

# Studiu privind rezistența genetică a animalelor la mamită

efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*

(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

## Colectiv de redacție:

Coordonator: Călin Mircu

Membri: Daniela Ilie, Ioan Huțu, Irina Partraș

Data finalizării: 30 noiembrie, 2018.

## Acknowledgements

Activities under this work were carried out in the *Research Laboratory Complex "Horia Cernescu"* - financed by project *"A bio-economical approach of the antimicrobial agents - use and resistance"*, in the frame of contract PCCDI 7/19.03.2018, code: PN-III P1-1.2-FPRD-2017.

## 1. Introducere

Eforturile de ameliorare intensă a efectivelor de vaci cu lapte pentru obținerea unor producții superioare de lapte, materializate în special prin ameliorarea caracterelor fenotipice, au dus la deprecierea condiției de bunăstare a animalelor. Potrivit raportului AHAW (*Animal Health and Welfare Panel*) "Efectele sistemelor agricole asupra bunăstării vacilor de lapte" (2009, 2012) produs pentru EFSA (Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară), ameliorarea vacilor pentru un randament ridicat de lapte, este factorul principal care cauzează deprecierea condiției de bunăstare, în special în ceea ce privesc problemele de sănătate și este asociată cu un risc crescut de mamite, laminite, infertilitate și tulburări metabolice.

Mamita, definită ca inflamația glandei mamare, este una dintre cele mai frecvente și costisitoare afecțiuni din industria produselor lactate [Halasa et al, 2007; Berry et al, 2011], cu o incidență variind de la 25% la 40%. Aceasta reprezintă unul dintre cele mai importante motive pentru sacrificările de necesitate și pierderile productive. Estimări economice recente, au indicat o pierdere medie datorată mamitelor variind între 140-570 Euro, în funcție de agentul patogen și statusul vacii. Potrivit Bar et al. (2008) costul mediu al unui caz de mamită clinică a fost de 179\$ (compus din 115\$ din pierderile producției de lapte, 14\$ din creșterea mortalității și 50\$ din costurile de tratament asociat). Costurile asociate includ astfel, pierderea producției de lapte, scăderea calității laptelui, laptele aruncat, munca, tratamentele veterinare, sacrificările de necesitate ca urmare a mamitei, diagnosticul și măsurile preventive [Halasa et al., 2007]. Mamitele pot determina deprecieri ale stării de sănătate a animalelor cu efecte economice negative și prin urmare, dezvoltarea de metode durabile pentru a proteja animalele de fermă este de o importanță majoră pentru industria produselor lactate.

În urmă cu două decenii, activitatea de ameliorarea a animalelor a fost orientată de la ameliorarea clasică spre genetica moleculară. În prima etapă a avut loc identificarea markerilor moleculari asociați locilor pentru caracterele cantitative (QTL), iar în cea de-a doua etapă s-au utilizat acești markeri pentru selecția animalelor. Ca urmare a unor astfel de biotehnologii moderne, în țările dezvoltate de câțiva ani selecția animalelor se face și pe baza selecției genomice care este o metoda de selecție bazată pe genotip. Acest tip de selecție a fost posibil la bovine ca urmare a finalizării secvențierii întregului genom care conține 3 miliarde perechi de baze (3 GB) și aproximativ 22.000 de gene. Astfel, în prezent în țările cu zootehnie avansată în procesul de selecție merit să amelioreze caracterele importante din punct de vedere economic, alături de metodele clasice de estimare a valorii genetice a animalelor pentru alegerea indivizilor destinații să producă noua generație, se aplică selecția asistată de markeri moleculari și selecția genomică.

## Studiu privind rezistența genetică a animalelor la mamită

Mai mult, ultimii ani s-au caracterizat prin accelerarea cercetărilor la nivelul întregului genom și în mod sigur numărul de markeri moleculari descoperiți va crește de la an la an, iar o parte din aceștia vor fi folosiți în programele de ameliorare, acolo unde se va considera ca pot îmbunătăți progresul genetic.

Selecția markerilor genetici asociați cu mamita oferă un instrument valoros pentru reducerea incidenței acestei boli, deoarece duce la un nivel ridicat de discriminare între fenotipuri și o uniformitate mai mare comparativ cu selecția convențională [Kühn et al., 2008]. Studiul markerilor moleculari precum și metodele de detecție a acestora s-au dovedit a fi benefice în programele de ameliorare pentru îmbunătățirea producției de lapte, a rezistenței la boli și a caracterelor de reproducție cu rol major în deciziile manageriale [Deb et al., 2012]. Însă, selecția genetică pentru reducerea incidenței mamitei este dificilă deoarece aceasta este controlată de multe gene (caracter poligenic) cu efecte minore, care prezintă o mică parte a varianței genetice, ceea ce complică identificarea variantelor de cauzalitate.

În consecință, sunt necesare multe cercetări pe un număr mare de rase și animale pentru a găsi asociațiile puternice. Mai multe studii privind caracterizări ale regiunilor genomice și studii de asociere la nivelul genomului (GWAS), au adus contribuții la o mai bună înțelegere a dezvoltării rezistenței la boli. Astfel, până la acest moment s-au efectuat numeroase cercetări care au evidențiat implicația mai multor loci în apariția mamitelor. Din numeroase QTL studiate pentru mamită, a fost găsită o asociere între variația secvenței ADN și rezistența sau susceptibilitatea mamitei pentru osteopontina  $\beta$ -defensin-5 (BNBD5) care are un rol semnificativ în mamita subclinică, IL8 și receptorii IL8, receptorii Toll-like (TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9), BoLA-DRB3 (Bovine Leukocytic Antigen), complexul Hp-MMP9 (Haptoglobin-Matrix Metalloproteinase 9), Lactoferină (LF), CXCR1 (C-X-C motif chemokine receptor 1), BRCA1 (bovine breast cancer 1), CACNA2D1 (channel, voltage-dependent, alpha-2/ delta subunit 1) și NRAMP1 (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) [Deb et al., 2012; Singh et al., 2014]. Cele mai multe gene studiate pe scară largă au fost cele care codifică moleculele complexului major de histocompatibilitate (MHC sau BoLA), situate pe BTA23, datorită rolului lor esențial în inducerea și reglarea răspunsului imun. Astfel, multe studii au raportat asocierea dintre diferitele alele ale MHC și mamite. Genele asociate semnificativ cu indicatori diferiți de mamită sunt prezentate în tabelul 1.

Odată cu dezvoltarea studiilor de asociere la nivelul genomului (GWAS), au fost identificați și mai mulți markeri ca având efect asupra rezistenței sau susceptibilității la mamită. Studiile GWAS permit detectarea variantelor genetice asociate cu o anumită trăsătură sau boală, folosind markeri denși, cunoscuți și ca SNP-uri [Matukumalli et al., 2009]. Până la această dată, ca urmare a diverselor cercetări, s-au identificat QTL-urile asociate cu mamita pe toți cromozomii, iar câteva cazuri au fost confirmate de cel puțin două studii independente. QTL-urile au fost raportate pe BTA 6, 13, 14 și 20 [Sahana et al., 2013]; pe BTA 6, 10, 15 și 20 [Meredith et al., 2012] și pe BTA 6, 13, 19 și X la vacile Holstein [Abdel-Shafy et al., 2014].

## Studiu privind rezistența genetică a animalelor la mamită

**Tabelul 1.** Asocieri semnificative între alelele diferitelor gene și indicatori diferiți de mamită.

| Ref                        | Rasă                                       | Metoda              | Indicator | Genă<br>mamită*     |
|----------------------------|--|---------------------|-----------|---------------------|
| Masomeh F et al., 2010     | Iranian Holstein                           | PCR-SSCP            | CM        | BoLA-DRB3.2         |
| Duangjinda M et al., 2014  | Holstein × Zebu                            | PCR-RFLP            | CM        | BoLA-DRB3.2         |
| Renjin C et al., 2014      | Chinese Holstein                           | PCR-SSCP            | SCS       | IL8                 |
| Ramírez NF et al., 2013    | Holstein<br>Holstein x Jersey              | PCR-RFLP            | SM        | TLR4<br>BoLA-DRB3.2 |
| Jinming H et al., 2010     | Chinese Holstein                           | CRS-PCR             | SCC       | LF                  |
| Wojdak MK et al., 2006     | Polish Black and<br>White                  | PCR-RFLP            | SCC       | LF                  |
| Zhengrong Y et al., 2012   | Holstein<br>Simmental                      | PCR-RFLP<br>CRS-PCR | SCS       | BRCA1               |
| Hu HC et al., 2009         | Chinese Holstein                           | PCR-SSCP            | SCS       | NRAMP1              |
| Ranjan S et al., 2015      | Holstein<br>Friesian/Brown<br>Swiss/Jersey | PCR-SSCP            | CM        | TNF- $\alpha$       |
| Elmaghraby MM et al., 2018 | Holstein                                   | PCR-RFLP            | CM        | TLR2, TLR6          |
| Youngerman SM et al., 2004 | Holstein<br>Jersey                         |                     | CM        | CXCR2               |
| Magotra A et al., 2018     | Sahiwal<br>Karan Fries                     | PCR-RFLP            | CM        | CACNA2D1            |

\*CM-clinical mastitis, SCS- somatic cell score, SCC- somatic cell count

Un total de 171 SNP-uri au fost asociate semnificativ cu numărul de celule somatice (NCS) din care 52 SNP-uri au fost adnotate în cadrul unor gene implicate în răspunsul imun [Strillacci et al., 2014].

Pe BTA 1, 2, 3, 4, 9, 13, 15, 17, 21 și 22 a fost găsit cel mai mare număr de markeri din care cel mai mare număr de SNP -uri semnificative a fost găsit pe BTA15.

Studiile efectuate de Tiezzi et al. [2015] au evidențiat mai multe regiuni ca având impact asupra variației genetice a mamitelor. Regiuni cu un impact semnificativ asupra mamitelor clinice au fost situate pe cromozomii 14 (de la 2.574.909 la 3.137.144 pb), 11 (de la 19.125.116 la 19.644.044 pb), 8 (de la 61.042.106 la 61.507.067 pb), 24 (de la 46.763.152 la 47.343.727 pb), 2 (de la 30,262,141 la 41,089,812 pb), 20 (de la 32,174,117 la 61,609,342 pb), 19 (de la 15,568,242 la 15,997,977 pb și de la 61,806,709 la 68,513,565 pb), 29 (de la 34,091,321 la 34,723,917 pb), 16 (de la 68.069.139 la 68.513.565 pb). Unele dintre genele aflate pe cromozomul 14 (LY6K, LY6D, LYNX1, LYPD2, SLURP1, PSCA) fac parte din complexul LY6 (lymphocyte-antigen-6 complex) cunoscut pentru funcția de reglare a neutrofilelor legate de complexul major de histocompatibilitate. Alte gene de pe cromozomul 2 au fost, de asemenea, implicate în reglarea răspunsului imun (IFIH1, LY75 și DPP4), sau sunt ele însele reglate în prezența agenților patogeni specifici (ITGB6, NR4A2). Alte gene pe

## Studiu privind rezistența genetică a animalelor la mamită

cromozomul 20 sunt implicate în metabolismul glandei mamare (GHR, OXCT1), producția de anticorpi și fagocitoză (C6, C7, C9, C1QTNF3), supresia tumorală (DAB2) și involuția epitelului mamar (OSMR). O parte din aceste gene au fost asociate cu mamita și în alte studii. Zarrin et al. [2014] au arătat că gena OXCT1 (Succinil-CoA: 3-cetoacid-coenzima A transferaza 1) poate regla metabolismul glandelor mamare și sinteza la vacile afectate de mamită. C6, C7 și C9 s-au dovedit a fi asociate cu mamita clinică în studiile efectuate de Sodeland et al. [2011] și He et al. [2011], C1QTNF3 a fost asociată cu numărul de celule somatice [Meredith et al., 2013] iar CARD6 a fost asociată cu cazurile de infecție cu *Staphylococcus aureus* [Thacker et al., 2012].

Potrivit Strillacci et al. [2014] un număr mare de SNP-uri au fost identificate pe 10 cromozomi (BTA 1, 2, 3, 4, 9, 13, 15, 17, 21 și 22) ca fiind asociate semnificativ cu celulele somatice (SCS). Dintre acestea patru SNP-uri sunt situate pe BTA 9 [BovineHD0900019961 (rs136413030), BovineHD0900019716 (rs109049649), BovineHD4100007550 (rs41662465) și Hapmap49339-BTA-84110 (rs41662464)] lângă gena CTGF. Genă ZNFX1 pe BTA 13 a fost aproape de patru SNP-uri [BovineHD4100010442 (rs41634068), BovineHD1300022626 (rs137320993), BovineHD1300022630 (rs109123247) și BovineHD1300022672 (rs41710487)]. Genele CXCL2 și CXCL10 pe BTA6 au fost semnificativ asociate cu SNP-ul BovineHD0600025253 (rs42615160). Toate aceste gene (ZNFX1, CTGF, TRIM21, CXCL2 și CXCL10) situate în apropierea SNP-urilor semnificative sunt exprimate diferențial semnificativ de către celulele epiteliale mamare bovine stimulate de *E. coli* [Gilbert et al., 2013].

Identificarea unor alte variante genetice asociate cu rezistența la mamită a fost efectuată recent de Kurz et al., [2018] prin GWAS, utilizând o matrice de înaltă densitate (Illumina 777962 SNPs) pe vaci de rasă Holstein. Au fost identificate 27 QTL-uri pentru rezistența la mamite pe baza a 117 SNP-uri, inclusiv 10 QTL-uri noi. Dintre acestea un număr de 17 QTL-uri s-au suprapus cu QTL-urile raportate anterior în deferitele studii, iar un QTL include gena RASGRP1, o gena candidată pentru rezistența la mamită.

Identificarea unui număr atât de mare de markeri SNP în genomul animalelor a permis efectuarea studiilor de asociere la nivelul genomului și disponibilitatea acestor SNP-uri a sporit puterea identificării QTL-urilor permițând o estimare mai precisă a valorilor de ameliorare. Detectarea continuă a regiunilor genomice va ajuta la identificarea mai multor regiuni și a acelor gene potențial candidate care pot fi responsabile de variația genetică a rezistenței / susceptibilității la mamită. Asocieri semnificative prin GWAS între alelele diferitelor gene și mamită sunt prezentate în tabelul 2.

Multitudinea de rezultate obținute până la această dată reflectă într-o oarecare măsură faptul că rezistența/ susceptibilitatea la mamită este un caracter complex care implică multe molecule și căi care pot fi reglate de multe gene. Pe lângă câteva constatări consensuale, totuși, rezultatele par a fi specifice fiecărei rase/populație studiată. Factorii externi (de mediu) și cei interni (genetici) ai populațiilor și raselor pot influența foarte mult magnitudinea legăturilor dintre gene și fenotip.

Studiu privind rezistența genetică a animalelor la mamită

**Tabelul 2.** Asocieri semnificative prin GWAS între alelele diferitelor gene și mamită.

| Cromozom | Regiunea                 | Genă/SNP   | Rasa                    | Metoda         | Ref.                      |
|----------|--------------------------|--|-------------------------|----------------|---------------------------|
| 2        | 30262141<br>41089812     | IFIH1, DPP4,<br>ITGB6, LY75,<br>NR4A2                                    | Holstein                | Illumina 50K   | Tiezzi F et al,<br>2015   |
| 14       | 2754909 -<br>3137184     | LY6K, LY6D,<br>LYNX1, LYPD2,<br>SLURP1, THEM6,<br>PSCA, BAI1,<br>TSNARE1 | Holstein                | Illumina 50K   | Tiezzi F et al,<br>2015   |
| 20       | 32174117 -<br>61609342   | GHR, OXCT1, C6,<br>C7, C9, CARD6,<br>DAB2, OSMR, PRLR,<br>C1QTNF3        | Holstein                | Illumina 50K   | Tiezzi F et al,<br>2015   |
| 2        | 103892096                | BTA-120624   | Norwegian<br>Red cattle | Affymetrix 25K | Sodeland et al,<br>2011   |
| 6        | 90670190                 | BTA-119376   | Norwegian<br>Red cattle | Affymetrix 25K | Sodeland et al,<br>2011   |
| 14       | 45153040                 | BTA-34923  | Norwegian<br>Red cattle | Affymetrix 25K | Sodeland et al,<br>2011   |
| 20       | 43267496                 | BTA-19985  | Norwegian<br>Red cattle | Affymetrix 25K | Sodeland et al,<br>2011   |
| 4        | 98543003                 | PLXNA4   | Valdostana<br>Red Pied  | Illumina 770K  | Strillacci et al,<br>2014 |
| 9        | 73355572                 | VNN1   | Valdostana<br>Red Pied  | Illumina 770K  | Strillacci et al,<br>2014 |
| 15       | 27339214                 | rs136596272  | Valdostana<br>Red Pied  | Illumina 770K  | Strillacci et al,<br>2014 |
| 15       | 27670811                 | rs134799988  | Valdostana<br>Red Pied  | Illumina 770K  | Strillacci et al,<br>2014 |
| 15       | 30514604                 | rs134980659/<br>THY1   | Valdostana<br>Red Pied  | Illumina 770K  | Strillacci et al,<br>2014 |
| 15       | 31105101                 | rs41754552   | Valdostana<br>Red Pied  | Illumina 770K  | Strillacci et al,<br>2014 |
| 15       | 31110621                 | rs110269361  | Valdostana<br>Red Pied  | Illumina 770K  | Strillacci et al,<br>2014 |
| 21       | 14303664                 | SLCO3A1  | Valdostana<br>Red Pied  | Illumina 770K  | Strillacci et al,<br>2014 |
| 25       | 13011549                 | SHISA9   | Valdostana<br>Red Pied  | Illumina 770K  | Strillacci et al,<br>2014 |
| 25       | 13017281                 | SHISA9   | Valdostana<br>Red Pied  | Illumina 770K  | Strillacci et al,<br>2014 |
| 2        | 118870124 -<br>118870999 | FBXO36/<br>rs133973886   | Holstein                | Illumina 770K  | Kurz et a.,<br>2018       |
| 3        | 91429028 -<br>91852910   | USP24/<br>rs42349819   | Holstein                | Illumina 770K  | Kurz et a.,<br>2018       |
| 7        | 31997138 -<br>32005542   | PRDM6/<br>rs109782486  | Holstein                | Illumina 770K  | Kurz et a.,<br>2018       |

## Studiu privind rezistența genetică a animalelor la mamită

|    |                             |  |          |               |                     |
|----|-----------------------------|--|----------|---------------|---------------------|
| 7  | 32661575 -<br>32678638      | rs136099077  | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 8  | 103,092,247-<br>103,096,670 | rs110448143  | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 10 | 34258059 -<br>34455599      | RASGRP1 /<br>rs109623385                               | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 10 | 27798183 -<br>28002566      | LOC784925/<br>rs136350185                              | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 11 | 102314941 -<br>102336231    | NTNG2/<br>rs110442181                                  | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 11 | 96629841-<br>96777054       | PBX3 /<br>rs110090917                                  | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 12 | 76826267 -<br>76870470      | CLDN10/<br>rs41668080                                  | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 15 | 47742405 -<br>47775426      | OR52E4/rs110711<br>227                                 | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 15 | 51068247-<br>51303719       | LOC618050 /<br>rs135549815                             | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 16 | 20,608,750 -<br>20,623,978  | ESRRG<br>/rs133596831                                  | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 17 | 41733436 -<br>41785932      | FAM198B /<br>rs109674792                               | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 17 | 42046346 -<br>42208979      | rs133679609  | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 17 | 10393778 -<br>10411003      | ARHGAP10 /<br>rs136877205                              | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 18 | 49684020 -<br>49690172      | FBL/ rs41257394  | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 18 | 5268101-<br>5268998         | rs41858359   | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 18 | 43568128 -<br>43596859      | FAAP24/<br>rs135753929                                 | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 26 | 26078080-<br>26190210       | SORCS3/<br>rs110130285,<br>rs136355517,<br>rs135745332 | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 26 | 28,154738 -<br>28204944     | SORCS1/rs418376<br>62                                  | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 26 | 28796634 -<br>28813937      | rs42434953   | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 26 | 27751543 -<br>27790973      | rs41840890   | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 27 | 24405764 -<br>24803258      | TNKS/<br>rs133086162                                   | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |
| 28 | 30834105 -<br>30879841      | MIR584-3/<br>rs134956968                               | Holstein | Illumina 770K | Kurz et a.,<br>2018 |

## 2. Studiu de caz

În această primă etapă a proiectului s-a început cu colectarea datelor fenotipice de la vaci de rasă Bălțată Românească și Brună. S-a inclus în studiu o singură fermă din zona de vest a țării cu un efectiv de cca. 330 vaci cu lapte întreținute în stabulație liberă.

Indicatorii tehnici ai fermei sunt: producția de lapte pe lactație normală (305 zile) de cca. 5500 kg; masa corporală medie a vacilor la maturitate de 600 kg; vârsta la prima fătare de cca. 32 luni la rasa BR și cca. 35 luni la rasa Brună; durata medie a intervalului între fătări de sub 400 de zile, durata repausului mamar de 73 zile, iar cea a repausului uterin de 120 zile. În fermă se practică sistemul de însămânțări și fătări eșalonate pe tot parcursul anului iar vacile luate în studiu au fost cuprinse între a 1-a și a 10-a lactație.

Caracterizarea fenotipică s-a bazat pe înregistrarea cazurilor de vaci cu mamită clinică (mamită hemoragică și purulentă), evaluarea numărului de celule somatice și evaluarea efectivului de vaci lunar pentru detectarea mamitelor subclinice cu ajutorul dispozitivul Draminski Mastitis Detector 4x4 Q MAST cu pe o perioadă de cinci luni. Astfel, mamitele subclinice au fost definite ca și cazuri în care infecția intramamară a fost detectată pe baza conductivității laptelui, dar nu au fost detectate modificări la nivelul glandei mamare. Mamitele clinice au fost definite ca infecții intramamare însoțite de modificări inflamatorii detectabile clinic în glanda mamară și / sau modificări ale consistenței sau culorii laptelui.

Identificarea mamitei clinice a fost efectuată de către medicul veterinar din ferma și a constat în efectuarea periodică a inspecțiilor vizuale și tactile a tuturor sferturilor glandei mamare pentru modificarea culorii, consistenței și temperaturii și inspecția vizuală a laptelui pentru modificarea culorii sau consistenței.

În cadrul fermei, pe parcursul anului 2018 au fost prezente un număr mediu de 332 de vaci din care au fost incluse în Controlul Oficial al Producției de Lapte (COP) în medie un număr de 280 de vaci.

Înregistrarea datelor privind valorile productive ale efectivului total de vaci incluse în Controlul Oficial al Producției de Lapte/2018, este redată în tabelul 3.

Producția medie a vacilor aferente efectivului total pentru anul 2018 a fost de  $5587 \pm 71,49$  kg lapte/lactație standard, corectată la echivalent maturitate. Vacile BR au realizat o producție de lapte mai mare ( $5610,55 \pm 76,36$  kg) decât vacile BM ( $5476,07 \pm 194,14$  kg) dar diferența nu a atins pragul de semnificație statistică. La nivelul efectivului total, conținutul mediu de grăsime înregistrat a fost de  $3,99\% \pm 0,03$ , (cu un minim de 2,51% și un maxim de 5,76%) implicând astfel o producție medie de  $221,17 \pm 2,78$  kg grăsime (cu un minim de 64 kg și un maxim de 332 kg). Procentul mediu de proteină al laptelui, aferente efectivului total, a fost de  $3,42\% \pm 0,02$  (cu un minim de 2,67% și un maxim de 5,02%), producția medie fiind de  $189,34 \pm 2,18$  kg proteină cu un minim înregistrat de 52 kg respectiv o valoare maximă de 269 kg.

## Studiu privind rezistența genetică a animalelor la mamită

**Tabelul 3.** Valorile medii și indicii de dispersie pentru parametrii productivi pe lactația standard în cadrul efectivului de vaci de rasă Bălțată Românească și Brună.

| Însușirea                 | Rasa  | Media   | Minim   | Maxim   | Dev.st. | Valoarea <i>p</i> |
|---------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|-------------------|
| Cantitatea de lapte (kg)  | BR    | 5610,55 | 1388,00 | 8196,00 | 1109,23 | 0,5219            |
|                           | Brună | 5476,07 | 1681,00 | 7658,00 | 1273,04 |                   |
| Procentul de grăsime (%)  | BR    | 3,96    | 2,51    | 5,76    | 0,45    | 0,0477            |
|                           | Brună | 4,13    | 2,87    | 5,53    | 0,50    |                   |
| Procentul de proteină (%) | BR    | 3,40    | 2,67    | 4,40    | 0,26    | 0,0388            |
|                           | Brună | 3,52    | 3,02    | 5,02    | 0,36    |                   |
| NCS (celule x 1000/ml)    | BR    | 229,43  | 13      | 3242    | 402,73  | 0,5521            |
|                           | Brună | 194,33  | 15      | 1616    | 141,79  |                   |

Analiza efectuată între cele două rase, asupra parametrilor productivi, relevă diferențe semnificative ( $p \leq 0,05$ ) asociate procentului de grăsime (3,96 vs. 4,13), respectiv procentului de proteină (3,40 vs. 3,52).

### 2.1. Stabilirea ratei anuale de incidență, prevalență și proporția de recidivă

În cazul mamitelor a fost definită o perioadă medie de recuperare ca fiind totalul dintre perioada efectivă de tratament și timpul de așteptare, adică numărul de zile în care medicamentul persistă în organismul animalului. În acest mod s-au luat în calcul o perioadă de recuperare de 13 zile. Pentru un animal, raportări succesive ale mamei într-un interval de timp mai mic decât perioada medie de recuperare corespunzătoare, au fost tratate ca un caz unic de boală. În caz contrar, acestea au fost considerate ca și cazuri separate (recidivă a bolii), indiferent de sferturile de uger afectate.

Rata de incidență *I* a fost definită astfel:

$$I = \frac{\text{nr. de cazuri noi de boala în perioada de timp}}{\text{efectivul mediu de animale din perioada de timp}}$$

Această valoare reprezintă numărul de cazuri de boala nou aparute per 100 de indivizi, în perioada de timp luată în calcul.

Prevalența *P* a fost definită astfel:

$$P = \frac{\text{nr. de indivizi ce au suferit boala în unitatea de timp}}{\text{efectivul mediu de animale din perioada de timp}}$$

În cazul prevalenței, fiecare individ este numărat o singură dată în perioada de timp, indiferent de numărul de cazuri de boală ale individului din acest interval.

## Studiu privind rezistența genetică a animalelor la mamită

Proportia de recidivă, sau recurență,  $R$ , a fost definită astfel:

$$R = \frac{\text{nr. de indivizi cu cel puțin doua cazuri de boală în unitatea de timp}}{\text{nr. de indivizi ce au contactat boala cel puțin odata în unitatea de timp}}$$

În cazul mamitelor clinice au fost observate 81 de cazuri pe parcursul anului 2018. Numerele corespunzătoare de vaci cu cel puțin un caz pe an a fost 72, restul de 8 vaci fiind cazuri de recidivă.

Cazurile de mamite clinice au fost de două feluri: mamite hemoragice și mamite purulente (tabelul 3). Trei cazuri survenite pe parcursul anului au fost catalogate simultan și ca mamită hemoragică, și purulentă. S-au înregistrat 60 de cazuri de mamită hemoragică din care 5 au fost recidivă. În cazul mamitelor purulente, acestea au fost observate la un număr de 23 de vaci corespunzând unui număr total de 24 de cazuri. A fost observată o singură vacă cu recidivă a mamitei purulente.

**Tabelul 4.** Proportia de recidivă, rata anuală de incidență și prevalență anuală a mamitelor clinice

| Specificare              | Nr. animale afectate | % mamite hemoragice | % mamite purulente |
|--------------------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| Proportia de recidivă    | 8                    | 9,09                | 4,35               |
| Rata anuală de incidență | 81                   | 18,10               | 7,24               |
| Prevalența anuală        | 72                   | 16,59               | 6,94               |

Detectarea mamitelor subclinice s-a efectuat lunar cu ajutorul dispozitivului Draminski Mastitis Detector 4x4 Q MAST. Valorile afișate pentru fiecare sfert au fost interpretate ca indicatoare de mamită subcliniă în cazul în care aceste valori au fost mai mici sau egale cu valoarea 250. Au fost apoi calculate procentele de vaci identificate cu mamită subcliniă, raportate la efectivul total de vaci de lapte din luna respectivă.

**Tabelul 5.** Procentul de vaci cu mamită subcliniă, raportat la valoarea medie a efectivului din luna analizată

| Luna               | Iunie | Iulie | Septembrie | Octombrie | Noiembrie |
|--------------------|-------|-------|------------|-----------|-----------|
| Nr. cazuri         | 5     | 12    | 10         | 13        | 8         |
| Efectiv mediu      | 331   | 327   | 328        | 333       | 333       |
| Mamită subcliniă % | 1,51  | 3,67  | 3,05       | 3,90      | 2,40      |

## Bibliografie

1. Abdel-Shafy H, Bortfeldt RH, Reissmann M, Brockmann GA (2014) Short communication: Validation of somatic cell score-associated loci identified in a genome-wide association study in German Holstein cattle. *J Dairy Sci*, 97:2481-2486
2. Bar D, LW Tauer, G Bennett, RN Gonzalez, JA Hertl, YH Schukken, HF Schulte, FL Welcome, YT Grohn (2008) The Cost of Generic Clinical Mastitis in Dairy Cows as Estimated by Using Dynamic Programming. *Journal of Dairy Science*, 91(6):2205 – 2214
3. Berry DP, Kearney JF, Twomey K, Cromie AR, Evans RD (2010) Revision of the fertility and health genetic evaluations for Irish Holstein-Friesian dairy cattle. *Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock production*. Leipzig, Germany, August 1-6
4. Deb R, Chakraborty S, Singh U (2012) Molecular Markers and Their Application in Livestock Genomic Research. *J. Vet. Sci. Technol.*, 3:5
5. Elmaghraby MM, El-Nahas AF1, Fathala MM; Sahwan FM, Tag EL-Dien MA (2018) Association of toll-like receptors 2 and 6 polymorphism with clinical mastitis and production traits in Holstein cattle, *Iranian J Vet Res*, 19:202-207
6. Gilbert FB, Cunha P, Jensen K, Glass EJ, Foucras G, Robert-Granié C, Rupp R,
7. Rainard P (2013) Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Vet Res*, 44:40.
8. Halasa T., K. Huijps, O. Østeras, and H. Hogeveen (2007) Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet. Q.*, 29:18–31
9. He Y, Chu Q, Ma P, Wang Y, Zhang Q, et al. (2011) Association of bovine CD4 and STAT5b single nucleotide polymorphisms with somatic cell scores and milk production traits in Chinese Holsteins. *J Dairy Res* 78: 242–249. doi: 10.1017/S0022029911000148
10. Hu HC, Wang HM, Li JB, Wang CF, Lai SJ, Li QL, Zhong JF (2009) Genetic polymorphism of *Nramp1* gene and correlation with mastitis in Holstein cattle. *Yi Chuan* 31(1):57-62
11. Kühn C, Reinhardt F, Schwerin M (2008) Marker assisted selection of heifers improved milk somatic cell count compared to selection on conventional pedigree breeding values. *Arch Tierz Dummerstorf* 51:23–32
12. Kurz J P, Yang Z, Weiss RB, Wilson DJ, Rood KA, Liu GE, Wang Z (2018) A genome-wide association study for mastitis resistance in phenotypically well-characterized Holstein dairy cattle using a selective genotyping approach. *Immunogenetics*. DOI: 10.1007/s00251-018-1088-9
13. Magotra A, Gupta ID, Verma A, Alex R, Mr V, Ahmad T. (2018) Candidate SNP of CACNA2D1 Gene Associated with Clinical Mastitis and Production Traits in Sahiwal (*Bos taurus indicus*) and Karan Fries (*Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus*), *Animal Biotechnology*,
14. *Anim Biotechnol*, 20:1-7. DOI: 10.1080/10495398.2018.1437046
15. Matukumalli LK, Lawley CT, Schnabel RD, Taylor JF, Allan MF, Heaton MP, et al. (2009) Development and Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle. *PLoS ONE* 4(4): e5350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005350>
16. Meredith BK, Berry DP, Kearney F, Finlay EK, Fahey AG, et al. (2013) A genome-wide association study for somatic cell score using the Illumina high-density bovine beadchip identifies several novel QTL potentially related to mastitis susceptibility. *Front Genet* 4.

## Studiu privind rezistența genetică a animalelor la mamită

---

17. Meredith BK, Kearney FJ, Finlay EK, Bradley DG, Fahey AG, Berry DP, Lynn DJ (2012) Genome-wide associations for milk production and somatic cell score in Holstein-Friesian cattle in Ireland. *BMC Genetics*, 13:21
18. Ranjan S, Bhushan B, Panigrahi M, Kumar A, Deb R, Kumar P, Sharma D (2015) Association and expression analysis of single nucleotide polymorphisms of partial tumor necrosis factor alpha gene with mastitis in crossbred cattle. *Anim Biotechnol* 26(2):98-104. doi: 10.1080/10495398.2014.929582.
19. Rupp R, Boichard D (2003) Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet Res* 34: 671–688
20. Sahana G, Gulbrandsen B, Thomsen B, Lund MS (2013) Confirmation and fine-mapping of clinical mastitis and somatic cell score QTL in Nordic Holstein cattle. *Animal Genetics*, 44:620–626
21. Singh U, Rajib D, Alyethodi RR, Rani A, Sushil K, Sandip C, Kuldeep D, Arjava S (2014) Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review, *Biomarkers and Genomic Medicine*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bgm.2014.03.001>
22. Sodeland M, Kent MP, Olsen HG, Opsal MA, Svendsen M, et al. (2011) Quantitative trait loci for clinical mastitis on chromosomes 2, 6, 14 and 20 in Norwegian Red cattle. *Anim Genet* 42: 457–465. doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02165.x
23. Strillacci MG, Frigo E, Schiavini F, Samore AB, Canavesi F, Vevey M, Cozzi MC, Soller M, Lipkin E, Bagnato A (2014) Genome-wide association study for somatic cell score in Valdostana Red Pied cattle breed using pooled DNA. *Bmc Genetics*, 15:106
24. Thacker JD, Balin BJ, Appelt DM, Sassi-Gaha S, Purohit M, et al. (2012) NLRP3 inflammasome is a target for development of broad-spectrum anti-infective drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 1921–1930. doi: 10.1128/AAC.06372-11
25. Tiezzi F, Parker-Gaddis KL, Cole JB, Clay JS, Maltecca C (2015) A Genome-Wide Association Study for Clinical Mastitis in First Parity US Holstein Cows Using Single-Step Approach and Genomic Matrix Re-Weighting Procedure. *PLoS ONE* 10(2): e0114919. doi:10.1371/journal.pone.0114919
26. Youngerman SM, Saxton AM, Oliver SP, et al. (2004) Association of CXCR2 polymorphisms with subclinical and clinical mastitis in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 87:2442e2448.
27. Zarrin M, Wellnitz O, van Dorland HA, Gross JJ, Bruckmaier RM (2014) Hyperketonemia during lipo- polysaccharide-induced mastitis affects systemic and local intramammary metabolism in dairy cows. *J Dairy Sci* 97: 3531–3541. doi: 10.3168/jds.2013-7480