



UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

Controllo genetico dei marcatori di stress

Paolo AJMONE MARSAN

Dipartimento di Scienze Animali della Nutrizione e degli Alimenti
– DIANA –
Università Cattolica del S. Cuore
Piacenza/Cremona
paolo.ajmone@unicatt.it

Cremona 9 Novembre 2021



Regione Lombardia



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore



Regione Lombardia



benelat



Regione Lombardia

Interventi a breve e lungo termine per il
miglioramento del benessere, dell'efficienza e della
qualità delle produzioni dei bovini da latte in
Lombardia



Bando 2018 d.d.s. n. 4403 del 28/03/2018

Cremona 9 Novembre 2021



Regione Lombardia

Stress nella bovina da latte



Inefficienza

Fisiologia

Ambiente

Management



Salute e benessere



Produzione e riproduzione



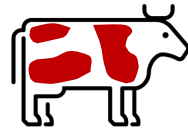
Genes **2021**, *12*, 534. <https://doi.org/10.3390/genes12040534>



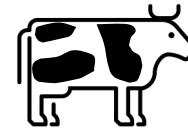
Article

Genetic Regulation of Biomarkers as Stress Proxies in Dairy Cows

Marco Milanesi ^{1,2} , Matilde Maria Passamonti ¹, Katia Cappelli ³ , Andrea Minuti ¹ , Valentino Palombo ⁴ , Sandy Sgorlon ⁵, Stefano Capomaccio ³ , Mariasilvia D'Andrea ⁴ , Erminio Trevisi ¹ , Bruno Stefanon ⁵ , John Lewis Williams ^{1,6} and Paolo Ajmone-Marsan ^{1,7,*}



350 Pezzate Rosse



343 Frisone



10 aziende in
provincial di
Udine



120K SNP

Studi precedenti

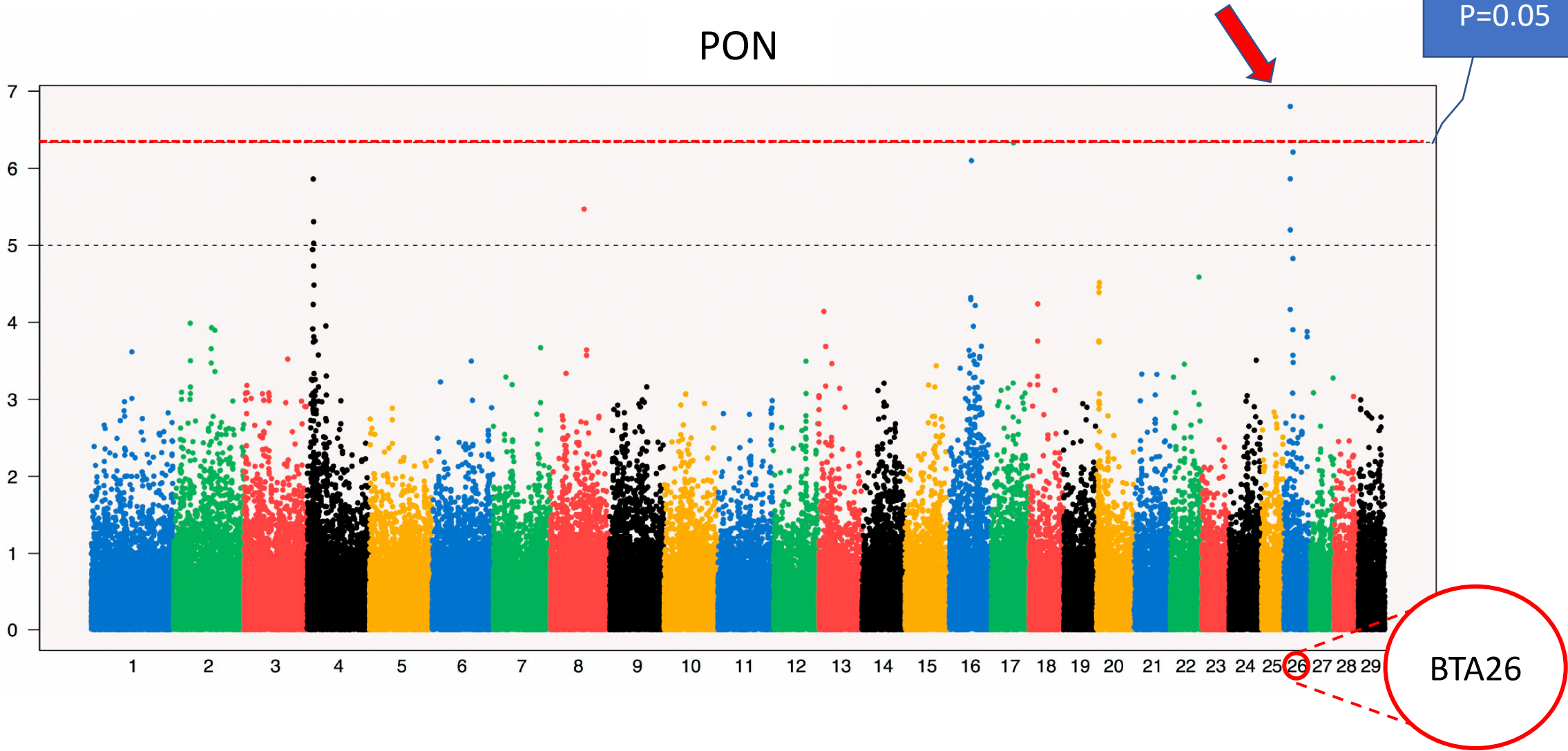
Tabella 1. Numero di associazioni significative identificate nel progetto GEN2PHEN con GWAS tradizionale e analisi MUGBAS nelle razze Frisona (FRI), Pezzata Rossa Italiana (PRI) ed in entrambe le razze (FRI e PRI).

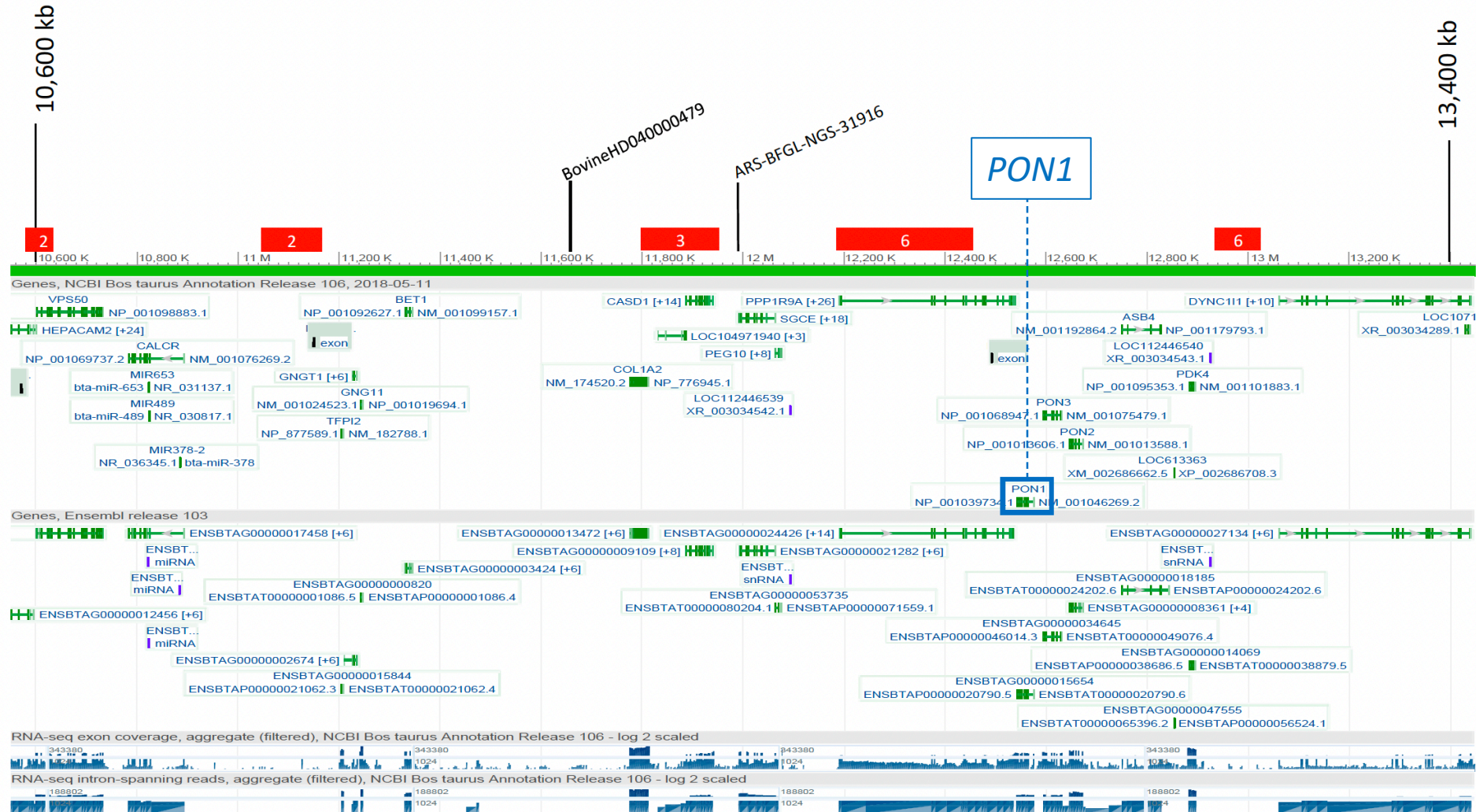
Fenotipi	Tipo	FRI		PRI		FRI e PRI	
		GWAS	MUGBAS	GWAS	MUGBAS	GWAS	MUGBAS
Zinco	metabolismo		27		1		
Bilirubuna	metabolismo		2	1			
Urea (latte)	metabolismo		1				
Beta Idrossi Butirrato (latte)	metabolismo				7		
Glucosio	metabolismo				1		
Colesterolo	metabolismo						
Idrossi Butirrato	metabolismo						
NEFA	metabolismo						
Urea (sangue)	metabolismo						
GGT	stress	13	76	2			
Ceruloplasmina	stress	3	16	1	6		3
Paraoxonasi	stress	2	19		7		2
Proteine totali	stress		8				
Globuline	stress				2		
Albumine	stress						
Aptoglobina	stress			1			
AstGot	stress						
Cortisolo (latte)	stress						
Cortisolo (pelo)	stress						
Creatinina	stress						
Grasso	produttivo	12	76	8	10		
Proteina	produttivo	1	67				
Caseina	produttivo		63				

GGT	stress	13	76	2	14	1	12
Ceruloplasmina	stress	3	16	1	6		3
Paraoxonasi	stress	2	19		7		2

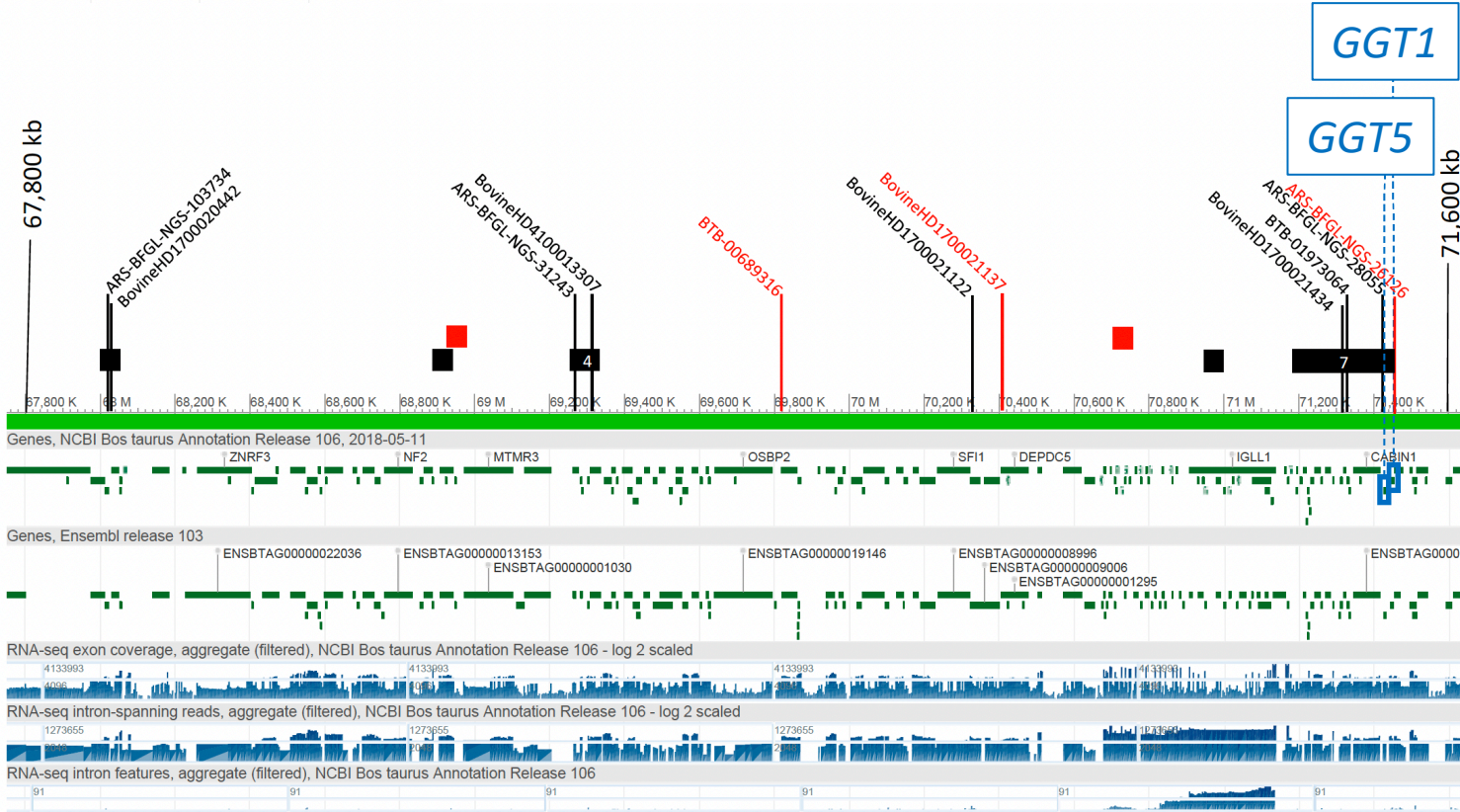
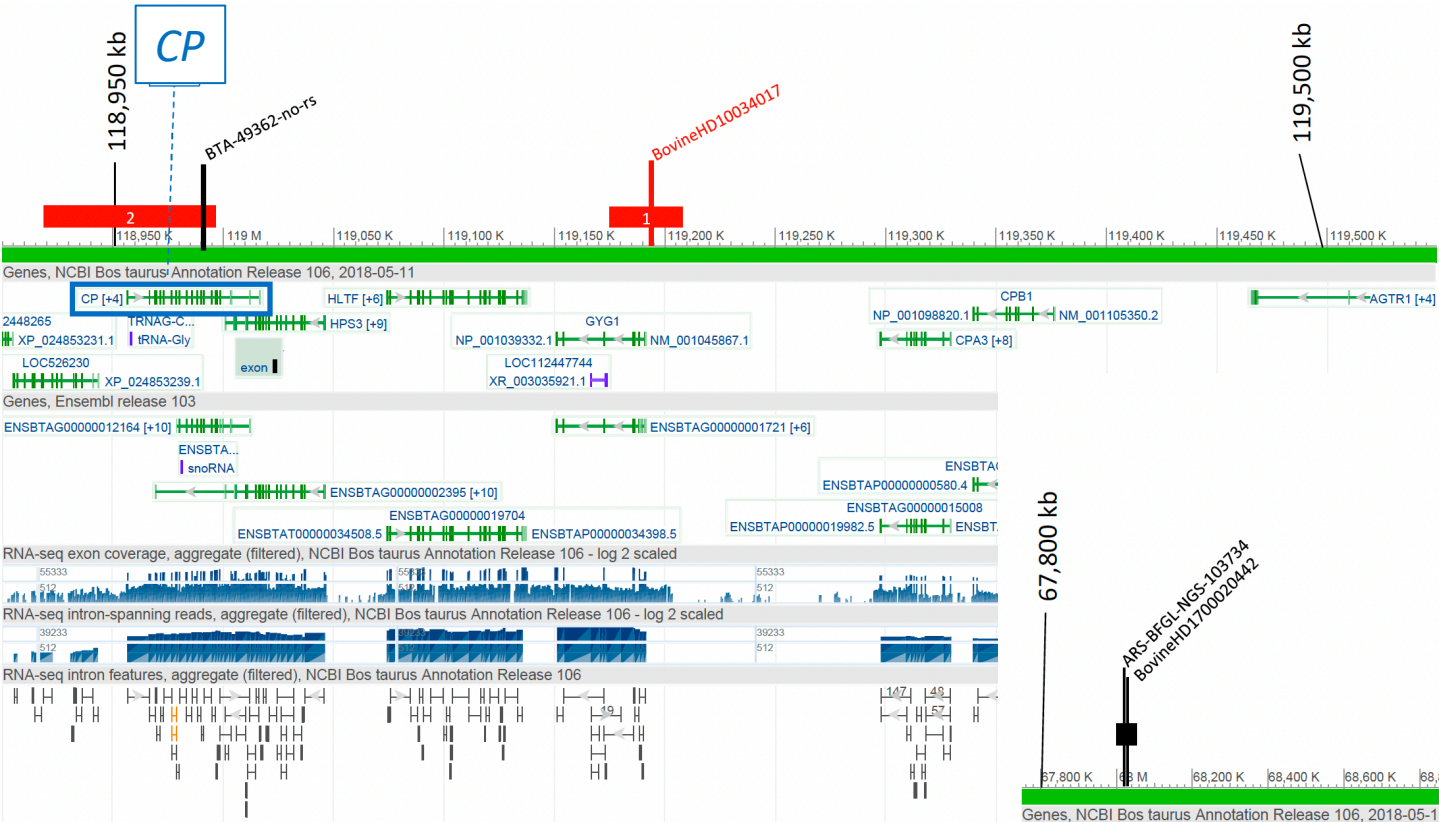
Studi precedenti

P=0.05





Studi precedenti



Analisi SWOT

Strengths - Segnali simili in due razze geneticamente indipendenti - Segnali nelle vicinanze dei geni codificanti	Weaknesses - Forti effetti ambientali (diverse aziende con management differente) - Alte cellule somatiche (scartati 141 animali con SCC > 500.000) - Pochi animali per razza e singola misura
Opportunities - Controllo genetico semplice - Selezione semplice per caratteri difficili da misurare	Threats - Ripetibilità dei risultati? - Effetto in animali soggetti a vero e proprio stress? - Associazione con altri caratteri? - Effetto sufficiente a giustificare selezione?



Regione Lombardia



benelat

Campionamento Benelat



UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

Team Unicatt - UniPD

1006 Frisone
Italiane (sangue e
latte)

Genotipizzazione
con GGP bovine
100K SNP



Azienda Fugazza, Piacenza

Cremona 9 Novembre 2021



Erminio Trevisi e team

Tipo di stress	Biomarcatori nel sangue
Metabolico	<i>Glucosio, Urea, Creatinina, NEFA, BHB, Colesterolo, Fosfatasi alcalina, Ca, P, Mg, Na, K, Cl</i>
Infiammatorio	<i>Aptoglobina, Ceruloplasmina, Globuline, Zinco, Albumine, Paraoxonasi, Mieloperossidasi</i>
Funzionalità epatica	<i>GOT, GGT, bilirubina</i>
Ossidativo	<i>Metaboliti reattivi dell'ossigeno, Prodotti d ossidazione avanzata delle porteine (AOPP), Capacità ferro-riducente plasmatica (FRAP)</i>



Regione Lombardia

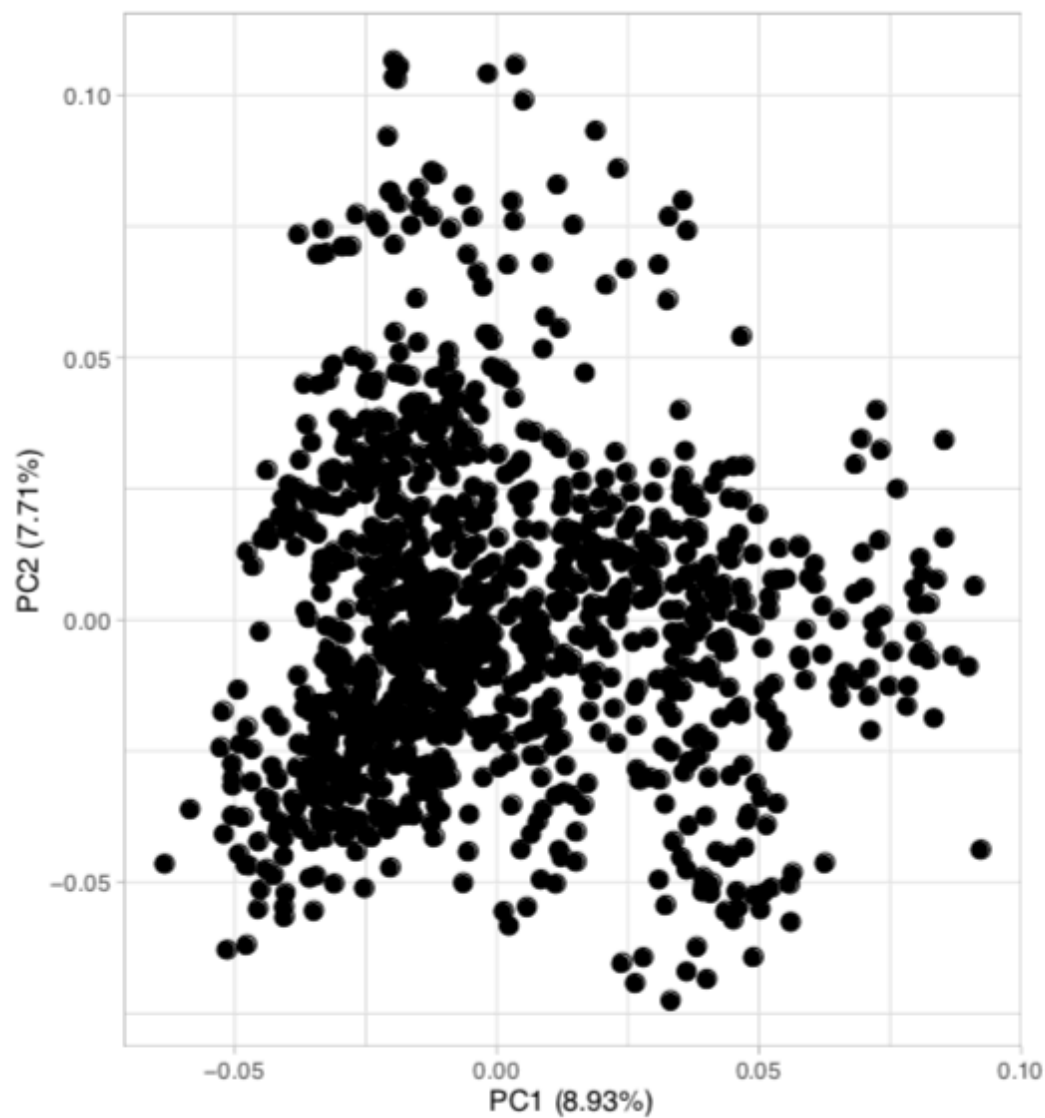


benelat

Struttura genetica del campione



UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore



Statistiche descrittive

Metabolic parameters	Mean	SD
Hematochemical parameters		
Hematocrit, l/l	0.30	0.02
Liver function/hepatic damage		
AST/GOT, U/l	96.44	23.73
GGT, U/l	25.51	10.25
Total bilirubin (BILt), mcmol/l	2.61	1.67
Albumin, g/l	36.99	2.32
Alkaline phosphatase (ALP), U/l	63.55	24.08
Paraoxonase, U/ml	105.10	21.00
Energy and protein related metabolites		
Glucose, mmol/l	4.33	0.39
Cholesterol, mmol/l	4.63	1.25
Nonesterified fatty acid (NEFA), mmol/l	0.17	0.20
β -hydroxybutyric acid (BHBA), mmol/l	0.56	0.29
Urea, mmol/l	6.28	1.07
Creatinine, mcmol/l	81.55	6.19

Inflammation/innate immunity	Mean	SD
Haptoglobin, g/l	0.39	0.33
Ceruloplasmin (CP), mcmol/l	1.84	0.61
Total protein, g/l	80.53	4.92
Globulin, g/l	43.55	5.28
Mieloperoxidase, U/l	453.4	69.31
Oxidative stress		
ROMt, mg H ₂ O ₂ /100 ml	12.60	3.17
AOPP, mcmol/l	44.93	9.42
FRAP), mcmol/l	195.14	69.75
Thiol groups, mcmol/l	377.6	51.61
Calcium, mmol/l	2.51	0.11
Phosphorus, mmol/l	1.93	0.34
Magnesium, mmol/l	0.99	0.09
Sodium, mmol/l	142.1	2.98
Potassium, mmol/l	4.08	0.41
Chlorine, mmol/l	101.33	3.25
Zinc, mcmol/l	11.63	2.98



Regione Lombardia



benelat



Matilde Passamonti

Pulizia dati

Genotipi – Controllo qualità

PLINK v1.9

--geno 0.05 --mind 0.1 --maf 0.02 --hwe 10^{-6}

Solo marcatori su autosomi

Dataset finale

- 88'271 SNPs
- 739 animali

Fenotipi – Filtri e trasformazione

Eliminati animali con:

▪ SCC > **400'000**

▪ **Dati mancanti**

★ Trasformazione **RADQ per GGT**

★ Trasformazione **logaritmica per fosfatasi alcalina**



$$Y = \mu + Xb + Sa + Zu + \varepsilon$$

Effetti fissi (selezionati con ANOVA):

- N. di lattazione – 1, 2, >=3
- BCS – 1 to 5
- Stagione di campionamento – primavera, estate, autunno, inverno
- Giorni di lattazione – continua
- Produzione di latte – continua

Y = vettore dei valori fenotipici

μ = media generale

b = vettore degli effetti fissi

a = effetto fisso del genotipo SNP

u = vettore degli effetti poligenici additivi

ε = vettore dei residui



GWAS

Single – SNP GWAS

GCTA v1.93.2

Mixed Linear Model Leaving-One-Chromosome-Out

Haplotype - based GWAS

Phasing on Eagle v2.4.1

Buiding haplotypes with Ghap v2.0.0: blocks of 4 markers

sliding 1 marker at a time

GWAS with GCTA v1.93.2

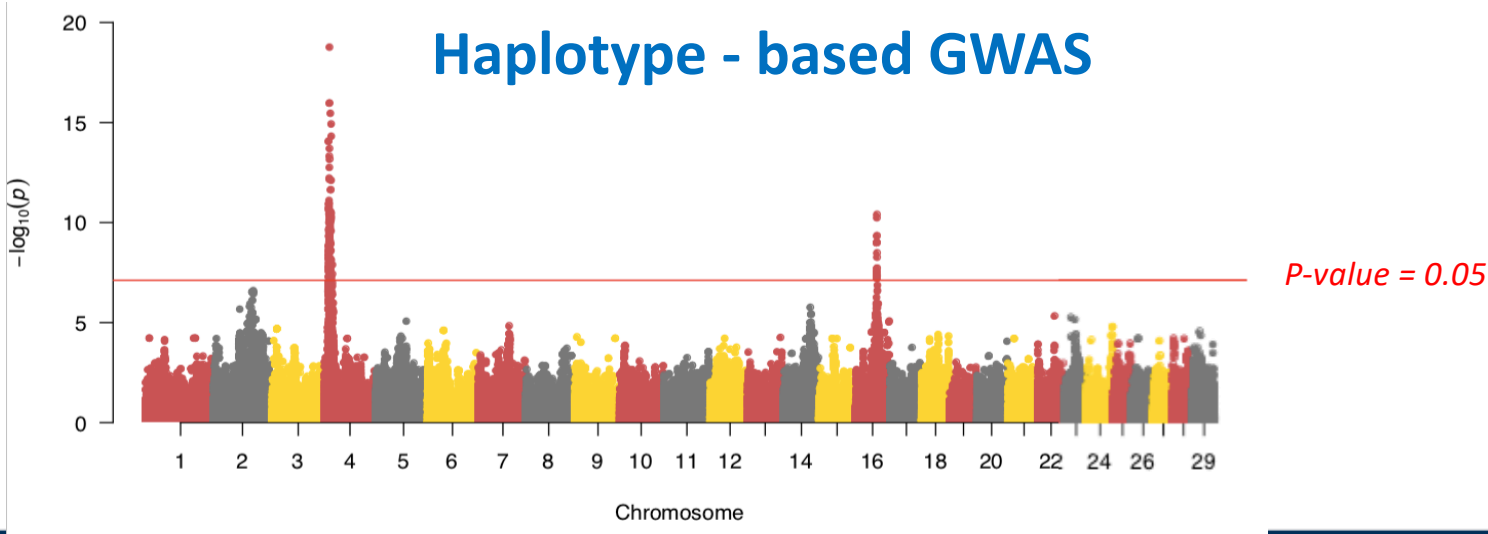
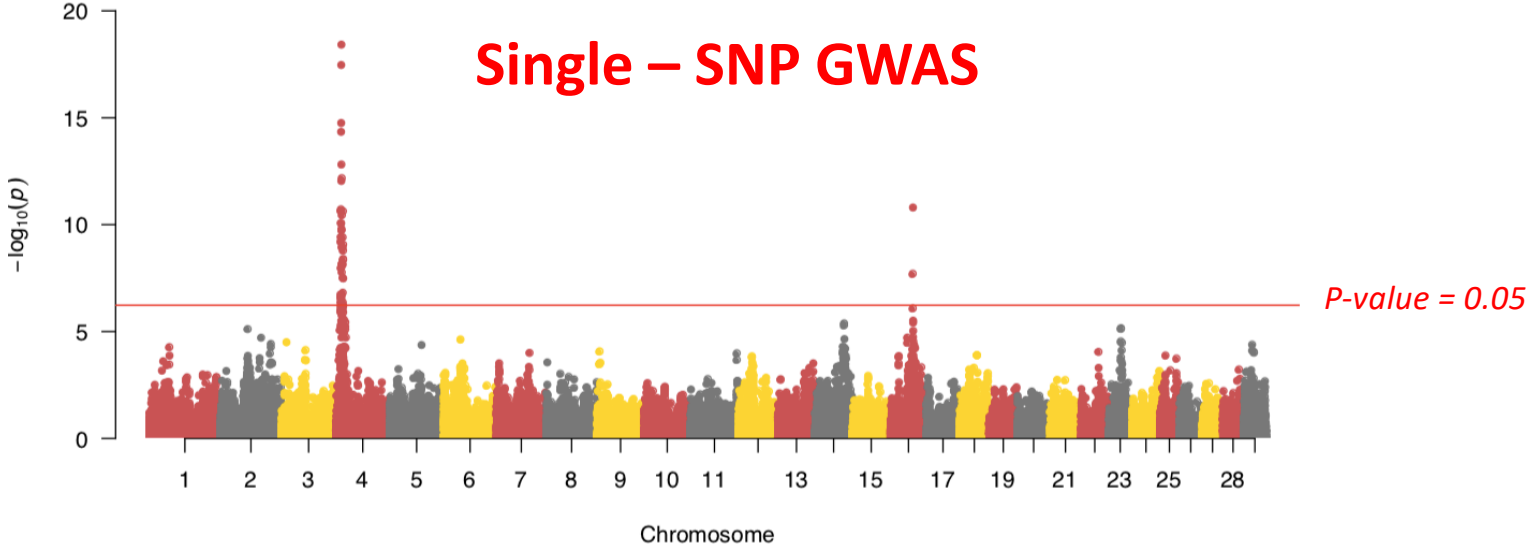


Gene - based GWAS

GCTA v1.93.2

fastBAT

Paraoxonasi





Regione Lombardia



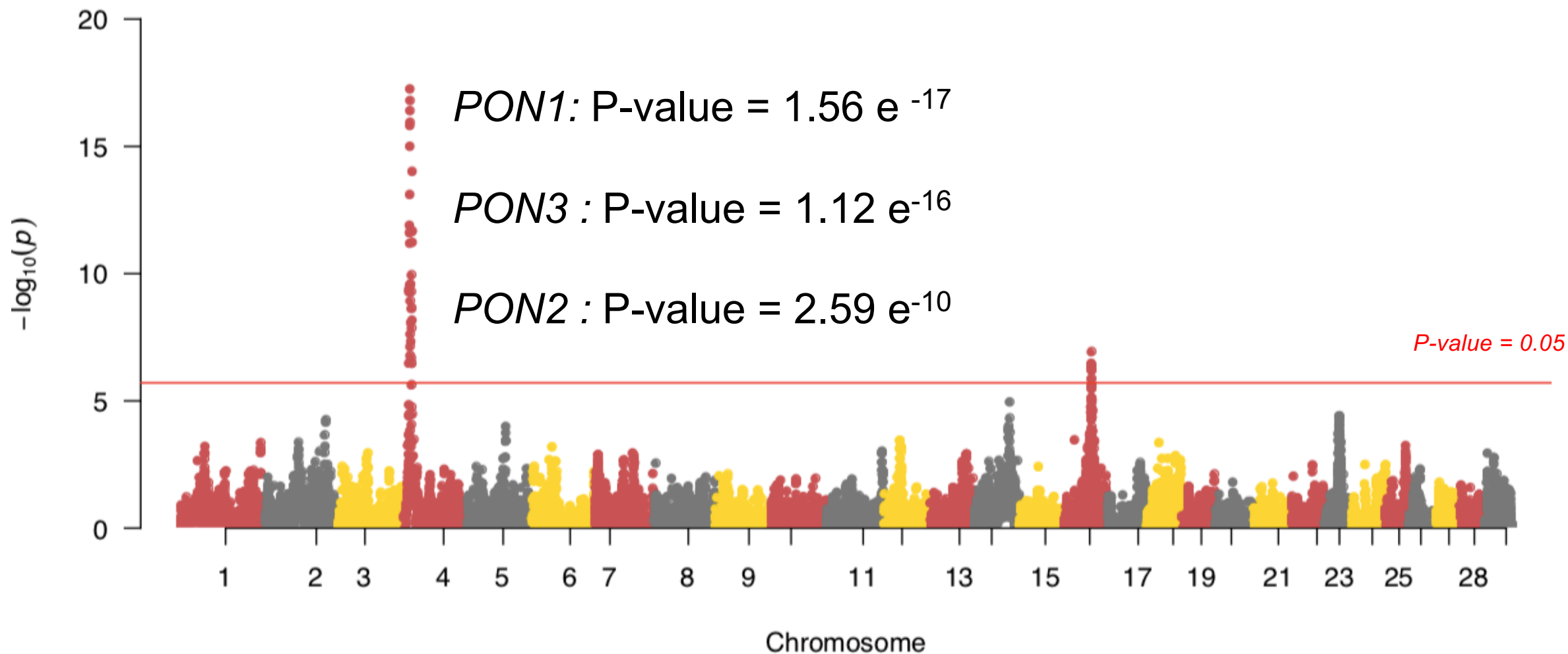
benelat

Paraoxonasi



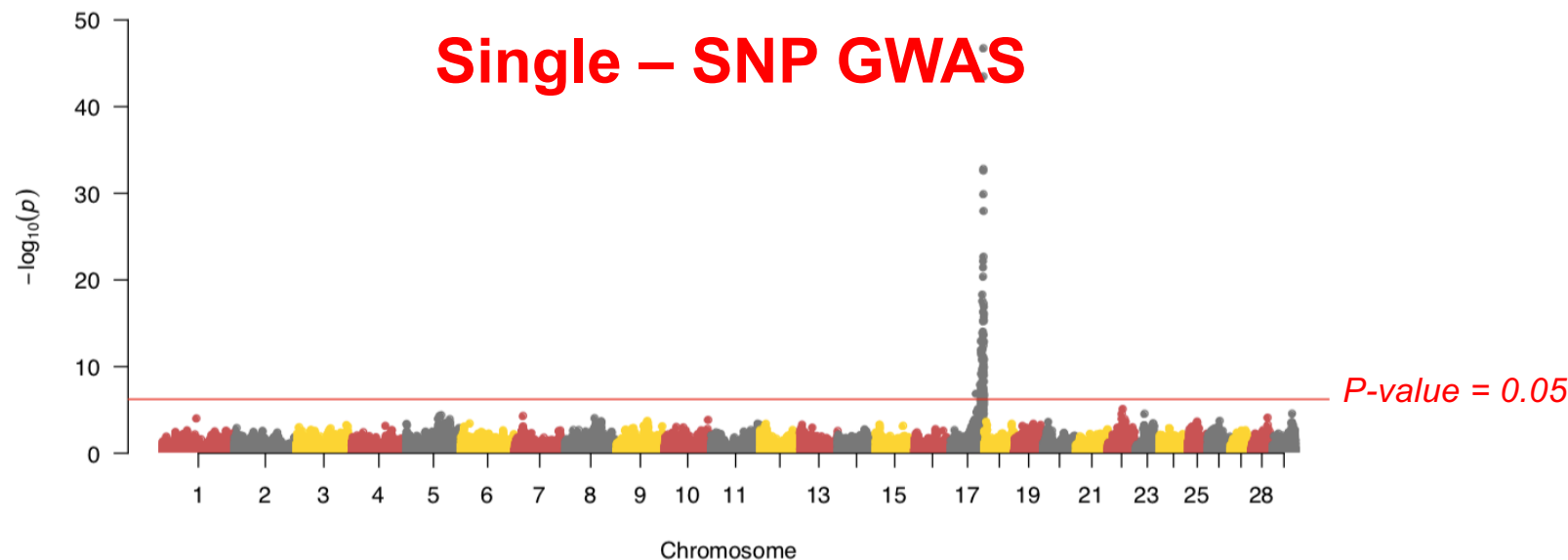
UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

Gene - based GWAS

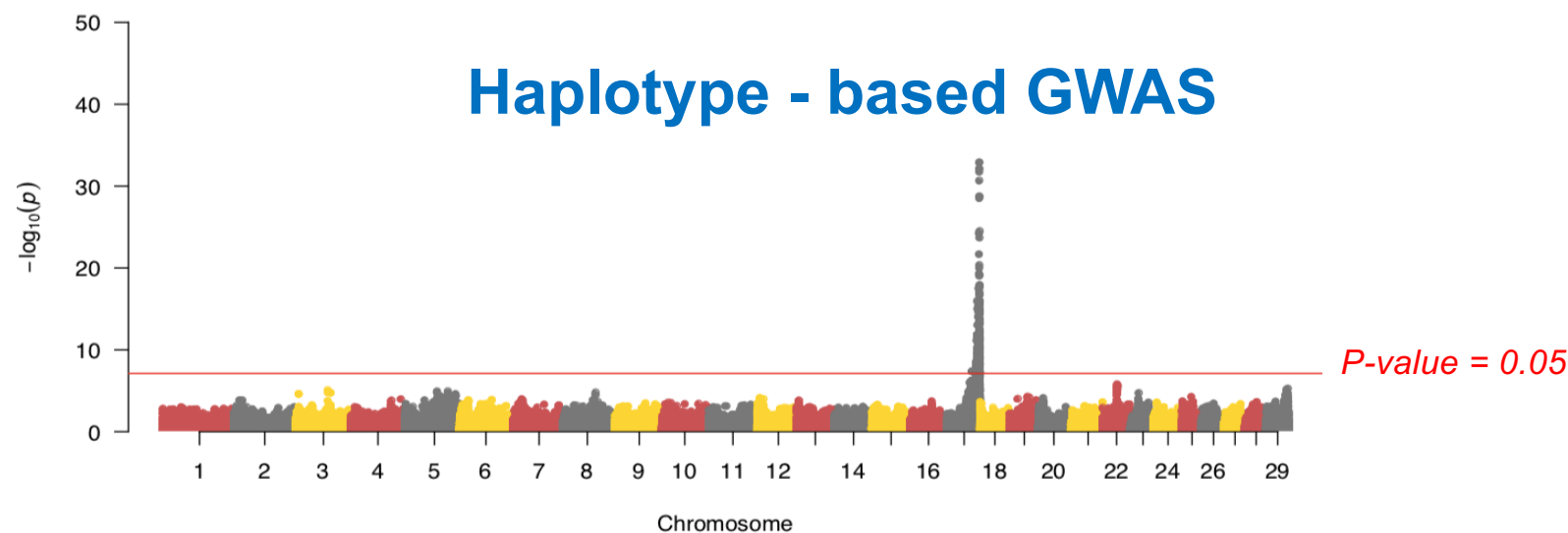


Sqrt - GGT

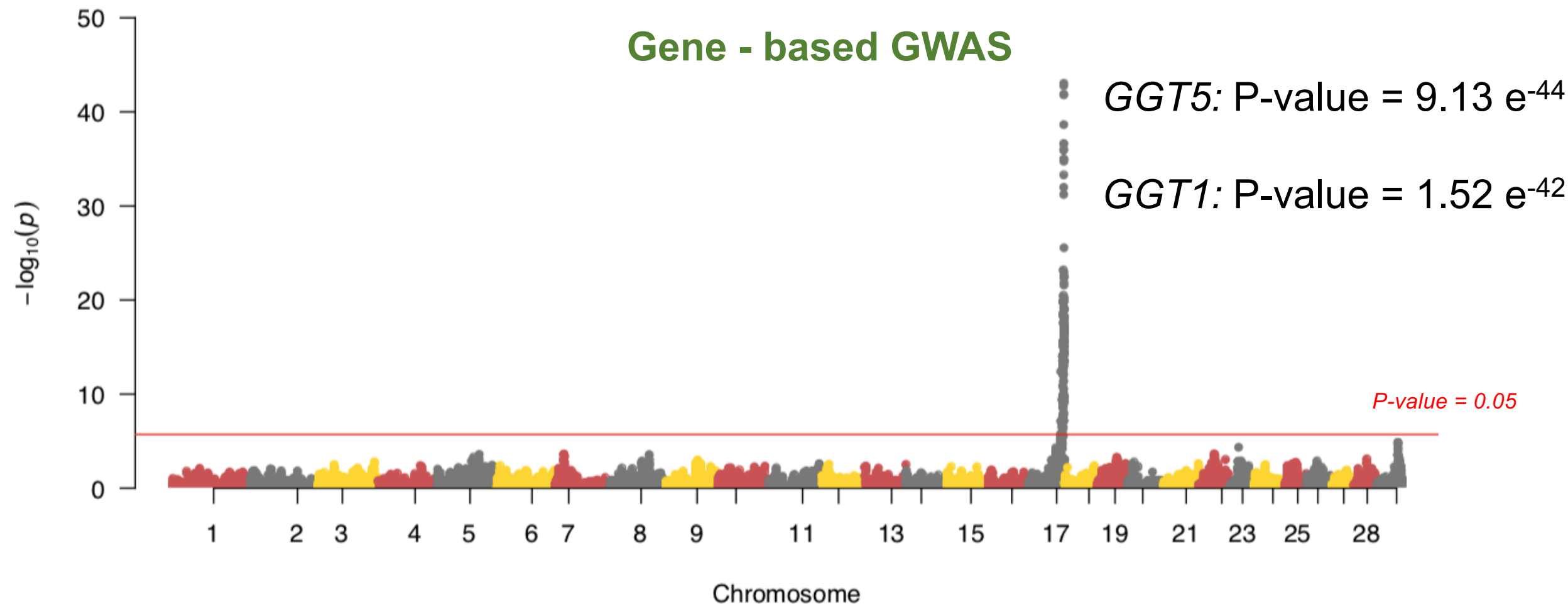
Single – SNP GWAS



Haplotype - based GWAS



Sqrt - GGT





Regione Lombardia

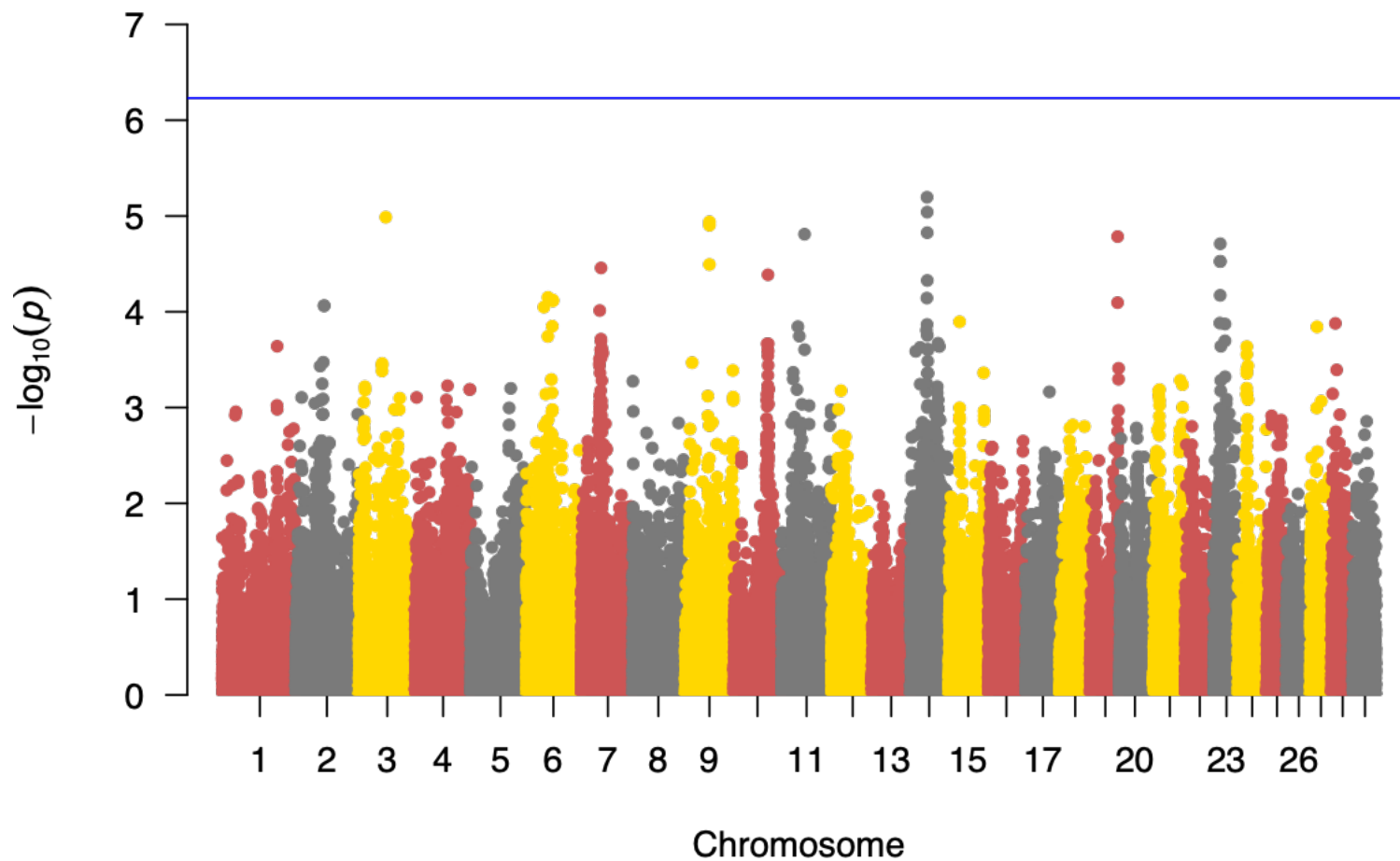


benelat

Ceruloplasmina



UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore





Regione Lombardia



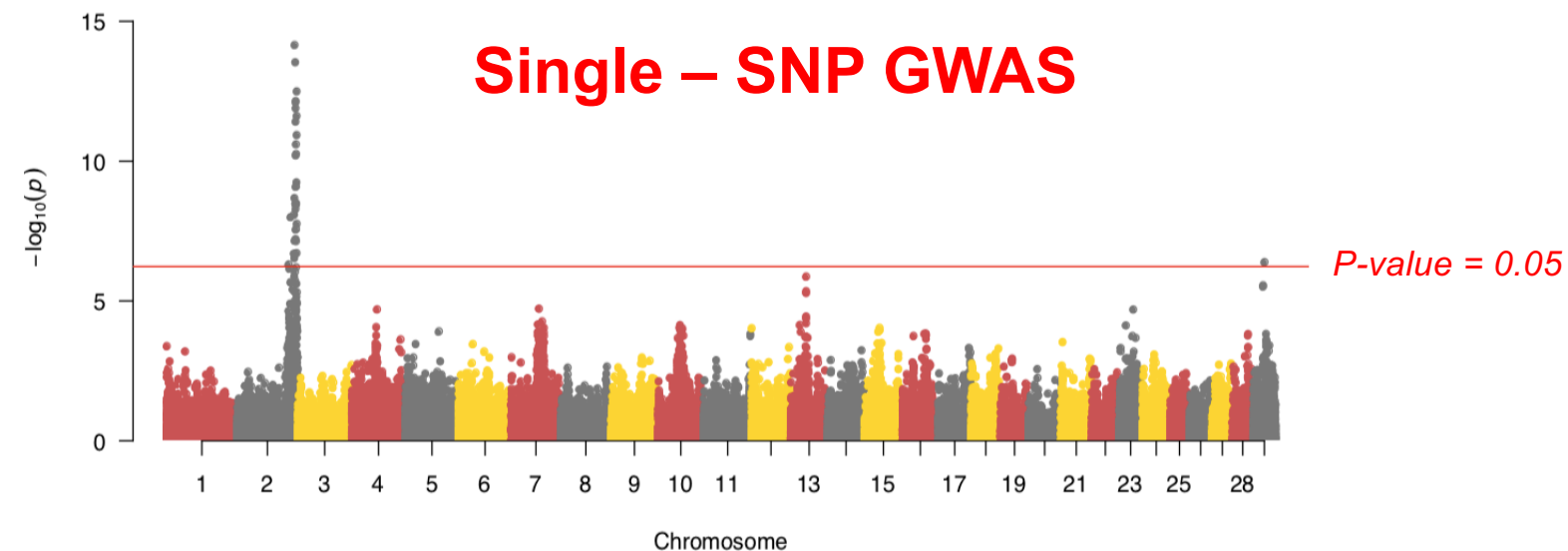
benelat

Log – Fosfatasi alcalina

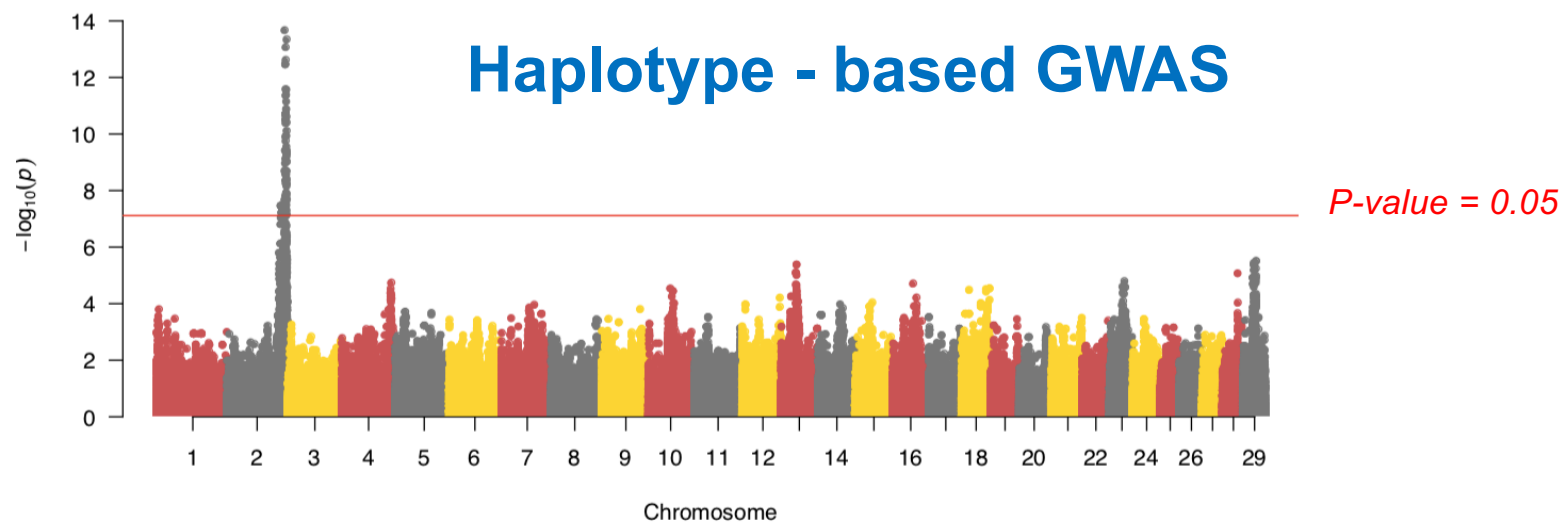


UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

Single – SNP GWAS

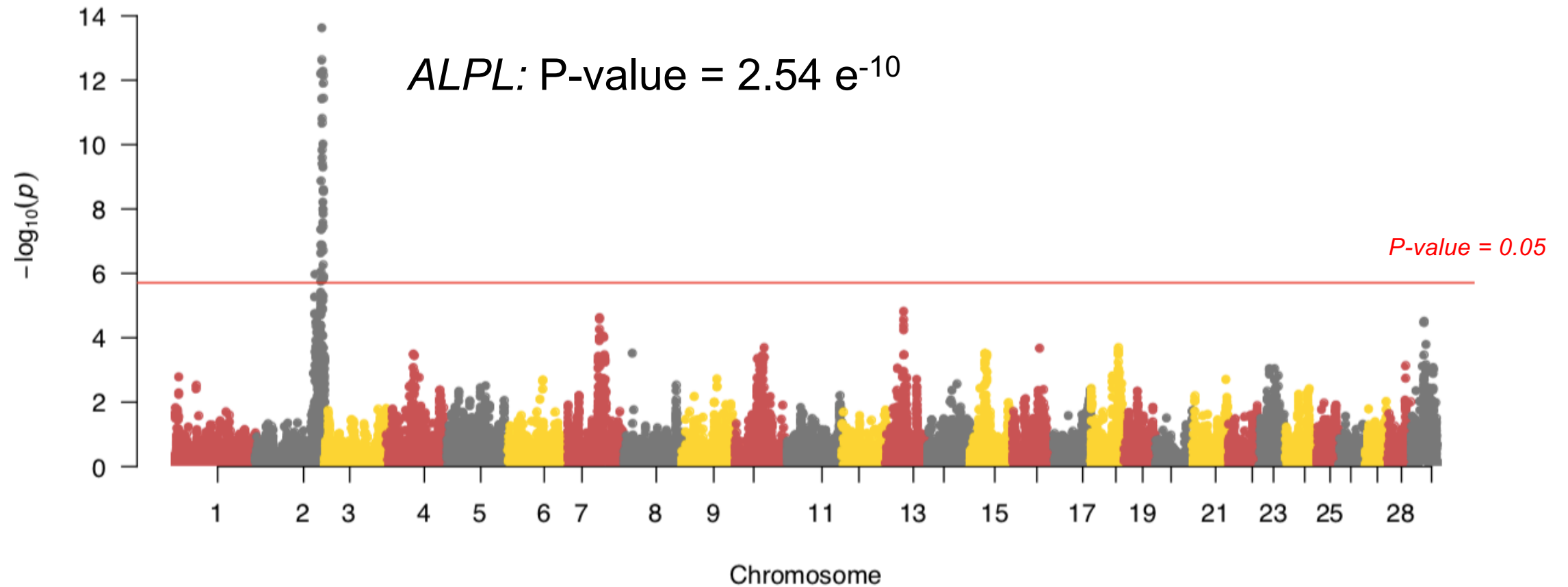


Haplotype - based GWAS



Log – Fosfatasi alcalina

Gene - based GWAS



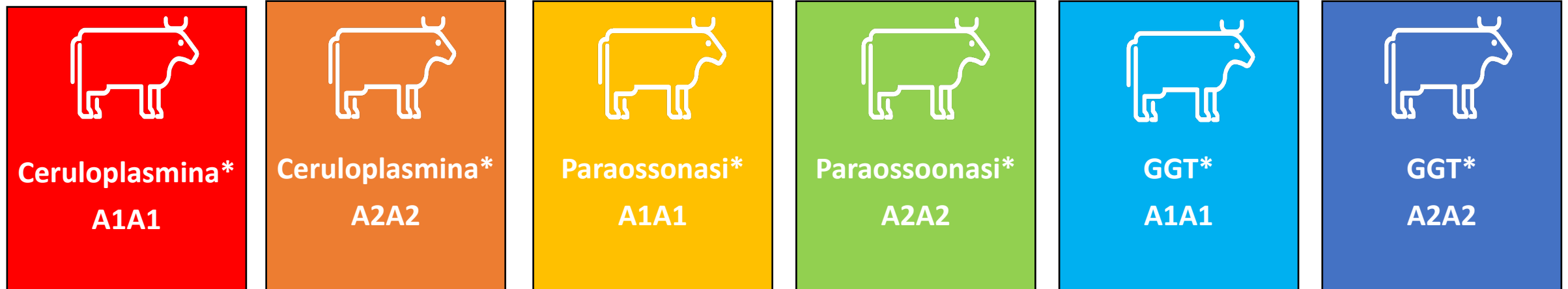
Threats

- Ripetibilità dei risultati?

GGT	✓
PON	✓
CP	✗
- Effetto in animali soggetti a vero e proprio stress?
- Associazione con altri caratteri?
- Effetto sufficiente per giustificare selezione?

Validazione sotto stress

140 animali divisi in gruppi sulla base del loro genotipo

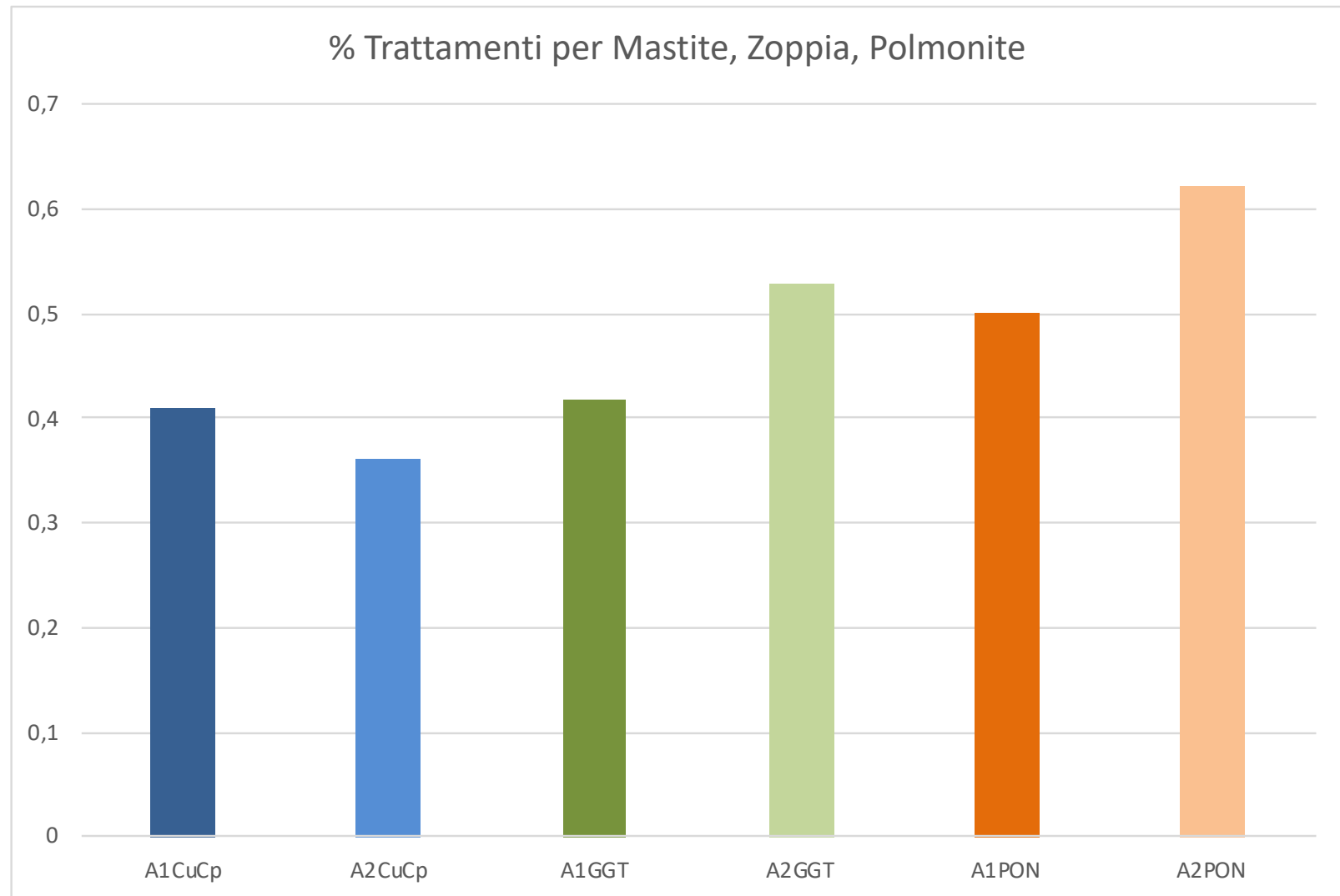


* Eterozigoti agli altri due loci

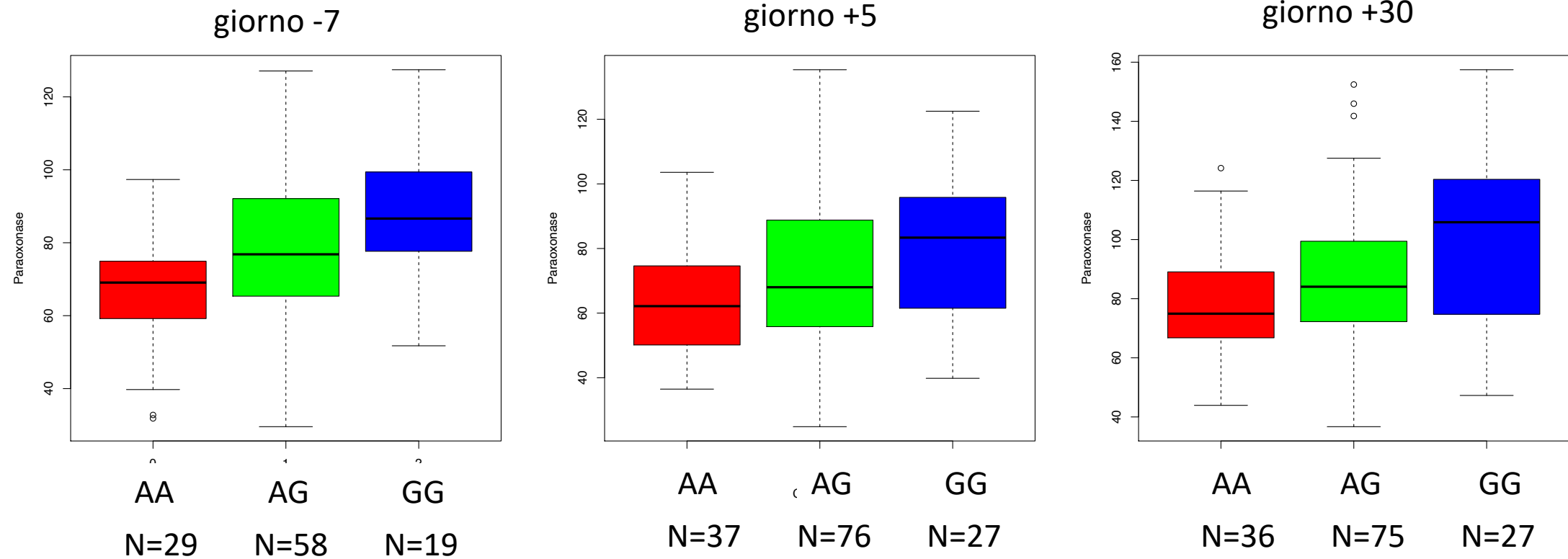
Animali campionati a: **-7**, **+5** e **+30** giorni dal parto

Fattori confondenti

- Su 140 animali, 69 sono stati trattati con antibiotici nei primi 90 giorni dal parto per diverse patologie:
- mastiti
- zoppie
- polmoniti



BovineHD0400003689



Dati grezzi, non corretti per parentela e trattamento

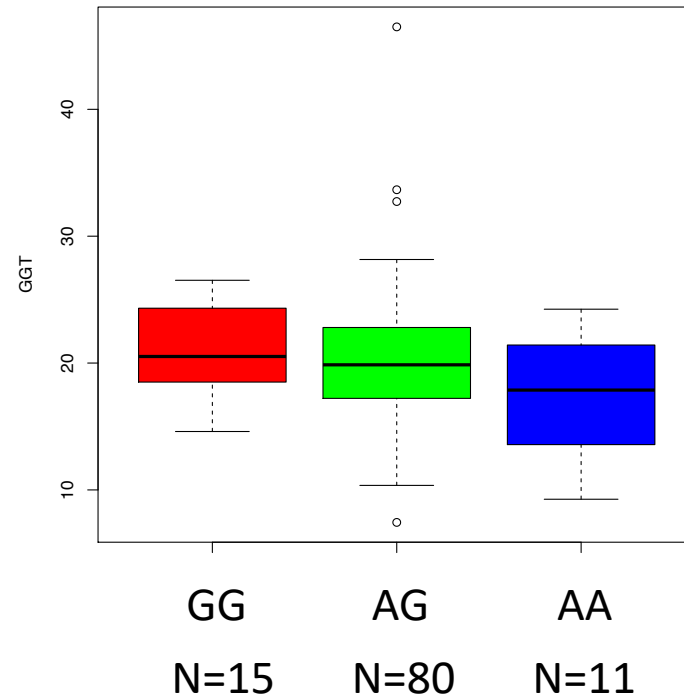
140 animali: associazione singolo SNP, correzione per parentela e trattamento

Biomarcato re	Tempo	SNP	P-value
PON	-7	BovineHD0400003689	0,0091**
PON	+5	BovineHD0400003689	0,00151**
PON	+30	BovineHD0400003689	0,00507**

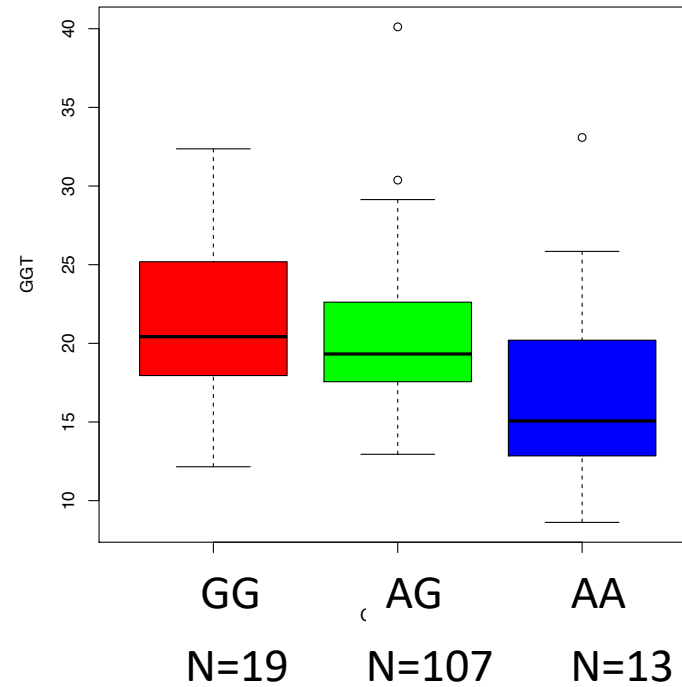
GGT

BTB-01973064_A

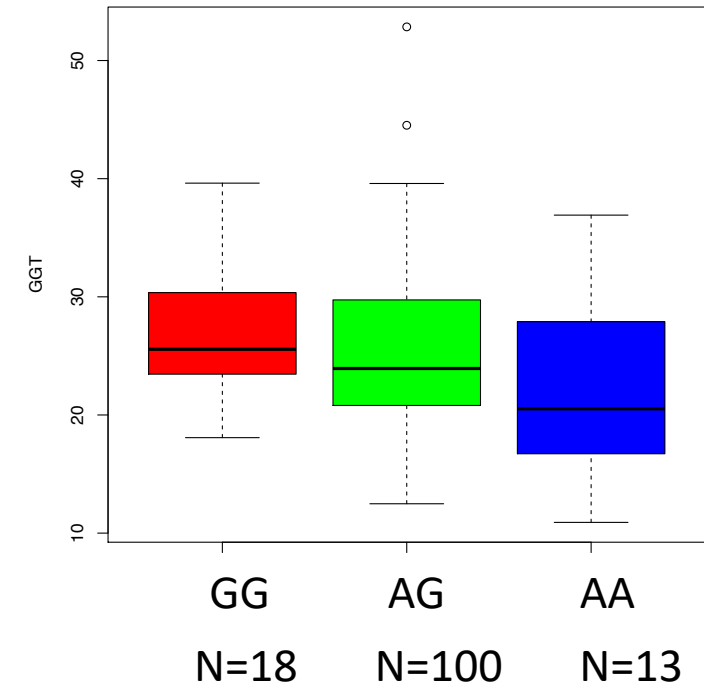
giorno -7



giorno +5



giorno +30



Dati grezzi, non corretti per parentela e trattamento

140 animali: associazione singolo SNP, correzione per parentela e trattamento

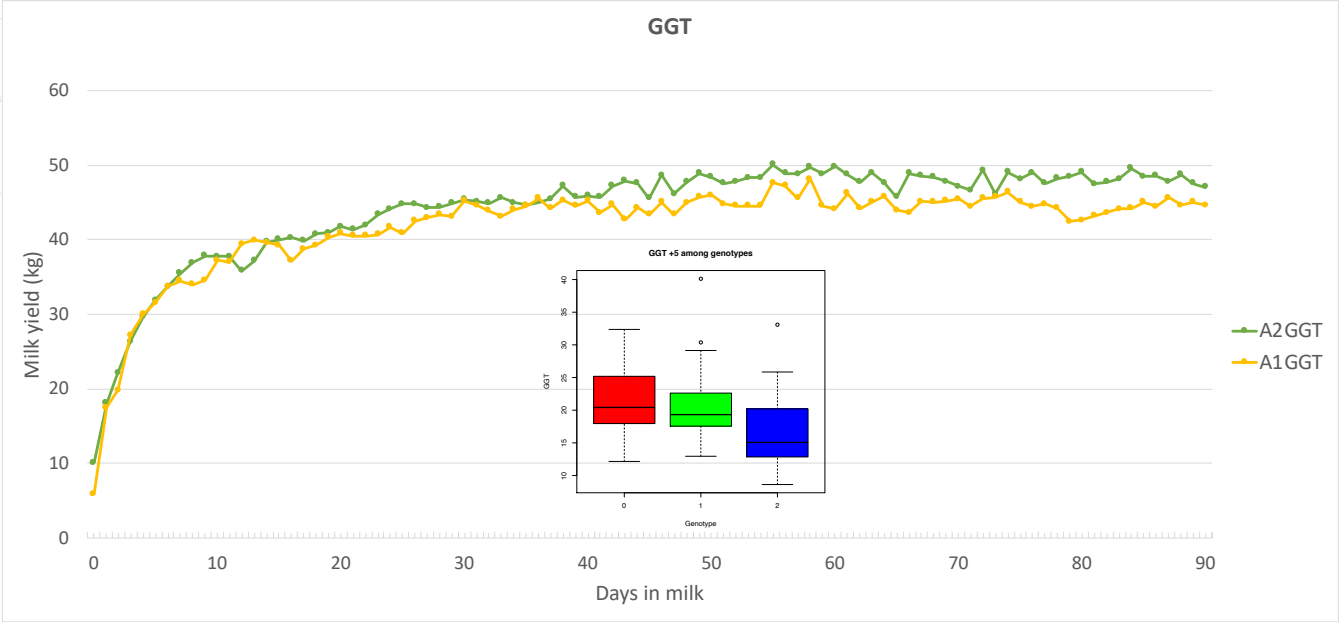
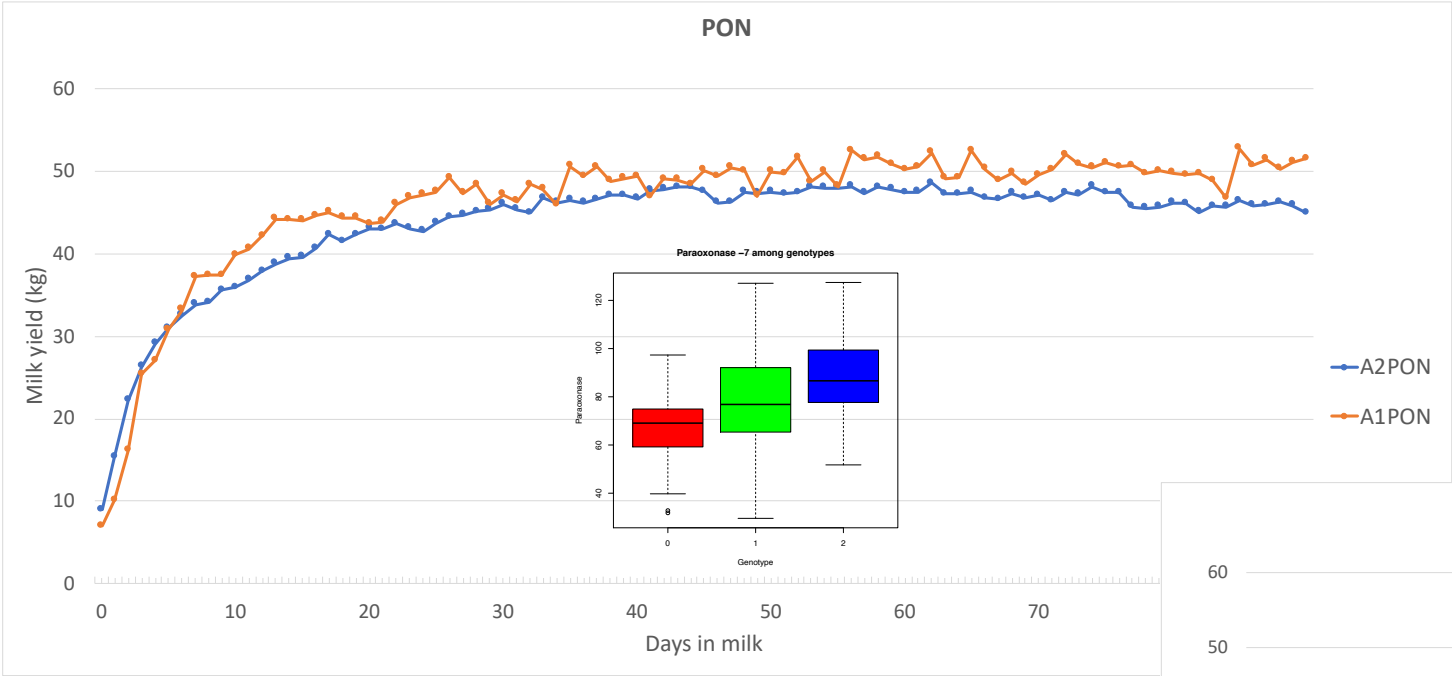
Biomarcatore	Tempo	SNP	P-value
GGT	-7	BTB-01973064	0,0911
GGT	+5	BTB-01973064	0,00926**
GGT	+30	BTB-01973064	0,036*

Associazioni SNP-parametri

140 animali: associazione singolo SNP, correzione per parentela e trattamento

Biomarc atore	Tempo	SNP	P-value
ALPL	-7	BovineHD0200038313	0,740
ALPL	+5	BovineHD0200038313	0,409
ALPL	+30	BovineHD0200038313	0,033*

Stanno veramente meglio?



Liver Functionality Index

Indice composto basato sui valori di:

- Albumina
- Colesterolo
- Bilirubina

Misurati a +3 e +28 giorni dal parto

- Valori compresi tra -12 e +5
- LFI > 0 : valori favorevoli
- Bassi LFI sono associati a minore produzione, minore DMI, maggiore aptoglobina.



$$\begin{aligned}\text{Albumin (Alb-I) subindex} &= 50\% V3 + 50\%(V28 - V3) \\ \text{Cholesterol (Cho-I) subindex} &= 50\% V3 + 50\%(V28 - V3) \\ \text{Bilirubin (Bil-I) subindex} &= 67\% V3 + 33\%(V3 - V28)\end{aligned}$$

Use of the Liver Activity Index and Other Metabolic Variables in the Assessment of Metabolic Health in Dairy Herds

Giuseppe Bertoni*, Erminio Trevisi, PhD

Vet Clin Food Anim 29 (2013) 413–431

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.04.004>

0749-0720/13/\$ – see front matter © 2013 Published by Elsevier Inc.

$$\text{LFI} = (\text{Alb-I} - 17.71)/1.08 + (\text{Chol-I} - 2.57)/0.43 - (\text{Bil-I} - 6.08)/2.17$$

Threats

- Ripetibilità dei risultati?

GGT	✓
PON	✓
CP	✗
- Effetto in animali soggetti a vero e proprio stress? ✓
- Associazione con altri caratteri?
- Effetto sufficiente a giustificare selezione?

Associazioni con EBV

Testata associazione dei tre SNP con EBV per 50 caratteri fornita da ANAFIBJ su tutte le bovine genotipizzate



Nessuna associazione significativa

Threats

- Ripetibilità dei risultati:
 - GGT ✓
 - PON ✓
 - CP ✗
- Effetto in animali soggetti a vero e proprio stress ✓
- Associazione con altri caratteri ✓
- Effetto sufficiente a giustificare selezione



Conclusioni

Opportunities

- Controllo genetico semplice ✓
- Selezione semplice per caratteri difficili da misurare ✓ ✗

Gli animali stanno effettivamente meglio? 

Effetto sufficiente a giustificare selezione? 

La risposta nei primi mesi del 2022.....

Grazie per l'attenzione!

- *L. Passerini*
- *E. Trevisi*
- *J.L. Williams*
- *M. Milanesi*
- *J. Rodriguez Diaz*
- *M. Barbato*
- *M. Passamonti*