

CONTEGGIO DI UNITA' FORMANTI COLONIA DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NEL LATTE DI MASSA COME DATO PREDITTIVO DEL LIVELLO D'INFEZIONE INTRA-ALLEVAMENTO

Bertocchi L.¹, Bolzoni G.¹, Zanardi G.¹, Nassuato C.¹, Bonometti G.², Benicchio S.³, Varisco G.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Reparto di Produzione Primaria, Brescia

² Centro Miglioramento Qualità Latte e Carni Bovine – Brescia

³ Veterinario Libero Professionista

Key words: latte di massa, *Staphylococcus aureus*, modello predittivo

SUMMARY

Aim of this work is to review the predictive model developed in 2005 regarding bulk milk tank (BMT) analysis as a tool for epidemiological surveillance system on herd's Staphylococcus aureus infection level.

The comparison between BMT analysis results and single cow milk (SCM) analysis results was investigated to verify the relationship between BMT S. aureus UFC value and dairy herds infection rate.

Statistical analysis shows that within herds the prevalence is 1.98 greater (exp 0.68) every one UFC log unit (p<0.001).

Results obtained confirm the significative statistical relationship between UFC, in log, and cows' infection rate;

BMT analysis is a valid tool to evaluate dairy herds infection prevalence.

INTRODUZIONE

La mastite da *Staphylococcus aureus* è oggi la principale infezione della ghiandola mammaria. Infatti, essa riduce sensibilmente la produzione di latte e causa un aumento del conteggio delle cellule somatiche, con possibili ricadute sulla salute pubblica dovute alla presenza di ceppi produttori di enterotossine.

Nella letteratura scientifica sono pubblicati diversi report che evidenziano una prevalenza d'infezione dal 15 al 40 % tra gli allevamenti e dal 10 al 70% intra-allevamento.

Oltre alla intrinseca elevata contagiosità della malattia, un ulteriore fattore che ne favorisce la rapida diffusione è il suo carattere sub-clinico. Per questa ragione, il controllo della diffusione richiede il rispetto di rigorosi parametri igienico-sanitari e il costante monitoraggio batteriologico del latte. La rilevazione dell'infezione nelle bovine è effettuata tramite il campionamento sterile dei quarti mammari mastitici. Questo approccio presenta 2 criticità: la scelta delle bovine da campionare e le metodiche di campionamento. Infatti, il decorso sub-clinico rende difficile l'individuazione corretta dei capi infetti con *S. aureus* ed è possibile che la presenza contestuale di batteri ambientali ne possa occultare la crescita in piastra, fino ad arrivare ad una falsa negatività nel 20-30% dei casi. E' consigliabile, perciò, monitorare l'eventuale presenza di infezione stafilococcica eseguendo prelievi sterili, mirati su bovine senza patologia clinica rilevabile e con conteggi in cellule somatiche di poco superiori ai limiti di legge tra 300 e 400.000 cellule per ml, rispettivamente previsti per la produzione di latte crudo destinato alla produzione di latte fresco pastorizzato di alta qualità e per le altre trasformazioni. In questi casi, è necessario tenere presente che il campione può risultare falsamente negativo e non utile per una diagnosi precoce (2, 3).

D'altronde, considerata l'ubiquità di *S. aureus* e i fattori predisponenti la sua diffusione in fase di mungitura, non è affatto trascurabile il rischio di introdurre l'infezione in un allevamento indenne. Le cause più frequenti sono l'acquisto di soggetti infetti e il momento del parto di primipare o pluripare infettatesi come manze o in asciutta. Una volta che uno o più soggetti infetti sono entrati in mungitura, l'utilizzo

della medesima macchina mungitrice amplifica la diffusione dell'infezione. L'obiettivo del lavoro è stato quello di verificare un sistema di monitoraggio di *S. aureus* sul latte di massa, semplice ed economico, in un campione di allevamenti di bovine da latte in provincia di Brescia, che fosse in grado di identificare tempestivamente l'infezione e stimare la sua prevalenza intra-allevamento. In particolare, lo studio epidemiologico è stato condotto per valutare la capacità predittiva del conteggio di colonie di *S. aureus* su terreno selettivo a partire da campioni di latte di massa, al fine di classificare gli allevamenti infetti secondo differenti intervalli di prevalenza intra-allevamento. Questo approccio diagnostico è in grado di discriminare in maniera sufficientemente affidabile e rapida le aziende problema e di quantificarne la prevalenza ai fini della realizzazione di un piano di controllo *ad hoc*. E' altresì importante come strumento di monitoraggio continuo per addivenire ad una diagnosi precoce dell'infezione in allevamenti indenni.

Il latte di massa rappresenta una matrice poco costosa e facilmente fruibile dal laboratorio (almeno due prelievi al mese per il pagamento del latte secondo qualità), sulla quale si è deciso di modellare la sperimentazione per offrire un servizio sanitario e zootecnico agli allevatori e per impostare programmi di intervento in azienda e per il miglioramento quali-quantitativo delle produzioni.

MATERIALI E METODI

Nel 2005 è stato effettuato uno studio preliminare per realizzare un modello predittivo basato sull'analisi statistica del conteggio delle UFC di *S. aureus* isolato con l'esame batteriologico su 31 campioni di latte di massa aziendale correlato con i risultati ottenuti in circa 4.000 campioni di latte di singola bovina (3). L'obiettivo era di verificare la capacità del modello di prevedere in modo affidabile il livello di prevalenza intra-allevamento dell'infezione, utilizzando la matrice latte di massa, idonea per il monitoraggio su larga scala dei piani di controllo/eradicazione.

Tuttavia, lo studio preliminare presentava dei limiti relativi alla numerosità dei campioni e alla procedura di prelievo, cronologicamente sfasata tra latte di massa e latte di singole bovine dello stesso allevamento.

A questo riguardo, nel corso del 2009 e del primo semestre 2010 si è incrementata la numerosità dei campioni di latte di massa e di singola bovina prelevati contestualmente in aziende della provincia di Brescia.

Nel 2009 sono state reclutate 99 aziende di bovine da latte, controllate anche più di una volta, per un totale di 120 prelievi. Considerata la sfasatura temporale tra più prelievi eseguiti nella stessa azienda, il numero totale di prelievi è stato considerato come fosse rappresentativo di differenti aziende e quindi indipendente ai fini dell'analisi statistica.

La validazione è stata eseguita nel primo semestre 2010 utilizzando i dati derivanti dal prelievo contestuale di campioni di latte di massa e di singola bovina di altri 53 allevamenti da latte. In totale, tra 2009 e 2010 sono state effettuate 3.462 esami batteriologici per la ricerca di *S. aureus* e 1.177 determinazioni per il conteggio delle cellule somatiche.

L'analisi batteriologica è stata eseguita utilizzando terreni di coltura selettivo/differenziali specifici per *S. aureus*, seminando 0,1 ml di latte su terreno Baird Parker, addizionato di supplemento (50 ml/L) così composto: 47 ml di emulsione sterile al 50% di tuorlo d'uovo e soluzione fisiologica e 3 ml di soluzione acquosa al 3,5% (p/v) di tellurito di potassio, sterile per filtrazione con supplemento liofilizzato di plasma di coniglio e fibrinogeno bovino (RPF).

Le colonie non chiaramente identificabili come *S. aureus* in piastra sono state sottoposte a verifica della reazione positiva alla prova della coagulasi in provetta.

Per il conteggio delle cellule somatiche dei campioni è stato utilizzato il metodo indiretto a citometria di flusso mediante apparecchiatura automatica Fossomatic 5000.

Ai dati è stato adattato un modello di regressione logistica con variabile dipendente il numero di capi infetti sul totale di soggetti in lattazione e variabili indipendenti le UFC di *S. aureus* e il conteggio delle cellule somatiche. Le covariate sono state sottoposte a trasformazione logaritmica.

Ai fini della validazione esterna del modello si è proceduto a:

- 1- confrontare i valori stimati con il modello selezionato con i valori di infezione osservati nel set di validazione di dati raccolti nel 2010. Grazie all'esperienza pluri-trentennale del Centro Miglioramento Qualità Latte (CMQL) nell'assistenza alle aziende nella lotta contro le mastiti, è stato possibile individuare tre classi di infezione intra-allevamento, 0-9.99%, 10-25%, oltre 25%, utili alla programmazione e gestione degli interventi in azienda entro le quali verificare la capacità predittiva del modello;
- 2- confrontare i coefficienti stimati con il modello selezionato con i coefficienti stimati tramite un nuovo modello adattato al solo set di validazione (53 aziende).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Con la regressione logistica abbiamo evidenziato che le UFC predicono con significatività statistica il livello di infezione aziendale (LR test $p < 0.01$). Il modello ha permesso di calcolare il *log odds* per allevamento infetto: $-4.674 + 0.68 * \ln(UFC)$.

Per ottenere il valore di prevalenza è stata utilizzata la seguente formula: $Prevalenza = Odds / (1 + Odds)$.

Ad esempio, in caso di 20 UFC, il valore stimato di prevalenza, calcolato come $\exp(-4.674 + 0.68 * 3) / (1 + \exp(-4.674 + 0.68 * 3))$, è pari a 0.1435 (14.3%).

La prevalenza intra-allevamento è risultata 1.98 più grande (CI 95%: 1.90 - 2.06) per incremento unitario di UFC espresse in unità logaritmiche.

Aggiungendo la variabile cellule somatiche al modello, sebbene si apporti un miglioramento della bontà di adattamento, non si ottengono miglioramenti ai fini della discriminazione degli allevamenti rispetto ai range di infezione individuati.

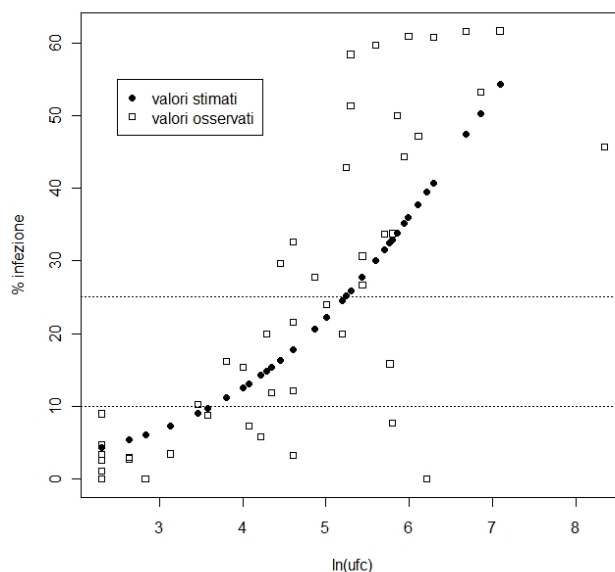
La validazione esterna del modello ha evidenziato una capacità predittiva della prevalenza intra-aziendale accettabile, con una classificazione globale corretta nel range di infezione in circa l'81% dei casi (43/53). La percentuale di errore entro ciascuna classe è risultata la seguente:

- % Errore 1 classe (0 - 9,99) = 21,7%
- % Errore 2 classe (10,0 - 25,0) = 20,0%
- % Errore 3 classe (>25) = 15,0%

Come si può notare il modello presenta minor precisione nelle prime due classi di infezione (figura 1).

I coefficienti stimati attraverso un modello adattato al set di validazione sono risultati pari a: -4.42 (intercetta) e 0.64 a fronte di -4.67 (intercetta) e 0.68. Dal confronto si ha conferma della discreta capacità predittiva del modello selezionato.

Figura 1. Distribuzione dei valori stimati dal modello e dei valori osservati nel set di validazione



Pur rilevando una bontà di adattamento ai dati migliorabile, da valutarsi alla luce dell'acquisizione di nuove informazioni, considerata la semplicità di applicazione e la flessibilità del modello oltre alla economicità e facilità di acquisizione della matrice, si ritiene che il modello selezionato abbia mostrato delle performance che lo rendono utile a livello operativo come sistema di screening su latte di massa per la valutazione del grado d'infezione da *S. aureus*. La sua applicazione presenterebbe i seguenti vantaggi:

- ÷ offrire all'utenza (allevatori, caseifici, etc.) un nuovo servizio diagnostico;
- ÷ svolgere indagini conoscitive estese con acquisizione di dati a livello di allevamento da latte riguardo alla situazione sanitaria nei confronti dell'infezione da *S. aureus* e in tempi relativamente rapidi;
- ÷ programmare gli interventi prioritari a livello territoriale e di allevamento all'interno di un piano di contenimento e/o eradicazione dell'infezione;
- ÷ monitorare l'andamento dei piani di controllo o di mantenimento dell'eradicazione;
- ÷ studiare il comportamento predittivo del nuovo modello relativamente ad altri patogeni mammari.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Varisco G., Bertocchi L. An intramammary *Staphylococcus aureus* infection control program in dairy herds of the province of Brescia Congresso Mundial de Buiatria, 28 Jornadas Uruguayas de Buiatria, Punta del Este, Uruguay, 4-8 Diciembre 2000 Proceedings XXI World Buiatrics Congress - p 140
- 2) Bertocchi L., Varisco G., Bolzoni G., Bravo R., Bonometti G. An intramammary *Staphylococcus aureus* infection control program in dairy herds of the province of Brescia Mastitis in dairy production: current knowledge and future solutions: proceedings of the 4th IDF International Mastitis Confernece, Maastricht, The Nedtherlands, June 2005/edited M Hogeveen - Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2005 - p 952-953
- 3) Varisco G, Bertocchi L., Contessi N., Tranquillo M., Bolzoni G. Bulk milk tank *Staphylococcus aureus* UCF count as predictive datum for bovine herd's infection level. XXV Jubilee World Buiatrics Congress: July 6-11, 2008, Budapest (Hungary) Hung. Vet. J. - Vol. 130 Suppl 2 (2008) - p 62