

Indagine sull'infestazione da zecche e sulla diffusione delle principali zoonosi trasmesse da artropodi negli ovini e caprini della Sardegna, associata ad attività di prevenzione per la tutela della salute umana ed animale

Responsabile Scientifico: Piera Angela Cabras

Il presente progetto nasce dall'esigenza di approfondire la conoscenza sulla diffusione delle zecche e delle zoonosi a esse correlate in Sardegna, con l'obiettivo di contribuire al controllo e alla prevenzione di questa problematica sanitaria, spesso sottovalutata ma di grande rilevanza.

L'area oggetto di studio principale è stata individuata nella zona centro-orientale dell'isola; la scelta di questo territorio è stata motivata da un grave episodio accaduto nel giugno 2022, quando una donna perse la vita a causa della Rickettsiosi, malattia contratta a seguito della puntura di una zecca.

Le malattie trasmesse dagli artropodi vettori rappresentano un rischio per la salute pubblica e stanno emergendo a ritmi crescenti a livello globale. La conoscenza del rischio correlato all'esposizione dell'uomo e degli animali ai vettori è indispensabile per lo sviluppo di strategie atte a contrastare e prevenire il rischio. La Sardegna rappresenta la seconda regione italiana per numero di notifiche di casi clinici umani ascrivibili alle "Rickettsiosi in sensu lato"; tuttavia, i casi di febbre correlata al morso di zecca, rimangono la maggior parte delle volte ad eziologia sconosciuta.

Negli ultimi decenni, i laboratori dell'IZS della Sardegna hanno rivolto la propria attenzione allo studio di patogeni emergenti e riemergenti trasmessi dai vettori, principalmente zecche presenti nell'isola. Ciò ha permesso di caratterizzare diverse specie di Rickettsiae appartenenti alle Spotted Fever Group quali: *Rickettsia aeschlimannii*, *R. massiliae*, *R. slovacca*, *R. conoriiisraelensis*, *R. raoultii*, *R. helvetica* e *R. hoogstraalii*. Il ceppo TWN di *Ehrlichia canis* e varie specie di *Anaplasma* (*A. platys*, *A. platys-like*, *Anaplasma ovis*) compresa *A. phagocytophilum* sono state rinvenute e caratterizzate da diverse specie di zecche. L'identificazione e caratterizzazione di batteri appartenenti alla famiglia delle Chlamydiales in alcuni artropodi presenti nel territorio (*C. psittaci*, *C. pecorum*, *C. abortus*, *Parachlamydia acanthamoebae*), ha permesso di ipotizzare un possibile coinvolgimento di

tali vettori nella trasmissione delle varie specie di Chlamidia. Infine, il sequenziamento del DNA estratto dalle zecche risultate positive per Babesia spp, ha permesso di determinare la presenza del gruppo della Theileria sergenti, buffeli ed orientalis, Babesia equi, Theileria ovis e Babesia bigemina nelle varie specie di zecche presenti nell'isola raccolte da ospiti vertebrati domestici e selvatici. Con il presente progetto si intende svolgere un'analisi più completa sulle conoscenze e percezione del rischio relativo alle VBDs correlate agli ectoparassiti infestanti la popolazione ovina e caprina e incrementare le informazioni relative ad importanti patogeni zoonotici presenti nel territorio regionale.

Obiettivi

Il progetto si propone di valutare il rischio per la salute umana ed animale legato alle infestazioni di zecche negli allevamenti ovini e caprini e degli eventuali patogeni zoonotici ad essi collegati. L'aggiornamento ed il monitoraggio costante delle popolazioni di vettori presenti in Sardegna, consentirà di incrementare il programma di sorveglianza entomologica nel territorio, di ottenere informazioni sulla diffusione delle VBDs e di valutare il rischio al quale la popolazione può essere esposta. Ciò permetterà ai servizi di Sanità Pubblica di individuare precocemente nuove specie di vettori e l'introduzione di nuovi patogeni, e alle Autorità Sanitarie Locali di acquisire le informazioni utili per pianificare interventi multidisciplinari atti a ridurre i fattori di rischio ad essi associati.

Risultati

Nel corso del 2023-2024, sono state analizzate un totale di 357 zecche prelevate da 67 capre e 20 ovini provenienti da diversi allevamenti in Sardegna. L'analisi morfologica delle zecche ha permesso di determinare le specie di zecche più comuni nell'area: Rhipicephalus sanguineus (66,4% del totale), seguita da Rh. bursa (32,78%). Tra le zecche adulte (352), 126 sono risultate ingorgate, mentre 225 non lo erano. La PCR ha evidenziato la presenza di patogeni zoonotici, tra cui Coxiella spp., Rickettsia spp. e Piroplassmidi. Il 29% delle zecche è risultato positivo per Rickettsia spp., con la specie prevalente Candidatus Rickettsia barbariae (24%). Altri patogeni rilevati includono Chlamydia spp. e Anaplasmataceae. I campioni di sangue in EDTA (n=91) e di emosiero (n=69) hanno mostrato una positività del 31% per Anaplasma spp., in particolare per Anaplasma phagocytophilum, con una prevalenza nei caprini. La positività per Babesia spp. è stata del 22,9%, prevalente negli ovini. Theileria equi è stata rilevata nei caprini e Theileria ovis negli ovini in seguito a sequenziamento molecolare. Inoltre, i campioni di emosiero hanno mostrato una prevalenza di Coxiella burnetii nei caprini (18/69) e di Ehrlichia spp. negli ovini

(12/69). I risultati indicano la presenza di diversi patogeni zoonotici sia nei caprini che negli ovini, con un'alta frequenza nelle specie di zecche e nel sangue.

Conclusioni

I dati ottenuti in questo studio confermano la presenza di numerose specie di zecche infette da patogeni zoonotici, tra cui *Coxiella* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp. e *Babesia* spp., patogeni noti per il loro significativo impatto sulla salute animale e umana. Le analisi morfologiche e molecolari hanno identificato *Rhipicephalus sanguineus* come la specie predominante nelle aree in esame, suggerendo un ruolo centrale di questa specie nel ciclo di trasmissione di vari patogeni. Le infezioni da *Rickettsia* spp., in particolare da *Candidatus Rickettsia barbariae*, e da *Theileria ovis*, prevalentemente associata agli ovini, e *Theileria equi* nei caprini, evidenziano la necessità di un monitoraggio continuo delle specie di zecche e indicano una distribuzione geografica e animale differenziata dei patogeni. I risultati sottolineano anche l'importanza di proseguire il monitoraggio della fauna locale per l'identificazione precoce di nuove specie di vettori o di patogeni emergenti, un aspetto di particolare rilevanza in un contesto caratterizzato da cambiamenti climatici e urbanizzazione, che potrebbero favorire la diffusione di malattie zoonotiche. In tale contesto, la sorveglianza continua delle popolazioni di zecche e la prevenzione attiva sono essenziali per ridurre il rischio per la salute pubblica e animale. Monitorare e identificare tempestivamente nuovi patogeni e vettori consente di sviluppare strategie più mirate ed efficaci per il controllo delle malattie trasmesse da vettori (VBDs) nella regione, contribuendo a tutelare un settore chiave dell'economia sarda, come l'allevamento di capre e ovini.

Monitoraggio della diffusione di Brucella Suis nelle popolazioni suine domestiche e selvatiche della Sardegna

Responsabile Scientifico: Annamaria Coccollone

Brucellosi è il nome generico che indica infezioni causate da diverse specie appartenenti al genere *Brucella* che interessano sia gli animali sia l'uomo. *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* sono le specie di maggior rilievo per la loro elevata patogenicità e per questo contemplate anche dalla nuova normativa sulla Sanità Animale, in particolare dal Regolamento 429/2016 e dai Regolamenti Delegati, come si evince dalla tabella di cui all'articolo 2 del Regolamento 2018/1882.

Tale infezione nelle popolazioni suine è provocata dalla *Brucella suis*, la quale si presenta con diversi biotipi. I biotipi 1, 2 e 3 infettano nello specifico maiali e cinghiali, provocando patologie a carico del sistema riproduttivo. Negli individui di sesso maschile vengono intaccati prevalentemente testicoli, prostata, epididimo, vescicole seminali o ghiandole bulbo-uretrali, mentre nelle femmine la patologia riguarda la placenta e il feto con conseguente aborto.

La brucellosi negli animali ha un importante impatto economico, in quanto causa di aborti, natimortalità e diminuzione di fertilità nelle specie allevate; inoltre rappresenta una delle zoonosi maggiormente diffuse a livello mondiale. In Sardegna non esiste attualmente un piano di monitoraggio e sorveglianza per quanto riguarda il settore suinicolo e i dati relativi a questa regione sono scarsi e risalgono per lo più al periodo 2007-2010, fatta eccezione per alcune sporadiche segnalazioni recenti in suini domestici e cinghiali.

Materiali E Metodi

Questo lavoro ha previsto il monitoraggio di suini domestici e cinghiali, secondo un definito piano di campionamento, al fine di valutare la diffusione della brucellosi suina in Sardegna.

I campioni di siero di suino sono stati analizzati utilizzando la tecnica di sieroaagglutinazione rapida, SAR; i campioni che hanno dato un esito positivo a questo esame sono stati analizzati con un'altra tecnica che è la fissazione del complemento (FdC).

Sui campioni di organi di cinghiali è stata eseguita l'estrazione del DNA e gli estratti sono stati analizzati successivamente con PCR convenzionale o con PCR real time per rilevare eventualmente la presenza del genoma di *Brucella* spp.

Sono state campionate 799 aziende di suini domestici, appartenenti alle ASSL di Sassari, Olbia, Nuoro, Lanusei, Oristano, Sanluri, Carbonia, Cagliari, comprendendo, quindi, tutto il territorio regionale.

Su un totale di 3556 campioni di siero analizzati con metodica di Sieroagglutinazione rapida (SAR) 1235 hanno dato esito positivo.

La Fissazione del Complemento (F.d.C.) ha confermato la positività a *Brucella* spp. su 87 sieri, con valori ≥ 20 UICFT/ml, con una prevalenza aziendale pari all'1.3% (95% CI = 0.8-2.0).

Per quanto riguarda i cinghiali selvatici, sono stati analizzati 548 cinghiali appartenenti a tutto il territorio regionale. In totale gli organi analizzati con reazione di PCR sono stati 636. Di questi 548 cinghiali, 16 hanno mostrato positività per *Brucella* spp. con una prevalenza generale pari al 2.9% (95% CI = 1.7-4.7%). Un campione ha dato esito non conclusivo. Inoltre, su 22 organi è stato eseguito anche l'esame colturale che ha dato in tutti i casi esito negativo.

Discussione E Conclusioni

I pochi dati presenti in letteratura riguardanti la regione Sardegna hanno permesso di appurare l'importanza della brucellosi suina nell'ambito suinicolo, sia domestico che selvatico, e la sottostima di questa patologia.

Dai dati ottenuti, sia per quanto riguarda i suini domestici sia nel caso dei cinghiali selvatici, emerge come che la *Brucella* spp. continui ad essere presente nel territorio regionale; attualmente sono in corso le analisi per definire se si tratti di *Brucella suis*, ed eventualmente per la definizione del biotipo.

Questo studio può essere definito di natura esplorativa, finalizzato a fornire strumenti validi per studi futuri in materia, per i quali, grazie ai risultati ottenuti, si potrà calcolare la numerosità campionaria adeguata a condurre uno studio più ampio e rappresentativo dell'intera popolazione.

Un importante fattore di rischio per la circolazione del patogeno è rappresentato dalle misure di biosicurezza degli allevamenti dei suini, non sempre adeguate e in grado di impedire i contatti con i cinghiali selvatici. Problema non meno importante è stata la presenza di suini bradi irregolari, per la loro maggiore esposizione al contatto con i cinghiali nei loro spostamenti non controllati, e per il loro potenziale ruolo nella trasmissione di malattie tra cinghiali e suini domestici

Implementazione di un sistema di sorveglianza della resistenza agli antimicrobici (AMR) in batteri di origine veterinaria con particolare attenzione a quelli zoonotici

Responsabile Scientifico: Simone Dore

Obiettivo principale della ricerca è contribuire a implementare e rafforzare la sorveglianza sull'AMR in ambito veterinario come attività stabile e rappresentativa, con lo scopo di monitorare l'andamento epidemiologico dei microrganismi resistenti, stimare la circolazione e l'impatto di questi patogeni sulla salute animale e umana al fine di studiare, programmare e attuare in maniera puntuale gli interventi di controllo.

Obiettivi secondari sono:

Acquisire elementi di conoscenza sulla sensibilità alle diverse molecole di antibiotici utilizzate al fine di indirizzare verso protocolli terapeutici maggiormente efficaci, per un consumo consapevole degli antibiotici e il contrasto allo sviluppo di fenomeni di AMR.

Implementare e rafforzare la sorveglianza sull' AMR in ambito veterinario.

Promuovere un utilizzo appropriato e consapevole degli antimicrobici in veterinaria attraverso la definizione di un "albero delle decisioni"

Identificare le molecole rappresentative della classe di antibiotici definite sulla base della specie animale e del microrganismo isolato al fine di armonizzare l'attività dei Laboratori Diagnostici per il saggio della sensibilità agli antibiotici.

La ricerca è stata articolata in 2 fasi principali:

Fase 1

Questa fase è stata caratterizzata dalle seguenti attività:

1. Standardizzazione e armonizzazione dei set di antibiotici per l'esecuzione del test di sensibilità con test KB.
2. Stesura del metodo di prova per la determinazione della MIC su agar.
3. Saggio della sensibilità agli antibiotici con metodo KB e MIC dei ceppi batterici isolati.

Fase 2

Tale fase è stata caratterizzata da significative modifiche metodologiche apportate al progetto di ricerca iniziale e determinate dalla necessità di armonizzare i percorsi diagnostici tra tutti i laboratori degli IZZSS a livello nazionale attraverso l'adozione del sistema *Sensititretm* (Thermo Fisher Diagnostic S.p.A.), una versione miniaturizzata del classico metodo della diluizione in brodo capace di fornire risultati qualitativi e quantitativi della MIC su una piastra costituita da 96 pozzetti, precedentemente allestita con diluizioni scalari di molecole antibiotiche predefinite sulla base del microrganismo target e/o della specie animale.

Nello specifico sono state eseguite le seguenti attività:

1. Stesura del metodo di prova per la determinazione della MIC con metodo miniaturizzato.
2. Saggio della MIC con metodo miniaturizzato dei ceppi batterici isolati.
3. Creazione di un *Data Warehouse* come sistema di monitoraggio sistematico e di sorveglianza delle AMR a livello regionale.

Il *Data Warehouse* rappresenta uno strumento che permette di centralizzare e organizzare i dati in un formato ottimizzato per le analisi e per il supporto alle decisioni aziendali e di laboratorio.

All'interno della piattaforma i dati sono strutturati in modo da facilitare analisi complesse e veloci, con tabelle progettate specificamente per scopi analitici.

Tale applicativo sarà fondamentale per acquisire elementi di conoscenza sulla sensibilità alle molecole di antibiotici maggiormente utilizzate al fine di indirizzare verso protocolli terapeutici più efficaci, per un consumo consapevole degli antibiotici e il contrasto allo sviluppo di fenomeni di antibiotico-resistenza. Tali informazioni potranno essere impiegate per studi di carattere epidemiologico di valutazione del rischio, per i piani di sorveglianza e come strumento per un uso razionale dell'antibiotico nelle terapie empiriche, ossia somministrate in regime di urgenza, da parte del clinico.

Infine, tale attività, costituisce un primo step orientato all'integrazione tra la sorveglianza nel settore umano e il monitoraggio nel settore veterinario, che potrà essere consolidata anche in Italia promuovendo l'integrazione con l'analisi dei dati esistenti al fine di produrre una reportistica comune con un approccio One Health.

Ricerca e caratterizzazione di nuovi patogeni virali emergenti negli allevamenti suini e di ceppi di Peste Suina Africana a ridotta virulenza

Responsabile Scientifico: Annalisa Oggiano/Giulia Franzoni

La peste suina africana (PSA) è una malattia a eziologia virale che colpisce suini e cinghiali ed è considerata una delle principali minacce all'industria suinicola mondiale. L'agente eziologico è l'ASFV (African swine fever virus), un virus a DNA appartenente alla famiglia Asfarviridae. La PSA è stata eradicata in Sardegna nel 2024, dopo più di 40 anni, mentre attualmente il virus sta circolando in altre regioni italiane. Il controllo della malattia è reso difficile dall'assenza di un vaccino o di cure efficaci e dell'alto grado di diffusibilità del virus tra diversi stati. La presenza di ceppi attenuati potrebbe favorire la persistenza del virus in territori endemici, ostacolando ulteriormente l'eradicazione.

Nell'ambito della ricerca IZS SA RC 06/21, abbiamo verificato se ceppi attenuati di ASFV avessero circolato in Sardegna negli anni precedenti alla sua eradicazione. In passato (RC 2018 RS0118UM) avevamo ricercato ceppi attenuati tra i suini bradi in Sardegna, ma nonostante la presenza di numerosi capi con anticorpi anti-ASFV (914 su 2491 testati tra il 2017-2020), non avevamo identificato in questi animali ceppi di ASFV con delezioni geniche. Abbiamo pertanto focalizzato le ricerche nei cinghiali.

Nel 2019, al termine di una forte campagna di eradicazione, due ceppi con una delezione genica sono stati identificati nei cinghiali: 7303WB/19 e 7212WB/19 ASFV. Test di NGS (next generation sequencing) hanno mostrato che questi due ceppi presentavano una delezione di circa 4000 bp rispetto agli altri ceppi sardi isolati dal 1978 al 2018, a livello dei geni MGF 360-6L, X69R, MGF 300-1L.

Il fenotipo di 7303WB/19 e 7212WB/19 è stato quindi studiato mediante test in vitro su macrofagi suini, che rappresentano il target principale del virus. L'interazione virus-ospite è stata analizzata mediante curve di crescita, citofluorimetria multiparametrica e multiplex ELISA. Abbiamo osservato che i ceppi deleti 7303WB/19 e 7212WB/19 presentavano una cinetica di crescita ridotta nei $moM\Phi$ rispetto al ceppo sardo virulento 26544/OG10, sia utilizzando una bassa (0.01) che una alta (1) MOI. Oltre alla ridotta capacità dei ceppi deleti di replicare nei macrofagi, le cellule infette presentavano livelli inferiori di proteine virali, sia precoci (p30) che tardive (p72). Questa ridotta capacità di replicare nei macrofagi potrebbe

comportare a un fenotipo attenuato in vivo: 7303WB/19 e 7212WB/19 potrebbero avere a una ridotta patogenicità nei suini domestici e nei cinghiali.

In una seconda fase, abbiamo verificato se varianti virali con una delezione simile avessero circolato in Sardegna negli anni precedenti. Abbiamo monitorato la circolazione di ASFV nelle popolazioni di cinghiali in Sardegna da Febbraio 2015 a Gennaio 2019 (data dell'ultimo isolamento del genotipo I nell'isola). In questo arco di tempo, il genoma di ASFV è stato rilevato in dieci cinghiali, otto tra il 2015 e il 2017 e nessuno nel 2018. La delezione di circa 4000 bp non è stata rilevata in nessuno dei ceppi sardi di ASFV isolati prima del 2018.

La delezione è stata rilevata solo alla fine di una forte campagna di eradicazione; pertanto, è possibile che varianti attenuate di ASFV avessero circolato in Sardegna tra il 1978-2018, ma queste sono poi state rapidamente sostituite 'in campo' da varianti con una maggiore capacità di replicare nell'ospite e diffondere tra la popolazione.

Confronto tra allevamenti convenzionali e biologici di orate: utilizzo di metodi innovativi e tradizionali nella valutazione del benessere

Responsabile Scientifico: Paola Nicolussi

Poiché l'acquacoltura marina rappresenta un importante settore nell'ambito delle specie allevate risulta necessario definire una serie di principi per la tutela del benessere dei pesci e, di conseguenza, della salute del consumatore.

In questo contesto, poiché nuove forme di allevamento sostenibile come l'acquacoltura biologica sono sempre più diffuse, è importante definire le condizioni di benessere nelle quali i pesci dovrebbero essere allevati, sia che si tratti di un allevamento convenzionale che biologico. Nonostante gli studi siano sempre più numerosi, la definizione di indicatori oggettivi per la definizione del benessere nei pesci allevati rimane un campo ancora da esplorare, dal momento che la valutazione attualmente si basa soprattutto su osservazioni ambientali (qualità dell'acqua di allevamento), comportamentali e/o sulle performance produttive ottenute.

Scopo del lavoro è:

valutare il benessere di orate in allevamenti convenzionali e biologici, confrontando i dati ottenuti con metodi tradizionali (parametri fisiologici e ormonali, indicatori animal based) e sistemi di telemetria fisiologica con impiego di trasmettitori impiantati sugli animali (per es. accelerometri, tag elettromiografici o cardiaci);

indagare alcuni parametri dell'immunità aspecifica, utili nella valutazione del benessere dei pesci;

impiegare per la prima volta in campo in Italia sistemi biotelemetrici e valutare la loro adeguatezza come indicatori di benessere animale;

evidenziare nuovi parametri utilizzabili in campo nella valutazione del benessere.

Per lo svolgimento del disegno sperimentale sono stati identificati due allevamenti con vasche situate al largo, situati nella Regione Sardegna.

Sono stati prelevati campioni di sangue e per l'esecuzione delle seguenti determinazioni: esame emocromo-citometrico (RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW, PLT, WBC,

NEU, LYM, MONO, EOS, BASO), profilo biochimico, in particolare misurazione delle proteine totali, cortisolo, fattore di crescita insulino-simile uno (IGF1) e lattato.

I risultati ottenuti forniscono un valido contributo alla valutazione del benessere in allevamenti di orate, attraverso il rilievo di alcuni parametri ematici (esame emocromocitometrico, parametri biochimici e immunità aspecifica) e, soprattutto, nell'utilizzo di sistemi biotelemetrici che offrono importanti informazioni comportamentali (accelerazione, variazioni di profondità) che necessitano, tuttavia, di ulteriori approfondimenti.

Sviluppo e validazione sul campo di un test diagnostico basato sull'immunocromatografia lateral flow per la diagnosi rapida di Agalassia Contagiosa

Responsabile Scientifico: Sebastiana Tola

L'agalassia contagiosa (A.C.) è una delle malattie più serie tra quelle che colpiscono i piccoli ruminanti. Negli ovini, il quadro morboso della malattia è caratterizzato principalmente da mastite, artrite e cheratocongiuntivite (sindrome MAKE) mentre, nei caprini, si aggiunge anche la polmonite e la setticemia (sindrome MAKEPS). Il danno maggiore è rappresentato, comunque, dalla drastica diminuzione della produzione latte. L'A.C. è causata da 4 specie di Micoplasmi: *Mycoplasma agalactiae* (Ma), *Mycoplasma mycoides subsp capri* (Mmc), *Mycoplasma capricolum subsp capricolum* (Mcc) e *Mycoplasma putrefaciens* (Mp). Nel controllo ed eradicazione della malattia, possono giocare un ruolo primario l'utilizzo di test diagnostici rapidi e lo sviluppo di strategie di prevenzione mediante l'impiego di vaccini più efficaci, come indicato anche nelle linee guida sull'uso prudente degli antimicrobici in medicina veterinaria (2015/C 299/04).

Con una recente Ricerca Corrente, finanziata dal Ministero della Salute, abbiamo sviluppato un sistema di immunocromatografia lateral flow (LFIA) per la diagnosi veloce di agalassia contagiosa mediante l'utilizzo di sieri sperimentali marcati con particelle di oro colloidale. Per capire se il test potesse essere utilizzato in tutta la regione Sardegna, abbiamo caratterizzato genotipicamente gli isolati di *M. agalactiae* (n=126), di *M. mycoides subsp. capri* (n= 67) e *M. capricolum subsp. capricolum* (n=39) collezionati nel periodo 2012-2023. Tutti i 232 isolati sono stati anche analizzati mediante immunoblotting per verificare se gli anticorpi presenti nei sieri sperimentali fossero in grado di riconoscere e legare gli antigeni dei micoplasmi. Le strip LFIA sono state assemblate utilizzando la strategia del sandwich a doppio-anticorpo, mentre il box di contenimento della strip è stato realizzato con un filamento di acido polilattico, materiale biodegradabile, mediante l'utilizzo di una stampante 3D.

Tutti i micoplasmi analizzati sono stati riconosciuti dagli anticorpi presenti nei sieri sperimentali anti-*M. agalactiae* e anti-*M. capri/ M. capricolum* prodotti in seguito allo studio degli antigeni immunodominanti dei micoplasmi mediante proteomica 2D. Per valutare la sensibilità del LFIA, quantità crescenti (da 10 a 1010 CCU/ml) di *M. agalactiae* sono state

risospese nel running buffer. Una banda colorata nitida si è formata nel Test line a partire da 104 CCU/ml di micoplasmi.

L'utilizzo diretto del latte negativo, del latte positivizzato con micoplasmi e del latte proveniente da animali con agalassia contagiosa non ha dato buoni risultati a causa della saturazione immediata del Sample pad con interruzione del flusso laterale.

Ulteriore lavoro è necessario per automatizzare la dispensazione degli anticorpi, uniformare le dimensioni delle strip e utilizzare direttamente il latte.

Identificazione e quantificazione delle comunità microbiche, microorganismi patogeni ed emergenti presenti negli ambienti di lavorazione dei caseifici ovis della Sardegna mediante DNA metabarcoding

Responsabile Scientifico: Sebastiano Virgilio

Obiettivo dello studio era quello di acquisire informazioni sulla composizione tassonomica e sull'abbondanza delle popolazioni microbiche dominanti e delle sottopopolazioni rare presenti negli ambienti di lavorazione dei caseifici ovis della Sardegna e sulle vie di potenziale trasferimento al prodotto mettendo a punto e standardizzando le metodiche di ricerca dei microrganismi responsabili di contaminazione degli ambienti di lavorazione e dei prodotti mediante metodi coltura-indipendenti basati sul DNA metabarcoding.

Una prima fase della Ricerca si è concentrata nell'individuare dei caseifici a carattere industriale e artigianale da coinvolgere nello studio e nella messa appunto del piano di campionamento. Per il progetto sono stati analizzati i materiali prelevati da 14 caseifici. Presso ciascuno stabilimento di trasformazione sono stati prelevati campioni dalle aree di lavorazione da superfici a contatto e non a contatto con l'alimento e da prodotti. La scelta dei siti da cui prelevare i campioni ambientali è stata effettuata tenendo conto del rischio di trasferimento della contaminazione al prodotto. Le tipologie di prodotti da cui effettuare il campionamento sono state scelte sulla base della valutazione del rischio e i campioni sono stati prelevati dalle superfici di questi prodotti. Il prelievo dei campioni dalle superfici ambientali e di prodotto sono state effettuate mediante l'utilizzo di sponge bag kit. Dai campioni di sponge è stato estratto il DNA per l'analisi delle comunità microbiche tramite DNA metabarcoding. I campioni sono stati contestualmente sottoposti a screening per la ricerca di *Listeria* spp mediante Real time PCR Quantitativa Real Time. I campioni risultati positivi sono stati sottoposti ad analisi mediante metodiche colturali tradizionali per isolamento dei ceppi. La ricerca di *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) e *Listeria* spp. è stata effettuata in accordo con la ISO 11290-1. Si è inoltre proceduto all'analisi delle comunità microbiche tramite DNA metabarcoding. In particolare è stata effettuata l'amplificazione del DNA estratto mediante PCR con primer universali. Gli ampliconi sono stati sequenziati attraverso tecniche di sequenziamento massivo NGS. Le analisi post-sequencing sono state finalizzate all'identificazione dei taxa e dei geni funzionali presenti e

al successivo raggruppamento delle sequenze in unità tassonomiche operative, o OTUs, mediante Ribosomal Database Project, SILVA o Greengenes. L'identificazione di specie è stata effettuata mediante stima dei parametri di biodiversità tramite indicatori ecologici quali l'indice di Simpson o di Shannon.

Listeria spp. è stata isolata con metodo colturale da 13 dei 14 caseifici (92,8%) campionati. La sola presenza di *L. monocytogenes* è stata osservata in 1 struttura (7,1%), mentre la sola presenza di *Listeria* spp è stata osservata in 5 strutture (35,7%). La presenza combinata di *L. monocytogenes* e a *Listeria* spp è stata rilevata in 7 strutture (50,0%) e in 54 campioni (18,6%). A seguito del processo di filtraggio e di replicazione per ottenere sequenze di alta qualità, sono stati analizzati 253 campioni sui 281 inizialmente sequenziati. L'analisi delle comunità microbiche tramite DNA metabarcoding ha messo in evidenza che il phylum Proteobacteria ha rappresentato circa il 50% della composizione microbica sulla superficie del formaggio Pecorino, mentre la sua abbondanza è diminuita considerevolmente sulle superfici (a contatto e non a contatto con gli alimenti). Anche i Firmicutes hanno mostrato un trend simile. Al contrario, i Bacteroidota sono risultati più abbondanti sulle superfici a contatto con gli alimenti e meno presenti sul formaggio. Il taxa più abbondante è risultato *Halomonas*, comune in ambienti salini. *Streptococcus*, è risultato il più abbondante sulla superficie del formaggio e nelle aree a contatto con gli alimenti. Tra i microrganismi ricercati *Listeria* spp. è stata trovata in 7 campioni su 253 (2,77% di prevalenza e 0,01% percentuale di abbondanza sulla popolazione microbica totale), di cui 4 contenenti *L. monocytogenes* (1,58% di prevalenza e 0,03% della popolazione). In 91 su 253 campioni (35,97%) è stata rilevata la presenza di *Salmonella* spp., con una percentuale media dello 0,12% e di *Bacillus cereus*, con una media percentuale di abbondanza dello 0,11%. *Escherichia coli*, era presente in 9 campioni (0,03%). *Pseudomonas* spp. è stato invece riscontrato in tutti i 253 campioni (prevalenza del 100%) con un'abbondanza media del 7,50%.

La percentuale di caseifici in cui è stata isolata *Listeria* spp. rispecchia i risultati ottenuti in altre ricerche mettendo in evidenza l'elevata prevalenza di contaminazione da *Listeria* spp. nell'ambiente di lavorazione. Il microrganismo dimostra di trovare, all'interno dei caseifici, specialmente in ambienti umidi e difficili da sanificare, un habitat adatto alla propria sopravvivenza. Dai dati del DNA metabarcoding è stata evidenziata, nel complesso, una diversità notevolmente elevata. È stato osservato uno standard igienico generalmente accettabile, sebbene l'abbondanza di *Pseudomonas* spp. sia da prendere con particolare cura in virtù delle caratteristiche del microrganismo.