

VALUTAZIONE DELLA RILEVANZA ZOOTICA DEL VIRUS DELL'ECTIMA CONTAGIOSA (ORFV) MEDIANTE UN APPROCCIO ONE HEALTH

Responsabile: Dr. Ciriaco Ligios

Relatore: Dr. Davide Pintus

Il virus ORF (ORFV) (Famiglia: Poxviridae; Genere Parapoxvirus) è l'agente causale dell'ectima contagioso (ORF) malattia infettiva caratterizzata da lesioni che vanno da vescicole e pustole a lesioni atipiche papillomatose/angiomatose con localizzazione nella cute e nelle mucose. La nostra ricerca è stata finalizzata allo studio dei fattori molecolari che portano ai cambiamenti simili a tumori atipici associati all'ORFV. Agnelli, capretti e un montone adulto clinicamente affetti da infezione naturale da ORFV sono stati oggetto di questa parte dello studio ed esaminati con diversi metodi. L'ORFV è stato rilevato mediante coltura virale o reazione a catena della polimerasi (PCR) nei tessuti lesionati e nel sangue degli animali clinicamente colpiti. Microscopicamente, il quadro emerso ha messo in evidenza una marcata proliferazione pseudo-papillomatosa dell'epitelio, mentre il derma e la lamina propria erano caratterizzati da una componente neovascolare in proliferazione che esprimeva immunochimicamente il fattore di crescita vascolare endoteliale virale (vVEGF) e il suo recettore Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2). Le tecniche di immunoistochimica, immunofluorescenza e l'ibridazione in situ (ISH) dell'RNA, hanno mostrato che il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) era espresso nella componente fibrovascolare, nei macrofagi CD163+ infiltranti e nello strato basale dell'epidermide. La microscopia confocale ha rivelato inoltre che i macrofagi CD163+ erano associati a vVEGF e VEGFR2. Infine, mediante qRT-PCR geni dell'interleuchina-6 e VEGFR2 risultavano sovraespressi nei tessuti lesionati. Questi risultati suggeriscono che ORFV sia in grado di attivare una reazione infiammatoria caratterizzata da macrofagi CD163+ che esprimono EGFR e VEGFR2, che potrebbero svolgere un ruolo di promozione oncogenica attraverso un'azione sinergica il vVEGF. Infine, ORFV è stato determinato mediante PCR con un'elevata prevalenza nel sangue di capre sane in un'azienda focolaio, a dimostrazione di come ORFV possa avere una latenza. Inoltre, la nostra ricerca si è indirizzata nel fornire indicazioni sulla storia evolutiva di questo virus, valutando la variazione genetica di ORFV in Sardegna che ospita una grande popolazione di piccoli ruminanti. È emerso per ORFV un alto tasso di evoluzione virale mutazionale in tutto il mondo, che è risultato, a sua volta, superiore al tasso che abbiamo rilevato per i ceppi isolati in Sardegna. Inoltre, è stata riscontrata una divergenza genetica ben supportata tra i ceppi virali isolati da pecore e quelli da capre, ma non è stata evidenziata alcuna connessione rilevante tra la gravità delle lesioni prodotte da ORFV e specifici pattern polimorfici nelle due specie. Tale scoperta suggerisce che le lesioni correlate all'infezione da ORFV non sono necessariamente legate all'espressione di uno dei tre geni qui analizzati e potrebbero piuttosto essere l'effetto dell'espressione di altri geni o piuttosto rappresentare un carattere multifattoriale.

ANALISI MULTISISTEMICA DEI MECCANISMI PATOGENETICI DI ORF VIRUS MEDIANTE LO STUDIO COMPARATIVO TRA CEPPI DIFFERENTI.

Responsabile e relatrice: Dr.ssa Elisabetta Coradduzza

Orf virus (ORFV) è l'agente eziologico dell'ectima contagioso appartenente al genere Parapoxvirus. La patologia si manifesta con lesioni di tipo papulo-pustolose ma anche simil-papillomatose ed angiomatose principalmente in pecore e capre. ORFV causa una zoonosi trasmissibile a figure professionali interagenti con soggetti sensibili, segnalata e diffusa in tutte le parti del mondo. La malattia mostra un decorso benigno benché vi siano state segnalazioni di esiti atipici, in ospiti già immunocompromessi. ORFV ha un genoma altamente variabile soprattutto nella regione terminale e la variabilità genetica è probabilmente la causa della reinfezione dell'ospite tipica di ORF.

Nostre analisi molecolari preliminari, supportano l'ipotesi che i ceppi circolanti in Sardegna mostrino una strutturazione genetica altamente variabile. Infatti, i dati ottenuti dall'albero filogenetico e dall'automatic barcode Gap Discovery sui tre geni di riferimento sono concordi nell'evidenziare cinque unità genetiche distinte che riflettono un differenziamento principale in funzione della specie ospite, dell'età e della differente provenienza geografica di tessuti con lesioni. Inoltre, abbiamo rilevato la presenza del virus anche su sangue, cordone ombelicale e feto ponendo il quesito sulla possibilità che si verifichi una viremia a lungo termine e che il virus si trasmetta ai feti per via transplacentare, caratteristica che arricchirebbe ulteriormente la complessità dei meccanismi patogenetici di questo virus finora non appieno chiariti.

Il progetto mette in opera un approfondito piano di indagine molecolare in un'area del Mediterraneo caratterizzata dalla presenza di ORFV e da una numerosa popolazione ovi- caprina, quale è la Sardegna. Lo scopo del lavoro è quello di fornire una descrizione organica dell'interazione virus-ospite indagando i meccanismi patogenetici e di risposta immunitaria che la regolano associandoli ai differenti ceppi di ORFV implicati nell'infezione. Le analisi molecolari ad alta risoluzione, che verranno condotte negli allevamenti sardi, permetteranno di calcolare il tasso evolutivo di ORFV, fornire una datazione molecolare e descrivere le dinamiche di diffusione del virus nell'isola identificando la connessione tra determinati ceppi e differenti fenotipi della patologia. Inoltre, mediante uno studio di Gene Expression si avrà la possibilità d'identificare differenti profili fenotipici di ectima contagioso correlandoli a definiti quadri morfo- patologici e ceppi di ORFV coinvolti.

L'integrazione di analisi molecolari filogeografiche, filogenetiche e filodinamiche con quelle colturali, proteomiche e di espressione genica consentirà di acquisire nuove conoscenze su ORFV. Saranno correlate specifiche varianti alleliche al grado delle lesioni e valutata la rapidità di evoluzione che il virus mostra in condizioni specifiche. L'analisi delle variazioni proteiche sul tessuto infetto rispetto a quello sano consentirà di valutarne lo stato metabolico-cellulare.

ASFEND – MODELLIZZAZIONE DELLA SORVEGLIANZA PASSIVA COME STRUMENTO CHIAVE PER L'AFRICAN SWINE FEVER EXIT STRATEGY

Responsabile e relatrice: Dott.ssa Federica Loi

Le caratteristiche epidemiologiche della peste suina africana (PSA) e l'attuale diffusione nelle popolazioni di suini domestici e selvatici rappresentano una minaccia globale con gravi ripercussioni sulla salute e sul benessere degli animali con perdite economiche che ammontano a decine di miliardi di euro all'anno. L'assenza di un vaccino, la rapida diffusione e le lacune informative epidemiologiche spesso compromettono il controllo efficace della malattia. Uno dei principali gap è l'incapacità di definire una specifica strategia di abrogazione delle misure restrittive generando danni economici talvolta evitabili, in particolare nei paesi in cui il riscontro della malattia è da tempo limitato ai soli animali sieropositivi. Un chiaro esempio di tale situazione è ciò che accade oggi in Sardegna, dove nonostante la malattia sia endemica da più di 40 anni, l'ultima notifica risale a Settembre 2018 nel domestico ed Aprile 2019 nel selvatico. L'EFSA, chiamata dalla Comunità Europea ad esprimere il proprio parere sull'argomento e sulle strategie applicabili, focalizza l'attenzione sulla sorveglianza passiva nelle popolazioni di cinghiali. Tale sorveglianza risulta essere tuttora carente nell'isola, e le informazioni relative all'andamento epidemiologico della PSA nei cinghiali derivano principalmente dai campioni conferiti durante la campagna venatoria (CVC), la quale ha una durata di 3 mesi all'anno. Tutto questo genera un dato limitato con conseguenti gap informativi che è necessario colmare.

A fronte di un miglioramento della situazione epidemiologica in Sardegna, ad oggi persiste la necessità di migliorare e rafforzare la sorveglianza passiva nei cinghiali. Il presente progetto ha lo scopo di strutturare e programmare una sorveglianza mirata, basata su una metodologia standardizzata e in grado di colmare le informazioni mancanti, finalizzata ad escludere la presenza del virus della PSA nei cinghiali.

Ad oggi non risulta presente tra le indicazioni della CE, tra i pareri EFSA e quelli della comunità scientifica in generale, una metodologia concreta che generi indicazioni chiare e specifiche riguardanti la sorveglianza passiva mirata in paesi in fase avanzata di eradicazione della PSA. Lo studio applicato e i modelli epidemiologici alla base del presente progetto avranno come risultato la standardizzazione di un protocollo di sorveglianza utile per la Sardegna, ma che costituirà una linea guida per tutte quelle situazioni epidemiologiche in cui la PSA è in via di eradicazione.

Il presente progetto consta di tre fasi. La prima fase (preliminare-retrospettiva) ha come scopo l'individuazione delle aree più suscettibili alla persistenza della malattia nelle quali indirizzare la sorveglianza passiva. La fase applicativa di sorveglianza riguarda le azioni da intraprendere al fine di reperire le informazioni mancanti su determinate porzioni di territorio. L'ultima fase di elaborazione dei dati prevede l'applicazione di metodiche di multiple imputation, volta a colmare i gap informativi e costituire una base dati completa che verrà successivamente utilizzata per rispondere ad un quesito scientifico: "Quanti animali sieropositivi è necessario riscontrare al fine di osservare un animale virus positivo?". La risposta a tale quesito darebbe la misura di quanto robusta potrà essere l'ipotesi di assenza di circolazione virale, sulla base del numero di animali sieropositivi eventualmente riscontrati in futuro.

RUOLO DEGLI UCCELLI MIGRATORI NELL'INTRODUZIONE DI NUOVI VETTORI ED AGENTI PATOGENI IN SARDEGNA

Responsabile e relatrice: Dott.ssa Valentina Chisu

Negli ultimi anni si è assistito ad un aumento delle malattie infettive trasmesse da artropodi vettori che rappresentano un problema sanitario a livello globale sia in campo medico che veterinario. L'emergere/riemergere delle Vector-borne diseases (VBDs) è correlato ad una complessa rete di fattori ambientali e sociali. I cambiamenti climatici, la globalizzazione, l'intensificarsi degli scambi commerciali di animali e prodotti d'origine animale tra i vari paesi, le variazioni delle pratiche agricole, l'urbanizzazione sono solo alcuni dei fattori che contribuiscono ad aumentare il rischio di introduzione e adattamento di questi vettori in nuove aree geografiche, con conseguenti ripercussioni sulla diffusione delle zoonosi ad essi correlate.

In Europa vengono registrati in media 77.000 casi l'anno, mentre in Italia i casi notificabili di VBDs sono in aumento. Le modalità con cui tali vettori sono in grado di superare le barriere geografiche sono diventate recentemente un importante oggetto di studio. In tale contesto, gli uccelli migratori svolgono un ruolo significativo nell'ecologia degli ectoparassiti e nella circolazione dei microrganismi patogeni. Durante la migrazione, miliardi di uccelli percorrono grandi distanze utilizzando vari siti di sosta che permettono loro di nutrirsi e riposarsi e dove gli ectoparassiti (solitamente artropodi) possono attaccarsi o staccarsi, creando così nuovi focolai naturali. Lo studio degli artropodi come vettori di malattie zoonotiche riveste un ruolo di primaria importanza affinché vengano attuati programmi di prevenzione, controllo e monitoraggio dei vettori nel territorio e identificare le aree di rischio per la trasmissione dei patogeni da essi veicolati.

In Sardegna, le informazioni riguardanti il ruolo degli uccelli migratori nella circolazione di virus, batteri e protozoi veicolati da vettori sono pressoché assenti. Lo scopo di tale progetto è stato quello di incrementare le conoscenze sulla diffusione di ectoparassiti negli uccelli migratori che transitano nell'isola, nella rotta migratoria dalla zona sub-sahariana al Nord-Europa e viceversa. È stato inoltre considerato il ruolo svolto da questi volatili nella trasmissione di patogeni di importanza medica e veterinaria. La messa a punto di nuove metodiche diagnostiche, più sensibili, rapide ed economiche per la determinazione dei patogeni correlati ai vettori ha contribuito ad implementare il sistema diagnostico per la determinazione delle VBDs ed ha permesso di individuare il ruolo fondamentale degli artropodi vettori nella trasmissione di tali infezioni.

Questo studio ha consentito la comprensione dell'impatto degli uccelli sulla diffusione delle zecche e degli agenti patogeni da esse trasmessi. Nonostante la colonizzazione di una nuova specie di zecca in un'area specifica richieda condizioni favorevoli di clima, vegetazione e ospiti, nonché una nicchia ecologica disponibile, è necessario monitorare gli agenti patogeni emergenti/riemergenti veicolati dalle zecche e che potrebbero diffondersi nel territorio. Poiché dai risultati ottenuti viene evidenziata l'importanza delle zecche quali vettori di numerose specie di *Borrelia* e *Rickettsia*, si rende necessario istituire piani di sorveglianza che includano fauna selvatica e ambiente, al fine di caratterizzare meglio la situazione epidemiologica e limitare il rischio negli animali domestici. Questo studio sottolinea inoltre l'importanza di proseguire questo filone adottando un approccio "One Health" che migliorerebbe il rilevamento di nuovi focolai e minimizzerebbe il rischio di trasmissione all'uomo.

STUDIO MULTIDISCIPLINARE FINALIZZATO ALLA CARATTERIZZAZIONE ISTOLOGICA-MOLECOLARE DEI PRINCIPALI AGENTI PATOGENI E DELLE LESIONI ASSOCIATE DELL’OSTRICA (CRASSOSTREA GIGAS) ALLEVATA IN SARDEGNA

Responsabile: Dr. Angelo Ruiu

Relatrice: Dott.ssa Daniela Mandas

L'ostrica concava (*Crassostrea gigas* o *Magallana gigas* (Thunberg, 1793) è un mollusco endemico delle coste asiatiche dell'Oceano Pacifico con una produzione mondiale annua di circa 4.7 milioni di tonnellate. In questa specie gli episodi di mortalità sono stati correlati ad una eziologia multifattoriale. Tra i principali fattori di rischio sono stati identificati, lo stress, l'alterazione dei parametri ambientali (temperatura, salinità, ossigeno etc) e gli agenti patogeni. I principali eventi di mortalità nell'ostrica sono stati associati all' Ostreid herpesvirus (OsHV-1 e sue varianti) e ai batteri del genere *Vibrio* (*Vibrio aestuarianus* e *V. splendidus*). Il *V. aestuarianus* recentemente ha assunto un ruolo emergente negli episodi di mortalità massive negli allevamenti di ostriche. Tuttavia, le segnalazioni in merito risultano ancora limitate.

Il lavoro svolto nell'ambito di questo progetto ha previsto il monitoraggio di sette allevamenti di ostriche *Magallana gigas* situate in differenti aree della Sardegna, al fine di valutare lo stato di salute dei molluschi ed eventuali variazioni dei parametri ambientali associati alla presenza dei patogeni. I molluschi oggetto di studio (208 esemplari adulti) sono stati osservati macroscopicamente al fine di rilevare la presenza di lesioni nei tessuti. Successivamente sono stati sottoposti ad analisi molecolari per la ricerca dei principali agenti patogeni virali e batterici (OsHV, *V. aestuarianus* e *V. splendidus*), seguite dalle analisi istopatologiche su sezioni di tessuto fissato in formalina al fine di valutare la presenza di un infiltrato infiammatorio nei tessuti target (mantello e branchie) dell'ostrica. Inoltre, il progetto ha previsto la messa a punto di un protocollo di ibridazione in situ come strumento diagnostico utile nella localizzazione dei batteri appartenenti al genere *Vibrio* spp con la finalità di associare i quadri infiammatori alla presenza di *Vibrio* spp nel mantello e nelle branchie di *Magallana gigas*.

Durante il periodo monitorato non è stata registrata nessuna mortalità e nessuna anomalia negli allevamenti coinvolti nel progetto. Le analisi tramite PCR hanno comunque rilevato la presenza di Ostreid herpesvirus in 4 campioni, un solo campione è risultato positivo al *Vibrio splendidus*, mentre in nessun campione è stata evidenziata la presenza di *V. aestuarianus*. Istologicamente non sono emersi quadri di particolare gravità dell'infiltrazione emocitaria nei tessuti valutati (branchie e mantello), fattore che va di pari passo con i risultati molecolari, considerando che non è stata rilevata una presenza dei patogeni tale da far pensare ad un episodio di malattia in allevamento. La messa a punto del protocollo di ibridazione in situ è stata eseguita con l'utilizzo di 28 campioni di ostriche appartenenti ad un progetto precedente, prelevati durante un episodio di mortalità e risultati positivi alla presenza di elevate concentrazioni del patogeno *V. aestuarianus*. Il segnale ottenuto nell'esperimento di ibridazione nei campioni analizzati ha rispecchiato il livello di infezione indicato dalla quantificazione del patogeno *V. aestuarianus* in qPCR.

La risposta immunitaria rilevata non è da correlarsi ad un malessere dei molluschi poiché non rientra in nessun caso di mortalità, ma può essere considerata come una risposta immunitaria di base in relazione alla continua interazione dei molluschi con agenti patogeni e non patogeni. Il saggio di ISH sviluppato nell'ambito di questo progetto si è rivelato importante come conferma dell'infezione da parte del patogeno e in grado di fornire ulteriori informazioni sulla migrazione interna e localizzazione tissutale dell'agente infettivo. Questa tecnica potrebbe essere utilizzata come approfondimento dell'analisi dei casi di mortalità in allevamento, supportando i test eseguiti attualmente per verificare la presenza del *V. aestuarianus* e delle specie associate alle mortalità.

STUDIO E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) IN ALIMENTI, ANIMALI E UOMO NELLA REGIONE SARDEGNA

Responsabile: Dr. Sebastiano Virgilio

Relatori: Dott. Riccardo Bazzardi – Dott.ssa Mariangela Fiori

In Italia, il virus dell'Epatite E (HEV) è responsabile del 10% circa delle epatiti acute virali non-A-C. La trasmissione di HEV può avvenire attraverso il consumo di acqua contaminata (HEV-1 e HEV-2) o di alimenti contaminati (HEV-3 o HEV-4) e in soggetti con forma sia acuta che cronica legata a HEV-3. L'attività di sorveglianza a carico di tutte le epatiti virali acute viene svolta dal Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA) che nel corso del 2018, ha registrato 49 casi di epatite E. Relativamente alla distribuzione geografica dei casi notificati sul territorio nazionale, si osserva come la maggior parte delle segnalazioni sia riferibile al Nord Italia, mentre risultano solo casi sporadici a livello delle regioni del Sud e delle Isole. Nella regione Sardegna la prevalenza riscontrata è molto probabilmente dovuta al consumo maggiore di carne cruda di maiale, ad esempio le salsicce di fegato che diversi studi hanno indicato come possibile veicolo. In nessuno dei campioni è stato invece trovato il virus attivo e capace di replicarsi. Una criticità legata alla sorveglianza dell'HEV è legata ad un alto livello di sotto notifica attribuibile nella maggior parte dei casi ad una conoscenza ancora limitata sull'infezione. Tale criticità è legata principalmente al fatto che non vi è ancora completa consapevolezza sul ruolo delle infezioni autoctone nell'epidemiologia dell'infezione, e si tende ad associarla prevalentemente a viaggi all'esterno in aree endemiche. La ricerca del virus viene difficilmente effettuata su soggetti che non sono viaggiatori, anche nei casi in cui sarebbe indicato. Un limitato numero di studi ha inoltre riportato la presenza del virus nei molluschi bivalvi, nella frutta e nella verdura.

Gli obiettivi della ricerca sono, da una parte approfondire le conoscenze relative alla diffusione di HEV negli allevamenti suinicoli sardi, dall'altra sviluppare ed ottimizzare metodiche di diagnosi diretta ed indiretta sia in matrici biologiche che alimentari. Sarà inoltre possibile valutare la prevalenza di HEV in pazienti che presentano sintomatologia caso-correlata e implementazione di un approccio filogenetico, e migliorare la capacità diagnostica nel settore umano/animale.

Lo studio porterà alla raccolta di dati epidemiologici fino ad ora insufficienti o scarsi su territorio regionale; avranno il principale ruolo di arricchire la conoscenza sulle caratteristiche genetiche e molecolari dell'HEV affinché si possa stabilire una strategica risposta per il controllo e gestione dei focolai di infezione.

Attraverso il disegno sperimentale costruito secondo metodi statistici e distribuito in due anni di studi il progetto si propone di ottenere i seguenti risultati: al primo anno monitoraggio degli allevamenti di suini e analisi virologiche in almeno l'80% dei campioni di feci. Analisi di almeno 20 campioni fecali di pazienti sintomatici e relativa prevalenza per area geografica; al secondo anno monitoraggio degli allevamenti di suini e analisi virologiche nel restante 20% di campioni fecali. Nel periodo di studio sono state analizzate le matrici alimentari provenienti dai controlli ufficiali per la sicurezza alimentare. Identificazione del genotipo sui campioni viremici isolati.

BENESSERE NEGLI ALLEVAMENTI OVINI DA LATTE: CONFRONTO TRA PARAMETRI EMATICI E UNA CHECK LIST BASATA SULLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO

Responsabile e relatrice: Dr.ssa Paola Nicolussi

Relatore: Dott. Giuseppe Tedde

Obiettivo principale della ricerca era verificare la corrispondenza tra i risultati ottenuti dall'applicazione di una procedura standardizzata per la rilevazione del benessere in allevamento di ovini da latte (Check list ClassyFarm) con alcuni parametri ematici, al fine di contribuire al miglioramento dei sistemi di valutazione del benessere negli allevamenti di ovini da latte (conferma della procedura impiegata o revisione di alcuni punti) e di identificare e validare alcuni marker ematologici quali indicatori dello stato di benessere in allevamento.

Il programma sperimentale prevedeva l'esecuzione di sopralluoghi in allevamenti di pecore da latte della Regione Sardegna, nel corso dei quali veniva applicata una procedura standardizzata (Check list ClassyFarm - autocontrollo aziendale) per la valutazione del benessere animale e venivano prelevati campioni di sangue.

In particolare, in ogni azienda il prelievo di sangue era effettuato dalle pecore sulle quali venivano rilevate le Animal Based Measures, utilizzando lo schema previsto per tali valutazioni dal "Protocollo di valutazione del benessere animale e della biosicurezza" di tutte le specie animali inserite nel Sistema Classyfarm. Venivano eseguiti l'esame emocromocitometrico, il profilo epatorenale, l'elettroforesi delle proteine sieriche, la determinazione della Proteina C reattiva. I risultati venivano confrontati con i range di riferimento della specie, al fine di verificare lo stato di benessere e di salute degli animali.

La sperimentazione svolta evidenziava come il livello di tutti i 15 allevamenti inseriti nello studio presentavano un livello di benessere superiore al giudizio sufficiente, dimostrando come la tipologia di allevamento semi-estensivo sia rispettosa del benessere della pecora da latte. I risultati degli esami eseguiti (esame emocromocitometrico, elettroforesi e proteina C reattiva) confermavano quanto rilevato dall'applicazione della check list ClassyFarm nei diversi allevamenti.

FARMACI AD USO ZOOTECNICO COME CONTAMINANTI EMERGENTI, SVILUPPO DI PROTOCOLLI DI MONITORAGGIO INTEGRATI A METODI ANALITICI NELLA VALUTAZIONE DELLA ESPOSIZIONE NELLA CATENA ALIMENTARE.

Severyn Salis

Un'enorme varietà di farmaci viene impiegata nel mondo in ambito agro-zootecnico per il trattamento e la prevenzione di malattie infettive e non, nella gestione dei processi riproduttivi, e, con utilizzi a livelli sub-terapeutici, come promotori della crescita, pratica quest'ultima vietata nell'Unione Europea dal 2006, in attuazione di politiche sanitarie volte alla responsabilizzazione degli operatori del settore. I più utilizzati appartengono ad un'ampia gamma di classi terapeutiche, come antimicrobici, antinfiammatori, ormoni sessuali, antisettici e antimicotici. I dati di consumo oggi disponibili si riferiscono principalmente agli antimicrobici (β -lattamici, sulfamidici, tetracicline, macrolidi), probabilmente a causa della loro commercializzazione in grandi quantità e dei loro effetti altamente tossici per i batteri ambientali, il che giustifica l'aumento della generale preoccupazione nei confronti del loro potenziale di induzione di resistenza batterica, anche a bassi livelli di concentrazione, a causa dell'esposizione continua. In Italia, la commercializzazione di principi attivi farmacologici per utilizzo su animali potrebbe considerarsi comparabile a quella per uso umano, stimata in migliaia di tonnellate l'anno, stima che potrebbe comunque risultare non corretta in considerazione dell'uso illecito talvolta fuori controllo. I farmaci, una volta somministrati all'animale possono:

- essere metabolizzati nell'organismo e eliminati sotto forma di metaboliti inattivi con le feci e con le urine
- non subire alcun processo metabolico ed essere eliminati come tali
- essere metabolizzati in parte ed eliminati come metaboliti farmacologicamente attivi.

Le principali vie di accesso all'ambiente terrestre provengono dall'uso in allevamenti intensivi, dalla escrezione diretta dovuta alla somministrazione in animali allevati al pascolo e dall'applicazione di liquami e letame ai terreni, che può portare anche ad una contaminazione indiretta del comparto acquatico attraverso il deflusso superficiale o la lisciviazione nelle acque sotterranee; pertanto, è ragionevole pensare che i trattamenti topici abbiano un potenziale maggiore di rilascio nell'ambiente rispetto alla somministrazione per via orale o per iniezione. L'elevato consumo mondiale di medicinali veterinari ha sollevato l'interesse e l'impegno generale della comunità scientifica e degli organismi legislativi, con l'attuazione di politiche sanitarie di prevenzione e controllo del loro impiego, mirate a valutare e limitare il rischio per la salute pubblica dovuto all'esposizione a queste sostanze.

Ciò ha portato all'adozione di piani di controllo ufficiali (Piano Nazionale Residui) e allo sviluppo di metodi analitici per l'identificazione e la quantificazione dei residui farmaceutici veterinari nell'ambiente e negli alimenti. A causa della grande varietà e complessità delle matrici, tuttavia, non sono tantissimi in letteratura gli studi di determinazione e contestuale correlazione tra la presenza di questi residui nell'ambiente (in terreni, sedimenti e fanghi) e nei prodotti alimentari, fatto, questo, che rende concreta la possibilità di incorrere in una sottostima del rischio per la salute pubblica.

Data l'importanza e la necessità di ottenere sempre maggiori informazioni per comprendere e valutare l'impatto dei farmaci veterinari sull'ambiente e nella catena alimentare, sembra opportuno proporre un progetto che possa portare allo sviluppo di protocolli di monitoraggio e nuovi metodi analitici al fine di poter ottenere quanti più elementi possibili nella valutazione della esposizione alimentare a questi contaminanti emergenti.

INDAGINE SUI FATTORI DETERMINANTI LA SCELTA DEI TRATTAMENTI ANTIBIOTICI NELLE AZIENDE OVINE E CAPRINE DA LATTE

Responsabile: Dr. Simone Dore

Relatrice: Dott.ssa Ilaria Fadda

Obiettivo del progetto di ricerca è l'identificazione dei fattori determinanti che influenzano l'approccio all'uso degli antibiotici da parte dei veterinari e degli allevatori degli ovini e caprini da latte attraverso la valutazione critica delle variabili demografiche, epidemiologiche, laboratoristiche, sociali, e cliniche utili ai fini della comprensione delle conoscenze e della consapevolezza sul tema dell'AMR.

La ricerca è stata articolata in 3 fasi principali:

1. Identificazione e studio dei determinanti: È stata eseguita la ricerca dell'evidenza scientifica al fine di identificare le variabili demografiche, epidemiologiche, laboratoristiche, sociali, e cliniche utili ai fini della comprensione delle conoscenze e della consapevolezza su AMR.
2. Costruzione del questionario e validazione: Dopo lo studio e la definizione dei quesiti da investigare sono stati sviluppati due distinti questionari, destinati rispettivamente ad allevatori e veterinari, con l'obiettivo di identificare gli elementi caratterizzanti gli atteggiamenti e le opinioni degli intervistati. Terminata la fase di validazione, i questionari sono stati quindi convertiti in formato elettronico per la raccolta automatica dei dati con l'utilizzo dell'applicativo elettronico.
3. Le versioni definitive dei questionari destinati ai veterinari ed allevatori sono risultati composti, rispettivamente, da n. 59 e n.52 items suddivisi in 3 sezioni:
 - informazioni personali/professionali:
 - conoscenze generali su antibiotici e antibiotico-resistenza:
 - uso degli antibiotici in allevamento.

Le variabili raccolte col questionario sono state inserite in un foglio elettronico, quindi ripulite, codificate e analizzate. Sono stati analizzati i dati provenienti da 16 e 43 questionari somministrati ad altrettanti veterinari e allevatori operanti nel settore degli ovini e caprini da latte.

Questo studio fornisce indicazioni sulla conoscenza dell'antimicrobico-resistenza e sull'atteggiamento e l'utilizzo appropriato degli antibiotici tra i veterinari e gli allevatori del settore ovino e caprino da latte.

In particolare, si è osservato come la maggior parte dei veterinari e allevatori sia in possesso di una buona conoscenza sul tema della resistenza antimicrobica anche se ritiene necessario un maggiore approfondimento e aggiornamento attraverso la partecipazione a corsi di formazione.

Per quanto riguarda l'atteggiamento sulla prescrizione di antibiotici negli allevamenti, è da rimarcare la consuetudine ancora, talvolta, presente di prescrivere la terapia antibiotica su richiesta dell'allevatore, spesso in assenza di diagnosi clinica e microbiologica senza preventiva valutazione della sensibilità alle molecole somministrate; inoltre, la somministrazione in totale autonomia della terapia da parte degli allevatori dovrebbe essere accompagnata, oltre che dalla sola prescrizione, anche da indicazioni adeguate sulle modalità di esecuzione della stessa, con particolare attenzione alle corrette procedure di igiene (i.e., terapia intramammaria).

Nello specifico dell'allevamento ovi-caprino da latte si rimarca, innanzitutto come le patologie mammarie rappresentino la causa principale di utilizzo di antibiotici; tuttavia, si sottolinea che la scelta del trattamento selettivo degli animali, sempre più attuata così come peraltro previsto dalle linee-guida vigenti, riduca il rischio di sviluppare resistenza batterica.

VESCICOLE EXTRACELLULARI DEL LATTE: EFFETTO IMMUNOMODULANTE IN MACROFAGI SUINI

Giulia Franzoni

Le vescicole extracellulari (EVs) sono molecole di dimensioni nanometriche (diametro 30 - 150 nm) racchiuse da un doppio strato fosfolipidico, secrete dalle cellule di tutti i tessuti e in grado di raggiungere ed essere assorbite da cellule riceventi sia vicine che lontane. Queste molecole hanno un ruolo centrale nella comunicazione cellulare, che viene espletata dal cargo vescicolare costituito da molecole di varia natura: proteine, glicani, lipidi, metaboliti, RNA e DNA. Il latte, rappresenta una delle fonti alimentari più promettenti di EV.

Le vescicole derivanti dal latte (mEVs) sembrano avere effetti antinfiammatori ed immuno-modulatori e stanno suscitando notevole interesse in campo biomedico. Prima di ogni applicazione in campo biomedico è fondamentale analizzare l'interazione di queste molecole con le cellule del sistema immunitario. Qualsiasi molecola 'estranea' viene infatti riconosciuta dalle cellule dell'immunità innata, in particolare modo da quelle con una spiccata attività fagocitaria come i neutrofili e i macrofagi.

In questo lavoro, abbiamo caratterizzato gli effetti immunomodulatori delle vescicole extracellulari del latte di capra sui macrofagi non attivati (moMΦ) e macrofagi classicamente attivati (moM1). Abbiamo analizzato cellule suine, in quanto il suino è considerato un modello ideale in campo biomedico, grazie alle numerose similitudini con l'uomo.

Gli effetti immunomodulatori delle mEVs sono state analizzati mediante esperimenti in vitro, con tecniche di citofluorimetria a flusso, ELISA (rilascio citochine), microscopia ottica e confocale, test di espressione genica. Abbiamo confrontato gli effetti di bassi e alti dosaggi di mEVs (0,6 vs 60 ng).

Le mEVs sono state internalizzate in modo efficiente dai macrofagi suini, sia non attivati che attivati classicamente.

Dosi elevate di mEVs (60 mg) hanno indotto up-regolazione di MHC I e MHC II DR sui moMΦ, ma non sui moM1.

L'esposizione a basse dosi (0,6 mg) di mEV ha aumentato l'espressione genica di IL10, EBI3 e IFNB in moMΦ, mentre alte dosi (60 mg) hanno aumentato l'espressione genica di diverse citochine pro-infiammatorie. In accordo con i dati espressione genica, abbiamo osservato che l'esposizione a alti dosaggi (60 mg) di mEVs ha indotto un notevole rilascio di TNF, IL-8, IL-1α, IL-1β, IL-1Ra, IL-6, IL-10 e IL-12. Le mEVs non hanno influenzato in modo critico né i livelli di espressione genica né i livelli di citochine nei surnatanti culturali di moM1.

Nel complesso, i nostri dati sono in favore di un'applicazione di queste molecole in campo biomedico. Le mEVs hanno infatti polarizzato i macrofagi verso un fenotipo simile a M1, ma questa attivazione ha mostrato di poter essere controllata, prevenendo quindi una reazione esacerbata e potenzialmente patologica per l'individuo.

SVILUPPO DI UN VACCINO RICOMBINANTE PER LA MASTITE OVINA DA STAPHYLOCOCCUS AUREUS A PARTIRE DAI GENI CODIFICANTI PER I PRINCIPALI ANTIGENI IMMUNODOMINANTI

Sebastiana Tola

Lo *Staphylococcus aureus* è la principale causa di mastiti cliniche e subcliniche nelle pecore, compromettendo in modo significativo la qualità e la quantità delle produzioni di latte. Ad oggi, i vaccini commerciali utilizzati negli ovini sono costituiti principalmente da ceppi produttori di biofilm; tuttavia, si è visto che molti isolati patogeni di *S. aureus* non producono biofilm, compresi quelli che circolano in Sardegna. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di identificare antigeni immunodominanti come candidati alternativi ai componenti del biofilm da utilizzare sia per la produzione di vaccini che per lo sviluppo di sistemi diagnostici. Nella prima parte della ricerca, è stato condotto uno studio di immunoproteomica testando sieri di pecore naturalmente infette contro antigeni cellulari e secreti estratti da ceppi appartenenti al lineage prevalente di *S. aureus*, seguito dall'identificazione mediante spettrometria di massa degli immunogeni più importanti. Quattro antigeni cellulari e tre secreti di *S. aureus* hanno indotto una forte risposta immunitaria umorale dell'ospite. I quattro antigeni cellulari rientravano nelle cosiddette proteine housekeeping: piruvato chinasi, fattore di allungamento Tu, diidrolipoil deidrogenasi e alfa-chetoacido deidrogenasi. I tre antigeni secreti erano l'autolisina bifunzionale Atl e i due componenti della leucocidina Panton-Valentine, lukF-PV/lukM. Nella seconda parte di questa ricerca, abbiamo effettuato un'analisi di previsione strutturale 3D, con l'identificazione dei migliori epitopi dell'intera porzione secreta della proteina AtlA di *S. aureus*. Frammenti di atlA, contenenti i principali epitopi previsti, sono stati amplificati, clonati ed espressi in *Escherichia coli* per la produzione di proteine ricombinanti. Due cloni selezionati (rAtl4 e rAtl8) hanno prodotto proteine ricombinanti con una forte reattività nei confronti del siero iperimmune anti-AtlA nativo e dei sieri raccolti da pecore con mastite clinica da *S. aureus*. La stessa procedura è stata applicata anche alle leucocidine lukPV e lukM. Poiché tutte le proteine ricombinanti prodotte sono in grado di legare gli anticorpi presenti nei sieri di animali naturalmente infetti da *S. aureus*, le r-proteine potrebbero essere utilizzate come vaccini a base proteica.

RICERCA DI MICROPLASTICHE IN PESCI ALLEVATI IN SARDEGNA E CONTRIBUTO ALLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO SANITARIO PER IL CONSUMATORE

Responsabile: Dr. Sebastiano Virgilio

Relatore: Dott.ssa Rita Melillo

Le materie plastiche sono polimeri non biodegradabili, le cui capacità intrinseche sono risultate estremamente vantaggiose e ciò ne ha determinato un largo impiego nei più svariati settori. L'inquinamento ambientale causato dalla plastica è oggetto di crescente preoccupazione. I polimeri plastici di dimensioni comprese tra 0,1 e 5000 μm sono definiti microplastiche (MP). La loro presenza è stata rilevata in vari ambienti, compreso quello marino, dove possono essere ingerite dai pesci, tra cui le orate, che sono tra le specie ittiche più allevate in Sardegna, diventando un potenziale problema per il consumatore finale. Scopo del presente studio è stato quello di acquisire dati aggiornati sul livello di contaminazione e sulla natura delle MP rilevate in orate raccolte da differenti allevamenti della costa Sarda contribuendo alla valutazione del rischio sanitario per il consumatore associato al consumo di prodotti ittici. Si è inoltre messa a punto una tecnica di estrazione, identificazione e caratterizzazione delle MP utilizzando la microscopia infrarossa a trasformata di Fourier ($\mu\text{-FTIR}$). Una prima fase della Ricerca si è concentrata nella valutazione delle aree di produzione, delle aziende da inserire nel progetto e nella messa appunto del piano di campionamento e del più efficace protocollo di digestione per la matrice da analizzare. L'indagine è stata effettuata presso 4 allevamenti di orate (A $\rightarrow$ D) ubicati in differenti zone dell'Isola. Sono stati prelevati 4 esemplari da ciascun allevamento nel trimestre autunnale, primaverile ed estivo e 4 esemplari da tre allevamenti (B-C-D) nel trimestre invernale per un totale di 60 orate. Da ogni esemplare sono stati analizzati due campioni: muscolo (10 g prelevato in più punti (M) e tratto gastrointestinale (GI). La metodica di preparazione e analisi dei campioni prevedeva le seguenti fasi: 1) Degradazione della materia organica attraverso l'aggiunta di idrossido di potassio al 10% 1:10 (w/v) e sosta in termostato a 40 °C per 48 ore. 2) Setacciatura del digerito. 3) Neutralizzazione della sospensione ottenuta attraverso l'uso di acido citrico 1M. 4) Filtrazione in filtri in policarbonato con porosità di 10 μm e 47-50 mm di diametro mediante pompa da vuoto, lavaggio dei filtri con acqua Milli-Q e successiva filtrazione di questa in filtri di silicio (SI) con porosità 1 μm . 5) Analisi dei filtri attraverso il $\mu\text{-FTIR}$. Il materiale utilizzato non conteneva componenti plastiche e il trattamento dei campioni era eseguito rispettando misure rigorose per mitigare la contaminazione crociata.

I dati ottenuti mostrano la presenza di polimeri plastici, identificabili come MP nel 30% dei campioni analizzati. In particolare la presenza maggiore si è evidenziata nel tratto gastro intestinale, dove il 22% di tutti quelli analizzati è risultato contaminato da almeno una microplastica e nell'8% dei campioni di muscolo provenienti dagli esemplari analizzati. La contaminazione è risultata tuttavia molto limitata, con una media di 1-2 elementi per campione. Solo un esemplare ha mostrato la presenza simultanea di MP nel GI e M, entrambi identificati come elementi in polipropilene ma di colore diverso. I polimeri identificati erano prevalentemente di colore blu, rosso e verde. Si tratta di dati in linea con quanto evidenziato nei nostri studi precedenti e con quanto riportato da altri autori. Il colore potrebbe portare i predatori a confondere i detriti marini con prede di colore simile. Il polimero più rilevato (72 %) è risultato il polipropilene. I risultati ottenuti evidenziano l'efficacia del protocollo sperimentale per la rilevazione e il conteggio delle MP in una matrice compressa come il muscolo e il tratto gastrointestinale di orata. I dati raccolti confermano la presenza di MP sia nell'intestino che nel muscolo di esemplari di *Sparus aurata* allevati in Sardegna ma con una contaminazione inferiore a quella riportata da altri autori su pesci catturati nel Mediterraneo. Ciò può essere dovuto al sistema di alimentazione di questi pesci e all'età dei soggetti esaminati, ma sono necessarie ulteriori indagini.