

## **LA CITOMETRIA A FLUSSO IN ZOOTECCNIA:**

### **STUDIO DI NUOVI MARCATORI PER LA SALUTE E IL BENESSERE ANIMALE**

**Giovanna De Matteis**

*CREA-Zootecnia e Acquacoltura, Monterotondo (Roma)*

[giovanna.dematteis@crea.gov.it](mailto:giovanna.dematteis@crea.gov.it)

Tel. 06 90090219

## Centro di ricerca Zootecnia e Acquacoltura

Zootecnia e Acquacoltura –  
Monterotondo (Roma)

Zootecnia e Acquacoltura –  
Bella Muro (PZ)

Zootecnia e Acquacoltura - San  
Cesario sul Panaro (MO)

Zootecnia e Acquacoltura –  
Sant'Angelo Lodigiano (LO)



### Principali aree di ricerca:

1. Sistemi di allevamento
2. **Immunità e benessere animale**
3. Genetica
4. Prodotti animali
5. Acquacoltura

## **Abstract**

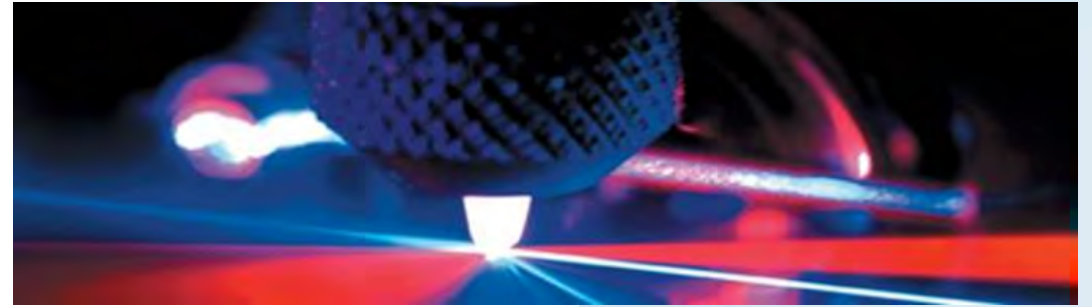
### **Giovanna De Matteis**

La citometria di flusso sta acquisendo un sempre crescente interesse anche in ambito di ricerca veterinaria. In particolare, si sta rivelando uno strumento particolarmente utile per la valutazione dei parametri immunitari negli animali in allevamento zootecnico (bovini, bufali, piccoli ruminanti), per la ricerca di nuovi marcatori da utilizzare per identificare animali più robusti e resistenti, e per la diagnosi precoce delle mastiti.

La presentazione si focalizzerà sulle attività svolte nei progetti di ricerca IMMA e MASTMARK in cui è stata ampiamente utilizzata la metodica citofluorimetria per la valutazione della risposta immunitaria della bovina da latte nel periodo intorno al parto, per la valutazione quantitativa di marcatori cellulari mediante metodo ABC, e per caratterizzazione delle principali popolazioni leucocitarie del latte (conta differenziale delle cellule somatiche).

I risultati ottenuti sono promettenti circa l'applicabilità della citofluorimetria in campo zootecnico e incoraggiano lo sviluppo di ulteriori indagini in particolare per quanto riguarda l'applicabilità dei protocolli proposti e la validazione dei marcatori trovati anche in condizioni di campo.





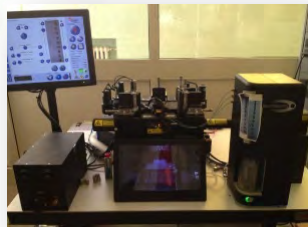
**Unità di Citometria e Biologia Cellulare**

**Francesco Grandoni**  
[francesco.grandoni@crea.gov.it](mailto:francesco.grandoni@crea.gov.it)

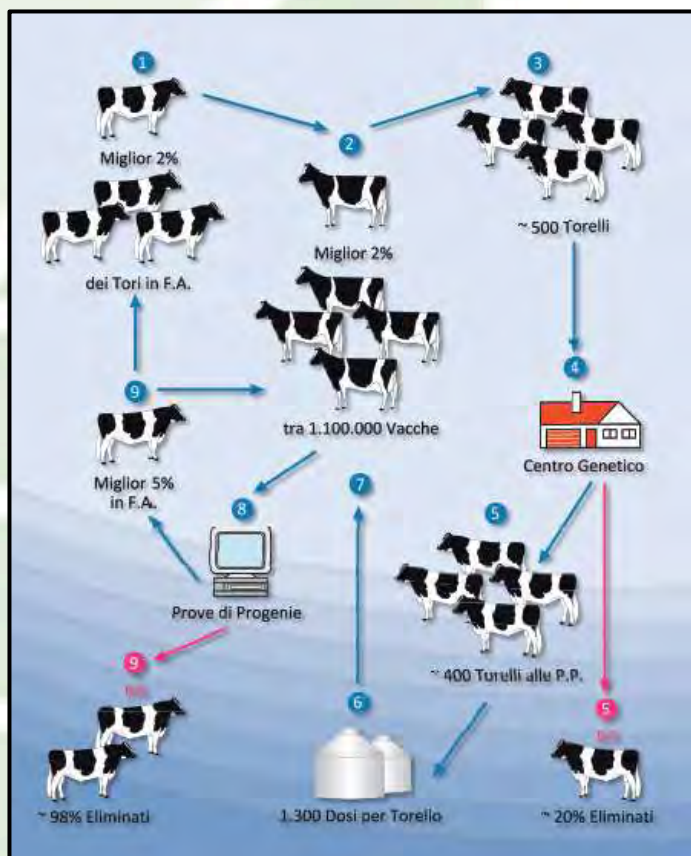
**Maria Carmela Scatà**  
[mariacarmela.scatà@crea.gov.it](mailto:mariacarmela.scatà@crea.gov.it)

**Giovanna De Matteis**  
[giovanna.dematteis@crea.gov.it](mailto:giovanna.dematteis@crea.gov.it)

**Laboratorio di citofluorimetria**



Selezione Genetica →



Pressione selettiva  
per la produzione di  
latte

**Consanguineità**  
**Immunodepressione**



**Mastiti**  
Endometriti  
Laminiti

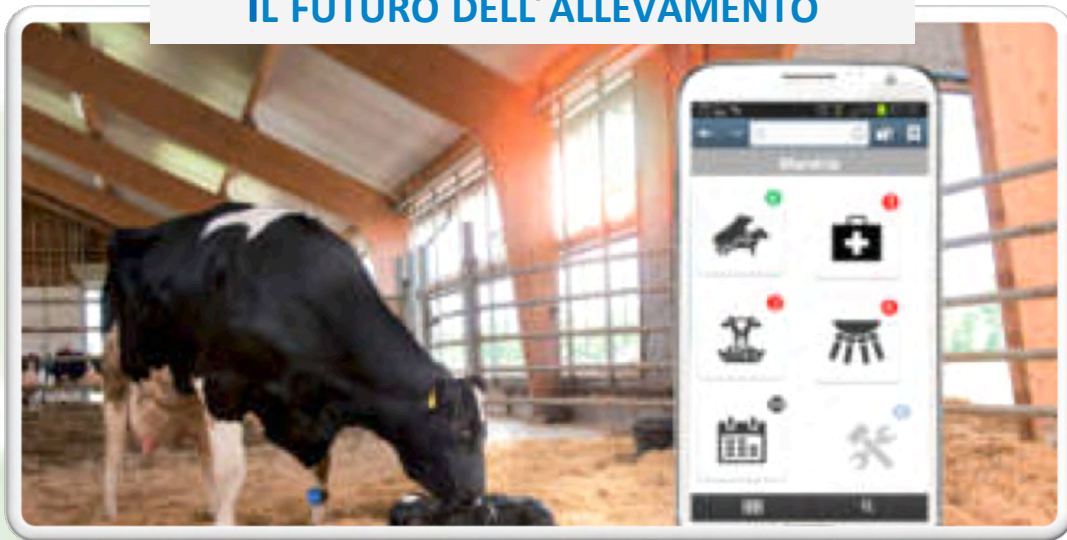
Riduzione  
della fertilità  
e produttività

Riduzione della  
redditività

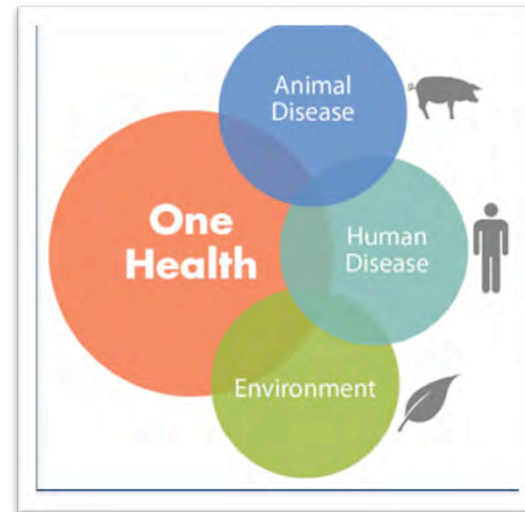




**ZOOTECNIA DI PRECISIONE:  
IL FUTURO DELL'ALLEVAMENTO**



Controllo delle malattie e sviluppo di nuovi strumenti e tecnologie per avere nuove informazioni su salute e benessere animale = impatto positivo sulla salute pubblica



## Sfide per il futuro: riguadagnare la fiducia del consumatore

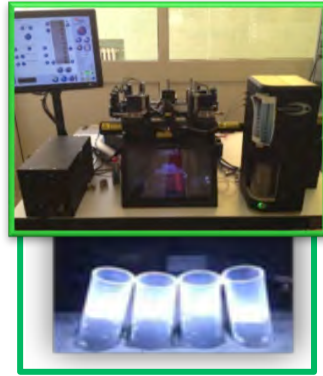
- Bilanciare alti livelli di produzione e buono stato di salute e benessere dell'animale
- Selezionare animali più robusti e resistenti: fenotipi idonei per la valutazione
- Monitorare lo stato di salute e benessere degli animali a livello individuale (**animal-based**) con parametri solubili, cellulari, genetici.....



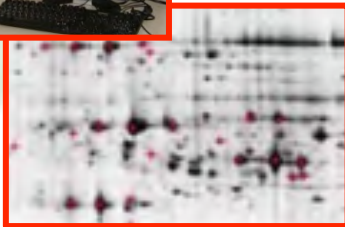
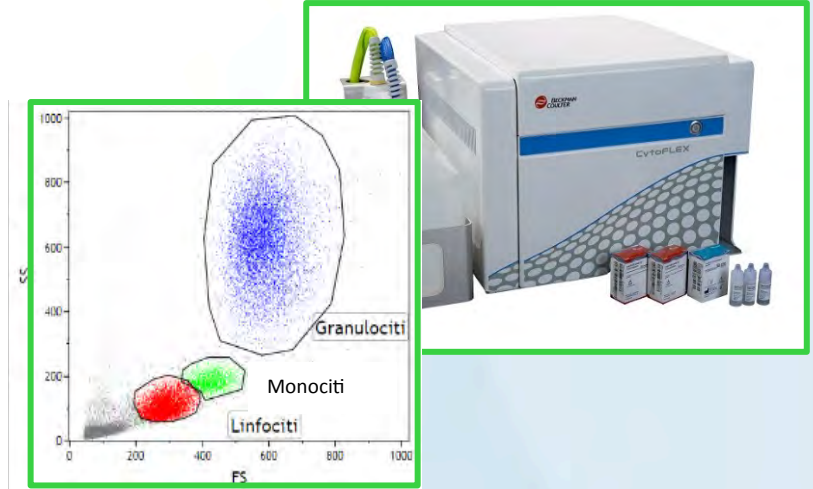


# Identificazione di biomarcatori nel sangue e nel latte

Trascrittomica



Citofluorimetria  
e  
Cell Sorting



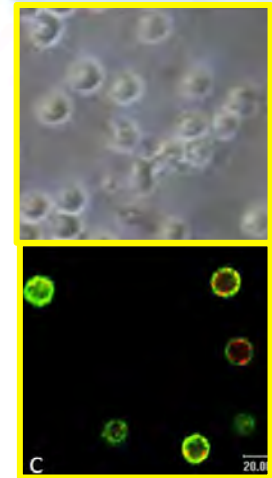
Proteomica



Colture Cellulari



Microscopia





## ➤ Progetto IMMA (Mipaaft)

Studio della risposta immunitaria nel periparto di una mandria sperimentale di: Frisona, Pezzata Rossa, FI x PRI



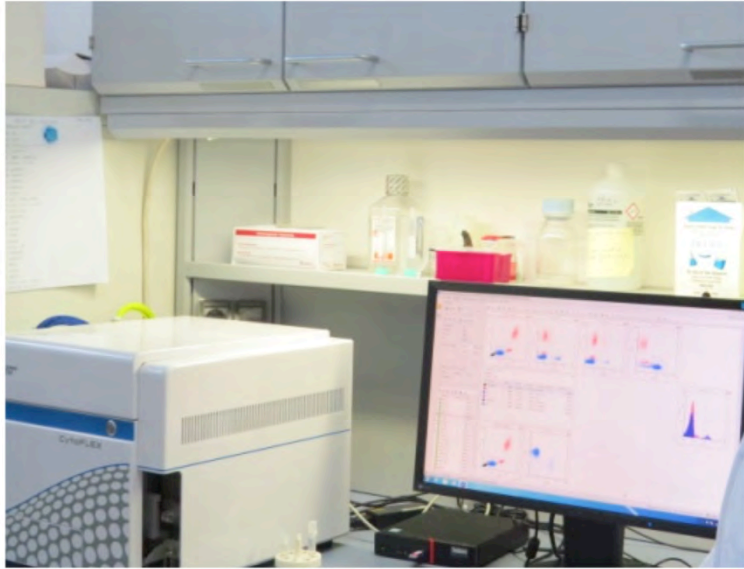
## ➤ Progetto Mastmark (Mipaaft)

Impiego della citofluorimetria per la valutazione di marcatori nel latte da utilizzare nella diagnosi precoce delle mastiti



## ➤ Buffalo Project (CREA-WSU-AlexU-IZSM)

Studio del sistema immunitario nella specie bufalina



# Progetto IMMA (IMmunological MArkers): Studio dei parametri immunitari nel periparto

CD4:CD8  
LattazioneCD11b  
Peri-PartoLinfocitiTCellule  
PARP-1ResistenzaNeutrofilii  
Infiammazione  
NKcellsCitofluorimetriaEosinofili  
MiglioramentoGeneticoROS  
**ProgettoIMMA**  
PeripartoImmunitàStress  
CD3  
BenessereAnimaleMonociti  
FrisonaPezzataRossaCD14  
IncrocioLinfocitiBMacrofagi  
CD4FisiologiaBAP  
CD62L

**Pezzata Rossa  
Italiana**



**Frisona Italiana**



## Eterosi

**Migliorare l'efficienza  
produttiva, riproduttiva e  
resistenza alle malattie**



**Incrocio PRI x FI  
(50:50)**



## Obiettivi

Uso della citometria di flusso per la valutazione di bio-marcatori nel periparto

Identificazione di animali più robusti e longevi

### Parametri immunitari

- Valutazione della percentuale delle popolazioni leucocitarie circolanti: Linfociti B and T (CD4, CD8 e CD4:CD8), cellule NK, monociti, neutrofili ed eosinofili

### Risposta immunitaria innata

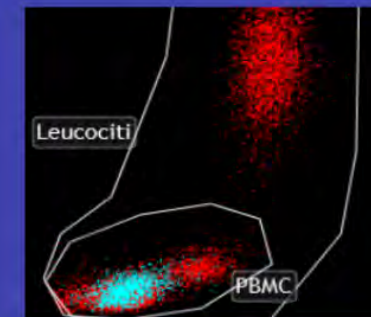
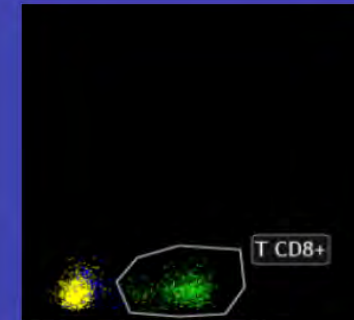
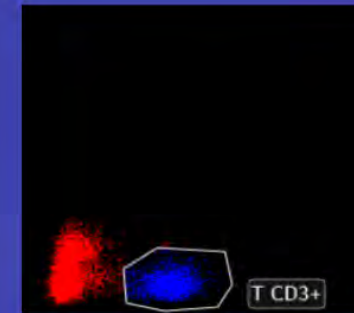
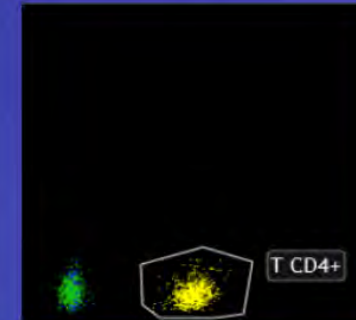
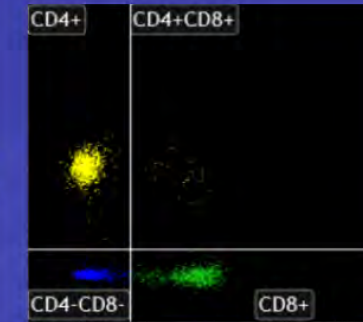
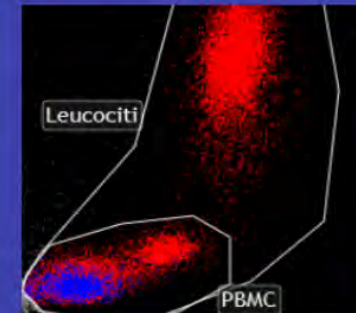
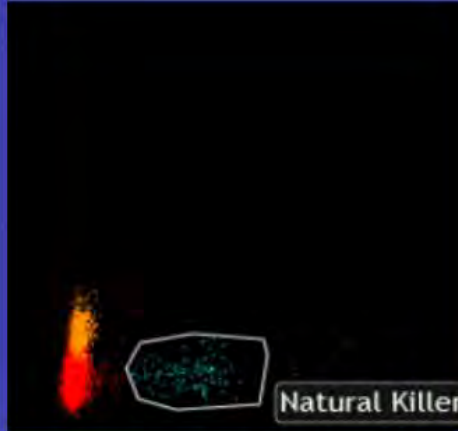
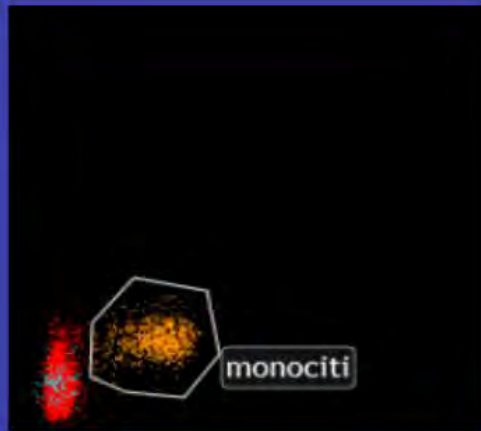
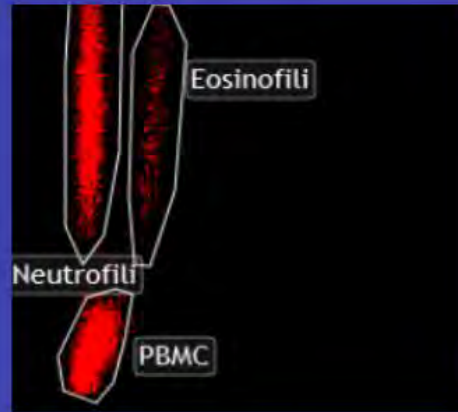
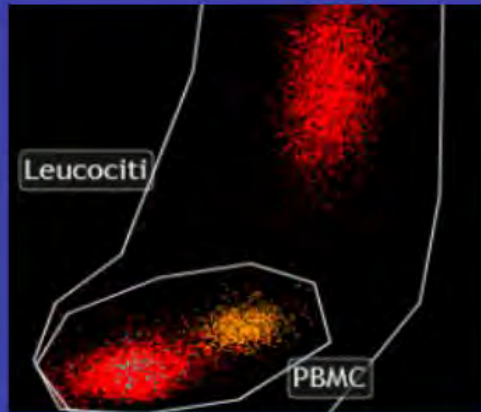
- Quantificazione di molecole di adesione: CD62L e CD11b

### Risposta infiammatoria

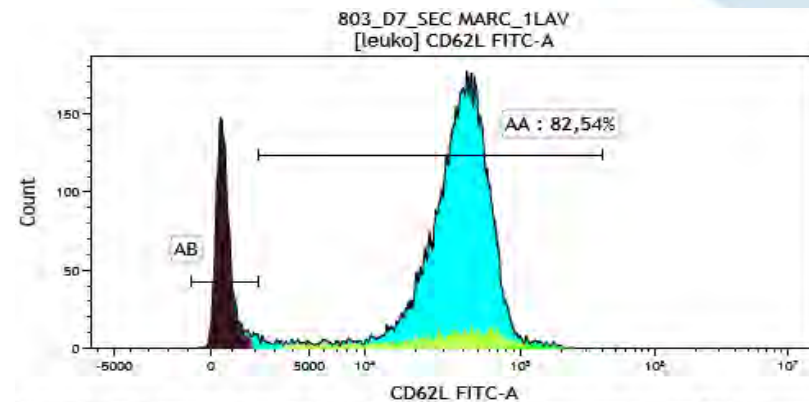
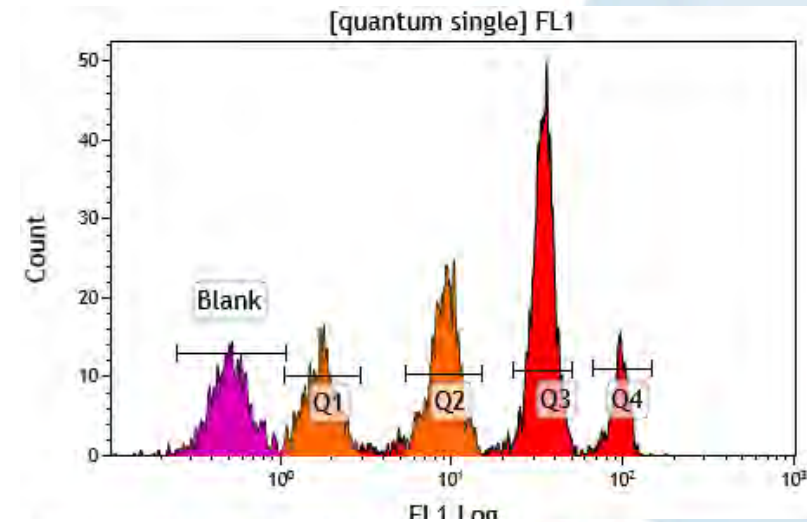
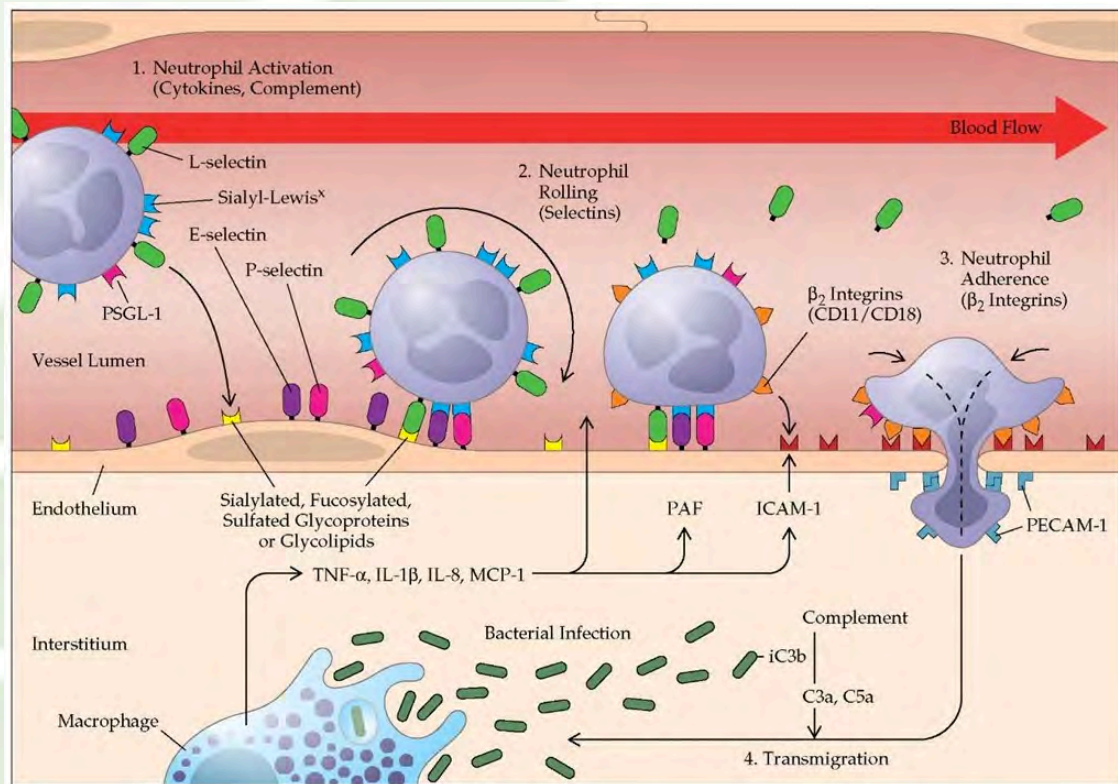
- Valutazione di PARP1 e della sua attività (produzione di PAR) e dell'attivazione della Caspase-3



# Parametri immunitari nel periparto



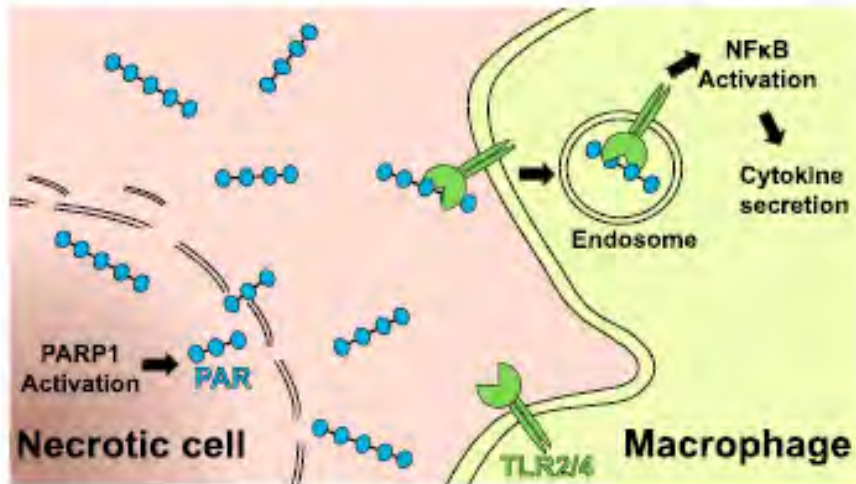
## CD62L e CD11b: Ruolo nella diapedesi e indicatori della capacità di risposta ai patogeni



Gate Number	X-Med	X-Mode	X-Stdev	X-Min	X-Max	X-GMean
AA	15.995	39.064,05	42.512,41	22.222,05	2.159,31	364.390,81
AB	3.382	595,35	418,83	416,51	-486,50	2.153,46



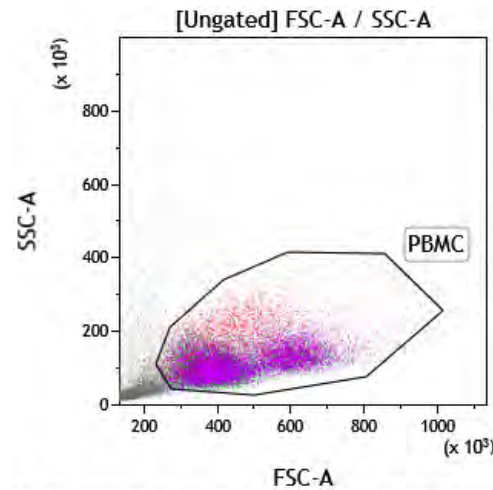
## I polimeri di ADP(ribosio): segnali molecolari nell'inflammatione



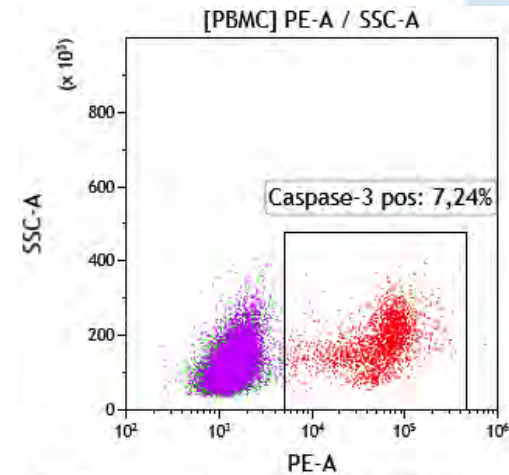
**Figure 1. PARP1 Enzymatic Activity Is Highly Upregulated in Cells Undergoing Necrosis**

Upon lysis of the necrotic cell, the PAR synthesized by PARP1 is released into the extracellular space. Extracellular PAR can then be detected by TLR2 and TLR4, which are endocytosed and signal the activation of NFκB, resulting in the secretion of cytokines and activation of an inflammatory response.

*Krukenberg et al., Chem. Biol. 2015*



Gate	Number	%Total	%Gated	X-GMean
All	36.353	100,00	100,00	371.165,66
PBMC	29.737	81,80	81,80	420.376,91

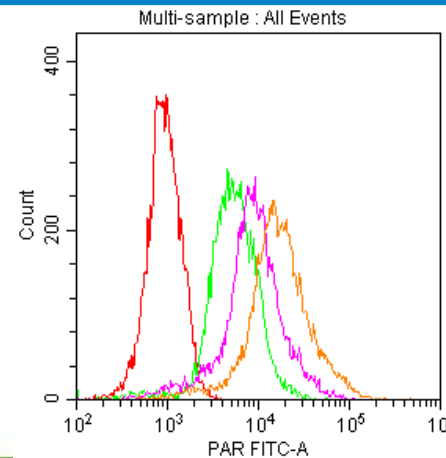


Gate	Number	%Total	%Gated
All	29.737	81,80	100,00
Caspase-3 pos	2.152	5,92	7,24

Gate	X-GMean
All	1.784,20
Caspase-3 pos	51.946,87

**Caspasi-3 attiva  
dopo stimolazione**



**Accumulo di polimeri di  
PAR dopo stimolazione**



## Identificazione di un epitopo polimorfico nell'antigene CD4 bovino

**TERZO CONGRESSO NAZIONALE ISCCA**

**Stato: INVIATO - ID: 3503**

**Monoclonal Antibody Clone CC8 recognizes a polymorphic epitope of bovine CD4 antigen**

**F. Grandoni<sup>1</sup>, F. Napolitano<sup>1</sup>, M.C. Scatà<sup>1</sup>, G. De Matteis<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*CREA - Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (Council for Agricultural Research  
di ricerca Zootecnia e Acquacoltura - Monterotondo (RM) - Italy*

1. Studio dell'**immunofenotipo** mediante analisi multicolor nelle diverse razze;
2. Analisi **quantitativa (ABC)** di molecole dell'immunità innata;
3. Valutazione di **marcatori intracitoplasmatici** indicatori di danno cellulare e stress ossidativo;
4. Identificazione di **polimorfismi genetici**;

# Applicazioni della FCM nel latte: Studio della mastite



## La mastitis bovina è tra le principali cause di perdite economiche nell'industria del latte

### Valutazione del conteggio cellulare nel latte di singole bovine

Somatic Cell Count/mL	Evaluation
< 100.000/ ml	Situazione ottimale
< 200.000/ml	Situazione normale
Da 200.000 a 350.000/ml	Accettabile a fine lattazione. Preallarme per vacche fresche soprattutto se primipare
Da 350.000 a 700.000/ml	Mastite conclamata, la bovina deve essere controllata ad ogni mungitura e vanno ricercate le cause di infezione
> 1.000.000/ml	Valori che non dovrebbero essere raggiunti; è necessaria una terapia intensiva, la mammella è gravemente compromessa

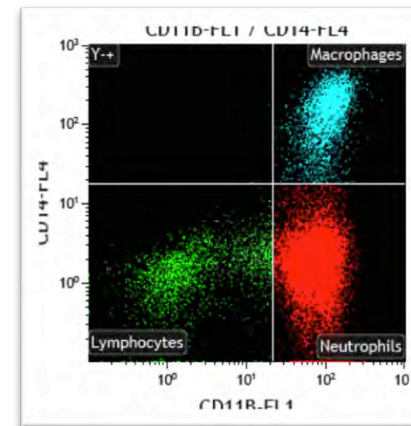
Somatic Cell Count/mL	Kg of milk lost/cow/day
200.000	1,3
400.000	2,00
800.000	2,70
1.600.000	3,40
3.200.000	4,00

La conta delle cellule somatiche (SCC) è uno strumento utile per la diagnosi di mastite

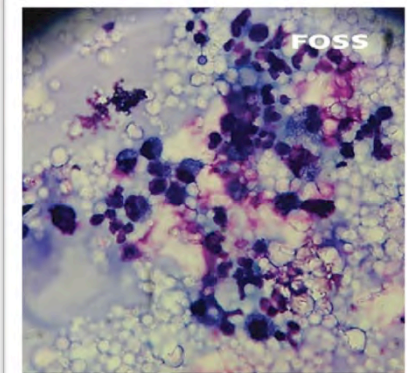
La citofluorimetria è il metodo di routine per la **conta delle cellule somatiche nel latte (Fossomatic)**



La **conta differenziale delle cellule somatiche (DCC)** consente di distinguere le diverse popolazioni leucocitarie fornendo maggiori informazioni sullo stato di salute della mammella (Schwarz et al., 2011; Pilla et al., 2013)



La **DSCC** è stata recentemente proposta come alternativa alla SCC + analisi batteriologica per identificare le mastiti (Damm et al., 2017)



Differential Somatic Cell Count with the Fossomatic 7 DC

## OBIETTIVO

Individuazione di marcatori per la diagnosi precoce della mastite  
nei bovini da latte

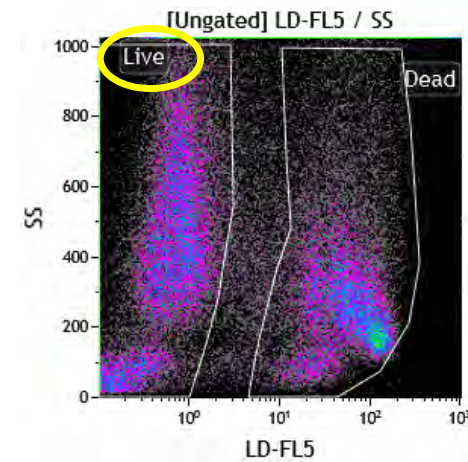


## OBIETTIVO

Individuazione di marcatori per la diagnosi precoce della mastite nei bovini da latte

Messa a punto di pannelli citofluorimetrici multicolore per valutare:

- Vitalità cellulare (vive/morte)

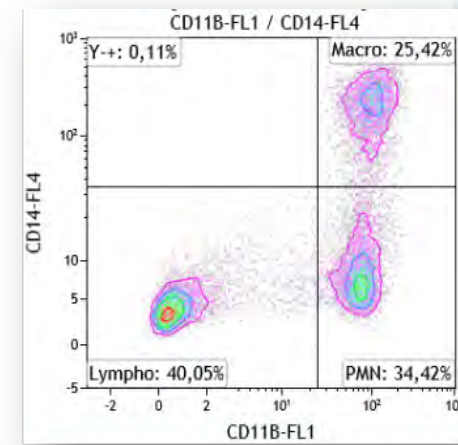


## OBIETTIVO

Individuazione di marcatori per la diagnosi precoce della mastite nei bovini da latte

Messa a punto di pannelli citofluorimetrici multicolore per valutare:

- Vitalità cellulare (vive/morte)
- **Percentuale di leucociti vivi (L-DCC)**

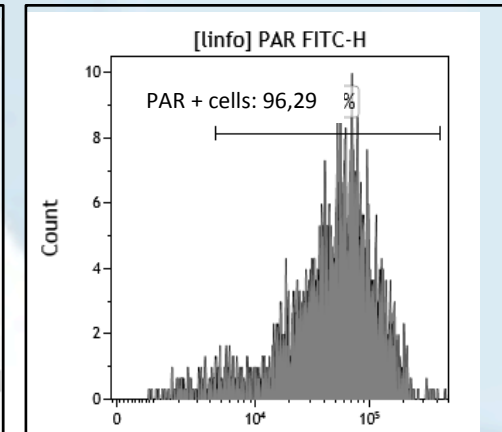
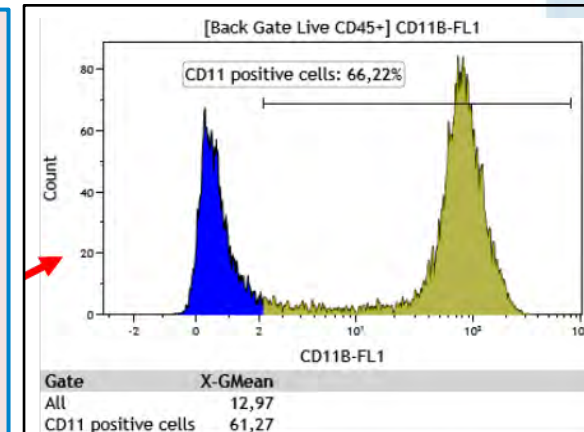


## OBIETTIVO

Individuazione di marcatori per la diagnosi precoce della mastite nei bovini da latte

Messa a punto di pannelli citofluorimetrici multicolore per valutare:

- Vitalità cellulare (vive/morte)
- Percentuale di leucociti vivi (L-DCC)
- **Espressione di marcatori di infiammazione (CD11b, PAR)**





## OBIETTIVO

Individuazione di marcatori per la diagnosi precoce della mastite nei bovini da latte

Messa a punto di pannelli citofluorimetrici multicolore per valutare:

- Vitalità cellulare (vive/morte)
- Percentuale di leucociti vivi (L-DCC)
- Espressione di marcatori di infiammazione (CD11b, PAR)
- **Correlazione con i parametri di stalla (SCC, conducibilità elettrica, velocità di flusso)**

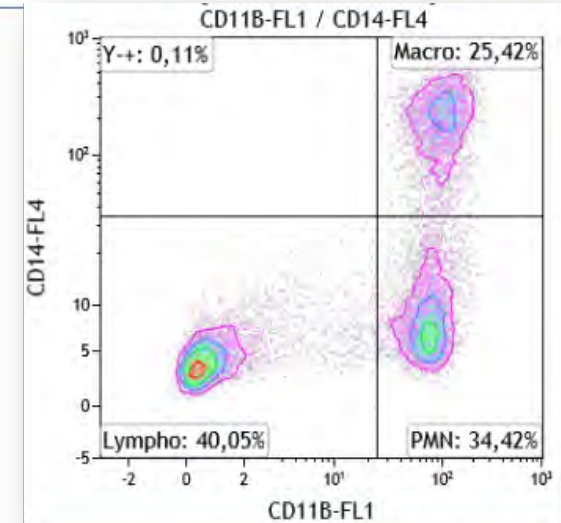


<https://www.alfasystemsrl.com/sites>



### Caratterizzazione dei subsets di leucociti vivi (L-DCC).

La proporzione relativa delle cellule vive del latte gioca un ruolo importante nell'immunità della ghiandola mammaria.

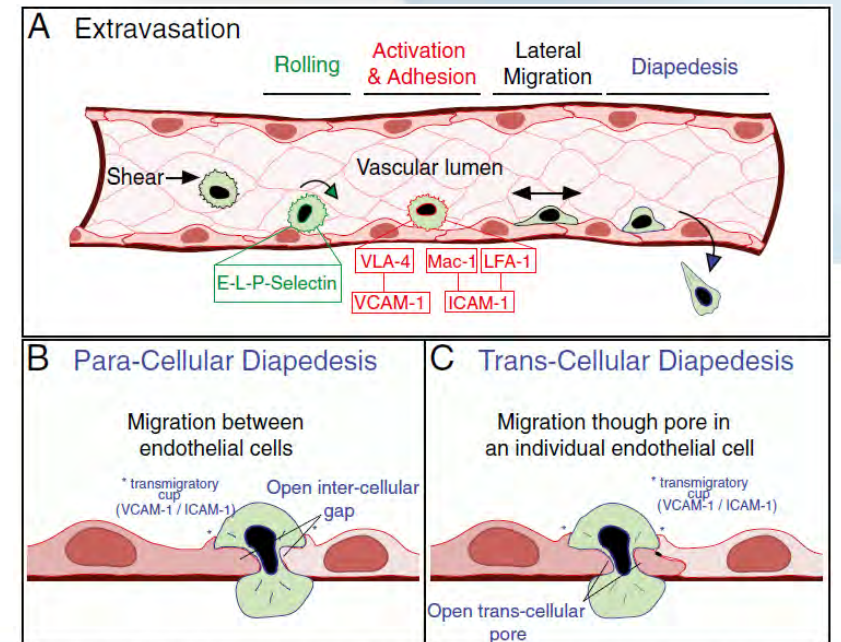
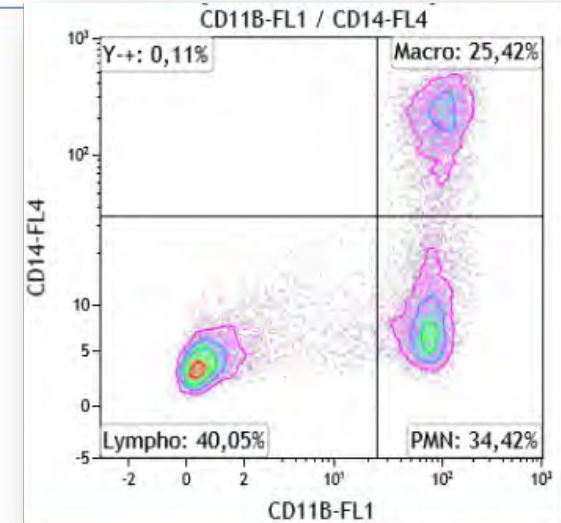


## Caratterizzazione dei subsets di leucociti vivi (L-DCC).

La proporzione relativa delle cellule vive del latte gioca un ruolo importante nell'immunità della ghiandola mammaria.

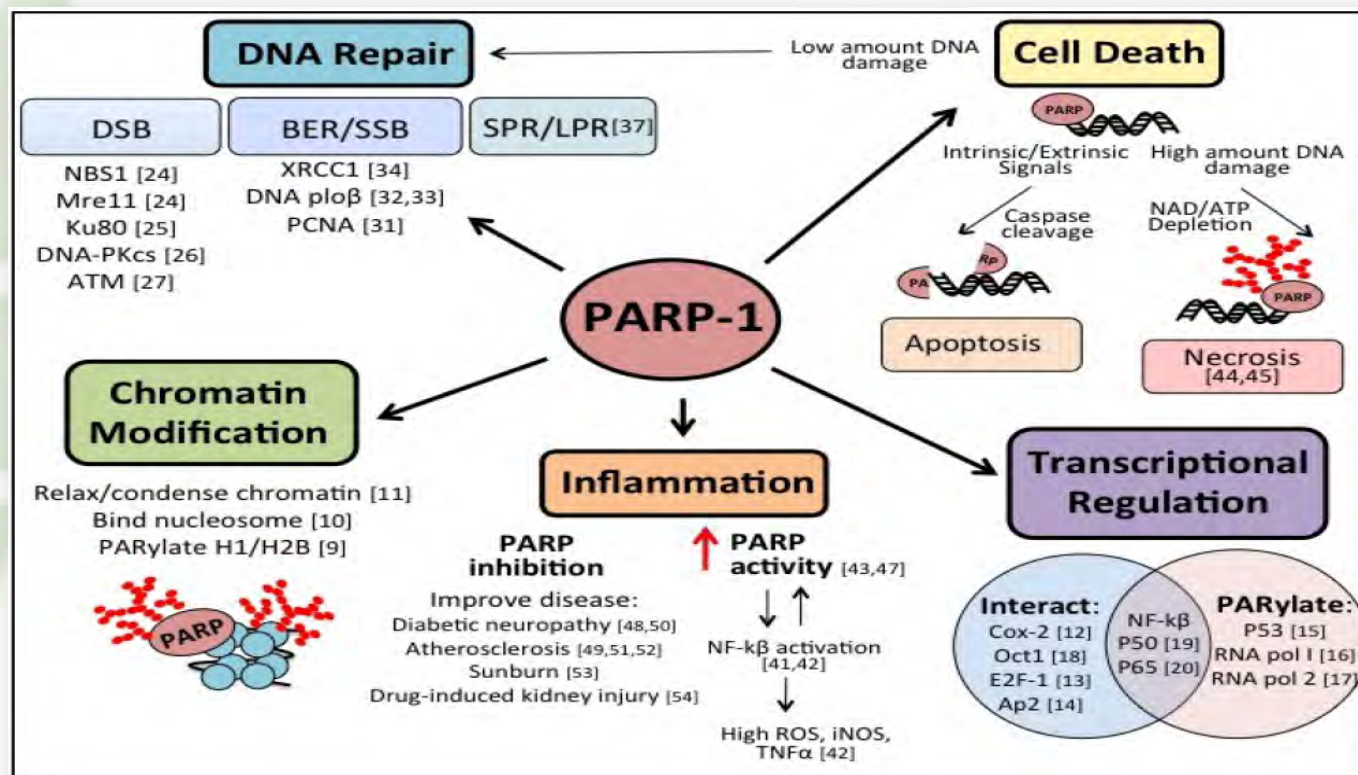
## L'espressione della $\beta$ -integrina CD11b sulla superficie dei leucociti.

Il CD11b è coinvolto nella migrazione dei monociti e dei PMN dal sangue al sito di infezione. La sua up-regolazione è associata a condizioni infiammatorie sia nell'uomo che in modelli murini (Duan et al., 2015).





# Studio dell'enzima PARP-1: potenziale marcatore di mastite

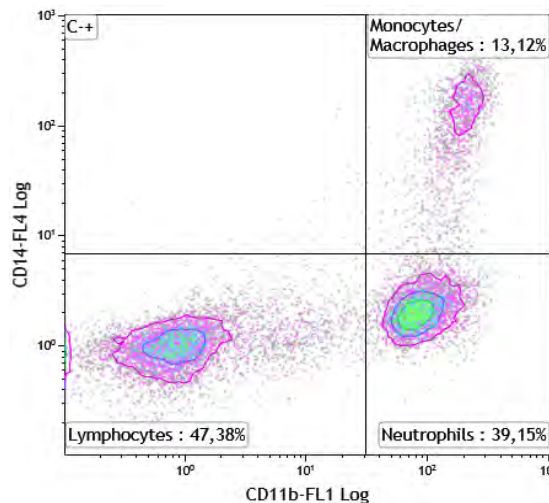
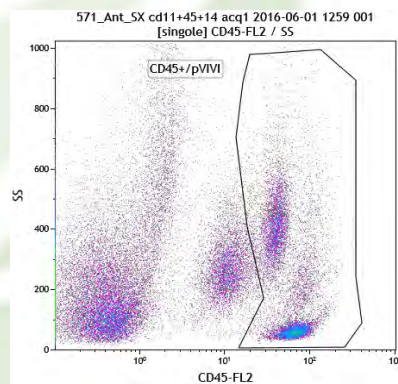


Swindall · et al., 2013.  
*Cancers* 2013, 5(3), 943-958

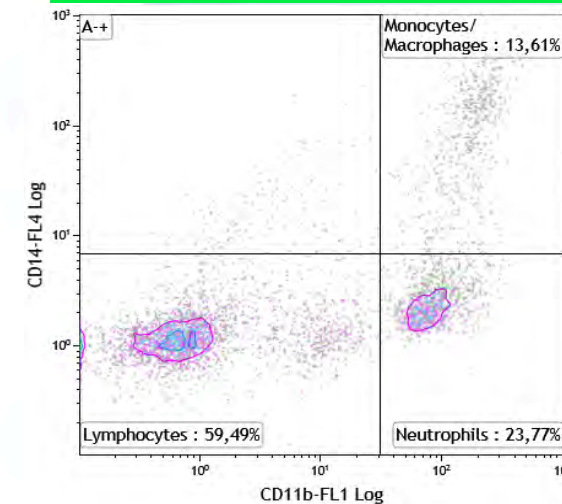
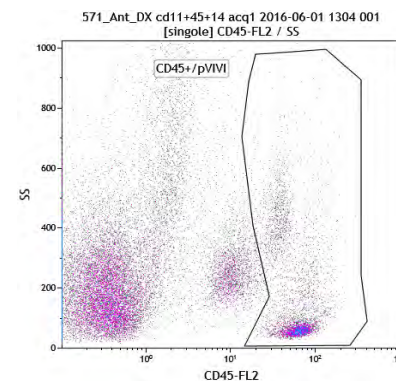
**PARP-1 ha un ruolo chiave nell'infiammazione**

# Utilizzo della L-DCC sui singoli quarti

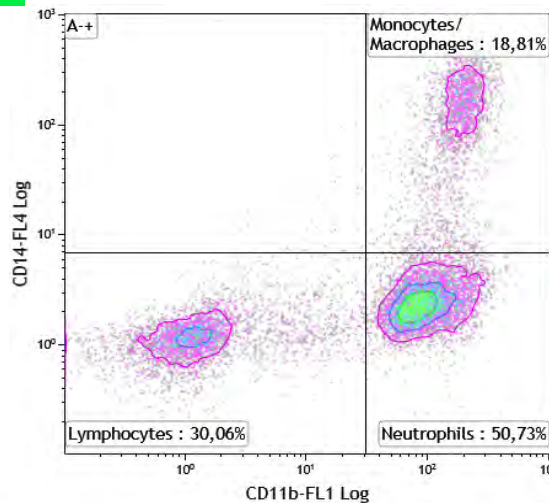
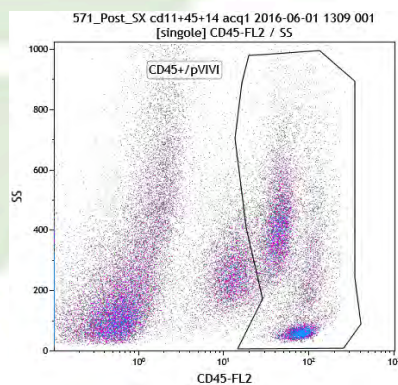
## ASX (SCC=92,000)



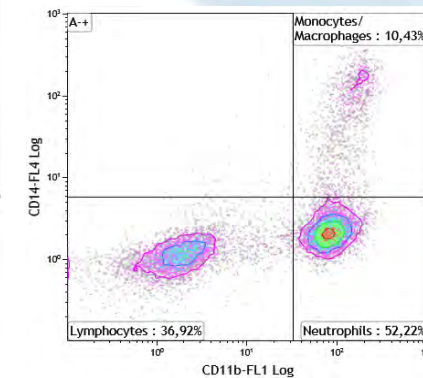
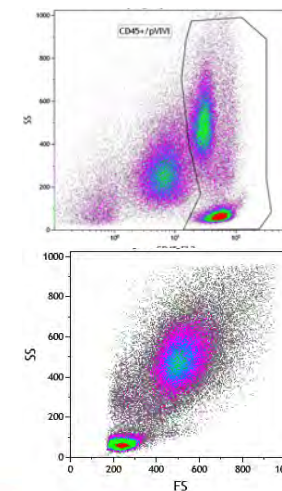
## ADX (SCC=115,000)



## PSX (SCC=142,000)

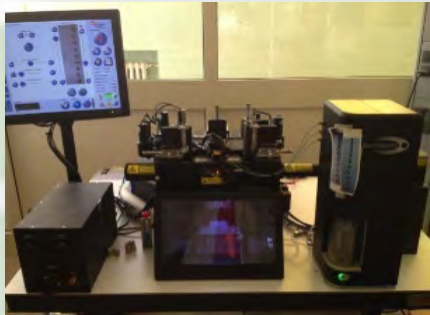
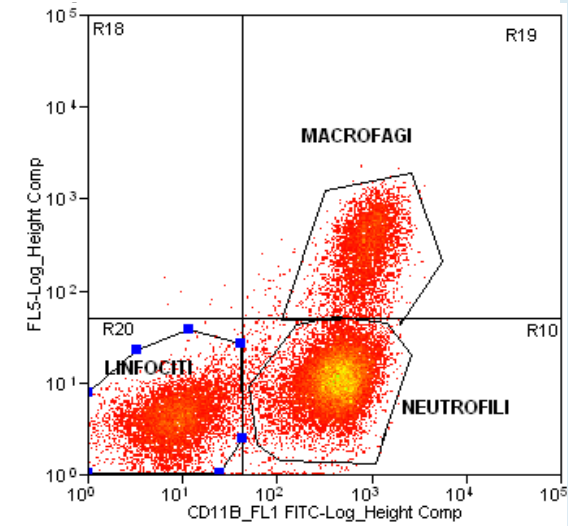
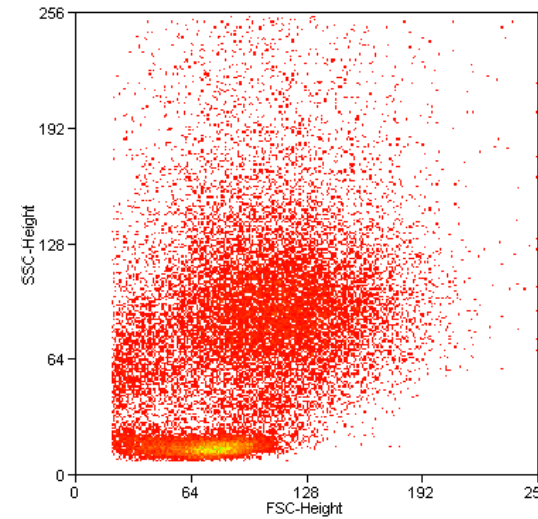


## PDX (SCC=937,000)

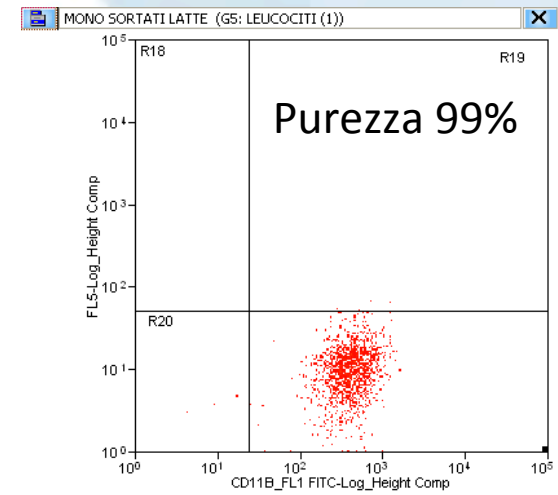
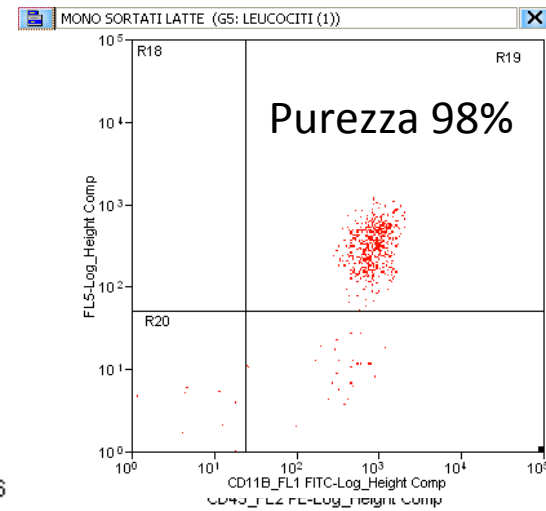
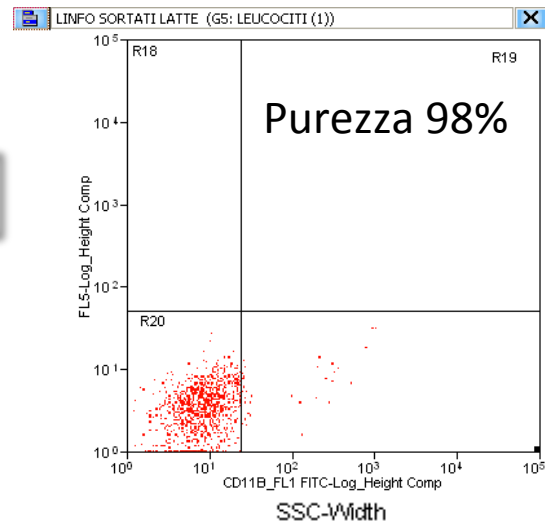




Marcatore	Cellula target
CD45	All leukocytes
CD14	Monocyte/Macrophages
CD11b	Monocyte/Macrophages; PMN
Live/Dead	Cellule vive



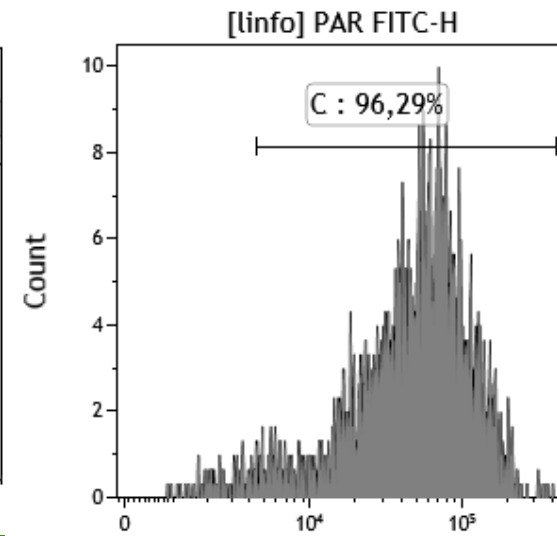
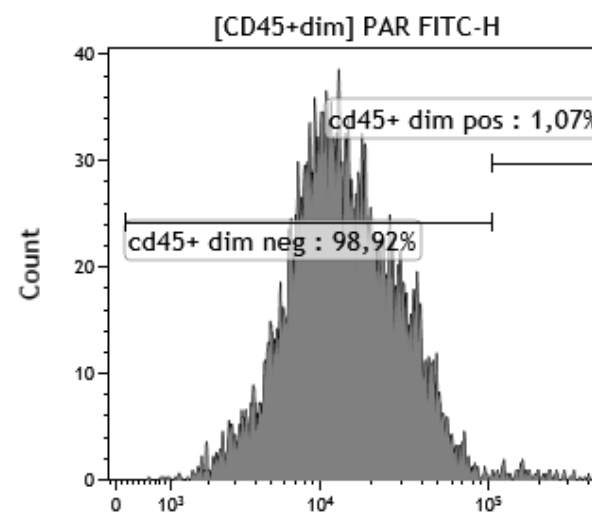
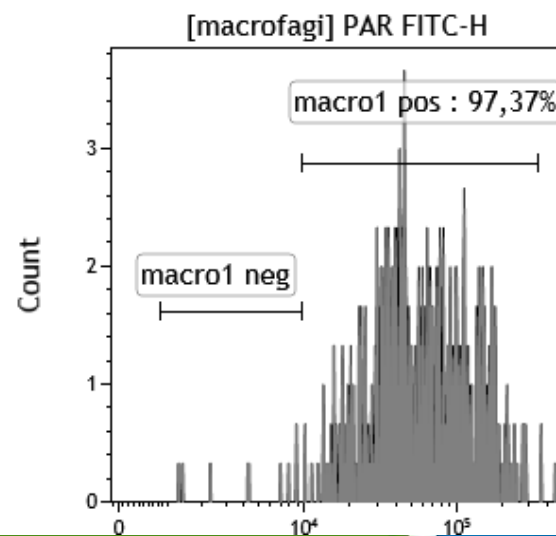
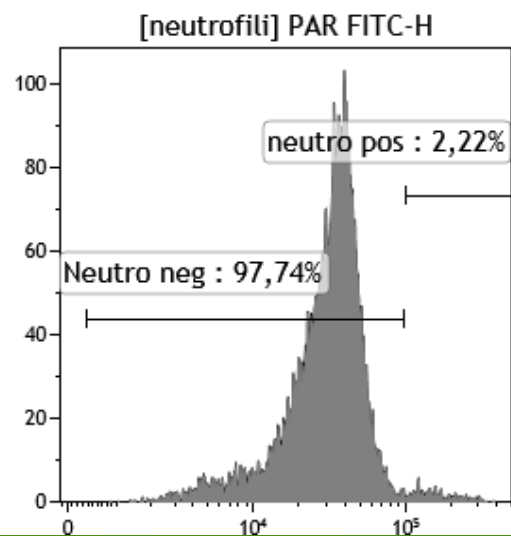
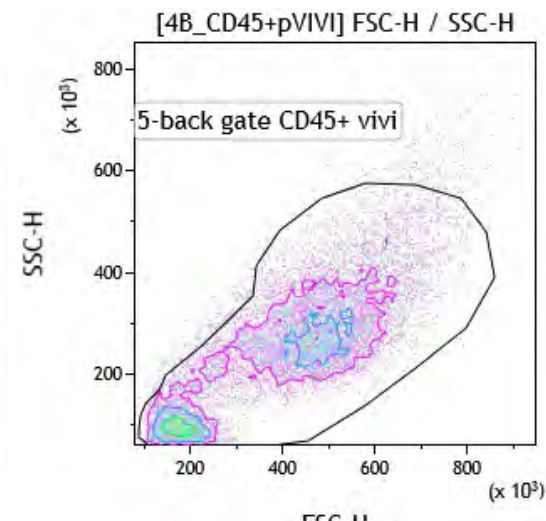
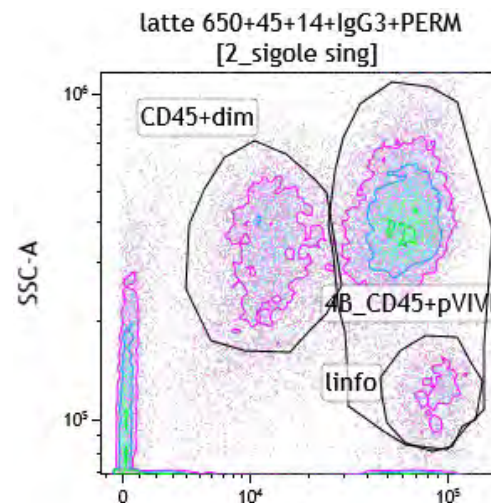
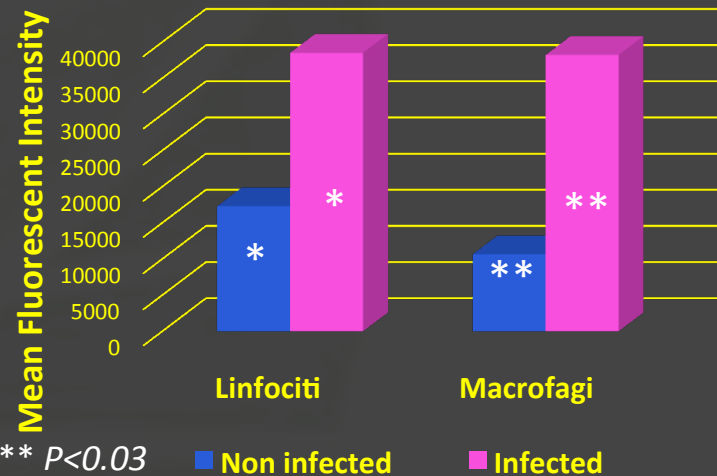
Sorting





# Rilevazione dei livelli di attivazione di PARP-1 nel latte (Patent N. 102017000100555)

## Accumulo di PAR nei linfociti e macrofagi



1. Consente di identificare e caratterizzare **nuovi marcatori** di mastite
2. Permette di identificare precocemente gli animali con **processi infiammatori in atto** anche in assenza di segni clinici e con SCC nel range considerato fisiologico
3. Correla bene con i **parametri di stalla**
4. Ha potenziale applicabilità in **condizioni di campo**

**Obiettivo 1:** testare un pannello di anticorpi monoclonali (mAb)

**Obiettivo 2:** messa a punto di pannelli multicolor

**Obiettivo 3:** Studio della sottopopolazione dei linfociti T, in particolare il subset  $\gamma\delta$  e delle cellule NK



- Migliore descrizione della risposta immunitaria del bufalo ai patogeni e ai parassiti
- Caratterizzare le differenze nel sistema immunitario tra bovino e bufalo per lo sviluppo di vaccini



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/dci](http://www.elsevier.com/locate/dci)

Characterization of leukocyte subsets in buffalo (*Bubalus bubalis*) with cross-reactive monoclonal antibodies specific for bovine MHC class I and class II molecules and leukocyte differentiation molecules

Francesco Grandoni<sup>b,1</sup>, Mahmoud M. Elnaggar<sup>a,c,1</sup>, Gaber S. Abdellrazeq<sup>a,c,1</sup>, Federica Signorelli<sup>b</sup>, Lindsay M. Fry<sup>a,d</sup>, Cinzia Marchitelli<sup>b</sup>, Victoria Hulubei<sup>a</sup>, Samy A. Khaliel<sup>c</sup>, Helmy A. Torky<sup>c</sup>, William C. Davis<sup>a,\*</sup>



## Utilizzo degli indicatori citofluorimetrici nella Precision Livestock Farming (Zootecnia di Precisione)





**Grazie per l'attenzione**