

**Giornata di studio**

**L'ATTIVITÀ DI RICERCA PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA:  
RISVOLTI APPLICATIVI**

**“Uso fraudolento di Somatotropina  
negli allevamenti da latte:  
aspetti diagnostici e di sicurezza alimentare”**

Roma 29 Novembre 2012

Simonetta Amatiste - Carlo Boselli



## Introduzione

### la Somatotropina

*La somatotropina è un ormone peptidico sintetizzato dalla adenoipofisi, composto da 191 aminoacidi (peso di circa 22 kDa).*

*Nei vertebrati regola lo sviluppo, la crescita e la riproduzione, attraverso effetti sugli organi bersaglio diretti o mediati da altre molecole quali le somatomedine o fattori IGF1 (Insuline like growth factors).*

*L'azione induce un aumento della lipolisi, della sintesi proteica con effetti sulla galattopoiesi, per questo motivo viene utilizzata per stimolare la produzione di latte nei ruminanti.*



## La Somatotropina naturale e ricombinante

Esistono 4 varianti conosciute della bST nativa, dovute alla combinazione della presenza di una valina al posto di una leucina in posizione 127 e dall'assenza dell'alanina in posizione 1.

La somministrazione di rbST induce nell'animale un aumento della produzione lattea.

Stime ufficiali condotte in USA riportano che a seguito dell'autorizzazione all'impiego di rbST (1993), è stato registrato un incremento di produzione di latte pari al 12%.



## Somatotropina ricombinante: le norme e gli effetti sulla salute

L'Unione Europea, dopo una lunga moratoria, interpellati anche lo SCVPH (Sub-Committee on Veterinary Public Health) e lo SCAHAW (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare), ha definitivamente proibito l'utilizzo di rbST con la **Decisione del Consiglio 1999/897/CE**.

In merito alla **salute pubblica**, un rischio diretto associato all'uso della rbST è legato agli aumentati livelli di Insulin Like growth factor (IGF-1), molecola identica nell'uomo e nel bovino, considerata un induttore della proliferazione cellulare.

Dimostrata l'associazione fra elevati livelli di IGF-1 serico e la presenza di tumori mammari e prostatici nell'uomo.

Per quanto concerne il **benessere animale**, numerosi studi hanno evidenziato un aumento nell'incidenza di mastiti cliniche e sub-cliniche (25%), di laminiti (50%) e di infertilità (18%) negli animali sottoposti a trattamento.



## La Somatotropina ricombinante e i problemi ispettivi

*L'estrema somiglianza fra rbST e bST (sostituzione in posizione 1 di una Metionina con una Valina) rendono particolarmente complicato lo sviluppo di sistemi analitici di controllo in grado di evidenziare con certezza la presenza di molecole ricombinanti negli animali trattati.*

*Per svelare la somministrazione illecita si ricerca la presenza di rbST nel sangue ed eventualmente nel latte.*



## **L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella bovina da latte**

**9SOM** - Sviluppo di metodiche analitiche per il controllo del trattamento con somatotropina ricombinante (rBST) nelle bovine da latte.

**Ricerca Corrente 2001 - 01/06/2002 31/05/2004**

**9TAR** - Studio proteomico e molecolare ai fini dell'individuazione di targets diagnostici per il controllo del trattamento con somatotropina ricombinante nella bovina da latte.

**Ricerca Corrente 2004 - 25/05/2005 25/05/2006**

*Ricerche condotte in collaborazione con:*

- 1) Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Università di Pisa*
- 2) C.R.A. P.C.M. di Tor Mancina – Monterotondo - Roma*



## L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella bovina da latte

### obiettivi

Valutazione e comparazione dei profili metabolici e dell'esame emocromocitometrico del gruppo sottoposto a trattamento e del gruppo di controllo

Valutazione e comparazione delle caratteristiche qualitative del latte prodotto dai due gruppi

Valutazione e comparazione dei parametri riguardanti la sfera riproduttiva

Valutazione dello stato di ingrassamento (Body Condition Score, BCS ) degli animali.



# L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella bovina da latte

## obiettivi

- Produzione e caratterizzazione degli anticorpi monoclonali e policlonali anti somatotropina.
- Messa a punto di un metodo immunoenzimatico per la rilevazione di bST ed rbST.
- Produzione e caratterizzazione degli anticorpi policlonali anti IGF-1
- Sviluppo di un test immunoenzimatico a sandwich per la quantificazione dell'IGF-1 nel siero bovino





## L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella bovina da latte

### obiettivi

- Messa a punto della tecnologia “**real-time biospecific interaction analysis**”, o **analisi di interazioni bio-specifiche in tempo reale (BIA)**  
basata sull'impiego di un biosensore ottico per misurare quantitativamente e monitorare in tempo reale la cinetica dell'interazione diretta tra la molecola rBST e anticorpi monoclonali o policlonali diretti contro di essa e misurarne la quantità nel siero di bovine pre-trattate in vivo con l'ormone.
- Ricerca di alterazioni di espressione di geni coinvolti nella regolazione dell'asse somatotropo (recettori mediatori ormonali).



## L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella bovina da latte

### Materiali e Metodi

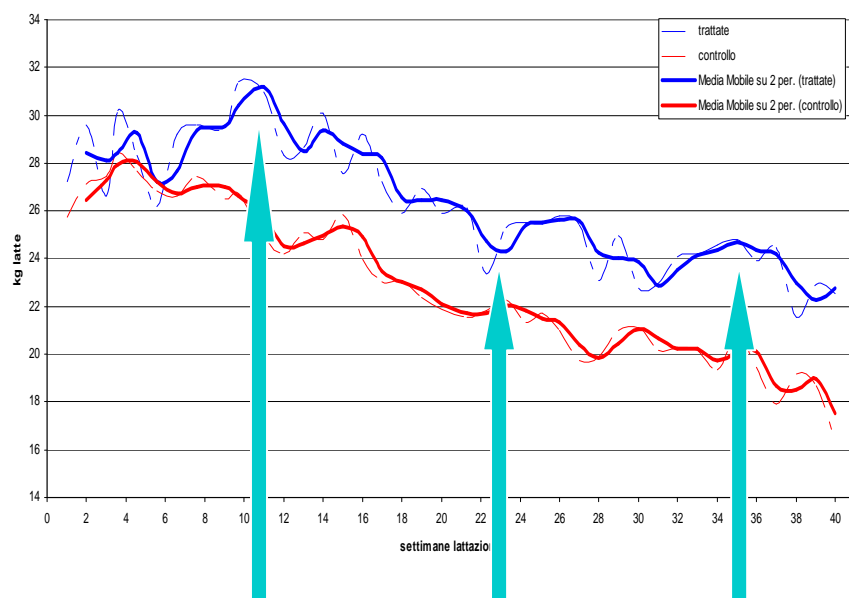
- Due gruppi omogenei (10 + 10) di vacche di razza Frisona Italiana in lattazione (ISZ) omogenee per numero di parti e stato di lattazione.
- Il gruppo Sperimentale (S), è stato sottoposto a trattamento farmacologico con una preparazione commerciale di r-BST (500 mg/dose a lento rilascio) a partire in media dalla ottava settimana dall'inizio della lattazione fino alla fine della lattazione standard. Al gruppo di Controllo è stata somministrata una soluzione salina.
- E' stato valutato lo stato di condizione corporea degli animali nel corso della prova (BCS).
- E' stata registrata la produzione di latte nel corso della prova e con cadenza settimanale è stato prelevato un campione di latte individuale da sottoporre alle principali analisi chimico fisiche e citologiche (grasso, proteine, lattosio, caseine, urea cellule somatiche).



# L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella bovina da latte

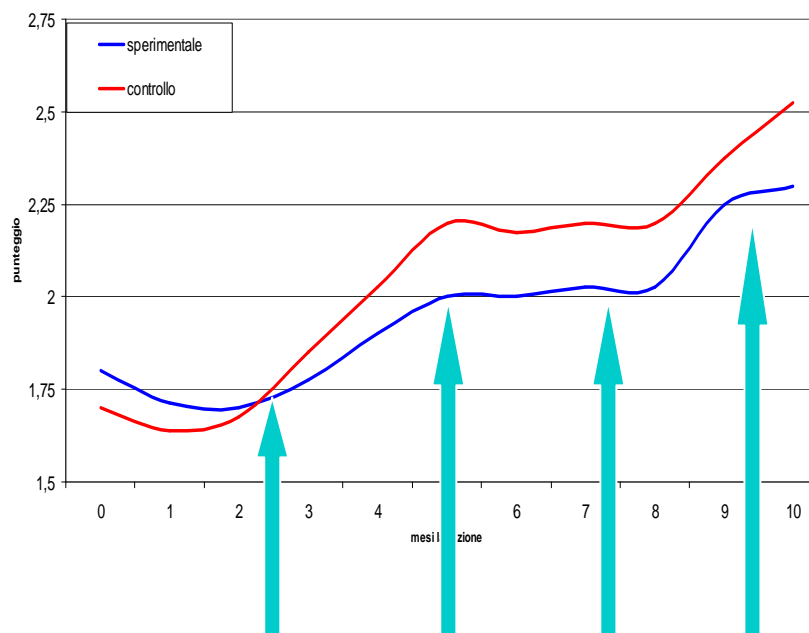
## Risultati 1

GRAFICO 1: EFFETTO DELL'r-bST SULLE PRODUZIONI DI LATTE



**Incremento medio della produzione di latte nel gruppo trattato (linea blu) del 15%.**

GRAFICO 2: EFFETTI DELL'r-bST SULLA CONDIZIONE CORPOREA

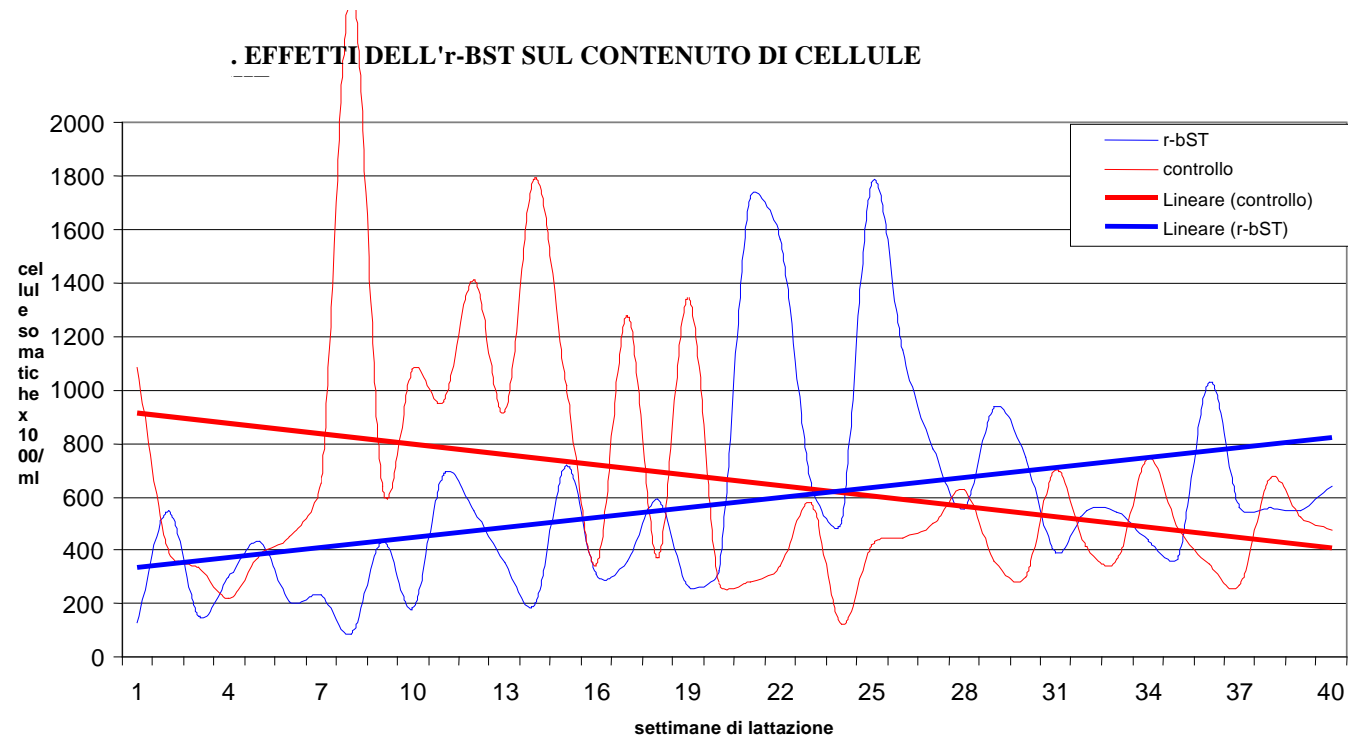


**Peggioramento dello stato di Condizione Corporea (BCS) nel gruppo trattato (linea blu).**



# L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella bovina da latte

## Risultati 2

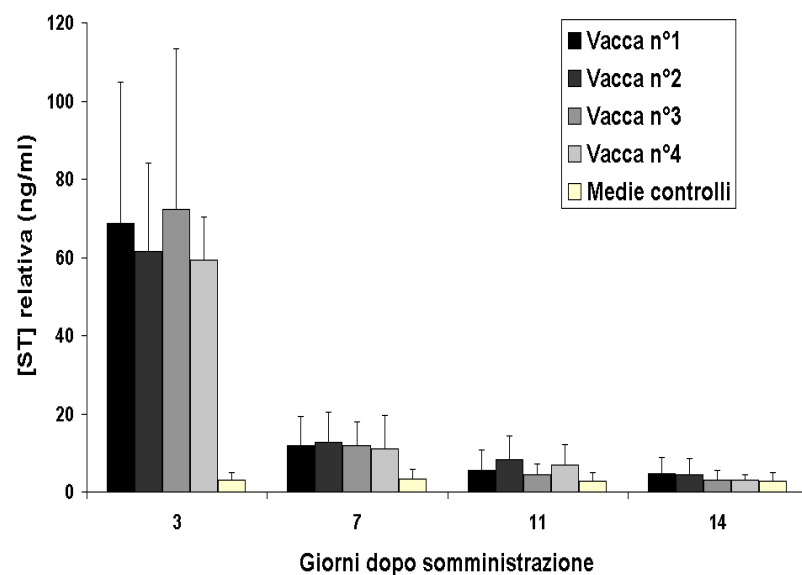


Andamento del contenuto in cellule somatiche nei gruppi di studio (*trattato* linea blu, *controllo* linea rossa).

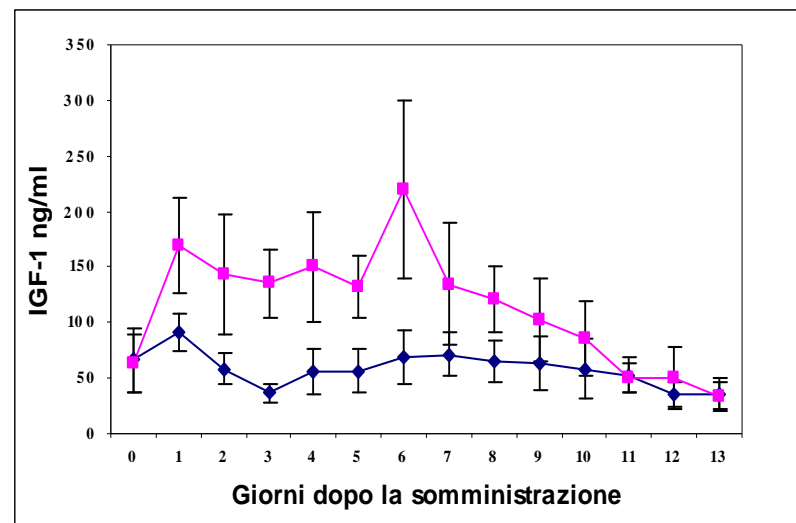


# L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella bovina da latte

## Risultati 3



Concentrazioni seriche medie di ST (relative a 4 vacche), nei giorni seguenti la somministrazione del farmaco, confrontate con la media del gruppo di controllo.



Concentrazioni seriche medie di IGF-1, nei giorni seguenti la somministrazione del farmaco nel gruppo trattato (**colore fucsia**) e nel gruppo controllo (**colore nero**).



## L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella bovina da latte

### Risultati e Conclusioni

- Aumento della produzione di latte di circa il 15%
- diminuzione nel latte della concentrazione di Urea e Caseine nel gruppo trattato
- Evidenziato un **aumento considerevole** (fino a 20-100 volte i livelli basali medi) di **somatotropina serica** durante i primi sei giorni dopo ogni iniezione del farmaco ed un **aumento significativo** di **IGF-1** nel periodo di trattamento.
- Il periodo di **5-6 giorni dopo la somministrazione** quindicinale del farmaco, potrebbe risultare utile per evidenziare una netta alterazione dei parametri fisiologici, indice di un avvenuto trattamento.



## **L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella bufala Mediterranea Italiana**

**9RBS** - *Sviluppo di metodiche analitiche per il controllo del trattamento con somatotropina ricombinante (rbST) nelle bufale da latte.*

**Ricerca Corrente 2007 - 01/11/2008 31/10/2010**

**9BUF** - *Ricerca Finalizzata Bando Giovani Ricercatori : Development of analytical methods to identify treatments with recombinant somatotropin buffalos.*

**Ricerca finalizzata 2009 - 01/11/2011 30/11/2014 (in itinere)**

*Ricerche condotte in collaborazione con:*

- 1) Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Università di Pisa*
- 2) C.R.A. P.C.M. di Tor Mancina – Monterotondo - Roma*



## L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella Bufala Mediterranea Italiana

### Materiali e Metodi

- Due gruppi omogenei (8 + 8) di bufale di razza Mediterranea Italiana (CRA Monterotondo ex IZS) per numero di parti e stato di lattazione sono stati utilizzati.
- 8 Bufale → **Trattamento** con rbST (1 somministrazione ogni 14 gg, Hilac, LG Life Science) in un periodo di lattazione di circa 10 settimane dopo il picco.
- 8 Bufale → **Controllo** (1 somministrazione ogni 14 giorni di soluzione salina)

Prelievi Sangue: giorni 2 - 5 - 9 - 14 di ogni ciclo [determinazione bST e IGF1]

Prelievi Latte: giorni 2 - 5 - 14 dei cicli 2 e 5 [determinazione IGF1]

**Produzione di latte:** rilievi con lattoflussometro LactoCorder® per registrare la produzione di latte individuale e la curva di flusso di ciascuna bufala.

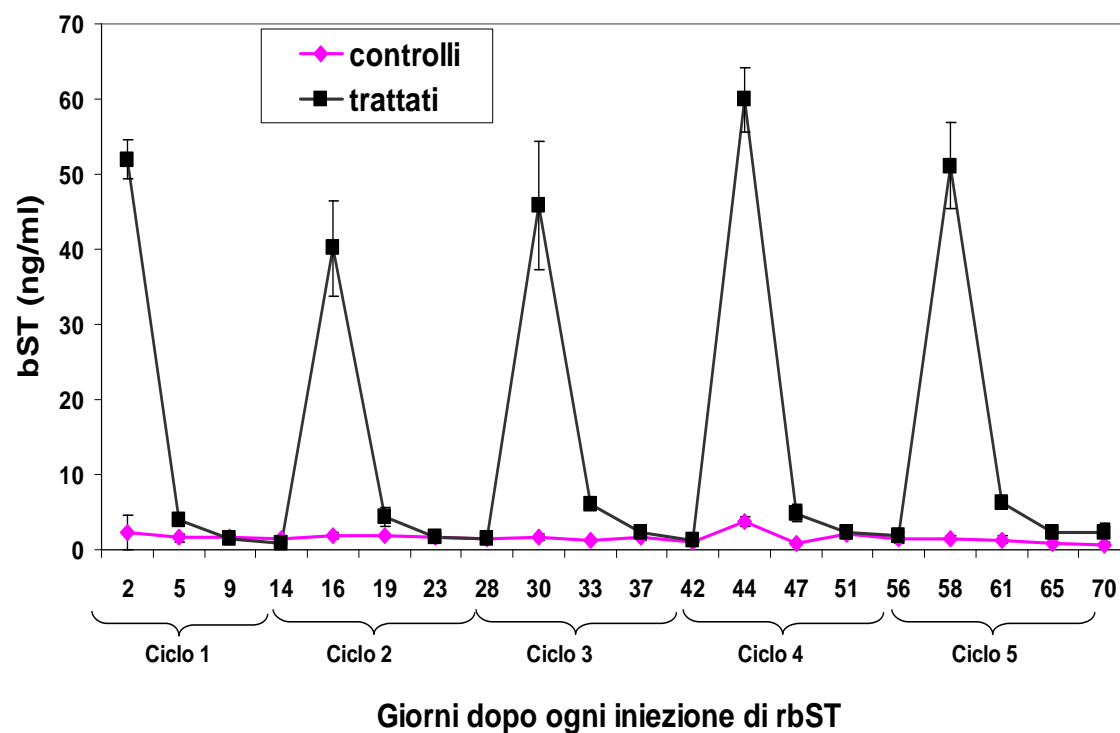
**Latte individuale:** E' stata registrata la produzione di latte mattutina e serale con cadenza di 14 giorni, su ciascun campione di latte sono state determinate le principali analisi chimico fisiche e citologiche (grasso, proteine, lattosio, caseina, urea, cellule somatiche).





# L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella Bufala Mediterranea Italiana

## Risultati 1

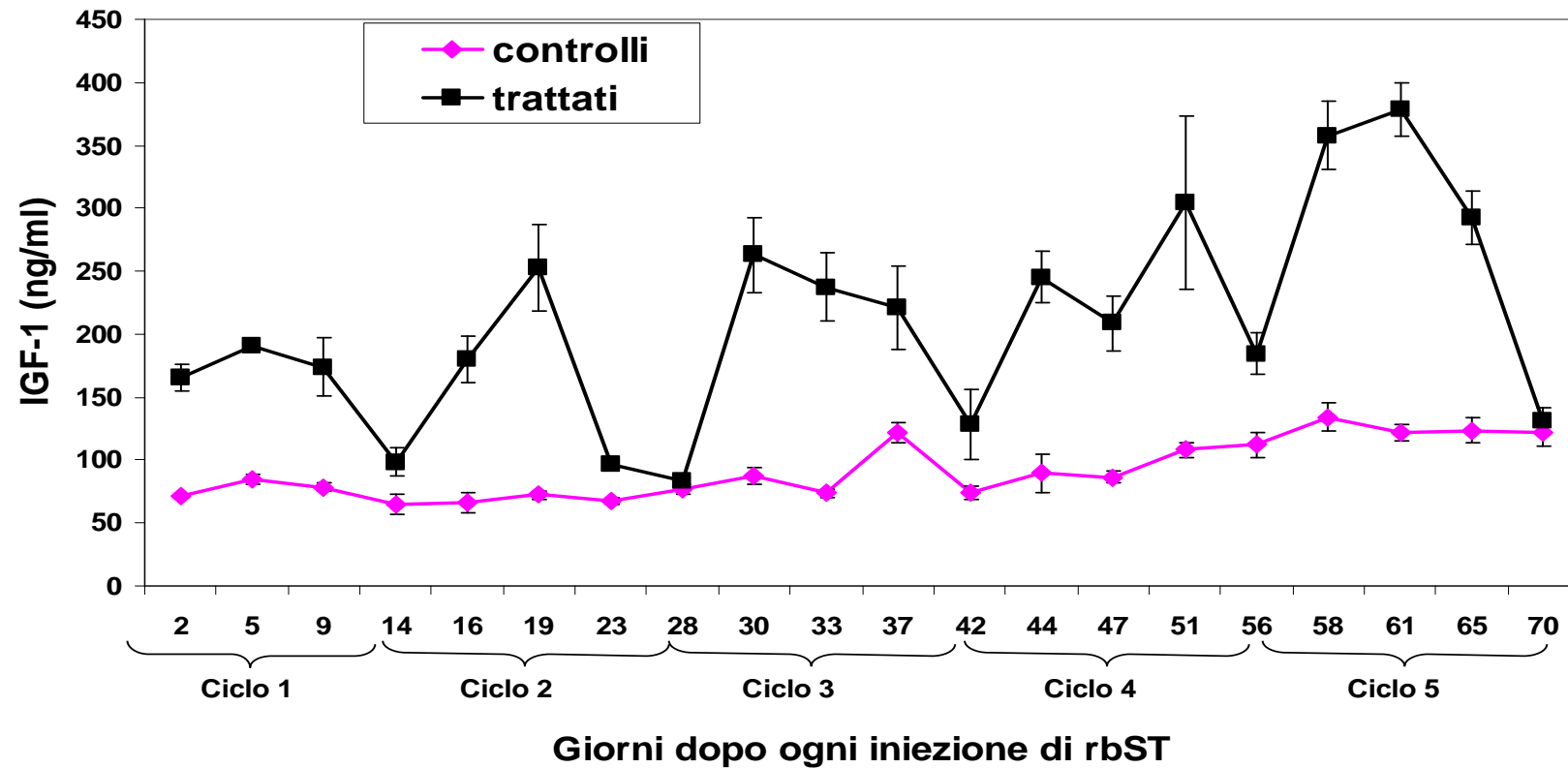


Andamento della concentrazione di bST nel siero nel gruppo trattato con rbST (linea nera) e nel gruppo di controllo (linea fucsia).



## L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella Bufala Mediterranea Italiana

### Risultati 2

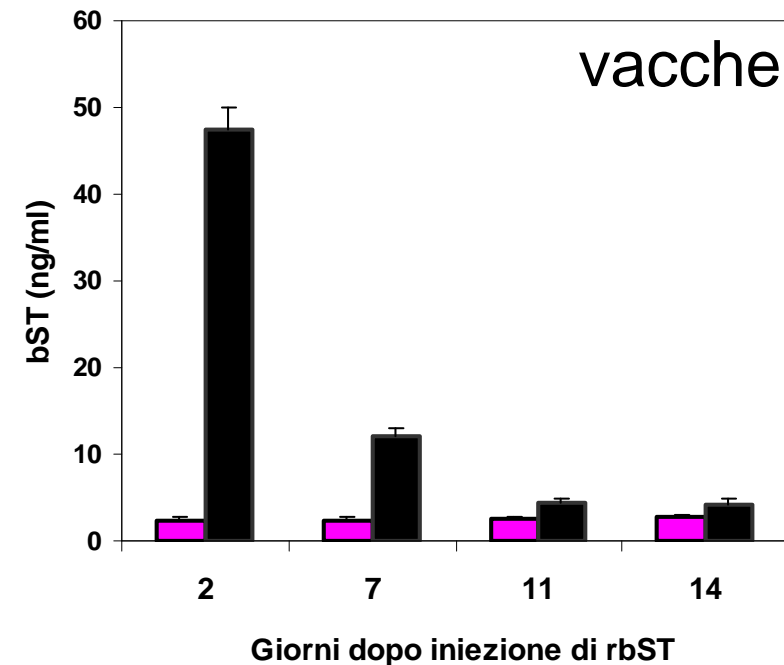
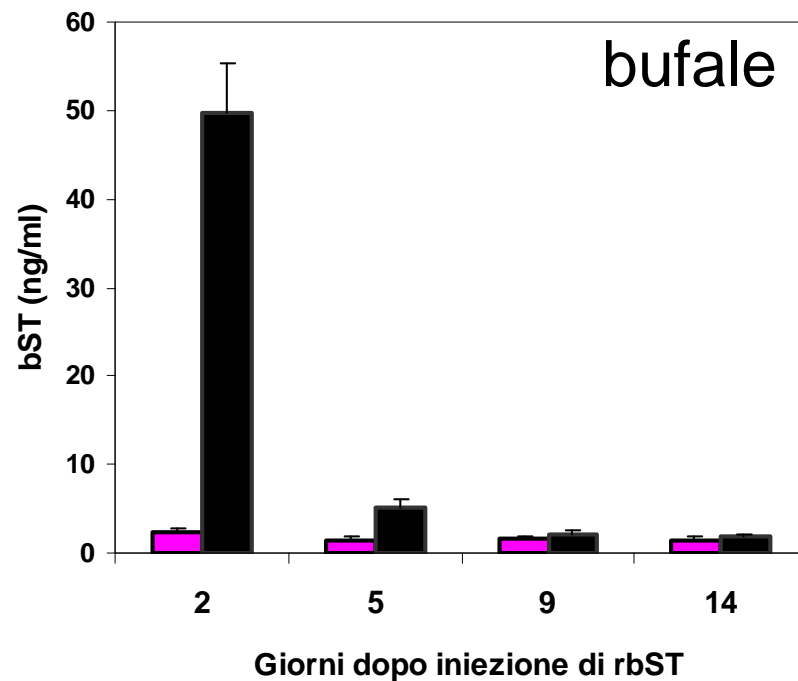


Andamento della concentrazione di IGF-1 nel siero nel gruppo trattato con rbST (linea nera) e nel gruppo di controllo (fucsia).



## L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella Bufala Mediterranea Italiana

### Risultati 3

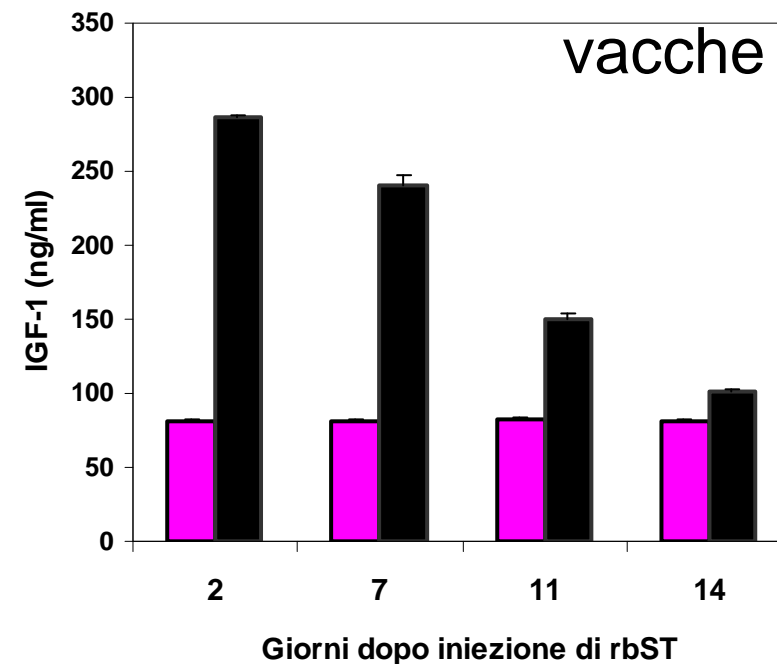
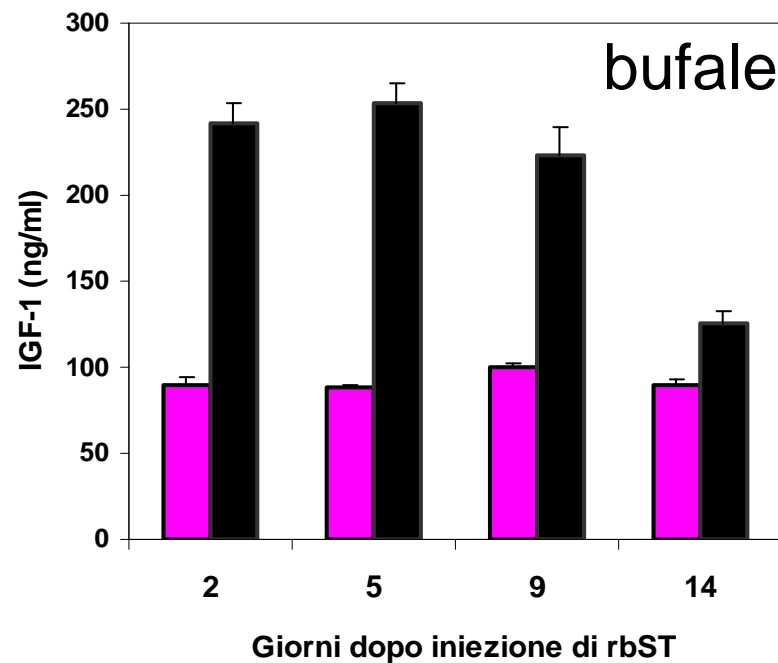


Livelli medi di bST serica durante l'intero ciclo di trattamento, nei gruppi trattati con rbST (colore nero) rispetto ai gruppi di controllo (**colore fucsia**), nella bufala (sinistra) e nella vacca (destra).



## L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella Bufala Mediterranea Italiana

### Risultati 4

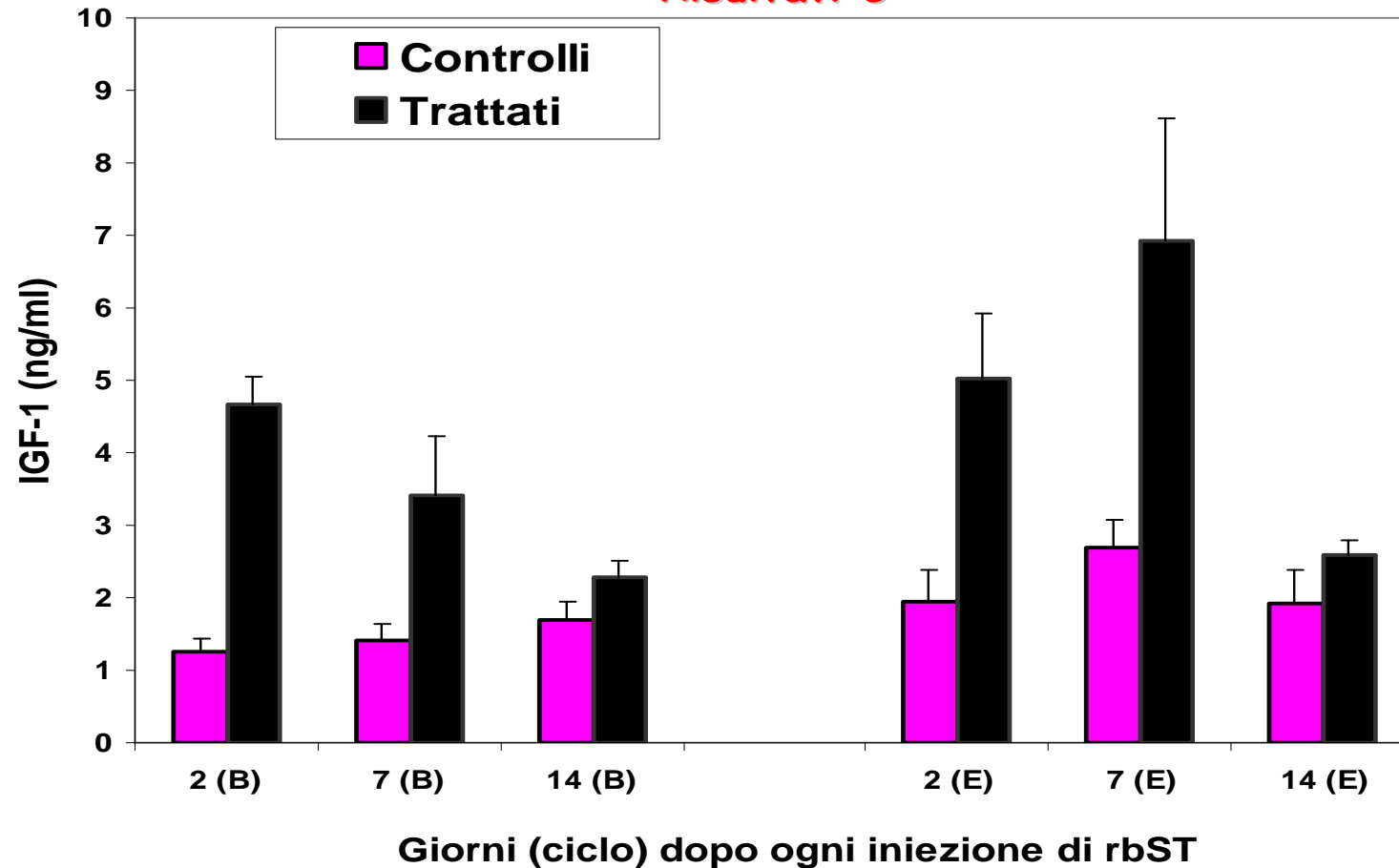


Livelli medi di IGF-1 serica durante l'intero ciclo di trattamento (14 giorni), nei gruppi trattati con rbST (colore nero) rispetto ai gruppi di controllo (**colore fucsia**), nella bufala (sinistra) e nella vacca (destra).



## L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella Bufala Mediterranea Italiana

### Risultati 5



Livelli medi di IGF-1 nel latte durante l'intero ciclo di trattamento, nel gruppo trattato con rbST (colore nero) rispetto ai gruppi di controllo (colore fucsia), nel 2° e 5° ciclo di somministrazione.



L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina  
ricombinante nella Bufala Mediterranea Italiana

**Risultati 6**

Parametri registrati	Gruppo Controllo	Gruppo Trattato
Grasso (%)	9,16 ± 0,60	9,23 ± 0,25
Proteine (%)	4,96 ± 0,05	4,79 ± 0,22
Lattosio (%)	4,63 ± 0,11	4,58 ± 0,11
Caseina (%)	4,14 ± 0,05*	4,00 ± 0,21*
Urea (mg/dL)	42,8 ± 10,0*	35,8 ± 7,0*
Cellule Somatiche (log10/mL)	5,89 ± 0,06	5,91 ± 0,06

\* Differenze significative per  $P < 0,05$

Parametri chimico fisici e citologici rilevati nel latte individuale durante i cicli di trattamento (media±esm.).



L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella Bufala Mediterranea Italiana

**Risultati 7**

<b>Parametri di mungibilità</b>	<b>Gruppo trattato</b>	<b>Gruppo controllo</b>
Produzione di latte (kg)	<b><math>3,97 \pm 1,16^*</math></b>	<b><math>3,00 \pm 1,05^*</math></b>
Conducibilità Elettrica (mS/cm)	<b><math>4,19 \pm 0,38</math></b>	<b><math>4,02 \pm 0,41</math></b>
Tempo di messa a latte (min)	<b><math>0,88 \pm 1,10^*</math></b>	<b><math>1,94 \pm 0,42^*</math></b>
Fase di plateau (min)	<b><math>2,05 \pm 1,90^*</math></b>	<b><math>1,11 \pm 1,09^*</math></b>
Fase di decremento (min)	<b><math>2,00 \pm 1,68</math></b>	<b><math>2,19 \pm 2,06</math></b>
Flusso medio (kg/min)	<b><math>0,80 \pm 0,39</math></b>	<b><math>0,79 \pm 0,47</math></b>
Tempo totale di mungitura (min)	<b><math>9,24 \pm 2,38</math></b>	<b><math>8,94 \pm 3,52</math></b>

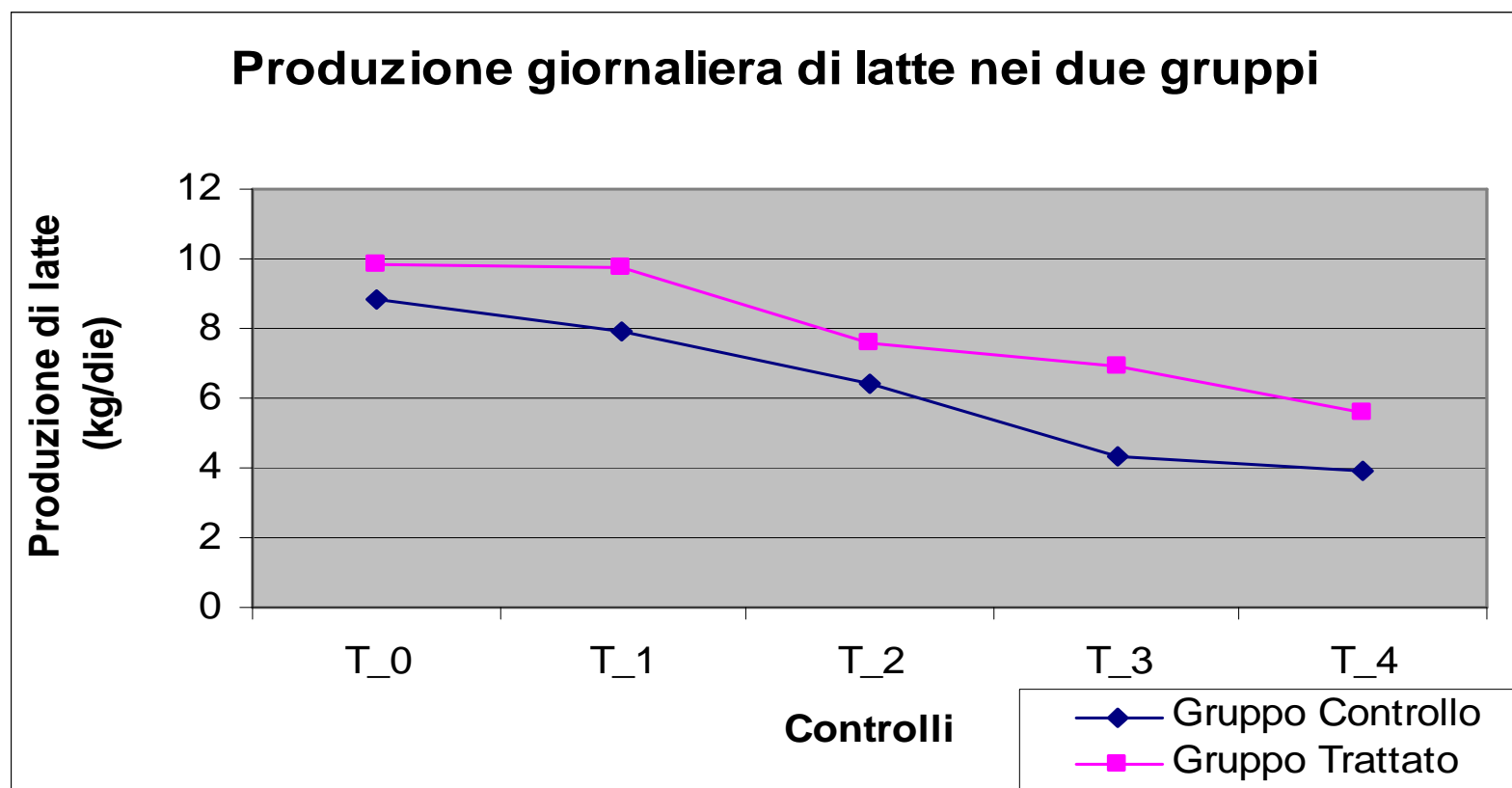
**\* Differenze significative per  $P < 0,05$**

Principali parametri di mungibilità rilevati durante i cicli di trattamento, nel gruppo trattato con rbST e nel gruppo di controllo (media $\pm$ dev st).



## L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella Bufala Mediterranea Italiana

### Risultati 9



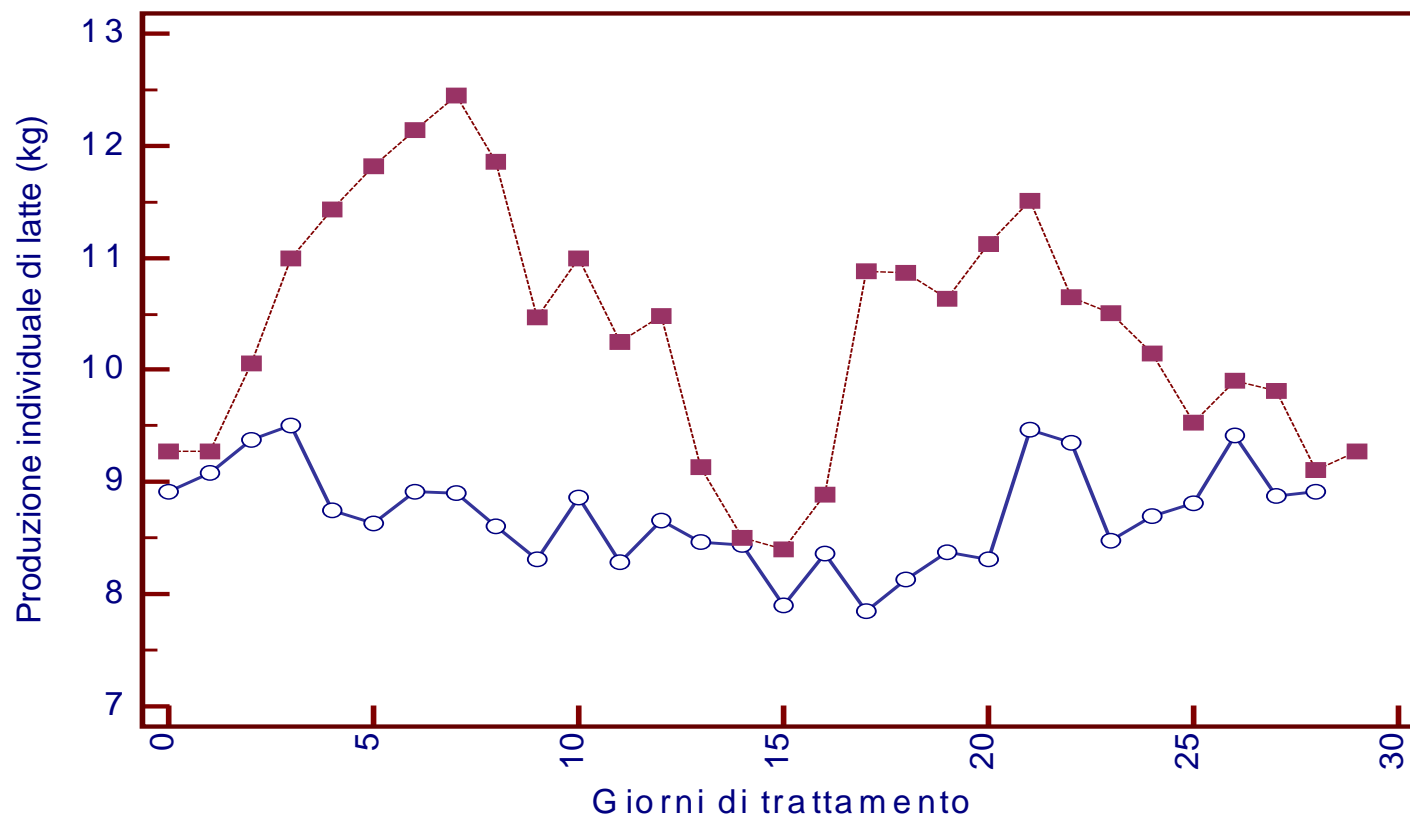
Andamento della produzione di latte nei due gruppi. La linea fucsia mostra il maggiore livello produttivo del gruppo trattato con rbST.





L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella Bufala Mediterranea Italiana -

Ricerca 9BUF in itinere  
risultati preliminari sulla produzione di latte



Andamento della produzione di latte nei primi due cicli di somministrazione rispettivamente nel gruppo trattato con rbST (**linea marrone**) e nel gruppo di controllo (**linea blu**). La maggiore produzione del gruppo trattato rispetto al controllo è stimata in ragione del 19,7% ( $10,38 \pm 1,08$  vs  $8,68 \pm 0,50$  kg;  $P < 0,001$ ).



**L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina  
ricombinante nella Bufala Mediterranea Italiana -  
Ricerca 9BUF RISULTATI PRELIMINARI**

- Aumento della produzione di latte di circa il 21%**
- Anche per le bufale l'innalzamento dei livelli di bST serica nei primi giorni dopo ogni ciclo bisettimanale di iniezione di rbST è sufficiente per l'individuazione degli animali trattati.**
- I livelli di IGF-1 aumentano in maniera significativa lungo quasi tutto il ciclo anche di 2,5 volte il valore basale e potrebbero essere considerati come elemento **aggiuntivo** da tenere in considerazione.**
- Le concentrazioni di IGF-1 nel latte restano elevate di più del doppio almeno fino al giorno 7. Tale valore oltre ad essere discriminante deve far riflettere sulla concentrazione di elevati livelli ormonali su un substrato alimentare.**



## L'attività di ricerca condotta dall'IZSLT sulla Somatotropina ricombinante nella Bufala Mediterranea Italiana -

### Conclusioni

- Attuazione dei protocolli di somministrazione di rbST e messa a punto di metodi per la ricerca di bST e IGF-1 nel siero e nel latte nelle bufale.
- Valutazione degli incrementi produttivi (maggiore produzione di latte di circa il 20%) nelle bufale di razza Mediterranea Italiana trattate con rbST.
- Valutazione del cambiamento dei principali parametri chimico fisici (diminuzione della concentrazione di Urea e Caseine nel gruppo trattato) e citologici (aumento del contenuto in cellule somatiche) nel latte prodotto dalle bufale trattate .



## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

### Importanza della RICERCA ai fini della risoluzione dei problemi riscontrati nell'attività ispettiva

**-Produzione scientifica su riviste nazionali e internazionali indicizzate.**

### Elenco delle principali pubblicazioni originate dalle 3 ricerche Correnti (1)

Castigliego L, Li XN, Armani A, Razzano M, Mazzi M, Rosati R, Gianfaldoni D, Guidi A. (2011) Somatotropic gene response to recombinant somatotropin treatment in buffalo leukocytes. 2011 Dec;392(12):1145-54.

Castigliego L, Li X, Armani A, Mazzi M & Guidi A 2011 An immunoenzymatic assay to measure insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in buffalo milk with an IGF binding protein blocking pre-treatment of the sample. *International Dairy Journal* 21 421-426.

Lorenzo Castigliego, Li XN, Armani A, Goffredo Grifoni, Carlo Boselli, Rosati R, Gianfaldoni D, Guidi A. (2011). Hormone variations in serum and milk of buffaloes (*Bubalus bubalis*) as potential indicator of treatment with recombinant bovine somatotropin. *J Dairy Res.* 78 (4): 412-420.

Lorenzo Castigliego, Andrea Armani, Xiao-ing Li, Goffredo Grifoni, Daniela Gianfaldoni and Alessandra Guidi. (2011). Selecting reference genes in the white blood cells of buffalos treated with recombinant growth hormone. *Anal Biochem* 403 (1-2): 120-2

Guidi A., Tinacci L., Armani A., Boselli C., Grifoni G., Rosati R., Gianfaldoni D., Castigliego L. 2011. Aumento delle proteine leganti somatotropina nel siero e nel latte come indicatore ausiliario del trattamento con somatotropina ricombinante nella bufala. LXV Convegno Sisvet. [www.sisvet.it](http://www.sisvet.it)

Castigliego L., Iannone G., Grifoni G., Rosati R., Brizioli N. R., Guidi A. (2005). *Analisi dei livelli di somatotropina in bovine sperimentalmente trattate. XV Convegno Nazionale A.I.V.I., Tirrenia (Pi), 16-18/06/05, pag. 209-212.*

Castigliego L., Iannone G., Grifoni G., Rosati R., Gianfaldoni D., Guidi A. (2007). Natural and recombinant bovine somatotropin: immunodetection with a sandwich ELISA. *Journal of Dairy Research; Vol. 74, n.° 1, Febbraio 2007, pag. 79-85.*



## Elenco delle principali pubblicazioni originate dalle 3 ricerche Correnti (2)

*Grifoni G., Castigliego L., Iannone G., La Regina F., Borghese A., Rosati R., Micarelli G., Guidi A. (2006). Ricerca di indicatori ispettivi in bovine sperimentalmente trattate con somatotropina ricombinante: analisi di alcuni parametri fisiologici. XVI Convegno Nazionale Associazione Nazionale Italiana Veterinari Igienisti, Bari, 22-24/06/06, pag. 111-115.*

*Iannone G., Castigliego L., Armani A., Grifoni G., Rosati R., Gianfaldoni D., Guidi A. (2005). Elettroforesi bidimensionale su sieri di vacche trattate con Somatotropina Ricombinante Bovina. LIX Convegno Nazionale S.I.S.Vet., Viareggio, 21-24/09/05, pag. 405-406.*

*Castigliego L, Iannone G, Grifoni G, Rosati R, Gianfaldoni D & Guidi A 2007 Natural and recombinant bovine somatotropin: immunodetection with a sandwich ELISA. Journal of Dairy Research 74 79-85*

*Castigliego L, Grifoni G, Rosati R, Iannone G, Armani A, Gianfaldoni D & Guidi A 2009 On the alterations in serum concentration of somatotropin and insulin-like growth factor 1 in lactating cows after the treatment with a little studied recombinant bovine somatotropin. Research in Veterinary Science 87 29-35*

*Guidi A., Tinacci L., Armani A., Boselli C., Grifoni G., Rosati R., Gianfaldoni D., Castigliego L. 2011. Aumento delle proteine leganti somatotropina nel siero e nel latte come indicatore ausiliario del trattamento con somatotropina ricombinante nella bufala. LXV Convegno Sisvet.*

*GUIDI ALESSANDRA, Li Xiao ning, Armani Andrea, Mazzi Marco, Rosati Remo, GIANFALDONI DANIELA, Castigliego Lorenzo,, LXIX Convegno della Società Italiana delle Scienze Veterinarie (SISVet), pp 451-452, Asti, 2010.*

*Castigliego Lorenzo, Grifoni Goffredo, Rosati Remo, Iannone Giorgio, Andrea Armani, GIANFALDONI DANIELA, GUIDI ALESSANDRA, Trattamento con somatotropina ricombinante nella bufala: variazioni ormonali nel siero come possibili indicatori ispettivi, RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE, vol. Aug.87/1, pp 29, tot.pag 35, 2009*

