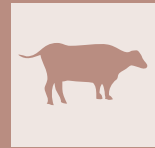


Infezione da *Streptococcus agalactiae* in bovine da latte: epidemiologia e piano di controllo di regione Lombardia



GIORGIO ZANARDI*, ANTONIO VITALI**, LUIGI BERTOCCHI*, GIUSEPPE BOLZONI*

* Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna "B. Ubertini"

Reparto Produzione Primaria

**DG Welfare - Regione Lombardia

RIASSUNTO

L'infezione da *Streptococcus agalactiae* è la principale causa di mastite contagiosa subclinica con eventuali forme di cronicizzazione, che comporta l'innalzamento del conteggio di cellule somatiche, parametro di conformità igienico sanitaria che influisce negativamente nei processi di trasformazione casearia e che è normato dalla UE per la produzione di latte crudo.

DG Welfare di Regione Lombardia dal 2012 ha impostato un piano di controllo e di eradicazione dell'infezione con l'obiettivo di ridurre la prevalenza all'8% alla fine del 2014.

La prevalenza media iniziale del 17,24% nel 2012 si è ridotta al 11,69% nel 2014 e solo nel 2018 si è attestata al 7,27% con risultati più favorevoli nelle zone di pianura (2-7%), mentre nelle aree di montagna persistono livelli d'infezione elevati, dal 15 al 25%.

Questo lavoro descrive le caratteristiche epidemiologiche dell'agente eziologico e le modalità del suo controllo, illustrando l'andamento dell'applicazione del Piano e i suoi riflessi sul controllo dell'infezione dal 2012 al 2018, evidenziando in particolare le criticità, che non hanno ancora permesso la sua eradicazione; a tale fine è stato, infatti, rimodulato il piano Regionale 2019.

PAROLE CHIAVE

Streptococcus agalactiae; mastite bovina; Piano Regione Lombardia.

INTRODUZIONE

Tra le mastiti contagiose della bovina da latte, *Streptococcus agalactiae* rappresenta, insieme a *Staphylococcus aureus*, una delle cause più significative di perdita nella produzione di latte e di danno economico in quella di formaggio, poiché la sua presenza è generalmente associata a elevati conteggi di cellule somatiche⁵.

A questo proposito, si ricorda che il Reg UE 853/2004 in tema di produzione di latte crudo include le cellule somatiche, quale parametro igienico sanitario da tenere sotto controllo e che esso è incluso da sempre nei sistemi di pagamento latte secondo qualità.

L'aumento della carica leucocitaria nel latte comporta, oltre al rischio di non commerciabilità del prodotto per il superamento dei limiti legali, una notevole perdita economica per mancata produzione. Infatti, l'effetto stimato ogni raddoppio di incremento delle cellule somatiche nel latte individuale, a partire da 50.000 cellule somatiche/mL, comporta la perdita di mezzo litro di latte, non considerando lo stadio di lattazione e il numero di lattazioni¹⁵.

Dal punto di vista zoonosico, *Str. agalactiae* può essere fonte di contagio per l'uomo, anche se la via di trasmissione principale è il contatto con altri esseri umani, in cui può essere presente a livello di intestino, gola e vie urogenitali. Infatti, *Str. agalactiae* è presente nella microflora genitale, primaria-

mente localizzato nel tratto gastrointestinale inferiore, da cui può colonizzare ad intermittenza le vie genitali o urinarie. I ceppi generalmente isolati nell'uomo presentano differenze genetiche con quelli bovini; gli studi filogenetici di questi ceppi fanno pensare che quelli umani e bovini abbiamo, comunque, progenitori comuni (bovini). Il problema del potenziale zoonosico è se realmente *Str. agalactiae* costituisca un pericolo per la salute umana con trasmissione diretta da animale a uomo o tramite l'evoluzione di ceppi patogeni per l'uomo derivanti dal bovino⁴.

Uno studio svolto nel Nord Europa ha approfondito la possibile trasmissione interspecie, comparando ceppi umani e bovini con la sierotipizzazione molecolare e identificando 5 tipi di sequenze comuni⁹. La possibilità che l'uomo possa essere fonte d'infezione per il bovino, stante la presenza di *Str. agalactiae* nell'orofaringe tramite contatto diretto tra mani e mammella non è esclusa. Il quesito è determinare la direzionalità della trasmissione tra le specie ospiti (da bovino a uomo o da uomo a bovino?). Potenzialmente anche le acque di superficie e i liquami potrebbero essere possibili vie di trasmissione intra e inter-specie. Infatti, uno studio norvegese ha dimostrato la presenza di *Str. agalactiae* da tamponi rettali e ambientali in 13 di 19 allevamenti con almeno un campione di latte positivo o con episodi di mastite nell'anno precedente il campionamento. Pertanto, gli autori suggeriscono la possibile co-esistenza, oltre alla classica trasmissione contagiosa tramite il latte contaminato e la routine di mungitura, di un ciclo di trasmissione ambientale per via oro-fecale e tramite acqua contaminata¹².

La sintomatologia negli adulti di solito è lieve o asintomatica con infezioni cutanee o delle vie urogenitali. In categorie a ri-

Corresponding Author:

Giorgio Zanardi (giorgio.zanardi@izsler.it).

schio (anziani, diabetici, pazienti con deficit immunitari o gravi patologie debilitanti) può presentarsi anche con forme più gravi quali setticemia, artrite, polmonite ed endocardite. Inoltre, nelle prime ore di vita del neonato sono possibili sepsi o meningiti acute, dovute principalmente al contagio della madre in utero per via ascendente in prossimità del parto o subito dopo la nascita con inalazione di secreti infetti. L'origine dell'infezione tardiva (dai 7 ai 90 giorni di vita) non è stata ancora chiarita. In questi casi, i fattori di rischio sono madri portatrici, ambiente contaminato e nati prematuri³.

Str. agalactiae è un batterio β -emolitico gram-positivo, parassita obbligato della ghiandola mammaria della bovina e altamente contagioso, che in genere ha una scarsa sopravvivenza nell'ambiente esterno. Lavori recenti^{10,11} eseguiti con tecniche biomolecolari quantitative hanno, però, evidenziato la presenza dei medesimi ceppi di *Str. agalactiae* anche da campioni retali, ambientali, sulla cute del capezzolo dimostrando la possibilità di sopravvivenza nell'ambiente. La via di entrata è il canale del capezzolo, che può infettarsi attraverso fomite contaminati dal patogeno e perciò la mungitura è il punto critico della sua possibile diffusione all'interno della mandria.

Il controllo e successiva eradicazione di questa mastite contagiosa è raggiungibile tramite la corretta applicazione del Five-Point Mastitis Control Plan, che, oltre al rispetto di rigide misure di biosicurezza, include il trattamento e la registrazione dei casi clinici, la disinfezione del capezzolo post mungitura, l'idonea e mirata terapia in asciutta, la riforma dei casi cronici, recidivanti o refrattari alle cure e la manutenzione corretta della macchina mungitrice.

Infatti, il suo *reservoir* primario è la mammella infetta, da cui diffonde tra i quarti e tra bovine in lattazione durante la routine di mungitura, attraverso i gruppi di mungitura, le mani e i fazzoletti contaminati da latte di bovine infette. Le infezioni sono tipicamente sub-cliniche e facilmente cronicizzano, con episodi meno frequenti di sintomatologia conclamata e mastite acuta. Questa modalità di diffusione comporta solitamente la presenza di un singolo ceppo di *Str. agalactiae* nell'allevamento colpito. Per questa ragione sono stati condotti pochi studi di tipizzazione biomolecolare nei bovini per verificarne la persistenza, la via di trasmissione o le fonti di infezione⁴.

L'isolamento da latte del microrganismo *Str. agalactiae* non rappresenta di per sé causa sufficiente per inquadralo nell'art. 5 del regolamento di Polizia Veterinaria D.P.R. 320/1954, in cui si prevede la denuncia di malattia infettiva come mastite catarrale contagiosa.

L'eradicazione dell'infezione da *Str. agalactiae* è stata storicamente uno degli obiettivi primari dell'intervento veterinario per la lotta alla mastite negli allevamenti di bovine da latte.

I motivi di questo particolare interessamento possono essere così sinteticamente elencati:

- la notevole **contagiosità** che determina il continuo diffondersi all'interno della mandria e l'interessamento di nuovi animali (*Str. agalactiae* è considerato un patogeno obbligato della mammella, poiché poco resistente nell'ambiente esterno);
- la sua **patogenicità** legata non tanto alla gravità delle forme cliniche acute, ma piuttosto alla frequente cronicizzazione delle infezioni mammarie che possono pregiudicare la futura carriera produttiva delle bovine;
- la rilevanza **sanitaria** sia in termini di Polizia Veterinaria (Mastite Catarrale Contagiosa) sia, più in generale, di Salute Pubblica (agente zoonosico) e di Sicurezza Alimentaria

(in particolare nel caso di produttori di latte crudo destinato alla vendita diretta);

- l'**impatto economico negativo** causato dai costi di terapia delle forme di mastite clinica, dalla penalizzazione nel pagamento del latte secondo qualità per l'innalzamento del tasso di cellule somatiche, dalla ridotta produttività delle bovine infette anche in forma sub-clinica. Particolarmente condizionanti sull'intera carriera produttiva sono poi le frequenti forme croniche;
- i costi degli **insuccessi terapeutici** che non dipendono da fenomeni di antibiotico-resistenza (fatto decisamente raro), ma ai già citati fenomeni cronici, alle recidive e alla continua comparsa di nuovi casi, che sono tipici degli allevamenti che "convivono" da anni con questa infezione;
- le crescenti limitazioni alla possibilità di **vendere animali vivi da produzione**, per gli allevamenti che non forniscono le necessarie garanzie d'indennità alla mastite contagiosa da *Str. agalactiae*, con l'alternativa di destinarli verso il macello con notevole deprezzamento.

Non è un caso, del resto, che proprio nei confronti di questa infezione si siano realizzati i primi interventi a metà degli anni '70 di assistenza sanitaria in provincia di Brescia, dagli albori della collaborazione tra IZSLER e Centro per il Miglioramento Qualità Latte Bovino (CMQLCB). Questi interventi, realizzati con professionalità, impegno, perseveranza negli anni hanno, in effetti, ridotto significativamente la prevalenza dell'infezione nella provincia di Brescia da circa il 70% negli anni '70 al di sotto del 10% negli anni '90.

Gli stessi metodi applicati anche nell'ultimo decennio non sono però riusciti a completare l'opera e ad arrivare al vero obiettivo finale: l'eradicazione di *Str. agalactiae* dall'intero territorio provinciale. Le ragioni di questa "crisi in prossimità del traguardo" sono diverse. Tra queste è fondamentale il carente coinvolgimento dei portatori di interesse della filiera produttiva, che non hanno incentivato l'eradicazione come un fattore di resa economica e di spendibilità della qualifica sanitaria nella filiera latte e nei confronti dei consumatori. Inoltre, la frequente cessazione di attività delle piccole-medie aziende ha comportato la vendita di animali infetti, che ha contribuito a reinfettare aziende negative e a mantenere stabile la prevalenza provinciale.

A ciò va aggiunto che, come in molte altre esperienze simili, è proprio quando si devono affrontare i casi meno reattivi, in cui i risultati appaiono meno determinanti in termini di costo-beneficio, che diviene più difficile ottenere risultati efficaci; non c'è dubbio, infatti che, a livello provinciale, soprattutto in pianura, il problema coinvolga direttamente ormai un numero limitato di allevamenti. Si sottolinea che la permanenza di allevamenti infetti non rappresenta un problema solo per i diretti interessati, ma costituisce un rischio potenziale per l'intero settore a causa dell'elevata probabilità di reintroduzione in allevamenti negativi (soprattutto in caso di monticazione degli animali o di compravendita di vacche e manze, queste ultime già infette ancor prima di entrare in lattazione).

EPIDEMIOLOGIA

A partire dagli anni '70, la mastite causata da *Str. agalactiae* è stata inquadrata come obiettivo primario della maggior parte dei piani di controllo e della ricerca scientifica. Il periodo si caratterizza come una vera e propria "era delle mastiti con-

tagiose”, proseguita per almeno un ventennio. Il controllo dell’infezione (riduzione della prevalenza e dell’incidenza) si è basato su due metodi, scelti in base alla prevalenza dell’infezione in allevamento e alla strategia scelta dall’allevatore:

- esame batteriologico del latte e conseguente trattamento terapeutico della bovina in asciutta;
- eradicazione aggressiva con test batteriologico e trattamento immediato o riforma delle bovine infette.

La persistenza dell’infezione è solitamente legata ad una applicazione discontinua o inappropriata del pre dipping o della selezione delle bovine da trattare in asciutta, dell’ordine di mungitura e delle possibilità di segregare gli animali in gruppi differenziati.

Il primo sistema consente un risanamento più gestibile ed economico, sempre accompagnato da un appropriato programma di dipping del capezzolo, che richiede la costante applicazione di un programma di igiene della mungitura. Il pericolo da tenere sotto controllo sono le introduzioni di nuovi animali (biosicurezza), che vanno controllati prima dell’inserimento nella mandria.

La principale controindicazione è la maggior richiesta di tempo (fino ad uno-due anni) per eliminare tutte le infezioni e la necessità di controllare tutte le bovine fresche che entrano in mungitura.

Questo sistema di eradicazione “soft” è stato quello maggiormente utilizzato nei piani di risanamento in Lombardia e richiede da parte dell’allevatore un’applicazione gestionale corretta e costante, preferibilmente con l’assistenza di un servizio tecnico del settore latte qualificato.

Il secondo sistema permette la rimozione più rapida dell’infezione, minimizzando le perdite produttive e riducendo il rischio di trasmissione. D’altro canto, esso richiede un costo iniziale più elevato per il latte scartato delle bovine trattate anche in lattazione, il potenziale pericolo di presenza di sostanze inibenti nel latte aumenta ed è necessaria la disponibilità di un laboratorio in grado di sostenere l’attività diagnostica. A lungo termine, nonostante il costo iniziale, questo approccio può risultare più efficiente del primo⁵.

La scelta tra i due metodi dipende dalla disponibilità dell’allevatore sia in termini economici sia di impegno gestionale nell’applicare le regole del risanamento e della biosicurezza. Sicuramente, la prevalenza dell’infezione intra-allevamento rappresenta un fondamentale fattore dirimente l’opzione di rimozione rapida, se è bassa, o a medio termine, se elevata.

Il conteggio delle cellule somatiche nel latte composito di singola bovina è un parametro associato alla ricerca di *Str. agalactiae* ed è utilizzato per impostare il piano di risanamento e individuare le bovine con mastite subclinica e, quindi, più probabilmente infette o croniche.

Dal punto di vista diagnostico, nonostante non esista un gold standard di riferimento, l’esame colturale su latte di quarto o pool di quarti rappresenta il metodo più applicato, che presenta una sensibilità di circa il 95%, e una specificità di circa il 99%. L’esame batteriologico su latte di massa rispecchia la sensibilità nel latte di singola bovina, quando la prevalenza intra-allevamento è elevata, ma declina in maniera proporzionale con il livello di infezione. Questa diminuzione di capacità di rilevare l’infezione può essere ovviata pre-incubando il campione di latte, seminandone una quantità più elevata (0,05 mL) su terreni altamente selettivi oppure semplicemente ripetendo il prelievo e la coltura, soprattutto se si utilizza il metodo aggressivo del “test e terapia”, in cui sono da evitare le false negatività⁵.

Oppure si può ricorrere all’utilizzo di tecniche diagnostiche basate su PCR Real Time (RT) quantitativa, che presentano una maggior capacità di rilevare l’infezione, non inficiando la specificità diagnostica⁶. La scelta del cut-off (soglia) di lettura dipende dallo scopo del campionamento, vale a dire identificare tutte le bovine positive con rischio di rilevare anche falsi positivi o, in alternativa, quelle gravemente e realmente infette. In qualunque caso, il campionamento eseguito in sterilità diminuisce i falsi positivi⁷.

Un altro studio conferma che sia l’esame colturale sia PCR RT sono metodi diagnostici similmente accurati in allevamenti con elevata prevalenza d’infezione (> 20%) e che PCR RT su latte di massa è un metodo di screening consigliabile in caso di infezioni a bassa prevalenza o per confermare l’indennità.

Sul latte di massa di 165 aziende monitorate, la PCR real-time ha individuato 90 campioni di latte di massa negativi e 75 positivi, mentre l’esame batteriologico ha evidenziato 78 positivi e 87 negativi. PCR RT vs metodo di riferimento “batteriologico su latte di massa” ha una Se del 96,5% (90-99,3) e una Sp del 94,4% (86,4-98,5) con un ottimo indice di concordanza ($K = 0,91$)⁸.

Nelle fasi finali di un piano di eradicazione (prevalenza bassa) è consigliabile l’uso in parallelo dell’esame colturale su latte di massa aziendale con terreno selettivo Tallium Kristalviolette Tossin (TKT) e di PCR RT, poiché i due metodi aumentano la specificità diagnostica (capacità di identificare correttamente gli animali negativi), mentre nelle prime fasi è preferibile usare metodi diagnostici di screening altamente sensibili, perché l’obiettivo è di individuare gli allevamenti a rischio¹. Infatti, con il decrescere della prevalenza d’infezione si riduce la capacità di rilevare *Str. agalactiae* con l’esame batteriologico nel latte di massa⁵, al di sotto del limite di rilevanza del metodo diagnostico, dovuta alla eliminazione intermittente del batterio e all’effetto diluizione.

L’utilizzo del latte di massa per la ricerca di *Str. agalactiae* è la scelta di elezione per il controllo periodico, almeno trimestrale, della conferma di negatività dell’allevamento, una volta raggiunta l’eradicazione. Ogni animale di nuova introduzione e ogni primipara che entra in produzione vanno sempre controllati con l’esame batteriologico o, preferibilmente, con PCR RT.

Il numero di allevamenti di bovine da latte in Lombardia negli ultimi vent’anni ha subito un decremento di quasi il 50% con un aumento di concentrazione di capi in aziende di grandi dimensioni, alimentato anche dallo spostamento e rimescolamento di bovine provenienti da aziende cessate non controllate prima dell’introduzione. I principi fondamentali del risanamento di un allevamento infetto da *Str. agalactiae* non sono cambiati nel tempo, ma la chiusura o la riduzione di servizi nel settore zootecnico a supporto del controllo da parte della componente veterinaria e tecnica nel settore del controllo delle mastiti, ha comportato la diminuzione di expertise sul territorio, del livello di attenzione e di aderenza a programmi consolidati di eradicazione, controllo e sorveglianza.

TRATTAMENTO E BIOSICUREZZA

La sensibilità *in vivo* di *Str. agalactiae* ad antimicrobici appartenenti alla famiglia dei beta lattamici è sempre stata elevata e costante nel tempo.

Una strategia di eradicazione a medio termine (uno-due anni) comporta un protocollo di rigorosa igiene nella routine di mungitura e la pratica costante della terapia in asciutta.

La strategia di eradicazione rapida prevede, invece, l'esecuzione dell'esame batteriologico seguito dal trattamento, anche in lattazione. La guarigione degli animali infetti che sono trattati va confermata con almeno due colture negative a distanza di tre settimane. Le bovine refrattarie al trattamento vanno riformate, poiché rappresentano potenziali *reservoir* di infezione in allevamento⁷.

Per questa ragione, i protocolli di biosicurezza tra allevamenti devono essere stringenti e applicati costantemente, se si vuole evitare di introdurre nuovi ceppi di *Str. agalactiae*, che possono diffondere molto rapidamente in una popolazione suscettibile all'infezione. Il Piano di controllo di regione Lombardia prevede per il modello di accompagnamento di provenienza degli animali durante il trasporto la segnalazione di qualifica sanitaria dell'allevamento nei confronti di *Str. agalactiae*. Nuovi animali introdotti provenienti da allevamenti con stato sanitario sconosciuto sono da sottoporre preventivamente ad esame batteriologico o PCR RT prima di entrare nella mungitura ordinaria, altrimenti è consigliabile porli in isolamento, fino alla conferma di negatività.

Un altro fattore di rischio nelle zone di montagna è la pratica dell'alpeggio, da giugno a settembre, in cui bovini di aziende diverse vengono a contatto. L'inoltro alle malghe estive di animali provenienti da allevamenti con qualifica sanitaria negativa risulterebbe fondamentale. Il controllo pre e post alpeggio dei bovini è una pratica essenziale per verificare la possibile presenza di animali *reservoir* d'infezione o eventuali re-infezioni, per le quali vanno individuate l'origine delle cause attraverso una indagine epidemiologica.

MATERIALI E METODI

Il protocollo di campionamento del latte di massa da parte delle ATS lombarde ha previsto il suo prelievo con prelevatore automatico dal tank di raccolta aziendale previa agitazione di 15 minuti e raccolta di un campione di 120 mL in un contenitore sterile di plastica. I campioni sono stati immediatamente refrigerati e trasportati in tale stato al laboratorio, mantenuti a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ fino ad inizio analisi. L'analisi batteriologica è stata eseguita entro le 24 ore dalla raccolta.

La semina di 0,1 mL di latte, previamente miscelato, è stata eseguita su piastra con terreno agar selettivo Tallium Kristalviolette Tossin, poi incubata per 24 ore a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ in aerobiosi. La crescita di colonie di colore bianco-violetto e circondate da netto alone di emolisi completa e reazione negativa all'idrolisi dell'esculina è stata identificata come indicativa di presenza di *Str. agalactiae*. Un campione è stato classificato positivo per *Str. agalactiae* in base alla crescita di una o più colonie in piastra. Eventuali test di conferma su colonia isolata sono stati eseguiti applicando il metodo interno PCR RT per ricerca di *Str. agalactiae*, considerando un cut off di lettura di 40 cicli soglia⁸.

L'analisi statistica è stata condotta con l'ausilio di fogli di calcolo (Excel®) e procedure statistiche sviluppate in R (R Core Team 2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>¹⁴.

L'analisi ha permesso di calcolare la stima della significatività delle differenze fra medie (Tabella 2) mediante t-test fra medie e la stima della significatività della differenza fra proporzioni, con valutazione della significatività della tendenza e stima degli intervalli di confidenza delle proporzioni (Tabella 3) mediante z.test; i limiti superiore e inferiore sono stati calcolati con il metodo di Wilson. Per queste elaborazioni si è utilizzato il pacchetto R "binom" [Sundar Dorai-Raj (2014) binom: Binomial Confidence Intervals For Several Parameterizations. R package version 1.1-1. <https://CRAN.r-project.org/package=binom>]¹³.

Situazione epidemiologica dell'infezione da *Str. agalactiae* negli allevamenti da latte nella provincia di Brescia

I risultati del piano di monitoraggio quadriennale (2008-2011) eseguito in provincia di Brescia da IZSLER in collaborazione con CMQLB sono sintetizzati in Tabella 1.

L'andamento dell'infezione nel quadriennio considerato si è mantenuta su valori costanti.

La ragione di questo può essere individuata comparando i risultati del 2011 vs 2010, in cui si rileva che 1.077 aziende hanno mantenuto nel 2011 la negatività rilevata nel 2010 e 50 sono rimaste positive; 107 aziende (8,7%) hanno subito un cambiamento di stato sanitario, di cui 62 aziende negative sono diventate positive e 45 positive si sono negativizzate. Ciò dimostra che l'applicazione del risanamento è disomogenea e che le re-infezioni sono un evento tutt'altro che trascurabile.

Come si può notare in Tabella 2, la media del conteggio delle cellule somatiche nelle aziende positive è diminuita probabilmente per la progressiva consapevolezza del problema da parte degli allevatori e dell'avvio di azioni correttive nella gestione della mandria. In particolare, la media del conteggio di cellule somatiche nel 2010 in allevamenti positivi per *Str. agalactiae* era di 455.275 cellule/ml contro la media di 326.993 cellule/ml in allevamenti negativi, pur considerando l'ovvia variabilità interna ai due gruppi. La significatività delle differenze tra medie (t-test per le medie, assumendo uguale varianza) è stata confermata statisticamente significativa per $P > 0.01\%$.

Si evidenzia, perciò, che gli allevamenti infetti con *Str. agalactiae* presentano un valore maggiore del conteggio leucocitario del 39,2% rispetto a quelli negativi o indenni. Pur persistendo in un numero limitato di allevamenti (8,4%), il rialzo cellulare è consistente e, soprattutto, si attesta su un valore superiore al riferimento normativo per la commercializzazione del latte (Reg. CE n. 853/2004).

Tabella 1 - *Str. agalactiae*: allevamenti esaminati annualmente con esame colturale nel periodo 2008-2011 nella provincia di Brescia.

Anno	Allevamenti controllati	Allevamenti positivi	% positività
2008	1.411	107	7,6
*2009	672	81	12,0
2010	1.446	121	8,4
2011	1.234	112	9,1

*Controllo non eseguito nelle aree di montagna.

Tabella 2 - Comparazione della media delle cellule somatiche in aziende positive e non per *Str. agalactiae* nella provincia di Brescia; periodo 2008-2010.

Anno	Media conteggio cellule somatiche aziende positive	N° aziende	Media conteggio cellule somatiche aziende negative	N° aziende	P(t _{obs}) Pos > Neg
2008	585.196	107	304.112	1.304	> 99,9%
2009	574.582	81	298.271	591	> 99,9%
2010	455.275	121	326.993	1.325	> 99,9%

Quest'andamento, al di là degli aspetti particolari e di quelli tecnici organizzativi, descritti nel Piano proposto, supportava la prospettiva di perseguire l'obiettivo di "provincia ufficialmente indenne da *Str. agalactiae*" in tempi relativamente brevi (2-3 anni), aggiungendo valore sanitario e commerciale alla qualità del prodotto della provincia di Brescia. Non da ultimo, ciò avrebbe rappresentato il degno riconoscimento di decenni d'impegno e di collaborazione tra IZSLER e CMQLCB nei confronti di questo problema sanitario ed economico al servizio della zootecnica bresciana, che si potrebbe pregiare di una ulteriore qualifica sanitaria.

Il Piano di Regione Lombardia di controllo ed eradicazione dell'infezione da *Str. agalactiae* negli allevamenti da riproduzione latte

Nel 2012 DG Welfare della Regione Lombardia, sulla base dei dati di prevalenza d'infezione in alcune province rappresentative (5% nel 2008 a Cremona; 8,4% nel 2010 a Brescia; 23% nel 2009 a Bergamo e il 50% nel 2011 in zone di montagna), attivava il piano triennale di controllo degli agenti di mastite, in particolare *Str. agalactiae*, all'interno del Piano Integrato Aziendale della Prevenzione Veterinaria 2012-2014, al fine di ridurre la prevalenza d'infezione al di sotto dell'8% sul territorio regionale, accreditare gli allevamenti di bovini da latte come ufficialmente indenni o negativi da *Str. agalactiae* in funzione dello status sanitario raggiunto, assicurare garanzie sanitarie supplementari nella compra-vendita di animali, valorizzare gli allevamenti della regione. L'ulteriore preoccupazione per l'economia zootecnica lombarda e la commercializzazione del latte si focalizzava sull'aumento di cellule somatiche conseguente alla presenza di agenti mastidogeni, tra cui spiccava *Str. agalactiae*, e che si rifletteva sul rispetto dei limiti imposti dal reg. (CE) 853/2004 per la produzione latte crudo.

Il Piano era ad adesione volontaria e prevedeva il controllo del latte di massa, contestuale al controllo della brucellosi o rinotracheite infettiva, di tutti gli allevamenti di bovine da latte censiti e di codificare la qualifica sanitaria secondo i seguenti criteri:

- negativo: allevamento da riproduzione latte con tre prelievi consecutivi negativi a distanza di almeno tre mesi sul latte di massa per *Str. agalactiae*;
- indenne: allevamento da riproduzione latte con sei campioni negativi, effettuati sul latte di massa almeno a distanza di tre mesi e controllo finale con esito negativo sul latte dei singoli capi in lattazione presenti in azienda;
- positivo: allevamento riproduzione latte con un prelievo su latte di massa con isolamento di *Str. agalactiae*;
- stato sanitario non disponibile: allevamento senza analisi effettuate su latte di massa con ricerca di *Str. agalactiae*.

Il Piano prevedeva di segnalare la qualifica sanitaria sul modello di provenienza in caso di movimentazione dei capi, per la monticazione e/o il pascolo, di movimentazione di ballotti destinati ad un allevamento da riproduzione latte.

La segnalazione sul modello aveva lo scopo di informare l'allevatore sullo stato sanitario dell'allevamento di provenienza per operare scelte consapevoli nella tutela della biosicurezza del proprio allevamento.

Per quanto concerneva la movimentazione di bovini era previsto il controllo prima e dopo 8 giorni la loro introduzione, mantenendoli separati dalla mandria. Nel caso di alpeggio era consentita la monticazione di bovini positivi per *Str. agalactiae*, previo trattamento terapeutico e controllo batteriologico due volte a distanza di otto giorni, con esito negativo. I costi dei controlli degli accertamenti sanitari per la movimentazione degli animali erano a carico della regione Lombardia, mentre quelli di controllo sui singoli animali necessari al risanamento dell'infezione erano a carico dell'allevatore.

Inoltre, nel Piano era indicato un protocollo di intervento in azienda a seguito positività latte di massa. Compito dei Dipartimenti Veterinari era anche quello di effettuare attività di formazione/informazione sulle norme di biosicurezza da adottare per prevenire o eradicare la patologia mammaria.

Alla fine del Piano mastiti (sorveglianza dei batteri contagiosi alla stalla), nel 2014 la prevalenza media aziendale regionale si attestava al 11,7% (5-22%), con valori intorno al 20% nelle aree di montagna e del 6-7% in pianura. L'obiettivo di ridurre la prevalenza al di sotto dell'8% non era ancora raggiunto.

Nel 2015 Regione Lombardia decide di aggiungere, sempre in regime di adesione volontaria, la obbligatorietà del controllo sul latte di massa, al fine di confermare lo stato sanitario favorevole acquisito dalle aziende negative o indenni e di registrare le qualifiche sanitarie nella Anagrafe Regionale.

In Tabella 3 è illustrato l'andamento del Piano dal 2012 al 2018. Si evidenzia che dal 2015 la copertura dei controlli è passata dal 65 al 88% e la prevalenza media dal 2017 si è attestata al di sotto del 8%, iniziale obiettivo del piano triennale partito nel 2012.

Il test di significatività della differenza fra proporzioni (z-test) ha evidenziato una differenza significativa fra le stesse (P > 0.01%), confermando anche la tendenza in decrescita.

Ciò nonostante, rimangono diverse criticità che non consentono ancora di poter considerare "raggiunto" l'obiettivo complessivo del Piano e che possono riassumersi nei seguenti punti:

- il piano di eradicazione è ancora volontario, nonostante più del 90% delle aziende sia negativa o indenne, anche se è diventato obbligatorio il controllo sul latte di massa aziendale;
- è necessario l'aggiornamento del numero di allevamenti da latte controllabili presente in anagrafe;

Tabella 3 - Andamento del Piano di controllo e di eradicazione di *Str. agalactiae* in regione Lombardia; periodo 2012-2018 (fonte dati SEL - IZSLER).

Anno	Aziende presenti	Aziende controllate	% copertura	Aziende negative	Aziende positive	% positive	Limiti inferiore e superiore (%)	
2012	6.834	2.940	43,02	2.433	507	17,2	15,9	18,7
2013	6.605	4.310	65,25	3.781	529	12,3	11,3	13,3
2014	6.427	4.234	65,88	3.739	495	11,7	10,8	12,7
2015	6.329	5.572	88,04	4.920	652	11,7	10,9	12,6
2016	6.226	5.531	88,84	4.935	596	10,8	10,0	11,6
2017	6.065	5.196	85,67	4.808	388	7,5	6,8	8,2
2018	5.907	5.049	85,47	4.682	367	7,3	6,6	8,0

- la compra-vendita di animali provenienti da allevamenti positivi è segnalata sul modulo di accompagnamento, ma non è vietata/condizionata/limitata;
 - l'alpeggio e la possibile promiscuità tra animali provenienti da allevamenti con diverse qualifiche sanitarie non possono ancora essere considerati sotto pieno controllo;
 - il coinvolgimento nel Piano delle Associazioni Allevatori deve essere ancor più incentivato;
 - la prospettiva di essere una provincia o Regione indenne da *Str. agalactiae* andrebbe maggiormente valorizzata in termini di spendibilità del settore lattiero-caseario nei confronti sia dei primi Acquirenti Latte sia del consumatore.
- Sulla base di questi risultati e di queste considerazioni, il Piano è stato rimodulato nel Piano Integrato Aziendale della Prevenzione Veterinaria del 2019, prevedendo i seguenti interventi:
- aggiornamento dell'anagrafe bovina in termini di tipologia produttiva e allevamenti con assenza di capi, al fine di aggiornare il denominatore e di calcolare correttamente la percentuale di copertura degli allevamenti controllabili, la prevalenza e incidenza dell'infezione;
 - mantenimento del controllo annuale su tutti gli allevamenti di produzione latte e della segnalazione sulla modulistica di accompagnamento dei campioni dell'adesione al Piano *Str. agalactiae* e della qualifica sanitaria aziendale;
 - registrazione della qualifica sanitaria nel sistema informativo veterinario e comunicazione dello *status sanitario* all'azienda. Le ATS forniscono indicazioni sulla corretta applicazione delle misure di biosicurezza, al fine di evitare la reintroduzione dell'agente patogeno e non vanificare gli sforzi effettuati per raggiungere la qualifica. Particolare attenzione va prestata all'introduzione di nuovi animali in azienda, quando non sia correttamente riportata la qualifica sul modello di compravendita. In tale situazione, è consigliato il controllo batteriologico sul latte dei singoli animali introdotti, che vanno segregati fino ad esito negativo;
 - esecuzione dell'indagine epidemiologica volta ad individuare la possibile origine dell'infezione e dei fattori di rischio in caso di reinfezione in aziende negative/ indenni o di aziende sotto controllo (piano di risanamento) o che risultano persistentemente positive;
 - le aziende positive devono predisporre un piano di eradicazione concordato con il Veterinario Aziendale e che deve essere notificato alle autorità competenti;
 - gli allevamenti che non aderiscono al piano sono inseriti nell'elenco delle aziende a rischio e come tali sono cam-

- pionati al fine di verificare il rispetto di quanto previsto dal Reg (CE) 853/2004 sulla produzione latte e dal D.lgs. 193/06 sull'utilizzo di farmaci;
- valutazione annuale dei risultati del Piano con definizione di opportune misure correttive, che possono prevedere anche vincoli nella movimentazione degli animali e interventi di risanamento d'ufficio.

CONCLUSIONE

In generale, le campagne di controllo delle malattie infettive necessitano di motivazione, comunicazione e formazione che coinvolga tutti i portatori di interesse, chiamati a lavorare in modo coordinato e sostenibile e con comportamenti di aderenza costante ai principi e alle regole condivise per gli obiettivi a medio-lungo termine. L'infezione da *Str. agalactiae* non si sottrae a questi concetti basilari, tanto più che rappresenta una mastite a lungo studiata ed eradicabile a breve-medio termine.

Proprio in quest'ottica, il Piano di controllo dell'infezione da *Str. agalactiae* della Regione Lombardia è stato rimodulato nel 2019, poiché il target originario di fine 2014 è stato raggiunto solo nel 2017.

La qualifica sanitaria di azienda negativa o indenne raggiunta da oltre il 90% degli allevamenti nelle zone di pianura va tutelata e le residue sacche d'infezione vanno rimosse. In questo caso, l'obiettivo di eradicazione è ampiamente alla portata, mentre la criticità maggiore insiste nelle zone di montagna, per le quali risulta problematica la gestione dell'alpeggio e il rischio di re-infezione si mantiene elevato.

A questo proposito, è fondamentale valutare l'opportunità *in itinere* di intervenire con misure più stringenti, che incidano sui fattori di rischio della movimentazione di animali infetti o loro promiscuità.

■ *Streptococcus agalactiae* epidemiology in dairy herds and control plan of Lombardy Region

SUMMARY

Streptococcus agalactiae is the most cause of contagious mastitis, mainly subclinic or chronic, increasing somatic cells count, that is a hygienic parameter regulated by UE for the raw milk production and that adversely affects cheese production and milk composition.

In 2012 DG Welfare of Lombardy Region programmed a control plan of the *Streptococcus agalactiae* infection with the goal to reduce dairy herd prevalence in three years from 17.24% below 8%.

In 2014 at the end of this plan the average prevalence was 11.69%; only during the following three years, maintaining the surveillance plan the prevalence decreased to 7.47%, with values 2-7% in lowland areas and 15-25% in mountainous territories.

This paper describes epidemiological characteristics of *Streptococcus agalactiae* and its control methods, showing the infection trend from 2012 to 2018 and the results of the Control Plan carried out in Lombardy Region. Furthermore, some critical issues are discussed about eradication, taking in account the main news in the Regional Plan published in 2019.

KEY WORDS

Streptococcus agalactiae; epidemiology; bovine mastitis; Lombardy Region Mastitis Plan.

Bibliografia

- Rothman K.J., Greenland S. (1998). Modern epidemiology. Editor: Lippincott-Raven, 1998.
- Jayarao B.M., Pillai S.R., Sawant D.R., Wolfgang D.R., Hegde N.V. "Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cells and bacterial counts" (2004). Journal of Dairy Science 87, 3561-3573.
- Baldassarri L. (2007). Infezioni da streptococco di gruppo B Istituto Superiore di Sanità, ii, 41 p. Rapporti ISTISAN 07/28.
- Zadoks R.N., Middleton J. R., McDougall S., Katholm J., Schukken Y.H. "Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans" (2011). J Mammary Gland Biol Neoplasia (2011) 16:357-372.
- Keefe G. "Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis" Vet Clin Food Anim 28 (2012), 203-216.
- Keane O.M., Budd K.E., Flynn J., McCoy F. (2013). "Increased detection of mastitis pathogens by real time PCR compared to bacterial culture". Veterinary Record (2013) 173 (11), 268.
- Mahmmod Y, Toft N., Katholm J., Nielsen S., Cederlof E., Klaas I. (2013). "Diagnostic test properties of a Real-time PCR mastitis test of composite milk samples from milk recordings to identify intramammary infections with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*". Proceedings 29th NKVet Symposium May 2013, Reykjavik, Iceland, 9.
- Zanardi G., Caminiti A., Delle Donne G., Moroni P., Santi A., Galletti G., Tamba M., Bolzoni G., Bertocchi L. (2014). "Short communication: Comparing real-time PCR and bacteriological cultures for *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* in bulk-tank milk samples". Journal of Dairy Science Vol. 97 No. 9, 2014.
- Lyhs U, Kulkas L., Katholm J, Persson Waller K., Saha K., Tomusk R.J., Zadoks R.N. (2016). "*Streptococcus agalactiae* Serotype IV in Humans and Cattle, Northern Europe". Emerg Infect Dis. 2016 Dec; 22 (12): 2097-2103.
- Cobo-Angel C., Jaramillo-Jaramillo A.S., Lasso-Rojas L. M., Aguilar-Marin S.B., Sanchez J., Rodriguez-Lecompte J.C., Ceballos-Maquez A., Zadoks R.N. (2018). "*Streptococcus agalactiae* is not always an obligate intramammary pathogen: Molecular epidemiology of GBS from milk, feces and environment in Colombian dairy herds" PLOS ONE <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208990> December 10, 2018 13/14.
- Svennesen L., Mahmmoda Y.S., Skjølstrup N. K., Mathiasen L.R., Katholm, Pedersen K., Klaas I.C., Nielsen S.S. "Accuracy of qPCR and bacterial culture for the diagnosis of bovine intramammary infections and teat skin colonisation with *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* using Bayesian analysis" (2018). Preventive Veterinary Medicine 161 (2018), 69-74.
- Jørgensen H.J., Nordstoga A.B., Sviland S., Zadoks R.N., Sølvørød L., Kvitle B., Mørk T. (2016). "Streptococcus agalactioae in the environment of bovine dairy herds - rewriting the txtbooks?". Veterinary Microbiology 184, 64-72.
- Sundar D.R. (2014). binom: Binomial Confidence Intervals For Several Parameterizations. R package version 1.1-1. <https://CRAN.R-project.org/package=binom>
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Seegers H., Fourichon C., Beaudeau F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Veterinary Research, BioMed Central, 2013, 34 (5), 475-491.