

# Relazione tra patogeni della mammella e cellule somatiche nel latte ovino e caprino

GIORNATA DI STUDIO SIPAOC:  
*CELLULE SOMATICHE NEL LATTE OVINO E CAPRINO*

**Grosseto 8 Novembre 2013**

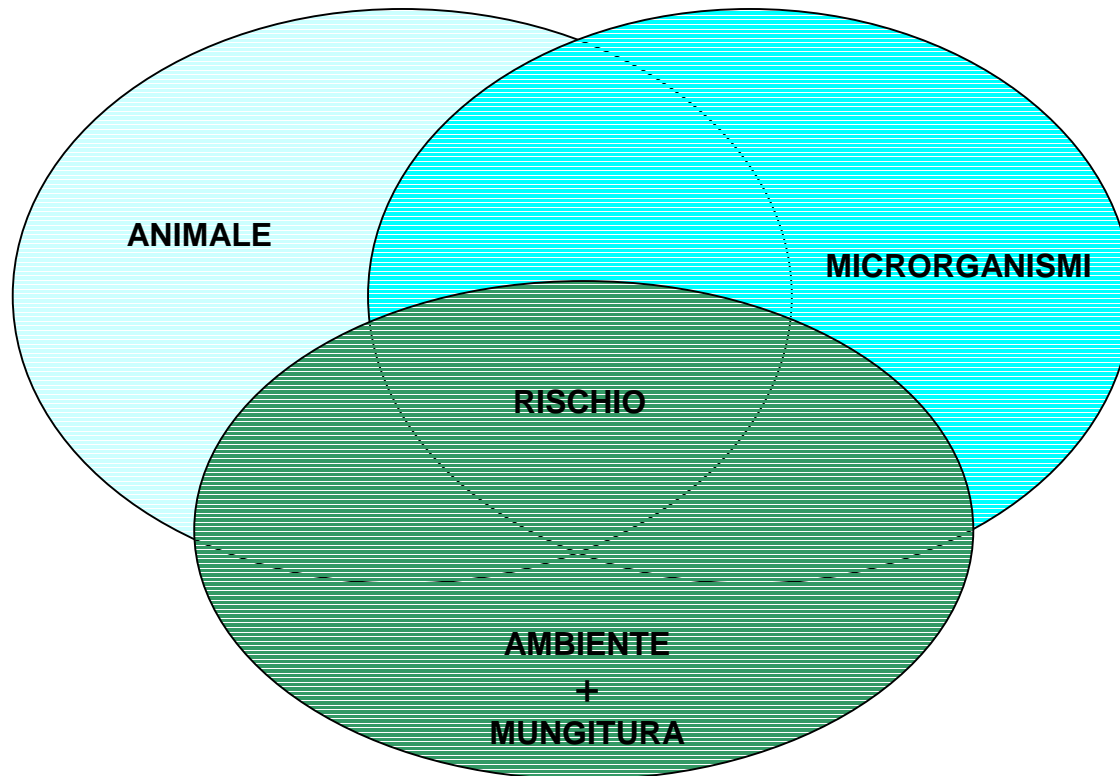
E. **Agnese Cannas**

Centro di Referenza Nazionale per le Mastopatie degli Ovini e dei Caprini  
(CRenMOC)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna - Sassari



# Processo infiammatorio



Interazione fra:

- ⑩ *Microrganismi*
- ⑩ *Ospite*
- ⑩ *Ambiente*
- ⑩ *Tipologia e modalità mungitura*

# **Microrganismi responsabili di mastiti**

## **Batteri**

## **Micoplasmi**

## **Muffe e lieviti**

*(Candida spp; Criptococcus spp)*

## **Virus**

*(retroviridae –lentivirus VISNA MAEDI – CAEV)*

## **Alghe**

*(Prototheca zopfii )*

# Eziologia

## **MASTITI DA GERMI PATOGENI - CONTAGIOSI**

*Riserva mammella infetta  
I patogeni sopravvivono con  
difficoltà nell'ambiente*

## **MASTITI DA GERMI AMBIENTALI**

*Riserva: ambiente*

*Quasi sempre associati a  
contaminazioni fecali*

## **MASTITI DA GERMI OPPORTUNISTI**

*Riserva : flora microbica  
cutanea*

# Mastiti da patogeni - contagiosi

## Batteri patogeni per la mammella

*Staphylococcus aureus*

*Mannheimia haemolytica*

*Pasteurella multocida*

*Corynebacterium spp*

*Arcanobacter (Actinomyces) pyogenes*

Micoplasmi (*M. agalactiae*)

E' il più importante patogeno contagioso della mammella

**Staphylococcus aureus**  
Riserva primaria: mammella infetta - lesioni cutanee della mammella (Dermatite pustolosa)

Diffusione: procedure di mungitura/impianto di mungitura

Produce diverse tossine coinvolte nella patogenesi della mastite ed enterotossine responsabili di tossinfezioni alimentari

# *Staphylococcus aureus*

Si possono avere diverse gradazioni di forme di mastiti:

**Mastite gangrenosa** (Interessamento sistemico che può esitare con la morte dell'animale – perdita funzionale della mammella)

**Mastite parenchimatosa** (mastite parenchimatosa acuta, difficilmente guaribile, può evolvere nella forma cronica).

**Dermatite pustolosa** (può rappresentare la premessa per l'insorgenza della mastite stafilococcica)



# Mastiti ambientali

## Batteri opportunisti di origine ambientale:

*E. Coli*

*Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella oxytoca*

*Enterobacter spp*

*Serratia spp*

***Pseudomonas aeruginosa***

*Proteus spp*

*Streptococcus dysgalactiae*

***Streptococcus uberis***

*Bacillus spp* (*Bacillus cereus*)

# Mastiti ambientali

Microrganismi ubiquitari presenti nel tratto gastro-intestinale, suolo, acqua e lettiera.

Moltiplicandosi nelle guaine della mungitrice favoriscono il diffondersi dell'infezione fra gli animali

Differenti quadri clinici di mastite

Importante il controllo dei fattori di rischio

Microrganismo isolato in tutti gli ambienti specialmente umidi (suolo, acqua e liquami).

## ***Pseudomonas aeruginosa***

E' in grado di colonizzare nelle diverse superfici in particolare quelle umide (impianto di mungitura)

E' di difficile eliminazione:

- Produttore di biofilm
- Grande capacità di adattamento
- Resistenza agli antibiotici e ad alcuni disinfettanti

# *Pseudomonas aeruginosa*







5th IDF International Mastitis Conference, 21-24 March 2010, Christchurch, New Zealand

# Survey on the milking machine contamination by *Pseudomonas aeruginosa* in Sardinian dairy sheep farms

E A Cannas<sup>1</sup>, S Dore<sup>1</sup>, A Fadda<sup>1</sup>, A Vidili<sup>1</sup>, E Bandino<sup>1</sup>, G A Carboni<sup>1</sup>, S Piredda<sup>2</sup>, E Marongiu<sup>1</sup> and M Liciardi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro di Riferenza Nazionale per le Mastopatie degli Ovini e dei Caprini, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", Italy

<sup>2</sup> LAORE Sardegna, Italy



## INTRODUCTION

In 2008, during the survey on routine bacteriology on milk samples, environmental bacteria were isolated from the individual milk of the 47% of 777 Sardinian dairy sheep herds examined by bacterial culture in the laboratories of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna; in particular, *Pseudomonas aeruginosa* was recognised as a serious problem causing 12% of mastitis reported. This mastitis is difficult to control because of the environmental presence and the lack of effective control methods especially therapy and immunoprophylaxis. The main source of infection is represented by the milking machine contaminated by the washing water containing *P. aeruginosa*. The high infectiousness and the great resistance, in particular in aqueous environment, is due to the biofilm forming capacity that isolates and feeds bacteria, gives adaptation ability, antibiotic and disinfection resistance, and helps the fast and invasive growth on all surfaces, especially if moist. (Moore David M., 1997) The mastitis is characterized by several clinical pictures that differ considerably, going from slight symptoms or acute inflammation processes with changes in milk composition (figure 1) and swelling of the regional lymph nodes, to the gangrenous mastitis (figure 2) and the death of the animals. The most productive animals are often affected by this udder pathology.

## AIM

Objective of this study is to survey the role of the milking machine contamination by *P. aeruginosa* and to assess the risk factors for the development of mastitis in Sardinian dairy sheep herds.

## MATERIALS AND METHODS

450 dairy sheep farms selected randomly and equipped with milking machines were studied. Each farm was tested by cultural examination for *P. aeruginosa* from one water sample from the cleaning unit and 10 swabs from the milking machine components (3 from the liners, 3 from the claws, 3 from the jettors and 1 from the milk receiver). The tests for *P. aeruginosa* were based on the ability to identify the microorganism using a selective culture medium, on which it grows with particular cultural characteristics. Water (100 ml) was filtered using a membrane and then the membrane was sowed on CETRIMIDE-AGAR medium and finally it was incubated at 37°C for 24-48 h.; the swabs were directly sowed on CETRIMIDE-AGAR medium and incubated at 37°C for 24-48 h.. Bacterial cultures were examined by Wood's Lamp Test (Ultra Violet Light Test) and the fluorescent colonies were purified by transplantation on Nutritive/Blood - Agar. Finally, after performing Oxidase-test, biochemical identification with miniaturized system (API NE Kits) was carried out. (Figure 3)



Figure 3. a) Cetrimide-agar, b) Wood's Lamp Test, c) Blood-Agar, d) Oxidase-Test



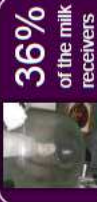
Figure 1:  
Changes in milk characteristics  
caused by *Pseudomonas*  
*aeruginosa* udder infection in  
sheep.



Figure 2:  
Gangrenous mastitis in sheep  
due to *Pseudomonas aeruginosa*  
infection.

## RESULTS

*P. aeruginosa* was isolated from water and/or swabs on 355 (79%) of the farms. Water contaminated by *P. aeruginosa* was used on 77% of farms for the washing of the milking machines; the bacteria being found on 64% of the milking machines. The percentage of the contaminated milking machine components was:



## CONCLUSIONS

The results of this study show a problematic situation about the hygiene and the presence of *P. aeruginosa* in the milking machines; this is due to the typical Sardinian systems of sheep herding, often found far from public water-supply system and without effective water purification systems. A specific protocol to prevent and control *P. aeruginosa* mastitis is being studied currently by our Institute; it is based on the risk factors assessment like the microbiological water quality, the milking machine contamination, the teat hygiene (post-dipping) and the early identification of the infected animals and their exclusion from machine milking to avoid the spread of the pathology among the animals. To develop appropriate strategies for prevention and control of the different clinical pictures of mastitis due to *P. aeruginosa* and to reduce the time of diagnosis a molecular characterization of the strains associated with udder health must be carried out.

Acknowledgements: A Ambu, A Bullitta, P Chessa, G Denanni, T Demurtas, A M Fois, R Fraileone, B Licheri, P Puligheddu, E Scano  
Corresponding author: [antene.cannas@izs-sardegna.it](mailto:antene.cannas@izs-sardegna.it) This work was supported by Regione Autonoma della Sardegna

# Stafilococchi Coagulasi negativi (SCN)

Batteri opportunisti presenti nella flora microbica cutanea degli animali

Definiti da molti autori come “*patogeni minori*” sono responsabili di mastiti subcliniche (Bergonier 2003)

Patogenicità variabile, da forme asintomatiche o lievi a casi sporadici di forme cliniche importanti (*Staphylococcus haemolyticus*, *cromogenes* ed *epidermidis*).

Importanti i riflessi sulle produzioni.

# Stafilococchi Coagulasi negativi (SCN)

Specie	Sassari	Cagliari	Oristano	Nuoro	Totale
<i>S. epidermidis</i>	30	11	22	46	109
<i>S. chromogenes</i>	15	31	17	27	90
<i>S. simulans</i>	6	6	10	11	33
<i>S. haemolyticus</i>	6	3	3	8	20
<i>S. caprae</i>	3	5	22	6	36
<i>S. warneri</i>	4	3	0	5	12
<i>S. hyicus</i>	1	0	0	0	1
<i>S. xylosus</i>	0	3	1	0	4
<i>S. capitis</i>	0	2	2	0	4
<i>S. hominis</i>	0	1	0	0	1
<i>S. equorum</i>	0	2	0	3	5
<i>S. muscae</i>	0	0	0	3	3
<i>S. pasteurii</i>	0	0	0	1	1
<i>S. aureus</i>	0	0	0	2	2
Non eseguibile	0	0	0	8	8
<b>Totale</b>	<b>65</b>	<b>67</b>	<b>77</b>	<b>120</b>	<b>329</b>

Fra gli SCNI è la specie più frequentemente isolata negli ovini

## ***Staphylococcus epidermidis***

La sua patogenicità varia in rapporto alla presenza di markers di patogenicità (Simojoki 2012)

Spesso associata ad elevati valori di CCS (Bergonier et al. 2003)



# Altri microrganismi

*Streptococcus zooepidemicus* (capre)

*Listeria spp*

*Nocardia spp*

*Aspergillus fumigatus*

# FATTORI PREDISPONENTI ALLA MASTITE

## Fattori individuali

- Conformazione mammaria
- Età della pecora
- Difese locali
- Alimentazione

## Fattori ambientali

Impianto mungitura

Igiene mungitura

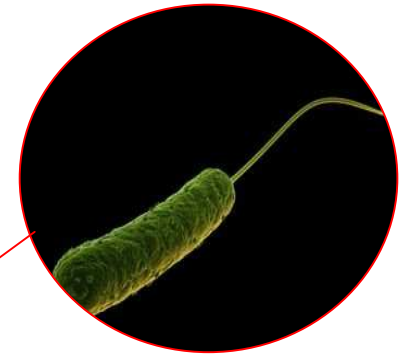
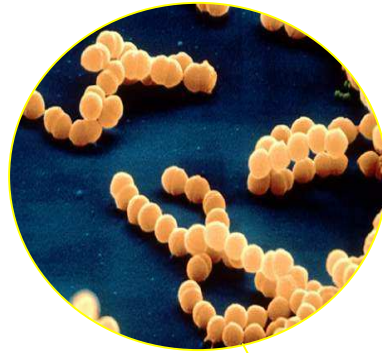
Lettiera



- Come vettore di batteri tra gli animali
- Come vettore di batteri tra capezzolo e cisterna
- Riducendo le difese naturali del capezzolo (cute e sfintere)

## MUNGITRI





# **Meccanismi di difesa della mammella**

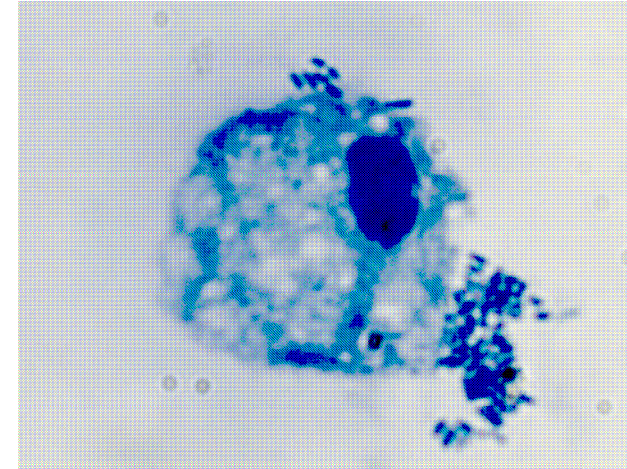
Componente umorale

Componente cellulare

# Componente cellulare

## Macrofagi

Ruolo sentinella per l'ingresso di batteri nella mammella. Cellule in grado di fagocitare microorganismi e presentare gli antigeni. Secrezione di citochine regolatorie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6



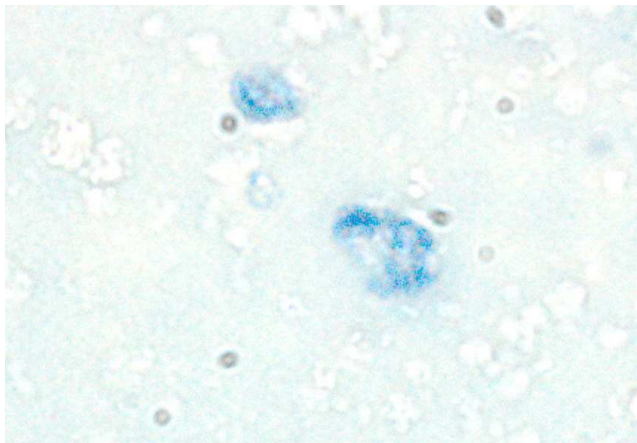
## Cellule epiteliali

Nel latte rappresentano cellule di sfaldamento derivate dal normale turn-over cellulare o dal danneggiamento dell'epitelio mammario.

Esprimono l'antigene MHC II.

Sono in grado di legare antigeni batterici e “presentarli” ai linfociti T.

Producono citochine pro-infiammatorie in seguito a infezione: IL-8.





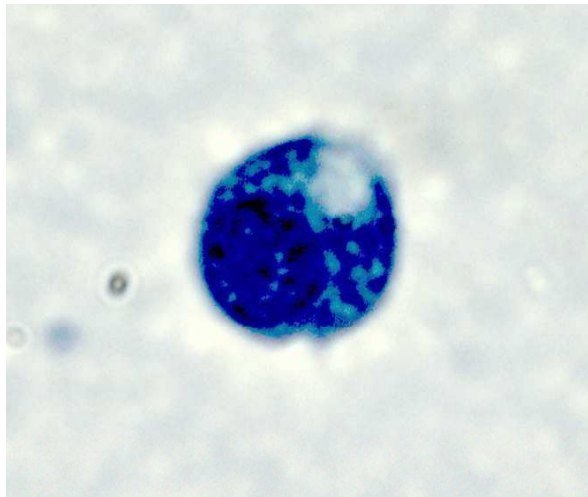
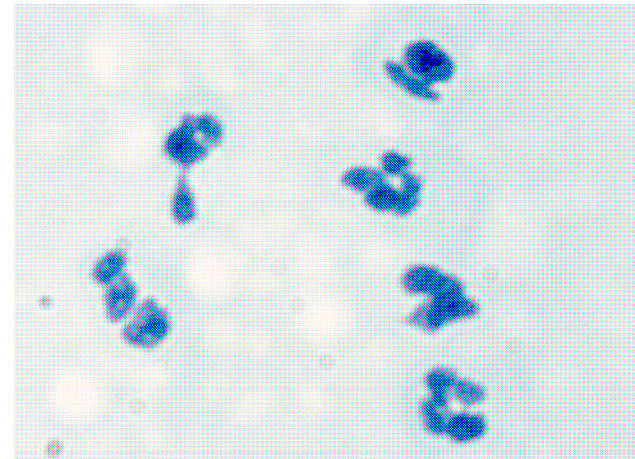
# Componente cellulare

## Granulociti neutrofili (PMN)

Cellule prodotte nel midollo osseo, vengono rilasciate nel torrente circolatorio per poi migrare nei tessuti.

Sono le cellule più numerose nelle mammelle infette, specializzate nella fagocitosi, svolgono un ruolo essenziale nella risoluzione dell'infezione

Vitalità nel latte 24-48



## Linfociti

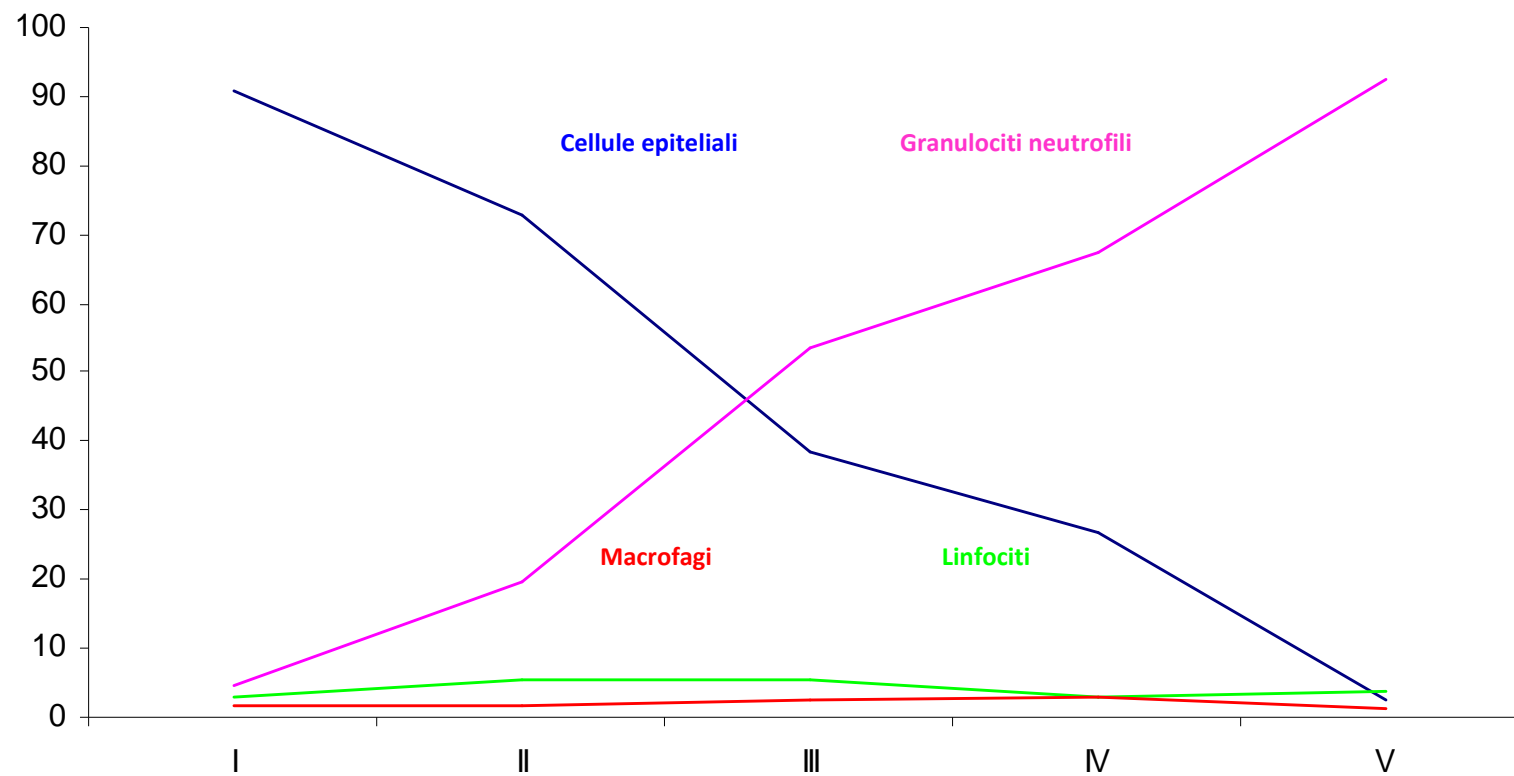
**Linfociti B:** si trasformano in plasmacellule producono anticorpi

**Linfociti T:**

*T helper* - *CD4* - modulano la risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata tramite la produzione di citochine

*T citotossici* - *CD8* - attività citolitica diretta contro Ag specifici

*Linfociti T $\gamma\delta$* : riconoscimento Ag non legati a MHC



**Tabella 1. Classi di CCS**

Classi	Valore (cellule/ml*1000)
I	<300
II	301-500
III	501-1000
IV	1001-2000
V	>2000



**Table 1**

Somatic cell counts ( $\times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup>) in uninfected ewe udder halves and those infected with different pathogens.

**References****Pathogens**

	Uninfected	Coagulase-negative staphylococci	Minor pathogens	Major pathogens
González-Rodríguez et al. (1995)	130	1200	450–490	4000–4800
Leitner et al. (2001)	388	1371–2129	–	–
Ariznabarreta et al. (2002)	70	–	72–160a	850–19,000b
Gonzalo et al. (2002)e	77	1005c	131a	1841
Suarez et al. (2002)e	244.5	–	1044d	2046

a Including novobiocin-resistant coagulase-negative staphylococci.

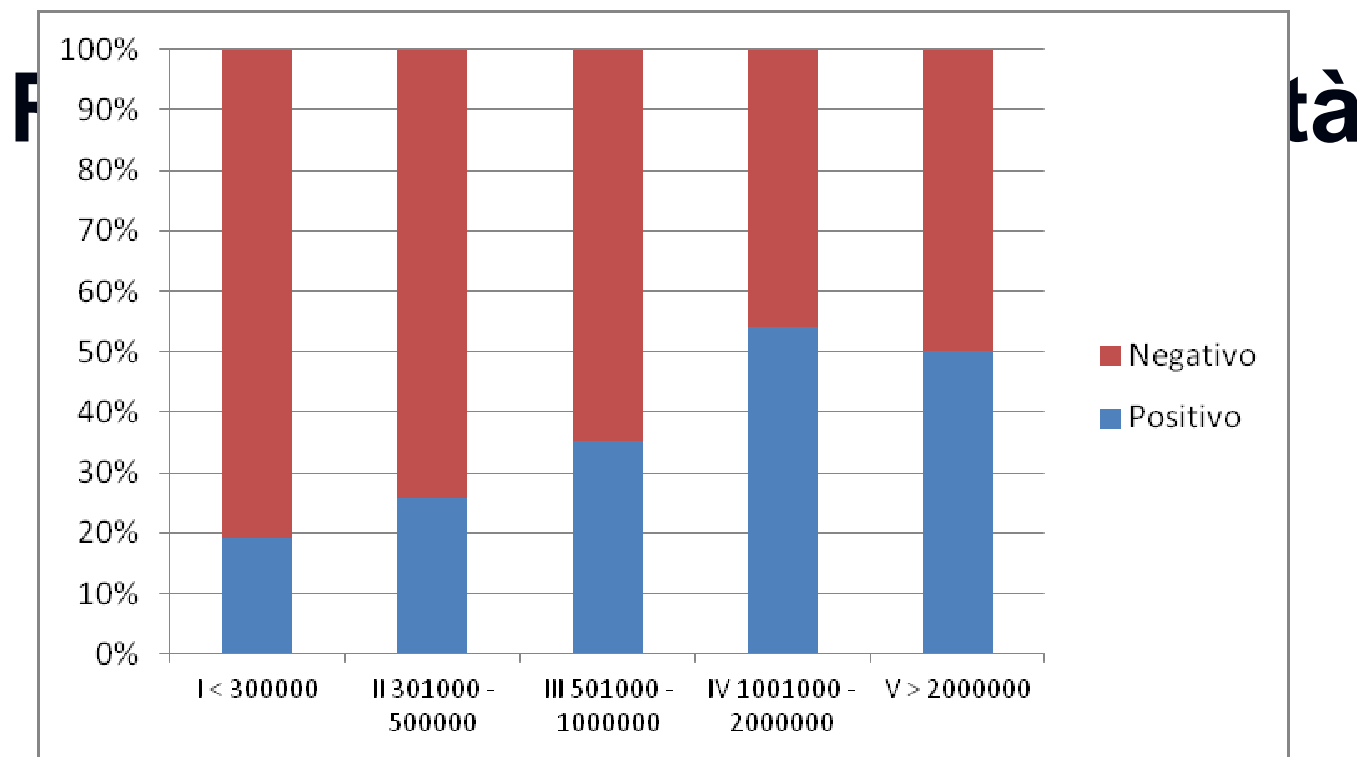
b Including novobiocin-sensitive coagulase-negative staphylococci.

c Only novobiocin-sensitive coagulase-negative staphylococci.

d Including coagulase-negative staphylococci.

e Geometric means of the somatic cell counts are shown.

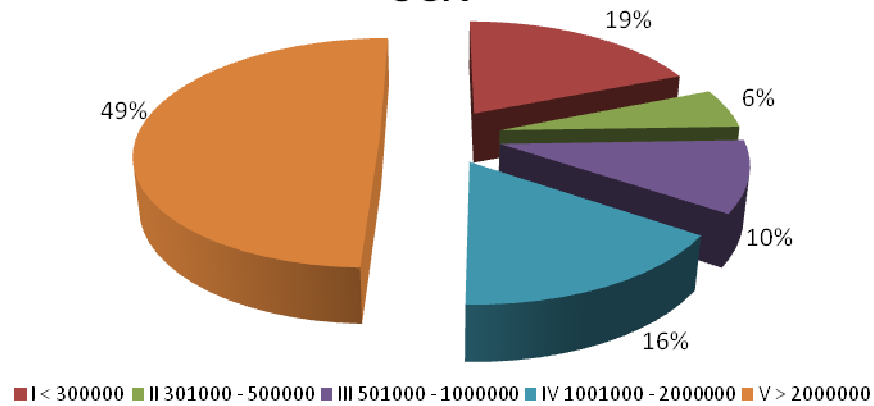
Frequenza isolamenti microrganismi per classe di cellule



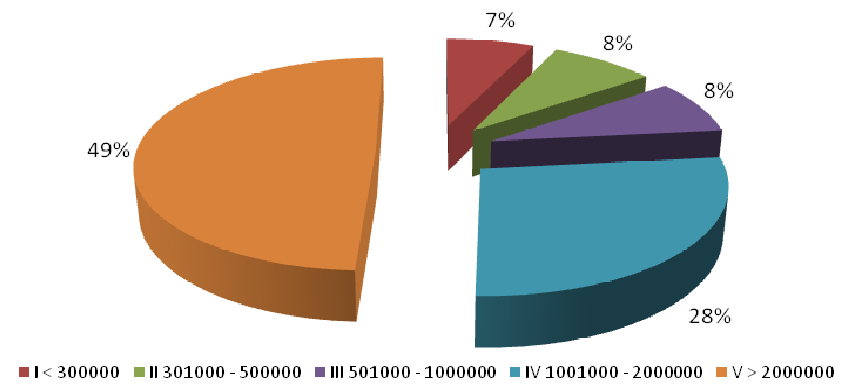
Esito	n.
Positivi	2633
Negativi	4356
Dubbi ( prelievo scorretto)	182

3  
d

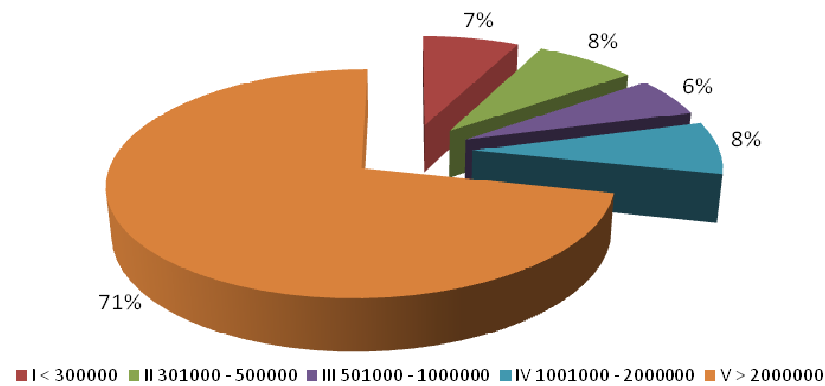
**SCN**



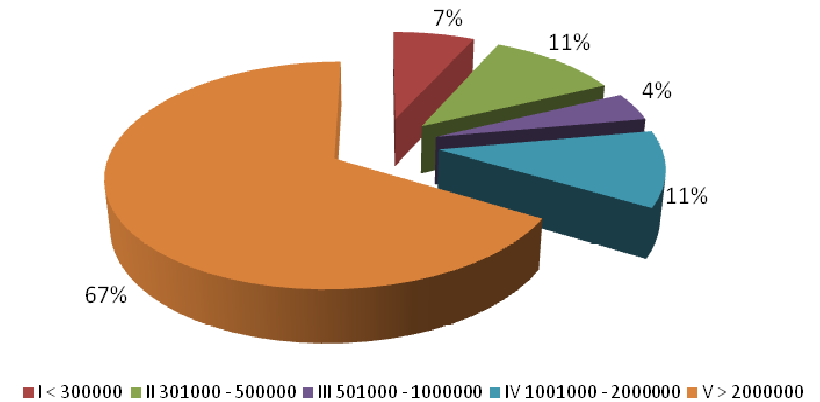
***Streptococcus uberis***



***P. aeruginosa***



***Staphylococcus aureus***



# Strumenti di valutazione della salute della mammella in allevamento

Esame clinico



(cellule somatiche)



Caratteristiche latte  
(colore, densità, odore)



INSUFFICIENTI A STABILIRE LA CORRETTA EZIOLOGIA

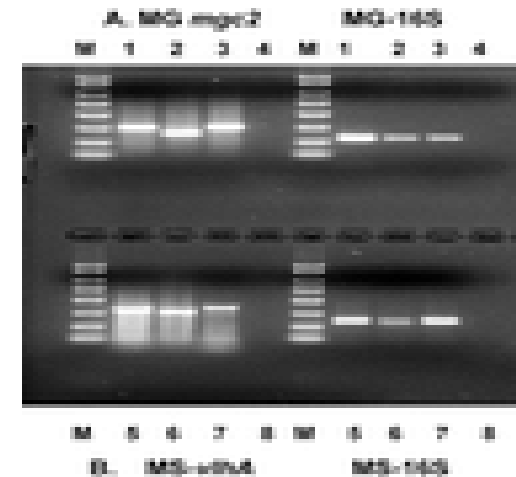
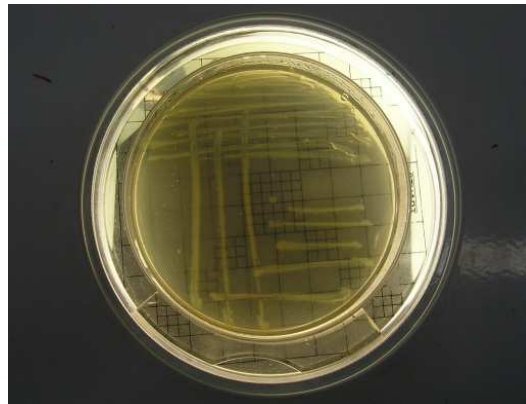
UTILI PER UNA DIAGNOSI DI LABORATORIO  
MIRATA

E



la

# Strumenti di valutazione della sanità della mammella in laboratorio



Modificazioni della composizione del latte in caso di  
infiammazione della mammella

Isolamento e identificazione dei microrganismi responsabili  
di patologie a carico della mammella

# Valutazione cellule somatiche

## **A livello individuale:**

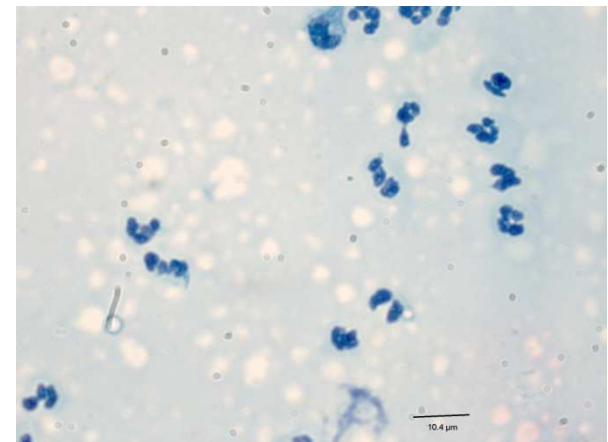
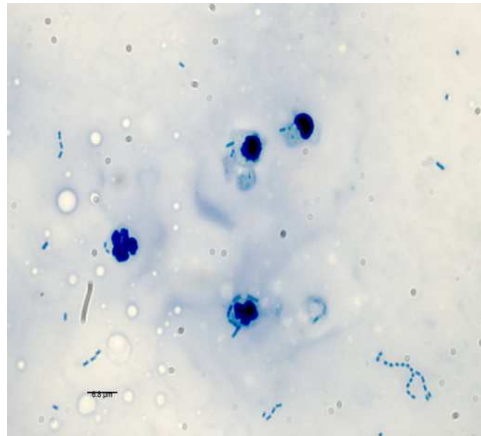
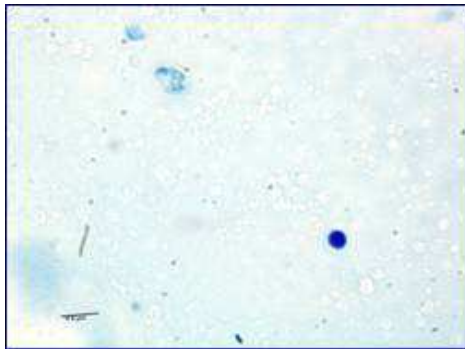
Indicatore dello stato sanitario e produttivo dell'animale

## **Sul latte di massa:**

Indicatore della prevalenza di emimammelle infette all'interno dell'allevamento

**Il CCS in una mammella ovina sana non supera il valore di:**

**300.000/ml**

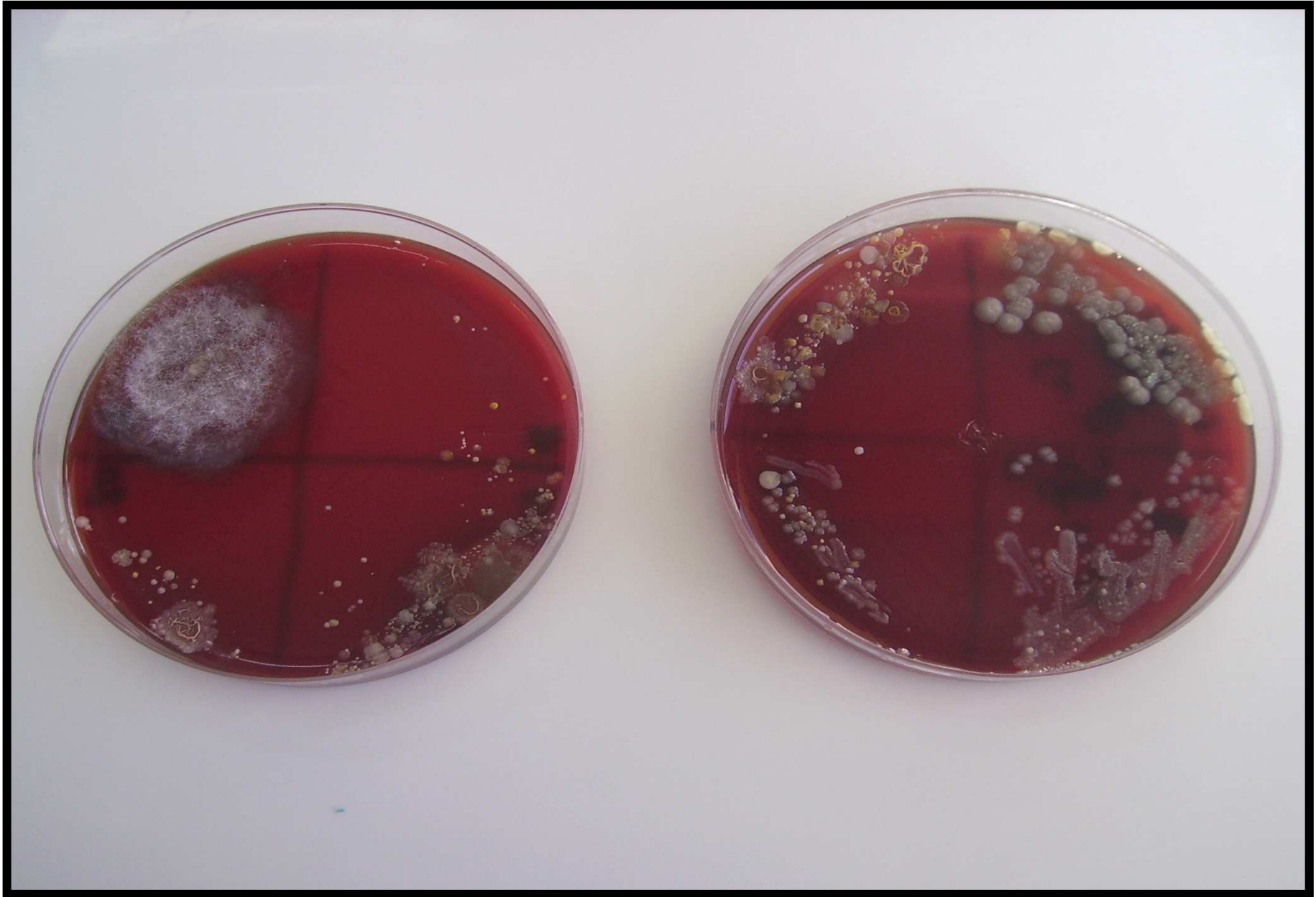


L'esame batteriologico è indispensabile per:

- identificare il microrganismo per definire le strategie di controllo e applicare
- Monitorare le patologie presenti in allevamento
- Valutare la sua sensibilità agli antibiotici
- Valutare l'efficacia della terapia
- Produrre vaccini stabulogeni/autovaccini
- Importante il campionamento

## **Esame batteriologico**





**Esito prelievo non asettico**

~~Assenza di crescita batterica~~  
**Possibili risultati esame colturale**

Presenza di crescita colonie pure

Presenza di crescita colonie miste

Crescita di flora batterica aspecifica

**Problemi**  
**Falsi positivi** – isolamento in coltura pura – assenza  
infezione mammaria

**Falsi negativi** – assenza di crescita batterica – presenza  
infezione mammaria

## Valutazione dei risultati

Anche in assenza di infiammazione endomammaria, l'isolamento di un microrganismo responsabile di mastiti contagiose costituisce un elemento di rischio per l'allevamento

E' necessario distinguere il  
**Valutazione dei risultati**  
microorganismo responsabile del processo  
**mastiti ambientali**  
patologico dai contaminanti.

Importante la scelta degli animali da  
campionare e la tecnica di prelievo.

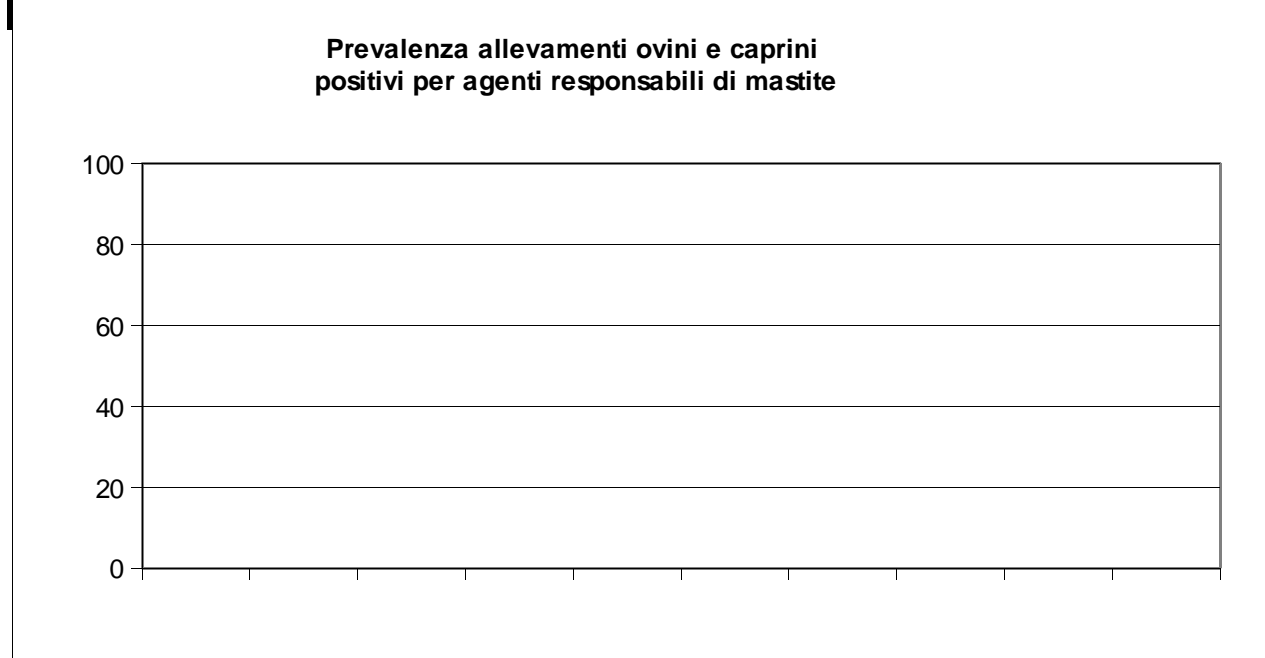
National Mastitis Council  
Research Committee Report

Interpreting Bacteriological Culture Results to Diagnose  
Bovine Intramammary Infections

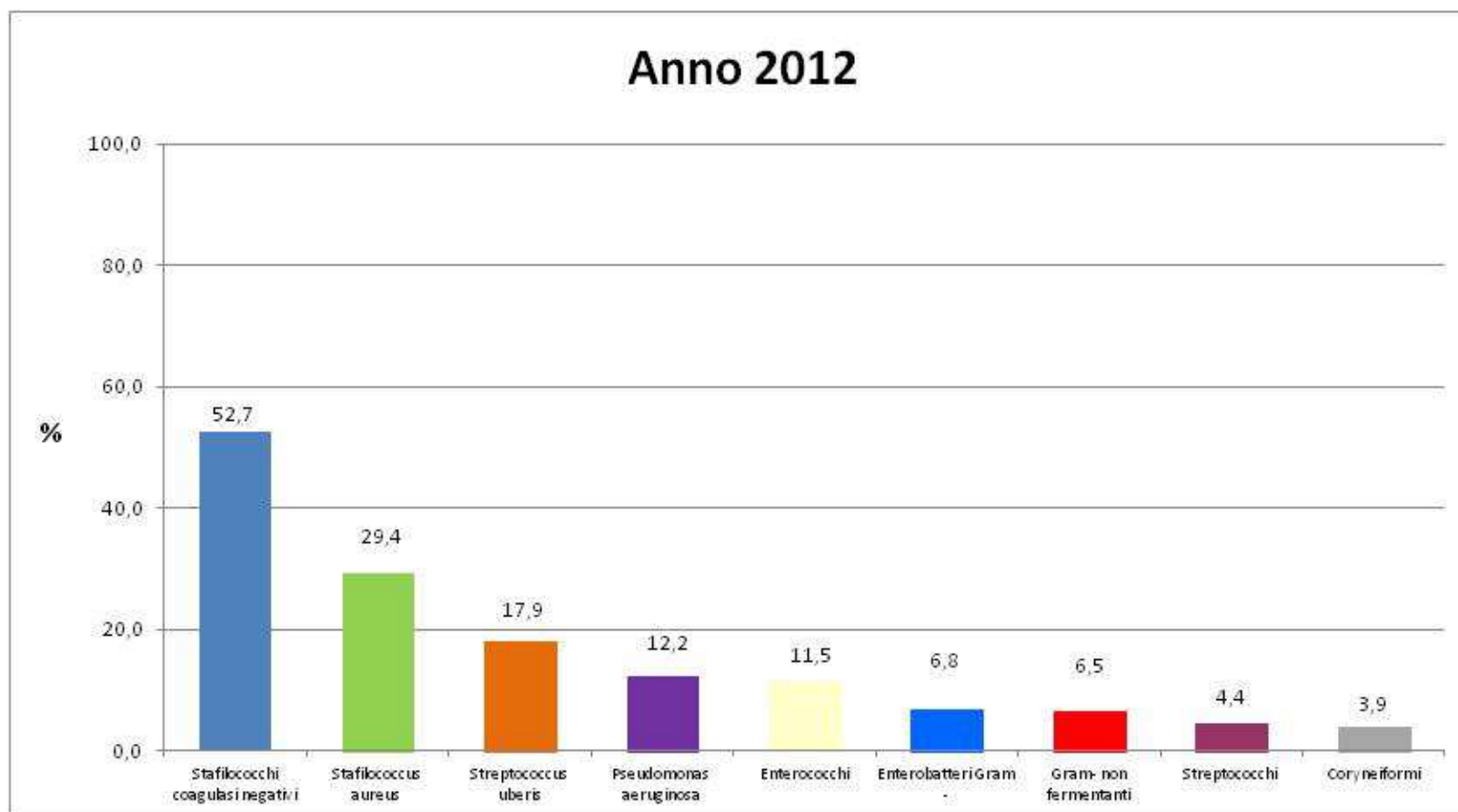
Table 1: Definitions and features of intramammary infection and mastitis.

	Intramammary Infection	Mastitis
International Dairy Federation definition	An infection occurring in the secretory tissue and/or the ducts and tubules of the mammary gland.	Inflammation of one or more quarters of the mammary gland, almost always caused by infecting microorganisms.
Diagnosis mainly by:	Bacteriological culture of milk samples obtained aseptically.	<u>Subclinical</u> : Measure of indicators of inflammation in milk samples such as somatic cell count (SCC) or California Mastitis Test (CMT). <u>Clinical</u> : Visual observation of milk and/or physical examination of the udder.

# % allevamenti positivi al colturale rinetto



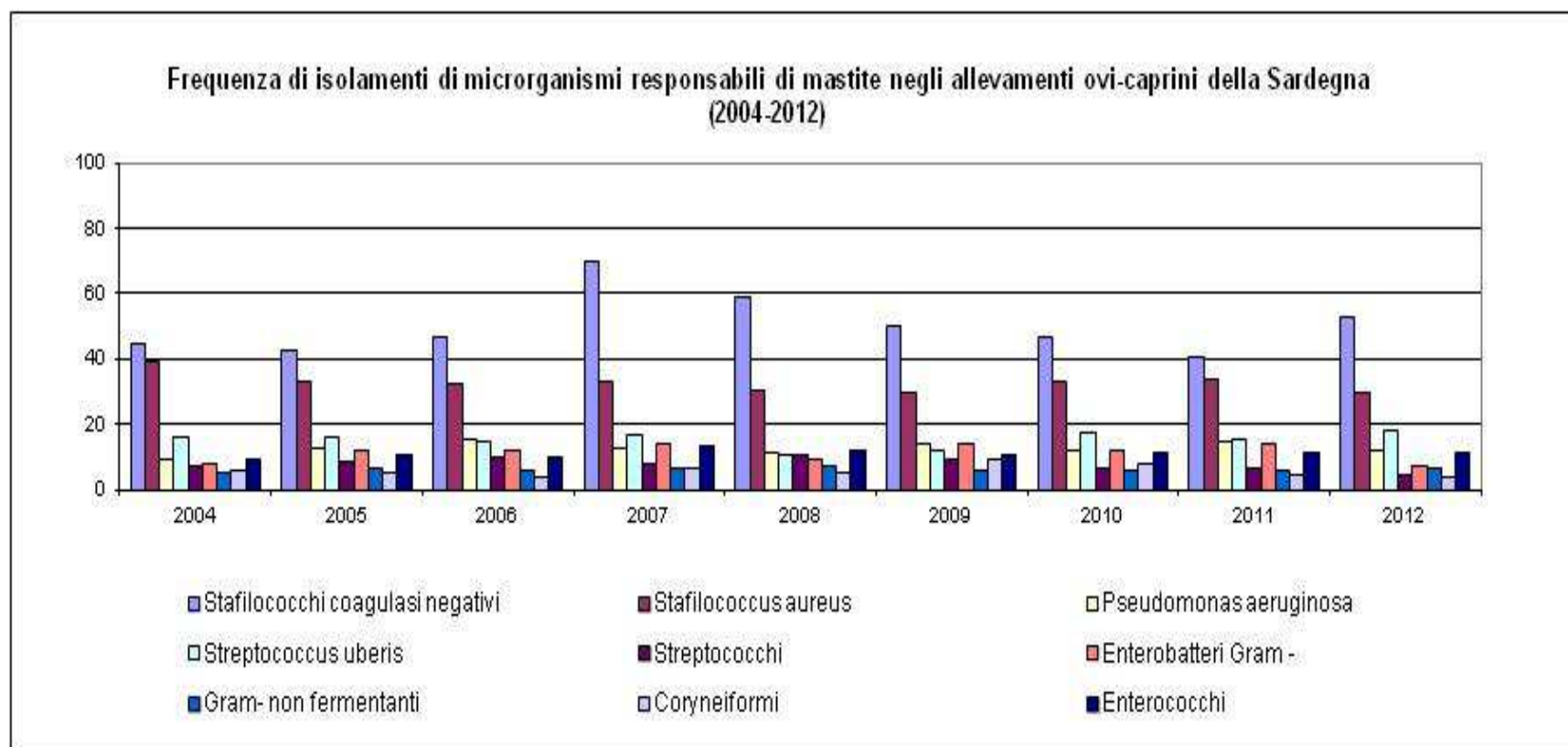
# Epidemiologia mastiti regione Sardegna negli ovini e nei caprini 2012 (Frequenza di isolamenti negli allevamenti)



*N. allevamenti: 541*



# Epidemiologia mastiti regione Sardegna negli ovini e nei caprini 2004-2012 (Frequenza di isolamenti negli allevamenti)



n. Allevamenti controllati 6695, media/anno 744, (max 1046-min 541)

