

MASTITI

Stato dell'arte sulla mastite bovina da *Prototheca* spp.

Clara Locatelli*, Paola Cremonesi**, Nicola Rota*, Licia Scaccabarozzi*, Claudia Pollera***, Bianca Castiglioni**, Antonio Casula*, Valerio Bronzo*, Paolo Moroni*

*Dipartimento di Scienze veterinarie per la Salute, la Produzione animale e la Sicurezza alimentare, Università degli Studi di Milano

**Istituto di Biologia e Biotecnologia agraria, (IBBA-CNR), Lodi

***Dipartimento di Scienze veterinarie e Sanità pubblica, Polo veterinario di Lodi

RIASSUNTO

Negli ultimi anni l'attenzione per *Prototheca* spp. come patogeno mammario è molto aumentata, anche nel nostro Paese. Tuttavia, dati di prevalenza esistono solo a livello locale. Opzioni terapeutiche praticabili non sono ad oggi disponibili. La modalità più efficace di gestione è l'eliminazione degli animali infetti; la scelta dei capi da testare e la sensibilità dei terreni utilizzati sono di assoluta importanza. La biologia molecolare può essere utile nella distinzione di specie saprofiti e patogeni rilevabili nell'ambiente, contribuendo a chiarire il quadro epidemiologico aziendale. La valutazione dei fattori di rischio, nota l'epidemiologia del patogeno che è ambientale ma diffonde anche per via contagiosa, è indispensabile per estinguere focolai e contenere la prevalenza.

Parole chiave: *Prototheca* spp., mastiti, ambiente, diagnosi, fattori di rischio.

SUMMARY

State of play about bovine mastitis due to *Prototheca* spp.

In the last years the awareness about *Prototheca* spp. as an udder pathogen has been increased, even in our farms. Nevertheless, prevalence data exist just at a local extent. Feasible therapeutic options are not available yet. The more efficient way to manage infections is culling the infected animals. The selection of cows to be tested and sensitivity of cultural media employed are very important. Biotechnology can be useful in differentiating saprophytic and pathogenic specie found in the environment, contributing to clarify the epidemiological farm picture. Evaluating risk factors, basing on epidemiology of a pathogen that is of environmental origin but also spreads as a contagious one, is indispensable to manage outbreaks and keep prevalence low.

Keywords: *Prototheca* spp., mastitis, environment, diagnosis, risk factors.

Da quando alle alghe unicellulari del genere *Prototheca* spp. è stato riconosciuto un importante ruolo nella genesi della mastite bovina e un impatto economico rilevante, poco è cambiato nelle modalità dell'estinzione dei focolai. La separazione e, ove possibile, l'eliminazione degli animali infetti resta tuttora il modo più concreto e di potenziale successo, pur oneroso per l'allevatore. L'assenza di terapie è indissolubilmente legata alla natura stessa del patogeno e al fatto che le specialità registrate sono mirate alla cura di infezioni esclusivamente batteriche. Tuttavia, gli ostacoli sulla strada della terapia hanno spinto i settori della ricerca e della pratica clinica ad affrontare il problema da altri punti di vista. L'importanza dell'individuazione degli animali infetti ha reso necessario un affinamento delle tecniche diagnostiche, sia per sensibilità (terreni selettivi) sia per specificità (biologia molecolare applicata al riconoscimento di specie e alla genotipizzazione). Avvalendosi dei progressi delle predette tecniche di laboratorio, molto più è noto dell'epidemiologia di *Prototheca* spp. e, quindi, una valutazione dei fattori di rischio al servizio della prevenzione è ora possibile. Questo dossier si prefigge di riassumere le conoscenze attualmente disponibili sul tema della protothecosi bovina legata alla salute della mammella.

Epidemiologia e prevalenza

Le alghe unicellulari del genere *Prototheca* spp. sono saprofiti ampiamente diffusi nell'ambiente, in ogni clima, latitudine e continente, dove trovano aree umide con abbondante materiale organico

particolarmente adatte alla loro proliferazione. L'isolamento è documentato in letame, liquami, acque di scolo civili e industriali (macelli), laghi, acquitrini e feci di varie specie animali [20], compresi i roditori sinantropi, il cui ruolo in dispersione e mantenimento di *Prototheca* spp. non è da escludere [21]. Del genere *Prototheca* spp. fanno parte: *P. moriformis*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora*, *P. ulmea*, *P. zopfii* genotipo 1 e 2, *P. blaschkeae* [25] e *P. cutis* sp. nov. [26]. *P. zopfii* genotipo 2 [18, 2, 13] e *P. blaschkeae* [2, 14] sono state identificate come causa di mastiti bovine subcliniche tendenti alla cronicizzazione. *P. blaschkeae* è stata ritenuta una specie a sé stante dopo essere stata identificata per anni come genotipo 3 della *P. zopfii*. Recentemente, un primo focolaio da *P. blaschkeae* è stato descritto in Italia [22]. Il genotipo 1 di *P. zopfii* ad oggi si è dimostrato in grado di indurre infezioni intramammarie subcliniche a seguito di infezioni sperimentali, ma non è comunemente riscontrato in casi spontanei. Ampliando il campo all'allevamento bufalino, recenti isolamenti sembrano indicare *P. wickerhamii* come particolarmente adatta a colonizzare la mammella della bufala [7].

Prototheca spp., agli inizi degli anni 2000, era considerato un patogeno mammario nuovo ed emergente. **Nonostante il grande interesse e la maggiore attenzione ad essa rivolta, le sue peculiarità culturali (crescita lenta, aspetto simile ad altri microrganismi, necessità di diagnosi microscopica) suggeriscono che l'incidenza reale possa essere tuttora sottostimata.** Inoltre, i dati di prevalenza esistono solo a livello locale e derivano da indagini condotte in aree ben definite o in casi di focolai. In Italia, questo tipo ►►



di indagini sono disponibili soprattutto per le aree che maggiormente contribuiscono alla produzione di latte nazionale. L'Istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna ha pubblicato i dati relativi ai campioni inviati per la diagnosi di mastite bovina ai laboratori diagnostici sparsi sul territorio di competenza, evidenziando un incremento della frequenza di *Prototheca* spp. dall'1,7% nel 2005 al 6% nel 2011, arrivando di fatto ai livelli di prevalenza di *Escherichia coli* [3]. **Di rilievo è lo studio svolto in Piemonte in cui, su 400 allevamenti testati, 51 sono risultati positivi (pari al 12%).** La prevalenza aziendale oscilla tra il 10% di animali positivi e il 25,3%. In due allevamenti di 490 e 200 capi, la prevalenza per quarto è risultata, rispettivamente, dell'11,7% e del 13,1% [27].

Prototheca spp. ha dimostrato di resistere alla digestione e passare indisturbata attraverso l'apparato digerente di animali monogastrici. È possibile che ciò sia vero anche per i poligastrici, giustificandone la presenza in ogni area di aziende positive, attraverso la disseminazione con feci e liquami. *Prototheca* spp. infatti sopravvive nelle deiezioni determinando la contaminazione di lettiera, acqua di abbeverata e lavaggio, pascolo e altri foraggi (foto 1). Animali cui siano stati forniti alimenti contaminati

cessano di espellere *Prototheca* spp. con le feci in seguito all'ingestione di alimenti *Prototheca* spp.-free. Particolare cura dovrebbe essere rivolta ai vitelli, quali potenziali diffusori in seguito alla somministrazione, assolutamente sconsigliata e da evitare, di latte mastitico, come pure di alimenti contaminati.

Non tutte le stalle albergano *Prototheca* spp. Laddove presente, è di solito ampiamente diffusa e, contaminando acqua di abbeverata e alimenti, può determinare un potenziale circolo vizioso "ingestione-espulsione", con ulteriore amplificazione della sua dispersione. In tali casi, la pressione microbica risulta talmente elevata da costituire un grosso rischio per l'instaurarsi di infezioni intramammarie.

D'altra parte, non tutte le stalle in cui *Prototheca* spp. è presente nell'ambiente hanno registrato mastiti ad essa ascrivibili. Molto si può fare con la gestione degli animali e dell'ambiente. **Mastiti da *Prototheca* spp. possono verificarsi, ma con una frequenza sporadica, anche in stalle ben gestite.** L'infezione diventa endemica in situazioni climatiche e ambientali propizie, combinate a stabulazioni non idonee e a scarsa igiene della mungitura.

Sintomatologia

Le bovine che hanno contratto un'infezione da *Prototheca* spp. possono manifestare un andamento subclinico o clinico. Le forme subcliniche sono preponderanti e per la maggior parte caratterizzate da un conteggio delle cellule somatiche (CCS) costantemente elevato, anche se in alcuni casi il CCS può essere normale. Il dato CCS è da soppesare bene nel caso lo si impieghi nella ricerca di animali potenzialmente infetti, soprattutto se il dato si riferisce a campioni di pool dei quattro quarti. Meno frequenti sono le mastiti cliniche che solitamente si manifestano con leggere alterazioni del latte e comunque mai, salvo rare segnalazioni [30], con risentimento sistemico. Infatti, a differenza di quanto accade nelle infezioni batteriche, in particolare quelle da coliformi, la reazione infiammatoria all'inizio dell'infezione da *Prototheca* spp. è di norma moderata. Casi di guarigione spontanea sono sporadici [24] e ciò è ascrivibile all'elevata suscettibilità dell'ambiente mammario all'infezione da *Prototheca* spp.: inoculazioni sperimentali di *Prototheca* spp. at-



Foto 1. *Prototheca* trova nelle zone umide con abbondante materiale organico un importante serbatoio. Le feci fanno da veicolo e mantenimento nell'ambiente di stalla e sono fonte di infezione per la mammella. La gestione di una lettiera permanente, come in questo reparto, costituisce un grave rischio per nuove infezioni.

traverso il canale del capezzolo in quantità di 40-480 unità formanti colonia hanno dato luogo a mastite nel 100% dei casi [17]. Altro punto di forza per *Prototheca* spp., in ambito mammario, è la resistenza della parete alla digestione enzimatica e alla lisi da parte dei macrofagi, che proteggono l'alga dall'azione dei più efficaci neutrofili [9]. L'osservazione di sporangi e sporangiospore nei macrofagi suggerisce che la replicazione intracellulare può contribuire in modo significativo al mantenimento dell'infezione [12]. Caratteristica fondamentale, che emerge dall'esperienza e dalla letteratura, è che la mastite da *Prototheca* spp. è di tipo cronico ed evolutivo. L'impatto sulla produzione è notevole [10] per via dell'atrofia cui va incontro il parenchima, che aumenta gradualmente di consistenza, con perdita di tessuto secernente, e viene progressivamente sostituito da connettivo. È necessario tener conto, in vista delle scelte gestionali, che a causa dei danni irreversibili, dovuti all'infiammazione persistente, la produzione è destinata a rimanere a livelli molto bassi, anche nel caso ipotetico in cui l'alga possa essere eliminata [10].

Sensibilità alla disinfezione

Prototheca spp. può resistere a trattamenti fisico-chimici [15]. L'efficacia dell'ipoclorito di sodio e dello iodo povidone, rispettivamente alla concentrazione di 0,03% e 0,313%, è stata sperimentalmente dimostrata su ceppi di riferimento e di campo [29]. L'ipoclorito di sodio è un presidio comunemente usato per la disinfezione di pavimenti, ambienti e utensili; tuttavia, l'efficacia alghicida dimostrata *in vitro* può essere di molto ridotta se applicata in presenza di materiale organico e sporizia. Inoltre, si deve tenere conto anche del tempo di contatto. Lo stesso vale per lo iodo povidone, alla base dei prodotti per la disinfezione post mungitura. La sua efficacia, in un momento critico che vede benante lo sfintere esposto a un ambiente umido e carico di microrganismi, è promettente nel limitare il tasso di nuove infezioni. La corretta e costante applicazione di un *post dipping* a base di iodio costituisce uno strumento di prevenzione utile.

Terapia

Per quanto riguarda la sensibilità alle terapie, i prodotti disponibili sono indicati

per la cura di infezioni batteriche e ceppi di *P. zopfii* si sono dimostrati resistenti [6]. Le molecole usate nella terapia della protothecosi umana sono efficaci; in particolare, amfotericina B e nistatina si sono dimostrate attive *in vitro* verso sia *P. zopfii* [6] sia *P. wickerhamii* [13]. Tuttavia, non esistono specialità registrate ad uso intramammario e pertanto la terapia resta un'opzione non percorribile. Si può suggerire la pratica della cauterizzazione, nel caso in cui un solo quarto risulti infetto. Nonostante alcuni buoni risultati siano possibili e sia segnalata una buona produzione (definita compensatoria) dei quarti rimasti attivi, [28], è necessario valutare il costo beneficio di questo approccio al problema, in relazione al valore dell'animale e alla prevalenza aziendale. È bene ricordare che questa pratica deve essere accompagnata da altri interventi preventivi. Infine si deve considerare il rischio che eventuali secrezioni residue del quarto perso possano continuare a disperdere *Prototheca* spp. nell'ambiente (finestra 1).

Prevenzione

Climi e condizioni ambientali propizi, associati a scarsa igiene della mungitura e a modalità di stabulazione inadeguate, possono contribuire a mantenere costantemente alta la prevalenza aziendale di *Prototheca* spp. Aziende positive, in particolare che non abbiano mai acquistato capi, devono tenere in massimo conto l'impatto della contaminazione ambientale sul rischio di nuove infezioni. La prevenzione deve essere potenziata esattamente come nei riguardi di altri microrganismi di origine ambientale. Le lettiere vanno mantenute pulite e asciutte, soprattutto in climi, stagioni e periodi di massima umidità. Lo stesso vale per l'apice dei capezzoli, che può contaminarsi con feci, lettiera e acqua carichi di *Prototheca* spp. Pertanto, si deve prestare particolare attenzione all'igiene della mungitura, a cui la mammella deve essere preparata asportando prontamente ogni imbrattamento, potenzialmente veicolante l'alga, e asciugando con cura ogni singolo capezzolo (finestra 2).

Diagnosi

Le caratteristiche cliniche delle mastiti da *Prototheca* spp. sono totalmente aspecifiche e non permettono di distinguerle da altre a eziologia batterica né di formulare un'ipotesi. Nei casi di mastite clinica, il latte può apparire sieroso o sieroso-purulento.



FINESTRA 1. Case report n. 1

Caratteristiche generali

- Azienda di 1.200 bovine in lattazione, divisa in 2 siti produttivi: uno adibito a infermeria e *post partum*, con sala parallela (15+15) per la mungitura degli animali sotto trattamento; l'altro ospita la maggior parte della mandria e la mungitura avviene con sistema a giostra (72 poste).
- Il materiale usato come lettiera è la sabbia (occasionalmente sabbia riciclata).
- L'acqua di lavaggio deriva dall'effluente di una laguna con elevata carica di batteri e *Prototheca* spp.
- L'acqua per l'allevamento deriva da 2 pozzi e un laghetto, ora trattati con cloro.

Anamnesi

- In passato, è stato rilevato un alto tasso di lesioni dell'estremità del capezzolo, problema ora risolto.
- Detersione pre-mungitura a base di perossido.
- Disinfezione post mungitura con iodio 1%, applicazione adeguata.

Problemi

- Oltre 120 bovine in infermeria.
- Mastiti da *Streptococcus uberis*, *Lactococcus* ed *Enterococcus* spp., *Klebsiella* e *Prototheca* spp. (figura 1).
- Scarsa risposta al trattamento.
- 3-5 nuovi casi/giorno da *Prototheca* spp.
- Maggior numero di capi trovati positivi per *Prototheca* spp. al momento della dimissione dall'infermeria rispetto a quanti entrano in infermeria.
- Inizialmente la scelta gestionale è stata la sola segregazione dei capi infetti; poi, si è proceduto con l'induzione della perdita del quarto con soluzione di iodopovidone 5% e al prelievo di campioni dai quarti persi ancora positivi per *Prototheca* spp.
- Attualmente è prevista l'eliminazione dei capi infetti.

Indagini

- *Prototheca* spp. isolata in acqua di abbeverata, guaine post mungitura con imbrattamento visibile e tamponi positivi per abbondante flora microbica, tra cui *Prototheca* spp.
- CCS del latte di massa stabilmente al di sopra delle 200.000/ml, con netto ulteriore innalzamento nei mesi estivi.
- Tasso di nuove infezioni e infezioni croniche stabilmente superiori all'8%.

Commenti

L'azienda presenta un quadro ambientale ideale per la permanenza di *Prototheca* spp. data la contaminazione dell'acqua di lavaggio e di abbeverata. Il trattamento con cloro non è sufficiente ad abbattere la carica. La gestione del *flushing* e il tipo di ventilazione comportano un alto livello di umidità, che stimola ulteriormente la moltiplicazione della microalga. Questo quadro, tipico di un patogeno ambientale (confermato dall'isolamento di altri patogeni ambientali, che rappresentano anch'essi un problema), si complica con la possibile trasmissione tra animali infetti e sani mediante la contaminazione delle guaine, confermata dalle analisi sui tamponi di fine mungitura.

to, con frustoli di fibrina, caratteristiche queste riscontrabili anche in corso di altre infezioni (streptococchi). Nella maggior parte dei casi, l'anamnesi di persistente alto CCS in animali o quarti mammari refrattari alle terapie porta al sospetto e all'individuazione di capi infetti. D'altra parte, l'uso del solo CCS o del *California Mastitis Test* (CMT) per l'identificazione di animali da campionare pur essendo un approccio giustificato da quanto appena sostenuto, può portare alla mancata rilevazione di animali infetti, ma con CCS sotto la soglia di riferimento [19]. È parere sostanzialmente condiviso che, per quanto riguarda la salute della mammella, *Prototheca* spp. sia un patogeno ambientale e, inoltre, che la mungitura in presenza di animali infetti contribuisca alla diffusione dell'infezione [27], denotando un comportamento epidemiologico tipico dei patogeni contagiosi. La trasmissione da bovina a bovina, dal momento che un'infezione intra-

mammaria costituisce un *reservoir* di microalga, può giocare un ruolo importante nella progressione dell'infezione nella mandria. La preponderanza di mastiti subcliniche rende l'individuazione degli animali infetti un punto critico per il controllo della prevalenza aziendale [4]. Modelli statistici costruiti sui fattori di rischio a livello di singoli animali suggeriscono che prelevare per la ricerca di *Prototheca* spp. campioni di latte dalle pluripare e dalle bovine con alto CCS può essere un modo efficiente per testare una mandria con una storia di infezioni pregresse. Tuttavia, è possibile il riscontro di bovine positive alla coltura sia tra i capi con CCS < 100.000 cellule/ml sia tra le primipare [19].

L'eliminazione di *Prototheca* spp. attraverso il latte dei quarti infetti è generalmente abbondante e continua; tuttavia, si deve prendere in considerazione anche l'eliminazione intermittente. Esiste quindi il rischio di imbattersi in animali negativi perché cam-

FINESTRA 2. Case report n. 2

Caratteristiche generali

- Azienda di 250 bovine in lattazione, stabulate in una unica struttura, comprendente la zona per le bovine in asciutta e per le manze gravide a fine gestazione.
- Le bovine in lattazione sono suddivise in quattro sottogruppi: primipare, pluripare, freschissime e bovine-problema (animali con elevato CCS, cronici e infetti da *Prototheca*).
- Tutti i capi hanno a disposizione cuccette a riempimento con paglia.
- Gli animali in asciutta, pre e *post partum*, infermeria e manze gravide sono invece stabulate su lettiera permanente (paglia).
- L'azienda si avvale di una sala di mungitura 10+10 con 2 operatori.
- L'acqua di abbeverata e di lavaggio deriva dal pozzo aziendale dove è stata riscontrata un'elevata carica batterica e di *Prototheca*.
- Attualmente l'acqua è trattata con perossido di idrogeno.

Problemi

- Azienda senza controlli funzionali.
- Si campionano le bovine a 7 giorni dal parto e tutti i casi di mastite clinica.
- Nel *post partum* i patogeni maggiormente isolati sono stafilococchi, streptococchi, enterococchi, *Prototheca* e *Serratia*.
- Le mastiti sono soprattutto da *E. coli*.
- La maggior parte delle infezioni da *Prototheca* avvengono durante la fase di asciutta, pre e *post partum*.
- La strategia adottata è la segregazione degli animali infetti da *Prototheca*.
- Eliminazione di notevoli quantità di latte a ogni singola mungitura per rientrare nei parametri della qualità del latte imposto dal caseificio.

Indagini

- *Prototheca* isolata in acqua di abbeverata, tamponi su guaine post mungitura, tamponi su pavimentazione della sala di mungitura.

Commenti

L'azienda presenta un quadro ambientale ideale per la permanenza di *Prototheca* per via della contaminazione dell'acqua e per la cattiva gestione della lettiera permanente. L'igiene delle lettiere, l'errato ordine di mungitura e una non corretta igiene durante le fasi della mungitura stessa aumentano le probabilità di nuove infezioni da *Prototheca*.

pionati in una fase di emissione di microalghe bassa o nulla. Un lavoro svolto su 72 casi ha rilevato che il 70% degli animali eliminava in modo continuativo, il 5% in modo intermittente e il 18% risultava costantemente negativo alla coltura, nonostante la positività alla sierologia [24]. *Prototheca* spp. può essere diagnosticata con la coltura sia del latte di massa sia del latte individuale di un quarto o di un pool dei quattro quarti. Le microalghe crescono lentamente sui terreni utilizzati di routine (agar sangue) e su quelli selettivi studiati per esaltarne la crescita, come il PIM (*Prototheca* spp. *Isolation Medium*). Alternativo può essere l'uso di *Sabouraud* destrosio, eventualmente addizionato di antibiotici per inibire i batteri. Le alghe, come pure i lieviti, crescono preferibilmente in ambienti e su terreni ricchi di zuccheri, in particolare di glucosio. Pertanto l'uso di *Sabouraud* può portare a una crescita mista dei due tipi di microrganismi, potenzialmente limitante la capacità di riconoscere *Prototheca* spp. Indipendentemente dal terreno impiegato, di norma, *Prototheca* spp. necessita di almeno 48 ore di incubazione, talvolta anche di 72 ore, e solo occasionalmente si manifesta in 24 ore. La capacità di inibire even-

tuali altri microrganismi per la presenza di 5-fluorocitosina, l'assenza di sangue e la composizione specifica per le microalghe, fanno del PIM un terreno in grado di migliorare la sensibilità nella ricerca di *Prototheca* spp. (foto 2 e 3). Uno studio ha rilevato la positività in 49 campioni contro 314 usando rispettivamente agar sangue e PIM per la semina del latte di massa [5]. È d'obbligo puntualizzare che, in questo caso, sono stati seminati 10 µl di latte su agar sangue e 100 µl su PIM.



Foto 2. Aspetto di *P. zopffii* su agar sangue. Il terreno usato di routine ne permette la crescita, senza inibire altri microrganismi.

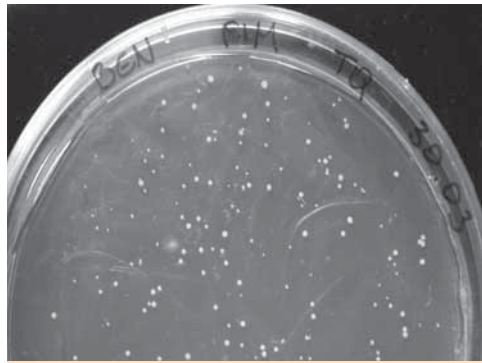


Foto 3. Latte di massa positivo per *Prototheca* su PIM. La presenza di 5-fluorocitosina, l'assenza di sangue e la composizione specifica fanno del PIM un terreno in grado di migliorare sensibilità e specificità, anche in campioni caratterizzati da una elevata carica batterica.

In quanto microrganismo ambientale, è possibile che *Prototheca* spp. contaminino il latte di massa senza che alcun animale sia infetto. Tuttavia, ogni campione positivo deve essere considerato come tale e deve essere seguito da ulteriori approfondimenti. È infatti altamente probabile che ci siano effettivamente capi positivi oppure che la presenza ambientale di *Prototheca* spp. diventi, se non lo è già, un rischio di infezioni intramammarie.

I casi, in genere, sono dovuti al genotipo 2 di *P. zopfii*, ma ai fini epidemiologici e preventivi è di massima importanza il riconoscimento della specie. Inoltre, il solo isolamento di *Prototheca* spp. nell'ambiente, senza riconoscimento della specie, non rappresenta necessariamente un rischio per la mammella, in quanto specie non patogene ed esclusivamente ambientali sono altrettanto riscontrabili. Il riconoscimento di specie non patogene o, comunque, non riconosciute come causa di mastite, può confermare una contaminazione del tank di origine ambientale e contribuire a chiarire un quadro con una prognosi migliore rispetto al riscontro di *P. zopfii* genotipo 2.

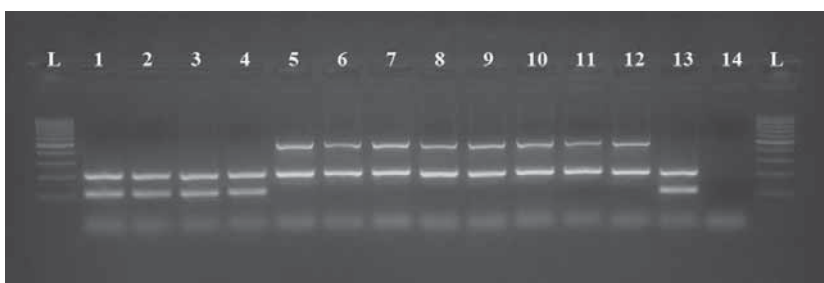


Foto 4. Analisi di *Prototheca* spp. di campo. Pozzetti 1-4: *Prototheca wickerhamii*; pozzetti 5-11: *Prototheca zopfii* genotipo 2; pozzetti 12-13: controlli positivi rispettivamente per *Prototheca zopfii* genotipo 2 e *Prototheca wickerhamii*. Pozzetto 14: controllo negativo. L: marcatore di peso molecolare.

Le indagini che seguono la positività del latte di massa possono contemplare l'individuazione dei siti ambientali maggiormente contaminati, oltre alla ricerca dei singoli animali infetti. Il PIM è particolarmente indicato per la ricerca di *Prototheca* spp. in acqua e matrici organiche (feci, lettiera, alimenti), in cui altri microrganismi possono interferire inibendo o mascherando la crescita dell'alga [27]. L'uso della sola morfologia colturale e microscopica, pur associata ad altre caratteristiche fenotipiche, come test biochimici di assimilazione, può essere riduttivo [16]. La variabilità intraspecie può essere molto spiccata; ad esempio, *P. zopfii* può presentare profili di assimilazione e fermentazione di substrati molto diversi da isolato a isolato. La caratterizzazione fenotipica del genere *Prototheca* spp. è estremamente laboriosa e il processamento del campione richiede molto tempo. La ricerca, pertanto, si affida ai test genetici (foto 4).

In questi ultimi anni, sono stati sviluppati saggi molecolari per la genotipizzazione di *Prototheca* spp., basati sull'amplificazione in PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dell'RNA ribosomiale del gene 18S (18SrRNA). Questa reazione consente di ottenere molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria. Amplificando e sequenziando una regione di questo gene, Roesler e collaboratori [25] riuscirono a differenziare tra i genotipi 1 e 2 di *P. zopfii* e *P. blaschkeae*. Lo stesso risultato fu poi raggiunto con un saggio di PCR-RFLP (PCR - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) sul gene 18S, che prevedeva l'amplificazione del frammento di interesse e la digestione con enzimi di restrizione in grado di tagliare il DNA in siti specifici [18].

Queste due metodiche (PCR e PCR-RFLP), sebbene molto più accurate delle analisi fenotipiche, non sono però in grado di differenziare tra le altre specie di *Prototheca* spp. Dal momento che le sequenze del 18S rRNA delle principali protothecche coinvolte nella mastite bovina differiscono per poche basi, è stata messa a punto una metodica molecolare [23] basandosi su un saggio in *Real Time* PCR (saggio di amplificazione seguito da quantificazione del prodotto ottenuto), associato a *melting resolution analysis*. Questo approccio consente di sfruttare l'effetto che piccole differenze di sequenza hanno sulle dinamiche di dissociazione del doppio filamento durante la reazione. Si tratta di una metodica laboriosa, ma che rende possibile discriminare sei differenti specie di *Prototheca* spp.

Più recentemente, è stato pubblicato un la-

voro in cui per la genotipizzazione di *Prototheca* spp. è stata impiegata una metodica rapida, semplice e altamente riproducibile: la PCR-SSCP (PCR - *Single Strand Conformation Polymorphism*) [8]. Questa metodica consente di evidenziare i polimorfismi del DNA, ossia la presenza di mutazioni a un singolo nucleotide (SNP), inserzioni o delezioni e riarrangiamenti, grazie alla differente conformazione che esso assume dopo la denaturazione.

Infine, in questi ultimi anni, l'avvento di piattaforme di sequenziamento di nuova generazione (*Next Generation Sequencing*) ha reso possibile il sequenziamento di interi genomi batterici in tempi brevi e a costi contenuti. Attualmente, alcuni gruppi di ricerca italiani stanno effettuando il sequenziamento "ex-novo" dell'intero genoma di *P. zopfii* genotipo 1, *P. zopfii* genotipo 2 e *P. blaschkeae*, al fine di evidenziare i principali geni coinvolti nella virulenza e patogenicità di questi microrganismi, sui quali mettere a punto sistemi diagnostici rapidi.

Fattori di rischio

Il *reservoir* naturale di *Prototheca* spp. è l'ambiente. La sua presenza in diverse matrici parte dell'ambiente aziendale (feci, fango, liquame, mangime, insilati, abbeveratoi) non comporta necessariamente l'isolamento da campioni di latte. La prevalenza aziendale, inoltre, può variare molto, da valori prossimi allo zero in campioni di *routine* (in caso di presenza di sporadici animali infetti) a percentuali a due cifre in caso di focolai di mastite. *Prototheca* spp., quindi, è potenzialmente ubiquitaria, ma alcuni fattori condizionano l'insorgenza delle infezioni mammarie. La valutazione di questi fattori è al momento la chiave per la prevenzione delle infezioni da *Prototheca* spp. Uno studio caso-controllo ha messo a confronto i potenziali fattori di rischio legati alle pratiche di gestione aziendale a livello di singolo animale tra allevamenti positivi e negativi. Il maggior rischio è stato identificato nel trattamento intramammario *off label* con un principio attivo non registrato per questa via di somministrazione: un'azienda che adotta questa pratica ha una probabilità 9,6 volte maggiore di essere positiva per *Prototheca* spp. L'uso di un sigillante intramammario in asciutta è risultato una pratica potenzialmente rischiosa, in grado di aumentare di 5 volte la probabilità di positività. In generale, i risultati di questa indagine sembrano concentrare attorno alle procedure

che prevedono l'introduzione di farmaci nel canale del capezzolo i maggiori rischi per il passaggio di *Prototheca* spp. dall'ambiente alla mammella. Anche il numero di trattamenti intramammari è significativamente maggiore nelle aziende positive che in quelle negative, mentre il numero di trattamenti per via sistemica non è significativa. La sola patologia estranea alla mastite frequente nelle aziende-caso più che in quelle di controllo è la dislocazione abomasale. I motivi sarebbero da ricercare in comuni possibili cause favorevoli: errori nella formulazione della razione, scarsa igiene e qualità nell'alimentazione, manutenzione della corsia di alimentazione e altri indicatori di pulizia generale e gestione aziendale.

La varietà e la frequenza di isolamento di altri patogeni mammarie, tra cui *Staphylococcus aureus*, è risultata maggiore negli allevamenti positivi; inoltre, patogeni come lieviti, *E. coli* e *Klebsiella* spp. sono stati isolati esclusivamente in questi ultimi. Dall'indagine si desume che le bovine pluripare sono esposte a un maggiore rischio di infezioni da *Prototheca* spp., ma ciò non esclude che alcune primipare lo siano (l'8,2% delle bovine positive erano primipare). Inoltre, bovine con un elevato conteggio delle cellule somatiche medio durante la lattazione e nei singoli controlli funzionali hanno una maggiore probabilità di essere infette. Tuttavia, sono stati registrati casi di bovine positive con CCS inferiori a 100.000 cellule/ml.

Le prime fasi della lattazione sono a maggior rischio di infezioni da *Prototheca* spp. a causa dell'immunosoppressione *post partum* [11]. La stagionalità è un altro fattore caratterizzante le infezioni da *Prototheca* spp., che si instaurano prevalentemente nei mesi caldi delle regioni a clima temperato. Il tipo di lettiera non è stato investigato come fattore di rischio, ma la capacità di favorire la proliferazione di *Prototheca* spp. è stata testata *in vitro*, dimostrando una minore crescita nei trucioli rispetto al separato, alla segatura e alla sabbia [1]. Si dovrebbero testare molti più tipi di lettiera e le analisi dovrebbero essere condotte in campo; tuttavia, lo studio sembra dimostrare che, nelle aziende positive, questa scelta gestionale può essere utile al controllo delle infezioni.

Allevamento positivo: considerazioni in breve

Sulla base di quanto discusso, si riassumono in pochi punti le considerazioni da



Figura 1. Patogeni ambientali - Risultati colturali



Mastiti da *Prototheca* spp. possono coesistere con problemi da patogeni ambientali (in questo caso streptococchi). *Prototheca* spp., in primo luogo, deve essere prevenuta come patogeno ambientale, sempre ricordando che la presenza di animali infetti aumenta il rischio di trasmissione durante la mungitura.

fare in un allevamento positivo per *Prototheca* spp.

- *Prototheca* spp. deve essere combattuta, in primo luogo, con le buone pratiche atte a prevenire infezioni da patogeni ambientali (figura 1).
- La diffusione nella mandria avviene anche per contagio tra bovine in sala di mungitura: l'igiene della mungitura, dei trattamenti endomammari e l'integrità del ca-

pezzolo sono di estrema importanza nella prevenzione di nuove infezioni.

- Mungere per ultime le bovine riconosciute infette, in quanto eliminano grandi quantità di microalghe nel latte e, pertanto, possono contagiare altri capi.

- Migliorare la pulizia dei capezzoli durante la mungitura: una bovina può contrarre una nuova infezione se il microrganismo presente sulla cute del capezzolo viene messo in condizione di potere oltrepassare lo sfintere e colonizzare il canale del capezzolo. Occorre garantire che la cute del capezzolo sia pulita e asciutta. Contaminazioni e umidità apportano *Prototheca* spp. e lo scivolamento delle guaine, imputabile all'umidità in eccesso, è un ulteriore stress per le strutture del capezzolo. Per la pulizia e l'asciugatura è importante utilizzare una pezza rilavabile o carta a perdere individuale.

- Mungere separatamente i quarti infetti, evitando che il latte contaminati le guaine e arrivi nel tank, determinando un innalzamento della carica microbica. Non si devono trattare i quarti infetti.

- Esaminare i dati sulle infezioni e i CCS dei singoli animali per evidenziare un potenziale periodo critico in cui le nuove infezioni hanno luogo. In ogni caso, concentrare l'attenzione sul periparto e sulle prime settimane di lattazione come periodi a rischio.

- Non somministrare latte munto da quarti infetti da *Prototheca* spp. ai vitelli, in quanto comporterebbe una continua contaminazione dell'ambiente e dell'acqua attraverso le feci. ■

Bibliografia

- 1-Adhikari N., Bonaiuto H.E., Lichtenwalner A.B. Short communication: Dairy bedding type affects survival of *Prototheca* spp. in vitro. *J. Dairy Sci.* 2013; vol. 96: pp. 7739-7742.
- 2-Aouay A., Coppee F., Cloet S., Cuvelier P., Baylayew A., Lagneau P.-E., Mullender C. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from bovine mastitis. *J. Mycol. Med.*, 2008; vol. 18: pp. 224-227.
- 3-Bertocchi L., Vismara F., Hathaway T., Fusi F., Scalvenzi A., Bolzoni G., Zanardi G., Varisco G. Evoluzione dell'eziologia della mastite bovina nel Nord Italia dal 2005 al 2011. *Large Animal Review*, 2012; vol. 18: pp.1-8.
- 4-Britten A.M. Epidemiologic aspects of a mastitis outbreak caused by *Prototheca* spp. on a large dairy herd. *Proceedings of the NMC 59th Annual Meeting*, 2011.
- 5-Britten A.M., Cerar J., Gurajala. Use of a selective agar for detection of *Prototheca* spp. in bulk tank and cow milk culture. *Proceedings of the NMC 59th Annual Meeting*, 2011.
- 6-Buzzini P., Turchetti B., Facelli R., Baudino R., Cavarero F., Mattalia L., Mosso P., Martin A. First large-scale isolation of *Prototheca* spp. zopfii from milk produced by dairy herds in Italy. *Mycopathologia*, 2004; vol. 158: pp. 427-430.

- 7-Capra E., Cremonesi P., Cortimiglia C., Bignoli G., Ricchi M., Moroni P., Pesce A., Luini M., Castiglioni B. Simultaneous identification by multiplex PCR of major *Prototheca* spp. isolated from bovine and buffalo intramammary infection and bulk tank. *Lett Appl Microbiol.*, 2014 Sep 6. doi: 10.1111/lam.12326.
- 8-Cremonesi P., Pozzi F., Ricchi M., Castiglioni B., Luini M., Chessa S. Technical note: identification of *Prototheca* spp. species from bovine milk samples by PCR-single strand conformation polymorphism. *J. Dairy Sci.*, 2012; vol. 95: pp. 6963-6968.
- 9-Chevillat N.F., McDonald J., Richard J. Ultrastructure of *Prototheca* spp. zopfii in bovine granulomatous mastitis. *Vet. Pathol.*, 1984; vol. 21: pp. 341.
- 10-Hertl J.A., Schukken Y.H., Welcome F.L., Tauer L.W., Gröhn Y.T. Pathogen-specific effects on milk yield in repeated clinical mastitis episodes in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2014; vol. 97, n. 3: pp. 1465-1480.
- 11-Janosi S., Ratz F., Szigeti G., Kulcsar M., Kerényi J., Lauko T., Katona F. Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca* spp. zopfii. *Vet. Quart.* 2001; vol. 23, n. 2: pp. 58-

- 61.
- 12-Jensen H.E., Aalbaek B., Bloch B., Huda A. Bovine mammary protothecosis due to *Prototheca* spp. zopfii. *Med. Mycol.*, 1998; vol. 36, n. 2: pp. 89-95.
- 13-Marques S., Silva E., Carvalheira J., Thompson G. Short communication: in vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca* spp. wickerhamii and *Prototheca* spp. zopfii isolated from bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2006; vol. 89: pp. 4202-4204.
- 14-Marques S., Silva E., Kraft C., Carvalheira J., Videira A., Huss V. A., Thompson G. Bovine mastitis associated with *Prototheca* spp. blaschkeae. *J. Clin. Microbiol.*, 2008; vol. 46: pp. 1941-1945.
- 15-Marques S., Silva E., Carvalheira J., Thompson G. Short communication: temperature sensibility of *Prototheca* blaschkeae strains isolated from bovine mastitic milk. *J. Dairy Sci.*, 2010; vol. 93, n. 11: pp. 5110-5113.
- 16-Marques S., Silva E., Carvalheira J., Thompson G. Phenotypic characterization of mastitic *Prototheca* spp. isolates. *Res. Vet. Sci.*, 2010; vol. 89, n. 1: pp. 5-9.
- 17-McDonald J.S., Richard J.L., Chevillat N.F. Natural and experimental bovine intramammary infection with *Prototheca* spp. zopfii. *Am. J. Vet. Res.*, 1984; vol. 45: pp. 592-595.

>>> segue Bibliografia

- 18**-Möller A., Truyen U., Roesler U. *Prototheca zopfii* genotype 2: the causative agent of bovine protothecal mastitis? *Vet Microbiol.* 2007; 120(3-4):370-4.
- 19**-Pieper L., Godkin A., Roesler U., Polleichtner A., Slavic D., Leslie K.E., Kelton D.F. Herd characteristics and cow-level factors associated with *Prototheca* mastitis on dairy farms in Ontario, Canada. *J. Dairy Sci.*, 2012; vol. 95, n. 10: pp. 5635-5644.
- 20**-Pore R.S., Barnett F.A., Barnes jr W.C., Walker J.D. *Prototheca* spp. ecology. *Mycopathol.*, 1983; vol. 81: pp. 49-62.
- 21**-Pore R.S., Shahan T.A. *Prototheca* spp. *zopfii*: natural, transient occurrence in pigs and rats. *Mycopathol.*, 1988; vol. 101: pp. 85-88.
- 22**-Ricchi M., De Cicco C., Buzzini P., Cammi G., Arrigoni N., Cammi M., Garbarino C. First outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca blaschkeae*. *Vet. Microbiol.*, 2013; vol. 162, n. 2-4: pp. 997-999.
- 23**-Ricchi M., Goretti M., Branda E., Cammi G., Garbarino C.A., Turchetti B., Moroni P., Arrigoni N., Buzzini P. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from Italian dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 2010; vol. 93, n. 10: pp. 4625-4631.
- 24**-Roesler U., Hensel A. Longitudinal analysis of *Prototheca zopfii*-specific immune responses: correlation with disease progression and carriage in dairy cows. *J. Clin. Microbiol.*, 2003; vol. 41, n. 3: pp. 1181-1186.
- 25**-Roesler U., Müller A., Hensel A., Baumann D., Truyen U. Diversity within the current algal species *Prototheca* spp. *zopfii*: a proposal for two *Prototheca* spp. *zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca* spp. *blaschkeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006; vol. 56: pp. 1419-1425.
- 26**-Satoh K., Ooe K., Nagayama H., Makimura K. *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010; vol. 60: pp. 1236-1240.
- 27**-Scaccabarozzi L., Turchetti B., Buzzini P., Pisoni G., Bertocchi L., Arrigoni N., Boettcher P., Bronzo V., Moroni P. Short communication: isolation of *Prototheca* spp. species strains from environmental sources in dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 2008; vol. 91: pp. 3474-3477.
- 28**-Sarale A., Midulla L., Colombero R., Franchi M. *Prototheca* spp., an underestimated mastitis agent. *La Settimana Veterinaria*, 2013; n. 847: pp. I-VII.
- 29**-Sobukawa H., Watanabe M., Kano R., Ito T., Onozaki M., Hasegawa A., Kamata H. In vitro algacide effect of disinfectants on *Prototheca* spp. *zopfii* genotypes 1 and 2. *J. Vet. Med. Sci.*, 2011; vol. 73, n. 11: pp. 1527-1529.
- 30**-Thompson G., Silva E., Marques S., Müller A., Carvalheira J. Algaemia in a dairy cow by *Prototheca blaschkeae*. *Med. Mycol.*, 2009; vol. 47, n. 5: pp. 527-531.