras et al., 2007).

Nonostante il ruolo accertato di questi batteri come principali patogeni causanti infezione intramammaria nei piccoli ruminanti, la patogenicità delle diverse specie di SCN è molto variabile (Contreras et al., 2007).

Anche se meno patogeni di *Staphylococcus aureus*, gli SCN possono determinare una mastite subclinica persistente, aumentando significativamente la conta delle cellule somatiche, oltre a produrre enterotossine termostabili (Contreras et al., 2007). Il 60-80% dei ceppi di SCN isolati da mastiti subcliniche produce alfa e delta emolisine. Questi ceppi emolitici inducono un aumento delle cellule somatiche significativamente più alto rispetto ai ceppi non emolitici, mentre la produzione di leucotossine è assente o inferiore negli SCN rispetto a *Staphylococcus aureus* (Bergonier e Berthelot, 2003).

Gli SCN si trovano comunemente sulla cute e nell'ambiente (Plummer e Plummer, 2012). La natura opportunistica degli SCN si nota osservando come la loro prevalenza aumenti in contemporanea alle carenze dei sistemi di mungitura meccanica o alle carenze dell'igiene di mungitura (Contreras et al., 2003).

Sembra che la ghiandola mammaria della pecora sia più suscettibile all'infezione da SCN rispetto a quella della capra (Contreras et al., 2007).

### **5.1.7 Micoplasmi**

L'agalassia contagiosa è una malattia dei piccoli ruminanti causata da batteri del genere *Mycoplasma* spp. Il principale agente eziologico è *Mycoplasma agalactiae*, anche se altre specie, come *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* e *Mycoplasma putrefaciens* sono stati isolati negli ultimi anni da capre con mastite (Contreras et al., 2003; Gómez-Martín et al., 2013).

Questa malattia è endemica nel bacino del Mediterraneo, anche se si verifica in altre parti del mondo (Damassa et al., 1992; Contreras et al., 2003; Gómez-Martín et al., 2013).

Nelle greggi di capre da latte cronicamente infette, sono frequentemente osservate mastiti subcliniche, mentre episodi di mastiti cliniche si verificano sporadicamente. I sintomi clinici più caratteristici sono quelli che vanno a costituire la cosiddetta triade contraddistinta da episodi di artrite, cherato-congiuntivite e mastite, a cui si possono aggiungere disordini respiratori e riproduttivi (aborto) (Gómez-Martín et al., 2013).

L'infezione inizia come una mastite interstiziale che porta a un rialzo termico a livello locale, a una perdita di consistenza della mammella colpita e forte dolorabilità, seguiti poi da un calo della quantità e qualità del latte prodotto. Dopo alcuni giorni la mammella interessata dall'infezione si riduce in volume a causa del danno tissutale. Si possono osservare anche ascessi a livello mammario e aumento di volume dei linfonodi mammari. Se si verifica un esito positivo, le condizioni cliniche dell'animale migliorano in poche settimane, con una parziale ripresa della funzionalità ghiandolare della mammella colpita, ma la qualità del latte resta alterata. Se il danno mammario è stato grave, la fibrosi e l'atrofia possono essere responsabili di una persistenza di agalassia, l'animale quindi non sarà più in grado di produrre latte (Corrales et al., 2007; Gómez-Martín et al., 2013).

## **5.2 INFEZIONI VIRALI**

Per le specie ovina e caprina, l'interesse per le infezioni mammarie virali è limitato ai *Lentivirus dei piccoli ruminanti* (SRLV), che causano infezioni croniche e multisistemiche. Le manifestazioni cliniche tipiche si verificano in circa un terzo degli animali infetti e comprendono polmonite, artrite e mastite (Narayan e Clements, 1989).

Va inoltre considerata un'altra patologia virale che può interessare l'apparato mammario e a sua volta può favorire lo sviluppo di infezioni batteriche secondarie, che è l'ectima contagioso (Contreras et al., 2003).

### **5.2.1 Lentivirus**

Gli SRLV appartengono alla famiglia *Retroviridae*, sottofamiglia *Orthoretrovirinae*. Essi includono virus con diversi genotipi che frequentemente attraversano la barriera di specie tra pecore e capre, e mostrano una grande variabilità genetica (Minguijón et al., 2015).

La nuova classificazione ha previsto la suddivisione dei SRLV in quattro gruppi o genotipi (A, B, C e D) approssimativamente equidistanti l'uno dall'altro, a cui è stato aggiunto successivamente un quinto gruppo (genotipo E) (Grego et al., 2007). L'analisi del frammento gag-pol 1.8 kb e del frammento 1.2 kb pol, ha permesso di suddividere gli SRLV in due numerosi e dominanti gruppi di sequenze, A e B. Il gruppo A è un gruppo vasto ed eterogeneo, suddiviso in sette sottotipi (A1-A7), che include i clusters riguardanti il prototipo MVV, isolati EV1 e SA-OMVV. Il gruppo B è meno vario e comprende solo due sottotipi distinti, virus relativi al prototipo CAEV Cork (M33677). Il gruppo C riconosce come prototipo l'isolato virale norvegese, CAEV 1GA (AF322109), mentre il gruppo D comprende un'unica sequenza di un ovino svizzero solo sul gene pol. Per quanto riguarda il gruppo E sono stati identificati fino ad oggi due sottotipi (Reina et al., 2010).

L'infezione da SRLV è ampiamente diffusa nel mondo, anche se ci sono alcuni Paesi in cui non è mai stata riportata; altri Paesi come l'Islanda, la Nuova Zelanda e l'Australia sono considerati indenni in base alla Organizzazione Mondiale per la Salute Animale (OIE) (Peterhans et al., 2004).

Gli SRLV causano un'infezione sistemica in pecore e capre che può provocare lesioni significative in diversi organi bersaglio, quali polmone, sistema nervoso, ghiandola mammaria e articolazioni. La sintomatologia clinica è influenzata dal tropismo del virus, dalla specie affetta e dalla genetica di ogni razza o animale. In entrambe le specie, le sindromi respiratorie e nervose possono condurre l'animale a uno stato di cachessia e morte. Le sindromi mammarie e articolari non conducono a morte l'animale, ma possono causare gravi difficoltà di locomozione o una grave diminuzione della produzione di latte con pesanti ripercussioni su agnelli e capretti che risultano denutriti; la conseguenza di tutto ciò è l'abbattimento prematuro dei soggetti (Minguijón et al., 2015).

La sindrome mammaria comporta una diffusa mastite interstiziale periacinare che appare spesso con una intensa fibrosi che modifica profondamente la normale struttura della mammella. Questo è dovuto alla replicazione del virus nei macrofagi o nelle cellule epiteliali degli acini (Bolea et al., 2006), innescando un'intensa reazione infiammatoria che molto spesso coinvolge i linfociti e distrugge le cellule epiteliali degli acini, riducendo così la produzione di latte. Inoltre, follicoli linfoidi iperplastici si trovano sparsi in tutto il parenchima mammario degli acini e intorno ai dotti lattiferi (Minguijón et al., 2015).

Il latte non mostra cambiamenti delle proprie caratteristiche organolettiche. Sembra inoltre che la conta delle cellule somatiche non aumenti drammaticamente, anche se in uno studio sulle capre di Sánchez et al. (2001) è stato riportato un loro incremento (Minguijón et al., 2015).

L'eradicazione dell'infezione in una delle due specie in esame (ovina o caprina) non può escludere la presenza dell'infezione nell'altra (Peterhans et al., 2004). Infatti alcuni sottotipi (A3, A4, A6, B2) appartenenti a diversi gruppi di SRLV sono stati riscontrati sia nelle capre sia nelle pecore, costituendo la prova della trasmissione interspecie.

### **5.2.2 Orf virus**

L' *Orf virus*, responsabile dell'ectima contagioso, appartiene al genere *Parapoxvirus*, famiglia *Poxviridae*, sottofamiglia *Chordopoxvirinae* (Spyroua e Valiakos, 2015).

È un patogeno con una distribuzione mondiale che causa perdite economiche significative. La malattia colpisce ovini e caprini, ma sono riportati anche casi di infezione in altri ruminanti e mammiferi; è anche una zoonosi che riguarda principalmente persone che hanno contatto con animali infetti (allevatori, veterinari). La patologia è solitamente benigna e autolimitante, sebbene in molti casi, soprattutto in giovani animali, può essere persistente e persino fatale (mortalità inferiore all'1%). Le perdite produttive sono sottostimate dal momento che non è una malattia soggetta a denuncia (Spyroua e Valiakos, 2015).

Negli agnelli e nei capretti, dopo un periodo di incubazione di circa una settimana, si manifesta un rialzo termico iniziale che si evolve in lesioni cutanee nell'area della bocca, labbra e naso, con un pattern caratteristico: papule che diventano ulcere e possono essere ricoperte da essudato (McElroy e Bassett, 2007). Le lesioni si possono anche trovare nella cavità orale (lingua, gengiva e palato) e occasionalmente in esofago e abomaso (Spyroua e Valiakos, 2015).

Nelle pecore in lattazione questo virus può variare i meccanismi di difesa locali e potenzialmente può predisporre a mastiti (Mavrogianni e Fthenakis, 2007).

Infatti il virus codifica una serie di geni immunomodulatori che interferiscono con la risposta immunitaria dell'ospite, il virus produce interleuchina-10 che, a sua volta, sopprime la produzione di citochine da parte dei macrofagi dell'animale colpito deprimendone la risposta immunitaria (Mavrogianni et al., 2006). Le lesioni sono osservate principalmente sul capezzolo e intorno all'orifizio del capezzolo (Figura 3), sulla cute della mammella, e meno frequentemente nella zona inguinale e sul piatto interno della coscia (Nandi, 2011). Lesioni gravi a carico della mammella possono provocare da parte delle madri anche l'abbandono della prole, poiché l'allattamento diventa doloroso. Le pecore infette possono manifestare in seguito mastiti causate da *Mannheimia haemolytica* o da *Staphylococcus* spp. (Mavrogianni et al., 2006). La vaccinazione rappresenta ad oggi lo strumento più efficace per la prevenzione e il controllo dell'infezione (Spyroua e Valiakos, 2015).



**Figura 3.** Ovino. Lesioni da ectima contagioso sulla cute di mammella. *Parapoxvirus*.

### 5.3 INFEZIONI MICOTICHE

La mastite micotica è una patologia rara e di solito è il risultato dell'utilizzo prolungato di antibiotici. Possono essere implicati diversi miceti tra cui *Candida albicans*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus neoformans*, *Nocardia* spp., *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum* e *Aspergillus* spp., di quest'ultimo genere la specie *Aspergillus fumigatus* è quella più incriminata (Plummer e Plummer, 2012).

I segni clinici della mastite fungina includono la secrezione mammaria purulenta, l'indurimento della ghiandola colpita, l'ipertermia e la perdita di peso (Pérez et al., 1998).

Molti funghi filamentosi, incluso *Aspergillus* spp., sono comunque saprofiti e ubiquitari nell'ambiente e tendono a essere considerati come contaminanti quando sono isolati nei campioni di latte (Pérez et al., 1998).

## 6. MECCANISMI DI DIFESA DELLA GHIANDOLA MAMMARIA

I meccanismi di difesa della mammella nella pecora sono costituiti dalle sue caratteristiche anatomiche (strato corneo, sfintere del capezzolo, tappo di cheratina), dalla componente umorale (lattoferrina, lisozima, NAGasi, ecc..) e da fattori cellulari (Cannas e Dore, 2016).

L'insorgenza, la persistenza e la gravità delle infezioni mammarie dipendono dalla rapidità e dall'efficacia della risposta immunitaria dell'ospite contro i patogeni invasori (Brenaut et al., 2014).

La presenza di cellule somatiche nel latte è uno dei più importanti meccanismi di difesa della ghiandola mammaria e può essere considerata come una funzione di sorveglianza nella ghiandola non infetta (Sharma et al., 2011) che si innesca immediatamente alla comparsa di un processo infiammatorio.

Le sottopopolazioni cellulari sono costituite da cellule epiteliali, che derivano direttamente dalla mammella, e da cellule del sistema immunitario, rappresentate principalmente da macrofagi, linfociti e granulociti neutrofili polimorfonucleati (PMN), di provenienza ematica:

- i neutrofili sono essenziali per la difesa innata dell'ospite contro i microrganismi invasori poichè sono in grado di eliminare i patogeni attraverso un processo noto come fagocitosi. Durante la fagocitosi, i PMN rilasciano specie reattive dell'ossigeno (ROS) all'interno dei vacuoli in cui vengono incamerati e uccisi i patogeni (Souza et al., 2012);
- i monociti del sangue diventano macrofagi nei tessuti e costituiscono il principale tipo di cellula presente nel latte durante l'involutione della mammella. Durante la patogenesi delle infezioni batteriche i macrofagi servono sia per facilitare la risposta immunitaria innata che acquisita. In maniera analoga ai neutrofili, le funzioni non specifiche dei macrofagi sono la fagocitosi dei batteri e la loro distruzione mediante proteasi e specie reattive dell'ossigeno (Mullan et al., 1985);
- i linfociti sono le uniche cellule del sistema immunitario che riconoscono una varietà di strutture antigeniche attraverso i recettori di membrana che definiscono la loro specificità, diversità e caratteri di memoria (Oviedo- Boyso et al., 2007);
- le cellule dell'epitelio mammario possono giocare un ruolo di protezione nella prevenzione delle infezioni attraverso l'ingestione e la possibile digestione dei microbi fagocitati. Inoltre, le cellule dell'epitelio mammario sono in grado di produrre una varietà di mediatori infiammatori quali le citochine, le chemochine, i peptidi per la difesa dell'ospite e i metaboliti dell'acido arachidonico (Sharma et al., 2011).

Le percentuali di cellule somatiche nel latte di pecora esente da mastite sono molto simili a quelle osservate nella vacca: il 2-3% sono rappresentate dalle cellule epiteliali, il 2-40% da neutrofili, il 45-88% da macrofagi e il 6-20% sono rappresentate dai linfociti (Souza et al., 2012). Nel latte non infetto di capre, la conta delle cellule somatiche è più alta rispetto a quella osservata in vacche e pecore non

infette. Diversamente dal latte di queste ultime, i polimorfonucleati rappresentano il maggior tipo di leucociti (40-87%). Dal momento che i neutrofili rappresentano la prima linea di difesa contro le infezioni, questo potrebbe spiegare perché le capre sono molto più resistenti alle mastiti (Souza et al., 2012).

Un elevato numero di cellule somatiche nel latte è considerato il principale indicatore dell'infezione della ghiandola mammaria, causata da microrganismi specifici e non specifici, che causano mastite contagiosa o ambientale (Sharma et al., 2011). Poco dopo l'ingresso di un patogeno, i leucociti e le cellule epiteliali iniziano la risposta infiammatoria necessaria per eliminare i batteri invasori dalle ghiandole mammarie dei ruminanti. Queste cellule rilasciano sostanze chemotattiche per il rapido reclutamento dei PMN, dal sangue al sito di infezione (Souza et al., 2012). Durante questo processo, il maggior aumento delle cellule somatiche è dovuto principalmente all'afflusso di neutrofili nel latte, che possono rappresentare oltre il 90% delle cellule somatiche (Souza et al., 2012; Harmon, 1994).

Diversi autori hanno studiato l'esistenza di una correlazione fra CS e patogenicità dell'agente coinvolto, alcuni evidenziando un valore maggiore delle CS in presenza di "patogeni maggiori" come *S. aureus* (Leitner, 2011).

## 6.1 CELLULE SOMATICHE

Il prerequisito per la produzione di un latte che risponda ai requisiti igienico-sanitari è avere una ghiandola mammaria sana (Ariznabarreta et al., 2002).

L'utilizzo della conta delle cellule somatiche (CCS) per valutare la qualità del latte è molto comune e popolare; per ottenere e mantenere valori bassi di cellule somatiche (CS), si richiedono buone pratiche di gestione nei principali Paesi produttori di latte caprino (Berry e Broughan, 2007).

La CCS nel latte di massa rappresenta un importante indicatore per stimare la prevalenza di mastite all'interno dell'allevamento. La CCS nel latte individuale di emi-mammella rappresenta un indicatore dello stato sanitario del singolo animale (Cannas e Dore, 2016).

Per quanto riguarda il latte di massa, negli Stati Uniti il limite legale stabilito dalla Food and Drug Administration è di 750.000 per ml per le vacche e di 1.000.000 per ml per gli ovi-caprini (Paape et al., 2007). In Italia e nel resto dei Paesi dell'Unione Europea, le norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, compreso il latte, sono stabilite dal Regolamento (CE) N. 853/2004. Per il latte crudo di massa di vacca il tenore di cellule somatiche per ml deve essere  $\leq 400.000$  (espresso come media geometrica dei valori riferiti a 1 prelievo al mese per 3 mesi consecutivi); mentre per il latte crudo proveniente da altre specie, incluse quella ovina e caprina, non è stato fissato ad oggi alcun limite.

I livelli fisiologici di cellule somatiche nel latte di pecora sono ancora oggetto di controversie. Fattori multipli, oltre alla mastite, possono portare a fluttuazioni delle CS del latte, quali le pratiche di gestione dell'allevamento, lo stato di lattazione, il numero di parti, la frequenza di mungitura e la

presenza di infezioni da SRLV. Quindi, i loro numeri fisiologici e la tipologia di cellule, nonché la soglia da considerare a fini diagnostici, non sono ancora ben definiti nelle pecore (Pisanu et al., 2015).

Il valore delle CS nel latte individuale in una mammella ovina sana non dovrebbe essere superiore a 300.000 cellule/ml; Rosati (2005) riporta un valore di 265.000 cellule/ml quale valore discriminante fra campioni di latte positivi e campioni negativi all'esame colturale (Cannas e Dore, 2016).

Secondo Fragkou et al. (2014), valori di cellule somatiche  $> 1.0 \times 10^6$  di cellule  $\text{ml}^{-1}$  indicano una ghiandola mammaria con mastite clinica (infiammazione della ghiandola mammaria accompagnata da modificazioni clinicamente evidenti nel parenchima mammario o nel latte) o subclinica (infiammazione della ghiandola mammaria in assenza di modificazioni clinicamente evidenti), con nessuna necessità di fare un esame batteriologico dei campioni di latte per confermare la diagnosi. Valori di cellule somatiche compresi tra  $0.5 \times 10^6$  e  $1.0 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  indicano "mastite sospetta" e necessità di fare un esame batteriologico del latte. Valori di cellule somatiche  $< 0.5 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  indicano una ghiandola mammaria sana.

L'esame batteriologico del latte e la conta delle cellule somatiche sono metodi affidabili per rilevare nelle pecore da latte le mastiti subcliniche, ed è stata dimostrata una relazione inversa tra CS e produzione di latte (Ariznabarreta et al., 2002).

## 7. TERAPIA DELLE MASTITI

Protocolli dettagliati per il trattamento della mastite attualmente disponibili per le vacche, non sono ancora stati pubblicati per i piccoli ruminanti e in molti Paesi pochi farmaci sono autorizzati per la pecore (Gelasakis et al., 2015).

È ben noto come le strategie per controllare la mastite includono l'uso di disinfettanti durante le procedure di dipping dei capezzoli, corrette procedure di mungitura e terapie in asciutta (Lopez et al., 2015). Lo scopo della terapia in asciutta consiste nella cura di mastiti esistenti e nella prevenzione della genesi di nuove al momento del parto (Eberhart, 1986). Diversi studi hanno valutato l'efficacia del trattamento antibiotico in asciutta nelle pecore da latte (Gonzalo et al., 2004; Shwimmer et al., 2008; Linage e Gonzalo, 2008). In questi studi, l'uso della terapia in asciutta è stato associato con una ridotta prevalenza di infezione intramammaria nel periodo successivo allo svezzamento dell'agnello. Tuttavia bisogna sottolineare come gli studi siano stati condotti con metodi non sempre confrontabili.

Esistono anche alcune informazioni sull'efficacia della terapia intramammaria in asciutta nelle pecore da carne (McCarthy et al., 1988; Croft et al., 2000). Uno studio eseguito in Nord America ha valutato l'efficacia del trattamento antibiotico intramammario durante il periodo di asciutta di pecore che solitamente allattano gli agnelli (Hueston et al., 1989). Tale studio riporta come le pecore non trattate abbiano un rischio 2.6 volte superiore di sviluppare una nuova infezione intramammaria in confronto a quelle trattate.

Le strategie di trattamento in asciutta possono essere effettuate in maniera selettiva (solo le emimammelle affette da mastite) o generalizzata (a tutti gli animali). Una terapia antibiotica intramammaria generalizzata dovrebbe essere utilizzata nelle greggi con elevata prevalenza (> 50%), anche se una terapia in asciutta selettiva è preferibile quando si considerano alcune condizioni tipiche dei piccoli ruminanti (Poutrel et al., 1997). Il costo medio di trattamento per animale è più elevato rispetto al valore di abbattimento dei piccoli ruminanti, e quando è associato con un numero maggiore di animali da trattare mediante terapia in asciutta generalizzata o selettiva determina un ulteriore incremento del costo. Un'altra considerazione è l'elevato tasso di guarigione spontanea che varia tra il 35 e il 67% nei piccoli ruminanti (Paape et al., 2001; Bergonier e Bethelot, 2003). In questo scenario, l'utilizzo della terapia selettiva in asciutta potrebbe essere utile per ridurre i costi. Ulteriori vantaggi di tale strategia possono essere la riduzione del latte scartato e del potenziale rischio di residui di antibiotici nel latte (Gonzalo et al., 2004).

La maggior parte dei trattamenti disponibili è specifica per le vacche. I tempi di sospensione adottati per le vacche non sono necessariamente validi per le pecore. Infatti, le vie di escrezione degli antibiotici variano molto tra le ghiandole mammarie di vacca e pecora (Pengov e Kirbis, 2009). Così i tempi di sospensione, quando si utilizzano farmaci per le vacche nelle pecore, dovrebbero essere più lunghi di quelli raccomandati per le vacche da latte.

La terapia consigliata per la mastite nella pecora consiste nell'utilizzo di antibiotici iniettabili e farmaci antinfiammatori. Gli animali dovrebbero essere trattati non appena l'infezione viene identificata (AHDB, 2016). I farmaci antimicrobici sono spesso somministrati mediante iniezione intramuscolare o infusione intramammaria (Lopez et al., 2015). In linea di principio, il trattamento della mastite dovrebbe essere eseguito utilizzando l'infusione intramammaria di antibiotici, anche se la via intramuscolare può essere anche utilizzata sia da sola che in aggiunta a quella intramammaria. Attualmente non ci sono dati relativi al confronto tra l'efficacia delle due vie di somministrazione degli antibiotici.

Esistono pochi prodotti ufficialmente registrati e autorizzati per le pecore da latte. Negli Stati Uniti ci sono solo 8 farmaci approvati per la somministrazione intramammaria (Penicillina, Ampicillina, Ceftiofur, Cefalotina, Novobiocina/Penicillina, Etacillina, Pen/Streptomina, Eritromicina e Pirlimicina), ma nessuno di questi ha indicazioni specifiche per le pecore da latte ([www.accessdata.fda.gov/scripts/AnimalDrugsAtFDA/index.cfm?gb=2](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/AnimalDrugsAtFDA/index.cfm?gb=2)). Nell'Unione Europea esistono solo pochi farmaci intramammari registrati per le pecore da latte. In Italia la Cloxacillina è stata registrata con questo scopo (De Santis et al., 2001), mentre in Francia un solo trattamento è ufficialmente approvato per il trattamento intramammario per la pecora in asciutta (Longo e Pravieux, 2001). Quindi, se si opta per la via intramammaria, nelle pecore e nelle capre vengono generalmente utilizzati i prodotti autorizzati per le vacche (Shwimmer et al., 2008; Fthenakis e Menzies, 2011).

La somministrazione del farmaco dovrebbe essere successiva all'identificazione dell'agente causale e alla determinazione del suo profilo di suscettibilità antimicrobica (Kiossis et al., 2007).

Nelle pecore, la somministrazione degli antibiotici viene generalmente effettuata in asciutta una volta all'anno all'intero gregge per via intramuscolare (Bergonier et al., 2003).

I test di suscettibilità degli antibiotici *in vitro* rappresentano validi strumenti per studiare e monitorare la resistenza al farmaco nel tempo e dovrebbero essere condotti regolarmente sugli agenti responsabili di mastite. Diversi studi descrivono la prevalenza e l'andamento dell'antibiotico resistenza nei patogeni che causano mastite bovina; al contrario, le informazioni relative agli agenti patogeni che causano mastite nella pecora sono molto limitate (Lollai et al., 2008).

Dopo la somministrazione dell'antibiotico in asciutta si utilizza una soluzione germicida per la disinfezione del capezzolo. Se non vengono rispettate queste pratiche igieniche può insorgere il rischio di mastiti opportunistiche. La mastite micotica è generalmente associata all'infusione intramammaria di farmaci e siringhe contaminate (Kirk e Bartlett, 1986; Krukowski et al., 2000). Sono stati riportati nei piccoli ruminanti pochi casi di mastite micotica da *Aspergillus fumigatus* (Jensen et al., 1996; Pérez et al., 1998). È stata inoltre precedentemente osservata nelle pecore da latte un'associazione tra aspergillosi ed errata somministrazione di antibiotici in asciutta (Las Heras et al., 2000).

Vaccini contro gli stafilococchi patogeni sono attualmente disponibili sul mercato per i piccoli ruminanti e sono ampiamente utilizzati per prevenire la mastite gangrenosa. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi di immunizzazione per perfezionare questa strategia. Il miglioramento delle condizioni igieniche generali del gregge rimane la migliore strategia per controllare la mastite (Contreas et al., 2007).

## 8. ANTIBIOTICO RESISTENZA

L'era moderna degli antibiotici è iniziata con la scoperta della penicillina da parte di Sir Alexander Fleming nel 1928. Da allora, gli antibiotici rimangono la principale strategia terapeutica utilizzata per affrontare le malattie infettive, sia in medicina umana che in veterinaria. L'uso indiscriminato e improprio degli antibiotici, ha indotto i microrganismi ad adattarsi e sopravvivere mediante l'acquisizione di geni di resistenza che conducono alla formazione di ceppi antibiotico resistenti (Imperial e Ibane, 2016). Nei batteri, i geni dell'antibiotico resistenza possono essere ereditati o possono essere acquisiti da altre specie batteriche mediante elementi genetici mobili quali i plasmidi. Questo trasferimento orizzontale di geni può permettere all'antibiotico resistenza di passare quindi tra specie di batteri diversi. La resistenza può anche svilupparsi spontaneamente attraverso mutazione (Ventola, 2015).

Di conseguenza, una ridotta suscettibilità agli antibiotici e un concomitante aumento di antibiotico resistenza sono stati osservati non soltanto nei microrganismi che causano patologia, ma anche in quelli commensali (Imperial e Ibane, 2016).

L'antibiotico resistenza è la capacità dei microrganismi di sopravvivere e resistere ai trattamenti antimicrobici. L'uso eccessivo e l'abuso di antibiotici sono considerati le cause della crescita e della diffusione di microrganismi resistenti alla loro azione, con una conseguente perdita di efficacia delle terapie e gravi rischi per la salute pubblica (<https://www.efsa.europa.eu/it/topics/antimicrobial-resistance>). L'antibiotico resistenza è responsabile nell'Unione Europea di circa 25.000 decessi ogni anno; mentre la mortalità mondiale è stimata intorno a 700.000 decessi l'anno (<https://ec.europa.eu/health/amr/antimicrobial-resistance-en>). I batteri resistenti rappresentano quindi una delle più grandi minacce alla salute globale e alla sicurezza alimentare, con pesanti risvolti economici (WHO, 2012).

Negli animali da reddito gli antibiotici sono ampiamente utilizzati anche come promotori di crescita, sia nei Paesi sviluppati che in quelli in via di sviluppo. Negli Stati Uniti si stima che l'80% degli antibiotici sia utilizzato in veterinaria, soprattutto per promuovere la crescita oltre che per prevenire le infezioni (Ventola, 2015). L'utilizzo degli antibiotici in agricoltura influenza anche il microbioma ambientale. Fino al 90% degli antibiotici utilizzati per gli animali da reddito sono escreti nelle urine e nelle feci, e quindi abbondantemente dispersi nell'ambiente attraverso fertilizzanti e acque di falda (Ventola, 2015). Residui di antibiotici possono inoltre essere ingeriti dai consumatori di latte, prodotti lattiero-caseari, carne e verdure (Ventola, 2015). I batteri possono acquisire l'antibiotico resistenza, infettare umani e animali, e le infezioni che causano possono essere difficili da trattare. Di conseguenza, si verificano incremento delle spese mediche, dei ricoveri ospedalieri prolungati e della mortalità elevata (Barlett et al., 2013).

Nel 2001 la Commissione Europea ha varato una strategia per contrastare la minaccia della resistenza agli antimicrobici per la salute dell'uomo, degli animali e delle piante. Tale strategia prevede la graduale eliminazione degli antibiotici per uso non terapeutico negli animali, nonché una serie di misure a livello nazionale e comunitario nei settori della raccolta dei dati, della sorveglianza, della ricerca e della sensibilizzazione all'argomento. A partire dal gennaio 2006, la legislazione dell'Unione Europea in materia di nutrizione animale ha vietato l'uso degli antibiotici nei mangimi come promotori per la crescita (<https://www.efsa.europa.eu/it/topics/antimicrobial-resistance>).

Per quanto riguarda l'antibiotico resistenza nei piccoli ruminanti, un sondaggio eseguito in Sardegna nel 2008 (Lollai et al., 2008) ha identificato alti tassi di antibiotico resistenza tra i patogeni isolati da campioni di latte di pecore con mastite, comunque inferiori a quelli riportati nella vacca. Gli isolamenti di *S. uberis* sono risultati resistenti alla Kanamicina (84,5%) e alla Streptomicina (92,5%). Una minore resistenza agli aminoglicosidi è stata identificata tra gli isolamenti di *S. aureus* (14,6% per Kanamicina e 63,3% per Streptomicina). Inoltre, gli stafilococchi hanno mostrato una ridotta resistenza alla Penicillina rispetto a quella comunemente riportata (4.1% di *S. aureus* penicillino resistente e 15.3% di SCN penicillino resistenti).

## 9. RESUI DEGLI ANTIBIOTICI NEL LATTE

Recentemente, in seguito a un incremento della produzione di latte nei piccoli ruminanti, si è verificato un aumento della frequenza dei casi di mastite anche nelle pecore e nelle capre. Nella pecora il trattamento della mastite e di altre patologie con prodotti farmacologici è una pratica standard, e in molti casi la contaminazione del latte con residui antibiotici può essere causata da trattamenti non necessari, eseguiti senza una prescrizione veterinaria e con una conoscenza inadeguata del dosaggio corretto, della via di somministrazione o dei tempi di eliminazione dell'antibiotico. Una ragione per questo fenomeno si identifica nel fatto che la maggior parte dei trattamenti disponibili per la mastite sono specifici per le vacche e non per le pecore. Infatti, non sono stati stabiliti in maniera specifica i tempi di sospensione per il latte di pecore trattate con antibiotici (Molina et al., 2003).

La persistenza di residui antibiotici nel latte è collegata a diverse variabili, quali la produzione giornaliera di latte al momento del trattamento, la tipologia e il dosaggio dell'antibiotico usato, e lo stato patologico dell'animale (Molina et al., 2003).

I residui degli antibiotici nel latte dovrebbero essere evitati per molte ragioni (Brady e Katz, 1988; Yamaki et al., 2004):

- alcuni residui possono causare reazioni di idiosincrasia in consumatori molto sensibili che potrebbero essere estremamente serie;
- alcuni residui di antibiotici sono in grado di interferire con le colture degli starter utilizzati per la caseificazione dei formaggi;
- i residui contribuiscono allo sviluppo dell'antibiotico resistenza;
- i residui indicano che il latte può provenire da animali che hanno gravi infezioni.

Questi rischi hanno indotto l'Unione Europa a stabilire un "Piano Nazionale per il Monitoraggio dei Residui" (Direttiva del Consiglio 96/23/CE) concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti, tra cui il latte di specie non bovine. Inoltre, sono state stabilite delle linee guida per il numero minimo e la frequenza dei campionamenti (Decisione della Commissione 97/747/CE) (Yamaki et al., 2004; Bilandžić et al., 2011).

Successivamente, nel 2010 la legislazione dell'Unione Europea si è ampliata con il Regolamento della Commissione N. 37/2010, il quale pone le basi per le procedure comunitarie volte a stabilire i limiti massimi di residui (LMR) negli alimenti di origine animale (Bilandžić et al., 2011).

# 10. ALTERNATIVE AGLI ANTIBIOTICI

Attualmente, lo sviluppo di alternative agli antibiotici è fortemente incoraggiato per ridurre il rischio dell'antibiotico resistenza e di residui negli alimenti, e per ridurre i costi dei trattamenti per gli allevatori.

Ridurre l'uso degli antimicrobici negli animali da reddito, sostituirli ove possibile e ripensare il sistema di produzione degli animali è fondamentale per il futuro della salute animale e di quella pubblica. La resistenza agli antimicrobici è uno dei problemi di salute pubblica più pressanti al mondo e l'uso degli antimicrobici negli animali contribuisce al problema. A ciò si aggiunge la presenza di residui di antibiotici negli alimenti. Limitarne l'uso al minimo necessario è dunque cruciale per curare le malattie infettive negli animali (<https://www.efsa.eu/it/press/news/170124-0>). Le alternative agli antimicrobici che hanno dimostrato di migliorare la salute degli animali e quindi ridurre la necessità agli antimicrobici comprendono vaccini, probiotici, prebiotici, batteriofagi e acidi organici (<https://www.efsa.eu/it/press/news/170124-0>).

## 10.1 PROBIOTICI

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha definito i probiotici come "microrganismi vivi che conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite quando vengono somministrati in quantità adeguate" (Gillor et al., 2008).

Le norme che disciplinano l'autorizzazione delle indicazioni sulla salute apposte sui prodotti alimentari nell'Unione Europea sono illustrate nel Regolamento (CE) 1924/2006. In base a tale Regolamento, le indicazioni sulla salute possono essere autorizzate per l'uso solo dopo un'apposita valutazione scientifica da parte dell'EFSA (<https://www.efsa.europa.eu/it/press/news/160118>).

Le potenziali specie di probiotico differiscono in base alla loro biodisponibilità, all'attività metabolica e al meccanismo di azione. Tuttavia, per essere utilizzate nell'ospite devono essere non patogene e non tossiche. Inoltre, il probiotico deve sopravvivere al passaggio sino alla sede di elezione e quindi persistere, in modo da proteggere l'ospite contro le infezioni da microrganismi patogeni (Gillor et al., 2008).

Differenti criteri per definire un ceppo come potenzialmente probiotico includono le seguenti condizioni:

- organismi GRAS "generalmente riconosciuti come sicuri",
- vitalità durante il processamento e lo stoccaggio,
- effetto antagonista contro i patogeni,
- tolleranza all'attacco degli acidi biliari e aderenza all'epitelio intestinale dell'ospite (Bogni et al., 2011).

L'utilizzo dei batteri probiotici è stato ampiamente studiato come approccio alternativo per prevenire le infezioni negli animali, soprattutto a livello gastroenterico e vaginale. I probiotici possono esercitare i loro effetti benefici sulla salute dell'ospite attraverso diversi meccanismi (Frola et al., 2012):

- adesione alle cellule epiteliali,
- colonizzazione,
- formazione di un biofilm,
- produzione di biosurfactante,
- aggregazione e coaggregazione,
- competizione per i nutrienti e recettori cellulari,
- produzione di enzimi,
- modulazione del sistema immunitario,
- produzione di metaboliti antagonisti (acidi organici, perossido di idrogeno, batteriocine).

È probabile che i microrganismi possono esercitare i loro effetti come risultato di uno o più di questi meccanismi (Frola et al., 2012).

Tra i batteri lattici (LAB), i generi più comunemente usati come probiotici sono i Gram positivi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Saccharomyces*. I generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* sono quelli principalmente studiati a causa del loro utilizzo sicuro ampiamente documentato nell'industria casearia e della loro naturale presenza nell'intestino dell'uomo (Bogni et al., 2011).

Sebbene i probiotici siano in grado di influenzare positivamente la salute degli animali da reddito, il loro meccanismo d'azione non è ancora completamente chiaro. Negli ultimi decenni, sono stati pubblicati diversi studi sull'effetto di colture vive di batteri e lieviti sulla salute e benessere degli animali da reddito e da compagnia.

I microrganismi utilizzati come probiotici appartengono a generi e specie differenti. La loro efficacia è stata studiata in diverse patologie e problemi metabolici (FAO, 2016). I probiotici migliorano la produttività, incrementano la produzione di latte, determinano una migliore digestione dei nutrienti e aumentano il tasso di crescita dei ruminanti (FAO, 2016). Essi sono impiegati in diverse specie di animali da reddito, in particolare bovini, polli, suini, trota iridea, gatti, cani, capre, equini, pecore e conigli (Lee e Salminen, 2009).

Nelle pecore, i probiotici sono principalmente utilizzati nella prevenzione e nel trattamento di condizioni patologiche che derivano da squilibri alimentari. La somministrazione parallela di probiotici e prebiotici aiuta a correggere gli squilibri della flora batterica, fornisce energia, aiuta la reidratazione e riduce i tempi di recupero (Corcionivoschi et al., 2010).

## 10.2 BATTERIOCINE

Col termine "batteriocine", coniato nel 1953 da Jacob e colleghi, vengono indicate quelle molecole proteiche di produzione batterica generate indifferentemente da Gram positivi e da Gram negativi e dotate di attività inibitoria nei confronti di ceppi batterici diversi dal ceppo produttore, ma a questo strettamente correlati (Gillor et al., 2005). Esse vengono definite come peptidi sintetizzati a livello ribosomiale Klaenhammer (1988). I microrganismi produttori di batteriocine non subiscono l'azione

della batteriocina da loro stessi prodotta grazie allo sviluppo di un'immunità specifica mediata da una proteina (Hancock e Chapple, 1999).

In accordo con Klaenhammer (1988), il 99% di tutti i batteri può produrre almeno una batteriocina e l'unica motivazione per cui non ne sono state isolate in numero maggiore è che pochi studiosi le hanno ricercate (Gillor et al., 2008).

Le batteriocine prodotte dai lattobacilli, che sono state ampiamente utilizzate nella fermentazione e nella conservazione di carne e latte, sono quelle maggiormente caratterizzate all'interno di questo gruppo. L'attuale classificazione delle batteriocine si basa sia sulla loro natura chimica che sul loro spettro d'azione; sulla base di queste caratteristiche sono state individuate quattro classi (Klaenhammer, 1988; Cotter et al., 2006):

- classe I: comprende batteriocine modificate, a basso peso molecolare, termostabili, note come lantibiotici poiché contengono aminoacidi non tradizionali come la lantionina;
- classe II: comprende batteriocine di piccole dimensioni, idrofobiche, relativamente termostabili e minimamente modificate (questa classe viene a sua volta suddivisa in 3 sottoclassi);
- classe III: comprende batteriocine di notevoli dimensioni e termolabili;
- classe IV: include batteriocine complesse in grado di trasportare molecole lipidiche o glucidiche indispensabili per la loro attività.

La maggior parte della ricerca sui probiotici si è focalizzata soprattutto sulle classi I e II.

I batteri lattici (LAB) ovvero i lantibiotici, si chiamano in questo modo perché sono modificati in sede post-traduzionale per contenere aminoacidi quali ponti tioeteri di lantionina e 3-metilantionina o deidroalanina (Twomey et al., 2002). Essi producono batteriocine, sintetizzate a livello ribosomiale, che agiscono nei confronti di batteri Gram positivi e sono suddivisi in gruppi sulla base della loro struttura e del meccanismo d'azione (Gillor et al., 2008):

- Lantibiotici di tipo A (produttori di nisina): sono proteine piccole (2-5 kDa), di forma allungata che contengono molecole cariche positivamente e che uccidono attraverso la formazione di pori, con conseguente dissipamento del potenziale di membrana ed efflusso di piccoli metaboliti (ioni, aminoacidi, ATP) dalle cellule sensibili. La nisina ha un duplice meccanismo di azione (Gillor et al., 2008):
  - si lega al lipide II, il principale trasportatore delle subunità di peptidoglicano dal citoplasma alla parete cellulare, prevenendo quindi la corretta sintesi della parete cellulare del batterio, con conseguente morte cellulare;
  - utilizza il lipide II come molecola di attracco per iniziare un processo di inserzione della membrana e di formazione di pori che conduce a una rapida morte cellulare.
- Lantibiotici di tipo B (produttori di mersacidina): uccidono interferendo con le reazioni enzimatiche cellulari, quale la sintesi della parete cellulare (Gillor et al., 2008).

La continua scoperta di lantibiotici che non appartengono a nessuno dei due gruppi, fa sì che la classificazione sia continuamente aggiornata. Twomey e colleghi (2002) hanno recentemente diviso i lantibiotici in sei sottogruppi. Uno dei quali, composto da lantibiotici a due componenti, produce la

latticina 3147, la cui attività antimicrobica è data dalla sinergia dei due peptidi che la costituiscono (Gillor et al., 2008).

Le batteriocine, a spiccata attività antimicrobica, hanno riscosso un crescente interesse soprattutto per il loro possibile impiego sia in campo clinico che tecnologico alimentare.

La batteriocina più studiata è senza dubbio la nisina prodotta da *L. lactis*. Essa rappresenta, sino ad ora, l'unica batteriocina approvata dalla Food and Drug Administration come conservante alimentare (E 234) e utilizzata a questo scopo in più di 50 Paesi (Gillor et al., 2005; Gillor et al., 2008).

### 10.3 VALUTAZIONE DI UN POTENZIALE PROBIOTICO

I meccanismi alla base degli effetti benefici dei probiotici non sono completamente chiariti (Sungsoo Cho, 2010).

Quando si seleziona un ceppo probiotico (FAO/WHO, 2002), dovrebbero essere considerati diversi aspetti e le basi teoriche per la selezione dovrebbero comprendere sia le proprietà funzionali che tecnologiche desiderabili. Esempi di caratteristiche desiderabili per un ceppo probiotico includono la capacità di sopravvivere e di mantenere la vitalità a determinate condizioni (concentrazioni acide e biliari) che imitano l'ambiente sfavorevole di un tratto gastrointestinale umano sano, criteri di sicurezza come l'assenza di geni dell'antibiotico resistenza acquisiti, così come la capacità di produrre sostanze antimicrobiche (FAO / WHO, 2002).

Numerose specie batteriche del genere *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* e *Enterococcus* sono state identificate come probiotici, molti dei quali si differenziano notevolmente nella loro modalità di azione. Un meccanismo d'azione generale è l'adesione del probiotico all'epitelio intestinale, che non solo stimola il sistema immunitario ma riduce anche la colonizzazione dei patogeni e l'infezione conseguente (Sungsoo Cho, 2010).

Molti test *in vitro* sono consigliati per valutare la potenziale adesione del probiotico all'epitelio intestinale. Oltre ai test *in vitro*, possono essere usati modelli animali per sperimentazioni precliniche di un potenziale ceppo probiotico.

È stato sviluppato e caratterizzato da Chandler già negli anni '70 un modello sperimentale di mastite murina (Notebaert e Meyer, 2006). I modelli di mastite murina prevedono la somministrazione di un agente che provoca mastite nella ghiandola mammaria di topo, la valutazione della risposta immunitaria dell'ospite, la progressione e la risoluzione della malattia. Anche se la dimensione fisica ridotta dei topi può sollevare difficoltà tecniche, come la manipolazione e il campionamento dei tessuti, i modelli di mastite murina offrono vantaggi significativi in termini di tempo e costi rispetto ai modelli dei grandi animali (Ingman et al., 2015). Diversi agenti che provocano mastite sono stati utilizzati nei modelli di mastite murina, tra cui *E. coli*, *S. aureus* e, più recentemente, *S. chromogenes* (Brein et al., 2015; Notebaert e Meyer, 2006; Ingman et al., 2015). La latticina NK34 (una forma parzialmente purificata di latticina NK34), ha effetti *in vivo* preventivi e terapeutici in un modello murino di mastite (Kim et al., 2010).

## 10.4 PROBIOTICI E BATTERIOCINE UTILIZZATI NELLA MASTITE DEI RUMINANTI

I batteri probiotici possono essere usati per controllare diversi processi infiammatori attraverso l'antagonismo e l'immunomodulazione (Bogni et al., 2011).

Negli ultimi vent'anni, sono stati proposti diversi nuovi trattamenti come alternative agli antibiotici per prevenire e curare la mastite bovina. Tra questi, hanno suscitato particolare interesse i batteri lattici (LAB) e i loro peptidi antimicrobici (batteriocine), entrambi in grado di inibire la crescita dei batteri Gram positivi.

Batteri commensali, con un ampio spettro di attività antimicrobica, sono stati isolati da mammelle bovine sane e considerati come potenziali agenti antimastite (Bogni et al., 2011).

Greene e colleghi (1991) hanno studiato gli effetti del trattamento di infezioni mastitiche subcliniche da SCN in vacche mediante infusioni intramammarie di *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* (Lactobac, probiotico commerciale). Anche se gli autori hanno osservato un aumento delle CS, non è stato riscontrato alcun miglioramento nella mastite (Bogni et al., 2011; Green et al., 1991).

Risultati incoraggianti per il trattamento della mastite cronica subclinica e clinica bovina sono stati ottenuti in seguito all'inoculazione di una coltura viva di *L. lactis* DPC 3147, un trattamento ritenuto sicuro ed efficace come una comune terapia antibiotica. La coltura di *L. lactis* DPC 3147 è risultata efficace nella riduzione dell'infezione in casi clinici di mastite da *S. aureus* (Klostermann et al., 2008).

Crispie e colleghi (2008) hanno osservato che la somministrazione della coltura dello stesso lattococco nella ghiandola mammaria di animali non infetti stimola un effetto immunomodulatorio che produce un reclutamento di polimorfonucleati e linfociti nei quarti infusi. Dall'altro canto la latticina 3147, una batteriocina prodotta da *Lactococcus lactis* 3147, mostra un ampio spettro antimicrobico *in vitro* contro patogeni causanti mastite. Usata in combinazione con un disinfettante del capezzolo a base di bismuto, sembra conferire protezione contro l'infezione da *Strep. dysgalactiae* e *S. aureus* in vacche in asciutta (Bogni et al., 2011).

Frola e colleghi, hanno eseguito l'infusione intramammaria di *Lactobacillus perolens* CRL 1724 isolato dal latte di vacca. Essi hanno concluso che *L. perolens* CRL 1724 può essere incluso in una formulazione non antibiotica per la prevenzione della mastite bovina (Frola et al., 2012).

L'infusione intramammaria di *L. perolens* CRL 1724 (Frola et al., 2012) e di *Weissella confuse* (Enriquez-Valencia et al., 2015) nelle mammelle bovine ha innescato una risposta immunitaria innata, con conseguente reclutamento transitorio dei PMN e dei linfociti nella ghiandola (Frola et al., 2012; Enriquez-Valencia et al., 2015).

In letteratura sono pertanto riportati risultati controversi in relazione all'utilizzo di batteri lattici (LAB) per il trattamento della mastite nei bovini da latte attraverso inoculi intramammarie.

Altra strategia alternativa contro i patogeni della mastite sono le batteriocine che solitamente hanno come target solo specie strettamente correlate ad esse. Il vantaggio delle batteriocine rispetto agli

antibiotici nei trattamenti è quello di poter essere indirizzate contro specifici organismi patogeni. Le batteriocine identificate per un potenziale uso come antimicrobici comprendono lantibiotici (prodotti da ceppi di batteri lattici), le colicine e le microcine (prodotte da batteri Gram negativi) (Bogni et al., 2011).

Le più studiate in questo campo sono la nisina e la latticina 3147.

L'efficacia delle formulazioni a base di batteriocine, somministrate attraverso dipping del capezzolo o infusione intramammaria, è stata documentata sia per il trattamento della mastite bovina clinica e subclinica sia per la prevenzione della mastite da streptococchi e stafilococchi (Camperio et al., 2017).

La nisina è un polipeptide antimicrobico prodotto da *L. lactis* che si considera non tossico per l'uomo (Cao et al., 2007). Essa è stata la prima ad essere identificata cercando di trovare un'applicazione pratica per il trattamento delle mastiti bovine. L'interesse per l'uso della nisina come agente terapeutico è stato rinnovato nel 1989 quando Broadbent e colleghi (1989) hanno dimostrato il suo effetto inibitorio nei confronti di diversi patogeni Gram positivi che causano mastite. L'uso pratico della nisina è stato investigato da Sears e colleghi, (1992) in combinazione con l'isostafina attraverso la somministrazione di infusioni intramammarie ottenendo risultati promettenti (tassi di cura del 66% per *S. aureus*, del 95% per *Strep. agalactiae* e 100% per *Strep. uberis*).

Gli studi *in vivo* in vacche da latte in lattazione hanno mostrato che infusioni intramammarie a base di nisina sono efficaci nel trattamento della mastite clinica e subclinica causata da diversi patogeni (Cao et al., 2007).

In uno studio *in vivo*, sempre condotto sul bovino, è stato anche dimostrato che la latticina 3147, una batteriocina prodotta da *L. lactis* subsp. *lactis* DPC3147, è efficace contro un ampio range di batteri Gram positivi, inclusi molti patogeni che causano la mastite (Klostermann et al., 2010).

# **PARTE SPERIMENTALE**

# **11. INFUSIONE INTRAMAMMARIA DI UNA COLTURA VIVA DI *L. LACTIS* IN PECORE CON MASTITE DA STAFILOCOCCI**

## **11.1 INTRODUZIONE e SCOPO**

Numerosissimi studi sono stati condotti sulle applicazioni terapeutiche dei batterici lattici e delle batteriocine nella cura e nella prevenzione delle mastiti delle vacche. Non è invece disponibile in letteratura alcun tipo di informazione sull'utilizzo dei batteri lattici nelle mastiti nei piccoli ruminanti.

Durante il periodo di dottorato sono stati svolti due studi in campo che valutano, per la prima volta, l'efficacia dell'infusione intramammaria di una coltura viva di un ceppo di *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) che produce nisina nel trattamento della mastite subclinica e clinica delle pecore.

Per decidere nei confronti di quali patogeni testare le potenziali proprietà probiotiche del *L. lactis*, sono stati raccolti i dati degli isolamenti batterici da latte ovino eseguiti dagli Istituti Zooprofilattici della Sicilia e della Sardegna.

Nelle Tabelle 3 e 4 sono visibili i maggiori patogeni che circolano nel loro territorio. In entrambe le regioni gli agenti mastidogeni maggiormente diffusi sono stati i batteri opportunisti rappresentati dagli stafilococchi coagulasi-negativi presenti nel 2012 nel 52% degli allevamenti esaminati in Sardegna, mentre in Sicilia ben il 78% dei campioni di latte individuale sono risultati positivi agli SCN nel periodo compreso tra il 2006 e il 2012. Al secondo posto, in entrambe le regioni, è stato isolato lo *S. aureus* rispettivamente con il 29% in Sardegna e l'11% in Sicilia.

Anno	Allevamenti ovi-caprini campionati	Batteri contagiosi/opportunisti				Batteri ambientali				
		Stafilococchi Coagulasi Negativi	<i>Stafilococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>dysgalactiae</i>	Coryneiformi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	Enterobacteriacee	Streptococcus spp.	Enterococchi
	n°	%	%	%	%	%	%	%	%	%
2004	1026	42.1	36.5	4.6	5.5	9.4	16.0	7.1	6.5	9.0
2005	699	43.2	33.3	6.7	4.4	13.2	17.2	12.7	8.2	10.7
2006	785	46.2	19.0	5.9	5.9	16.9	15.2	12.2	10.2	10.4
2007	1019	64.7	29.5	5.7	5.7	13.4	16.2	13.1	6.5	13.3
2008	713	55.4	31.8	7.4	7.3	12.9	13.6	9.7	20.9	12.2
2009	555	50.1	29.9	6.3	9.0	15.1	12.6	14.2	9.2	10.8
2010	535	48.8	34.6	6.5	7.3	14.2	19.6	12.3	6.5	12.0
2011	450	42.0	34.0	6.2	4.4	15.1	16.9	15.1	17.8	12.0
2012	541	52.68	29.39	6.47	3.88	12.20	17.93	6.84	4.44	11.46

Tabella 3. Dati relativi alla regione Sardegna

Anno	Campioni di latte individuale esaminati	Campioni di latte individuale con esito positivi	Batteri contagiosi/opportunisti				Batteri ambientali				
			Stafilococchi Coagulasi Negativi	<i>Stafilococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>dysgalactiae</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>	Coryneiformi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Enterobacteriaceae	Streptococcus spp.	Enterococchi
	n°	n°	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)
2006-2012	14072	6327	4966 (78.5%)	748 (11.8%)	164 (2.6%)	39 (0.6%)	11 (0.2%)	73 (1.1%)	42 (0.7%)	192 (3%)	92 (1.5%)

Tabella 4. Dati relativi alla regione Sicilia.

## 11.2 MATERIALI E METODI

### 11.2.1 Selezione degli animali e progettazione dello studio

In ognuno dei due studi sono stati arruolati sia pecore sane (con entrambe le ghiandole mammarie sane) sia pecore infette con mastite (che hanno almeno una ghiandola mammaria infetta). Tutti gli animali erano nella fase terminale della lattazione. Prima di ogni prova, è stato monitorato lo stato di salute delle mammelle di ogni animale. Sono state incluse sia le emimammelle infette che quelle non infette. La diagnosi di mastite clinica o subclinica per singoli animali è stata formulata in accordo con Fragkou et al. (2014), anche se i valori di cut off di cellule somatiche (CCS) per la diagnosi di mastite ovina o di ghiandole sane erano leggermente ridotti sulla base dell'esperienza del gruppo di ricerca sulle razze di pecora considerate in questo studio. Brevemente, valori di CCS  $> 0.5 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  indicano una ghiandola mammaria con mastite clinica (infiammazione mammaria accompagnata da modificazioni clinicamente rilevabili nel parenchima mammario o nel latte) o mastite subclinica (infiammazione mammaria in assenza di modificazioni clinicamente rilevabili). La diagnosi di mastite subclinica è stata basata sull'identificazione dell'infezione (ovvero l'isolamento di specie stafilococciche diverse da *S. aureus* dal latte con almeno  $10^3$  UFC  $\times \text{ml}^{-1}$ ) e/o la presenza di reazione infiammatoria nella ghiandola mammaria. Una ghiandola è stata considerata sana in assenza di segni clinici di infezione, con CCS  $< 0.3 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  e una coltura del latte negativa. Una ghiandola è stata considerata "sospetta" con CCS tra  $0.3 \times 10^6$  e  $0.5 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  e classificata come infetta o sana se il risultato batteriologico parallelo era rispettivamente positivo o negativo.

Tutti gli animali sono stati munti regolarmente due volte al giorno. La mammella è stata regolarmente preparata prima della mungitura, attraverso lo "stripping" dei primi 3-4 getti di latte e l'asciugatura dei capezzoli con singoli tovaglioli di carta. Dopo la mungitura è stato utilizzato in tutti gli animali un prodotto disinfettante contenente clorexidina. Sono stati eseguiti in entrambi gli studi gli esami clinici delle ghiandole, così come il campionamento di latte per le analisi di laboratorio.

### 11.2.2 Studio 1

Nel 2014 sono state selezionate 19 pecore in lattazione di razza Sarda, comprendenti pecore sane ( $n = 6$ ) e pecore affette da mastite ( $n = 13$ ), provenienti da un unico gregge localizzato nell'area di Sassari, in Sardegna e allevate, alle stesse condizioni di gestione, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna. Gli animali infetti presentavano tutti mastite subclinica da SCN e in molti di loro l'infezione era bilaterale. Un totale di 38 ghiandole mammarie o emimammelle, comprendenti sia quelle sane che quelle infette, sono state incluse nello studio. Le ghiandole infette da SCN ( $n = 21$ ) sono state casualmente suddivise in tre gruppi:

- SCN-LL (ghiandole infette da SCN trattate con *L. lactis*)  $\rightarrow (n = 13)$ ,
- SCN-PBS (ghiandole infette da SCN trattate con PBS)  $\rightarrow (n = 4)$ ,
- SCN-UNT (ghiandole di controllo infette non trattate)  $\rightarrow (n = 4)$ .

Le ghiandole sane ( $n = 17$ ) sono state casualmente suddivise in due gruppi:

- HLT-LL (ghiandole sane trattate con *L. lactis*) → (n = 7),
- HLT-UNT (ghiandole di controllo sane non trattate) → (n = 10).

Tutti i gruppi sono elencati nella Tabella 5.

### 11.2.3 Studio 2

Nel 2015 sono state selezionate 36 pecore in lattazione, comprendenti pecore sane e pecore infette, appartenenti alle razze Valle del Belice e Comisana, selezionate da due greggi confinanti della zona di Catania in Sicilia. Lo studio è stato condotto negli allevamenti di origine degli animali. Tutte le pecore sono state sottoposte alle stesse condizioni gestionali. Le pecore erano affette sia da mastite subclinica da SCN (n = 26), e sia da mastite clinica da *S. aureus* (n = 10). Le infezioni erano unilaterali o bilaterali, e le infezioni bilaterali potevano essere causate da uno o entrambi gli agenti patogeni (con una ghiandola infetta da SCN e l'altra da *S. aureus*). Le ghiandole il cui l'esame microbiologico o i valori delle cellule somatiche non erano disponibili durante il periodo di selezione sono state escluse dallo studio. Sono state considerate un totale di 65 ghiandole mammarie, comprendenti sia le ghiandole infette (n = 52) che quelle sane (n = 13). Le ghiandole infette erano positive all'esame colturale sia per i SCN (n = 42) che per lo *S. aureus* (n = 10). Le ghiandole infette da SCN sono state suddivise in tre gruppi:

- SCN-LL (ghiandole infette da SCN trattate con *L. lactis*) → (n = 25),
- SCN-PBS (ghiandole infette da SCN trattate con PBS) → (n = 8),
- SCN-UNT (ghiandole di controllo infette non trattate) → (n = 9).

Le ghiandole infette da *S. aureus* sono state raggruppate in un unico gruppo:

- S.AU-LL (ghiandole infette con *S. aureus* trattate con *L. lactis*) → (n = 10).

Le ghiandole sane sono state anch'esse incluse in un unico gruppo di controllo non trattato:

- HLT-UNT (ghiandole di controllo sane non trattate ) → (n = 13).

Tutti i gruppi sono elencati nella Tabella 5.

	Stato di salute delle ghiandole mammarie	Trattamenti	Gruppi
<b>Studio 1</b>	Ghiandole infette da SCN (n = 21)	<i>L. lactis</i> PBS Non trattate	SCN-LL (n = 13) SCN-PBS (n = 4) SCN-UNT (n = 4)
	Ghiandole sane (n = 17)	<i>L. lactis</i> Non trattate	HLT-LL (n = 7) HLT-UNT (n = 10)
<b>Studio 2</b>	Ghiandole infette da SCN (n = 42)	<i>L. lactis</i> PBS Non trattate	SCN-LL (n = 25) SCN-PBS (n = 8) SCN-UNT (n = 9)
	Ghiandole sane (n = 13)	Non trattate	HLT-UNT (n = 13)
	Ghiandole infette da <i>S. aureus</i> (n = 10)	<i>L. lactis</i>	S.AU-LL (n = 10)

**Tabella 5.** Ghiandole mammarie degli studi 1 e 2: suddivisione a secondo del tipo di trattamento eseguito.

#### 11.2.4 Protocolli di trattamento

Durante il corso della procedura sperimentale, le pecore sono state allevate in strutture approvate dal Ministero della Salute italiano (Studio 1) o negli allevamenti di origine degli animali (Studio 2), in accordo con le loro caratteristiche biologiche, di allevamento e dei fabbisogni alimentari per garantire il benessere animale. Tutte le procedure sperimentali sono state concepite per ridurre al minimo il disagio e il dolore agli animali e sono state approvate dal Ministero della Salute (numeri di autorizzazione 17757-31/12/2013 e I/0002003/14-31/01/2014). I veterinari e gli addetti incaricati della cura degli animali si assicuravano che le procedure approvate fossero rispettate. La cura e il trattamento degli animali sono stati condotti in conformità sia con le linee guida istituzionali che con le leggi e le politiche internazionali. Alla fine degli studi, gli animali sono ritornati all'allevamento di origine in accordo con la Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. Tutti i trattamenti sono stati infusi direttamente nel seno del capezzolo. Sono state utilizzate siringhe con punta liscia e arrotondata (Bovivet Patteansats Cat. N° 170260, Kuuse, Regno Unito) in modo da garantire minimo dolore, sofferenza o disagio, e prevenire danni al capezzolo. Le infusioni sono state eseguite dopo la mungitura del mattino. Nello Studio 1 tutti i trattamenti sono stati somministrati per tre giorni consecutivi. Nello studio 2 i trattamenti di *L. lactis* e PBS sono stati estesi a sette giorni consecutivi.

- ***L. lactis*.** Una coltura viva di *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 7930 (BCCM/LMG Bacteria Collection, Belgio) che produce nisina è stata preparata come segue: il batterio è stato coltivato a 37 °C per 24 ore in Trypticase Soy Broth (TSB, BD, Italia). Sono stati usati 3 ml di questa coltura overnight (circa 10<sup>8</sup> UFC x ml<sup>-1</sup>, range di pH 5.0-5.30) per le iniezioni intramammarie (gruppi SCN-LL, HLT-

LL dello studio 1 e gruppi SCN-LL e S.AU-LL dello studio 2. In entrambi gli studi è stato osservato un intervallo di 24 ore tra i trattamenti con *L. lactis*.

- **PBS.** La soluzione PBS sterile senza pirogeno (3 ml) è stata usata per iniezioni intramammarie (gruppi SCN-PBS dello studio 1 e SCN-PBS dello studio 2). In entrambi gli studi è stato osservato un intervallo di 24 ore tra i trattamenti con PBS.

### 11.2.5 Osservazioni cliniche

Gli esami clinici sono stati eseguiti giornalmente in entrambi gli studi. Le mammelle sono state palpate ed esaminate per valutare la presenza di dolore, ipertrofia, consistenza, rossore e calore. Il latte è stato ispezionato per alterazioni di colore e consistenza (fiocchi, coaguli o aspetto acquoso). Per ciascuna emimammella, la mastite clinica è stata classificata in base alla gravità dei segni clinici come lieve (aspetto anomalo del latte come unico segno), moderata (aspetto anomalo del latte accompagnato da ipertrofia o arrossamento della ghiandola mammaria) o grave (pecora che mostra segni sistemici di malattia).

### 11.2.6 Campionamento e analisi del latte

In entrambi gli studi sono stati raccolti da ogni ghiandola prima della mungitura del mattino, campioni di latte per la microbiologia, l'analisi delle cellule somatiche e le misurazioni della quantità prodotta. Nello studio 1, i campioni di latte sono stati raccolti poco prima del primo trattamento (giorno 0) e successivamente 24 h dopo la prima dose (giorno 1), così come nei giorni 3, 7, 15, 30 e 45. Nello studio 2, i campioni di latte sono stati raccolti nei giorni 0, 3, 7, 15 e 30.

- **Produzione di latte.** La produzione di latte da ogni ghiandola durante la mungitura del mattino è stata misurata raccogliendo il latte in contenitori di plastica sterili monouso.
- **Colture di latte e identificazione batterica.** Aliquote di latte sono state utilizzate per le indagini microbiologiche e per le analisi delle cellule somatiche. Le indagini microbiologiche sono state effettuate sui campioni di latte in accordo con i protocolli del Mastitis Council Italia. In breve, 10 µl di ogni campione di latte sono stati seminati in doppio su agar sangue e su piastre di agar sale mannitolo per l'isolamento dei patogeni. Le piastre sono state incubate a 37 °C per 24-48 ore e i batteri sono stati identificati secondo Holt e colleghi (1994) e utilizzando il kit API Staph (BioMérieux, Francia). È stato calcolato il numero medio di colonie nelle piastre eseguite in doppio. Nello studio 1 sono state eseguite anche le colture di latte su agar MRS (de Man, Rogosa, Sharpe; Thermo Fisher Scientific Inc, Regno Unito) per l'isolamento di *L. lactis*. Le colture sono state considerate libere da patogeni quando il numero medio delle colonie era inferiore ai limiti di identificazione raccomandati dal Mastitis Council Italia.
- **Analisi delle cellule somatiche e dei neutrofili.** In entrambi gli studi, le cellule somatiche sono state misurate in ogni campione utilizzando un contatore di cellule Fossomatic FC (Foss Electric, Hillerød, Danimarca) in accordo con UNI EN ISO 13366-2:2007 (IDF 148-2: 2006).

Inoltre, nello studio 2, 20 ghiandole sono state casualmente selezionate dal gruppo SCN-LL (n = 5), SCN-PBS (n = 5), SCN-UNT (n = 5) e HLT-UNT (n = 5) per studiare la risposta dei neutrofili polimorfonucleati (PMN). Brevemente, campioni di latte raccolti da ogni ghiandola nei giorni 0, 3, 7 e 15 sono stati utilizzati per fare degli strisci (uno striscio/tempo/ghiandola). Sono stati esaminati dieci campi per ogni vetrino a elevato ingrandimento al microscopio ottico dopo la colorazione May-Grunwald Giemsa per l'identificazione e la quantificazione dei PMN. È stato quindi calcolato e utilizzato per l'analisi statistica il conteggio medio dei PMN per i dieci campi di ogni vetrino (mPMN), corrispondente a un campione di latte preso da una ghiandola in un momento temporale preciso.

### **11.2.7 Esame istologico**

Cinque pecore dello studio 2 sono state macellate il giorno 7 dopo la raccolta dei campioni di latte. Un totale di otto campioni di tessuto mammario infetto (tre ghiandole del gruppo SCN-LL, tre ghiandole del SCN-PBS e due del gruppo S.AU-LL) sono stati sottoposti a esame istopatologico. Frammenti di tessuto mammario sono stati fissati in formalina tamponata al 10% a temperatura ambiente, quindi inclusi in paraffina, tagliati in sezioni di 5µm e infine colorati con Ematossilina e Eosina.

### **11.2.8 Analisi statistica**

Le emimammelle di ogni pecora sono state considerate indipendenti tra di loro. La mediana e i range interquartili sono stati utilizzati per descrivere graficamente i trend dei dati relativi alla CCS, alla produzione di latte e alla media dei mPMN.

Sono state eseguite in ogni studio analisi intra e inter gruppo. Le differenze intra gruppo nella CCS, nella produzione di latte e nei valori di PMN sono state determinate mediante il test di Friedman, seguito dal post-test di Dunn, quando applicabile. I dati raccolti il giorno 0, prima della somministrazione dei trattamenti, sono stati considerati come controllo e paragonati con quelli ottenuti per tutti gli altri trattamenti e per i giorni di follow-up. Le ghiandole i cui campioni di latte presentavano coaguli, i quali impedivano una conta accurata delle cellule somatiche, sono state escluse dall'analisi intra gruppo relativa alle CCS. Le ghiandole che appartenevano ad animali macellati sono state anche escluse dalle analisi intra gruppo relative alla CCS, alla produzione di latte e ai PMN.

Le analisi delle differenze inter gruppo tra il gruppo di controllo e i gruppi nei diversi tempi sperimentali sono state eseguite attraverso il test Mann-Whitney per due gruppi, mentre per tre o più gruppi è stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis seguito dal post-test di Dunn quando applicabile. Le ghiandole infette da SCN e quelle sane non trattate (SCN-UNT e HLT-UNT) sono state considerate come controlli. Per le analisi intergruppo della CCS e della produzione di latte sono stati considerati i seguenti confronti: SCN-LL vs SCN-UNT, SCN-PBS vs SCN-UNT, HLT-LL vs HLT UNT nello Studio 1; e SCN-LL vs SCN-UNT, SCN-PBS vs SCN-UNT nello Studio 2. Per l'analisi inter gruppo dei PMN sono stati valutati SCN-LL vs SCN-UNT e SCN PBS vs SCN-UNT (studio 2).

È stato utilizzato il software GraphPad Prism 6 (versione 6.07 per Windows, Software GraphPad, La Jolla California USA, www.graphpad.com), per le analisi intra e inter gruppo. Sono state considerate significative le differenze con un valore di  $p < 0,05$ .

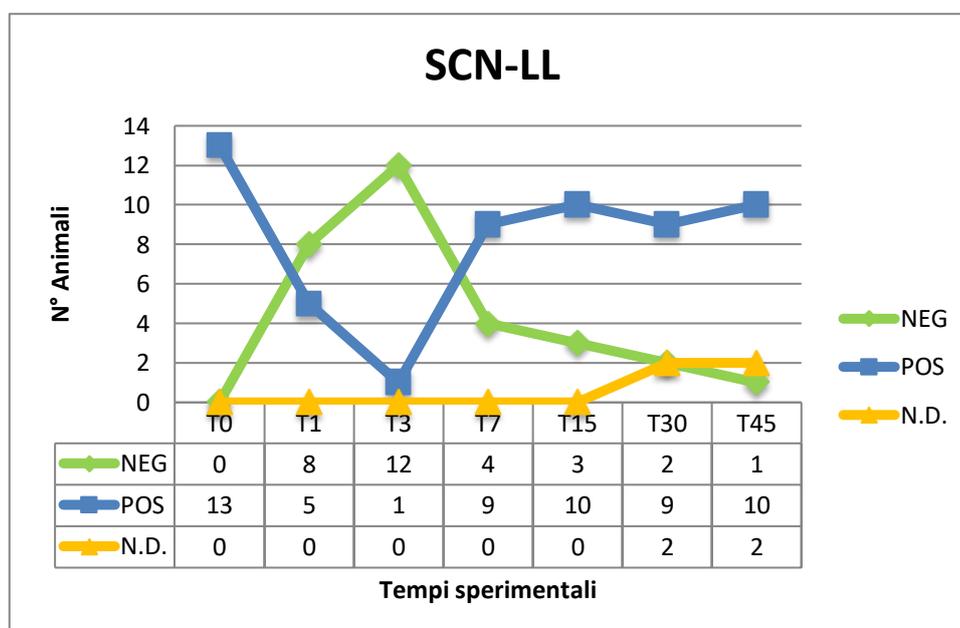
## 11.3 RISULTATI

### 11.3.1 Studio 1

Nello studio 1 sono state incluse 17 mammelle sane e 21 con mastite subclinica causate da SCN, per un totale di 38 ghiandole mammarie. Le mammelle sono state suddivise in cinque gruppi e sono state sottoposte a diversi trattamenti, come mostrato in Tabella 5.

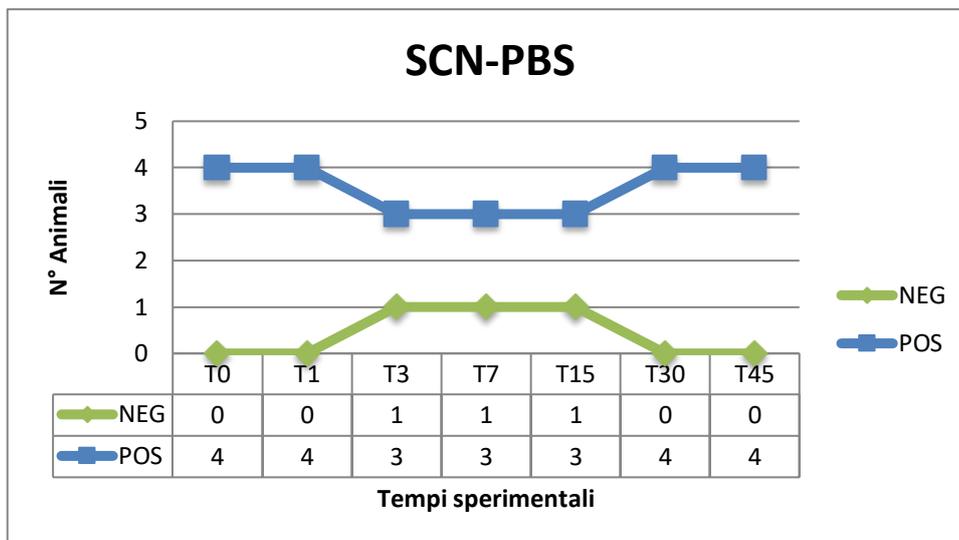
### 11.3.2 Esame microbiologico

Al giorno 0, la maggior parte delle infezioni subcliniche sono state causate da *S. epidermidis* (17 delle 21 ghiandole infette). Nel gruppo SCN-LL, dopo la prima somministrazione di *L. lactis* (giorno 1), otto mammelle sono risultate prive di SCN (61.5%), delle quali tre sono risultate negative all'esame colturale e in cinque è stato isolato il *L. lactis*. Dopo due ulteriori somministrazioni di *L. lactis* (giorno 3), il numero di ghiandole mammarie prive di SCN è salito a 12 (92%), di cui in tutte è stato isolato il *L. lactis*. Nei giorni successivi all'ultima somministrazione di *L. lactis* le mammelle positive all'esame colturale per SCN sono aumentate, passando da 9 su 13 (69%) il giorno 7, a 10 su 11 (91%) il giorno 45 (Figura 4). Il *L. lactis* non è stato più isolato dal latte dopo la terza e ultima somministrazione. Lo *S. epidermidis* è stato il patogeno più comunemente isolato (Tabella 6).



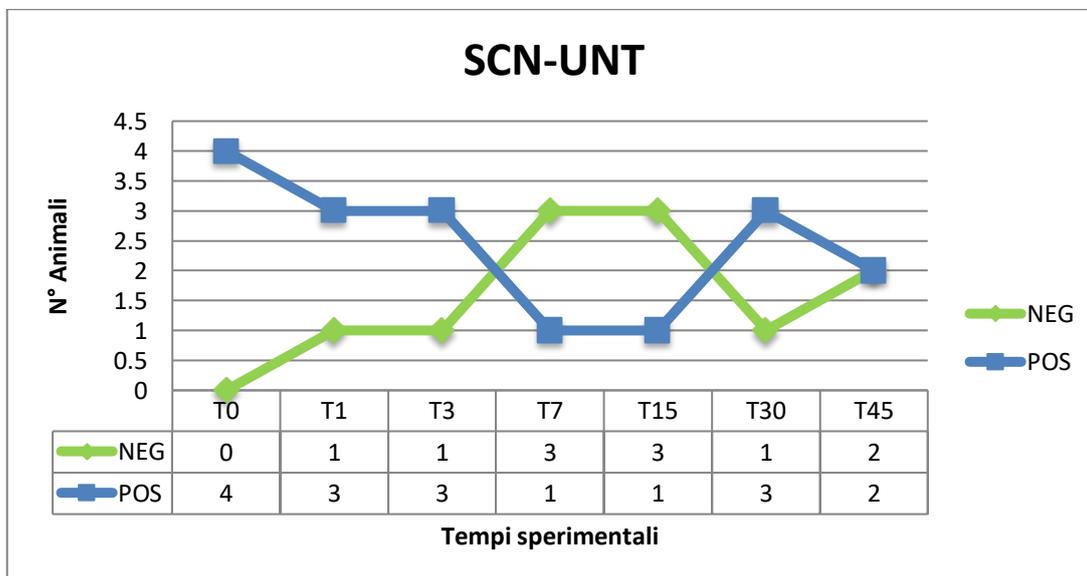
**Figura 4.** Andamento degli isolamenti microbiologici nel gruppo SCN-LL nei sette tempi sperimentali.

Nel gruppo SCN-PBS, soltanto una delle quattro ghiandole (ai giorni 3, 7 e 15) è risultata negativa all'esame colturale dopo le tre somministrazioni di PBS (Figura 5).



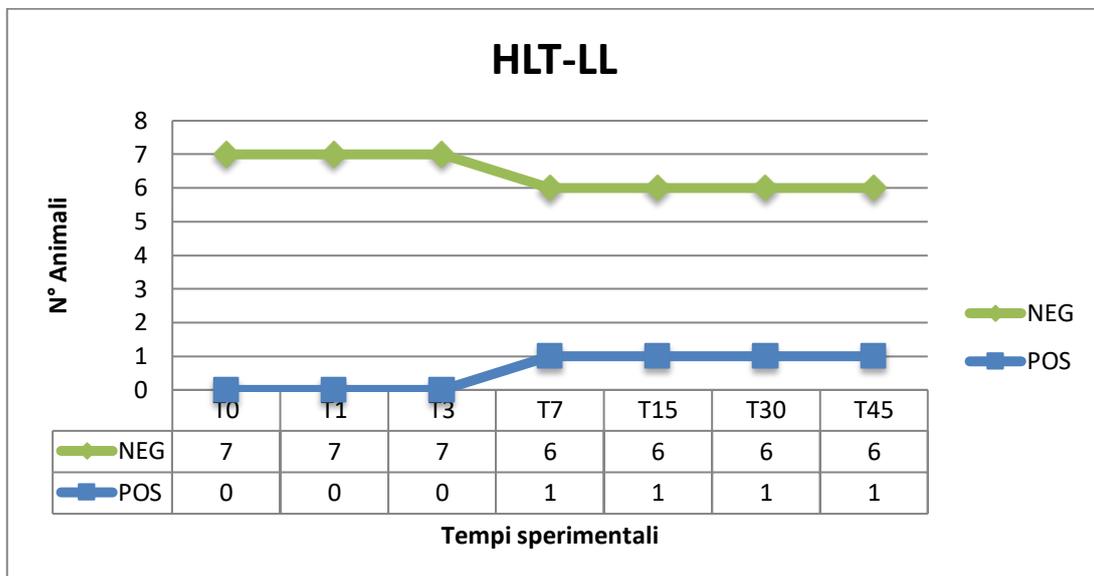
**Figura 5.** Andamento degli isolamenti microbiologici nel gruppo SCN-PBS nei sette tempi sperimentali.

Nel gruppo SCN-UNT, tre delle quattro ghiandole hanno mostrato una negativizzazione spontanea agli SCN il giorno 7 e 15, ma gli SCN sono riapparsi nelle colture il giorno 30 (Figura 6).



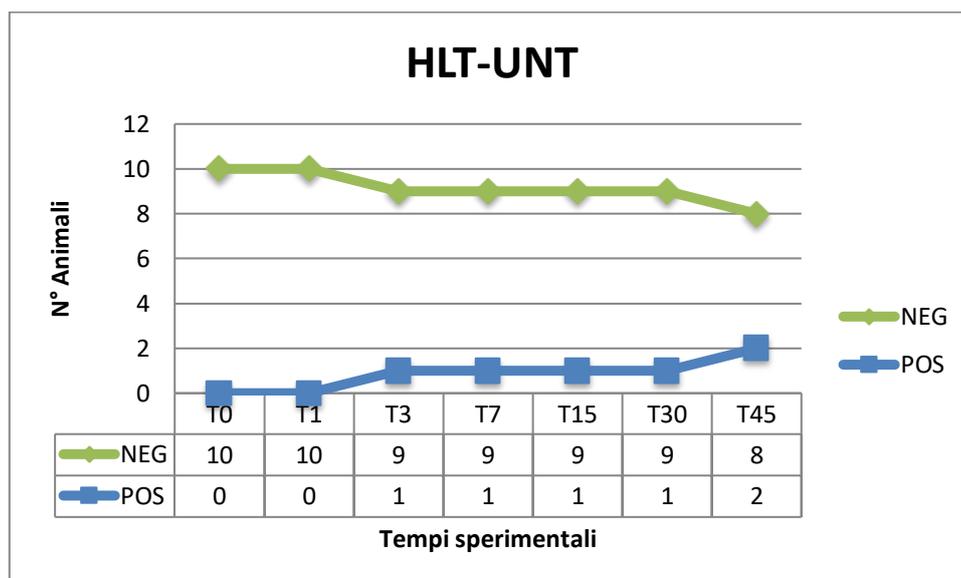
**Figura 6.** Andamento degli isolamenti microbiologici nel gruppo SCN-UNT nei sette tempi sperimentali.

Dalle ghiandole sane trattate con *L. lactis* (gruppo HLT-LL) è stato isolato il batterio lattico fino all'ultimo giorno della sua somministrazioni (giorno 7). Dal giorno 15 in poi, non è più stato isolato il *L. lactis* e quasi tutte le emimammelle (6/7) sono risultate negative fino al giorno 45 (Figura 7).



**Figura 7.** Andamento degli isolamenti microbiologici nel gruppo HLT-LL nei sette tempi sperimentali

Analogamente, quasi tutte le ghiandole del gruppo HLT-UNT (8/10) non hanno mostrato patogeni durante tutta la sperimentazione (Figura 8).

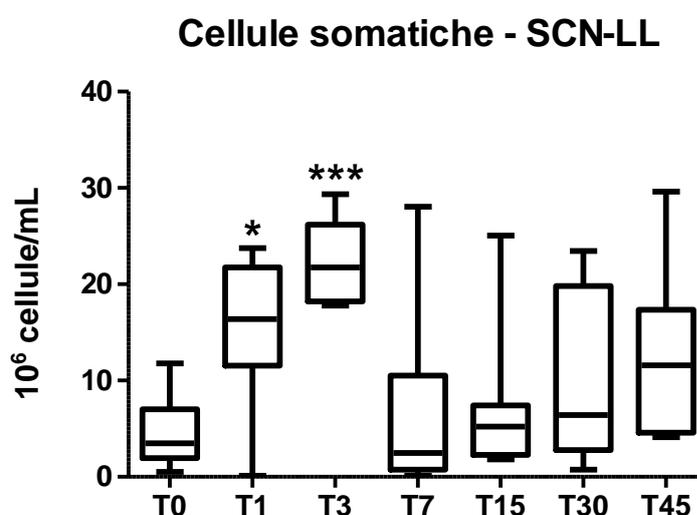


**Figura 8.** Andamento degli isolamenti microbiologici nel gruppo HLT-LL nei sette tempi sperimentali.

### 11.3.3 Misurazioni delle cellule somatiche

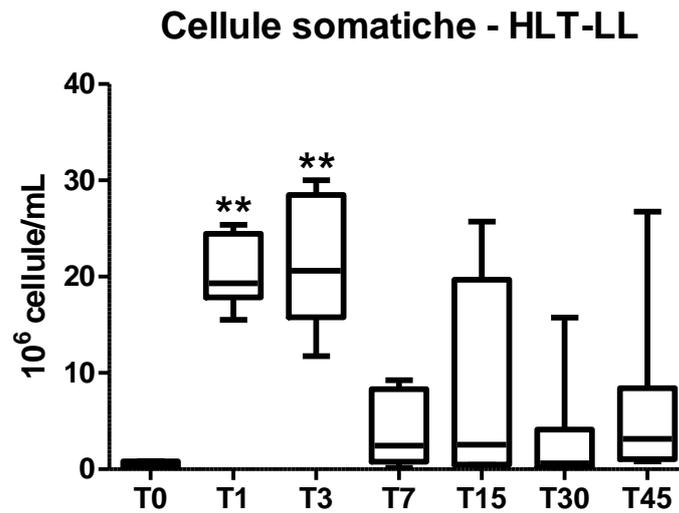
#### Andamenti e analisi intra-gruppo.

È stato osservato un netto aumento dei valori mediani delle cellule somatiche nelle ghiandole SCN-LL (Figura 9): i valori sono aumentati da  $3.48 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  prima del trattamento (giorno 0) a  $16.37 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  24 ore dopo la prima somministrazione di *L. lactis* (giorno 1), e quindi ulteriormente a  $21.76 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  24 ore dopo la terza e ultima somministrazione (giorno 3), un aumento di 5 volte. Quattro giorni dopo l'ultima somministrazione (giorno 7), tuttavia, i valori sono scesi ai livelli di pretrattamento ( $< 3.0 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$ ) e quindi sono aumentati gradualmente, anche se in maniera non significativa fino al giorno 45.



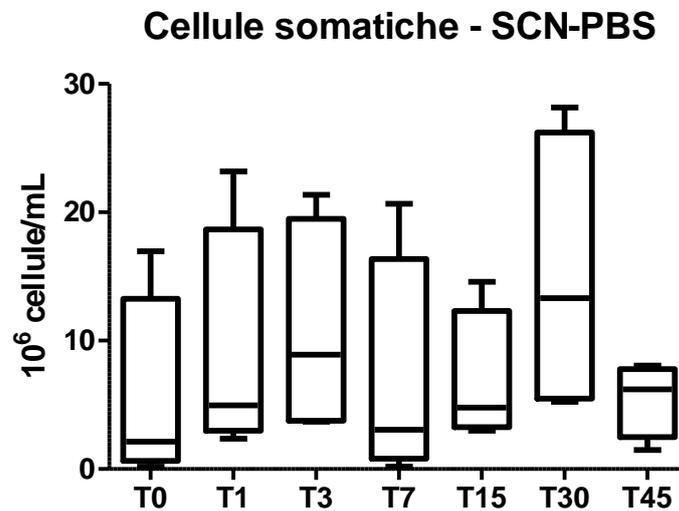
**Figura 9.** Andamento delle cellule somatiche nel gruppo SCN-LL nei sette tempi sperimentali.

Le mammelle sane infuse con *L. lactis* (HLT-LL) hanno mostrato un notevole incremento dei valori di cellule somatiche durante i 3 giorni di trattamento, da un valore mediano di  $0.21 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  immediatamente prima dell'infusione (giorno 0) a  $19.32 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  24 ore dopo la prima somministrazione di *L. lactis* (giorno 1) e ulteriormente a  $20.6 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  dopo la terza e ultima somministrazione (giorno 3), un aumento di 90 volte. Successivamente, dal giorno 7 in poi, i livelli di CCS sono nuovamente calati e sono rimasti bassi fino al giorno 45 (Figura 10).

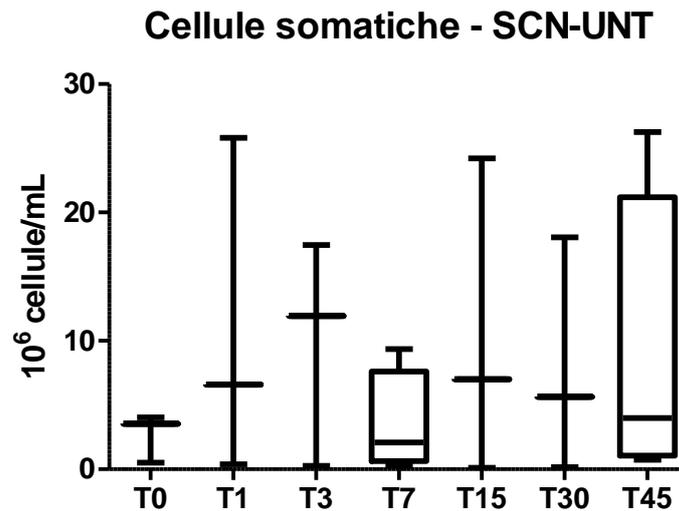


**Figura 10.** Andamento delle cellule somatiche nel gruppo HLT-LL nei sette tempi sperimentali.

Non sono stati osservati cambiamenti statisticamente significativi dei valori di cellule somatiche dal giorno 0 al giorno 45 sia nel gruppo SCN-PBS (Figura 11) che nel gruppo di controllo SCN-UNT (Figura 12).

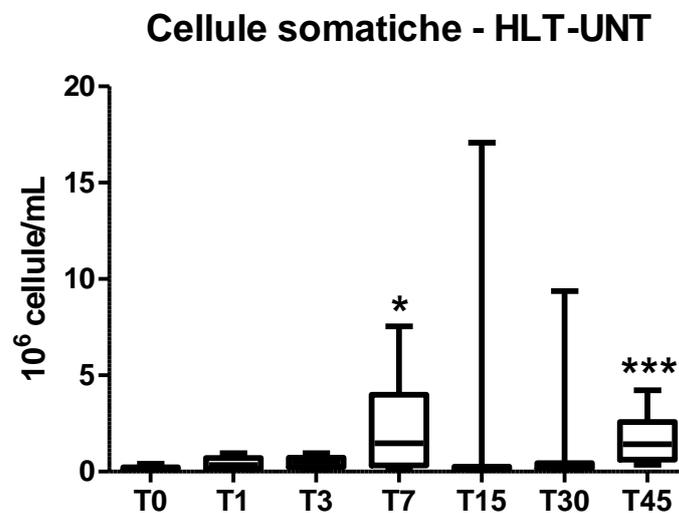


**Figura 11.** Andamento delle cellule somatiche nel gruppo SCN-PBS nei sette tempi sperimentali.



**Figura 12.** Andamento delle cellule somatiche nel gruppo SCN-UNT nei sette tempi sperimentali

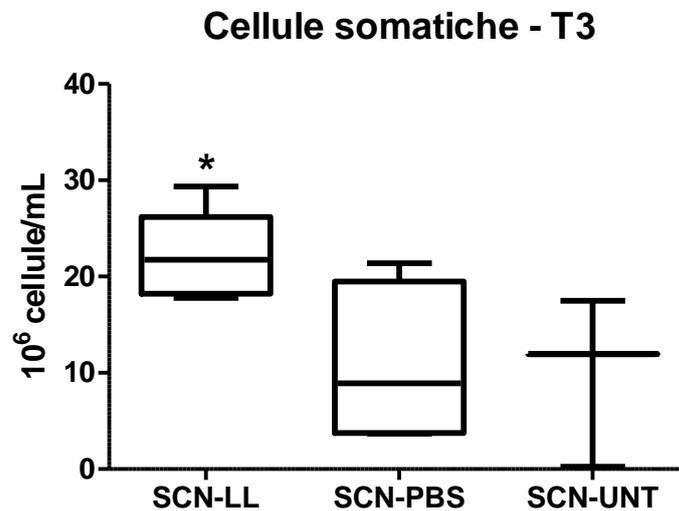
D'altra parte, i valori mediani di cellule somatiche nelle ghiandole sane non trattate (HLT-UNT) sono rimasti al di sotto del valore di riferimento per le ghiandole sane ( $< 0.3 \times 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$ ) nei giorni 0, 1, 3, 15 e 30, salendo leggermente oltre quel limite nei giorni 7 e 45 (Figura 13).



**Figura 13.** Andamento delle cellule somatiche nel gruppo HLT-UNT nei sette tempi sperimentali

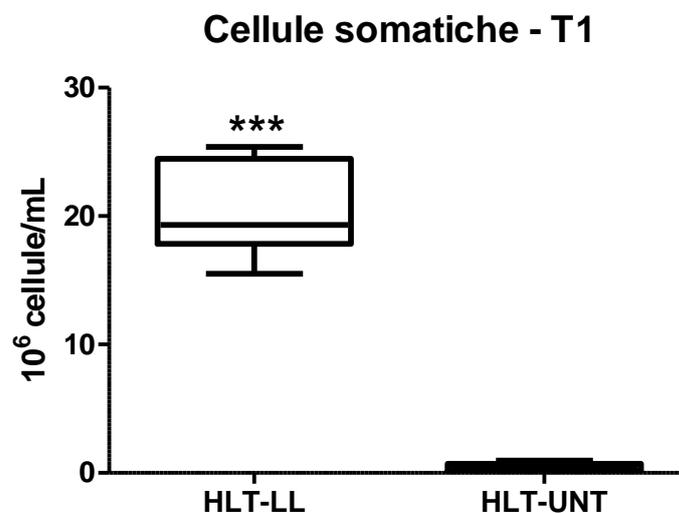
L'analisi intra-gruppo è risultata significativa nei gruppi SCN-LL, HLT-LL e HLT-UNT ( $P = 0.0022$ ;  $P = 0.0020$  e  $P = 0.0038$ ). I confronti multipli a coppie rispetto al giorno 0 hanno mostrato differenze significative nei valori di CCS nei giorni 1 e 3 nei gruppi SCN-LL ( $P = 0.0119$  e  $P = 0.0012$  rispettivamente, Figura 9) e HLT-LL ( $P = 0.0046$  e  $P = 0.0027$  rispettivamente, Figura 10), e nei giorni 7 e 45 nel gruppo HLT-UNT ( $P = 0.0466$  e  $P = 0.0005$  rispettivamente, Figura 13).

**Analisi inter-gruppo.** Entrambi i gruppi di trattamento, SCN-LL e SCN-PBS, sono stati confrontati con il gruppo SCN-UNT, considerato come controllo. Il test Kruskal-Wallis è risultato positivo solo il terzo giorno ( $P = 0.0148$ ). I confronti multipli a coppie sono risultati significativi solo tra i gruppi SCN-LL e SCN-UNT ( $P = 0.0383$ , Figura 14).

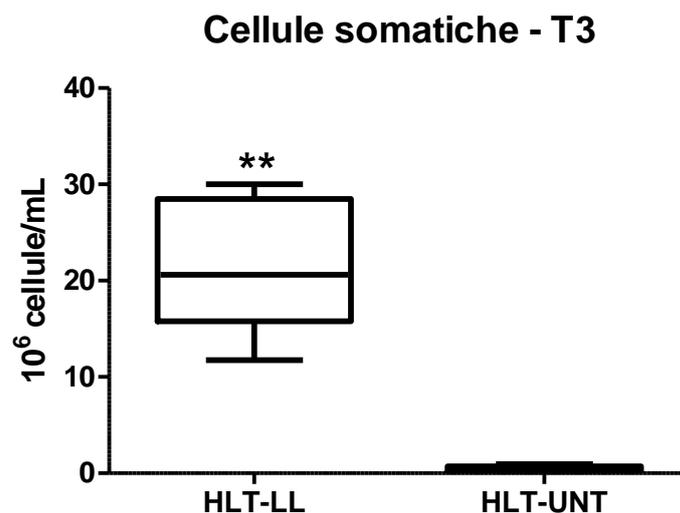


**Figura 14.** Andamento delle cellule somatiche nei gruppi SCN-LL, SCN-PBS e SCN-UNT a T3.

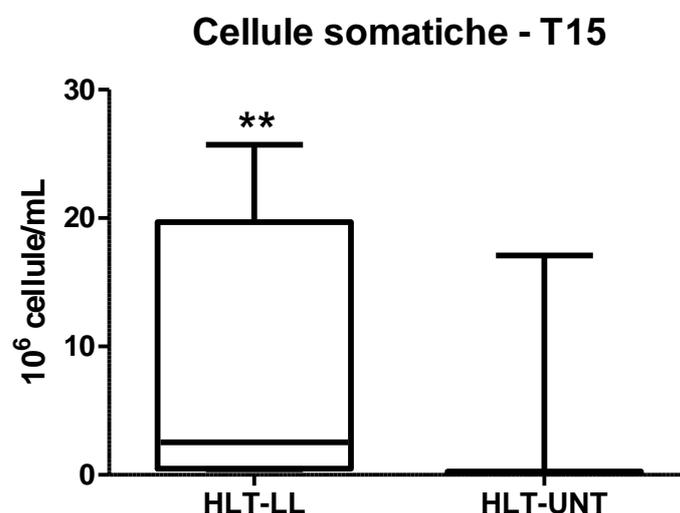
Quando sono stati confrontati i gruppi HLT-LL e HLT-UNT, sono state riscontrate differenze significative nei livelli di cellule somatiche nei giorni 1, 3 e 15 (rispettivamente  $P = 0.0001$ ;  $P = 0.0007$  e  $P = 0.002$ , Figura 15-16-17).



**Figura 15.** Andamento delle cellule somatiche nei gruppi HLT-LL e HLT-UNT a T1.



**Figura 16.** Andamento delle cellule somatiche nei gruppi HLT-LL e HLT-UNT a T3.

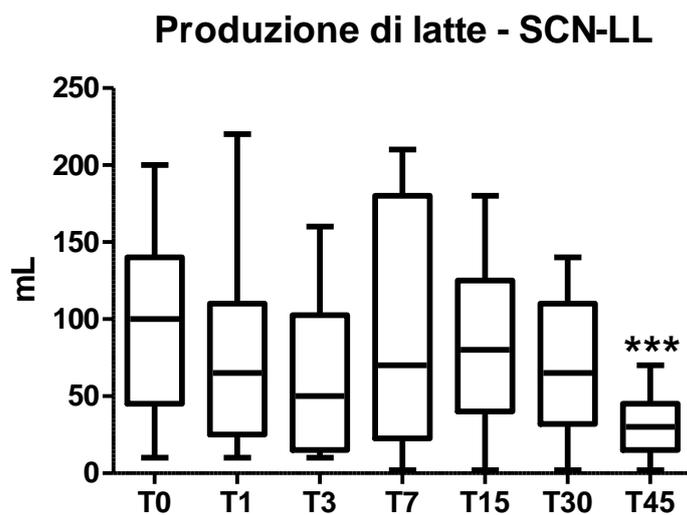


**Figura 17.** Andamento delle cellule somatiche nei gruppi HLT-LL e HLT-UNT a T15.

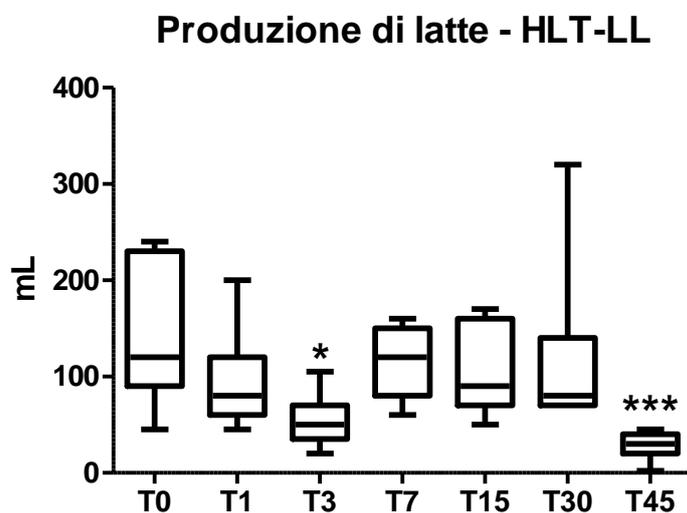
#### 11.3.4 Produzione di latte

**Andamenti e analisi intra-gruppo.** Durante lo studio, i valori di produzione mediana di latte delle pecore Sarde si sono mantenuti al di sotto della produzione media di questa razza (175 ml /ghiandola / mungitura).

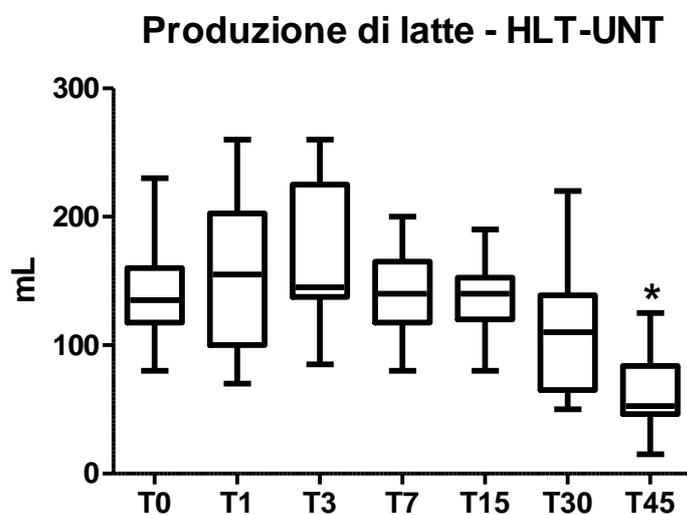
Il test Friedman è risultato positivo nei gruppi SCN-LL, HLT-LL e HLT-UNT ( $P < 0.0001$ ;  $P = 0.0002$  e  $P = 0.0001$ ). I confronti multipli a coppie rispetto al giorno 0 hanno mostrato una significativa riduzione nella produzione di latte solo al giorno 45 nei gruppi SCN-LL, HLT-LL e HLT-UNT ( $P = 0.0003$ ;  $P = 0.0002$  e  $P = 0.0161$ , Figura 18-19-20) e nel giorno 3 nel gruppo HLT-LL, dopo l'ultima somministrazione di *L. lactis* ( $P = 0.0119$ , Figura 19).



**Figura 18.** Andamento della produzione di latte nel gruppo SCN-LL nei sette tempi sperimentali.

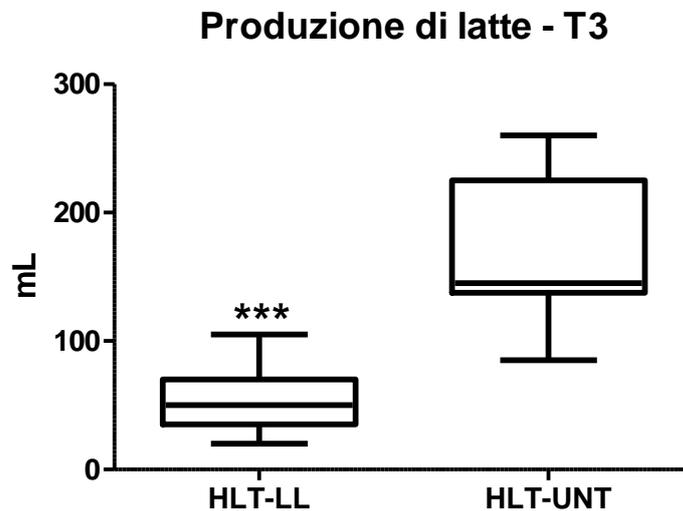


**Figura 19.** Andamento della produzione di latte nel gruppo HLT-LL nei sette tempi sperimentali.

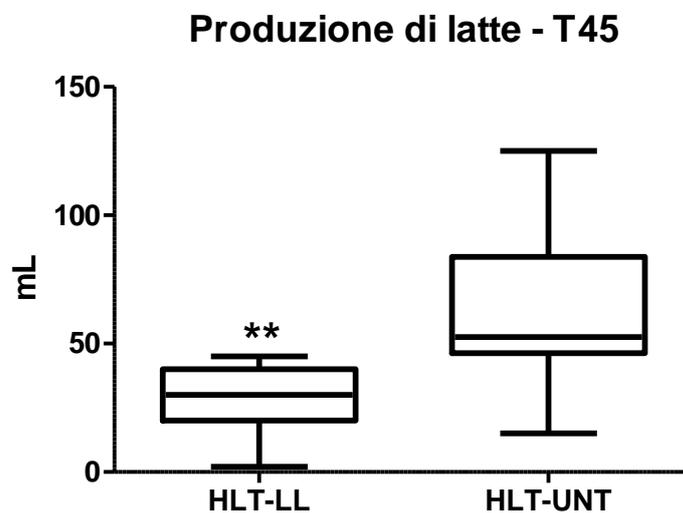


**Figura 20.** Andamento della produzione di latte nel gruppo HLT-UNT nei sette tempi sperimentali.

**Analisi inter-gruppo.** Non sono state osservate differenze nella produzione di latte tra i gruppi infetti da SCN (SCN-LL, SCN-PBS e SCN-UNT). Al contrario, il confronto tra la produzione di latte dei gruppi sani trattati con *L. lactis* e quelli sani non trattati (HLT-LL e HLT-UNT) ha mostrato una riduzione significativa nei giorni 3 e 45 ( $P = 0.0003$  e  $P = 0.0075$ , Figura 21-22) nel gruppo HLT-LL.



**Figura 21.** Andamento della produzione di latte nei gruppi HLT-LL e HLT-UNT a T3.



**Figura 22.** Andamento della produzione di latte nei gruppi HLT-LL e HLT-UNT a T45.

### 11.3.5 Studio 2

Nello studio 2, sono state incluse 42 mammelle con mastite subclinica causata da SCN, 10 mammelle con mastite clinica da *S. aureus* e 13 mammelle sane, per un totale di 65 ghiandole. Le ghiandole mammarie sono state divise in cinque gruppi e sottoposte a diversi trattamenti come mostrato nella Tabella 5.

### 11.3.6 Alterazioni macroscopiche nelle mammelle e nel latte

Lo stato di salute di ciascuna ghiandola prima di ogni trattamento (giorno 0) è stato utilizzato come controllo per i confronti intra-gruppo.

Nel gruppo SCN-LL, dove le infezioni erano state inizialmente subcliniche, è stata osservata una mastite clinica dopo tre somministrazioni di *L. lactis* (giorno 3) nel 40% delle ghiandole (10/25). I segni clinici consistevano in secrezioni anomale di latte con cambiamenti nel colore e nella consistenza (7/25, 28% con infiammazione lieve) o infiammazione acuta della ghiandola mammaria e/o del canale del capezzolo (3/25, 12% con infiammazione moderata). Sette giorni dopo la sospensione del trattamento con *L. lactis* (giorno 15), la prevalenza di anomalie nel latte è scesa del 20% (5/25) e tutte le infiammazioni delle ghiandole sono tornate ai livelli di pre-trattamento.

Nel gruppo SCN-PBS, le sette somministrazioni di PBS hanno causato alterazioni macroscopiche nel 50% delle ghiandole infette (4/8). Di queste, due ghiandole (25%) hanno sviluppato un'infiammazione acuta (infiammazione moderata) e due (25%) hanno sviluppato secrezioni anomale di latte (infiammazione lieve). In queste mammelle sono stati osservati valori aumentati di cellule somatiche. L'infiammazione delle ghiandole si è risolta il giorno 7 e le anomalie nel latte il giorno 15.

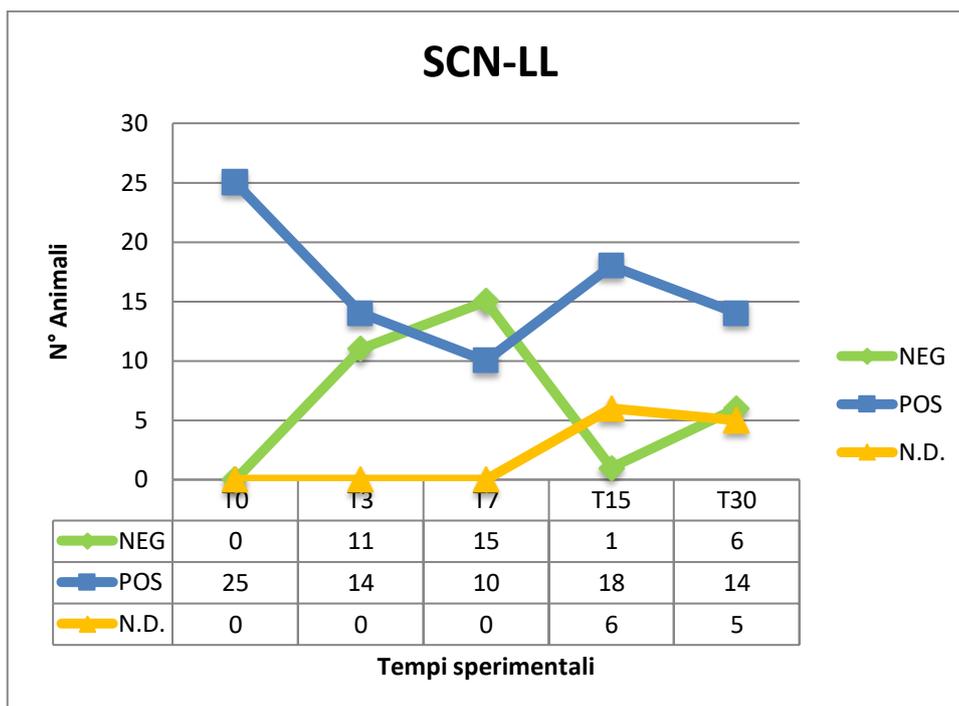
Nel gruppo S.AU-LL, è stato osservato un peggioramento dei segni clinici il giorno 3 nel 30% delle ghiandole (3/10). Tali segni clinici consistevano in una secrezione anomala di latte (2/10) e in un'infiammazione mammaria (1/10). Le anomalie del latte si sono mantenute fino al trentesimo giorno, mentre l'infiammazione mammaria si è risolta sette giorni dopo l'ultima somministrazione di *L. lactis* (giorno 15).

Nessun segno clinico di infiammazione è stato osservato nel gruppo di controllo, SCN-UNT.

### 11.3.7 Esame microbiologico

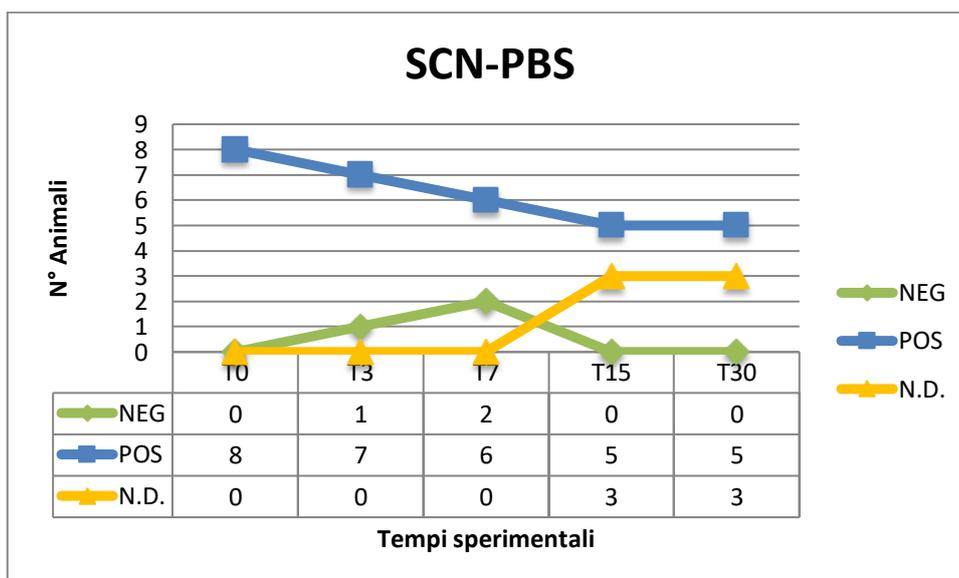
Nello studio 2 è stata identificata un'ampia varietà di specie di SCN.

Nelle ghiandole appartenenti al gruppo SCN-LL lo *S. epidermidis* è stata la specie più comunemente identificata nel giorno 0, seguita da *S. xylosus* (Tabella 6). Dopo tre somministrazioni di *L. lactis* (giorno 3), 11 ghiandole su 25 (44%) sono risultate prive di SCN. Il numero di ghiandole prive di SCN è salito a 15 (60%) dopo quattro ulteriori somministrazioni di *L. lactis* (giorno 7) (Figura 23). Non sono disponibili dati relativi all'eliminazione di *L. lactis* durante il trattamento, in quanto le colture di *L. lactis* non sono state eseguite in questo studio. Come osservato nello studio 1, una volta cessato il trattamento, le ghiandole hanno ripreso a eliminare SCN, anche se le specie patogene identificate il giorno 15 erano diverse da quelle osservate il giorno 0 (Tabella 6).



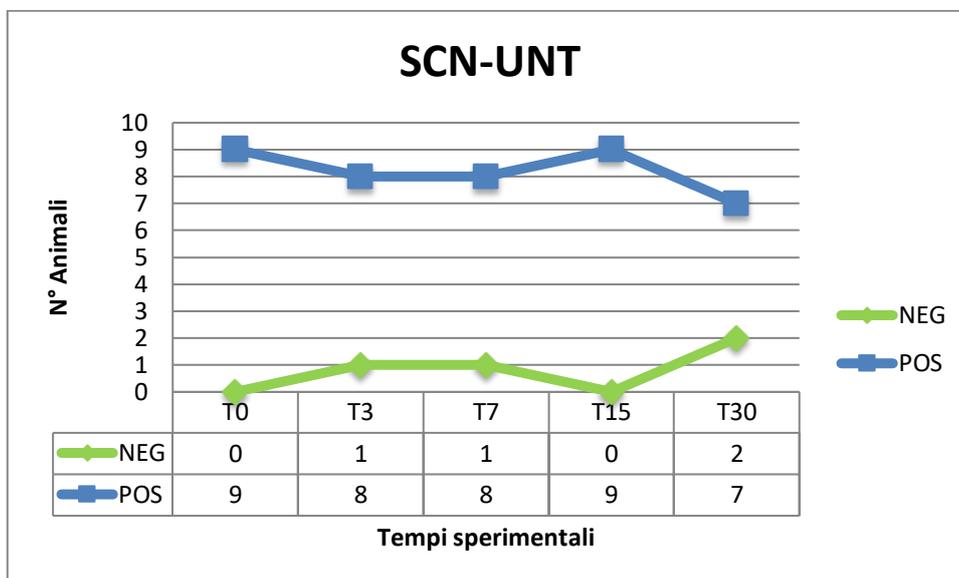
**Figura 23.** Andamento degli isolamenti microbiologici nel gruppo SCN-LL nei cinque tempi sperimentali.

Nel gruppo SCN-PBS, le sette somministrazioni di PBS non hanno influenzato l'infezione da SCN: due ghiandole su otto erano negative al giorno 7 e nessuna al giorno 15 (Figura 24).



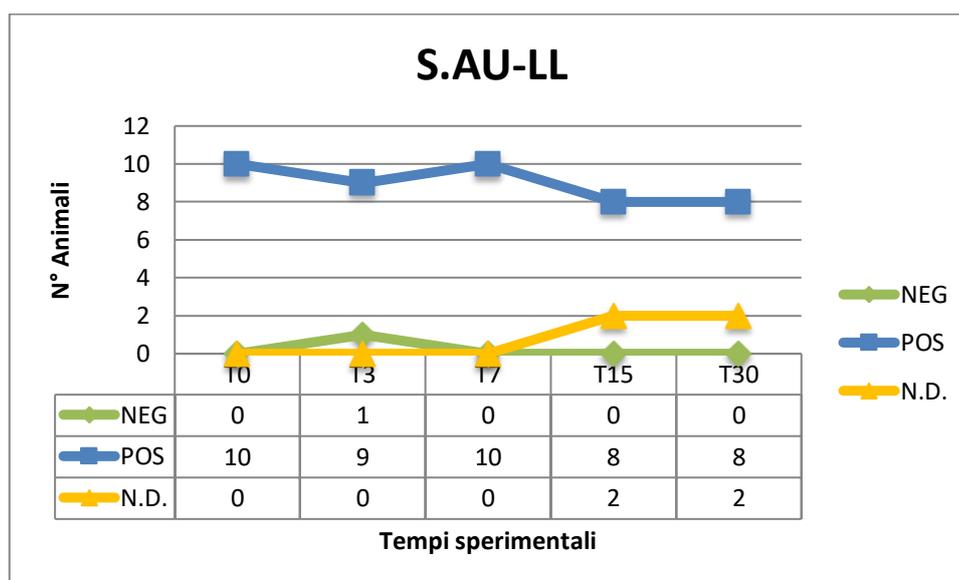
**Figura 24.** Andamento degli isolamenti microbiologici nel gruppo SCN-PBS nei cinque tempi sperimentali.

Nel gruppo SCN-UNT, le ghiandole non hanno mostrato una remissione spontanea sostanziale delle infezioni da SCN (Figura 25). Anche in questo caso sono state osservate modificazioni nelle specie di SCN isolate.



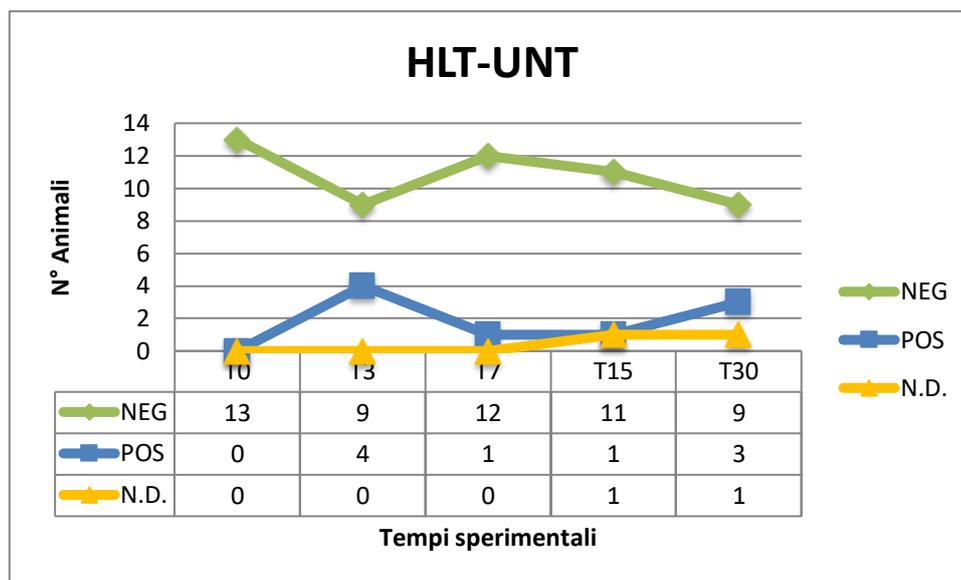
**Figura 25.** Andamento degli isolamenti microbiologici nel gruppo SCN-UNT nei sette tempi sperimentali.

*L. lactis* non è stato efficace contro l'infezione da *S. aureus* nel gruppo S.AU-LL (Figura 26).



**Figura 26.** Andamento degli isolamenti microbiologici nel gruppo S.AU-LL nei cinque tempi sperimentali.

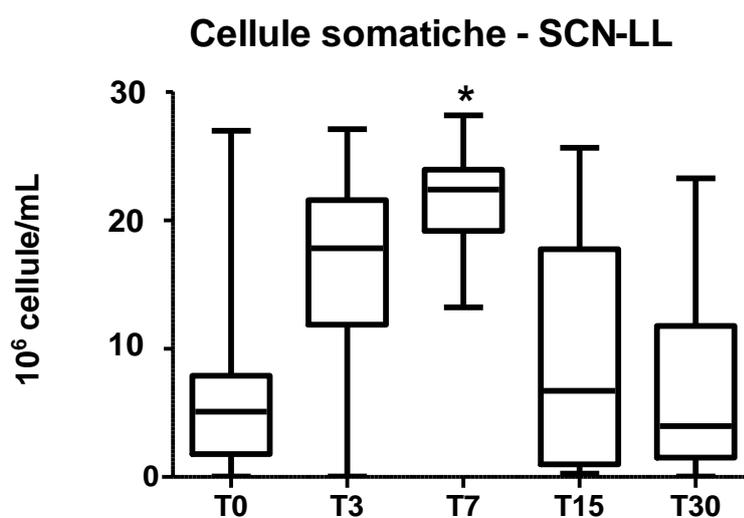
Come nello studio 1, quasi tutte le ghiandole non trattate del gruppo HLT-UNT sono rimaste prive di patogeni durante tutto il periodo della sperimentazione (Figura 27).



**Figura 27.** Andamento degli isolamenti microbiologici nel gruppo HLT-UNT nei cinque tempi sperimentali.

### 11.3.8 Misurazione delle cellule somatiche

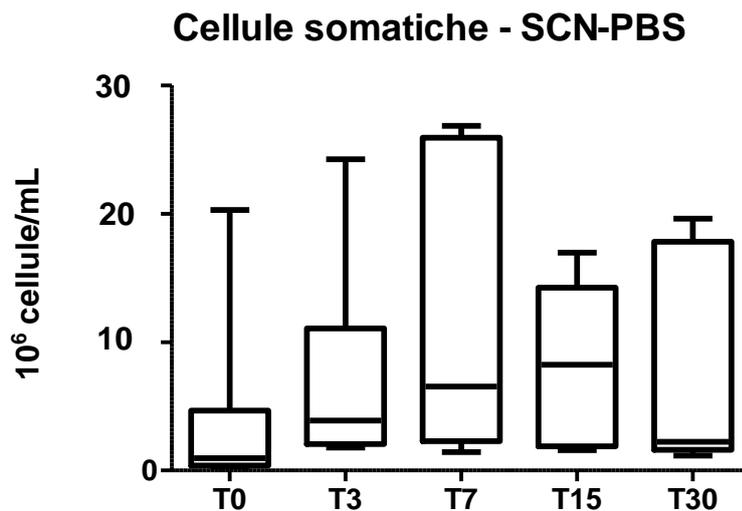
**Andamenti e analisi intra-gruppo.** Un aumento di cellule somatiche è stato osservato tra le ghiandole appartenenti al gruppo SCN-LL da  $5.58 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  prima del trattamento (giorno 0) a  $21.67 \times 10^6$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  24 ore dopo l'ultima dose di *L. lactis* (giorno 7), un incremento di 3 volte (Figura 28).



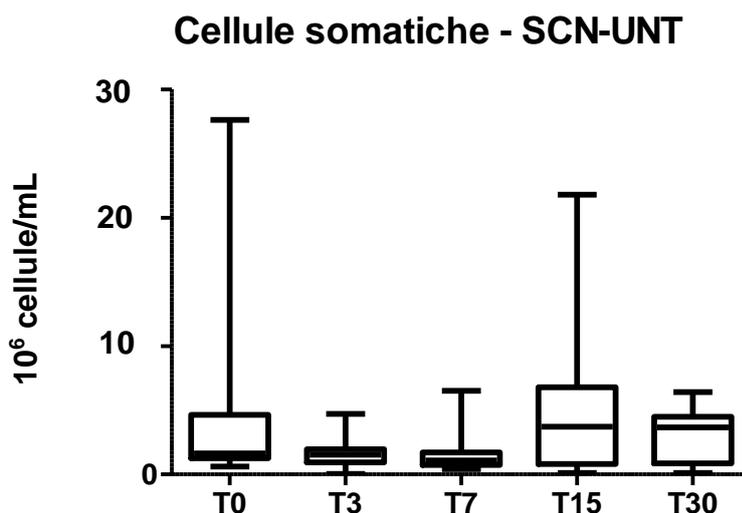
**Figura 28.** Andamento delle cellule somatiche nel gruppo SCN-LL nei cinque tempi sperimentali.

Il test Friedman è risultato positivo solo nel gruppo SCN-LL ( $P = 0.0005$ ). I confronti multipli a coppie dal giorno 0 hanno mostrato differenze significative nei valori delle cellule somatiche solo il giorno 7 ( $P = 0.012$ , Figura 28). Una settimana dopo l'ultima somministrazione di *L. lactis* (giorno 15), il valore mediano di cellule somatiche è sceso a un livello leggermente inferiore al valore di pretrattamento ( $< 5.0 \times 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$ ) ed è rimasto sostanzialmente invariato fino al giorno 30.

Nessun cambiamento statisticamente significativo nei valori di cellule somatiche dal giorno 0 al giorno 30 è stato osservato nei gruppi SCN-PBS e SCN-UNT (Figura 29-30).

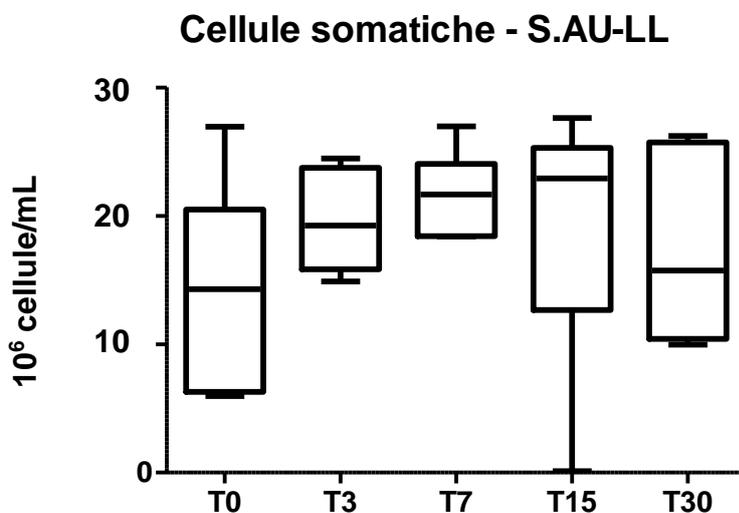


**Figura 29.** Andamento delle cellule somatiche nel gruppo SCN-PBS nei cinque tempi sperimentali.



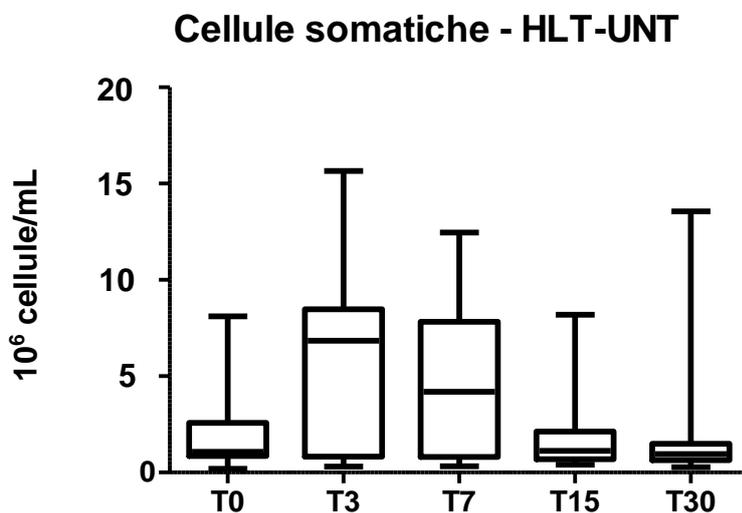
**Figura 30.** Andamento delle cellule somatiche nel gruppo SCN-UNT nei cinque tempi sperimentali

Allo stesso modo, i valori di CCS delle ghiandole infette da *S. aureus* del gruppo S.AU-LL non hanno subito modificazioni significative in seguito al trattamento con la coltura viva di *L. lactis* (Figura 31).



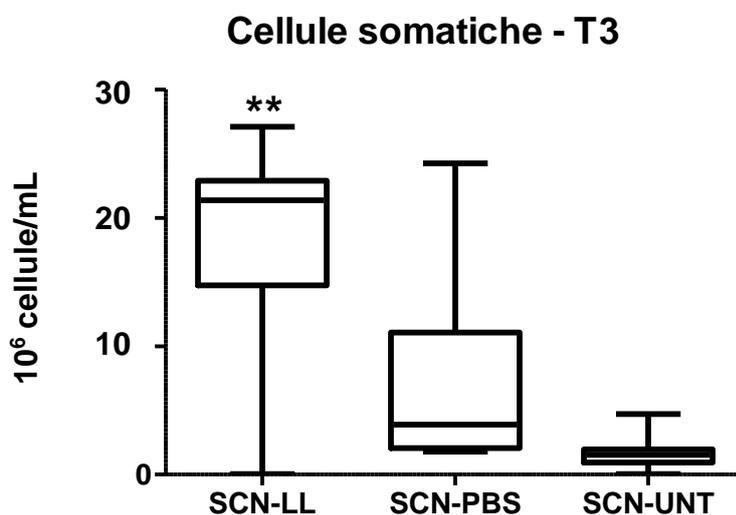
**Figura 31.** Andamento delle cellule somatiche nel gruppo S.AU-LL nei cinque tempi sperimentali.

I valori di cellule somatiche nelle ghiandole sane non trattate (HLT-UNT) sono rimasti al di sotto del valore di riferimento per le ghiandole sane (Figura 32).

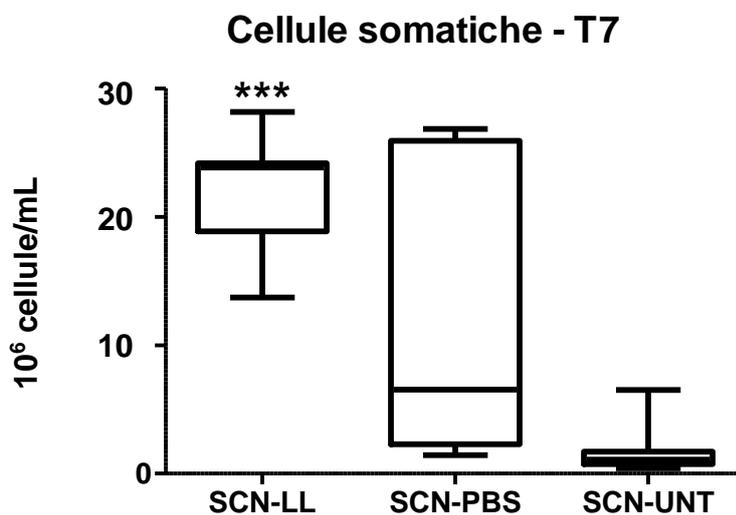


**Figura 32.** Andamento delle cellule somatiche nel gruppo HLT-UNT nei cinque tempi sperimentali.

**Analisi inter-gruppo.** I gruppi SCN-LL e SCN-PBS sono stati confrontati con il gruppo di controllo SCN-UNT. Sono state osservate differenze significative intergruppo dei valori di cellule somatiche solo nel giorno 3 ( $P = 0.0002$ ) e 7 ( $P < 0.0001$ ). Solo tra le ghiandole appartenenti ai gruppi SCN-LL e SCN-UNT ( $P = 0.0037$  e  $P < 0.0001$ ) sono state osservate differenze significative (Figura 33-34).



**Figura 33.** Andamento delle cellule somatiche nei gruppi SCN-LL, SCN-PBS e SCN-UNT a T3.



**Figura 34.** Andamento delle cellule somatiche nei gruppi SCN-LL, SCN-PBS e SCN-UNT a T7.

### 11.3.9 Risposta dei granulociti neutrofili

**Andamenti e analisi intra-gruppo.** È stato osservato un aumento significativo dei valori di mPMN solo nel gruppo SCN-LL ( $P = 0.0067$  nel test Friedman). I confronti multipli a coppia hanno evidenziato un aumento significativo solo dopo la terza somministrazione di *L. lactis* ( $P = 0.0212$ ) (Figura 35).

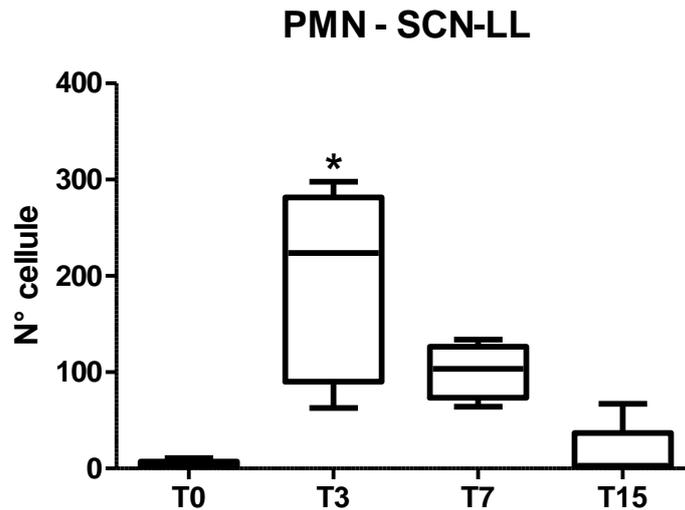


Figura 35. Andamento dei PMN nel gruppo SCN-LL a T0, T3, T7 e T15.

Nessun cambiamento significativo dei livelli mPMN è stato documentato nelle emimammelle dei gruppi SCN-PBS, SCN-UNT e HLT-UNT (Figura 36-37-38).

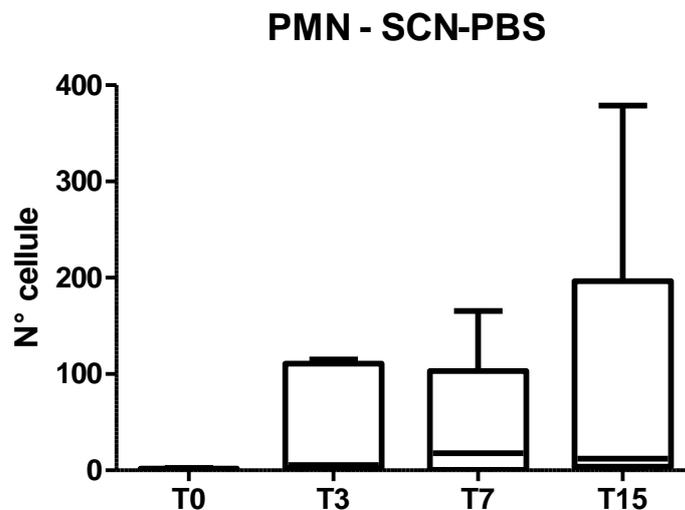
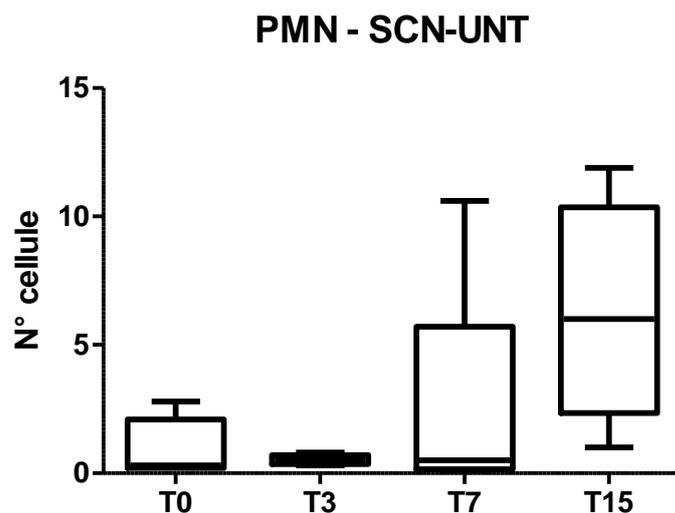
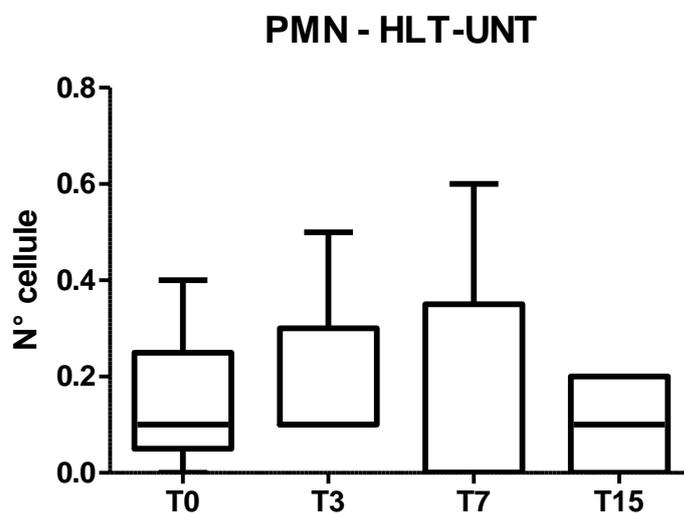


Figura 36. Andamento dei PMN nel gruppo SCN-PBS a T0, T3, T7 e T15.

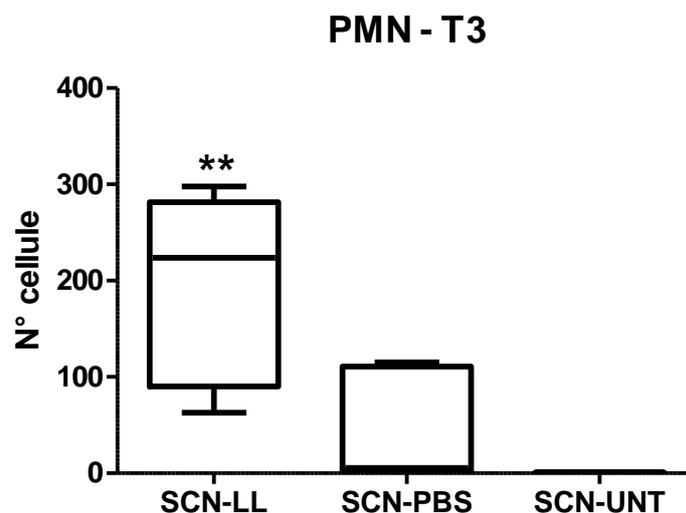


**Figura 37.** Andamento dei PMN nel gruppo SCN-UNT a T0, T3, T7 e T15.

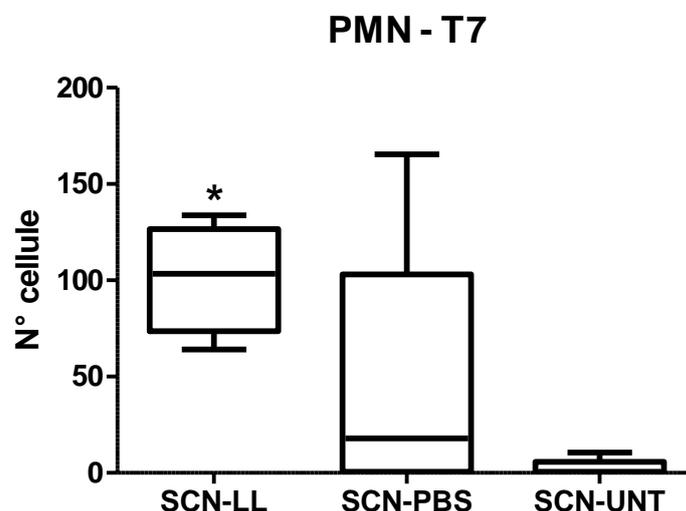


**Figura 38.** Andamento dei PMN nel gruppo HLT-UNT a T0, T3, T7 e T15.

**Analisi inter-gruppo.** I gruppi SCN-LL e SCN-PBS sono stati confrontati con il gruppo di controllo SCN-UNT. Differenze significative dei livelli mPMN sono state riscontrate solo al giorno 3 ( $P < 0.0001$ ) e 7 ( $P = 0.0114$ ). I confronti multipli a coppia hanno evidenziato un aumento dei livelli di mPMN solo tra le ghiandole appartenenti ai gruppi SCN-LL e SCN-UNT ( $P = 0.0014$  e  $P = 0.0104$ ) (Figura 39-40).



**Figura 39.** Andamento dei PMN nei gruppi SCN-LL, SCN-PBS e SCN-UNT a T3.

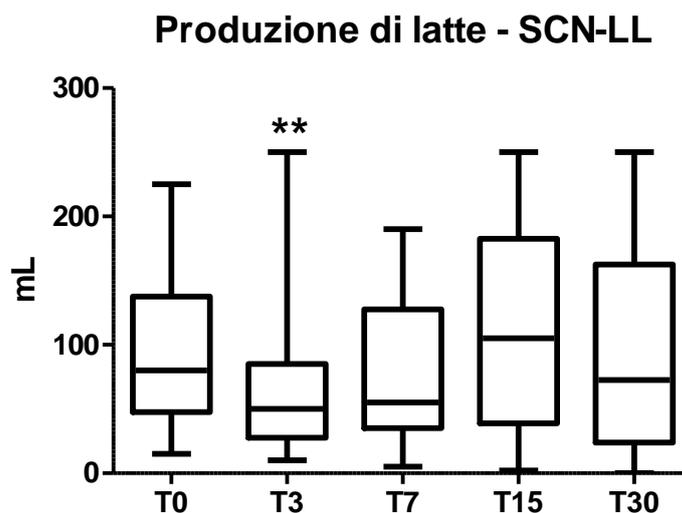


**Figura 40.** Andamento dei PMN nei gruppi SCN-LL, SCN-PBS e SCN-UNT a T7.

### 11.3.10 Produzione di latte

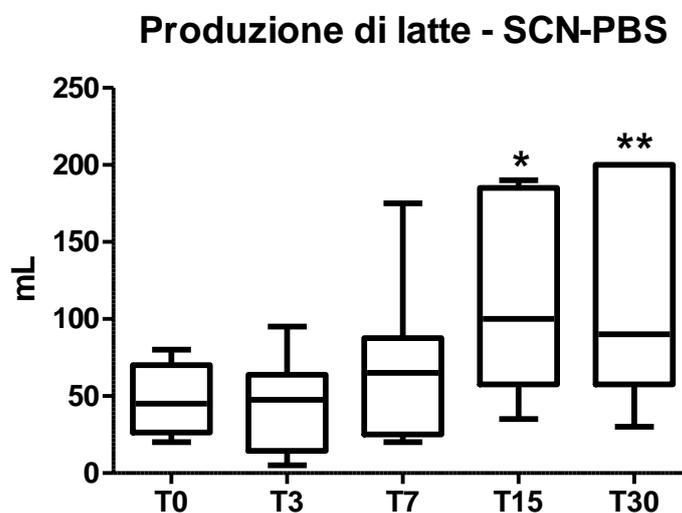
**Andamenti e analisi intra-gruppo.** Durante lo studio, i valori mediani della produzione di latte delle pecore Valle del Belice e Comisana sono rimasti inferiori alla produzione media di latte per queste razze (230 ml/ghiandola/mungitura) in tutti i gruppi infetti. Tra le ghiandole HLT-UNT, invece, i livelli mediani di produzione di latte si sono avvicinati e poi hanno superato il valore medio della razza. Il test di Friedman è risultato significativo nei gruppi SCN-LL ( $P = 0.0006$ ), SCN-PBS ( $P = 0.0022$ ), SCN-UNT ( $P = 0.0004$ ) e HLT-UNT ( $P < 0.0001$ ).

I confronti multipli a coppia hanno mostrato dal giorno 0 una diminuzione significativa della produzione di latte limitata al terzo giorno nel gruppo SCN-LL (Figura 41).

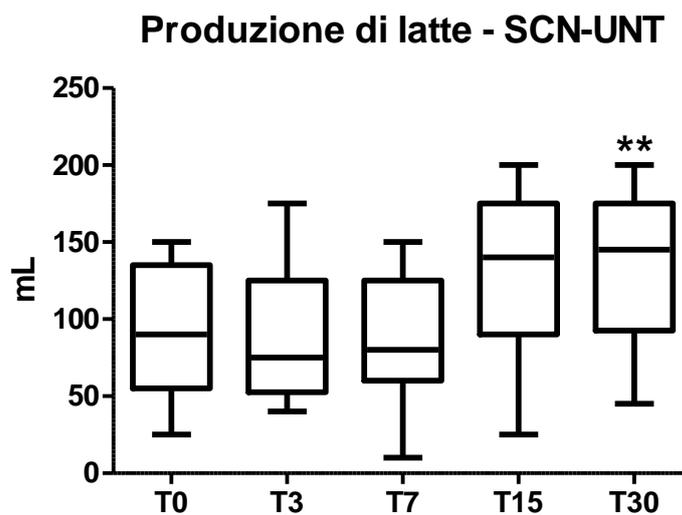


**Figura 41.** Andamento della produzione di latte nel gruppo SCN-LL nei cinque tempi sperimentali.

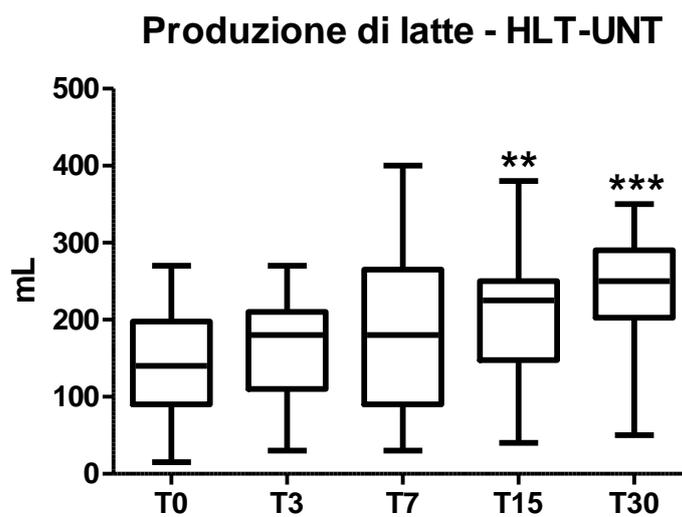
Viceversa, aumenti significativi della produzione di latte sono stati osservati a partire dal giorno 0 nei giorni 15 e 30 nel gruppo SCN-PBS ( $P = 0.0149$  e  $P = 0.0055$ , Figura 42), nel giorno 30 nel gruppo SCN-UNT ( $P = 0.0070$ , Figura 43), e nei giorni 15 e 30 nel gruppo HLT-UNT ( $P = 0.0078$  e  $P < 0.0001$ , Figura 44).



**Figura 42.** Andamento della produzione di latte nel gruppo SCN-PBS nei cinque tempi sperimentali.

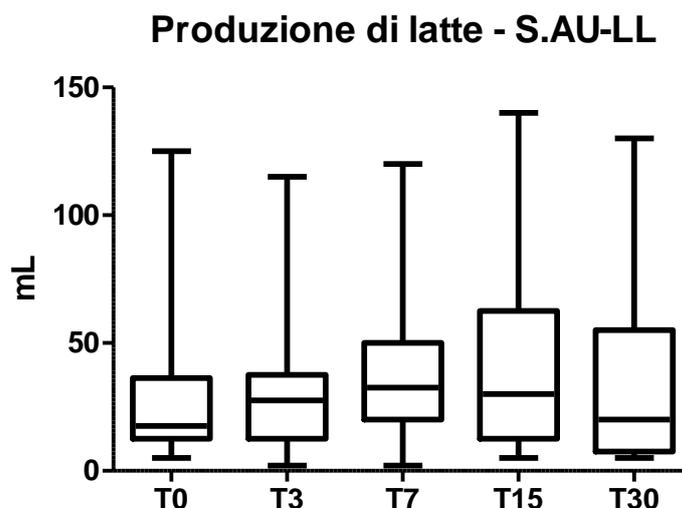


**Figura 43.** Andamento della produzione di latte nel gruppo SCN-UNT nei cinque tempi sperimentali.



**Figura 44.** Andamento della produzione di latte nel gruppo HLT-UNT nei cinque tempi sperimentali.

Nessun cambiamento significativo nella produzione di latte è stato registrato nel gruppo S.AU-LL (Figura 45).



**Figura 45.** Andamento della produzione di latte nel gruppo S.AU-LL nei cinque tempi sperimentali.

**Analisi inter-gruppo.** Non ci sono differenze significative tra i vari gruppi nei vari tempi di sperimentazione.

### 11.3.11 Esame istologico

Quasi tutte le ghiandole infette (7/8; n = 3 SCN-LL, n = 2 SCN-PBS e n = 2 S.AU-LL) hanno mostrato una mastite cronica caratterizzata da fibrosi (da moderata a grave), multifocale/diffusa infiltrazione cellulare mononucleata (macrofagi, linfociti e plasmacellule) e desquamazione epiteliale da lieve a moderata. La restante ghiandola, appartenente al gruppo SCN-PBS, non ha mostrato modificazioni istologiche. Inoltre, una ghiandola SCN-LL e una ghiandola S.AU-LL hanno mostrato infiltrazioni multifocali di PMN alveolari e interstiziali.

## 11.4 DISCUSSIONE

L'uso dei batteri lattici e delle batteriocine è stato recentemente proposto per il controllo della mastite bovina grazie alla loro capacità di stimolare una rapida risposta immunitaria locale (Klostermann et al., 2008; Crispie et al., 2008).

Studi precedenti *in vivo* in vacche hanno evidenziato come l'infusione intramammaria di nisina o di *L. lactis* sia efficace contro i patogeni Gram positivi che causano mastite (Cao et al., 2007; Wu et al., 2007; Klostermann et al., 2008). Studi più recenti hanno dimostrato che i batteri lattici vivi infusi nelle ghiandole mammarie bovine sono in grado di attivare il sistema immunitario locale (Crispie et al., 2008; Beecher et al., 2009; Enriquez-Valencia et al., 2005; Frola et al., 2012; Serna-Cock et al., 2013). Sulla base dei risultati sopra citati, nel presente studio è stato scelto il batterio *L. lactis* LMG 7930 come potenziale agente terapeutico contro la mastite, per valutarne l'efficacia *in vivo* nei piccoli

ruminanti. *L. lactis* LMG 7930 è un ceppo che produce nisina disponibile in commercio, considerato sicuro per il consumo umano (è utilizzato per la produzione di formaggio svizzero) ed è in grado di inibire *in vitro* numerosi patogeni che causano mastite (Armas et al., 2017). Pertanto, è stato deciso di inoculare una coltura viva cresciuta overnight di *L. lactis* LMG 7930, in quanto le colture overnight di batteri lattici sono in grado di stimolare un'attività immunomodulatoria maggiore rispetto a colture batteriche inattivate dal calore o a surnatanti privi di cellule (Crispie et al., 2008; Enriquez-Valencia et al., 2005).

Nello studio 1 è stata valutata l'efficacia di tre somministrazioni di una coltura viva di *L. lactis* in pecore con mastite subclinica da SCN. Le tre somministrazioni della coltura viva hanno compromesso la sopravvivenza degli SCN nelle ghiandole: il 92% delle ghiandole appartenenti al gruppo SCN-LL sono risultate prive di SCN il giorno 3. Tuttavia, i patogeni non sono stati eliminati in maniera permanente e gli SCN sono riapparsi nelle colture di latte non appena il trattamento è stato interrotto (dal giorno 7 in poi).

Nel presente studio è stato anche osservato che durante il trattamento con *L. lactis*, non è stato più possibile isolare il batterio poco tempo dopo la fine del trattamento sia nelle ghiandole sane che in quelle infette. Questo risultato è in accordo con uno studio precedente nel bovino (Klostermann et al., 2008), suggerendo come le colture di *L. lactis* potrebbero non essere in grado di colonizzare la ghiandola, poiché tutte le ghiandole inoculate hanno smesso di eliminare i batteri lattici pochi giorni dopo la cessazione della somministrazione intramammaria.

Come ci si aspettava, il trattamento con tre somministrazioni di PBS (gruppo SCN-PBS), è risultato inefficace nel contrastare la sopravvivenza dei patogeni nelle ghiandole, le quali sono rimaste positive per gli SCN durante tutto lo studio. L'unica eccezione è stata un solo caso di negativizzazione, probabilmente spontanea, come osservato anche tra mammelle infette non trattate (SCN-UNT). Risultati negativi delle colture batteriologiche possono anche derivare dalla remissione ciclica delle infezioni batteriche croniche (Sears et al., 1990), dalla presenza di poche colonie batteriche nel latte (Sears et al., 1990), o dalla fagocitosi dei patogeni da parte di macrofagi o altri fagociti (Newbould e Neave, 1965; Hill et al., 1978).

Sia le ghiandole sane che quelle infette infuse con *L. lactis* hanno mostrato un incremento notevole di cellule somatiche durante il trattamento, il che suggerisce una forte stimolazione immunitaria della mammella da parte della coltura. Questo incremento delle CS ha avuto, tuttavia, vita breve: le cellule somatiche si sono ridotte rapidamente ai livelli di pretrattamento come osservato al giorno 7, a causa probabilmente dell'incapacità del *L. lactis* di colonizzare le ghiandole trattate. Anche se le ghiandole sane trattate con PBS non sono state incluse nel presente lavoro, a motivo del fatto che il PBS senza pirogeno qui utilizzato è una soluzione salina isotonica sterile che non ha effetto tossico per le cellule epiteliali, i risultati di questo studio sembrano suggerire che la coltura di *L. lactis* è in grado di attivare il sistema immunitario della ghiandola mammaria. Tali risultati sono in accordo con studi precedenti

dove i quarti mammari infusi con batteri lattici hanno mostrato un incremento transitorio della CS nelle mammelle bovine (Klostermann et al., 2008; Greene et al., 1991).

Il fatto che la produzione di latte delle pecore di questo studio sia risultata costantemente al di sotto della produzione media della loro razza, non è sorprendente alla luce del fatto che erano animali in tarda lattazione. Tuttavia, mentre un calo significativo della produzione di latte è stato osservato tra le ghiandole sane dopo la terza somministrazione di *L. lactis*, il trattamento non ha alterato in maniera significativa la produzione di latte delle ghiandole infette, probabilmente già compromesse dall'infezione.

Sulla base dei risultati ottenuti nello studio 1, considerato il fatto che le ghiandole trattate con *L. lactis* sono risultate nuovamente positive per i patogeni una volta che il trattamento è stato interrotto, si è deciso di eseguire un altro studio. Nello studio 2, il trattamento a base di *L. lactis* è stato prolungato a sette giorni nella speranza di rimuovere completamente il patogeno dalla ghiandola. Nel gruppo SCN-LL, il prolungamento del trattamento a base di *L. lactis* ha incrementato la percentuale di ghiandole prive di SCN dal 44% del giorno 3 al 60% del giorno 7, ma non ha risolto le infezioni da SCN come sperato. Al contrario, la negativizzazione massima ottenuta nel primo studio è risultata maggiore di quella ottenuta nel secondo. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che, una percentuale più ampia di ghiandole appartenenti al gruppo SCN-LL, erano affette da infezione cronica nello studio 2. Anche nello studio 2, sebbene siano state utilizzate razze di pecora differenti, ma geneticamente simili, le infezioni nelle ghiandole si sono ripresentate non appena il trattamento con *L. lactis* è stato interrotto, come osservato nello studio 1.

Nei casi di mastite clinica da *S. aureus*, la coltura di *L. lactis* è risultata inefficace nel contrastare la sopravvivenza dei patogeni. Questi risultati sono in contrasto con quelli di Klostermann e colleghi (Klostermann et al., 2008), dove una coltura di *L. lactis* DPC3147 è stata efficace nel ridurre l'infezione da *S. aureus*. Diverse condizioni sperimentali, così come l'ospite (vacca *versus* pecora), il patogeno e le caratteristiche dei batteri lattici possono motivare tale discrepanza.

Come nello studio 1, nel secondo studio, le infusioni di *L. lactis* hanno causato un incremento transitorio di cellule somatiche nelle ghiandole infette da SCN (aumento di 3 volte). Ancora una volta, a seguito della cessazione del trattamento, i valori delle CS sono ritornati rapidamente ai livelli di pretrattamento. Nessun aumento significativo dei valori delle cellule somatiche è stato osservato tra le ghiandole infette da *S. aureus* trattate con *L. lactis*. Ciò era probabilmente dovuto ai valori pretrattamento già elevati delle CS causati dall'infezione di *S. aureus*. È stato anche osservato che, a differenza del PBS, l'infusione di *L. lactis* nelle ghiandole infette da SCN ha stimolato un significativo reclutamento di PMN nella ghiandola. Questi risultati sono in accordo con studi precedenti in cui l'infusione di colture di batteri lattici, come *L. lactis* DPC 3147 (Crispie et al., 2008), *Lactobacillus perolens* CRL 1724 (Frola et al., 2013) e *Weissella confusa* (Enriquez-Valencia et al., 2015), nelle mammelle bovine hanno attivato la risposta immunitaria innata, determinando un richiamo transitorio di PMN e linfociti nella ghiandola, cellule che a loro volta hanno promosso una rapida risposta

infiammatoria. L'evidenza di tale reclutamento è stata ottenuta dall'esame istologico di una delle ghiandole appartenenti al gruppo SCN-LL.

Nello studio 2 è stato osservato che dopo tre somministrazioni di *L. lactis*, il 40% delle mastiti da SCN inizialmente subcliniche, si sono trasformate in mastiti cliniche, con lo sviluppo di infiammazione lieve (28%) o moderata (12%). Allo stesso modo, il 30% delle ghiandole infette da *S. aureus* trattate con *L. lactis* ha subito un peggioramento delle condizioni cliniche con sviluppo di evidenti anomalie del latte. Tuttavia, se i segni clinici di infiammazione della mammella si sono risolti in entrambi i gruppi (SCN-LL e S.AU-LL) non appena il trattamento di *L. lactis* è cessato, le anomalie del latte hanno continuato a essere presenti.

È interessante notare che il PBS ha causato alterazioni macroscopiche nel 50% delle ghiandole appartenenti al gruppo SCN-PBS, caratterizzate da infiammazione della mammella o anomala secrezione di latte. Contrariamente alle ghiandole SCN-LL, sia le infiammazioni lievi che quelle moderate si sono risolte non appena il trattamento è stato interrotto. Al contrario, studi ripetuti nel bovino hanno evidenziato come l'infusione di acqua sterile nelle mammelle non causi irritazione o infiammazione (Frola et al., 2012). I risultati di questo studio sembrano quindi indicare che, nelle pecore, anche una soluzione salina isotonica sterile come il PBS può generare una risposta infiammatoria quando viene infusa nelle ghiandole, anche se dovrebbe essere considerato un maggior numero di ghiandole trattate con PBS per rendere i risultati più rappresentativi.

Si ritiene che la lieve risposta infiammatoria osservata nelle ghiandole SCN-PBS, che è stata transitoria e non associata a un reclutamento significativo di PMN o aumenti delle CS, è stata iatrogena piuttosto che il risultato di un effetto diretto del PBS sul sistema immunitario dell'ospite. Sulla base delle conoscenze del gruppo di lavoro, solo un precedente lavoro ha descritto la mastite iatrogena nella pecora (Roumen et al., 1987).

L'infusione di colture vive di *L. lactis* DPC 3147 (Beecher et al., 2009), *W. confusa* (Enriquez-Valencia et al., 2015) e *L. perolens* CRL 1724 (Frola et al., 2012) nei quarti mammari di vacche sane provocano segni clinici di infiammazione e anomalie nel latte. La risposta immunitaria in seguito all'infusione dei batteri lattici sembra essere dose-dipendente (Crispie et al., 2008; Frola et al., 2012). I risultati del presente lavoro, associati alla letteratura sopra indicata, suggeriscono che l'infusione intramammaria di colture di batteri lattici vivi overnight può produrre segni clinici avversi nei ruminanti, come infiammazione delle mammelle o lo sviluppo di secrezioni anomale del latte. La dose inoculata, piuttosto che il ceppo o l'ospite, potrebbero svolgere un ruolo decisivo nella regolazione della risposta immunitaria delle ghiandole mammarie. Inoltre questa risposta potrebbe essere la chiave per il controllo della mastite attraverso la riduzione della possibilità di colonizzazione/proliferazione di patogeni che causano mastite senza causare un danneggiamento della salute della ghiandola.

Nonostante prove incoraggianti indichino come le colture vive di batteri lattici stimolino la risposta del sistema immunitario nelle ghiandole mammarie, determinando condizioni sfavorevoli per la proliferazione dei patogeni, diventa fondamentale migliorare questa strategia come alternativa agli antibiotici nei ruminanti. Infatti, potrebbe non essere auspicabile inoculare direttamente batteri che

incrementano le CS del latte e producono segni clinici di infiammazione, specialmente negli animali colpiti da mastite, la cui salute della ghiandola è già compromessa. Ulteriori studi sono quindi necessari per trovare formulazioni batteriche in grado di modulare la risposta immunitaria delle ghiandole mammarie senza aumentarne, in modo sostanziale, il reclutamento dei PMN, che potrebbero compromettere la funzione della mammella e la qualità del latte.

In conclusione, in queste condizioni sperimentali, la coltura viva di *L. lactis* LMG 7930 utilizzata ha rapidamente attivato il sistema immunitario innato della mammella. Ciò ha indotto una negativizzazione transitoria del patogeno nella ghiandola, ma ha anche causato casi clinici da lievi a moderati di mastite. Si può concludere pertanto affermando come sia ancora precoce utilizzare formulazioni batteriche in alternativa agli antibiotici nel trattamento della mastite nei ruminanti, e siano quindi necessarie ulteriori sperimentazioni.

**Tabella 6.** Studio1: Isolamenti microbiologici dai campioni di latte dei diversi gruppi sperimentali nei vari tempi di trattamento.

Gruppi (n)	Isolamento batterico	T0 (n)	T1 (n)	T3 (n)	T7 (n)	T15 (n)	T30 (n)	T45 (n)
<b>SCN-LL (13)*</b>	<i>S. chromogenes</i>	2		1	1	2		1
	<i>S. epidermidis</i>	10	3		6	8	7	9
	<i>S. hycus</i> †				1		2	
	SCN non tipizzati ‡	1						
	Flora mista		2		1			
	<i>L. lactis</i>		5	12				
	Nessun isolamento		3			4	3	2
<b>SCN-PBS (4)</b>	<i>S. epidermidis</i>	4	4	3	3	3	2	4
	<i>S. hycus</i> †						2	
	Nessun isolamento			1	1	1		
<b>SCN-UNT (4)</b>	<i>S. epidermidis</i>	3	3	3	1	1	2	2
	<i>S. hycus</i> †						1	
	Nessun isolamento	1 §	1	1	3	3	1	2
<b>HLT-LL (7)</b>	<i>S. epidermidis</i>				1	1	1	1
	<i>L. lactis</i>		7	1	2			
	Nessun isolamento	7		6	4	6	6	6
<b>HLT-UNT (10)</b>	<i>S. epidermidis</i>				1	1		2
	<i>S. hycus</i> †						1	
	Flora mista			1				
	Nessun isolamento	10	10	9	9	9	9	8

\* Una pecora ha subito una frattura all'arto posteriore ed è stata mandata al macello il giorno 15. I risultati dell'esame microbiologico di due mammelle infette non sono, dunque, disponibili nei giorni 30 e 45.

† Specie batterica coagulasi variabile.

‡ L'identificazione a livello di specie di alcuni SCN non è stata ottenuta mediante esame biochimico.

§ Classificati come infetti sulla base della conta delle cellule somatiche > 0.5 ( x 10<sup>6</sup> cellule ml<sup>-1</sup>) il giorno 0, anche alla luce di colture SCN-positive durante il monitoraggio pre-trattamento.

**Tabella 6.** Studio 2: Isolamenti microbiologici dai campioni di latte dei diversi gruppi sperimentali nei vari tempi di trattamento.

Gruppi (n)	Isolamento batterico	T0 (n)	T3 (n)	T7 (n)	T15 (n)	T30 (n)
<b>SCN-LL (25)*</b>	<i>S. capitis</i>	2				
	<i>S. caprae</i>		1			
	<i>S. caseolyticus</i>		1			2
	<i>S. chromogenes</i>	1		1	4	1
	<i>S. epidermidis</i>	5	1	1	1	6
	<i>S. haemolyticus</i>	2				
	<i>S. lentus</i>				1	
	<i>S. saccharolyticus</i>			1	1	
	<i>S. sciuri</i>		1			
	<i>S. simulans</i>	1	2	1		
	<i>S. warneri</i>		1		1	
	<i>S. xylosus</i>	3				
	SCN non tipizzati †	11	7	6	9	4
	<i>S. aureus</i>				1	1
	N.D. §				3	2
Nessun isolamento			11	15	1	6
<b>SCN-PBS (8)*</b>	<i>S. caseolyticus</i>			1		
	<i>S. chromogenes</i>			1	1	
	<i>S. epidermidis</i>		3			2
	<i>S. hycus</i> ‡		1			
	<i>S. lentus</i>			2		
	<i>S. sciuri</i>			1		1
	<i>S. xylosus</i>		1			
	SCN non tipizzati †	8	2	1	4	2
Nessun isolamento		1	2			
<b>SCN-UNT (9)</b>	<i>S. capitis</i>	1				
	<i>S. caprae</i>		1			
	<i>S. caseolyticus</i>		1	1		2
	<i>S. chromogenes</i>	2		1	3	
	<i>S. cohnii</i>					1
	<i>S. epidermidis</i>	3		2	3	1
	<i>S. hycus</i> ‡					1
	<i>S. saccharolyticus</i>	1		1		
	<i>S. simulans</i>			1		
	<i>S. warneri</i>				1	
	SCN misti		1			
	SCN non tipizzati †	1	5	2	1	2
<i>S. aureus</i>				1		

	Nessun isolamento	1 #	1	1		2
<b>HLT-UNT (13)*</b>	<i>S. carnosus</i>					1
	<i>S. hycus</i> ‡					1
	<i>S. sciuri</i>		1			
	<i>S. warneri</i>					1
	<i>S. xylosus</i>		1			
	SCN non tipizzati †		2	1	1	
	Nessun isolamento	13	9	12	11	9
<b>S.AU-LL (10)*</b>	<i>S. intermedius</i> ‡		1			
	<i>S. simulans</i>			1	1	
	SCN non tipizzati †					2
	<i>S. aureus</i>	10	8	9	7	6
	Nessun isolamento		1			

\* Un totale di cinque pecore sono state macellate il giorno 7 dopo la mungitura e le ghiandole mammarie sono state prelevate per l'esame istologico. I risultati dell'esame microbiologico di nove mammelle infette – tre del gruppo SCN-LL, tre del gruppo SCN-PBS, due del gruppo S.AU-LL e una del gruppo HLT-UNT non sono, dunque, disponibili nei giorni 15 e 30..

† L'identificazione a livello di specie di alcuni SCN non è stata ottenuta mediante esame biochimico.

‡ Specie batteriche coagulasi-variabili o coagulasi-positive.

§ N.D.: dati non disponibili poiché le colture non sono state eseguite per campione di latte non sufficiente.

# Classificati come infetti sulla base di una conta delle cellule somatiche > 0.5 ( x 10<sup>6</sup> cellule ml<sup>-1</sup>) il giorno 0, anche alla luce di colture SCN-positive durante il monitoraggio pre-trattamento.

# **12. UTILIZZO DI UN MODELLO MURINO DI MASTITE PER STUDIARE GLI EFFETTI DELL'INFUSIONE INTRAMAMMARIA DI UN CEPPINO DI *L. LACTIS* DI ORIGINE ALIMENTARE**

## **12.1 INTRODUZIONE E SCOPO**

Gli antibiotici sono largamente utilizzati per il trattamento e la prevenzione della mastite nei ruminanti da latte (Tiwari et al., 2013), ma sono fortemente incoraggiate alternative terapeutiche per il crescente aumento della resistenza agli antibiotici dei patogeni responsabili di mastite.

È stato proposto recentemente l'utilizzo di batteri lattici (LAB) o batteriocine attraverso inoculazione intramammaria, anche se il loro impiego, è ancora controverso.

Per indagare la risposta indotta dall'infusione intramammaria di una coltura di *L. lactis*, è stato usato un modello murino di mastite che è conosciuto essere più efficiente in termini di tempo e costi rispetto ai modelli di grandi animali. Il modello sperimentale murino di mastite è stato sviluppato e caratterizzato da Chandler nel 1970 (Chandler, 1970). Sebbene esistano differenze tra ghiandole mammarie dei ruminanti e quelle murine (Notebaert et al., 2006), il modello murino di mastite da *S. aureus* ha fornito alternative credibili, utili ed economiche per lo studio degli agenti batterici patogeni che causano la mastite bovina (Brouillette et al., 2005; Brouillette e Malouin, 2005; Nazemi et al., 2014; Zhao et al., 2015) e per la valutazione primaria di farmaci sperimentali (Brouillette et al., 2004). Recentemente, un modello murino di mastite da *S. chromogenes* è stato proposto da Breyne e colleghi per studiare le differenze tra mastiti indotte da specie diverse di SCN associate al bovino (Breyne et al., 2015).

In questo studio è stata indagata la risposta immunitaria della ghiandola mammaria di topo indotta dall'inoculo intramammario di una coltura di un ceppo di *L. lactis* utilizzato in campo alimentare.

## **12.2 MATERIALI E METODI**

### **12.2.1 Ceppi batterici**

Per l'inoculo intramammario è stato impiegato *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 7930 (BCCM/LMG Bacteria Collection, Belgio), un ceppo utilizzato in campo alimentare nell'industria casearia nella produzione di formaggio svizzero. Inoltre, sono stati impiegati in questo studio 2 agenti patogeni responsabili di

mastite: lo *S. aureus* LMG 16805 isolato da mastite bovina (BCCM/LMG Bacteria Collection, Belgio) e lo *S. chromogenes* 100-SA isolato da un caso di mastite subclinica cronica nella pecora (Collezione Batterica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Italia).

Le colture batteriche sono state eseguite in Trypticase Soy Broth (TSB, BD, Italia) e incubate a 37 °C per 24 ore. Colture overnight sono state utilizzate per l'inoculazione intramammaria nei topi. *L. lactis* è stato usato così com'era, mentre *S. chromogenes* e *S. aureus* sono stati diluiti in PBS per ottenere la concentrazione desiderata (vedere il paragrafo sotto "Il Modello murino d'infezione mastitica"). L'inoculo batterico è stato determinato diluendo in maniera seriale la coltura e piastrando le diluizioni su TSB agar.

### 12.2.2 Topi

Sono stati presi in considerazione un totale di 41 topi CD-1 gravidi (circa 17 giorni di gestazione) acquistati dalla RMS Srl (Italia). I topi sono stati suddivisi casualmente in 6 gruppi:

- LL (ghiandole sane trattate con *L. lactis*) → n = 11,
- S.CH (ghiandole infette da *S. chromogenes* non trattate) → n = 7,
- S.CH-LL (ghiandole infette da *S. chromogenes* trattate con *L. lactis*) → n = 7,
- S.AU (ghiandole infette da *S. aureus* non trattate) → n = 3,
- PBS (mammelle sane trattate con PBS) → n = 6,
- UNT (ghiandole di controllo sane non trattate) → n = 7.

Gli animali sono stati alloggiati individualmente nello stabulario dell'Istituto Superiore di Sanità (Roma, Italia). Tutte le procedure coinvolgenti gli animali sono state approvate dall'autorità nazionale (Permesso numero 120/2014-B-24/03/2014). La cura e il trattamento degli animali sono stati condotti in accordo con le linee guida istituzionali e con le leggi e le politiche internazionali (Direttiva 2010/63/EU sulla protezione degli animali usati per scopi scientifici).

### 12.2.3 Modello murino d'infezione mastitica

La procedura generale per l'infezione della ghiandola mammaria murina è stata adattata dal metodo usato da Breyne et al. (Breyne et al., 2015) e Bruillette et al. (Bruillette et al., 2004). Brevemente, 10-12 giorni dopo la nascita della prole sono state isolate le madri CD-1 in lattazione. I piccoli sono stati rimossi 2 ore prima dell'inoculo nel canale del capezzolo delle ghiandole mammarie inguinali L5 (sinistra) e R5 (destra). Per le iniezioni intramammarie sono stati inoculati 100 µl di una coltura overnight di *L. lactis* (approssimativamente 10<sup>8</sup> UFC/ml) o di una coltura diluita in PBS di *S. chromogenes* (approssimativamente 10<sup>6</sup> UFC/ml) o di *S. aureus* (approssimativamente 10<sup>3</sup> UFC/ml), rispettivamente nei gruppi LL, S.CH e S.AU. Nel gruppo S.CH-LL, entrambe le ghiandole (L5 e R5) hanno ricevuto 2 iniezioni consecutive: un inoculo iniziale di 100 µl di *S. chromogenes* (approssimativamente 10<sup>6</sup> UFC/ml), seguito 4 ore dopo da un secondo inoculo di 100 µl di *L. lactis* (approssimativamente 10<sup>8</sup> UFC/ml). Nel gruppo di controllo PBS, le ghiandole inguinali sono state

trattate con 100 µl di PBS (Sigma Aldrich Srl, Italia). Per gli inoculi sono state adoperate siringhe con aghi con punta arrotondata da 33 gauge.

Ventiquattro ore dopo l'infezione, tutti i topi sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale. Per ogni topo sono state raccolte sterilmente le ghiandole mammarie L5 e R5, e conservate per esami colturali e indagini istologiche. È stata anche valutata la produzione di citochine nei gruppi LL, PBS e UNT.

#### **12.2.4 Coltura microbiologica delle ghiandole mammarie**

I campioni di ghiandola mammaria inguinale di ogni animale sono stati pesati, omogeneizzati e messi in coltura. Riassumendo, i campioni di tessuto sono stati omogeneizzati (1:1) in PBS e quindi diluiti serialmente (1:10). Le diluizioni sono state piastrate sia su Trypticase Soy Agar (TSA, BD, Italia) (è un terreno non selettivo) e sia su Mannitol Salt Agar (MSA, BD, Italia) (è un terreno selettivo e differenziale usato per l'isolamento di stafilococchi patogeni) per la conta batterica. Anche le ghiandole dei 2 gruppi di controllo PBS e UNT sono state piastrate su TSA e MSA. Le piastre sono state incubate per 24-48 ore a 37 °C fino a quando le colonie sono diventate visibili per la conta. Nel gruppo S.CH-LL, le conte di *L. lactis* sono state determinate sottraendo dalla somma di *S. chromogenes* e *L. lactis* ottenute sul TSA le conte dello *S. chromogenes* cresciuto sul MSA.

Da ogni piastra sono state prelevate colonie random e identificate molecularmente mediante PCR amplificando e sequenziando il gene 16S rDNA (Tabacchioni et al., 1995). I risultati sono stati espressi come Unità Formanti Colonia per grammo (UFC/g) di ghiandola mammaria. Sono stati poi calcolati i valori medi per gruppo e la deviazione standard.

#### **12.2.5 Indagine istologica**

I campioni di ghiandola mammaria di tutti i gruppi sono stati fissati in una soluzione neutra di formaldeide al 10% e processati di routine per ottenere sezioni istologiche di 4 µm incluse in paraffina che sono state quindi colorate con Ematossilina-eosina e osservate mediante microscopio ottico.

Le lesioni osservate sono state valutate in maniera semi-quantitativa assegnando uno score in funzione della presenza dell'infiltrato di cellule infiammatorie, osservando l'accumulo di polimorfonucleati, come in accordo con la letteratura (Biasibetti et al., 2012). È stata applicata una scala da 1 a 4 alle seguenti alterazioni:

- 0: nessuna lesione (assenza di infiltrato cellulare infiammatorio interstiziale e/o alveolare e tessuto non danneggiato);
- 1: lieve infiltrato infiammatorio interstiziale e/o alveolare da focale a multifocale e tessuto non danneggiato;
- 2: moderato infiltrato infiammatorio interstiziale e/o alveolare multifocale e tessuto non danneggiato;
- 3: grave infiltrato infiammatorio interstiziale e/o alveolare diffuso e aree focali di tessuto danneggiato;

- 4: grave infiltrato infiammatorio interstiziale e/o alveolare diffuso e aree necrotiche estese.

Tutti i vetrini sono stati valutati alla cieca da tre osservatori usando un microscopio ottico e i casi discordanti sono stati riesaminati fino a raggiungere un referto univoco.

### 12.2.6 Analisi delle citochine

I campioni di ghiandola mammaria dei gruppi LL, PBS e UNT, sono stati pesati e omogeneizzati in PBS (1:9, peso/volume) con l'integrazione di un cocktail di inibitori di proteasi capace di inibire serina e cisteina proteasi, calpaina proteasi e metallo-proteasi (Roche, Germania). L'omogenato è stato centrifugato a 2000 x g per 30 minuti a 4 °C ed è stato raccolto il surnatante. Sono stati determinati mediante un kit ELISA (PeproTech, Germania) i livelli delle citochine, interleuchina (IL)-1 $\beta$  e il fattore di necrosi tumorale (TNF)- $\alpha$ , in accordo con le istruzioni del produttore e della letteratura (Chen et al., 2014). I test ELISA sono stati eseguiti in triplicato. All'interno di ogni gruppo, sono stati, quindi, calcolati i valori medi e la deviazione standard.

### 12.2.7 Analisi statistica

I dati relativi alla conta batterica e alla produzione di citochine all'interno di ogni gruppo sono stati espressi mediante media  $\pm$  deviazione standard.

Il test ANOVA a due vie (con post-test di Tukey) è stato eseguito per analizzare i principali effetti degli inoculi di *L. lactis* e *S. chromogenes* e per valutare la loro interazione.

I livelli di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  tra LL, PBS e UNT sono stati confrontati tra i vari gruppi mediante il test ANOVA a una via (con post-test di Tukey).

È stato utilizzato il software GraphPad Prism 6 versione 6.07 per Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). È stato considerato significativo un valore di  $p < 0.05$ .

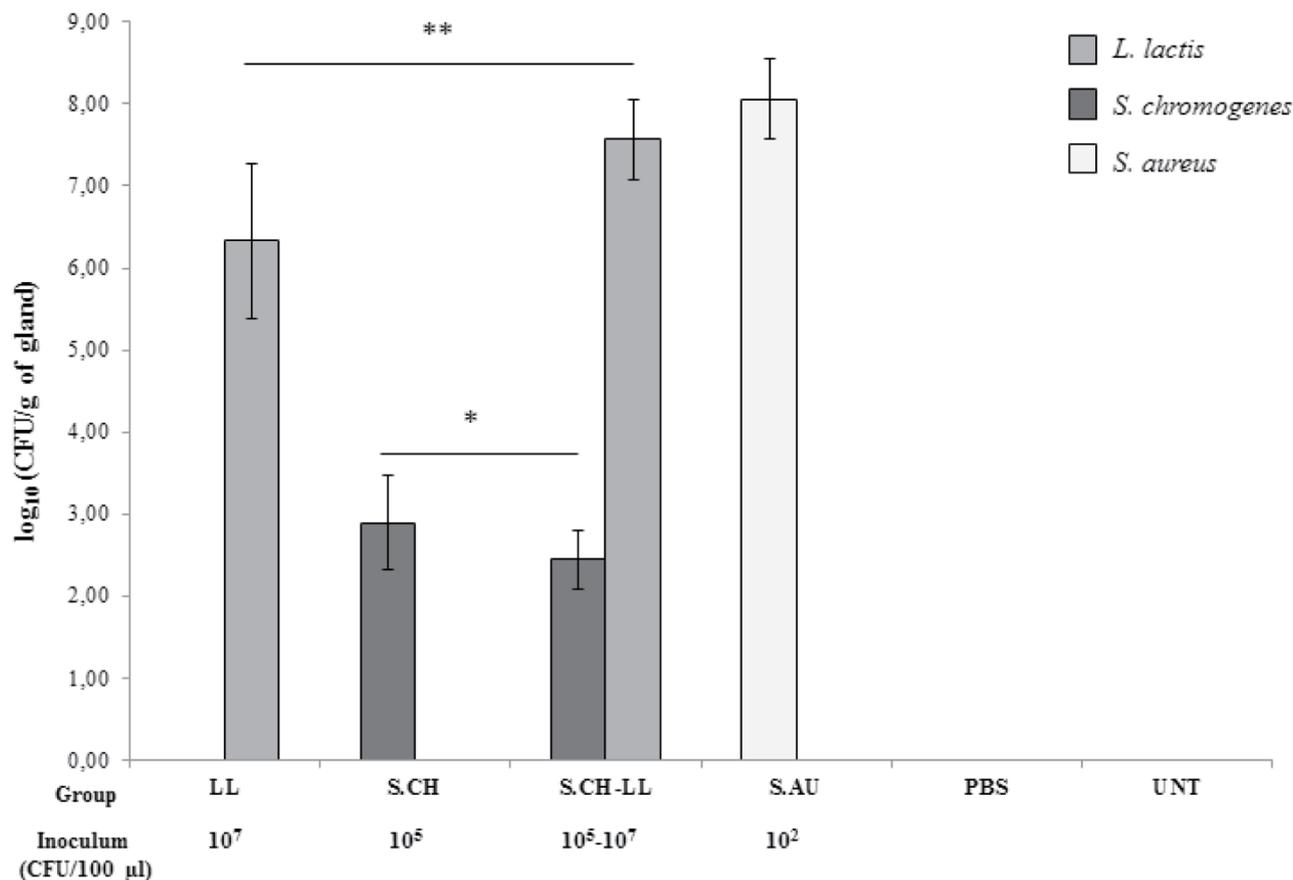
## 12.3 RISULTATI

### 12.3.1 Indagini microbiologiche da tessuto ghiandolare

I valori medi della conta batterica di *L. lactis* (gruppi LL e S.CH-LL), di *S. chromogenes* (gruppi S.CH e S.CH-LL) e di *S. aureus* (gruppo S.AU) sono mostrati in Figura 46 ed espressi in log<sub>10</sub> UFC/g di ghiandola.

Tutti i batteri testati sono stati isolati dalle ghiandole a 24 ore dall'inoculazione. Il valore medio della conta di *S. aureus* nel gruppo S.AU ( $1.79 \times 10^8$  UFC/g di ghiandola) è risultato maggiore rispetto ai valori medi registrati per *L. lactis* nel gruppo LL ( $9.32 \times 10^6$  UFC/g di ghiandola) e S.CH-LL ( $5.78 \times 10^7$  UFC/g di ghiandola) e per *S. chromogenes* nel gruppo S.CH ( $1.55 \times 10^3$  UFC/g di ghiandola) e S.CH-LL ( $2.56 \times 10^2$  UFC/g di ghiandola), anche se la dimensione dell'inoculo di *S. aureus* era più piccola di quella di *L. lactis* e *S. chromogenes*. Sulle conte di *L. lactis* sono stati osservati i principali effetti di *S. chromogenes* ( $F = 6.80$ ,  $p = 0.0147$ ) e *L. lactis* ( $F = 13.03$ ,  $p = 0.0012$ ), così come la loro interazione ( $F = 6.80$ ,  $p = 0.0147$ ). È stato trovato un aumento significativo della carica batterica di *L. lactis* nel

gruppo S.CH-LL comparato al gruppo LL ( $p = 0.0025$ ). Gli effetti principali di *S. chromogenes* ( $F = 8.50$ ,  $p = 0.0071$ ), *L. lactis* ( $F = 4.36$ ,  $p = 0.0464$ ) e la loro interazione ( $F = 4.36$ ,  $p = 0.0464$ ) sono stati osservati anche sulla conta di *S. chromogenes*. Una significativa diminuzione della carica batterica è stata registrata nel gruppo S.CH-LL comparata a quella S.CH ( $p = 0.0364$ ). Non è stata osservata nessuna colonizzazione batterica nelle ghiandole dei gruppi di controllo (PBS e UNT).



**Figura 46. Conta di *L. lactis*, *S. chromogenes* e *S. aureus***

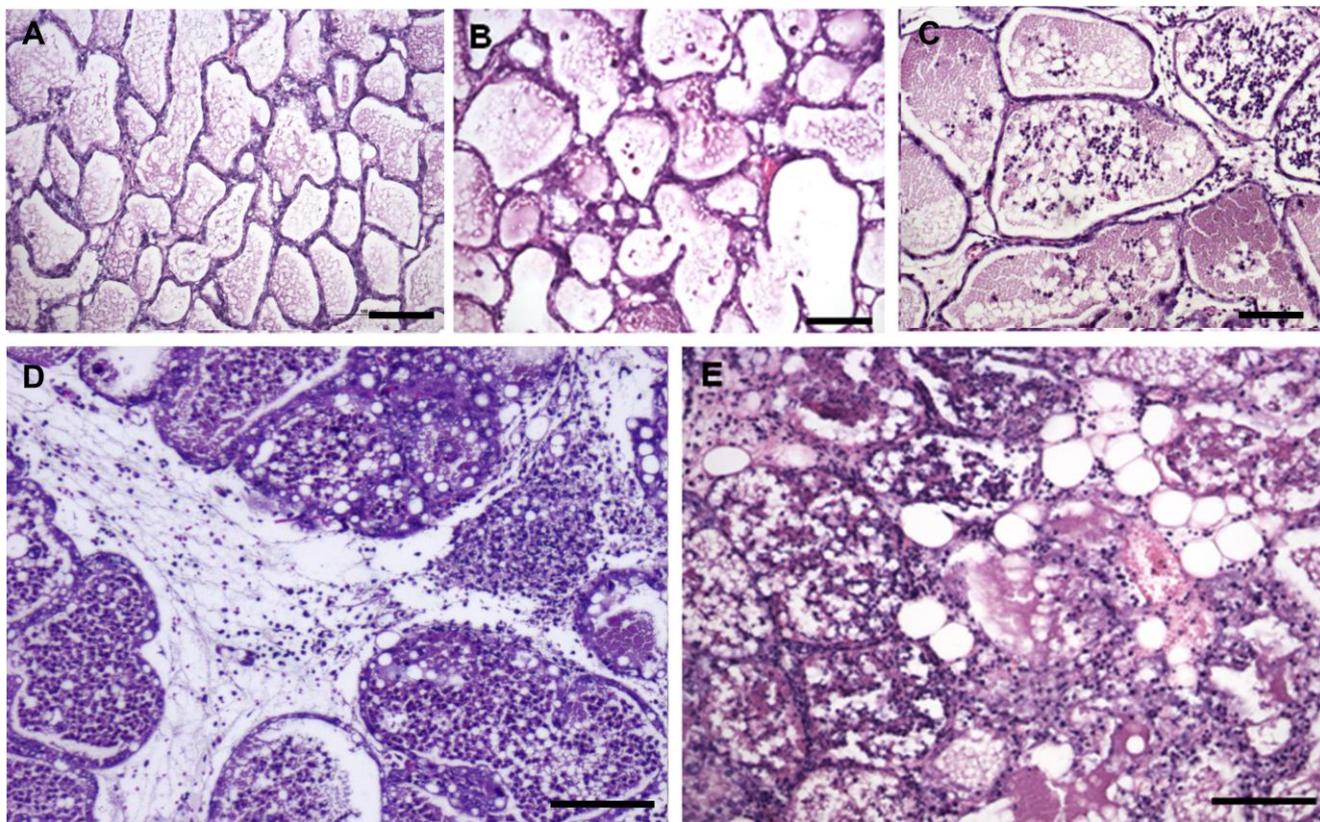
Tutti i batteri inoculati sono stati contati nelle ghiandole mammarie a 24 ore dall'iniezione nei gruppi trattati (LL, S.CH, S.CH-LL, S.AU e PBS) e nel gruppo non trattato (UNT). I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard dei valori log<sub>10</sub> UFC/g. Nella figura è riportata la dimensione iniziale dell'inoculo batterico. Sono, inoltre, indicate le differenze significative. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.001$ .

### 12.3.2 Alterazioni isto-patologiche

Sezioni istologiche rappresentative con score da 0 a 4 sono mostrate in Figura 47. La maggior parte dei campioni di tessuto di ghiandola mammaria dei gruppi PBS (4/6) e UNT (5/7), così come quelli del gruppo S.CH (6/7) hanno mostrato una struttura normale, senza lesioni nè infiltrazioni (score 0) come mostrato nella Figura 47A. Il resto dei campioni ha mostrato minime infiammazioni interstiziali non purulente (score 1): 2/6 nel gruppo PBS, 2/7 nel gruppo UNT e 1/6 nel gruppo S.CH.

Le ghiandole inoculate con *L. lactis* (LL e S.CH-LL) hanno mostrato caratteristiche istologiche variabili, con score da 0 a 3. Nel gruppo LL, il danno tissutale registrato variava da nessuna lesione (3/11, score 0) a lieve (1/11), moderato (5/11), e grave infiltrato di cellule infiammatorie (2/11), a cui è

stato assegnato un punteggio rispettivamente da 1 a 3 (Figura 47B-C-D). Nel gruppo S.CH-LL, sono state istologicamente riscontrate: nessuna lesione (1/7, score 0), lesioni lievi (2/7, score 1) e gravi (4/7, score 3) con infiltrazioni di cellule infiammatorie. Nel gruppo S.AU, il trattamento con *S. aureus* ha causato gravi infiltrazioni di polimorfonucleati con estese aree necrotiche (3/3, score 4) del tessuto ghiandolare (Figura 47E).



**Figura 47. Lesioni istologiche delle ghiandole mammarie dei topi.** **A:** gruppo UNT, score 0, nessuna infiltrazione e nessun danno tissutale; **B:** gruppo LL, score 1, lieve infiltrazione di polimorfonucleati localizzata in aree isolate di tessuto; **C:** gruppo LL, score 2, moderata infiltrazione interstiziale e alveolare di polimorfonucleati; **D:** gruppo LL, score 3, grave infiltrazione interstiziale e alveolare di polimorfonucleati e focali aree di tessuto danneggiato; **E:** gruppo S.AU, score 4, grave infiltrazione di polimorfonucleati ed estese aree necrotiche. Ingrandimenti 20X, bar = 100  $\mu$ m.

### 12.3.3 Gli effetti di *L. lactis* sulla produzione di citochine pro-infiammatorie

Sono stati misurati, a 24 ore dall'inoculo, i livelli di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nelle ghiandole mammarie trattate con *L. lactis* (gruppo LL), PBS (gruppo PBS) e nelle ghiandole di controllo non trattate (gruppo UNT). I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (pg/ml) nella Tabella 7.

Sono state osservate differenze significative nella produzione delle citochine pro-infiammatorie comparando soltanto i gruppi LL e UNT. Aumenti significativi sono stati riscontrati nei livelli di TNF- $\alpha$  ( $p = 0.0351$ ) e di IL-1 $\beta$  ( $p = 0.0204$ ) del gruppo LL. Comparando l'insieme di dati del gruppo LL *versus* il gruppo PBS, non sono state trovate differenze statisticamente significative, sebbene siano stati registrati maggiori livelli di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nel gruppo LL. Livelli più alti di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  sono stati registrati in 2 ghiandole trattate con *L. lactis* che presentavano, all'esame istologico, gravi infiltrazioni

di polimorfonucleati. La variazione più pronunciata è stata osservata per i valori di IL-1 $\beta$  del gruppo LL, come indicato dalla deviazione standard.

Citochine (pg/ml)	LL	PBS	UNT	Differenze significative
TNF- $\alpha$	267 $\pm$ 83	165 $\pm$ 49	142 $\pm$ 62	LL vs UNT p = 0.0351
IL-1 $\beta$	5383 $\pm$ 1007	4117 $\pm$ 300	3762 $\pm$ 534	LL vs UNT p = 0.0204

**Tabella 7. Produzione di citochine pro-infiammatorie nei gruppi LL, PBS e UNT**

I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Le differenze tra i livelli di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  tra i gruppi LL, PBS e UNT sono state determinate mediante test ANOVA a una via, seguito, dove applicabile, dal post-test di Tukey. Sono riportate le differenze significative ( $p < 0.05$ ).

## 12.4 DISCUSSIONE

Il modello murino di mastite *in vivo* è stato dimostrato essere un'alternativa veloce, economica e riproducibile per studiare la risposta immunitaria specifica dell'ospite all'iniezione intramammaria con i principali patogeni della mastite, come *E. coli* e *S. aureus* (Brouillette et al., 2005; Notebaert et al., 2008). Recentemente uno studio pilota ha suggerito che, un modello murino di mastite da SCN può mimare la mastite bovina da SCN ed essere usato per studiare le differenze tra le specie di SCN bovino e i ceppi (Breyne et al., 2015). In questa ricerca si è indagato se un'iniezione intraduttale di una coltura di *L. lactis* nella ghiandola mammaria murina (circa  $10^7$  UFC/100  $\mu$ l) può essere usata per valutare la sopravvivenza di *L. lactis* nel tessuto e la capacità di modulare o vincere la risposta immunitaria dell'ospite 24 ore post inoculo. Pertanto sono state condotte indagini microbiologiche e isto-patologiche su ghiandole mammarie trattate con *L. lactis*. Inoltre sono anche stati trattati ulteriori topi con sospensioni batteriche di patogeni causanti mastite, come *S. chromogenes* (S.CH) o *S. aureus* (S.AU) in modo da avere due modelli murini di mastite come strumenti complementari per valutare nel miglior modo gli effetti dell'inoculo di *L. lactis* nella ghiandola mammaria. Si è deciso di inoculare circa  $10^5$  UFC/100  $\mu$ l di *S. chromogenes* perché uno studio precedente ha documentato che una dose di inoculo di *S. chromogenes* di  $10^5$  UFC nella ghiandola mammaria murina ha determinato mastite clinica (Breyne et al., 2015). In accordo col modello murino di mastite da *S. aureus* validato, è stato inoculato circa  $10^2$  UFC/100  $\mu$ l di *S. aureus* perché una dose di inoculo di 100 UFC di questo patogeno è stato provato essere non fatale e causare un livello significativo di infezione con evidenti segni di infiammazione della ghiandola mammaria 24 ore post inoculo (Brouillette et al., 2004; Breyne et al., 2015). Un ulteriore gruppo è stato incluso nel presente studio: S.CH-LL, contenente animali trattati con 2 iniezioni separate, *S. chromogenes* prima, seguito da *L. lactis*, al fine di valutare se *L. lactis* fosse in grado di influenzare la sopravvivenza di *S. chromogenes* nella ghiandola mammaria.

I risultati microbiologici hanno mostrato che *L. lactis* è stato capace di sopravvivere nella ghiandola mammaria a 24 ore dall'infezione, così come gli agenti patogeni di mastite *S. chromogenes* e *S. aureus*. Al contrario, non è stata osservata alcuna colonizzazione batterica nelle ghiandole mammarie di controllo (gruppi PBS e UNT). È stato osservato che *L. lactis* ha ridotto la sopravvivenza di *S.*

*chromogenes* nelle ghiandole del gruppo S.CH-LL 24 ore post inoculo, e ha aumentato la propria abilità di sopravvivenza coesistendo col patogeno. Sembra che *L. lactis* e *S. chromogenes* siano coinvolti in un comportamento cooperativo interspecie piuttosto che in interazioni competitive. Le specie batteriche possono infatti coesistere con altri organismi o dominare, competendo attraverso meccanismi attivi per lo stesso pool di risorse (Hibbing et al., 2010).

Le ghiandole trattate con *L. lactis* hanno mostrato caratteristiche istologiche variabili, che vanno da tessuto non danneggiato con assenza di infiltrato infiammatorio a grave infiltrato di polimorfonucleati con aree focali di tessuto danneggiato (score da 0 a 3). Il cambiamento osservato con maggiore frequenza nelle ghiandole mammarie inoculate solo con *L. lactis* (gruppo LL) è stato una moderata infiammazione della ghiandola caratterizzata da infiltrazione alveolare e/o interstiziale di polimorfonucleati. Le ghiandole inoculate sia con *S. chromogenes* che con *L. lactis* (gruppo S.CH-LL) hanno mostrato comunque un più grave grado di infiammazione. L'infiltrazione neutrofilica è stata osservata in quasi tutte le ghiandole, sia nell'interstizio che negli alveoli, suggerendo una più grave infiammazione delle mammelle inoculate solo con *L. lactis*. Queste differenze all'istologico sono legate probabilmente al maggior numero di colonie di *L. lactis* misurate nel gruppo S.CH-LL rispetto a quelle registrate in LL.

La produzione di citochine pro-infiammatorie è stata misurata nelle ghiandole dei gruppi LL, PBS e UNT. Aumenti significativi dei livelli di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  sono stati trovati nelle ghiandole inoculate con *L. lactis* comparando i gruppi LL con UNT. Tuttavia, non sono stati osservati cambiamenti significativi tra i gruppi LL e PBS, sebbene siano stati registrati un trend positivo delle citochine pro-infiammatorie e una dispersione più pronunciata dei valori in LL. I risultati della produzione di citochine sono in accordo con il più alto numero di ghiandole con un infiltrato di cellule infiammatorie che è stato registrato nel gruppo LL rispetto ai gruppi di controllo.

Prevedibilmente, nelle ghiandole inoculate con *S. aureus* la crescita batterica è stata la più alta registrata, sebbene la dimensione dell'inoculo fosse la più piccola. Inoltre, tutte le ghiandole trattate con *S. aureus* hanno mostrato il più grave grado istologico di infiammazione (score 4). Entrambi i risultati sono compatibili con gli studi precedenti (Brouillette et al., 2004; Breyne et al., 2015) e sembrano supportare il fatto che una dose di inoculo di 100 UFC di un isolato mastitico di *S. aureus* per ghiandola, indipendentemente dal ceppo, sia in grado di causare una infiammazione grave della ghiandola mammaria nel modello murino a 24 ore dall'inoculo. Ciò conferma che i topi in lattazione sono altamente suscettibili all'infusione intramammaria da *S. aureus*. Contrariamente alle aspettative, l'isolato mastitico di *S. chromogenes* usato nella presente ricerca, non è stato in grado di indurre mastite a 24 ore dall'inoculo quando è stato usato da solo alla dose di 10<sup>5</sup> UFC. Infatti, la maggior parte delle ghiandole mammarie del gruppo S.CH hanno mostrato, all'esame istologico, strutture normali con assenza di infiltrato infiammatorio o lesioni. Risultati concordanti sono stati trovati nei gruppi di controllo (PBS e UNT). Alcuni casi di infiammazione della ghiandola mammaria, peraltro lievi, sono stati registrati nel gruppo S.CH, così come in PBS e UNT. Questa lieve infiammazione sembra essere stata causata dall'accumulo di latte (infiammazione fisiologica) piuttosto che dal

patogeno o dallo stesso inoculo. Il rapido accumulo di latte nella ghiandola mammaria, dovuto alla rimozione permanente della prole dalla madre in lattazione, che è riportata in letteratura come “svezzamento forzato”, può causare un aumento dei mediatori dell’infiammazione (Baxter et al., 2006) e dell’afflusso di macrofagi nella ghiandola (Stein et al., 2004; O’Brein et al., 2012), i quali sono coinvolti nel processo di morte cellulare e di rimodellamento tissutale (Ingman et al., 2015). I risultati della presente ricerca insieme con la letteratura (Breyne et al., 2015) confermano che gli SCN sono patogeni minori di mastite e che isolati mastitici epidemiologicamente differenti di ceppi di SCN possono indurre risposte variabili del sistema immunitario innato nella ghiandola mammaria del topo. In conclusione, l’inoculo di *L. lactis* ha causato caratteristiche istologiche variabili nella ghiandola mammaria, che vanno da tessuto non danneggiato a infiammazione grave. Questi risultati suggeriscono che i batteri come *L. lactis*, possono agire come patogeni causanti mastite quando inoculati ad alta concentrazione nella ghiandola mammaria di topi in lattazione.

## ***RICERCA III***

# **13. STUDIO MICROBIOLOGICO E ANATOMO-PATOLOGICO IN GHIANDOLE MAMMARIE MACROSCOPICAMENTE SANE E PATOLOGICHE DI PICCOLI RUMINANTI**

## **13.1 INTRODUZIONE e SCOPO**

La salute della ghiandola mammaria è fondamentale per l'igiene e la qualità del latte e dei prodotti lattiero-caseari, con notevole impatto sul benessere del consumatore.

Dopo aver identificato i principali agenti mastidogeni che circolano nelle due regioni insulari italiane attraverso la rielaborazione dei dati raccolti dai rispettivi centri analisi del latte di riferimento regionale, è stata intrapresa una terza ricerca al fine di indagare gli agenti microbici presenti nelle ghiandole mammarie dei piccoli ruminanti in Piemonte. Lo studio, svolto utilizzando due macelli della regione quali osservatori epidemiologici, ha previsto la raccolta di ghiandole macroscopicamente sane (studio 1) e di ghiandole con lesioni macroscopiche compatibili con mastite (studio 2).

Nonostante la ghiandola mammaria rappresenti l'organo specializzato nella produzione del latte, non sono attualmente disponibili in letteratura lavori riguardanti la flora microbica della ghiandola mammaria sana dei piccoli ruminanti e, in particolare, la correlazione tra i dati microbiologici e i reperti istologici. Lo scopo della presente ricerca è stato pertanto indagare gli agenti microbici (batteri, funghi e lentivirus) isolati dal parenchima di ghiandole mammarie macroscopicamente sane e patologiche di piccoli ruminanti regolarmente macellati e correlare la loro presenza con le lesioni istologiche infiammatorie eventualmente presenti.

## **13.2 MATERIALI E METODI**

### **13.2.1 Raccolta dei campioni studio 1**

Nel periodo compreso tra ottobre 2013 e febbraio 2016, venivano raccolti in due macelli della regione Piemonte (nord Italia) un totale di 89 ghiandole mammarie macroscopicamente sane di piccoli ruminanti (n = 41 pecore; n = 48 capre). Le mammelle appartenevano rispettivamente a 25 allevamenti ovini e a 27 allevamenti caprini situati nelle province di Cuneo e Torino. Gli animali presi in considerazione sono stati macellati per cause differenti, non relazionate a un coinvolgimento delle ghiandole mammarie.

In questo studio sono state incluse unicamente le mammelle considerate esenti da mastite e/o da ogni altra alterazione visibile macroscopicamente (ispezione e palpazione).

### **13.2.2 Raccolta dei campioni studio 2**

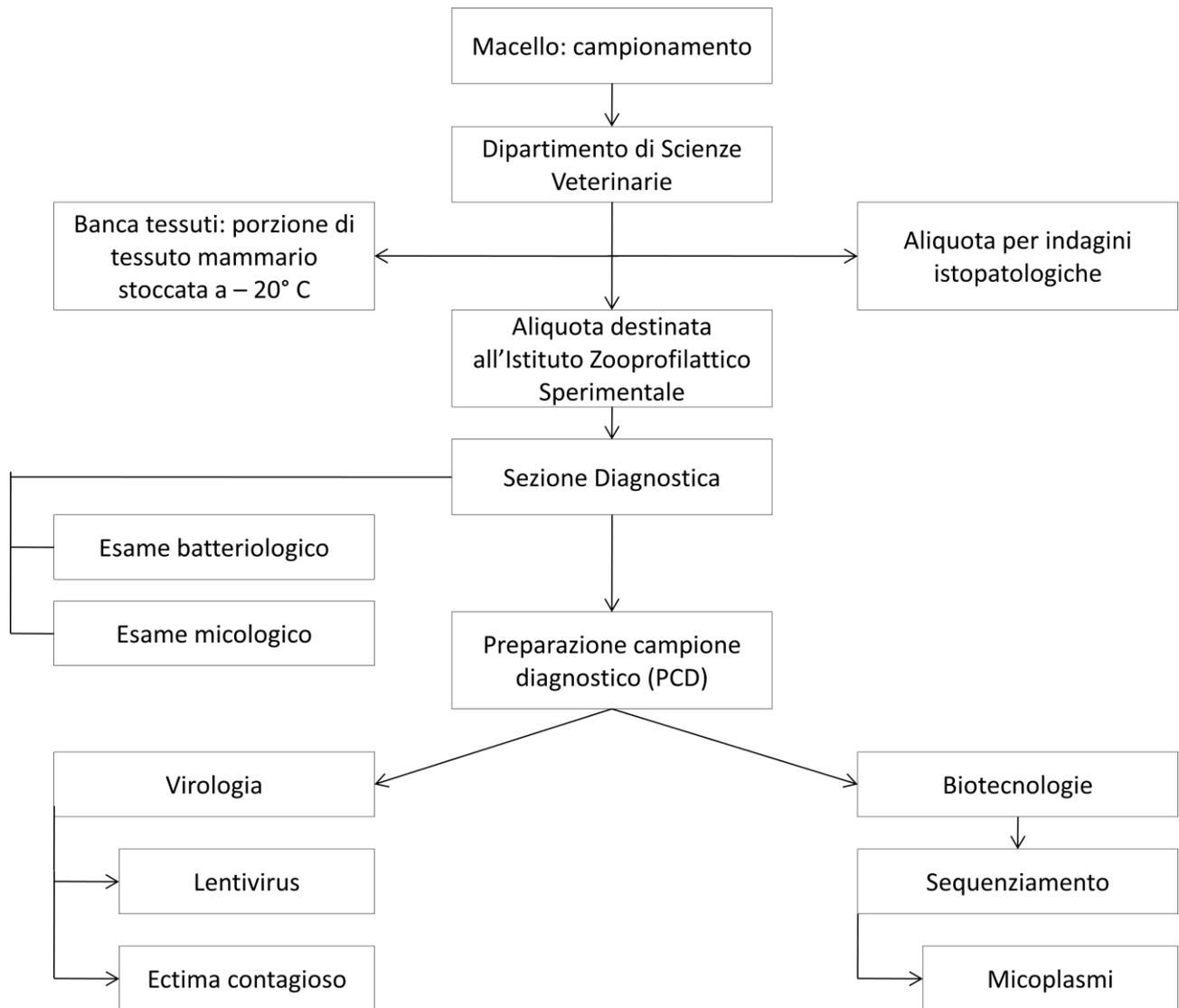
Nello stesso periodo e negli stessi macelli venivano raccolti un totale di 146 ghiandole mammarie macroscopicamente patologiche di piccoli ruminanti (n = 72 pecore; n = 74 capre). Le mammelle appartenevano rispettivamente a 34 allevamenti ovini e a 31 allevamenti caprini situati nelle province di Cuneo e Torino. Gli animali presi in considerazione sono stati macellati per cause differenti, talvolta relazionate a un coinvolgimento delle ghiandole mammarie.

In questo studio sono state incluse unicamente le mammelle che mostravano alterazioni riconducibile a mastite clinica.

### **13.2.3 Campionamento**

In seguito a un primo esame macroscopico in sede di macellazione, le mammelle venivano conservate a 4 °C e trasportate ai laboratori del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Torino. Qui i campioni venivano sottoposti a un secondo e più accurato esame macroscopico, seguito dal prelievo del tessuto. La cute della ghiandola veniva lavata, asciugata e disinfettata con garze imbevute con una soluzione al 70% di alcool. Due frammenti del parenchima di circa 2.5 cm<sup>3</sup> venivano prelevati da due differenti punti della ghiandola e fissati in falcon contenenti formalina al 10% per l'esame isto-patologico; un campione veniva stoccato a -20 °C come banca di tessuto e la porzione ghiandolare rimanente veniva inviata all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta per le analisi batteriologiche, virologiche e micologiche (Figura 48).

**Figura 48.** Iter diagnostico seguito.



### 13.2.4 Batteriologia

La superficie dell'organo è stata sterilizzata attraverso cauterizzazione e quindi tagliata usando un bisturi fino all'esposizione del tessuto ghiandolare. Un tampone è stato inserito nell'incisione e quindi è stato seminato su piastre di agar. Sono state usate piastre di agar Columbia contenenti il 5% di sangue di pecora (Liofilchem) e di agar Cioccolato (Liofilchem) e incubate aerobicamente a 37 °C e con il 5% di CO<sub>2</sub> rispettivamente per 24-48 ore. L'identificazione dei batteri è avvenuta mediante metodi di identificazione fenotipica; a questo scopo è stato usato un metodo automatico basato sulla crescita batterica (Vitek 2 System, bioMérieux) che misura sia la torbidità che i prodotti colorati attraverso varie attività metaboliche come l'acidificazione, l'alcalinizzazione, l'idrolisi enzimatica e la crescita in presenza di sostanze inibitorie. Sono state selezionate soltanto le colonie numericamente rappresentative, in cultura pura o che mostravano segni fenotipici di emolisi in accordo con Carter e Cole (1990). Per ottenere una chiara interpretazione dei risultati, è stato eseguito un controllo parallelo per l'identificazione di eventuali sostanze inibenti presenti nelle mammelle. Quindi due frammenti di parenchima sono stati posti su una piastra di agar contenente un inoculo di *Bacillus*

*subtilis* e incubati aerobicamente per 24 ore a 37 °C. Il test è stato considerato positivo se vi era un alone attorno al frammento che indica l'inibizione della crescita batterica.

Per l'individuazione di *Mycoplasma* spp., un terreno agar selettivo PPLO (Microbiol) è stato incubato a 37 °C con il 5% di CO<sub>2</sub> previo pre-arricchimento. In particolare, un frammento di parenchima è stato inoculato in brodo PPLO (Microbiol) e incubato a 37 °C con il 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 72 ore, 0.1 ml di brodo è stato inoculato in agar PPLO. La crescita del micoplasma è stata monitorata per 10 giorni attraverso l'esame microscopico con lo scopo di identificare colonie con la forma tipica "di uovo fritto" o finemente granulare (vetro smerigliato) che penetrasse la superficie dell'agar.

I batteri sono stati classificati in 4 gruppi:

- patogeni (PATO): batteri patogeni, in accordo con la letteratura, responsabili di mastiti cliniche;
- stafilococchi coagulasi-negativi (SCN): batteri opportunisti presenti nella flora microbica cutanea degli animali e del mungitore, definiti da molti autori "patogeni minori", generalmente responsabili di mastiti subcliniche. Hanno patogenicità variabile, da forme asintomatiche o lievi, a casi sporadici di forme cliniche importanti soprattutto in caso di immunodepressione;
- opportunisti ambientali (EO): microrganismi ubiquitari presenti nel tratto gastro-enterico, suolo, acqua e lettiera che, una volta penetrati all'interno della mammella, sono in grado, in determinate condizioni, di diventare patogeni e causare mastiti di gravità variabile;
- altri microrganismi (OM): batteri non associati a mastiti cliniche o subcliniche.

### 13.2.5 Micologia

Per l'isolamento di funghi e batteri filamentosi è stato usato agar Sabouraud (Biolife) sfregando direttamente il tampone, come precedentemente descritto, sulla superficie della piastra. La piastra è stata incubata per 10 giorni a temperatura ambiente. In caso di crescita di colonie sospette, è stato fatto un esame microscopico per l'identificazione del genere.

### 13.2.6 Virologia

Per l'individuazione dei Lentivirus (SRLV) è stato estratto il DNA da 50-100 mg di tessuto mammario usando un kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega), seguendo le istruzioni del manuale d'uso. Il DNA è stato amplificato seguendo una versione leggermente modificata del protocollo descritto da Grego e colleghi (2007). Brevemente, sono stati disegnati, basandosi su regioni conservate, 2 primers forward, GAG F1 (5'-TGGTGARKCTAGMTAGAGACATGG-39) e GAG F2 (5'-CAAACWGTRGCAATGCAGCATGG-3'), 2 primers reverse POL R1 (5'-CATAGGRGGHGC GGACGGCASCACACG-3') e POL R2 (5'-GCGGACGGCASCACACG-3') (Grego et al., 2007).

La prima reazione di PCR è stata eseguita in un volume totale di 50 µl contenente buffer per PCR 1X (Invitrogen, Platinum Taq DNA Polymerase), 0.2 mM di dNTPs, 3 mM di MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µM di ogni primers, 1U Taq Polymerase (Invitrogen). La PCR è stata eseguita nelle seguenti condizioni: la fase

iniziale di denaturazione del campione a 95 °C per 15 minuti; 35 cicli di denaturazione a 94 °C per 30 secondi, annealing a 55 °C per 1 minuto, ed elongation a 72 °C per 2 minuti, seguito da una fase finale di elongation a 72 °C per 10 minuti. La seconda PCR è stata eseguita nelle stesse condizioni (usando primers GAG F2 e POL R2), con una temperatura di annealing più bassa (55 °C) per un totale di 45 cicli. I prodotti di amplificazione sono stati quindi caricati e analizzati su gel di agarosio al 2%.

Al fine di escludere le infezioni da virus ORF (ORFv), i campioni di tessuto mammario delle ghiandole con lesioni macroscopiche sono stati anche sottoposti a una PCR basata sull'amplificazione di un frammento di 103 bp della DNA polimerasi (*DNA pol*) del ORFv. I primers forward e reverse utilizzati sono stati quelli descritti da Bora e colleghi (2011). La PCR è stata effettuata in un volume totale di 25 µl contenente: Buffer 1X (Invitrogen, Platinum Taq DNA Polymerase), 0.2 mM di dNTPs, 1.5 mM di MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM di ciascun primer, 1U Taq Polymerase (Invitrogen). Le condizioni di amplificazione sono state: denaturazione a 95 °C per 5 minuti, un ciclo ripetuto per 40 volte comprendente denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 64 °C per 30 secondi, estensione a 72 °C per 30 secondi, seguito da un'estensione finale a 72 °C per 5 minuti.

### 13.2.7 Istologia

Frammenti di parenchima fissati in formalina sono stati inclusi in paraffina e tagliati in sezioni di 5µm di spessore. Le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina (EE) ed esaminate al microscopio ottico a differenti ingrandimenti. Microscopicamente le lesioni sono state classificate come:

- negative quando mostravano un pattern normale;
- affette da mastite non purulenta cronica quando mostravano cellule infiammatorie mononucleate interstiziali e/o alveolari (linfociti, plasmacellule, macrofagi) e fibrosi da lieve a grave;
- affette da mastite mista cronica quando mostravano cellule infiammatorie mononucleate interstiziali e/o alveolari e un variabile numero di neutrofili;
- affette da mastite purulenta acuta quando mostravano neutrofili interstiziali e/o alveolari;
- affette da mastite purulenta cronica/piogranulomatosa quando mostravano centri di necrosi colliquativa circondati da neutrofili, macrofagi e capsula fibrosa/formazioni nodulari con o senza centro necrotico circondato da linfociti, neutrofili e un numero variabile di macrofagi e cellule mononucleate più voluminose di derivazione macrofagica.

### 13.2.8 Analisi statistica

Nello studio 1 per valutare l'associazione tra i reperti istologici, microbiologici e il segnalamento degli animali (l'età e la specie), è stata eseguita una regressione logistica multinomiale mediante "modello lineare generalizzato misto" (GLMM). Tale modello considera come covariate la positività a SCN, EO, PATO e SRLV, per valutare la relazione tra lo stato infettivo e le lesioni istologiche. Per valutare la

relazione tra la presenza di follicoli all'esame istologico e le infezioni da SRLV è stata eseguita una regressione logistica, modificata sulla base dell'età degli animali e della presenza di ogni classe di batteri. Questo modello è stato modificato sulla base dell'infezione dai gruppi batterici (EO, SCN), dell'età e della specie. Il possibile effetto dell'età, della specie e della positività agli SRLV sulla colonizzazione della mammella da parte di SCN ed EO è stato valutato mediante una serie di regressioni logistiche eseguite utilizzando un modello lineare generalizzato misto. Tutti i modelli di regressione includono gli allevamenti come "effetto random" per tenere in considerazione che diversi animali provenivano da stesse aziende.

Nello studio 2, per valutare l'associazione tra i germi patogeni e la presenza di ascessi/piogranulomi e mastite purulenta cronica/piogranulomatosa all'esame istologico è stato utilizzato il test esatto di Fisher. Sono stati considerati statisticamente significativi valori di  $p < 0.05$ .

## 13.3 RISULTATI

### 13.3.1 Studio 1

Le pecore di età compresa tra 1 e 15 anni (mediana 5) appartenevano principalmente alla razza Biellese ( $n = 20$ ; 48.8%) e a incroci ( $n = 17$ ; 41.5%), meno rappresentate erano le razze Frabosana ( $n = 2$ ; 4.9%), Lacaune ( $n = 1$ ; 2.4%) e Sambucana ( $n = 1$ ; 2.4%). Le capre di età compresa tra 2 e 13 anni (mediana 5.5) appartenevano alla razza Saanen ( $n = 13$ ; 27.1%), incroci ( $n = 25$ ; 52.1%) e Camosciata delle Alpi ( $n = 10$ ; 20.8%). In base alle differenti fasi del ciclo produttivo, gli animali sono stati suddivisi in 3 gruppi di età: il primo gruppo comprendeva 27 animali di età fino a 3 anni ( $n = 14$  pecore e  $n = 13$  capre), il secondo gruppo era composto da 44 animali di età compresa tra 4 e 8 anni ( $n = 20$  pecore e  $n = 24$  capre), e il terzo gruppo era composto da 18 animali di età oltre 8 anni ( $n = 7$  pecore e  $n = 11$  capre).

Su un totale di 89 mammelle macroscopicamente sane, 25/89 risultavano microbiologicamente negative (28.09%;  $n = 6$  pecore,  $n = 19$  capre), mentre nelle restanti 64/89 (71.91%;  $n = 35$  pecore,  $n = 29$  capre) è stata isolata almeno una specie batterica. Nelle 64 mammelle positive sono state isolate un totale di 138 specie batteriche. Le specie batteriche isolate e la loro frequenza di isolamento sono indicate nella Tabella 8.

Gli stafilococchi coagulasi-negativi (SCN) sono stati i batteri più frequentemente isolati sia nelle pecore che nelle capre (64/138; 46.42%). La specie predominante è stata *Staphylococcus xylosum* ( $n = 18$ ; 13.04%), seguita da *Staphylococcus caprae* ( $n = 7$ ; 5.07%), *Staphylococcus equorum* ( $n = 7$ ; 5.07%), *Staphylococcus auricularis* ( $n = 5$ ; 3.62%), *Staphylococcus warneri* ( $n = 5$ ; 3.62%), e *Staphylococcus vitulinus* ( $n = 4$ ; 2.9%). Le rimanenti specie isolate sono riassunte nella Tabella 8.

Gli "opportunisti ambientali" sono stati il secondo gruppo di batteri più frequentemente identificato (48/138; 34.76%). *Aerococcus viridans* è stato il batterio maggiormente isolato in entrambe le specie ( $n = 29$ ), rappresentando così il 21.01% del totale degli isolamenti. Altri batteri, isolati con una frequenza più bassa, sono stati *Bacillus pumilus* ( $n = 6$ ; 4.34%), *Aeromonas hydrophila* ( $n = 3$ ; 2.17%), *Escheria coli* ( $n = 2$ ; 1.46%) e *Klebsiella oxytoca* ( $n = 2$ ; 1.46%).

Un totale di 14/138 (10.14%) batteri sono stati identificati come “altri microrganismi”. A questo gruppo appartenevano batteri quali *Acinetobacter Iwoffii* e *Kocuria rosea*, con 3 casi ciascuno (2.17%). Altre specie batteriche identificate con una bassa frequenza sono state *Alcaligenes faecalis* (n = 2; 1.46%), *Vagococcus fluvialis* (n = 2; 1.46%), *Acinetobacter genomospecies* (n = 1; 0.72%), *Acinetobacter* spp. (n = 1; 0.72%), *Bordetella trematum* (n = 1; 0.72%) e *Paenibacillus* spp. (n = 1; 0.72%).

I batteri “patogeni” sono stati isolati in bassa percentuale (12/138; 8.68%). *Staphylococcus aureus* è stato trovato in 5 casi (3.62%), mentre *Streptococcus uberis* è stato identificato in 4 (2.9%). *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Escherichia coli* hanno rappresentato lo 0.72% degli isolamenti.

**Tabella 8.** Numero e frequenza delle specie batteriche isolate nelle mammelle macroscopicamente sane.

Microrganismi	Specie	N° isolati	%	Ovini	Caprini
<b>Patogeni</b>					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	3.62%	3	2
	<i>Streptococcus uberis</i>	4	2.90%	2	2
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	0.72%	1	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0.72%	0	1
	<i>Escherichia coli</i>	1	0.72%	0	1
	<b>totale del gruppo</b>	<b>12</b>	<b>8.68%</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>Stafilococchi coagulasi-negativi</b>					
	<i>Staphylococcus arlettae</i>	2	1.46%	2	0
	<i>Staphylococcus auricularis</i>	5	3.62%	2	3
	<i>Staphylococcus capitis</i>	1	0.72%	0	1
	<i>Staphylococcus caprae</i>	7	5.07%	0	7
	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2	1.46%	2	0
	<i>Staphylococcus cohnii</i>	2	1.46%	1	1
	<i>Staphylococcus equorum</i>	7	5.07%	4	3
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	1.46%	1	1
	<i>Staphylococcus kloosii</i>	1	0.72%	1	0
	<i>Staphylococcus lentus</i>	1	0.72%	1	0
	<i>Staphylococcus muscae</i>	2	1.46%	1	1
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	2	1.46%	1	1
	<i>Staphylococcus simulans</i>	2	1.46%	1	1
	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	4	2.90%	3	1
	<i>Staphylococcus warneri</i>	5	3.62%	3	2
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	18	13.04%	9	9

	<i>Staphylococcus</i> spp.	1	0.72%	0	1
	<b>totale del gruppo</b>	<b>64</b>	<b>46.42%</b>	<b>32</b>	<b>32</b>
<b>Opportunisti ambientali</b>					
	<i>Aerococcus viridans</i>	29	21.01%	19	10
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3	2.17%	3	0
	<i>Aeromonas sobria</i>	1	0.72%	1	0
	<i>Bacillus pumilus</i>	6	4.34%	1	5
	<i>Escherichia coli</i>	2	1.46%	1	1
	<i>Enterococcus cecorum</i>	1	0.72%	1	0
	<i>Enterococcus durans</i>	1	0.72%	0	1
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0.72%	0	1
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	1.46%	2	0
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	0.72%	0	1
	<i>Streptococcus constellatus</i>	1	0.72%	1	0
	<b>totale del gruppo</b>	<b>48</b>	<b>34.76%</b>	<b>29</b>	<b>19</b>
<b>Altri microrganismi</b>					
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	3	2.17%	1	2
	<i>Acinetobacter genomospecies</i>	1	0.72%	0	1
	<i>Acinetobacter</i> spp.	1	0.72%	0	1
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	2	1.46%	2	0
	<i>Bordetella trematum</i>	1	0.72%	1	0
	<i>Kocuria rosea</i>	3	2.17%	3	0
	<i>Paenibacillus</i> spp.	1	0.72%	0	1
	<i>Vagococcus fluvialis</i>	2	1.46%	1	1
	<b>totale del gruppo</b>	<b>14</b>	<b>10.14%</b>	<b>8</b>	<b>6</b>
<b>Totale</b>		138	100%	75	63

In 48/64 mammelle (75%) sono state riscontrate delle coinfezioni. Nello specifico, in 27/48 campioni sono state isolate 2 differenti specie batteriche (42.2%), in 17/48 sono state isolate 3 specie batteriche (26.5%), in 3/48 sono state isolate 4 specie batteriche (4.7%) e in 1/48 sono state isolate 5 specie batteriche (1.6%). Solo il 25% delle mammelle positive (16/64) è stato caratterizzato da una singola infezione.

Nessuna mammella è risultata positiva per *Mycoplasma* spp.

In 4 mammelle (4.5%) è stata riscontrata la presenza di sostanze inibenti.

Solo in 1 piastra di agar Sabouraud è cresciuto *Aspergillus* spp.(1.1%).

Ben 35/89 campioni (39.3%) sono risultati positivi per SRLV, la maggior parte dei quali insieme a batteri (21/35; 60%). La capra è risultata la specie prevalentemente colpita rispetto alla pecora (29/35; 82.9% versus 6/35; 17.1%).

Istologicamente, 45 mammelle su 89 presentavano una mastite non purulenta cronica (50.56%; pecore n = 17 e capre n = 28), 12/89 presentavano una mastite mista cronica (13.48%; pecore n = 2 e capre n = 10), 4/89 presentavano una mastite purulenta acuta (4.5%; pecore n = 1 e capre n = 3) e 28/89 non mostravano alcuna lesione istologica (31.46%; pecore n = 21 e capre n = 7). Nelle mastiti croniche le cellule infiammatorie erano localizzate prevalentemente nell'interstizio; solo nelle mastiti miste (66%) e in quelle purulente (100%) sono stati osservati neutrofili all'interno degli alveoli. Tuttavia, non sono mai stati osservati necrosi o sfaldamento dell'epitelio alveolare.

I reperti microbiologici e istologici osservati nel presente studio sono riportati in Tabella 9. Nella mastite non purulenta cronica, nella mastite mista cronica e nelle ghiandole senza lesioni istologiche, i batteri riscontrati più frequentemente sono stati gli stafilococchi coagulasi-negativi e gli opportunisti ambientali. Le ghiandole con mastite purulenta acuta hanno mostrato un più alto numero di microrganismi patogeni. Non sono stati identificati agenti microbici soltanto in 19/28 ghiandole mammarie senza lesioni istologiche.

**Tabella 9.** Sintesi delle specie batteriche identificate in ciascuna tipologia istologica di mastite.

Esame istologico	Risultati batteriologici					Risultati virologici
	PATO <sup>a</sup>	SCN <sup>b</sup>	EO <sup>c</sup>	OM <sup>d</sup>	Negativi	SRLV <sup>e</sup>
<b>Mastiti non purulente croniche</b>	6	34	22	8	13	25
Ovini	3	14	11	2	2	5
Caprini	3	20	11	6	11	20
<b>Mastiti miste croniche</b>	2	10	8	0	3	8
Ovini	1	2	3	0	0	0
Caprini	1	8	5	0	3	8
<b>Mastiti purulente acuta</b>	3	1	2	0	1	1
Ovini	1	0	1	0	0	0
Caprini	2	1	1	0	1	1
<b>Ghiandole istologicamente negative</b>	1	19	16	6	8	1
Ovini	1	16	14	6	4	1
Caprini	0	3	2	0	4	0

<sup>a</sup>PATO = Patogeni

<sup>b</sup>SCN = Stafilococchi coagulasi-negativi

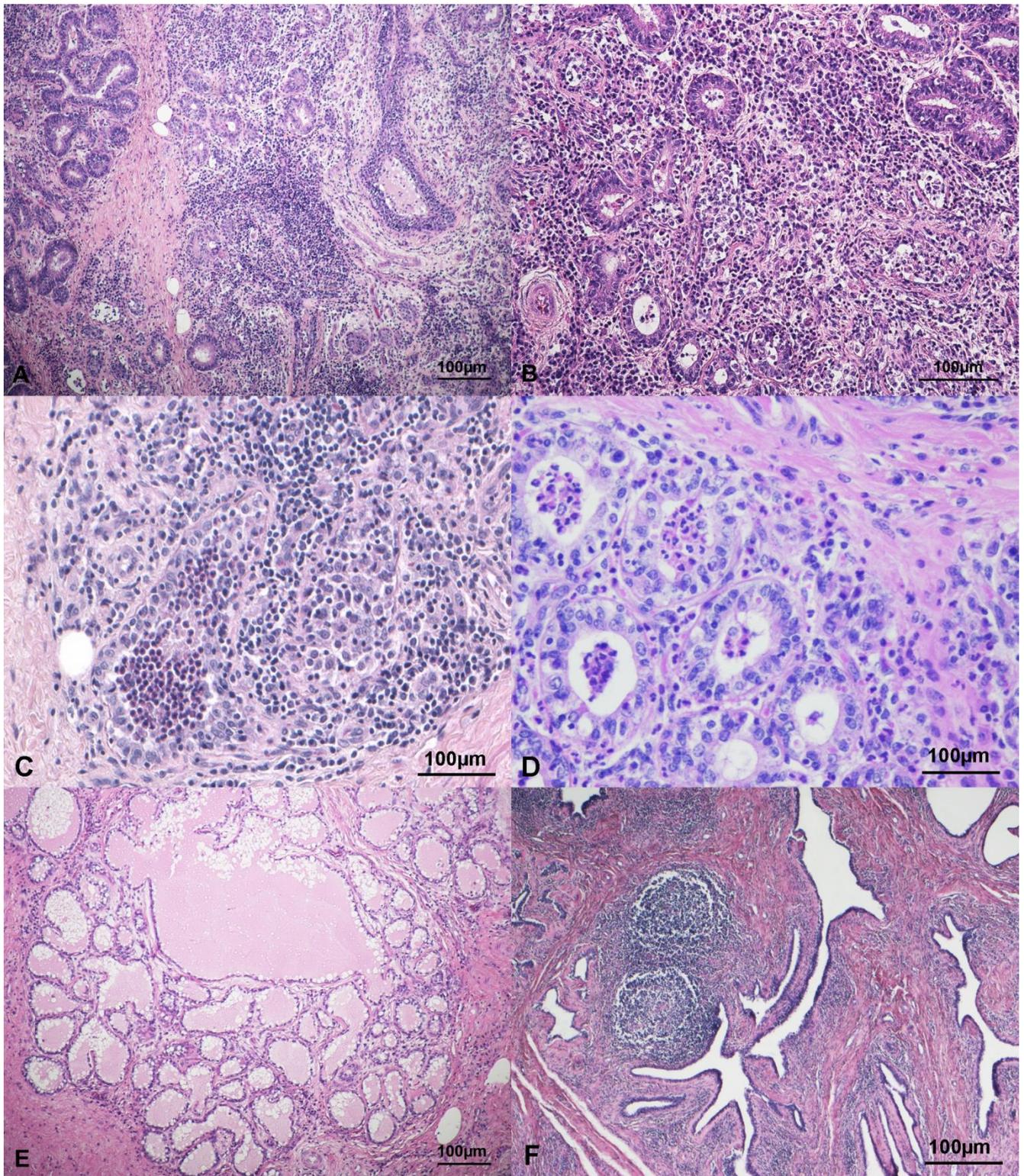
<sup>c</sup>EO = Opportunisti ambientali

<sup>d</sup>OM = Altri microrganismi

<sup>e</sup>SRLV = Lentivirus dei piccoli ruminanti

25/35 mammelle positive per SRLV (71.5%) hanno mostrato una mastite non purulenta cronica (Figura 49A-B); 8/35 (22.9%) avevano una mastite mista cronica (Figura 49C); 1/35 (2.8%) ha mostrato una mastite purulenta acuta (Figura 49D) e solo 1/35 (2.8%) non ha mostrato alcuna lesione

(Figura 49E). 24/35 mammelle positive per SRLV (68.6%) hanno rivelato follicoli linfoidi iperplastici disseminati nel parenchima ghiandolare e in particolar modo intorno ai dotti galattofori (Figura 49F).



**Figura 49.** Lesioni istologiche nelle ghiandole mammarie sane dei piccoli ruminanti. **A.** Mastite non purulenta cronica caratterizzata da cellule infiammatorie mononucleate (linfociti, plasmacellule e macrofagi) interstiziali e alveolari. Colorazione Ematossilina-Eosina (EE). **B.** Particolare dell'infiammazione mononucleata in una mastite non purulenta cronica. Colorazione EE. **C.** Mastite mista cronica con cellule infiammatorie mononucleate interstiziali e neutrofilo alveolari. Colorazione EE. **D.** Mastite purulenta acuta caratterizzata da neutrofilo interstiziali e alveolari. Colorazione EE. **E.** Tessuto mammario sano. Colorazione EE. **F.** Ghiandola mammaria positiva per SRLV con due ampi follicoli linfoidi iperplastici attorno ad un dotto galattoforo. Colorazione EE.

Le lesioni istologiche sono state significativamente associate alla specie (pecora, capra) e alle infezioni da SRLV e SCN. Gli animali infettati da SRLV avevano un significativo più alto rischio di mostrare sia la mastite mista cronica che la mastite non purulenta cronica all'esame istologico (Tabella 10). Le capre avevano un rischio significativamente più alto di mostrare mastite mista cronica rispetto alle pecore (Tabella 10). Le mammelle con infezione da SCN avevano un rischio significativamente aumentato di mostrare mastite non purulenta cronica. La presenza di PATO non ha aumentato il rischio di mostrare una particolare lesione istologica (Tabella 10).

**Tabella 10.** Risultati della regressione logistica multinomiale applicata per valutare l'associazione tra lesioni istologiche e infezione batterica, infezione da SRLV, età e specie. Le mammelle senza lesioni istologiche sono state stabilite come classe di riferimento per la regressione multinomiale.

<b>Covariata</b>	<b>Mastiti miste croniche</b> [OR (95% CI)]	<b>Mastiti non purulente croniche</b> [OR (95% CI)]
<b>Caprini (Ref: Ovini)</b>	13.7 (1.7, 34.1)*	5.21 (0.8, 17.1)
<b>Età (Ref: 1-3 anni di età):</b>		
4-8 anni di età	3.14 (0.46, 22.65)	2.21 (0.74, 12.19)
>8 anni di età	1.32 (0.14, 10.46)	0.82 (0.15, 4.42)
<b>EO<sup>a</sup></b>	2.61 (0.46, 17.16)	2.18 (0.41, 4.79)
<b>SCN<sup>b</sup></b>	7.25 (0.59, 22.10)	6.72 (1.83, 28.51)*
<b>PATO<sup>c</sup></b>	9.21 (0.68, 25.67)	7.8 (0.56, 16.71)
<b>SRLV<sup>d</sup></b>	47.5 (3.15, 80.16)**	43.52 (4.30, 104.52)**

\*p < 0.05; \*\*p < 0.01

<sup>a</sup>EO = Opportunisti ambientali

<sup>b</sup>SCN = Stafilococchi coagulasi-negativi

<sup>c</sup>PATO = Patogeni

<sup>d</sup>SRLV = Lentivirus dei piccoli ruminanti

Gli animali infettati da SRLV hanno anche mostrato un rischio 12.3 volte più alto (95% IC: 3.8-45.2; p < 0.01) di avere follicoli linfoidi all'esame istologico. Le capre avevano un rischio significativamente più basso di essere infettate da opportunisti ambientali rispetto alle pecore (Tabella 11), ma un più alto rischio di essere infettate da SRLV (Tabella 12). L'età e le coinfezioni non hanno mostrato nessun effetto sulle infezioni batteriche o virali (Tabella 11).

**Tabella 11.** Risultati della regressione logistica applicata per valutare i fattori che possono favorire l'infezione da SCN ed EO.

Covariata	SCN <sup>b</sup>	EO <sup>a</sup>
	[OR (95% CI)]	[OR (95% CI)]
<b>Caprini (Ref: Ovini)</b>	0.12 (0.32, 4.2)	0.26 (0.06, 0.71)*
<b>Età (Ref: 1-3 anni di età):</b>		
4-8 anni di età	1.25 (0.61, 3.32)	1.27 (0.27, 3.805)
> 8 anni di età	1.34 (0.48, 5.76)	2.09 (0.38, 7.45)
<b>EO<sup>a</sup></b>	2.16 (0.79, 4.98)	-
<b>SCN<sup>b</sup></b>	-	3.51 (0.59, 5.31)
<b>PATO<sup>c</sup></b>	1.23 (0.21, 4.67)	2.31 (0.42, 6.34)
<b>SRLV<sup>d</sup></b>	1.52 (0.42, 3.78)	2.97 (0.60, 4.24)

\*p < 0.05; \*\*p < 0.01

<sup>a</sup>EO = Opportunisti ambientali

<sup>b</sup>SCN = Stafilococchi coagulasi-negativi

<sup>c</sup>PATO= Patogeni

<sup>d</sup>SRLV = Lentivirus dei piccoli ruminanti

**Tabella 12.** Risultati della regressione logistica applicata per valutare i fattori che possono favorire l'infezione da SRLV.

Covariata	SCN <sup>b</sup>
	[OR (95% CI)]
<b>Caprini (Ref: Ovini)</b>	10.87 (3.69, 37.77)**
<b>Età (Ref; 1-3 years of age):</b>	
4-8 anni di età	0.66 (0.18, 2.33)
>8 anni di età	0.46 (0.11, 1.82)
<b>EO<sup>a</sup></b>	1.67 (0.41, 3.29)
<b>SCN<sup>b</sup></b>	1.15 (0.58, 5.18)
<b>PATO<sup>c</sup></b>	0.67 (0.34, 4.89)

\*p < 0.05; \*\*p < 0.01

<sup>a</sup>EO = Opportunisti ambientali

<sup>b</sup>SCN = Stafilococchi coagulasi-negativi

<sup>c</sup>PATO= Patogeni

### 13.3.2 Studio 2

Le pecore di età compresa tra 1 e 14 anni (mediana 6) appartenevano principalmente alla razza Biellese (n = 22; 30.6%) e a incroci (n = 32; 44.4%), meno rappresentate sono state le razze Lacaune (n = 4; 5.5%), Langhe (n = 4; 5.5%), Frabosana (n = 3; 4.2%), Sambucana (n = 2; 2.8%), Savoiarda (n = 2; 2.8%), Suffolk (n = 2; 2.8%) e Tacòla (n = 1; 1.4%). Le capre di età compresa tra 1 e 13 anni (mediana 4.5) appartenevano alla razza Saanen (n = 38; 51.3%) e incroci (n = 29; 39.2%), con una minore prevalenza della Camosciata delle Alpi (n = 7; 9.5%). In base alle differenti fasi del ciclo produttivo, gli animali sono stati suddivisi in 3 gruppi di età: il primo gruppo comprendeva 33 animali di età fino a 3 anni; il secondo gruppo era composto da 92 animali di età compresa tra 4 e 8 anni, e il terzo gruppo era composto da 21 animali di età oltre 8 anni.

All'esame macroscopico, tutte le mammelle campionate hanno mostrato diversi segni di anomalia. Le alterazioni delle ghiandole mammarie erano spesso associate. Quarantanove di 146 mammelle mostravano un aumento di volume, 74/146 mammelle mostravano una maggiore consistenza, 74/146 mammelle (n = 45 pecore; n = 29 capre) erano caratterizzate da ascessi e/o piogranulomi singoli o multipli e 11/146 presentavano erosioni cutanee.

Su un totale di 146 mammelle macroscopicamente patologiche, 19/146 risultavano batteriologicamente negative (13%), mentre nelle restanti 127 (87%) è stata isolata almeno una specie batterica. Nelle 127 ghiandole positive, sono state isolate un totale di 263 specie batteriche. Le specie batteriche isolate e la loro frequenza di isolamento sono riportate nella Tabella 13.

Gli stafilococchi coagulasi-negativi (SCN) sono stati i batteri più frequentemente isolati. Dei 263 batteri isolati, 87 (33.08%) appartenevano a questo gruppo. La specie predominante è stata *Staphylococcus xylosus* (n = 18; 6.84%), seguita da *Staphylococcus equorum* (n = 9; 3.42%), *Staphylococcus caprae* (n = 7; 2.66%) isolato solo da mammelle di capra, *Staphylococcus auricularis* (n = 7; 2.66%) e *Staphylococcus simulans* (n = 7; 2.66%). Altre specie di SCN isolate con minore frequenza sono riassunte nella Tabella 13.

Gli "opportunisti ambientali" sono stati il secondo gruppo di batteri più frequentemente identificato (85/263, 32.32%). *Aerococcus viridans* è stato il batterio maggiormente isolato in entrambe le specie (n = 36), rappresentando così il 13.68% del totale degli isolamenti. Altri batteri isolati con frequenza minore sono stati *Aeromonas hydrophila* (n = 7; 2.66%), *Bacillus cereus* (n = 5; 1.91%), e *Brevibacterium epidermidis* (n = 5; 1.91%). Le specie rimanenti specie identificate con una percentuale minore sono riportate nella Tabella 13.

I batteri "patogeni" sono stati isolati in una buona percentuale di ghiandole (70/263; 26.62%). I microrganismi più frequentemente riscontrati sono stati *Staphylococcus aureus* e *Trueperella pyogenes*, isolati rispettivamente in n = 31 (11.79%) e n = 11 (4.19%) mammelle. Altri batteri identificati sono stati *Escherichia coli* (n = 7; 2.66%), *Streptococcus uberis* (n = 7; 2.66%), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (n = 4; 1.52%) e *Streptococcus agalactiae* (n = 4; 1.52%). Altre specie isolate con minore frequenza sono riassunte nella Tabella 13.

Il gruppo degli “altri microorganismi” è stato, tra tutti, quello meno rappresentato. Solo 21 (7.98%) sono stati i batteri isolati appartenenti a questo gruppo. I microrganismi più frequentemente isolati sono stati *Acinetobacter Iwoffii* e *Kocuria rosea*, con 5 casi ciascuno (1.9%).

**Tabella 13.** Numero e frequenza delle specie batteriche isolate nelle mammelle macroscopicamente patologiche.

<b>Microorganismi</b>	<b>Specie</b>	<b>N° Isolati</b>	<b>%</b>	<b>Ovini</b>	<b>Caprini</b>
<b>Patogeni</b>					
	<i>Clostridium perfringens</i>	2	0.76%	2	0
	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	4	1.52%	2	2
	<i>Escherichia coli</i>	7	2.66%	5	2
	<i>Pasteurella multocida</i>	2	0.76%	1	1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	31	11.79%	21	10
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	4	1.52%	0	4
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	0.76%	2	0
	<i>Streptococcus uberis</i>	7	2.66%	4	3
	<i>Trueperella pyogenes</i>	11	4.19%	5	6
	<b>totale del gruppo</b>	<b>70</b>	<b>26.62%</b>	<b>42</b>	<b>28</b>
<b>Stafilococchi coagulasi-negativi</b>					
	<i>Staphylococcus arlettae</i>	4	1.52%	2	2
	<i>Staphylococcus auricularis</i>	7	2.66%	1	6
	<i>Staphylococcus capitis</i>	3	1.14%	0	3
	<i>Staphylococcus caprae</i>	7	2.66%	0	7
	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	4	1.52%	3	1
	<i>Staphylococcus cohnii</i>	5	1.90%	1	4
	<i>Staphylococcus equorum</i>	9	3.42%	4	5
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	0.76%	2	0
	<i>Staphylococcus lentus</i>	6	2.29%	5	1
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1	0.38%	0	1
	<i>Staphylococcus simulans</i>	7	2.66%	2	5
	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	6	2.29%	5	1
	<i>Staphylococcus warneri</i>	5	1.90%	3	2
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	18	6.84%	8	10
	<i>Staphylococcus spp.</i>	3	1.14%	2	1
	<b>totale del gruppo</b>	<b>87</b>	<b>33.08%</b>	<b>38</b>	<b>49</b>
<b>Opportunisti ambientali</b>					
	<i>Aerococcus viridans</i>	36	13.68%	15	21
	<i>Aerococcus spp.</i>	1	0.38%	1	0
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7	2.66%	5	2
	<i>Aeromonas sobria</i>	1	0.38%	0	1
	<i>Bacillus cereus</i>	5	1.91%	5	0
	<i>Bacillus firmus</i>	1	0.38%	0	1
	<i>Bacillus pumilus</i>	2	0.76%	1	1
	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	5	1.91%	3	2
	<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	2	0.76%	0	2

<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1	0.38%	0	1
<i>Corynebacterium propinquum</i>	2	0.76%	2	0
<i>Corynebacterium striatum</i>	3	1.14%	2	1
<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	1	0.38%	0	1
<i>Enterococcus cecorum</i>	2	0.76%	1	1
<i>Enterococcus durans</i>	1	0.38%	1	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	0.76%	0	2
<i>Enterococcus shirae</i>	1	0.38%	0	1
<i>Enterobacter hirae</i>	1	0.38%	1	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0.38%	1	0
<i>Micrococcus lylae</i>	1	0.38%	1	0
<i>Moraxella</i> spp.	2	0.76%	2	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	0.76%	2	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0.38%	1	0
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	0.38%	0	1
<i>Streptococcus suis</i>	1	0.38%	1	0
<i>Streptococcus</i> spp.	2	0.76%	2	0
<b>totale del gruppo</b>	<b>85</b>	<b>32.32%</b>	<b>47</b>	<b>38</b>

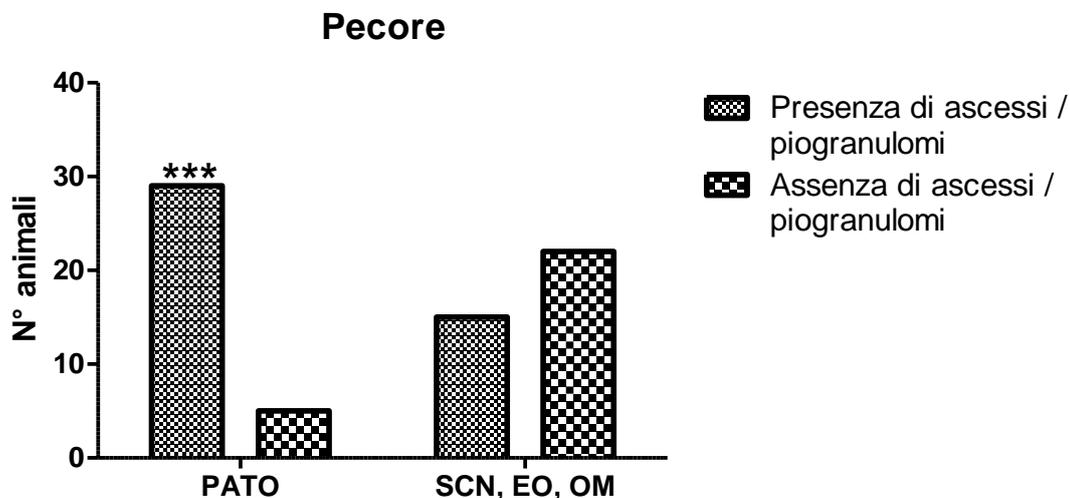
#### Altri microrganismi

<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0.38%	1	0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	5	1.90%	2	3
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1	0.38%	1	0
<i>Cellulomonas</i> spp.	1	0.38%	0	1
<i>Dermacoccus</i> spp.	1	0.38%	1	0
<i>Gemella morbillorum</i>	2	0.76%	1	1
<i>Granulicatella adiacens</i>	1	0.38%	0	1
<i>Kocuria kristinae</i>	2	0.76%	1	1
<i>Kocuria rosea</i>	5	1.90%	2	3
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	1	0.38%	0	1
<i>Rothia dentocariosa</i>	1	0.38%	1	0
<b>totale del gruppo</b>	<b>21</b>	<b>7.98%</b>	<b>10</b>	<b>11</b>

<b>Totale</b>	<b>263</b>	<b>100%</b>	<b>137</b>	<b>126</b>
---------------	------------	-------------	------------	------------

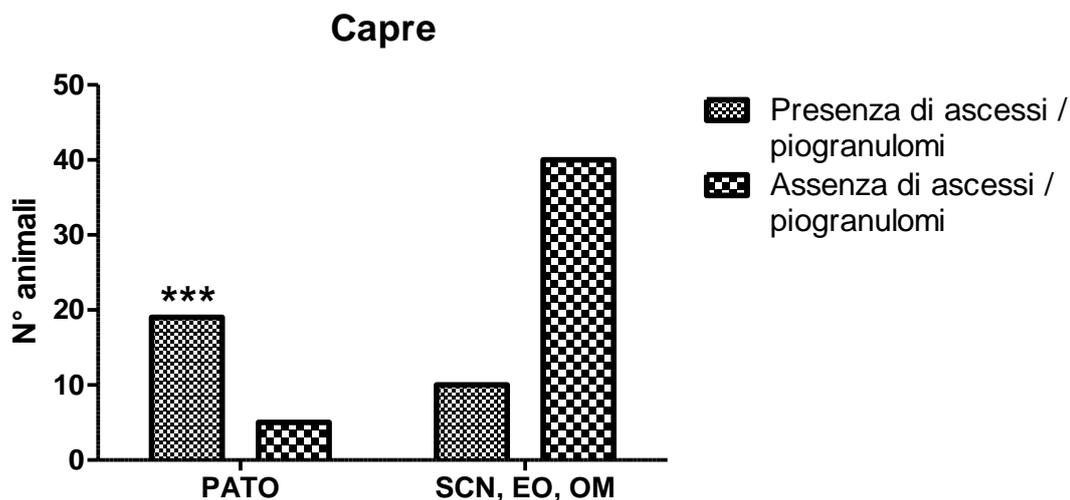
In 82/127 mammelle positive al batteriologico (64.6%) sono state riscontrate delle coinfezioni. Nello specifico, in 48/82 campioni sono state isolate 2 differenti specie batteriche (37.8%), in 21/82 sono state isolate 3 specie batteriche (16.5%), in 11/82 sono state isolate 4 specie batteriche (8.7%) e in 2/48 sono state isolate 5 specie batteriche (1.6%). Solo il 35.4% delle mammelle positive (45/127) è stato caratterizzato da una singola infezione.

Negli ovini è stata osservata un'associazione statisticamente significativa tra gli isolamenti di germi patogeni e la presenza di ascessi/piogranulomi all'esame macroscopico (test esatto di Fisher,  $p = 0.0002$ ) (Figura 50).



**Figura 50.** Associazione tra batteri patogeni e presenza di ascessi/piogranulomi nelle pecore.

Anche nei caprini è stata osservata un'associazione statisticamente significativa tra gli isolamenti di germi patogeni e la presenza di ascessi/piogranulomi all'esame macroscopico (test esatto di Fisher,  $p < 0.0001$ ) (Figura 51).



**Figura 51.** Associazione tra batteri patogeni e presenza di ascessi/piogranulomi nelle capre.

Tre ghiandole su 146 (2.1%) sono risultate positive per *Mycoplasma mycoides* e *Aspergillus* spp. in campioni non associati tra di loro.

In 14 mammelle (9.6%) è stata riscontrata la presenza di sostanze inibenti.

Cinque delle 146 mammelle erano positive per il virus ORF (3.4%).

L'infezione da SRLV è stata rilevata in 73/146 campioni (50%). La capra è risultata la specie prevalentemente colpita rispetto alla pecora (48/73; 65.8% *versus* 25/73; 34.2%).

Istologicamente, 67 mammelle su 146 presentavano una mastite purulenta cronica/piogranulomatosa (45.9%; n = 41 pecore e n = 26 capre), 46/146 presentavano una mastite mista cronica (31.5%; n = 13 pecore e n = 33 capre), 33/146 presentavano una mastite non purulenta cronica (22.6%; n = 18 pecore e n = 15 capre). Nelle mastiti purulente croniche/piogranulomatose (67/146) è stato osservato che il grado di fibrosi variava da lieve (solo 7 ghiandole) a moderata (27/67), a grave e diffusa (33/67). Le mastiti miste croniche (46/146) presentavano invece soprattutto lieve fibrosi (20/46), moderata in 23/46 e grave solo in 3 ghiandole. Nelle mastiti non purulente croniche (33/146) è stato osservato che 13 ghiandole mostravano una lieve fibrosi, 11 una moderata fibrosi e 9 mostravano una grave fibrosi. I reperti microbiologici e istologici osservati nello studio 2 sono riportati in Tabella 14. Nelle mastiti non purulente croniche i batteri riscontrati più frequentemente sono stati gli stafilococchi coagulasi-negativi (n = 32). Nelle mastiti miste croniche i batteri più numerosi sono stati gli opportunisti ambientali (n = 35), mentre nelle mastiti purulente croniche/piogranulomatose è stato isolato un più alto numero di microrganismi patogeni (n = 53). Otto mammelle con mastite mista cronica e 7 ghiandole con mastite purulenta cronica/piogranulomatosa, sono risultate negative all'esame batteriologico.

**Tabella 14.** Sintesi delle specie batteriche identificate in ciascuna tipologia istologica di mastite.

<b>Esame Istologico</b>	<b>Risultati Batteriologici</b>				<b>Risultati virologici</b>	
	<b>PATO<sup>a</sup></b>	<b>SCN<sup>b</sup></b>	<b>EO<sup>c</sup></b>	<b>OM<sup>d</sup></b>	<b>Negativi</b>	<b>SRLV<sup>e</sup></b>
<b>Mastiti non purulente croniche</b>	4	32	23	8	4	18
<b>Mastiti miste croniche</b>	13	27	35	7	8	27
<b>Mastiti purulente croniche/ piogranulomatose</b>	53	28	27	6	7	28

<sup>a</sup>PATO = Patogeni

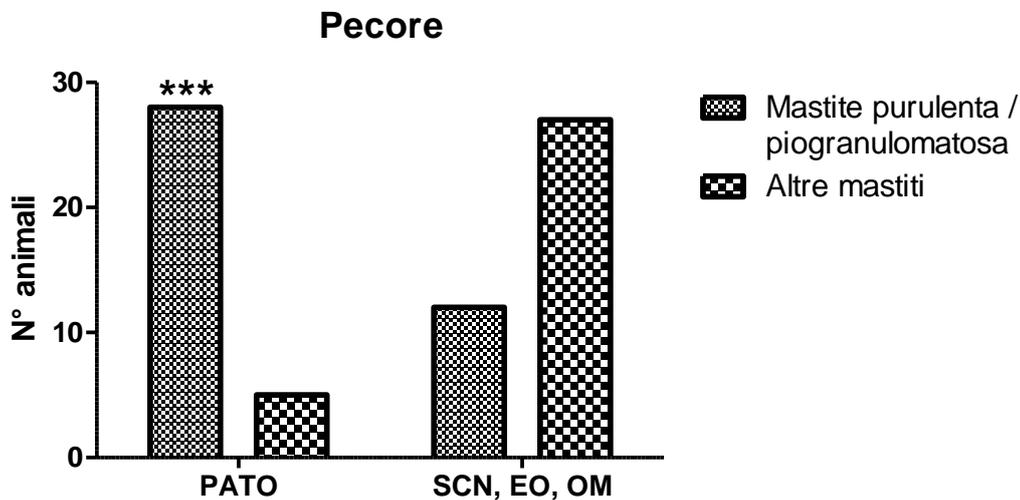
<sup>b</sup>SCN = Stafilococchi coagulasi-negativi

<sup>c</sup>EO = Opportunisti ambientali

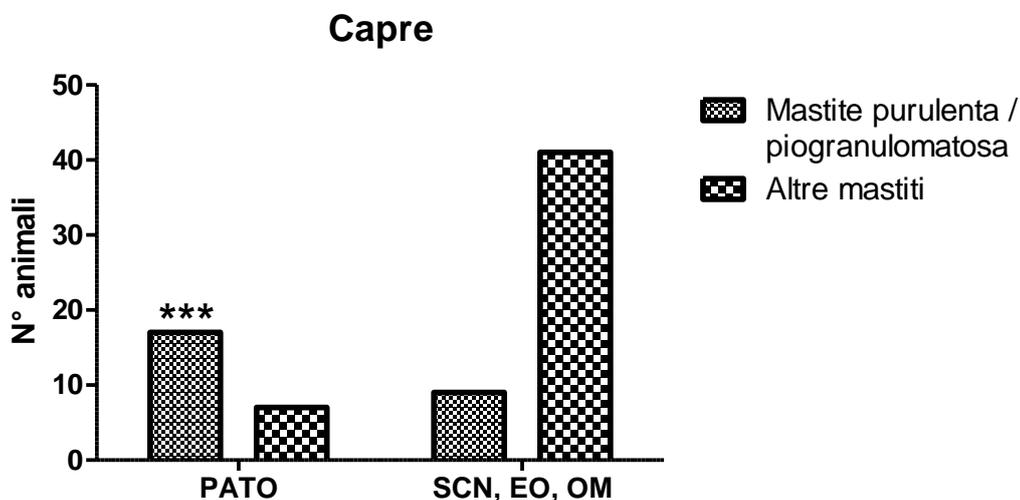
<sup>d</sup>OM = Altri microrganismi

<sup>e</sup>SRLV = Lentivirus dei piccoli ruminanti

È stata anche osservata un'associazione statisticamente significativa, sia nelle pecore che nelle capre, tra i germi patogeni e la presenza di mastiti purulente croniche/piogranulomatose all'esame istopatologico (test esatto di Fisher,  $p < 0.0001$ ) (Figura 52-53).



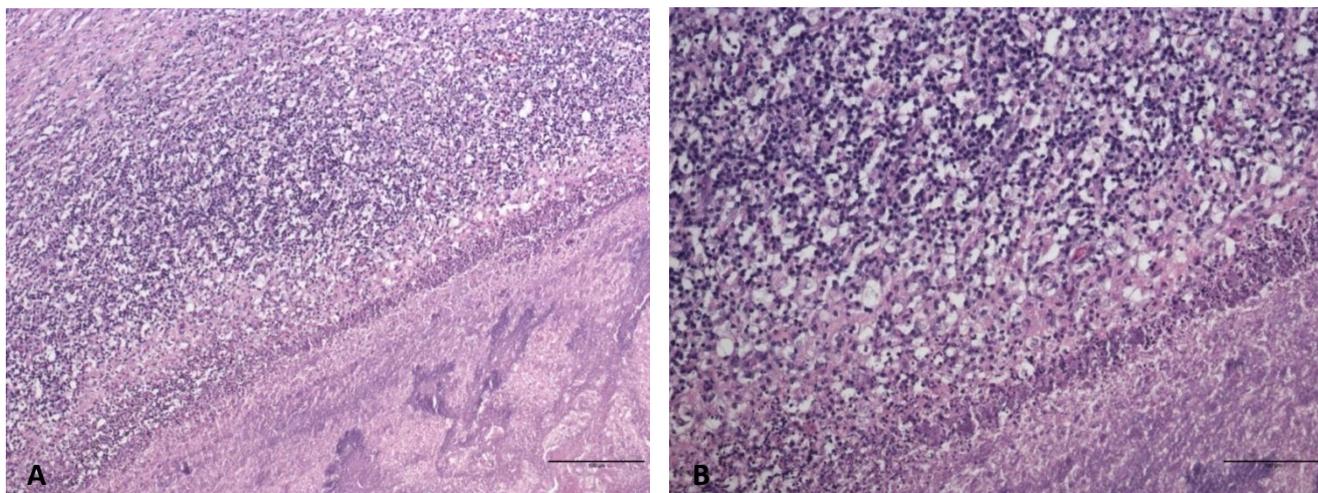
**Figura 52.** Associazione tra batteri patogeni e presenza di mastiti purulente croniche/piogranulomatose nelle pecore.



**Figura 53.** Associazione tra batteri patogeni e presenza di mastiti purulente croniche/piogranulomatose nelle capre.

Ventotto delle 73 mammelle positive per SRLV (38.3%) hanno mostrato una mastite purulenta cronica/piogranulomatosa (Figura 54 A-B); 27/73 (37%) avevano una mastite mista cronica e 18/73 (24.7%) hanno mostrato una mastite non purulenta cronica. Trentotto delle 73 mammelle positive per

SRLV (52.1%) hanno rivelato follicoli linfoidi iperplastici disseminati nel parenchima ghiandolare e in particolar modo intorno ai dotti galattofori.



**Figura 54 A-B.** Lesioni istologiche in ghiandole mammarie di piccoli ruminanti con mastite macroscopica. **A.** Mastite purulenta cronica caratterizzata da un voluminoso centro necrotico (in basso a destra) circondato da cellule infiammatorie quali linfociti, macrofagi e neutrofili. **B.** Particolare della figura. Colorazione Ematossilina-Eosina (EE).

## 13.4 DISCUSSIONE

L'importanza dei piccoli ruminanti utilizzati per la produzione di latte è significativamente aumentata negli ultimi anni, specialmente nei Paesi in via di sviluppo dove rappresentano una essenziale alternativa al latte bovino per la fornitura di prodotti lattiero-caseari per il consumo umano (Lérias et al., 2014). In questi Paesi, essi sono considerati una più sana alternativa al latte di vacca grazie alle significative caratteristiche organolettiche, sia per il consumo diretto (esempio nel nord Europa) che per la produzione di formaggio (esempio bacino del Mediterraneo) (Lérias et al., 2014).

Alcuni batteri che causano mastite possono rappresentare un importante rischio per la salute umana e, di conseguenza, la conoscenza di potenziali agenti patogeni nel tessuto mammario ghiandolare diventa fondamentale.

Questa ricerca ha previsto la raccolta di ghiandole mammarie macroscopicamente sane (studio 1) e di ghiandole con lesioni macroscopiche compatibili con mastite (studio 2) al fine di indagare i più comuni agenti biologici presenti in questi tessuti.

In entrambi gli studi è stata osservata la prevalenza degli SCN (studio 1 = 64/138; 46.42%; studio 2 = 87/263; 33.08%) in accordo con quanto riportato in letteratura. Bergonier e colleghi (2003) hanno osservato una prevalenza degli SCN nelle mastiti subcliniche variabile dal 25 al 93%. Risultati simili sono stati recentemente osservati anche in Portogallo in campioni di latte di mammelle di pecore clinicamente affette da mastite (Queiroga, 2007), in Iran nelle mastiti ovine subcliniche (Narenji Sani et al., 2015), in Grecia nelle capre da latte (Gelasakis et al., 2016) e in Italia in entrambe le specie (Dore et al., 2016). Nello studio 1 ha prevalso lo *Staphylococcus xylosus* nelle pecore e lo

*Staphylococcus caprae* nelle capre, riscontro anche questo in accordo con la letteratura (Bergonier et al., 2003 ; Contreras et al., 2007, Ergün et al., 2009), mentre nello studio 2 ha prevalso lo *Staphylococcus xylosus* sia nelle pecore che nelle capre. In ambedue gli studi è stato isolato con una buona frequenza in entrambe le specie lo *Staphylococcus equorum*, mentre in letteratura non risulta molto frequente, identificato infatti solo da Hariharan et al. (2004) nella pecora e da Contreras et al. (2003) nella capra. Differentemente da studi precedenti che riportano *Staphylococcus chromogenes* come un comune isolamento (Bergonier et al., 2003; Contreras et al., 2007), questo batterio nello studio 1 è stato osservato solo in 2 campioni e nello studio 2 solo in 4 campioni. In accordo con la letteratura (Contreras et al., 2007; Gelasakis et al., 2015), le altre specie di SCN identificate nel presente studio sono state osservate con una bassa frequenza.

Tra i microrganismi classificati come "opportunisti ambientali" nello studio 1, *Aerococcus viridans* e *Enterococcus* spp. sono stati precedentemente descritti come causa sporadica di infezioni mammarie in capre e pecore (Clements et al. 2003; Marogna et al., 2012; Queiroga, 2017), *Klebsiella oxytoca* e *Pseudomonas fluorescens* sono stati invece isolati in latte di capra con mastite subclinica (Gelasakis et al., 2016).

Nella presente ricerca le capre hanno mostrato un rischio significativamente più basso di essere infettate da opportunisti ambientali rispetto alle pecore. Dal momento che la prevalenza di questi batteri aumenta in presenza di carenze nel sistema di mungitura meccanica o di igiene delle greggi nei piccoli ruminanti (particolarmente in greggi ovine), le procedure di mungitura così come le attrezzature devono essere migliorate e periodicamente controllate.

Anche nello studio 2, *Aerococcus viridans* è stato il batterio opportunisto più isolato (n = 36 campioni, 13.68%).

Nello studio 2, come ci si aspettava, il numero di isolamenti di specie patogene è stato molto più elevato (70 isolati totali). Tra questi il batterio maggiormente isolato è stato lo *S. aureus* (n = 31) comunemente associato a mastiti cliniche (Olechnowicz e Jaśkowski, 2014). Tra gli altri isolati di batteri patogeni *Trueperella pyogenes* (n = 11), *Escherichia coli* (n = 8), *Streptococcus uberis* (n = 7), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (n = 4) e *Streptococcus dysgalactiae* (n = 2) sono riportati in letteratura quali responsabili di casi di mastite clinica nelle pecore (Fernandèz et al., 2001; Mørk et al., 2007).

Il ruolo dei microrganismi indicati come "altri" nell'epidemiologia delle mastiti dei piccoli ruminanti è ancora poco chiaro dal momento che non sono mai stati associati a processi infiammatori della ghiandola.

Pochi sono stati gli isolamenti di specie fungine limitate ad *Aspergillus* spp. (1.1% nello studio 1; 2.1% nello studio 2). I miceti normalmente si sviluppano in soggetti immunocompromessi e si osservano come agenti secondari a pregresse forme mastitiche batteriche cliniche. Il loro ruolo come agenti mastitici è comunque molto limitato e relazionato solo a gravi forme di mastiti cliniche (Bergonier et al., 2003).

Nessun micoplasma è stato identificato nelle ghiandole macroscopicamente sane (studio 1), mentre nello studio 2 sono stati isolati nelle capre tre *Mycoplasma mycoides*. Le infezioni da micoplasmi sono note in Italia da oltre 150 anni (Todaro et al., 2015b). In Sicilia la malattia è storicamente endemica, responsabile di oltre il 40% delle mastiti nelle pecore e nelle capre rappresentando uno dei problemi più seri in termini economici. Anche se questa malattia è classificata tra quelle appartenenti alla lista B dell'OIE, non ha mai rappresentato una priorità per la Veterinaria pubblica e i dati disponibili ne sottostimano la reale prevalenza (Loria et al., 2012). Gli unici dati epidemiologici presenti su scala nazionale si riferiscono all'agalassia contagiosa e fanno riferimento al database del Sistema Informativo Malattie Animali Nazionale (SIMAN) che riporta nel 2016 69 focolai di agalassia contagiosa in Italia, localizzati 1 in Abruzzo, 1 in Friuli Venezia Giulia, 1 in Sicilia e 66 in Sardegna (Loria, 2017). L'isolamento molto limitato di questo batterio nella presente ricerca è in accordo con la sua distribuzione territoriale che lo riferisce maggiormente presente nelle regioni insulari come causa di agalassia contagiosa.

Nello studio 2, quattro ghiandole di pecora e 1 di capra che mostravano lesioni erosive cutanee sono risultate positive per ORFv.

L'infezione da SRLV è stata rilevata in un'alta percentuale di ghiandole sane e con mastite macroscopica. Infatti 35/89 campioni di ghiandole sane (39.3%) (studio 1) e 73/146 campioni (50%) (studio 2) sono risultati positivi per SRLV. La maggior parte di questi campioni hanno mostrato infezioni batteriche concomitanti. La capra è risultata la specie prevalentemente colpita rispetto alla pecora (29/35; 82.9% versus 6/35; 17.1% - studio 1) (48/73; 65.8% versus 25/73; 34.2% - studio 2).

Alla luce dei risultati ottenuti nel primo studio ovvero il riscontro della presenza di agenti microbici in ghiandole mammarie macroscopicamente sane, dato sinora mai valutato, si è deciso di concentrare la discussione dei dati sullo studio 1.

La percentuale di identificazione di SRLV nelle ghiandole sane (35/89; 39.3%) è in accordo con quanto riportato in letteratura (Fras et al., 2013). Il presente studio ha mostrato inoltre che gli SRLV sono più facilmente identificati nelle mammelle di capra rispetto alla pecora (29/35; 82.9% versus 6/35; 17.1%). L'elevata prevalenza di infezioni da SRLV nelle capre potrebbe essere causata dalla trasmissione orizzontale mediante colostro e latte. Infatti, negli allevamenti ovini, gli agnelli generalmente vengono allattati esclusivamente dalle loro madri. Al contrario, i capretti sono separati dalle madri alla nascita e nutriti a mano con colostro e latte, spesso provenienti da un comune pool. Così facendo, un'infezione da SRLV di un singolo animale potrebbe infettare tutti i giovani animali. Questa possibilità è stata riportata come la ragione più credibile per l'alta prevalenza di infezioni CAEV nella capra in Europa occidentale, Australia e nord America (Narayan et al., 1985; Fras et al., 2013).

Le infezioni da SRLV sono state associate con un ampio spettro di malattie immunomediate e infezioni opportunistiche (Brodie et al., 1995). Nella capre, diversi studi hanno osservato che gli animali infettati da SRLV sembrano essere più predisposti a infezioni batteriche subcliniche da parte di stafilococchi non emolitici (Smith e Cutlip, 1988; Ryan et al., 1993). Anche nel presente studio le

capre hanno mostrato un rischio significativamente più alto rispetto alle pecore di manifestare mastite mista cronica.

Nelle pecore *in vivo* non sono ancora conosciute relazioni tra SRLV e batteri, ma precedenti studi *in vitro* hanno fornito l'evidenza di un'aumentata aderenza batterica e una diminuita fagocitosi in macrofagi infettati da SRLV (Monleón et al., 1997). Nel presente studio, le mastiti croniche osservate in mammelle infettate da SRLV sono frequentemente associate con infezioni da SCN ed EO. Sebbene i campioni positivi per SRLV abbiano mostrato un rischio significativamente più elevato di essere interessati sia da mastite mista cronica che da mastite non purulenta, le coinfezioni non hanno mostrato nessun effetto sulla presenza del virus.

Nonostante le mammelle considerate nel presente studio fossero macroscopicamente sane, l'assenza di lesioni allo screening istologico è stata osservata solo in 28 campioni. Le rimanenti 61 emimammelle hanno mostrato differenti tipi di mastite, la maggior parte delle quali erano croniche (64%) e di lieve gravità. È stata osservata in tutti i campioni una fibrosi da lieve a grave (28%: lieve; 25.8%: moderata; 46%: grave). Comunque, questo reperto non può essere correlato alla cronicità della malattia perché il rapporto tra parenchima e stroma evidenzia proporzioni individuali e cambiamenti durante le diverse fasi del ciclo riproduttivo degli animali e della fase di lattazione (Lérias et al., 2014). La cronicità della mastite è stata valutata sulla base della tipologia delle cellule infiammatorie, diagnosticando una mastite cronica quando l'essudato era principalmente composto da macrofagi, istiociti e plasmacellule. Un reperto interessante è stato l'identificazione di queste cellule mononucleate soprattutto nell'interstizio; cellule alveolari e duttali (neutrofili) sono state identificate soltanto nelle mastiti miste purulente. In queste mammelle è stato inoltre osservato un numero maggiore di cellule desquamate negli alveoli.

La correlazione tra i reperti microbiologici e istologici suggerisce che gli animali in cui sono stati isolati gli SCN avevano un rischio significativamente maggiore di sviluppare mastite non purulenta cronica. Non sono state osservate altre correlazioni significative. Tuttavia, nelle mastiti purulente acute, sono stati sempre isolati batteri patogeni, a eccezione di un caso in cui l'identificazione di sostanze inibenti ha giustificato l'esito di un esame microbiologico negativo (Zavanella, 2011).

All'esame istologico, 24/35 mammelle positive per SRLV hanno mostrato sparsi follicoli linfoidi iperplastici. Infatti, gli SRLV generalmente causano mastiti induritive non purulente caratterizzate da diffusa infiltrazione periacinare interstiziale di cellule mononucleate, intensa fibrosi interstiziale e formazione di sparsi follicoli linfoidi iperplastici nel parenchima tissutale, in particolare attorno ai dotti galattofori (van der Molen et al., 1985; Brodie et al., 1995; Monleón et al., 1997). Undici animali affetti da mastite non purulenta cronica e batteriologicamente negativi erano positivi per SRLV, confermando così il ruolo dei *lentivirus* nelle mastiti croniche subcliniche (Plummer e Plummer, 2012). Il modello statistico supporta ulteriormente questo risultato.

## 13.5 CONCLUSIONI

I risultati dello studio 1 suggeriscono come le ghiandole mammarie macroscopicamente sane dei piccoli ruminanti non rappresentino una matrice sterile, ma possano costituire un serbatoio di agenti microbici il cui ruolo deve essere approfondito. L'identificazione di un numero elevato di specie batteriche migliora la conoscenza delle specie in grado di colonizzare e potenzialmente infettare la ghiandola mammaria dei piccoli ruminanti. Molti batteri sono infatti capaci, almeno temporaneamente, di essere sequestrati all'interno del tessuto mammario. Questa abilità può essere uno dei meccanismi che permette a queste specie batteriche di by-passare le difese immunitarie e i trattamenti farmacologici dell'ospite, permettendo loro di persistere nei soggetti e nelle greggi.

Dal punto di vista gestionale, i piccoli ruminanti con mastite subclinica cronica hanno quindi un potenziale rischio di sviluppare malattia clinica acuta e cronica. Dato il numero esiguo di campioni dello studio 1, la dimensione del rischio non può essere determinata. L'elevato numero di EO ed OM suggerisce di sviluppare e applicare procedure per controllare la contaminazione microbica e ambientale, e conseguentemente migliorare l'igiene e la qualità del latte e dei prodotti lattiero-caseari, salvaguardando la salute dei consumatori.

Nonostante alcuni reperti istologici siano associati alle infezioni da SRLV e SCN (follicoli linfoidi iperplastici e mastite non purulenta), appare difficile correlare il singolo pattern istologico con un isolamento microbico specifico.

## 14. BIBLIOGRAFIA

- Addis MF, Tedde V, Dore S, Pisanu S, Puggioni GM, Roggio AM, Pagnozzi D, Lollai S, Cannas EA, Uzzau S. 2016. Evaluation of milk cathelicidin for detection of dairy sheep mastitis. *Journal of Dairy Science*, 99: 6446-56.
- AHDB (Agriculture and Horticulture Development Board). 2016. Beef and lamb, UK Yearbook.
- Albenzio M, Taibi L, Caroprese M, De Rosa G, Muscio A, Sevi A. 2003. Immune response, udder health and productive traits of machine milked and suckling ewes. *Small Ruminant Research*, 48: 189-200.
- Anatomy and Physiology of the Mammary Glands. 2013. In: Frandson RD, Lee Wilke W, Dee Fails A, eds. *Anatomy and Physiology of Farm Animals*. John Wiley & Sons, 449-462.
- Ariznabarreta A, Gonzalo C, San Primitivo F. 2002. Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. *Journal of Dairy Science*, 85: 1370-1375.
- Armas F, Camperio C, Marianelli C. 2017. *In vitro* assessment of the probiotic potential of *Lactococcus lactis* LMG 7930 against ruminant mastitis-causing pathogens. *PLoS One*, 12: e0169543.
- Arsenault J, Dubreuil P, Higgins R, Bélanger D. 2008. Risk factors and impacts of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in Quebec, Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 87: 373-393.
- Arsenault J, Girard C, Dubreuil P, Daignault D, Galarneau JR, Boisclair J, Simard C, Bélanger D. 2003. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 59: 67-81.
- Barbagianni MS, Mavrogianni VS, Katsafadou AI, Spanos SA, Tsioli V, Galatos AD, Nakou M, Valasi I, Gouletsou PG, Fthenakis GC. 2015. Pregnancy toxemia as predisposing factor for development of mastitis in sheep during the immediately *post-partum* period. *Small Ruminant Research*, 130: 246-251.
- Barger IA. 1993. Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. *International Journal for Parasitology*, 23: 463-469.
- Barlett JG, Gilbert DN, Spelberg B. 2013. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clinical Infectious diseases*, 56: 1445-1450.
- Baxter FO, Came PJ, Abell K, Kedjouar B, Huth M, Rajewsky K, Pasparakis M, Watson CJ. 2006. IKK $\beta$ /2 induces TWEAK and apoptosis in mammary epithelial cells. *Development*, 133: 3485-3494.
- Beecher C, Daly M, Berry DP, Klostermann K, Flynn J, Meaney W, Hill C, McCarthy TV, Ross RP, Giblin L. 2009. Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1 $\beta$  and IL-8 gene expression. *Journal of Dairy Research*, 76: 340-348.

- Bergonier D, Berthelot X. 2003. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science*, 79: 1-16.
- Bergonier D, de Crémoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*, 34: 689-716.
- Berry E, Broughan J. 2007. Use of the DeLaval cell counter (DCC) on goats' milk. *Journal of Dairy Research*, 74: 345-348.
- Biasibetti E, Amedeo S, Brugiapaglia A, Destefanis G, Di Stasio L, Valenza F, Capucchio MT. 2012. Lipomatous muscular "dystrophy" of Piedmontese cattle. *Animal*, 6: 1839-1847.
- Bilandžić N, Kolanović BS, Varenina I, Scortichini G, Annunziata L, Brstilo M, Rudan N. 2011. Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. *Food Control*, 22: 1941-1948.
- Blagitz MG, Souza FN, Batista CF, Diniz SA, Haddad JPA, Benites NR, Melville PA, Della Libera AMMP. 2014. Clinical findings relates to intramammary infections in meat-producing ewes. *Tropical Animal Health and Production*, 46: 127-132.
- Bogni C, Odierno L, Raspanti C, Giraud J, Larriestra A, Reinoso E, Lasagno M, Ferrari M, Ducrós E, Frigerio C, Bettera S, Pellegrino M, Frola I, Dieser S, Vissio C. 2011. War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. In: Méndez-Vilas A (ed) Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. World Scientific, Singapore, 483-494.
- Bolea R, Monleón E, Carrasco L, Vargasa A, De Aandrés D, Amorena B, Badiola JJ, Luján L. 2006. Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells. *Veterinary Research*, 37: 133-144.
- Bonnefont CMD, Toufeer M, Caubet C, Foulon E, Tasca C, Aurel MR, Bergonier D, Boullier S, Robert-Granié C, Foucras G, Rupp R. 2011. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics*, 12: 208.
- Bora DP, Venkatesan G, Bhanuprakash V, Balamurugan V, Prabhu M, Siva Sankar MS, Yogisharadhya R. 2011. TaqMan real-time PCR assay based on DNA polymerase gene for rapid detection of Orf infection. *Journal of Virological Methods*, 178: 249-52.
- Boyazoglou J, Morand-Fehr P. 2001. Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality: A critical review. *Small Ruminant Research*, 40: 1-11.
- Brady MS, Katz SE. 1988. Antibiotic/Antimicrobial residues in milk. *Journal of Food Protection*, 51: 8-11.
- Bramis G, Gelasakis AI, Kiossis E, Banos G, Arsenos G. 2016. Predisposing factors and control of bacterial mastitis in dairy ewes. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 67: 211-222.
- Brenaut P, Lefèvre L, Rau A, Laloe D, Pisoni G, Moroni P, Bevilacqua C, Martin P. 2014. Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Research*, 45: 16.

- Breyne K, De Vlieghe S, De Visscher A, Piepers S, Meyer E. 2015. *Technical note: A pilot study using a mouse mastitis model to study differences between bovine associated coagulase-negative staphylococci. Journal of Dairy Science*, 98: 1090-1100.
- Broadbent JR, Chou YC, Gillies K, Kond JK. 1989. Nisin Inhibits Several Gram-Positive, Mastitis-Causing Pathogens. *Journal of Dairy Science*, 72: 3342-3345.
- Brodie SJ, Pearson LD, Zink MC, Bickle HM, Anderson BC, Marcom KA, DeMartini JC. 1995. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. *American Journal of Pathology*, 146: 250-263.
- Brouillette E, Grondin G, Lefebvre C, Talbot BG, Malouin F. 2004. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*, 101: 253-262.
- Brouillette E, Grondin G, Talbot BG, Malouin F. 2005. Inflammatory cell infiltration as an indicator of *Staphylococcus aureus* infection and therapeutic efficacy in experimental mouse mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104: 163-169.
- Brouillette E, Malouin F. 2005. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes and Infection*, 7: 560-568.
- Camperio C, Armas F, Biasibetti E, Frassanito P, Giovannelli C, Spuria L, D'Agostino C, Tait S, Capucchio MT, Marianelli C. 2017. A mouse mastitis model to study the effects of the intramammary infusion of a food-grade *Lactococcus lactis* strain. *PLoS ONE*, 12: e0184218.
- Cannas EA, Dore S. 2016. Relazione tra patogeni della mammella e cellule somatiche nel latte ovino e caprino. Atti della giornata di studio "Cellule somatiche nel latte ovino e caprino". *Quaderni di zooprofilassi*, 16: 15-23.
- Cao LT, Wu JQ, Xie F, Hu SH, Mo Y. 2007. Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90: 3980-3985.
- Caroprese M. 2008. Sheep housing and welfare. *Small Ruminant Research*, 76: 21-25.
- Carta A, Casu S, Salaris S. 2009. *Invited review: Current state of genetic improvement in dairy sheep. Journal of Dairy Science*, 92: 5814-5833.
- Carter GR, Cole JR. 1990. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. San Diego: Academic Press.
- Casu S, Sechi S, Salaris SL, Carta A. 2010. Phenotypic and genetic relationships between udder morphology and udder health in dairy ewes. *Small Ruminant Research*, 88: 77-83.
- Chandler RL. 1970. Experimental bacterial mastitis in the mouse. *Journal of Medical Microbiology*, 3: 273-282.
- Chen F, Liu B, Wang D, Wang L, Deng X, Bi C, Xiong Y, Wu Q, Cui Y, Li YZX, Wang Y, Liu B, Cao Y. 2014. Role of sortase A in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *FEMS Microbiology Letters*, 351: 95-103.

- Clements AC, Taylor DJ, Fitzpatrick JL. 2003. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. *Journal of Dairy Research*, 70: 139-148.
- Contreras A, Luengo C, Sánchez A, Corrales JC. 2003. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livestock Production Science*, 79: 273-283.
- Contreras A, Rodríguez JM. 2011. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16: 339-356.
- Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, Gonzalo C. 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68: 145-153.
- Coop RL, Kyriazakis I. 1999. Nutrition-parasite interaction. *Veterinary Parasitology*, 84: 187- 204.
- Corcionivoschi N, Drinceanu D, Mircea Pop I, Stack D, Stef L, Julean C, Bourke B. 2010. The Effect of Probiotics on Animal Health. *Animal Science and Biotechnologies*, 43: (1).
- Corrales JC, Esnal A, De la Fe C, Sánchez A, Assunçao P, Poveda JB, Contreras A. 2007. Contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68: 154-166.
- Cotter PD, Deegan LH, Lawton EM, Draper LA, O'Connor PM, Hill C, Ross RP. 2006. Complete alanine scanning of the two-component lantibiotic lactacin 3147: generating a blueprint for rational drug design. *Molecular Microbiology*, 62: 735-747.
- Crispie F, Alonso-Gómez M, O'Loughlin C, Klostermann K, Flynn J, Arkins S, Meaney W, Ross RP, Hill C. 2008. Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of livelactococci on the mammary immune response. *Journal of Dairy Research*, 75: 374-384.
- Croft A, Duffield T, Menzies P, Leslie K, Bagg R, Dick P. 2000. The effect of tilmicosin administered to ewes prior to lambing on incidence of clinical mastitis and subsequent lamb performance. *The Canadian Veterinary Journal*, 41: 306-311.
- Cuccuru C, Melonmi M, Sala E, Scaccabarozzi L, Locatelli C, Moroni P, Bronzo V. 2011. Effects of intramammary infections on somatic cell score and milk yield in Sarda sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 59: 128-131.
- Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Brogden KA, Bolin SR. 1985. Mastitis associated with ovine progressive pneumonia virus infection in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 46: 326-328.
- DaMassa AJ, Wakenell PS, Brooks DL. 1992. Mycoplasmas of goats and sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4: 101-113.
- de Rancourt M, Fois N, Lavín MP, Tchakérian E, Vallerand F. 2006. Mediterranean sheep and goats production: An uncertain future. *Small Ruminant Research*, 62: 167-179.
- De Santis EPL, Mencarelli A, Nieddu MP, Farina S, Mazzette R, Sanna S, Viridis S. 2001. Efficacia della somministrazione per via endomammaria di cloxacillina benzatina per il trattamento delle infezioni intramammarie dell'ovino nel corso dell'asciutta. *Large Animals Review*, 3: 39-47.

- DECISIONE DELLA COMMISSIONE del 27 ottobre 1997 che fissa i livelli e le frequenze di prelievo di campioni, previsti dalla direttiva 96/23/CE del Consiglio, per il controllo di talune sostanze e dei loro residui in alcuni prodotti di origine animale (97/747/CE).
- Dore S, Liciardi M, Amatiste S, Bergagna S, Bolzoni G, Caligiuri V, Cerrone A, Farina G, Montagna CO, Saletti MA, Scatassa ML, Sotgiu G, Cannas EA. 2016. Survey on small ruminant bacterial mastitis in Italy, 2013-2014. *Small Ruminant Research*, 141: 91-93.
- Eberhart RJ, Buckalew JM. 1972. Evaluation of a hygiene and dry period therapy program for mastitis control. *Journal of Dairy Science*, 55: 1683-1691.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2009. Scientific opinion on welfare of dairy cows in relation to udder problems based on a risk assessment with special reference to the impact of housing, feeding, management and genetic selection. *EFSA JOURNAL*, 1141: 1-60.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2014. Scientific opinion on the welfare risks related to the farming of sheep for wool, meat and milk production. *EFSA JOURNAL*, 12: 3933 (128 pp).
- El-Masannat ETS, Jones JET, Scott MJ. 1991. The experimental production of mastitis in sheep by intramammary inoculation of *Pasteurella haemolytica*. *Journal of Comparative Pathology*, 105: 455-465.
- Enríquez-Valencia CE, Serna-Cock L, Campos-Gaona R. 2015. Intramammary infusion of *Weissella confuse* affects somatic cells counts and milk differential leukocyte count. *Ciência Rural*, 45: 835-841.
- Ergün Y, Aslantaş Ö, Doğruer G, Kireççi E, Sarıbay MK, Ateş CT, Ülkü A, Demir C. 2009. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi dairy ewes in southern Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 33: 477- 483.
- Ertafi HB, Kilic A, Özbey G, Muz A. 2005. Isolation of Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes from Abscessed Cattle Kidney and Identification by PCR. *Turkish Journal Veterinary Animal Sciences*, 29: 455-459.
- FAO (Food and Agriculture of the United Nations). 2016. Probiotics in Animal Nutrition. Production, impact and regulation.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Meeting Report, London Ontario, Canada.
- Fatima BAA, Kheira B, Bettache G, Habib A, Mebrouk K. 2013. Evaluation of microbiological and sanitary quality of ewe's raw milk in Western of Algeria and detection of antibiotic residue by Delvotest. *Advances in Environmental Biology*, 7: 1027-1033.
- Fragkou IA, Boscós CM, Fthenakis GC. 2014. Diagnosis of clinical or subclinical mastitis in ewes. *Small Ruminant Research*, 118: 86-92.

- Fragkou IA, Papaioannou N, Cripps PJ, Boscós CM, Fthenakis GC. 2007. Teat lesions predispose to invasion of the ovine mammary gland by *Mannheimia haemolytica*. *Journal of Comparative Pathology*, 137: 239-244.
- Fras M, Leboeuf A, Labrie FM, Laurin MA, Singh Sohal J, L'Homme Y. 2013. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in mixed flocks: Multiple evidence of dual infection and natural transmission of types A2 and B1 between sheep and goats. *Infection, Genetics and Evolution*, 19: 97-104.
- Frola ID, Pellegrino MS, Espeche MC, Giraudo JA, Nader-Macias MEF, Bogni CI. 2012. Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders. *Journal of Dairy Research*, 79: 84-92.
- Frola ID, Pellegrino MS, Magnano G, Giraudo JA, Espeche MC, Nader-Macias MEF, Bogni CI. 2013. Histological examination of non-lactating bovine udders inoculated with *Lactobacillus perolens* CRL 1724. *Journal of Dairy Research*, 80: 28-35.
- Fthenakis GC, Jones JE. 1990. The effect of inoculation of coagulase-negative Staphylococci into the ovine mammary gland. *Journal of Comparative Pathology*, 102: 211-219.
- Fthenakis GC, Menzies PI. 2011. Therapeutics and control of sheep and goat diseases, an issue of veterinary clinics: food animal practice. *The clinical veterinary medicine*.
- Galal S, Gürsoy O, Shaat I. 2008. Awassi sheep as a genetic resource and efforts for their genetic improvement: A review. *Small Ruminant Research*, 79: 99-108.
- Gelasakis AI, Angelidis AS, Giannakou R, Filioussis G, Kalamaki MS, Arsenos G. 2016. Bacterial subclinical mastitis and its effect on milk yield in low-input dairy goat herds. *Journal of Dairy Science*, 99: 3698-708.
- Gelasakis AI, Arsenos G, Valergakis GE, Oikonomou G, Kiossis E, Fthenakis GC. 2012. Study of factors affecting udder traits and assessment of their interrelationships with milking efficiency in Chios breed ewes. *Small Ruminant Research*, 103: 232-239.
- Gelasakis AI, Mavrogianni VS, Petridis IG, Vasileiou NGC, Fthenakis GC. 2015. Mastitis in sheep - The last 10 years and the future of research. *Veterinary Microbiology*, 181: 136-146.
- Giadinis ND, Panousis N, Petridou EJ, Siarkou VI, Lafi SQ, Pourliotis K, Hatzopoulou E, Fthenakis GC. 2011. Selenium, vitamin E and vitamin A blood concentrations in dairy sheep flocks with increased or low clinical mastitis incidence. *Small Ruminant Research*, 95: 193-196.
- Gillor O, Etzion A, Riley MA. 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology Biotechnology*, 81:591-606.
- Gillor O, Nigro LM, Riley MA. 2005. Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*, 11: 1067-1075.
- Gómez-Martín Á, Amores J, Paterna A, De la Fe C. 2013. Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control. *The Veterinary Journal*, 198: 48–56.

- Gonzalo C, Ariznabarreta A, Carriedo JA, San Primitivo F. 2002. Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 85: 1460-1467.
- Gonzalo C, Tardáguila JA, De La Fuente LF, San Primitivo F. 2004. Effect of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield on subsequent lactation in dairy ewes. *Journal of Dairy Research*, 71: 33-38.
- Gougoulis DA, Kyriazakis I, Fthenakis GC. 2010. Diagnostic significance of behaviour changes of sheep: A selected review. *Small Ruminant Research*, 92: 52-56.
- Gougoulis DA, Kyriazakis I, Papaioannou N, Papadopoulos E, Taitzoglou IA, Fthenakis GC. 2008. Subclinical mastitis changes the patterns of maternal – off-spring behaviour of dairy sheep. *The Veterinary Journal*, 176: 378-384.
- Greene WA, Gano AM, Smith KL, Hogan JS, Todhunter DA. 1991. Comparison of probiotic and antibiotic intramammary therapy of cattle with elevated somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 74: 2976-2981.
- Grego E, Bertolotti L, Quasso A, Profiti M, Lacerenza D, Muz D, Rosati S. 2007. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *Journal of General Virology*, 88: 3423-3427.
- Guarda F, Mandelli G, Biolatti B, Scanziani E. 2013. Trattato di Anatomia patologica veterinaria. UTET Scienze Mediche.
- Hadimli HH, Erganis O, Kav K, Sayin Z. 2010. Isolation of *Arcanobacterium pyogenes* from samples of sheep and cattle and identification by polimerase chain reaction. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16: 611-616.
- Haenlein GFW. 2007. About the evolution of goat and sheep milk production. *Small Ruminant Research*, 68: 3-6.
- Haftu R, Taddele H, Gugsu G, Kalayou S. 2012. Prevalence, bacterial causes, and antimicrobial susceptibility profile of mastitis isolates from cows in large-scale dairy farms of Northern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 44: 1765-1771.
- Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Veterinary Quarterly*, 29: 18-31.
- Hancock REW, Chapple DS. 1999. Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 1317-1323.
- Hariharan H, Donachie W, Macaldowie C, Keefe G. 2004. Bacteriology and somatic cell counts in milk samples from ewes on a Scottish farm. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 68: 188-192.
- Harmon RJ. 1994. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. *Journal of Dairy Science*, 77: 2103-2113.

- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 15-25.
- Hill AW, Shears AL, Hibbitt KG. 1978. The elimination of serum-resistant *Escherichia coli* from experimentally infected single mammary glands of healthy cows. *Research in Veterinary Science*, 25: 89-93.
- Hillerton JE, Bramley AJ. 1989. Infection following challenge of the lactating and dry udder of dairy cows with *Actinomyces pyogenes* and *Peptostreptococcus indolicus*. *British Veterinary Journal*, 145: 148-159.
- Holt JC, Krieg NR., Sneath PHA, Staley 632 JT, Williams ST. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. William & Wilkins, Baltimore, MD.
- Houdijk JGM, Kyriazakis I, Jackson F, Huntley JF, Coop RL. 2003. Is the allocation of metabolisable protein prioritised to milk production rather than to immune functions in *Teladorsagia circumcincta*-infected lactating ewes. *International Journal for Parasitology*, 33: 327-338.
- Hueston WD, Boner GJ, Baertsche SL. 1989. Intramammary Antibiotic Treatment at the End of Lactation for Prophylaxis and Treatment of Intramammary Infection in Ewes. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 194: 1041-1044.
- Imperial ICVJ, Ibana JA. 2016. Addressing the Antibiotic Resistance Problem with Probiotics: Reducing the Risk of its Double-Edged Sword Effect. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1983.
- Ingman WV, Glynn DJ, Hutchinson MR. 2015. Mouse models of mastitis - how physiological are they? *International Breastfeeding Journal*, 10: 12.
- Jensen HE, Espinosa de los Monteros A, Carrasco L. 1996. Caprine mastitis due to Aspergillosis and Zygomycosis: a pathological and immunoistochemical study. *Journal of Comparative Pathology*, 114: 183-191.
- Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. 2014. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed Research International*, 2014: ID 827965.
- Keefe GP. 1997. Streptococcus agalactiae mastitis: a review. *The Canadian Veterinary Journal*, 38: 429-437.
- Kern G, Traulsen I, Kemper N, Krieter J. 2013. Analysis of somatic cell counts and risk factors associated with occurrence of bacteria in ewes of different primary purposes. *Livestock Science*, 157: 597-604.
- Kim SY, Shin S, Koo HC, Youn JH, Paik HD, Park YH. 2010. In vitro antimicrobial effect and in vivo preventive and therapeutic effects of partially purified lantibiotic lactacin NK34 against infection by *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 93 : 3610-3615.
- Kiossis E, Brozos CN, Petridou E, Boscoc C. 2007. Program for the control of subclinical mastitis in dairy Chios breed ewes during lactation. *Small Ruminant Research*, 73: 194-199.
- Kirk JH, Bartlett PC. 1986. Bovine mycotic mastitis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 8: 106-110.

- Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337-349.
- Klostermann K, Crispie F, Flynn J, Meaney WJ, Paul Ross R, Hill C. 2010. Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lactacin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *Journal of Dairy Research*, 77: 231-238.
- Klostermann K, Crispie F, Flynn J, Ross RP, Hill C, Meaney W. 2008. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *Journal of Dairy Research*, 75: 365-373.
- Knight CH, Fitzpatrick JL, Logue DN, Platt DJ. 2000. Efficacy of two non-antibiotic therapies, oxytocin and topical liniment, against bovine staphylococcal mastitis. *Veterinary Record*, 146: 311-316.
- Koop G, Rietman JF, Pieterse MC. 2010. *Staphylococcus aureus* mastitis in Texel sheep associated with suckling twins. *Veterinary Record*, 167: 868-869.
- Koutsoumpas AT, Giadinis ND, Petridou EJ, Konstantinou E, Brozos C, Lafi SQ, Fthenakis GC, Karatzias H. 2013. Consequences of reduced vitamin A administration on mammary health of dairy ewes. *Small Ruminant Research*, 110: 120-123.
- Krukowski H, Tietze, M, Majewski T, Różanski P. 2000. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathologia*, 150: 5-7.
- Las Heras A, Domínguez L, López I, Payá MJ, Peña L, Mazzucchelli F, García LA, Fernández-Garayzábal JF. 2000. Intramammary *Aspergillus fumigatus* infection in dairy ewes associated with antibiotic therapy. *Veterinary Record*, 147: 578-580.
- Las Heras A, Vela AI, Fernández E, Legaz E, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. 2002. Unusual outbreak of clinical mastitis in dairy sheep caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1106-1108.
- Lechtenberg KF, Nagaraja TG, Leipold HW, Chengappa MM. 1988. Bacteriologic and histologic studies of hepatic abscesses in cattle. *American Journal Veterinary Research*, 49: 58-62.
- Lee YK, Salminen S. Second Edition. 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. Wiley.
- Leitner G, Krifucks O. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* mastitis outbreaks in sheep and goat flocks: antibody production and vaccination in a mouse model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 119: 198-203.
- Leitner G, Sapiro S, Krifucks O, Weisblit I, Lavi Y, Heller ED. 2011. Systemic and local mammary gland immunity to udder infection in goats by various *Staphylococcus* species. *Small Ruminant Research*, 95: 160-167.
- Lérias JR, Hernández-Castellano LE, Suárez-Trujillo A, Castro N, Poulis A, Almeida AM. 2014. The mammary gland in small ruminants: major morphological and functional events underlying milk production -- a review. *Journal of Dairy Research*, 81: 304-318.

- Linage B, Gonzalo C. 2008. Influence of an intramammary infusion at drying-off of combined penethamate hydriodide, benethamine penicillin, and framycetin sulfate on intramammary infections and somatic cell counts in dairy sheep. *Journal of Dairy Science*, 91: 3459-3466.
- Little CL, de Louvois J. 1999. Health risks associated with unpasteurized goats' and ewes' milk on retail sale in England and Wales. A PHLS Dairy Products Working Group Study. *Epidemiology and Infection*, 122: 403-408.
- Lollai SA, Ziccheddu M, Di Mauro C, Manunta D, Nudda A, Leori G. 2008. Profile and evolution of antimicrobial resistance of ovine mastitis pathogens (1995-2004). *Small Ruminant Research*, 74: 249-254.
- Longo F, Pravieux JJ. 2001. Traitement des brebis au tarisse ment: cefovet HL, première AMM pour ovins. In: Proceedings of the Journées Nationales GTV, Clermont-Ferrand, France, pp 301-302.
- López C, García JJ, Sierra M, Diez MJ, Pérez C, Sahagún AM, Fernández N. 2015. Systemic and mammary gland disposition of enrofloxacin in healthy sheep following intramammary administration. *BMC Veterinary Research*, 11:88.
- Loria GR. 2017. Mal del sito: where we are? Corso pratico di diagnostica di laboratorio dell'agalassia contagiosa: ultime acquisizioni. Palermo, 22-24 giugno 2017.
- Loria GR, Puleio R, Tamburello A, Messina F, Nicholas R. Agalassia contagiosa e micoplasmosi nei piccoli ruminanti in Italia: scenario attuale. Atti XX Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C, pp. 100-103. Siracusa, 26-29 settembre 2012.
- Marogna G, Pilo C, Vidili A, Tola S, Schianchi G, Leori SG. 2012. Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis. *Small Ruminant Research*, 102: 74-83.
- Marogna G, Rolesu S, Lollai S, Tola S, Leori G. 2010. Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. *Small Ruminant Research*, 88: 119-125.
- Mavrogianni VS, Cripps PJ, Papaioannou N, Taitzoglou I, Fthenakis GC. 2006. Teat disorders predispose ewes to clinical mastitis after challenge with *Mannheimia haemolytica*. *Veterinary Research*, 37: 89-105.
- Mavrogianni VS, Fthenakis GC. 2007. Clinical, bacteriological, cytological and pathological features of teat disorders in ewes. *Journal of Veterinary Medicine*, A 54: 219-223.
- Mavrogianni VS, Menzies PI, Fragkou IA, Fthenakis GC. 2011. Principles of mastitis treatment in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27: 115-120.
- Mavrogianni VS, Papadopoulos E, Spanos SA, Mitsoura A, Ptochos S, Gougoulis DA, Barbagianni MS, Kyriazakis I, Fthenakis GC. 2014. Trematode infections in pregnant ewes can predispose to mastitis during the subsequent lactation period. *Research in Veterinary Science*, 96: 171-179.
- McCarthy FD, Lyndsey JB, Gore MT, Notter DR. 1988. Incidence and control of subclinical mastitis in intensively managed ewes. *Journal of Animal Science*, 66: 2715-2721.

- McElroy MC, Bassett HF. 2007. The development of oral lesions in lambs naturally infected with Orf virus. *Veterinary Journal*, 174: 663-664.
- Merck Manual. 2012. Fleming SA. Pasteurellosis of Sheep and Goats: Overview of Pasteurellosis of Sheep and Goats. *The Merck Veterinary Manual*.
- Milán MJ, Caja G, González-González R, Fernández-Pérez AM, Such X. 2011. Structure and performance of Awassi and Assaf dairy sheep farms in northwestern Spain. *Journal of Dairy Science*, 94: 771-784.
- Minguijón E, Reina R, Pérez M, Polledo L, Villoria M, Ramírez H, Leginagoikoa I, Badiola JJ, García-Marín JF, de Andrés D, Luján L, Amorena B, Juste RA. 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary Microbiology*, 181: 75-89.
- Molina A, Molina MP, Althaus RL, Gallego I. 2003. Residue persistence in sheep milk following antibiotic therapy. *The Veterinary Journal*, 165: 84-89.
- Monleón E, Pacheco MC, Luján L, Bolea R, Luco DF, Vargas MA, Alabart JL, Badiola JJ, Amorena B. 1997. Effect of in vitro maedi-visna virus infection on adherence and phagocytosis of staphylococci by ovine cells. *Veterinary Microbiology*, 57: 13-28.
- Mørk T, Tollersrud T, Kvitle B, Jørgensen HJ, Waage S. 2005. Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from ovine intramammary infections in Norway. *Veterinary Microbiology*, 106: 265-273.
- Mørk T, Waage S, Tollersrud T, Kvitle B, Sviland S. 2007. Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49: 23.
- Moroni P, Pisoni G, Antonini M, Ruffo G, Carli S, Varisco G, Boettcher P. 2005. Subclinical Mastitis and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Two Italian Goat Herds. *Journal of Dairy Science*, 88: 1694-1704.
- Mullan NA, Carter EA, Nguyen KA. 1985. Phagocytic and bactericidal properties of bovine macrophages from non-lactating mammary glands. *Research in Veterinary Science*, 38: 160-166.
- Nandi S, De UK, Chowdhury S. 2011. Current status of contagious ecthyma or Orf disease in goat and sheep - a global perspective. *Small Ruminant Research*, 96: 73-82.
- Narayan O, Clements JE. 1989. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *Journal of General Virology*, 70: 1617-1639.
- Narayan O, Cork LC. 1985. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Reviews of Infectious Diseases*, 7: 89-98.
- Narenji Sani R, Mahdavi A, Moezifar M. 2015. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in dairy ewes in two seasons in Semnan province, Iran. *Tropical Animal Health And Production*, 47: 1249-1254.
- Nazemi S, Aalbæk B, Kjelgaard-Hansen M, Safayi S, Klærke DA, Knight CH. 2014. Expression of acute phase proteins and inflammatory cytokines in mouse mammary gland following

- Staphylococcus aureus* challenge and in response to milk accumulation. *Journal of Dairy Research*, 81: 445-454.
- Newbould FHS, Neave FK. 1965. The recovery of small numbers of *Staphylococcus aureus* infused into the bovine teat cistern. *Journal of Dairy Research*, 32: 157-162.
  - Notebaert S, Demon D, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Meyer E. 2008. Inflammatory mediators in *Escherichia coli*-induced mastitis in mice. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31: 551-565.
  - Notebaert S, Meyer E. 2006. Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis. A review. *Veterinary Quarterly*, 28: 2-13.
  - O'Brien J, Martinson H, Durand-Rougely C, Schedin P. 2012. Macrophages are crucial for epithelial cell death and adipocyte repopulation during mammary gland involution. *Development*, 139: 269-275.
  - Olechnowicz J, Jaśkowski JM. 2014. Mastitis in small ruminants. *Medycyna Weterynaryjna*, 70: 67-72.
  - Oluwatayo IB, Oluwatayo TB. 2012. Small Ruminants as a Source of Financial Security: A Case Study of Women in Rural Southwest Nigeria. Institute for Money, Technology and Financial Inclusion (IMTFI), Working Paper 2012-1.
  - Omaleki L, Barber SR, Allen JL, Browning GF. 2010. *Mannheimia* species associated with ovine mastitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 3419-3422.
  - Omaleki L, Browning GF, Allen JL, Barber SR. 2011. The role of *Mannheimia* species in ovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 153: 67-72.
  - Onni T, Sanna G, Cubeddu GP, Marogna G, Lollai S, Leori G, Tola S. 2010. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and gap genes. *Veterinary Microbiology*, 144: 347-352.
  - Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, 54: 399-499.
  - Paape MJ, Poutrel B, Contreras A, Marco JC, Capuco AV. 2001. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. *Journal of Dairy Science*, 84: E237-E244.
  - Paape MJ, Wiggans GR, Bannerman DD, Thomas DL, Sanders AH, Contreras A, Moroni P, Miller RH. 2007. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research*, 68: 114-125.
  - Pengov A, Kirbis A. 2009. Risk of antibiotic residues in milk following intramammary and intramuscular treatments in dairy sheep. *Analytica Chimica Data*, 637: 13-17.
  - Pérez V, Corpa JM, García Marín JF, Aduriz JJ, Jensen HE. 1998. Mammary and systemic aspergillosis in Dairy Sheep. *Veterinary Pathology*, 35: 235-240.

- Peterhans E, Greenland T, Badiola J, Harkiss G, Bertoni G, Amorena B, Eliazewicz M, Juste RA, Krassnig R, Lafont JP, Lenihan P, Pétursson G, Pritchard G, Thorley J, Vitu C, Mornex JF, Pépin M. 2004. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Veterinary Research*, 35: 257-274.
- Pezzanite L, Neary M, Hutchens T, Scharko P. 2009. Common diseases and health problems in sheep and goats. Kentucky: University of Kentucky. Animal Science. Purdue University Cooperative Extension Service.
- Pinzón-Sánchez C, Ruegg PL. 2011. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 94: 3397-3410.
- Pisanu S, Cubeddu T, Pagnozzi D, Rocca S, Cacciotto C, Alberti A, Marogna G, Uzzau S, Addis MF. 2015. Neutrophil extracellular traps in sheep mastitis. *Veterinary Research*, 46: 59.
- Plummer PJ, Plummer C. 2012. Diseases of the Mammary Gland. In: Pugh DG, Baird N., eds. *Sheep and Goat Medicine*. Maryland Heights, Missouri, USA: Elsevier Saunders, 442-465.
- Poutrel B, De Crémoux R, Ducelliez M, Verneau D. 1997. Control of intramammary infections in goats: impact on somatic cell counts. *Journal of Animal Science*, 75: 566-570.
- Queiroga MC. 2017. Prevalence and aetiology of sheep mastitis in Alentejo region of Portugal. *Small Ruminant Research*, 153: 123-130.
- Ramos CP, Foster G, Collins MD. 1997. Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. Nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 46-53.
- 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.
- REGOLAMENTO (UE) N. 37/2010 DELLA COMMISSIONE del 22 dicembre 2009 concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale.
- Reina R, Bertolotti L, Dei Giudici S, Puggioni G, Ponti N, Profiti M, Patta C, Rosati S. 2010. Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Veterinary Microbiology*, 144: 24-31.
- Rosati R, Militello G, Boselli C, Giangolini G, Amatiste S, Brajon G, Gazzoni S, Casini M, Scatassa M, Bono P, Cannas A, Mugoni G, Simula M, Denti G, Gradassi S, Fagiolo A. 2005. Cellule somatiche nel latte ovino e caprino: definizione del valore medio nazionale e del valore fisiologico. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 56 (3).
- Roumen MP, Sinke M, Gruys E. 1987. Iatrogenic mastitis in sheep. *Tijdschr Diergeneeskd*, 112: 513-518.
- Rovai M, Caja G, Salama AAK, Jubert A, Lázaro B, Lázaro M, Leitner G. 2014. Identifying the major bacteria causing intramammary infections in individual milk samples of sheep and goats

- using traditional bacteria culturing and real-time polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, 97: 5393-5400.
- Ruder CA, Sasser RG, Williams RJ, Ely JK, Bull RC, Butler JE. 1981. Uterine infections in the postpartum cow. II. Possible synergistic effect of *Fusobacterium necrophorum* and *Corynebacterium pyogenes*. *Theriogenology*, 15: 573-580.
  - Ryan DP, Greenwood PL, Nicholls PJ. 1993. Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk cell count and N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase activity in dairy goats. *Journal of Dairy Research*, 60: 299-306.
  - Ryan MP, Flynn J, Hill C, Ross RP, Meaney WJ. 1999. The natural food grade inhibitor, lactacin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82: 2625-2631.
  - Sanchez A, Contreras A, Corrales JC, Marco JC. 2001. Relationships between infection with caprine arthritis encephalitis virus, intramammary bacterial infection and somatic cell counts in dairy goats. *Veterinary Record*, 148: 711-714.
  - Schlafer D.H., Foster R.A. 2016. Female Genital System. In: Grant Maxie M., ed. Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals. St Louis, Missouri, USA: Elsevier, 358-464.
  - Scott PR. 2000. Extensive fibrinous pleurisy associated with *Streptococcus dysgalactiae* mastitis in two ewes. *Veterinary Record*, 146: 347-349.
  - Sears P, Smith B, Stewart W, Gonzalez R, Rubino S, Gusik S, Rubino S, Gusik S, Kulizek E, Projan S, Blackburn P. 1992. Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows. *Journal of Dairy Science*, 1992;75: 3185-3190.
  - Sears PM, Smith BS, English PB, Herer PS, Gonzalez RN. 1990. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 73: 2785-2789.
  - Serna-Cock L, Enriquez CE, Gaona RC, Vásquez A. 2013. Cellular response of the bovine mammary gland after *Weissella confuse* infusion to control *Streptococcus agalactiae*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 26: 280-287.
  - Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS. 2011. Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24: 429-438.
  - Shouman MT, Rezk MS, Ismail M, El-Ged A. 1986. The role of streptococci and corynebacteria in the subclinical and clinical mastitis in the goats and ewes. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 16: 341-351.
  - Shwimmer A, Kenigswald G, Van Straten M, Lavi Y, Merin U, Weisblit L, Leitner G. 2008. Dry-off treatment of Assaf sheep: Efficacy as a management tool for improving milk quantity and quality. *Small Ruminant Research*, 74: 45-51.
  - Smith MC, Cutlip R. 1988. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193: 63-67.

- Smith EM, Willis ZN, Blakeley M, Lovatt F, Purdy KJ, Green LE. 2015. Bacterial species and their associations with acute and chronic mastitis in suckler ewes. *Journal of Dairy Science*, 98: 7025-7033.
- Souza FN, Blagitz MG, Penna CFAM, Della Libera AMMP, Heinemann MB, Cerqueira MMOP. 2012. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? *Small Ruminant Research*, 107; 65-75.
- Spyroua V, Valiakos G. 2015. Orf virus infection in sheep or goats. *Veterinary Microbiology*, 181: 178-182.
- Stein T, Morris JS, Davies CR, Weber-Hall SJ, Duffy MA, Heath VJ, Bell AK, Ferrier RK, Sandilands GP, Gusterson BA. 2004. Involution of the mouse mammary gland is associated with an immune cascade and an acute-phase response, involving LBP, CD14 and STAT3. *Breast Cancer Research*, 6: R75-R91.
- Sungsoo Cho S. 2010. Handbook of Prebiotics and Probiotics Ingredients. Health benefits and Food Applications. CRC Press.
- Tabacchioni S, Visca P, Chiarini L, Bevivino A, Di Serio C, Fancelli S, Fani R. 1995. Molecular characterization of clinical and environmental isolates of *Burkholderia cepacia*. *Research in Microbiology*, 146: 531-542.
- Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. 1988. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. *Cornell University Press, Ithaca, NY*.
- Tiwari JG, Babra C, Tiwari HK, Williams V, Wet SD, Gibson J, Paxman A, Morgan E, Costantino P, Sunagar R, Isloor S, Mukkur T. 2013. Trends in therapeutic and prevention strategies for management of bovine mastitis: An overview. *Journal of Vaccines and Vaccination*, 4: 1-11.
- Todaro M, Dattena M, Acciaioli A, Bonanno A, Bruni G, Caroprese M, Mele M, Sevi A, Trabalza Marinucci M. 2015. Aseasonal sheep and goat milk production in the Mediterranean area: Physiological and technical insights. *Small Ruminant Research*, 126: 59-66.
- Todaro M, Puleio R, Sabelli C, Scatassa ML, Console A, Loria GR. 2015b. Determination of milk production losses in Valle del Belice sheep following experimental infection of *Mycoplasma agalactiae*. *Small Ruminant Research*, 123: 167-172.
- Triptahi BV, Chaltopadhyay SK. 1993. Caprine mastitis: clinico morphological and aetipathological findings in spontaneously occurring cases in India goats. *International Journal of Animal Science*, 8: 101-111.
- Twomey D, Ross RP, Rya M, Meaney B, Hill C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 165-185.
- Twomey DP, Wheelock AI, Flynn J, Meaney WJ, Hill C, Ross RP. 2000. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. *Journal of Dairy Science*, 83: 1981-1988.
- van der Molen EJ, Vecht U, Houwers DJ. 1985. A chronic indurative mastitis in sheep, associated with maedi/visna virus infection. *Veterinary Quarterly*, 7: 112-119.

- Ventola CL. 2015. The Antibiotic Resistance crisis. Part 1: causes and threats. *Pharmacy & Therapeutics*, 40: 277-283.
- Waage S, Vatn S. 2008. Individual animal risk factors for clinical mastitis in meat sheep in Norway. *Preventive Veterinary Medicine*, 87: 229-243.
- Werner C, Sobiraj A, Sundrum A. 2010. Efficacy of homeopathic and antibiotic treatment strategies in cases of mild and moderate bovine clinical mastitis. *Journal of Dairy Research*, 77: 460-467.
- White EC, Hinckley LS. 1999. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. *Small Ruminant Research*, 33: 117-121.
- World Health Organization (WHO). 2012. The evolving threat of antimicrobial resistance: option for action. Geneva, Switzerland.
- Wu J, Hu S, Cao L. 2007. Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 3131-3135.
- Yamaki M, Berruga MI, Althaus RL, Molina MP, Molina A. 2004. Occurrence of Antibiotic Residues in Milk from Manchega Ewe Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*, 87: 3132-3137.
- Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH. 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16: 357-372.
- Zavanella M. 2011. Esercitazioni di Microbiologia. Brescia: Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Tipografia Camuna.
- Zdragas A, Tsakos P, Kotzamanidis C, Anatoliotis K, Tsaknakis I. 2005. Outbreak of mastitis in ewes caused by *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Hellenic Veterinary Medical Society*, 56: 114-121.
- Zervas G, Tsiplakou E. 2011. The effect of feeding systems on the characteristics of products from small ruminants. *Small Ruminant Research*, 101: 140-149.
- Zhao Y, Zhou M, Gao Y, Liu H, Yang W, Yue J, Chen D. 2015. Shifted T helper cell polarization in a murine *Staphylococcus aureus* mastitis model. *PLoS One*, 10: e0134797.
- Zygyiannis D. 2006. Sheep production in the world and in Greece. *Small Ruminant Research*, 62: 143-147.

## 15. SITOGRAFIA

- <https://ec.europa.eu>
- <https://www.efsa.europa.eu>
- <https://www.fao.org>
- <https://www.accessdata.fda.gov>
- <https://www.istat.it>

## PERCORSO FORMATIVO

### **Internazionalizzazione**

- Maggio/luglio 2015: presso Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, Departamento de Patologia Animal, sotto la supervisione del Prof. Lluís Lujan.

### **Congressi**

- XXII Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C. (Società Italiana di Patologia e Allevamento degli Ovini e dei Caprini), 13-14-15-16 settembre 2016, Cuneo, Italia.
- 34th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology (ESVP) & 27th Meeting of the European College of Veterinary Pathologists (ECVP), 07-08-09-10 settembre 2016, Bologna, Italia.
- XXVII Reunion SEAPV (Sociedad Espanola de Anatomia Patologica Veterinaria), 17-18-19 giugno 2015, Barcelona, Spagna.

### **Articoli pubblicati su riviste attinenti al dottorato**

- S.A. Mignacca, S. Dore, **L. Spuria**, P. Zanghì, B. Amato, I. Duprè, F. Armas, E. Biasibetti, C. Camperio, S.A. Lollai, M.T. Capucchio, E.A. Cannas, V. Di Marco Lo Presti, C. Marianelli. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* in ewes to treat staphylococcal mastitis. Journal of Medical Microbiology, in press.
- **L. Spuria**, E. Biasibetti, D. Bisanzio, I. Biasato, D. De Meneghi, P. Nebbia, P. Robino, P. Bianco, M. Lamberti, S. Peletto, C. Caruso, A. Di Blasio, L. Masoero, A. Dondo, M.T. Capucchio. Microbial agents in macroscopically healthy mammary glands tissue of small ruminants. Peerj, 5: e3994, 2017.
- C. Camperio, F. Armas, E. Biasibetti, P. Frassanito, C. Giovannelli, **L. Spuria**, C. D'Agostino, S. Tait, M.T. Capucchio, C. Marianelli. A mouse mastitis model to study the effects of the intramammary infusion of a foodgrade *Lactococcus lactis* strain. PLOS ONE, 12: e0184218, 2017.

### **Articoli pubblicati su riviste non attinenti al dottorato**

- M.T. Capucchio, S.A. Mignacca, M. Vitale, D. Tasca, **L. Spuria**, B. Amato, M. Fiasconaro, V. Di Marco Lo Presti. Polypoid nasal neofomations in sheep: pathological investigations. Small Ruminant Research, 126: 6-9, 2015.

## Lavori scientifici attinenti al dottorato

### Comunicazioni a congressi nazionali e internazionali

- **L. Spuria**, A. Di Blasio, C. Caruso, D. Bisanzio, E. Biasibetti, I. Biasato, M. Lamberti, P. Bianco, L. Masoero, A. Dondo, M.T. Capucchio. Mastiti dei piccoli ruminanti in Piemonte: rilievi microbiologici e istopatologici. Comunicazione orale, Atti XXII Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C. (Società italiana di patologia e allevamento degli ovini e dei caprini), Italia, Cuneo, 13-16 settembre 2016, p.108.
- C. Marianelli, S.A. Mignacca, S. Dore, **L. Spuria**, P. Zanghì, B. Amato, I. Duprè, F. Armas, E. Biasibetti, C. Camperio, S. Lollai, M.T. Capucchio, A.E. Cannas, V. Di Marco Lo Presti. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* in lactating ewes with subclinical and clinical mastitis: a promising new alternative for the treatment of mastitis? Comunicazione orale, Atti II International Summit on Probiotics Health and Nutraceuticals, USA, Baltimore, 07-09/09/2016, p. 25.
- **L. Spuria**, E. Biasibetti, G. Barberis, P. Bianco, C. Caruso, E. Chiavassa, A. Di Blasio, M. Gai Via, E. Grego, M. Lamberti, L. Masoero, D. Nucera, F. Valenza, S. Zoppi, A. Dondo, M.T. Capucchio. Mastitis in small ruminants: a diagnostic protocol correlating pathologic findings and infectious agents. Comunicazione orale, Atti XXVII Reunion SEAPV (Sociedad Espanola de Anatomia Patologica Veterinaria), Barcelona (Espana), 17-19/05/2015, p. 51.
- E. Biasibetti, G. Barberis, P. Bianco, C. Caruso, E. Chiavassa, A. Di Blasio, E. Grego, L. Masoero, **L. Spuria**, S. Zoppi, A. Dondo, M.T. Capucchio. Development of a diagnostic protocol for mastitis in goats Comunicazione orale, Atti del LXIX Convegno SISVET, Perugia, 15-17 giugno 2015, p. 306.
- E. Biasibetti, A. Cannas, M.T. Capucchio, V. Di Marco Lo Presti, S. Dore, S.A. Mignacca, **L. Spuria**, F. Armas, C. Marianelli. Small ruminant mastitis: epidemiological survey and pathological investigations. Comunicazione orale, Atti del LXVII Convegno Nazionale S.I.S.Vet., Brescia, 17-19/09/2013, p. 17.

### Poster a congressi nazionali e internazionali

- **L. Spuria**, F. Armas, C. Camperio, E. Biasibetti, P. Frassanito, C. Giovannelli, C. D'Agostino, M.T. Capucchio, C. Marianelli. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* in lactating mice: preliminary data. Poster, 2nd International Symposium on Alternatives to Antibiotics (ATA), Francia, Parigi, 12-15/12/2016, p. 73.
- D. De Meneghi, **L. Spuria**, E. Biasibetti, P. Robino, D. Bisanzio, C. Caruso, A. Di Blasio, P. Nebbia, I. Biasato, P. Bianco, M. Lamberti, L. Masoero, A. Dondo, M.T. Capucchio. Studies on potential agents of mastitis in udders from small ruminants regularly slaughtered in Piemonte Region, North-Western Italy (part I): microbiological and pathological findings. Poster, Atti Annual Scientific Conference and Annual General Meeting of the European College of Veterinary Public Health, Svezia, Uppsala, 26-28/09/2016, p. 49.

- P. Nebbia, P. Robino, D. De Meneghi, E. Biasibetti, **L. Spuria**, D. Bisanzio, C. Caruso, A. Di Blasio, I. Biasato, P. Bianco, M. Lamberti, L. Masoero, A. Dondo, M.T. Capucchio. Studies on potential agents of mastitis in udders from small ruminants regularly slaughtered in Piemonte Region, North-Western Italy (part II): evaluation of antimicrobial resistance. Poster, Atti Annual Scientific Conference and Annual General Meeting of the European College of Veterinary Public Health, Svezia, Uppsala, 26-28/09/2016, p. 50.
- **L. Spuria**, M. Sossella, S.A. Mignacca, B. Amato, E. Grego, C. Camperio, F. Armas, E. Biasibetti, I. Biasato, P. Barbero, S. Dore, A. Cannas, V. Di Marco Lo Presti, M.T. Capucchio, C. Marianelli. Evaluation of the interleukin (IL)-1b and IL-8 gene expression in healthy sheep udders infused with live *Lactococcus lactis*: preliminary data. Poster, Atti 34th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology (ESVP) & 27th Meeting of the European College of Veterinary Pathologists (ECVP), 07-10/09/2016, Italia, Bologna, p. 211.
- E. Biasibetti, **L. Spuria**, D. Bisanzio, I. Biasato, P. Bianco, C. Caruso, A. Di Blasio, M. Lamberti, L. Masoero, A. Dondo, M.T. Capucchio. Epidemiological studies on biological agents in macroscopically healthy small ruminant mammary glands. Poster, Atti 34th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology (ESVP) & 27th Meeting of the European College of Veterinary Pathologists (ECVP), 07-10/09/2016, Italia, Bologna, p. 122.
- A. Cannas, S. Dore, S. Lollai, I. Duprè, **L. Spuria**, F. Armas, E. Biasibetti, M.T. Capucchio, V. Deriu, A. Piras, P.A. Sechi, S. Amedeo, S. Mioletti, C. Marianelli. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* in lactating ewes with mastitis by Coagulase Negative Staphylococci: preliminary field study. Poster: Conference Antibiotic Alternatives for the New Millennium, London (United Kingdom), 05-07/11/2014, p. 27.

### **Lavori scientifici non attinenti al dottorato**

#### **Comunicazioni/poster a congressi nazionali e internazionali**

- I. Biasato, E. Biasibetti, **L. Spuria**, A. Schiavone, L. Gasco, C. Dall'Aglio, M.T. Capucchio. Histological, morphometric and histochemical findings in broiler chickens fed diets with insect meal inclusion. Poster, Atti 34th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology (ESVP) & 27th Meeting of the European College of Veterinary Pathologists (ECVP), 07-10/09/2016, Italia, Bologna, p. 146.
- M.T. Capucchio, E. Biasibetti, I. Biasato, P. Barbero, I. Bruni, **L. Spuria**, S. Mioletti, F. Foglietta, G. Querio, G. Durando, R. Canaparo, L. Serpe. Anticancer sonodynamic treatment with porphyrin compounds: insights on in vivo efficacy in a syngeneic rat model of cancer. Poster, Atti 34th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology (ESVP) & 27th Meeting of the European College of Veterinary Pathologists (ECVP), 07-10/09/2016, Italia, Bologna, p. 106.
- I. Biasato, E. Biasibetti, **L. Spuria**, L. Cavallarin, F. Gai, L. Gasco, A. Schiavone, M.T. Capucchio. Broiler chickens fed diets with *Tenebrio molitor* insect inclusion: histological and morphometric

- investigations. Comunicazione orale, Atti XXVIII Reunión SEAPV (Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria), Spagna, Còrdoba, 8-10/06/2016, p. 50.
- S.A. Mignacca, E. Biasibetti, **L. Spuria**, B. Amato, V. Di Marco Lo Presti, M. T. Capucchio. Cutaneous tumors in small ruminants: UV Ray exposure and Papillomavirus infection as potential risk factors. Poster, Atti BIT's 9th Annual World Cancer Congress 2016, Cina, Shanghai, 14-26/05/2016, p. 366.
  - V. Di Marco Lo Presti, B. Amato, A. Isgrò, A. Lena, S. Antoci, **L. Spuria**, S. Agnello, M. Vitale, S.A. Mignacca, M. Fiasconaro. Preliminary studies on paratuberculosis (PTB) in sheep and goats in Southern Italy: IV. Risk factors associated to PTB in Sicilian flocks (Italy). Presentazione orale, XXII International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants, Sassari, 17-20/6/2015, p. 147-151.
  - B. Amato, V. Di Marco Lo Presti, E. Gerace, F. Mandanici, E. Biasibetti, B. Boniotti, **L. Spuria**, F. Valenza, M.L. Pacciarini, M.T. Capucchio. Bovine tuberculosis in pigs: a case of *Mycobacterium caprae* infection. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (I.M.E.D.), Vienna (Austria), 31/10- 03/11/2014, p. 144.
  - B. Amato, S. Cucinotta, **L. Spuria**, G. Guarneri, S. Antoci, V. Di Marco Lo Presti, M.T. Capucchio. Cutaneous lesions in a bovine tuberculosis outbreak in fallow deer (*Dama dama*). Poster, Atti VI International *M. bovis* Conference, Cardiff (United Kingdom), 16-19/06/2014, p. 127.
  - S. Migliore, S. Agnello, **L. Spuria**, B. Chiappini, G. Vaccari, A. Altavilla, V. Di Marco Lo Presti, M. Vitale. Genetic Variability in the gene for PRNP in goat breeds of Sicily, Italy. Congresso PRION 2014, Trieste, 27-30/05/2014, p. 66.
  - B. Amato, M.T. Capucchio, S.A. Mignacca, S. Antoci, S. Cucinotta, M. Musicò, **L. Spuria**, M. Fiasconaro, V. Di Marco Lo Presti. Description of a case of generalized tuberculosis caused by *M. bovis* in a fallow deer. Poster, Atti VIII International Symposium on Wildlife, Leon (Spain), 31/10 - 03/11/2013, p. 150.
  - S.A. Mignacca, M.T. Capucchio, E. Biasibetti, G. Purpari, P. Di Marco, **L. Spuria**, S. Muscia, D. Tasca, L. Gallina, G. Casà, V. Di Marco Lo Presti, A. Guercio. Cutaneous neoformations associated with coinfection by orf virus and Orthopoxvirus in goats in Sicily. Poster, 31st Annual Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and The European College of Veterinary Pathologists, London (United Kingdom), 04-07 September 2013, p. 136.
  - S.A. Mignacca, M.T. Capucchio, B. Amato, E. Biasibetti, M. Russo, G. Niosi, **L. Spuria**, V. Di Marco Lo Presti, F. Guarda. Vestigia uracali nei piccoli ruminanti: indagine al mattatoio. Poster, Atti del XXI Congresso Nazionale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento degli Ovini e Caprini (S.I.P.A.O.C.), Foggia 9-12/09/2014, p. 199.

# Microbial agents in macroscopically healthy mammary gland tissues of small ruminants

Liliana Spuria<sup>1</sup>, Elena Biasibetti<sup>1</sup>, Donal Bisanzio<sup>2,3</sup>, Ilaria Biasato<sup>1</sup>, Daniele De Meneghi<sup>1</sup>, Patrizia Nebbia<sup>1</sup>, Patrizia Robino<sup>1</sup>, Paolo Bianco<sup>4</sup>, Michele Lamberti<sup>5</sup>, Claudio Caruso<sup>6</sup>, Alessia Di Blasio<sup>6</sup>, Simone Peletto<sup>6</sup>, Loretta Masoero<sup>6</sup>, Alessandro Dondo<sup>6</sup> and Maria Teresa Capucchio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Veterinary Sciences, University of Turin, Grugliasco, Italy

<sup>2</sup> Big Data Institute, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, c/o Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Oxford, United Kingdom

<sup>3</sup> Sacro Cuore Don Calabria Hospital, Negrar, Verona, Italy

<sup>4</sup> ASLTo4, ASL, Torino, Italy

<sup>5</sup> ASLCn1, ASL, Barge, Italy

<sup>6</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italy

## ABSTRACT

**Background.** Health of mammary glands is fundamental for milk and dairy products hygiene and quality, with huge impacts on consumers welfare.

**Methods.** This study aims to investigate the microbial agents (bacteria, fungi and lentiviruses) isolated from 89 macroscopically healthy udders of regularly slaughtered small ruminants (41 sheep, 48 goats), also correlating their presence with the histological findings. Multinomial logistic regression was applied to evaluate the association between lesions and positivity for different microbial isolates, animal age and bacteria.

**Results.** Twenty-five samples were microbiologically negative; 138 different bacteria were isolated in 64 positive udders. Coagulase-negative staphylococci were the most prevalent bacteria isolated (46.42%), followed by environmental opportunists (34.76%), others (10.14%) and pathogens (8.68%). Most mammary glands showed coinfections (75%). Lentiviruses were detected in 39.3% of samples. Histologically, chronic non-suppurative mastitis was observed in 45/89 glands, followed by chronic mixed mastitis (12/89) and acute suppurative mastitis (4/89). Only 28 udders were normal. Histological lesions were significantly associated with the animal species and lentiviruses and coagulase-negative staphylococci infections. Goats had significantly higher risk to show chronic mixed mastitis compared to sheep. Goats showed a significantly lower risk (OR = 0.26; 95% CI [0.06–0.71]) of being infected by environmental opportunists compared to sheep, but higher risk (OR = 10.87; 95% CI [3.69–37.77]) of being infected with lentiviruses.

**Discussion.** The results of the present study suggest that macroscopically healthy glands of small ruminants could act as a reservoir of microbial agents for susceptible animals, representing a potential risk factor for the widespread of acute or chronic infection in the flock.

**Subjects** Microbiology, Veterinary Medicine, Histology

**Keywords** Small ruminants, Microbiology, Histology, Healthy mammary gland

Submitted 21 June 2017  
Accepted 16 October 2017  
Published 13 November 2017

Corresponding author  
Elena Biasibetti,  
elena.biasibetti@unito.it

Academic editor  
Sabine Leonhard-Marek

Additional Information and  
Declarations can be found on  
page 14

DOI 10.7717/peerj.3994

© Copyright  
2017 Spuria et al.

Distributed under  
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

## INTRODUCTION

The importance of small dairy ruminants has significantly increased during last decades, especially in developing countries where they represent fundamental economic and social livelihoods of a large human population (*Oluwatayo & Oluwatayo, 2012*). In high income economies, they are also becoming an important alternative to supply dairy products for human consumption (*Lérias et al., 2014*).

Functionality and health of the mammary gland are fundamental for dairy farms and directly correlated with milk production, milk and dairy products hygiene and quality, and consequently farmers profits. Mastitis is the inflammation of the mammary gland characterized by an increase in the number of somatic cells in the milk and/or by pathological changes in the mammary tissue (*Schlafer & Foster, 2016*). It is generally caused by microbial agents invasion, mainly represented by bacteria, and in a small extent by mycoplasmas, viruses (Small Ruminant Lentivirus—SRLV), fungi and algae.

According to *Bergonier & Berthelot (2003a)*, mastitis is important from three perspectives. Firstly, there are economic implications, because of reduced growth of lambs and kids and their mortality, treatment costs, reduced milk production and milk prices dependent on cellular quality in particular areas. Furthermore, hygienic issues related to the risk of infection or intoxication of consumers by milk bacteria such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., etc can occur. Finally, the E.U. Directive 46/92 (modified by Directive 71/94), which defines the milk bacteriological quality, must be considered (*Bergonier et al., 2003b; Olechnowicz & Jaśkowski, 2014*). In sheep, mammary infections are also of great welfare concern (*European Food Safety Authority, 2009*), since clinical mastitis is a disease that leads to anxiety, restlessness, changes in feeding behavior and pain in affected ewes (*Fthenakis & Jones, 1990*). Even in subclinical mastitis, normal behavioral patterns of sheep are modified (*Gougoulis et al., 2008; Gougoulis, Kyriazakis & Fthenakis, 2010*), hence raising potential welfare concerns (*Gelasakis et al., 2015*).

Mastitis of small ruminants are commonly divided into clinical and subclinical forms. Clinical mastitis is the term used for inflammatory process of the mammary gland, mostly from bacterial infection, which is accompanied by overt clinical symptoms. These visible signs of clinical mastitis include swelling, redness or necrosis of one or more half udders and/or abnormal discharge of milk. Affected animals can also present with anorexia, fever or agalactia. Progression of clinical mastitis might be toxaemia and gangrenous necrosis of the udder (*Omaleki et al., 2011*), which could result in a fatal event. Conversely, subclinical mastitis is characterized by inflammation of the udder that can be diagnosed only by enumeration of inflammatory cells in milk or inflammatory markers evaluation (*White & Hinckley, 1999; Olechnowicz & Jaśkowski, 2014; Addis et al., 2016; Bramis et al., 2016*). Among the organisms associated with clinical mastitis, *Staphylococcus aureus* has been reported to be the most common in both meat and dairy ewes milk samples. *Mannheimia haemolytica*, *Escherichia coli* and various streptococci are other important causative organisms isolated from udder secretions (*Mørk et al., 2007; Smith et al., 2015; Arsenault et al., 2008; Dore et al., 2016*). Coagulase-negative staphylococci (CNS) are the

most prevalent bacteria isolated in subclinical mastitis of sheep and goats (*Contreras et al., 2007; Ergün et al., 2009; Onni et al., 2010; Addis et al., 2016; Bramis et al., 2016; Dore et al., 2016*), with a prevalence in dairy ewes ranging from 25 to 93%. On the contrary, they are less frequently observed in meat ewes (12–34%) (*Olechnowicz & Jaśkowski, 2014*). Small Ruminant Lentivirus infection has also been reported to be an important cause of chronic subclinical mastitis predisposing the gland to secondary infections (*Cutlip et al., 1985; Brodie et al., 1995; Arsenault et al., 2003; Arsenault et al., 2008*).

While the mammary gland is the specialized milk production organ, no studies about the microbiological flora isolated from healthy mammary gland tissue of small ruminants and, particularly, the correlation between microbiological data and histological findings are currently available.

For this reason the aim of the present study was to investigate the microbial agents (bacteria, fungi and SRLV) isolated from macroscopically healthy mammary parenchyma of regularly slaughtered small ruminants and to correlate their presence with the histological findings.

## MATERIALS & METHODS

### Sample collection

A total of 89 macroscopically healthy small ruminants udders ( $n = 41$  sheep—23 lactating and 18 non-lactating—and  $n = 48$  goats—36 lactating and 12 non-lactating) belonging to a total of 25 ovine and 27 caprine flocks, respectively, were collected between October 2013 and February 2016 in two slaughterhouses of northern Italy, Piedmont region. Animals enrolled in the study were slaughtered for different causes unrelated to the mammary glands involvement.

The sheep ranged in age from one to 15 years (median five) and were mainly Biellese ( $n = 20$ ; 48.8%) and cross-breed ( $n = 17$ ; 41.5%), with Frabosana ( $n = 2$ ; 4.9%), Lacaune ( $n = 1$ ; 2.4%) and Sambucana breed ( $n = 1$ ; 2.4%) being less represented. The goats ranged in age from 2 to 13 years (median 5.5) and were mainly Saanen ( $n = 13$ ; 27.1%) and cross-breed ( $n = 25$ ; 52.1%), with a lower prevalence of Camosciata delle Alpi breed ( $n = 10$ ; 20.8%). Animals were classified in three groups according to their age: the first group included 27 animals which were up to three years old ( $n = 14$  sheep and  $n = 13$  goats), the second group was composed of 44 animals aged from four to eight years ( $n = 20$  sheep and  $n = 24$  goats) and the third group was composed of 18 animals over eight years ( $n = 7$  sheep and  $n = 11$  goats).

Only udders considered free of clinical mastitis and any other alterations at gross examination (inspection and palpation for macroscopic signs of abnormalities) were included in this study.

After gross examination, all the udders were stored at 4 °C and transported to the laboratory of the Department of Veterinary Sciences of University of Turin. The skin of the udder was washed, dried and disinfected with cotton soaked with 70% alcohol. Two fragments of parenchyma of approximately 2.5 cm<sup>3</sup>, were collected in two different points and fixed in vials containing 10% neutral buffered formalin for histopathological

examination, one sample was frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  as tissue bank, and the remaining tissue was sent to the Istituto Zooprofilattico Sperimentale of Piemonte, Liguria and Valle d'Aosta (Turin) for bacteriological, mycological and virological investigations.

## Bacteriology

The udder surface was sterilized through cauterization and then cut using scalpel until the glandular tissue was exposed. A swab was inserted into the incision and then it was streaked on several agar plates. Columbia agar containing 5% sheep blood (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) and Chocolate agar (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) plates were used and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  aerobically and 5%  $\text{CO}_2$ -enriched atmosphere, respectively, for 24–48 h. Bacteria identification was carried out by phenotypic identification methods; for this purpose a growth-based automatic methods (Vitek 2 System; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) that measures either turbidity or colored products by various metabolic activities such as acidification, alkalization, enzyme hydrolysis, and growth in the presence of inhibitory substances was used. According to [Carter & Cole \(1990\)](#) it has been selected only the colonies numerically representative, in pure culture or showing phenotypically features as haemolysis. In order to obtain a clear interpretation of the results, a parallel control for the identification of inhibiting substances in the udders was performed. Therefore, two fragments of parenchyma were placed on an agar plate containing an inoculum of *Bacillus subtilis* and incubated aerobically for 24 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . The test was considered positive if a ring around the fragment, which indicates the inhibition of bacterial growth, was observed.

For the detection of *Mycoplasma* spp., a PPLO Selective Agar (Microbiol, Sardinia, Italy) was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ -enriched atmosphere. A pre-enrichment was performed in order to promote the isolation of *Mycoplasma* spp. In particular, a fragment of parenchyma was inoculated in PPLO Broth (Microbiol, Sardinia, Italy) and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ -enriched atmosphere. After 72 h, 0.1 ml of broth was inoculated on PPLO agar. *Mycoplasma*'s growth was monitored for 10 days by microscopic examination with the aim to identify any typical tiny “fried egg” or finely granular (“ground glass”) colonies that penetrate the agar surface.

Bacteria were classified in four groups:

- pathogens (PATO): according to the literature, pathogenic bacteria reported in clinical mastitis;
- coagulase-negative staphylococci (CNS): opportunistic bacteria reported in the normal skin microbial flora usually responsible for subclinical mastitis. Their pathogenicity is highly variable from asymptomatic to mild forms. Sporadic cases of clinical mastitis, especially in immunocompromised animals, are also described;
- environmental opportunists (EO): ubiquitous microorganisms detected in the gastroenteric tract, soil, water and bedding. Once penetrated within the udder, they are able, under particular conditions, to become pathogenic and cause mastitis of different severity;
- other microorganisms (OM): bacteria not isolated in clinical or subclinical mastitis.

## Mycology

Sabouraud agar plate (Biolife, Bolzano, Italy) was used for the isolation of several types of fungi and filamentous bacteria, directly streaking the swab, as previously described, on the surface on the plate. The plate was incubated for 10 days at room temperature. In case of growth of suspect colonies, a microscopic examination was carried on in order to obtain an identification at genus-level.

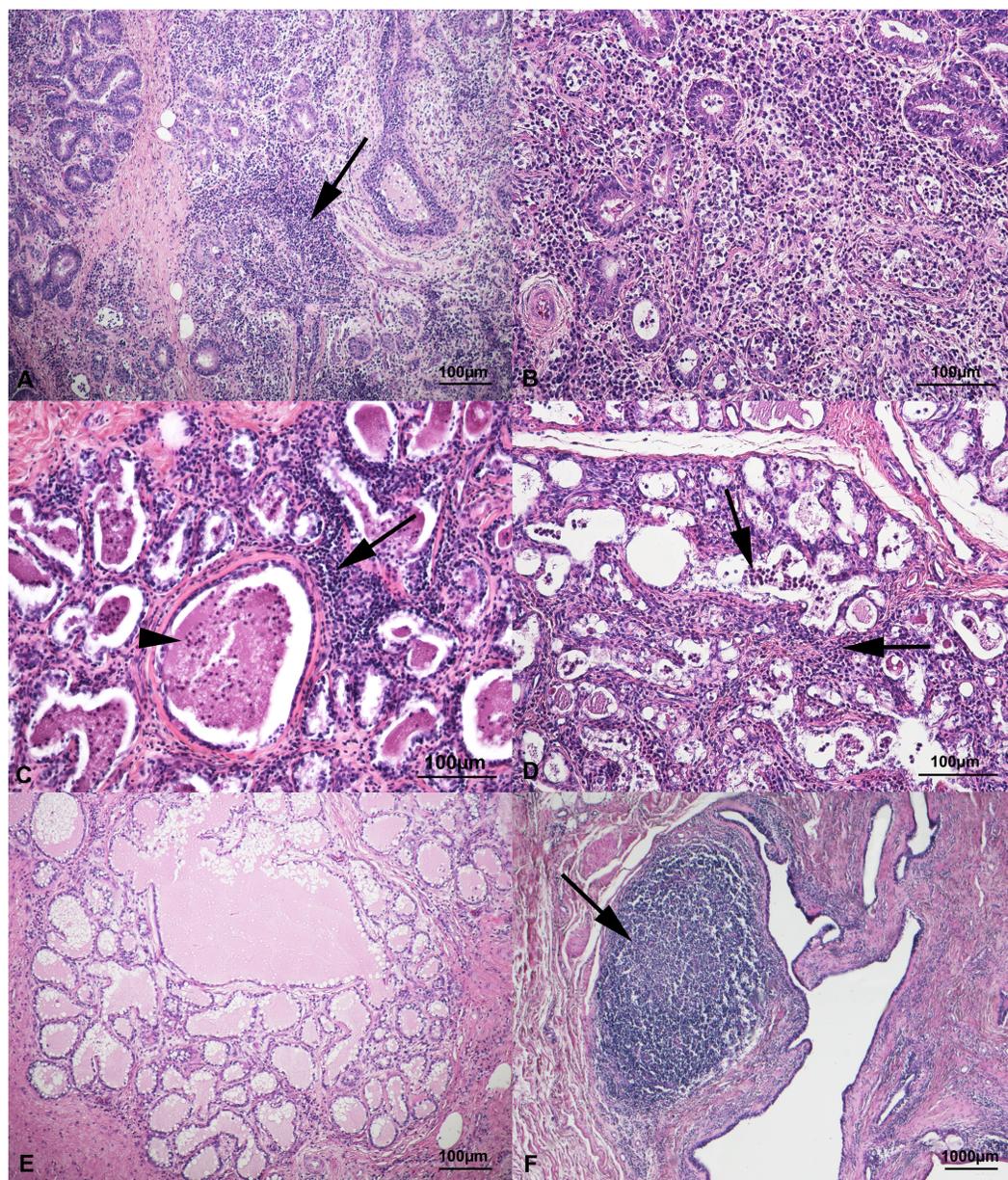
## Virology

For SRLV detection, DNA was extracted from 50–100 mg of udder tissue by using ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA), following manufacturer's instructions. DNA was amplified following a slightly modified version of the protocol described in [Grego et al. \(2007\)](#). Briefly, two forward degenerate primers, GAG F1 (5'-TGGTGARKCTAGMTAGAGACATGG-39) and GAG F2 (5'-CAAACWGTRGCAATG CAGCATGG-3'), and two reverse degenerate primers POL R1 (5'-CATAGGRGGHGCCGGA CGGCASCA-3') and POL R2 (5'-GCGGACGGCASCACACG-3') were selected, based on conserved regions ([Grego et al., 2007](#)). This primer set allows to detect all the different SRLV genogroups: SRLV group A (MVV—prototype-like strains), SRLV group B (CAEV—prototype-like strains) and also SRLV group E (Rocccaverano strains), a specific genogroup circulating in the studied area.

The first PCR reaction was carried out in a total volume of 50 µl containing 1X PCR Buffer (Platinum Taq DNA Polymerase; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.2 mM of dNTPs, 3 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µM of each primers, 1U Taq Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The PCR was performed under the following conditions: initial template denaturation step at 95 °C for 15 min; 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 1 min, and elongation at 72 °C for 2 min, followed by a final elongation step at 72 °C for 10 min. Second PCR was carried out in the same conditions (using primers GAG F2 and POL R2), with a lower annealing temperature (55 °C) for a total of 45 cycles. Amplification products were loaded and checked on a 2% agarose gel. Moreover, to reach 100% specificity, all nested PCR amplicons of expected sizes were directly sequenced on an ABI 3130 genetic analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and generated sequences were submitted to a Blast search for confirmation.

## Histology

Formalin fixed fragments of parenchyma were paraffin embedded and cut at 5 µm thickness sections. The sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) and examined by light microscope at different magnifications. Microscopically, lesions were classified as negative when they showed a normal pattern; affected by chronic non-suppurative mastitis when they showed interstitial and/or alveolar mononuclear inflammatory cells (lymphocytes, plasmacells, macrophages) and mild to severe fibrosis; affected by chronic mixed mastitis when they showed interstitial and/or alveolar mononuclear inflammatory cells and a variable number of neutrophils; affected by acute suppurative mastitis when they showed interstitial and/or alveolar neutrophils ([Fig. 1](#)).



**Figure 1** Histological findings in healthy mammary glands of small ruminants. (A) Chronic non suppurative mastitis characterized by interstitial (arrow) and alveolar mononuclear inflammatory cells (lymphocytes, plasmacells and macrophages). Haematoxylin & Eosin (H&E) stain. (B) Particular of the mononuclear inflammation in chronic non-suppurative mastitis. H&E stain. (C) Chronic mixed mastitis with interstitial mononuclear inflammatory cells (arrow) and alveolar neutrophils (arrowhead). H&E stain. (D) Acute suppurative mastitis characterized by interstitial and alveolar neutrophils (arrows). H&E stain. (E) A normal mammary tissue. H&E stain. (F) Small Ruminant Lentiviruses positive mammary gland with wide and focal hyperplastic lymphoid follicle (arrow) around a lactiferous duct. H&E stain.

Full-size  DOI: [10.7717/peerj.3994/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.3994/fig-1)

## Statistical analysis

Multinomial logistic regression performed using generalized linear mixed model (GLMM) was applied to evaluate the association among the histological findings, infection and animal attributes. The GLMM included as covariates the positivity for CNS, EO, PATO and SRLV to investigate relationship between infection status and histological lesions. The animal attributes included in GLMM were age and species which could be linked with histological lesions. Each analyzed udder was considered positive or negative for each investigated agent if one of its isolate showed positivity during laboratory tests.

A logistic regression, adjusted for animal age and presence of each bacteria class, was performed to investigate relationship between presence of follicles at histological examination and infections of SRLV. This model was adjusted for infection of bacterial groups (EO, CNS), age and species. The possible effect of age, species and SRLV positivity on colonization of udder by CNS, EO was tested with a series of logistic regressions performed using GLMM. Given the low number of udders showing positivity to PATO, it was not possible to perform such investigation for this class of bacteria. All regression models contained farm as random effect to adjust for sampling more individuals from same farm.

## RESULTS

Among the 89 macroscopically healthy udders, 25/89 (28.09%; sheep = 6; goats = 19) were microbiologically negative, while at least one bacterial species was isolated in the remaining 64/89 (71.91%; sheep = 35; goats = 29). In the positive udders, 138 different bacterial species were isolated. The bacterial species isolated from udders of sheep and goats are reported in [Table 1](#).

Coagulase-negative staphylococci (CNS) were the most prevalent bacteria isolated from both goats and sheep. Among the 138 isolated bacteria, 64 (46.42%) belonged to this group. The detail of the species isolated are summarized in [Table 1](#).

Environmental opportunists were the second most frequently identified bacterial group (48/138; 34.76%). *Aerococcus viridans* was the predominant strain in both species being isolated in 29 samples and thus representing 21.01% of the total isolates. A total of 14/138 microorganisms (10.14%) were classified as “other microorganisms”. The most frequent microorganisms were *Acinetobacter lwoffii* and *Kocuria rosea*, with three cases each (2.17%). Pathogen bacteria were isolated in a lower percentage (12/138 samples; 8.68%). *Staphylococcus aureus* was found in 5 cases (3.62%), while *Streptococcus uberis* was identified in 4 (2.9%). *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* represented the 0.72% of isolated strains.

Co-infections has been detected in 48/64 (75%) of the mammary glands; specifically, co-infections caused by two (42.2%) and three (26.5%) different bacterial species were demonstrated in 27/48 and 17/48 samples respectively. Four bacterial species (4.7%) were identified in 3/48 samples and five (1.6%) were found in 1/48 udder only. Only the 25% (16/64) of the positive udders were characterized by a single infection.

In four udders (4.5%) inhibiting substances were identified. Only one *Aspergillus* spp. (1.1%) grew on Sabouraud agar plate.

**Table 1** Number and frequency of bacterial species isolated.

Microorganisms	Species	Isolates n°	%	Sheep	Goats
Pathogens					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	3.62%	3	2
	<i>Streptococcus uberis</i>	4	2.90%	2	2
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	0.72%	1	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0.72%	0	1
	<i>Escherichia coli</i>	1	0.72%	0	1
	Total of group	12	8.68%	6	6
Coagulase-negative staphylococci					
	<i>Staphylococcus arlettae</i>	2	1.46%	2	0
	<i>Staphylococcus auricularis</i>	5	3.62%	2	3
	<i>Staphylococcus capitis</i>	1	0.72%	0	1
	<i>Staphylococcus caprae</i>	7	5.07%	0	7
	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2	1.46%	2	0
	<i>Staphylococcus cohnii</i>	2	1.46%	1	1
	<i>Staphylococcus equorum</i>	7	5.07%	4	3
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	1.46%	1	1
	<i>Staphylococcus kloosii</i>	1	0.72%	1	0
	<i>Staphylococcus lentus</i>	1	0.72%	1	0
	<i>Staphylococcus muscae</i>	2	1.46%	1	1
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	2	1.46%	1	1
	<i>Staphylococcus simulans</i>	2	1.46%	1	1
	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	4	2.90%	3	1
	<i>Staphylococcus warneri</i>	5	3.62%	3	2
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	18	13.04%	9	9
	<i>Staphylococcus</i> spp.	1	0.72%	0	1
	Total of group	64	46.42%	32	32
Environmental opportunists					
	<i>Aerococcus viridans</i>	29	21.01%	19	10
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3	2.17%	3	0
	<i>Aeromonas sobria</i>	1	0.72%	1	0
	<i>Bacillus pumilus</i>	6	4.34%	1	5
	<i>Escherichia coli</i>	2	1.46%	1	1
	<i>Enterococcus cecorum</i>	1	0.72%	1	0
	<i>Enterococcus durans</i>	1	0.72%	0	1
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0.72%	0	1
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	1.46%	2	0
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	0.72%	0	1
	<i>Streptococcus constellatus</i>	1	0.72%	1	0
	Total of group	48	34.76%	29	19

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Microorganisms	Species	Isolates n°	%	Sheep	Goats
Other microorganisms					
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	3	2.17%	1	2
	<i>Acinetobacter genomospecies</i>	1	0.72%	0	1
	<i>Acinetobacter</i> spp.	1	0.72%	0	1
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	2	1.46%	2	0
	<i>Bordetella trematum</i>	1	0.72%	1	0
	<i>Kocuria rosea</i>	3	2.17%	3	0
	<i>Paenibacillus</i> spp.	1	0.72%	0	1
	<i>Vagococcus fluvialis</i>	2	1.46%	1	1
	Total of group	14	10.14%	8	6
Total		138	100%	75	63

Small Ruminant Lentivirus infection was detected in 35/89 samples (39.3%). Most of them were isolated along with bacteria (21/35; 60%). Goats were more infected than sheep (29/35; 82.9% versus 6/35; 17.1%).

Histologically, 45/89 udders showed chronic non-suppurative mastitis (50.56%; sheep  $n = 17$  and goat  $n = 28$ ), 12 chronic mixed mastitis (13.48%; sheep  $n = 2$  and goat  $n = 10$ ), four acute suppurative mastitis (4.5%; sheep  $n = 1$  and goat  $n = 3$ ) and 28 did not show any lesions (31.46%; sheep  $n = 21$  and goat  $n = 7$ ).

In chronic mastitis the inflammatory cells were mainly located in the interstitium; alveolar neutrophils were detected in mixed (66%) or suppurative (100%) mastitis only. However necrosis and loss of the alveolar epithelium were never observed.

Microbiological and histological findings observed in the present study are reported in Table 2. In chronic non-suppurative mastitis, mixed mastitis and normal mammary glands, coagulase-negative staphylococci and environmental opportunists were the most frequently detected bacteria. On the contrary, acute suppurative mastitis showed a greater number of pathogenic microorganisms. Microbial agents were absent in 19/28 normal mammary glands only.

Within SRLV positive udders, 25/35 (71.5%) showed a chronic non-suppurative mastitis (Figs. 1A, 1B); 8/35 (22.9%) had a chronic mixed mastitis (Fig. 1C); 1/35 (2.8%) showed an acute suppurative mastitis (Fig. 1D) and only 1/35 (2.8%) did not show any lesions (Fig. 1E). Lentiviruses positive udders (68.6%; 24/35) revealed scattered hyperplastic lymphoid follicles throughout the parenchymal tissue and particularly around the lactiferous ducts (Fig. 1F).

Histological lesions were significantly associated to species and SRLV and CNS infections. Small Ruminant Lentivirus positive udders had significantly high risk to show both chronic mixed mastitis and chronic non-suppurative mastitis at histological examination (Table 3). Goats had significant higher risk to show chronic mixed mastitis compared to sheep (Table 3). CNS infection significantly increased the risk of chronic non-suppurative mastitis. Presence of PATO did not increase the risk of presenting one particular histological lesion (Table 3). Lentiviruses positive udders also showed a 12.3 (95% CI [3.8–45.2];  $p < 0.01$ ) times higher risk to have lymphoid follicles at histological examination. Goats

**Table 2** Summary of bacterial species identified within each histological type of mastitis.

Histological type of mastitis	Bacteriological data					Virological data
	PATO	CNS	EO	OM	Negative	SRLV
<b>Chronic non-suppurative mastitis</b>	6	34	22	8	13	25
Sheep	3	14	11	2	2	5
Goat	3	20	11	6	11	20
<b>Chronic mixed mastitis</b>	2	10	8	0	3	8
Sheep	1	2	3	0	0	0
Goat	1	8	5	0	3	8
<b>Acute suppurative mastitis</b>	3	1	2	0	1	1
Sheep	1	0	1	0	0	0
Goat	2	1	1	0	1	1
<b>Negative</b>	1	19	16	6	8	1
Sheep	1	16	14	6	4	1
Goat	0	3	2	0	4	0

**Notes.**

PATO, Pathogens; CNS, Coagulase-negative staphylococci; EO, Environmental opportunists; OM, Other microorganisms; SRLV, Small Ruminant Lentiviruses.

**Table 3** Results from multinomial logistic regression applied to evaluate association among histological lesions in mammary gland of goat/sheep and bacterial infection, SRLV infection, age and species. Udders without sign of histological lesions were set as reference class for the multinomial regression.

Covariate	Chronic mixed mastitis [OR (95% CI)]	Chronic non-suppurative mastitis [OR (95% CI)]
Caprine (Ref: Ovine)	13.7 (1.75, 34.1)*	5.21 (0.83, 17.1)
Age (Ref: 1–3 years of age):		
4–8 years of age	3.14 (0.46, 22.65)	2.21 (0.74, 12.19)
>8 years of age	1.32 (0.14, 10.46)	0.82 (0.15, 4.42)
EO	2.61 (0.46, 17.16)	2.18 (0.41, 4.79)
CNS	7.25 (0.59, 22.10)	6.72 (1.83, 28.51)*
PATO	9.21 (0.68, 25.67)	7.8 (0.56, 16.71)
SRLV	47.5 (3.15, 80.16)**	43.52 (4.30, 104.52)**

**Notes.**

\* $p < 0.05$ .

\*\* $p < 0.01$ .

EO, Environmental opportunists; CNS, Coagulase-negative staphylococci; PATO, Pathogens; SRLV, Small Ruminant Lentivirus.

had significant lower risk to be infected by EO compared to sheep (Table 4), but higher risk of being positive for SRLV (Table 5). Age and co-infections did not show any effects on bacterial or viral infections (Table 4).

## DISCUSSION

This is the first study investigating the presence of microbial agents and histological features in macroscopically healthy mammary glands of small ruminants.

Coagulase-negative staphylococci prevail, (64/138; 46.42%), in agreement with the literature. Already *Bergonier et al. (2003b)* reported a CNS prevalence in subclinical

**Table 4** Results from logistic regressions applied to evaluate factors in mammary gland of sheep/goat which can favour infection of CNS and EO.

Covariate	CNS [OR (95% CI)]	EO [OR (95% CI)]
Caprine (Ref: Ovine)	0.12 (0.32, 4.2)	0.26 (0.06, 0.71)*
Age (Ref: 1–3 years of age):		
4–8 years of age	1.25 (0.61, 3.32)	1.27 (0.27, 3.805)
>8 years of age	1.34 (0.48, 5.76)	2.09 (0.38, 7.45)
EO	2.16 (0.79, 4.98)	–
CNS	–	3.51 (0.59, 5.31)
PATO	1.23 (0.21, 4.67)	2.31 (0.42, 6.34)
SRLV	1.52 (0.42, 3.78)	2.97 (0.60, 4.24)

**Notes.**\* $p < 0.05$ .\*\* $p < 0.01$ .

EO, Environmental opportunists; CNS, Coagulase-negative staphylococci; PATO, Pathogens; SRLV, Small Ruminant Lentivirus.

**Table 5** Results from logistic regressions applied in mammary gland of goat/sheep to evaluate factors that can favour SRLV infection.

Covariate	CNS [OR (95% CI)]
Caprine (Ref: Ovine)	10.87 (3.69, 37.77)**
Age (Ref; 1–3 years of age):	
4–8 years of age	0.66 (0.18, 2.33)
>8 years of age	0.46 (0.11, 1.82)
EO	1.67 (0.41, 3.29)
CNS	1.15 (0.58, 5.18)
PATO	0.67 (0.34, 4.89)

**Notes.**\* $p < 0.05$ .\*\* $p < 0.01$ .

EO, Environmental opportunists; CNS, Coagulase-negative staphylococci; PATO, Pathogens.

mastitis ranging from 25 to 93%. Similar results (42.9%) were recently observed also in Portugal in milk samples from clinically affected sheep udders (Queiroga, 2017), in Iran in subclinical ovine mastitis (Narenji Sani, Mahdavi & Moezifar, 2015), in Greece in dairy goats (Gelasakis et al., 2016) and in Italy in both species (Dore et al., 2016). The identification of *Staphylococcus xylosus* in sheep and *Staphylococcus caprae* in goats is also in agreement with the literature (Bergonier et al., 2003b; Contreras et al., 2007; Ergün et al., 2009), while *Staphylococcus equorum* was isolated only by Hariharan et al. (2004) in sheep and by Contreras et al. (2003) in goats. Differently from previous studies reporting a common isolation (Bergonier et al., 2003b; Contreras et al., 2007), *Staphylococcus chromogenes* was observed in two samples only. According to the literature (Contreras et al., 2007; Gelasakis et al., 2015), the other species of CNS identified in the present research were observed with a lower frequency (Table 1).

The role of OM in the epidemiology of small ruminants mastitis is still unclear. Only *Aerococcus viridans* and *Enterococcus* spp. have previously been described as a sporadic

cause of mammary infection in sheep and goats (Clements, Taylor & Fitzpatrick, 2003; Marogna et al., 2012; Queiroga, 2017).

Goats had a significant lower risk to be infected by EO compared to sheep. Since EO prevalence increases when deficiencies in mechanical milking system or milking hygiene in small ruminants flocks (particularly in sheep flocks) occur, milking routines as well as milking equipment must be improved and periodically checked.

The low rate of fungi isolation *Aspergillus* spp. (1.1%) can be related to their common detection in clinical mastitis (Bergonier et al., 2003b), while the present study reports the isolation in macroscopically unaffected tissues.

The SRLV identification (35/89; 39.3%) agrees with the literature (Fras et al., 2013). Our work also showed that SRLV were more likely detected in goat udders than sheep (29/35; 82.9% versus 6/35; 17.1%). The high prevalence of SRLV infection in goats could be caused by the horizontal transmission with colostrum and milk. Indeed, in sheep industry, lambs usually suckle milk from their dam. On the contrary, kids are separated from mothers at birth, housed together, and hand-fed colostrum and milk, often from a common pool. So, a SRLV presence in the mammary tissue of a single animal may infect all the young animals. This occurrence has been reported to be the most reliable reason for the high prevalence of CAEV infection in goats in Western Europe, Australia, and North America (Narayan & Cork, 1985; Fras et al., 2013).

Small Ruminant Lentivirus infections have been associated with a spectrum of immune-mediated diseases and opportunistic infections (Brodie et al., 1995). In goats, several studies observed that SRLV infected animals appear to be more predisposed to subclinical bacterial infections by non-haemolytic staphylococci (Smith & Cutlip, 1988; Ryan, Greenwood & Nicholls, 1993). Also in the present study, goats showed a significant higher risk to show chronic mixed mastitis compared to sheep.

In sheep, *in vivo* relationship between SRLV and bacteria is not known, but previous *in vitro* studies provided evidence for increased bacterial adherence and decreased phagocytosis in macrophages infected by SRLV (Monleón et al., 1997). In the present study, chronic mastitis observed in SRLV positive udders is frequently associated with CNS and EO infections. Although the SRLV positive samples showed a significantly higher risk to be affected by both mixed and non-suppurative mastitis, co-infections did not show any effects on the virus detection.

Despite the udders considered in the present study being macroscopically healthy, the absence of lesions at the histological screening was observed in 28 samples only. The remaining 61 udders showed different types of mastitis; most of them were chronic (64%) and mild in severity. Mild to severe fibrosis was observed in all the samples (28%: slight; 25.8%: moderate; 46%: severe). However, this finding cannot be related to the chronicity of the disease only, because the ratio between parenchyma and stroma shows individual proportions and changes during the different phases of the reproductive cycle of the animals and of the lactation cycle (Lérias et al., 2014). The mastitis chronicity was mainly evaluated on the basis of the inflammatory cells type, diagnosing a chronic mastitis when the exudate was composed by macrophages, histiocytes and plasmacells. An interesting finding is represented by the identification of these non-suppurative cells mainly in the

interstitium; alveolar and ductal cells (neutrophils) were detected in mixed or suppurative mastitis only. In these udders, an increased number of desquamated cells was also observed in the alveoli.

The correlation between microbiological and histological findings suggests that the animals in which CNS were isolated had a significantly increased risk to develop a chronic non-suppurative mastitis. There were no other significant correlations. However, in acute suppurative mastitis pathogen bacteria were always isolated, except in one case in which the identification of inhibiting substances justifies a negative microbiological examination (*Zavanella, 2011*).

At histological examination, SRLV positive udders revealed scattered hyperplastic lymphoid follicles. Indeed, SRLV generally causes indurative and non-suppurative mastitis characterized by periacinar interstitial diffuse mononuclear cell infiltration, interstitial intense fibrosis and hyperplastic lymphoid follicle formation scattered throughout the parenchymal tissue particularly around the lactiferous ducts (*Van der Molen, Vecht & Houwers, 1985; Brodie et al., 1995; Monleón et al., 1997*). Eleven animals affected by chronic non-suppurative mastitis and bacteriologically negative were positive for SRLV, thus confirming the role of SRLV in subclinical chronic mastitis (*Plummer & Plummer, 2012*). The statistical model results further support this result.

## CONCLUSIONS

The results of the present study demonstrate that macroscopically unaffected glands of small ruminants do not represent a sterile substrate, but may be a reservoir of microbial agents whose role remains to be better evaluated. The detection of a large number of bacterial species improves the current knowledge of the species capable of colonizing and potentially infecting mammary glands of small ruminant. Many bacteria are able, at least temporarily, to be sequestered inside the mammary tissue. This ability might be one of the mechanisms that these bacterial species adopt to by-pass host defenses and treatments, allowing them to persist within individuals and the flock.

Therefore, from a flock management perspective, small ruminants with subclinical chronic mastitis have a potential risk to develop acute or chronic clinical disease. Given the paucity of the sample size of our data, the magnitude of risk cannot be determined from the current study. The high number of EO and OM suggests the need to develop and apply procedures for controlling microbial and environmental contamination and consequently to improve hygiene and quality of milk and dairy products and finally the consumers' welfare.

Despite some histological lesions being associated with SRLV and CNS infections (hyperplastic lymphoid follicles and non-suppurative mastitis), it seems difficult to correlate each histological pattern with specific microbial isolation.

Possible future investigations could aim to screen macroscopically affected mammary glands in order to evaluate the relationships between the isolated biological agents in clinical acute and chronic mastitis with histological patterns.

## ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

### Funding

This work was partially funded by the Italian Ministry of Health, grant number RF-2010-237304 and by University of Torino (grant number CAPM\_RIC\_LOC\_15\_01). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

Italian Ministry of Health: RF-2010-237304.

University of Torino: CAPM\_RIC\_LOC\_15\_01.

### Competing Interests

Liliana Spuria, Elena Biasibetti, Ilaria Biasato, Daniele De Meneghi, Patrizia Nebbia, Patrizia Robino, and Maria Teresa Capucchio are employees of the University of Torino. Donal Bisanzio is an employee of the Big Data Institute, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, c/o Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Oxford, United Kingdom. Claudio Caruso, Alessia Di Blasio, Loretta Masoero, and Alessandro Dondo are working in the IZS of Torino. Paolo Bianco is an employee of ASLTo4, Torino, Italy. Michele Lamberti is an employee of 4ASLCn1, Cuneo, Italy.

### Author Contributions

- Liliana Spuria and Elena Biasibetti conceived and designed the experiments, performed the experiments, wrote the paper, prepared figures and/or tables.
- Donal Bisanzio analyzed the data, wrote the paper, prepared figures and/or tables, reviewed drafts of the paper.
- Ilaria Biasato performed the experiments, prepared figures and/or tables.
- Daniele De Meneghi, Patrizia Nebbia, Patrizia Robino, Loretta Masoero and Alessandro Dondo conceived and designed the experiments, contributed reagents/materials/analysis tools, reviewed drafts of the paper.
- Paolo Bianco and Michele Lamberti contributed to sample collection.
- Claudio Caruso and Alessia Di Blasio performed the experiments, wrote the paper, prepared figures and/or tables.
- Simone Peletto reviewed drafts of the paper.
- Maria Teresa Capucchio conceived and designed the experiments, performed the experiments, contributed reagents/materials/analysis tools, wrote the paper, reviewed drafts of the paper.

### Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

The raw data has been provided as [Data S1](#).

## Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.3994#supplemental-information>.

## REFERENCES

- Addis MF, Tedde V, Dore S, Pisanu S, Puggioni GM, Roggio AM, Pagnozzi D, Lollai S, Cannas EA, Uzzau S. 2016. Evaluation of milk cathelicidin for detection of dairy sheep mastitis. *Journal of Dairy Science* **99**:6446–6456 DOI 10.3168/jds.2015-10293.
- Arsenault J, Dubreuil P, Higgins R, Bélanger D. 2008. Risk factors and impacts of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in Quebec, Canada. *Preventive Veterinary Medicine* **87**:373–393 DOI 10.1016/j.pvetmed.2008.05.006.
- Arsenault J, Girard C, Dubreuil P, Daignault D, Galarneau JR, Boisclair J, Simard C, Bélanger D. 2003. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Preventive Veterinary Medicine* **59**:67–81 DOI 10.1016/S0167-5877.
- Bergonier D, Berthelot X. 2003a. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science* **79**:1–16 DOI 10.1016/S0301-6226(02)00145-8.
- Bergonier D, De Crémoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. 2003b. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research* **34**:689–716 DOI 10.1051/vetres:2003030.
- Bramis G, Gelasakis AI, Kioussis E, Banos G, Arsenos G. 2016. Predisposing factors and control of bacterial mastitis in dairy ewes. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* **67**:211–222.
- Brodie SJ, Pearson LD, Zink MC, Bickle HM, Anderson BC, Marcom KA, DeMartini JC. 1995. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. *American Journal of Pathology* **146**:250–263.
- Carter GR, Cole JR. 1990. *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. San Diego: Academic Press.
- Clements AC, Taylor DJ, Fitzpatrick JL. 2003. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. *Journal of Dairy Research* **70**:139–148 DOI 10.1017/S0022029903006022.
- Contreras A, Luengo C, Sánchez A, Corrales JC. 2003. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livestock Production Science* **79**:273–283 DOI 10.1016/S0301-6226(02)00172-0.
- Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, Gonzalo C. 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research* **68**:145–153 DOI 10.1016/j.smallrumres.2006.09.011.
- Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Brogden KA, Bolin SR. 1985. Mastitis associated with ovine progressive pneumonia virus infection in sheep. *American Journal of Veterinary Research* **46**:326–328.

- Dore S, Liciardi M, Amatiste S, Bergagna S, Bolzoni G, Caligiuri V, Cerrone A, Farina G, Montagna CO, Saletti MA, Scatassa ML, Sotgiu G, Cannas EA. 2016. Survey on small ruminant bacterial mastitis in Italy, 2013–2014. *Small Ruminant Research* 141:91–93 DOI 10.1016/j.smallrumres.2016.07.010.
- Ergün Y, Aslantaş Ö, Doğruer G, Kireççi E, Saribay MK, Ateş CT, Ülkü A, Demir C. 2009. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi dairy ewes in southern Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 33:477–483 DOI 10.3906/vet-0803-23.
- European Food Safety Authority. 2009. Scientific opinion on welfare of dairy cows in relation to udder problems based on a risk assessment with special reference to the impact of housing, feeding, management and genetic selection. *EFSA JOURNAL* 1141:1–60.
- Fras M, Leboeuf A, Labrie FM, Laurin MA, Singh Sohal J, L’Homme Y. 2013. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in mixed flocks: multiple evidence of dual infection and natural transmission of types A2 and B1 between sheep and goats. *Infection, Genetics and Evolution* 19:97–104 DOI 10.1016/j.meegid.2013.06.019.
- Fthenakis GC, Jones JE. 1990. The effect of inoculation of coagulase-negative Staphylococci into the ovine mammary gland. *Journal of Comparative Pathology* 102:211–219 DOI 10.1016/S0021-9975(08)80126-0.
- Gelasakis AI, Angelidis AS, Giannakou R, Filioussis G, Kalamaki MS, Arsenos G. 2016. Bacterial subclinical mastitis and its effect on milk yield in low-input dairy goat herds. *Journal of Dairy Science* 99:3698–3708 DOI 10.3168/jds.2015-10694.
- Gelasakis AI, Mavrogianni VS, Petridis IG, Vasileiou NGC, Fthenakis GC. 2015. Mastitis in sheep—the last 10 years and the future of research. *Veterinary Microbiology* 181:136–146 DOI 10.1016/j.vetmic.2015.07.009.
- Gougoulis DA, Kyriazakis I, Fthenakis GC. 2010. Diagnostic significance of behaviour changes of sheep: a selected review. *Small Ruminant Research* 92:52–56 DOI 10.1016/j.smallrumres.2010.04.018.
- Gougoulis DA, Kyriazakis I, Papaioannou N, Papadopoulos E, Taitzoglou IA, Fthenakis GC. 2008. Subclinical mastitis changes the patterns of maternal—off-spring behaviour of dairy sheep. *The Veterinary Journal* 176:378–384 DOI 10.1016/j.tvjl.2007.02.024.
- Grego E, Bertolotti L, Quasso A, Profiti M, Lacerenza D, Muz D, Rosati S. 2007. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *Journal of General Virology* 88:3423–3427 DOI 10.1099/vir.0.83292-0.
- Hariharan H, Donachie W, Macaldowie C, Keefe G. 2004. Bacteriology and somatic cell counts in milk samples from ewes on a Scottish farm. *Canadian Journal of Veterinary Research* 68:188–192.
- Lérias JR, Hernández-Castellano LE, Suárez-Trujillo A, Castro N, Poulis A, Almeida AM. 2014. The mammary gland in small ruminants: major morphological and

- functional events underlying milk production—a review. *Journal of Dairy Research* **81**:304–318 DOI [10.1017/S0022029914000235](https://doi.org/10.1017/S0022029914000235).
- Marogna G, Pilo C, Vidili A, Tola S, Schianchi G, Leori SG. 2012.** Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis. *Small Ruminant Research* **102**:74–83 DOI [10.1016/j.smallrumres.2011.08.013](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.08.013).
- Monleón E, Pacheco MC, Luján L, Bolea R, Luco DF, Vargas MA, Alabart JL, Badiola JJ, Amorena B. 1997.** Effect of *in vitro* maedi-visna virus infection on adherence and phagocytosis of staphylococci by ovine cells. *Veterinary Microbiology* **57**:13–28 DOI [10.1016/S0378-1135\(97\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00080-1).
- Mørk T, Waage S, Tollersrud T, Kvitle B, Sviland S. 2007.** Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. *Acta Veterinaria Scandinavica* **49**:23 DOI [10.1186/1751-0147-49-23](https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-23).
- Narayan O, Cork LC. 1985.** Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Reviews of Infectious Diseases* **7**:89–98 DOI [10.1093/clinids/7.1.89](https://doi.org/10.1093/clinids/7.1.89).
- Narenji Sani R, Mahdavi A, Moezifar M. 2015.** Prevalence and etiology of subclinical mastitis in dairy ewes in two seasons in Semnan province, Iran. *Tropical Animal Health and Production* **47**:1249–1254 DOI [10.1007/s11250-015-0855-y](https://doi.org/10.1007/s11250-015-0855-y).
- Olechnowicz J, Jaśkowski JM. 2014.** Mastitis in small ruminants. *Medycyna Weterynaryjna* **70**:67–72 DOI [10.1016/j.smallrumres.2006.09.011](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.011).
- Oluwatayo IB, Oluwatayo TB. 2012.** Small ruminants as a source of financial security: a case study of women in rural Southwest Nigeria. Institute for Money, Tecnology and Financial Inclusion (IMTFI), Working Paper 2012-2. Available at [https://www.imtfin.uci.edu/files/blog\\_working\\_papers/2012-2\\_oluwatayo.pdf](https://www.imtfin.uci.edu/files/blog_working_papers/2012-2_oluwatayo.pdf).
- Omaleki L, Browning GF, Allen JL, Barber SR. 2011.** The role of Mannheimia species in ovine mastitis. *Veterinary Microbiology* **153**:67–72 DOI [10.1016/j.vetmic.2011.03.024](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.024).
- Onni T, Sanna G, Cubeddu GP, Marogna G, Lollai S, Leori G, Tola S. 2010.** Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and gap genes. *Veterinary Microbiology* **144**:347–352 DOI [10.1016/j.vetmic.2010.01.016](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.016).
- Plummer PJ, Plummer C. 2012.** Diseases of the Mammary Gland. In: Pugh DG, Baird N, eds. *Sheep and goat medicine*. Maryland Heights: Elsevier Saunders, 442–465.
- Queiroga MC. 2017.** Prevalence and aetiology of sheep mastitis in Alentejo region of Portugal. *Small Ruminant Research* **153**:123–130 DOI [10.1016/j.smallrumres.2017.06.003](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.06.003).
- Ryan DP, Greenwood PL, Nicholls PJ. 1993.** Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk cell count and N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase activity in dairy goats. *Journal of Dairy Research* **60**:299–306 DOI [10.1017/S0022029900027643](https://doi.org/10.1017/S0022029900027643).
- Schlafer DH, Foster RA. 2016.** Female genital system. In: Grant Maxie M, ed. *Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals*. St Louis: Elsevier, 358–464.
- Smith MC, Cutlip R. 1988.** Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **193**:63–67.

- Smith EM, Willis ZN, Blakeley M, Lovatt F, Purdy KJ, Green LE. 2015.** Bacterial species and their associations with acute and chronic mastitis in suckler ewes. *Journal of Dairy Science* **98**:7025–7033 DOI [10.3168/jds.2015-9702](https://doi.org/10.3168/jds.2015-9702).
- Van der Molen EJ, Vecht U, Houwers DJ. 1985.** A chronic indurative mastitis in sheep, associated with maedi/visna virus infection. *Veterinary Quarterly* **7**:112–119 DOI [10.1080/01652176.1985.9693966](https://doi.org/10.1080/01652176.1985.9693966).
- White EC, Hinckley LS. 1999.** Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. *Small Ruminant Research* **33**:117–121 DOI [10.1016/S0921-4488\(99\)00013-9](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(99)00013-9).
- Zavanella M. 2011.** *Esercitazioni di Microbiologia [Microbiology Tutorials]*. Brescia: Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Tipografia Camuna.

RESEARCH ARTICLE

# A mouse mastitis model to study the effects of the intramammary infusion of a food-grade *Lactococcus lactis* strain

Cristina Camperio<sup>1,2</sup>, Federica Armas<sup>1,3</sup>, Elena Biasibetti<sup>2</sup>, Paolo Frassanito<sup>1</sup>, Carlo Giovannelli<sup>1</sup>, Liliana Spuria<sup>2</sup>, Claudia D'Agostino<sup>1</sup>, Sabrina Tait<sup>4</sup>, Maria Teresa Capucchio<sup>2</sup>, Cinzia Marianelli<sup>1\*</sup>

**1** Department of Food Safety and Veterinary Public Health, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, **2** Department of Veterinary Sciences, University of Turin, Turin, Italy, **3** Department of Sciences, Roma Tre University, Rome, Italy, **4** Center for Gender-Specific Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

☞ These authors contributed equally to this work.

\* [cinzia.marianelli@iss.it](mailto:cinzia.marianelli@iss.it)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Camperio C, Armas F, Biasibetti E, Frassanito P, Giovannelli C, Spuria L, et al. (2017) A mouse mastitis model to study the effects of the intramammary infusion of a food-grade *Lactococcus lactis* strain. PLoS ONE 12(9): e0184218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184218>

**Editor:** Juan J Loor, University of Illinois, UNITED STATES

**Received:** February 21, 2017

**Accepted:** August 21, 2017

**Published:** September 5, 2017

**Copyright:** © 2017 Camperio et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by the Italian Ministry of Health, grant number RF-2010-2313040. The funder had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

*Lactococcus lactis* is one of the most important microorganisms in the dairy industry and has “generally recognized as safe” (GRAS) status. *L. lactis* belongs to the group of lactic acid bacteria (LAB) and is encountered in a wide range of environments. Recently, the use of the intramammary infusion of a live culture of LAB has been investigated as a new antibiotic alternative for treating mastitis in dairy ruminants. Controversial results are described in literature regarding its efficacy and safety. In this study we conducted in-depth investigation of the mammary gland immune response induced by intramammary inoculum of a live culture of *L. lactis* LMG 7930 using the mouse mastitis model. Overnight cultures either of *L. lactis* ( $\approx 10^7$  CFU) or of the mastitis pathogens *Staphylococcus chromogenes* ( $\approx 10^5$  CFU) or *S. aureus* ( $\approx 10^2$  CFU/ml) were injected into the mouse inguinal glands. A double injection, consisting of *S. chromogenes* first and then *L. lactis*, was also investigated. Bacterial recovery from the gland and inflammatory cell infiltration were assessed. *L. lactis*-treated and control glands were analysed for proinflammatory cytokine production. Microbiological results showed that *L. lactis* was able to survive in the mammary gland 24 h post infection, as were the mastitis pathogens *S. chromogenes* and *S. aureus*. *L. lactis* reduced *S. chromogenes* survival in the glands and increased its own survival ability by coexisting with the pathogen. Histology showed that *L. lactis*-treated glands presented variable histological features, ranging from undamaged tissue with no inflammatory cell infiltrate to severe PMN infiltrate with focal areas of tissue damage. *S. aureus*-treated glands showed the most severe histological grade of inflammation despite the fact that the inoculum size was the smallest. In contrast, most *S. chromogenes*-treated glands showed normal structures with no infiltration or lesions. Significant increases in IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels were also found in *L. lactis*-inoculated glands. The above findings seem to suggest that food-grade *L. lactis* at a high-inoculum dose such as an overnight culture may elicit a suppurative inflammatory response in the mammary gland, thus becoming a potential mastitis-causing pathogen. Because of the unpredictable potential of *L. lactis* in acting

as a potential mastitis pathogen, this organism cannot be considered a safe treatment for bovine mastitis.

## Introduction

Mastitis, generally defined as the inflammation of the mammary gland, is one of the most prevalent diseases affecting dairy ruminants worldwide [1,2]. This disease causes huge economic losses due to decreases in milk quantity and quality, veterinary services and labour expenses [3].

Antibiotics are extensively used for the treatment and prevention of mastitis in dairy ruminants [4]. Due to concerns regarding the growing antibiotic resistance of mastitis-causing pathogens that often make antibiotic therapy ineffective and the implications of the overuse of antibiotics on public health, the development of alternatives are strongly encouraged.

The use of bacteriocins, such as nisin and lacticin 3147, has recently been proposed as an alternative to antibiotics for treating and preventing bovine mastitis. The efficacy of bacteriocin-based formulations administered to the teat by dipping or intramammary infusion has been documented both for treatment of clinical and subclinical bovine mastitis [5,6] and prevention of streptococcal [7] and staphylococcal [8] mastitis infections in cattle. However, controversial results are described in literature regarding the use of lactic acid bacteria (LAB) as intramammary inocula for treating mastitis in dairy ruminants. On the one hand, safety and efficacy in reducing *Staphylococcus aureus* infection have been described with the inoculation of the live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 [9]. On the other hand, inefficacy of the intramammary *Lactobacillus* therapy in decreasing coagulase-negative staphylococci (CNS) infections in cattle, has been documented [10]. Recently, our group has conducted *in vitro* investigations of the probiotic potential of *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 7930, a food-grade nisin-producing strain, against mastitis-causing pathogens [11]. Our *in vitro* results suggested that this strain might be a promising candidate for the development of new strategies of mastitis control in ruminants [11]. We then discussed the efficacy and safety of the intramammary infusion of an overnight culture of *L. lactis* LMG 7930 in *in vivo* studies under field conditions (still unpublished data from our group). We conducted two trials involving naturally infected ewes with clinical and subclinical staphylococcal mastitis. We found that the *L. lactis* treatment rapidly activated the mammary glands' innate immune response and initiated an inflammatory response as evidenced by the recruitment of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and increased somatic cell counts. But while leading to a transient clearance of CNS in the gland, this response caused mild to moderate clinical cases of mastitis characterized by abnormal milk secretions and udder inflammation (still unpublished data from our group).

To further investigate the host immune response induced by the intramammary infusion of the *L. lactis* culture, we used the mouse mastitis model that is known to be more time- and cost-effective than larger animal models. The experimental mouse model of mastitis was developed and characterized by Chandler in 1970 [12]. Although differences may exist between ruminants and murine mammary glands [13], the mouse model of *S. aureus* mastitis provided reliable, useful and economical alternatives for studying bacterial pathogenesis of bovine mastitis-causing pathogens [14–17] and for primary evaluation of experimental drugs [18]. Recently, a mouse model of *S. chromogenes* mastitis has been proposed by Breyne and colleagues to study differences between bovine associated CNS species [19].

In this study, we have explored the effects of the intramammary inoculum of an overnight culture of the food-grade *L. lactis* LMG 7930 strain on the mouse mammary gland immune

response by proposing, for the first time, to the best of our knowledge, a mouse model of *L. lactis* mastitis. Inoculum size, time of infection, bacterial recovery from the gland, histological features and proinflammatory cytokine production are described.

## Material and methods

### Bacterial strains

*L. lactis* subsp. *lactis* LMG 7930 (BCCM/LMG Bacteria Collection, Belgium), a food grade strain used in the dairy industry in the production of Swiss cheese, was used for the intramammary inoculum. Two mastitis-causing pathogens, *S. aureus* LMG 16805 isolated from bovine mastitis (BCCM/LMG Bacteria Collection, Belgium) and *S. chromogenes* 100-SA isolated from a chronic case of subclinical mastitis in sheep (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna Bacteria Collection, Italy), were also used in this study.

Bacterial cultures were performed in Trypticase Soy Broth (TSB, BD, Italy) and incubated at 37°C for 24 h. Overnight cultures were used for the intramammary injection in mice. *L. lactis* was used as is, while *S. chromogenes* and *S. aureus* were properly diluted in PSB to achieve the desired concentration (see the “Mouse mastitis model of infection” section below). The bacterial inoculum size was determined by serially diluting the culture and pour-plating the dilutions on TSB agar.

### Mice

A total of 41 timed-pregnant CD-1 mice (ca. 17 days of gestation), purchased from Envigo RMS Srl (Italy), were considered. Mice were randomly divided into six groups: LL (n = 11, treated with *L. lactis*), S.CH (n = 7, treated with *S. chromogenes*), S.CH-LL (n = 7, treated with *S. chromogenes* and *L. lactis*), S.AU (n = 3, treated with *S. aureus*), PBS (n = 6, control group treated with sterile PBS solution) and UNT (n = 7, untreated control group).

The animals were individually housed in the animal facilities of the Istituto Superiore di Sanità (Rome, Italy). All procedures involving animals were approved by the Italian Ministry of Health (Permit number 120/2014-B-24/03/2014). Animal care and treatment were conducted in accordance with the institutional guidelines and international laws and policies (Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes).

### Mouse mastitis model of infection

The general procedure for mouse mammary gland infection was adapted from the method used by Breyne *et al.* [19] and Brouillette *et al.* [18]. Briefly, CD-1 lactating mice were used 10–12 days after birth of the offspring. The pups were removed 2 h before inoculation into the teat canal of the inguinal mammary glands L5 (on the left) and R5 (on the right). One hundred  $\mu$ l of either an overnight culture of *L. lactis* (approximately  $10^8$  CFU/ml) or PBS-diluted cultures of *S. chromogenes* (approximately  $10^6$  CFU/ml) and *S. aureus* (approximately  $10^3$  CFU/ml) were used for the intramammary injections in groups LL, S.CH and S.AU, respectively. In the S.CH-LL group, each gland received two consecutive injections: an initial inoculum of 100  $\mu$ l of *S. chromogenes* (approximately  $10^6$  CFU/ml) was followed by a second inoculum of 100  $\mu$ l of *L. lactis* (approximately  $10^8$  CFU/ml), 4 h later, in order to facilitate absorption. In the PBS control group the inguinal glands were treated with 100  $\mu$ l of PBS (Sigma Aldrich Srl, Italy). Syringes with 33-gauge blunt needles were used for the inocula.

Twenty-four hours post infection (p.i.), all mice were sacrificed by cervical dislocation. For each animal, both L5 and R5 mammary glands were aseptically collected and pooled for

cultures and histological investigations. Cytokine production was also measured in the LL, PBS and UNT groups.

### Microbiological culture of mammary glands

Inguinal mammary gland samples from each animal were weighed, homogenized and cultured. In summary, tissue samples were homogenized (1:1) in PBS and then serially diluted (1:10). Dilutions were plated onto both Trypticase Soy Agar (TSA, BD, Italy)–nonselective medium–and Mannitol Salt Agar (MSA, BD, Italy)–selective and differential medium used for the isolation of pathogenic staphylococci–to enumerate bacteria. PBS and UNT control glands were also plated onto both TSA and MSA. Plates were incubated for 24–48 h at 37°C until colonies became visible for enumeration. In S.CH-LL, *L. lactis* counts were determined by subtracting the total *S. chromogenes* + *L. lactis* obtained on TSA from the *S. chromogenes* counts obtained on MSA.

Random colonies were picked from each plate and molecularly identified by PCR amplifying and sequencing 16S rDNA [20]. Results were expressed as colony forming unit per gram (CFU/g) of mammary gland. Mean values per group with standard deviation were then calculated.

### Histological investigation

Mammary gland samples from all groups were fixed in 10% neutral buffered formalin and routinely processed to obtain 4 µm paraffin-embedded histological sections which were then stained with haematoxylin and eosin and examined via light microscopy.

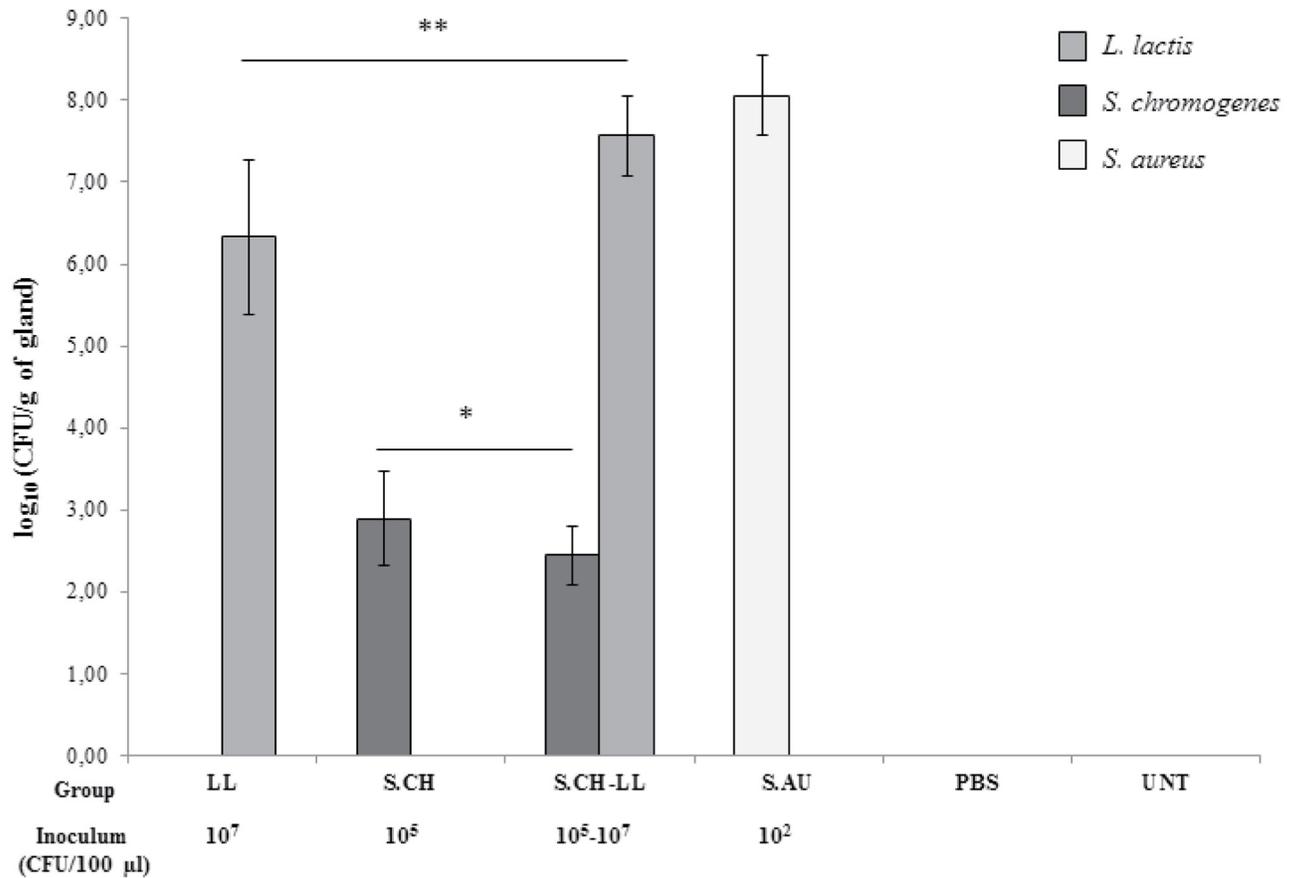
Lesions observed were measured semiquantitatively using a scoring system based on the characterization of the inflammatory cell infiltrate, specifically by accumulation of PMNs, according to the literature [21]. A scale from 1 to 4 was applied to the following alterations: 0, no lesions, absence of interstitial and/or alveolar inflammatory cell infiltrate and undamaged tissue; 1, focal to multifocal, mild interstitial and/or alveolar infiltrate of inflammatory cells and undamaged tissue; 2, multifocal, moderate interstitial and/or alveolar infiltrate of inflammatory cells and undamaged tissue; 3, severe, diffuse interstitial and/or alveolar infiltrate of inflammatory cells and focal areas of tissue damage; 4, severe, diffuse interstitial and/or alveolar infiltrate of inflammatory cells and extensive necrotic areas. All the slides were assessed blinded by three observers (EB, LS and MTC) using a light microscope, and the discordant cases were reviewed at a multi-head microscope until a consensus was reached.

### Cytokine analysis

Mammary gland samples from the LL, PBS and UNT groups were weighed and homogenized in PBS (1: 9, w/v) supplemented with a cocktail of protease inhibitors which is able to inhibit serine and cysteine proteases, calpain proteases and metallo-proteases (Roche, Germany). The homogenate was centrifuged at 2000 x g for 30 min at 4°C, and the supernatant was collected. The levels of the cytokines interleukin (IL)-1β and tumour necrosis factor (TNF)-α were determined by using an ELISA kit (PeproTech, Germany), according to the manufacturer's instructions and the literature [22]. ELISA tests were performed in triplicate. Mean values per group with standard deviation were then calculated.

### Statistical analysis

Mean values per group with standard deviation were used to describe data sets of bacterial recovery and cytokine production.



**Fig 1. *L. lactis*, *S. chromogenes* and *S. aureus* counts.** All inoculated bacteria were counted in mammary glands at 24 h p.i. in treated (LL, S.CH, S.CH-LL, S.AU and PBS) and untreated (UNT) groups. Results are expressed as mean values with standard deviation of log<sub>10</sub> CFU/g values. The initial bacterial inoculum size is shown. Significant differences are indicated. \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184218.g001>

Two-way ANOVA was performed to analyse main effects of *L. lactis* and *S. chromogenes* inoculations, as well as their interaction. Post-hoc Tukey’s multiple comparisons test was performed where appropriate.

Inter-group analyses of differences in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels among LL, PBS and UNT were performed by the one-way ANOVA, followed by Tukey’s multiple comparisons test where applicable.

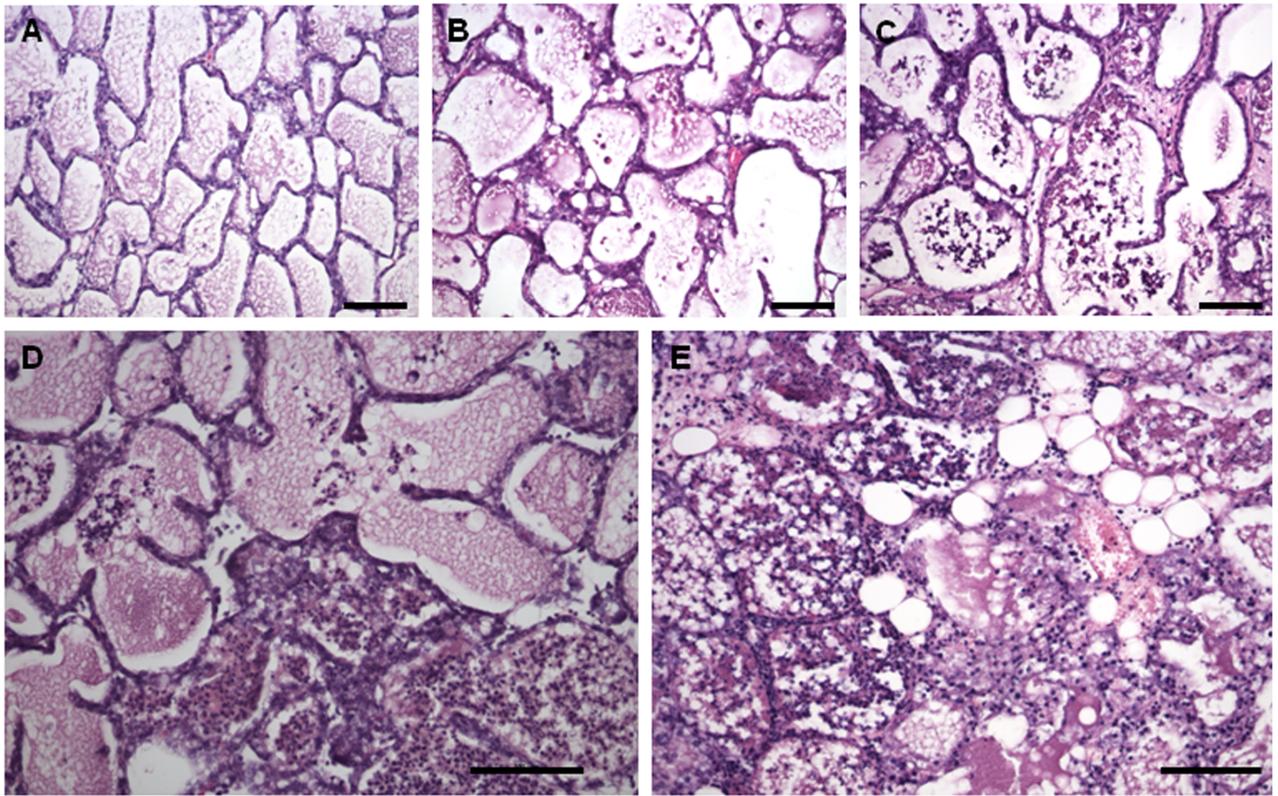
GraphPad Prism 6 version 6.07 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com), was used. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## Results

### Recovery of bacteria from glands

Bacterial count mean values of *L. lactis* (groups LL and S.CH-LL), *S. chromogenes* (groups S.CH and S.CH-LL) and *S. aureus* (S.AU group) are shown in Fig 1 and expressed as log<sub>10</sub> CFU/g of gland.

All bacteria here tested were recovered from the glands at 24 h p.i. The mean value of *S. aureus* count in S.AU ( $1.79 \times 10^8$  CFU/g of gland) was greater than the mean values recorded for *L. lactis* in LL ( $9.32 \times 10^6$  CFU/g of gland) and S.CH-LL ( $5.78 \times 10^7$  CFU/g of gland) and for *S. chromogenes* in S.CH ( $1.55 \times 10^3$  CFU/g of gland) and S.CH-LL ( $2.56 \times 10^2$  CFU/g of



**Fig 2. Histological changes in the murine mammary glands.** Panels A: UNT group, score 0, no infiltration and undamaged tissue; B: LL group, score 1, mild PMN infiltration in isolated areas of tissue sections; C: LL group, score 2, moderate PMN alveolar and interstitial infiltration; D: LL group, score 3, severe PMN infiltration and focal areas of tissue damage; E: S.AU group, score 4, severe PMN infiltration and extensive necrotic areas. Magnifications 20X, bar = 100  $\mu$ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184218.g002>

gland) even though the inoculum size of *S. aureus* was smaller than that of *L. lactis* or *S. chromogenes*. Main effects of *S. chromogenes* ( $F = 6.80$ ,  $P = 0.0147$ ), *L. lactis* ( $F = 13.03$ ,  $P = 0.0012$ ) as well as their interaction ( $F = 6.80$ ,  $P = 0.0147$ ) were observed on *L. lactis* counts. A significant increase of *L. lactis* recovery was found in S.CH-LL compared to LL ( $P = 0.0025$ ). Main effects of *S. chromogenes* ( $F = 8.50$ ,  $P = 0.0071$ ), *L. lactis* ( $F = 4.36$ ,  $P = 0.0464$ ) and their interaction ( $F = 4.36$ ,  $P = 0.0464$ ) were also observed on *S. chromogenes* counts. A significantly lower bacteria recovery was recorded in S.CH-LL mice compared to the S.CH group ( $P = 0.0364$ ). No bacterial colonization was observed in the control glands (groups PBS and UNT).

### Histopathological changes

Representative histological sections, scored from 0 to 4, are shown in Fig 2. Most of the mammary gland tissue samples from the PBS (4/6) and UNT (5/7) groups, as well as from S.CH (6/7), showed a normal structure and no infiltration or lesions (score 0), as shown in panel A. The rest showed minimal interstitial non suppurative inflammations (score 1): 2/6 in PBS, 2/7 in UNT and 1/6 in S.CH.

The glands challenged with *L. lactis* (LL and S.CH-LL) showed variable histological features, with scores ranging from 0 to 3. In LL, tissue damage recorded ranged from no lesions (3/11, score 0) to mild (1/11), moderate (5/11) and severe (2/11) inflammatory cell infiltrations, scored from 1 to 3, respectively (panels B-D). In S.CH-LL, no lesions (1/7, score 0), as well as

**Table 1. Proinflammatory cytokine production in the LL, PBS and UNT groups.**

Cytokine (pg/ml)	LL	PBS	UNT	Significant difference
TNF- $\alpha$	267 $\pm$ 83	165 $\pm$ 49	142 $\pm$ 62	LL vs UNT $P = 0.0351$
IL-1 $\beta$	5383 $\pm$ 1007	4117 $\pm$ 300	3762 $\pm$ 534	LL vs UNT $P = 0.0204$

Results are expressed as mean values with standard deviation. Differences in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels among LL, PBS and UNT were determined by the one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparisons test where applicable. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are shown.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184218.t001>

mild (2/7, score 1) and severe inflammatory cell infiltrations (4/7, score 3) were histologically documented. In S.AU, the *S. aureus* challenge caused severe PMN infiltrations with extensive necrotic areas (3/3, score 4) in the mammary glands (panel E).

### Effect of *L. lactis* on the proinflammatory cytokine production

TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were measured in *L. lactis*-treated (LL), PBS-treated (PBS) and untreated (UNT) control glands at 24 h p.i. and expressed as mean values with standard deviations (pg/ml) in Table 1.

Significant differences in the proinflammatory cytokine production data set were observed comparing LL versus UNT only. Significant increases in TNF- $\alpha$  ( $P = 0.0351$ ) and IL-1 $\beta$  ( $P = 0.0204$ ) levels were recorded in LL. Comparing LL versus PBS data sets, no statistical differences were found, although higher levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were recorded in LL. Higher levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were recorded in two *L. lactis*-treated glands presenting severe PMN infiltrations at histology. The more pronounced dispersion was observed in IL-1 $\beta$  values in LL as measured by the standard deviation. Results as shown in Table 1.

### Discussion

We have previously assessed, in two trials, the efficacy and safety of intramammary infusion of a live overnight culture of the food-grade *Lactococcus lactis* LMG 7930 for the treatment of sub-clinical (by CNS infections) and clinical (by *S. aureus* infections) mastitis in lactating ewes. We have found that, under our experimental conditions, the live bacterial culture rapidly activated the mammary innate immune system. This led to a transient clearance of the CNS in the gland, but also caused mild to moderate clinical cases of mastitis (still unpublished data from our group). To make further progress in our understanding of *L. lactis* mastitis, we decided to study the interaction between *L. lactis* LMG 7930 and the mammary gland in a mouse mastitis model in greater detail.

The mouse mastitis model has been proven to be a fast, cheap and reproducible intermediate *in vivo* alternative for studying the specific host immune response to intramammary injection with major mastitis pathogens, such as *Escherichia coli* and *S. aureus* [15,23]. Recently, a pilot study has suggested that a mouse mastitis CNS model can mimic bovine CNS mastitis and be used to study differences between bovine CNS species and strains [19]. Here we investigated whether an intraductal injection of an overnight *L. lactis* culture into the murine mammary gland (approximately  $10^7$  CFU/100  $\mu$ l) can be used to evaluate *L. lactis* survival in the tissue and success in overcoming host immune response 24 h p.i. Therefore we conducted microbial cultures and histopathological investigations on *L. lactis*-treated mammary glands. We also treated additional mice with bacterial suspensions of mastitis-causing pathogens, i.e. *S. chromogenes* (S.CH) or *S. aureus* (S.AU) in order to have two mouse mastitis models as complementary tools to better evaluate the effects of the *L. lactis* challenge into the mammary gland. We decided to inoculate approximately  $10^5$  CFU/100  $\mu$ l of *S. chromogenes* because a

previous study had documented that an *S. chromogenes* inoculum dose as high as  $10^5$  CFU displayed clinical symptoms of inflammation if inoculated into murine mammary glands [19]. According to the validated mouse mastitis *S. aureus* model, we inoculated approximately  $10^2$  CFU/100  $\mu$ l of *S. aureus* because an inoculum dose as high as 100 CFU of that pathogen has been proven to be nonfatal and to cause a significant level of infection with evident signs of mammary gland inflammation at 24 h p.i. [18,19]. An additional group was included in our study: S.CH-LL, containing animals treated with two separate injections—*S. chromogenes* first, followed by *L. lactis*—in order to assess whether *L. lactis* was able to affect *S. chromogenes* survival in the mammary gland.

Microbiological results showed that *L. lactis* was able to survive in the mammary gland 24 h p.i., as were the mastitis pathogens *S. chromogenes* and *S. aureus*. In contrast, no bacterial colonization was observed in the control glands (groups PBS and UNT). We observed that *L. lactis* reduced *S. chromogenes* survival in the glands in S.CH-LL at 24 h p.i., and increased its own survival ability by coexisting with the pathogen. It seems that *L. lactis* and *S. chromogenes* engaged in interspecies cooperative behaviours rather than competitive interactions. Bacterial species may in fact coexist with, or dominate, other organisms, competing for the same pool of resources by adopting many active mechanisms [24]. *L. lactis*-treated glands showed variable histological features, ranging from undamaged tissue with no inflammatory cell infiltrate to severe PMN infiltrate with focal areas of tissue damage (scores 0 to 3). A moderate mammary gland inflammation characterized by alveolar and/or interstitial PMN infiltration was the most prevalent change observed in the mammary glands challenged with *L. lactis* alone (LL). Glands challenged with both *S. chromogenes* and *L. lactis* (S.CH-LL), however, showed a more severe degree of inflammation. Neutrophil infiltration was observed in almost all glands and in both interstitium and alveoli, suggesting a more severe inflammation than observed in udders challenged with *L. lactis* alone. These differences in histology are likely related to the greater number of *L. lactis* colonies measured in S.CH-LL than that recorded in LL.

Proinflammatory cytokine production was measured in LL, PBS and UNT glands. Significant increases in IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels were found in *L. lactis*-inoculated glands by comparing LL with UNT. However, no significant changes were observed between groups LL and PBS, although we recorded higher proinflammatory cytokine trends and a more pronounced dispersion of values in LL. The cytokine production results are in accordance with the greater number of glands with inflammatory cells infiltrate that we recorded in LL compared with the control groups.

Predictably, bacterial growth in *S. aureus* inoculated glands was the highest we recorded, even though the inoculum size was the smallest. Moreover, *S. aureus*-treated glands all showed the most severe histological grade of inflammation (score 4). Both results are compatible with previous studies [18,19] and seem to support an inoculum dose as high as 100 CFU of a mastitis *S. aureus* isolate per gland, irrespective of the strain, like the injection that was able to cause severe mammary gland inflammation in the mouse model at 24 h p.i. That confirms lactating mice as animals very susceptible to intramammary infusion by *S. aureus*. Contrary to our expectations, the mastitis isolate of *S. chromogenes* here used was unable to induce mastitis when it was used alone at the inoculum size as high as  $10^5$  CFU at 24 h p.i. Indeed, most mammary glands in S.CH showed normal structures with no inflammatory infiltration or lesions detected by the histological exam. Concordant results were found in the control groups (PBS and UNT). Few cases of mammary gland inflammation—and, moreover, mild ones—were recorded in S.CH, as well as in PBS and UNT. That mild inflammation seemed to have been caused by milk accumulation (physiological inflammation) rather than by the pathogen or inoculum itself. The rapid accumulation of milk in the mammary gland—due to the permanent removal of offspring from a lactating mother, which is referred to in the literature as “forced

weaning”—has been documented to result in elevation of inflammatory mediators [25] and influx of macrophages into the mammary gland [26,27], all of which are critical components of the cell death and tissue remodelling process [28]. Our results together with the literature [19] confirm that CNSs are minor mastitis pathogens and that epidemiologically different mastitis isolates of CNS strains may induce variable host innate immune responses in the mouse mammary gland.

In conclusion, the *L. lactis* inoculum caused variable histological features in the mammary gland, ranging from undamaged tissue to severe inflammation. Our results suggest that bacteria with GRAS status, such as *L. lactis*, can act as mastitis-causing pathogens when inoculated at high density into the mammary glands of lactating mice. Because of the unpredictable potential of *L. lactis* in acting as a potential mastitis pathogen, this organism cannot be considered a safe treatment for bovine mastitis.

## Acknowledgments

We are grateful to Dr. Stefano A. Lollai (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Italy) for kindly providing the mastitis-causing pathogen *S. chromogenes* 100-SA.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Cinzia Marianelli.

**Formal analysis:** Sabrina Tait, Cinzia Marianelli.

**Funding acquisition:** Maria Teresa Capucchio, Cinzia Marianelli.

**Investigation:** Cristina Camperio, Federica Armas, Elena Biasibetti, Paolo Frassanito, Carlo Giovannelli, Liliana Spuria, Claudia D’Agostino, Maria Teresa Capucchio.

**Methodology:** Cristina Camperio, Federica Armas, Elena Biasibetti, Liliana Spuria, Maria Teresa Capucchio, Cinzia Marianelli.

**Project administration:** Maria Teresa Capucchio, Cinzia Marianelli.

**Resources:** Maria Teresa Capucchio, Cinzia Marianelli.

**Supervision:** Cinzia Marianelli.

**Writing – original draft:** Cristina Camperio, Cinzia Marianelli.

**Writing – review & editing:** Cristina Camperio, Federica Armas, Elena Biasibetti, Paolo Frassanito, Carlo Giovannelli, Liliana Spuria, Claudia D’Agostino, Sabrina Tait, Maria Teresa Capucchio, Cinzia Marianelli.

## References

1. Contreras A, Sierra D, Sanchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, et al. Mastitis in small ruminants. *Small Rumin Res.* 2007; 68: 145–153.
2. Haftu R, Taddelle H, Gugsu G, Kalayou S. Prevalence, bacterial causes, and antimicrobial susceptibility profile of mastitis isolates from cows in large-scale dairy farms of Northern Ethiopia. *Trop Anim Health Prod.* 2012; 44:1765–1771. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0135-z> PMID: 22476790
3. Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q.* 2007; 29: 18–31. <https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224> PMID: 17471788
4. Tiwari JG, Babra C, Tiwari HK, Williams V, Wet SD, Gibson J, et al. (2013) Trends In Therapeutic and Prevention Strategies for Management of Bovine Mastitis: An Overview. *J Vaccines Vaccin.* 4: 176.
5. Cao LT, Wu JQ, Xie F, Hu SH, Mo Y. Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2007; 90: 3980–3985. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0153> PMID: 17639009

6. Wu J, Hu S, Cao L. Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 3131–3135. <https://doi.org/10.1128/AAC.00629-07> PMID: 17606675
7. Ryan MP, Flynn J, Hill C, Ross RP, Meaney WJ. The natural food grade inhibitor, lacticin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 1999; 82: 2625–2631.
8. Twomey DP, Wheelock AI, Flynn J, Meaney WJ, Hill C, Ross RP. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. *J Dairy Sci.* 2000; 83: 1981–1988. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75075-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75075-2) PMID: 11003227
9. Klostermann K, Crispie F, Flynn J, Ross RP, Hill C, Meaney W. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *J Dairy Res.* 2008; 75: 365–373.
10. Greene WA, Gano AM, Smith KL, Hogan JS, Todhunter DA. Comparison of probiotic and antibiotic intramammary therapy of cattle with elevated somatic cell counts. *J Dairy Sci.* 1991; 74: 2976–2981.
11. Armas F, Camperio C, Marianelli C. *In vitro* assessment of the probiotic potential of *Lactococcus lactis* LMG 7930 against ruminant mastitis-causing pathogens. *PLoS ONE* 2017; 12: e0169543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169543> PMID: 28068371
12. Chandler RL. Experimental bacterial mastitis in the mouse. *J Med Microbiol* 1970; 3: 273–282.
13. Notebaert S, Meyer E. Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis. A review. *Vet Q.* 2006; 28: 2–13. <https://doi.org/10.1080/01652176.2006.9695201> PMID: 16605156
14. Brouillette E, Grondin G, Talbot BG, Malouin F. Inflammatory cell infiltration as an indicator of *Staphylococcus aureus* infection and therapeutic efficacy in experimental mouse mastitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 104: 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.11.006> PMID: 15734537
15. Brouillette E, Malouin F. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes Infect.* 2005; 7: 560–568. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.11.008> PMID: 15777742
16. Nazemi S, Aalbæk B, Kjelgaard-Hansen M, Safayi S, Klærke DA, Knight CH. Expression of acute phase proteins and inflammatory cytokines in mouse mammary gland following *Staphylococcus aureus* challenge and in response to milk accumulation. *J Dairy Res.* 2014; 81: 445–454. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000454> PMID: 25230141
17. Zhao Y, Zhou M, Gao Y, Liu H, Yang W, Yue J, et al. Shifted T helper cell polarization in a murine *Staphylococcus aureus* mastitis model. *PLoS One* 2015; 10: e0134797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134797> PMID: 26230498
18. Brouillette E, Grondin G, Lefebvre C, Talbot BG, Malouin F. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol.* 2004; 101: 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.04.008> PMID: 15261998
19. Breyné K, De Vlieghe S, De Visscher A, Piepers S, Meyer E. Technical note: a pilot study using a mouse mastitis model to study differences between bovine associated coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci.* 2015; 98: 1090–1100. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8699> PMID: 25497801
20. Tabacchioni S, Visca P, Chiarini L, Bevivino A, Di Serio C, Fancelli S, et al. Molecular characterization of clinical and environmental isolates of *Burkholderia cepacia*. *Res Microbiol.* 1995; 146: 531–542. PMID: 8577994
21. Biasibetti E, Amedeo S, Brugiapaglia A, Destefanis G, Di Stasio L, Valenza F, et al. Lipomatous muscular "dystrophy" of Piedmontese cattle. *Animal* 2012; 6: 1839–1847. <https://doi.org/10.1017/S175173111200081X> PMID: 22717052
22. Chen F, Liu B, Wang D, Wang L, Deng X, Bi C, et al. Role of sortase A in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *FEMS Microbiol Lett.* 2014; 351: 95–103. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12354> PMID: 24330077
23. Notebaert S, Demon D, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Meyer E. Inflammatory mediators in *Escherichia coli*-induced mastitis in mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2008; 31: 551–565. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.10.004> PMID: 18243314
24. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 15–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259> PMID: 19946288
25. Baxter FO, Came PJ, Abell K, Kedjouar B, Huth M, Rajewsky K, et al. IKKbeta/2 induces TWEAK and apoptosis in mammary epithelial cells. *Development* 2006; 133: 3485–3494. <https://doi.org/10.1242/dev.02502> PMID: 16887827

26. Stein T, Morris JS, Davies CR, Weber-Hall SJ, Duffy MA, Heath VJ, et al. Involution of the mouse mammary gland is associated with an immune cascade and an acute-phase response, involving LBP, CD14 and STAT3. *Breast Cancer Res.* 2004; 6: R75–91. <https://doi.org/10.1186/bcr753> PMID: [14979920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14979920/)
27. O'Brien J, Martinson H, Durand-Rougely C, Schedin P. Macrophages are crucial for epithelial cell death and adipocyte repopulation during mammary gland involution. *Development* 2012; 139: 269–275.
28. Ingman WV, Glynn DJ, Hutchinson MR. Mouse models of mastitis—how physiological are they? *Int Breastfeed J.* 2015; 10:12. <https://doi.org/10.1186/s13006-015-0038-5> PMID: [25848399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25848399/)