

Progetto RABoLA – Strategie sostenibili per ridurre l’impiego di antibiotici nell’allevamento delle bovine da latte

Relazione primo anno di attività

WP 1 Impiego di *Aloe arborescens* nel periodo della messa in asciutta e nel periparto

Obiettivi specifici: verificare l’efficacia della somministrazione di *Aloe arborescens* alle bovine nel periodo della messa in asciutta e nei primissimi giorni dopo il parto, nel garantire un miglior stato di salute correlato a migliori prestazioni produttive delle bovine e ad una maggiore resistenza alle malattie durante la lattazione.

Attività svolta da partner UCSC.

Acquisizione delle piante di *Aloe arborescens* presso la ditta “Dester Garden” (Desenzano – BS). Le piante usate avevano tutte le stesse caratteristiche (età, modalità e luogo di coltivazione). Le piante sono state omogenate e stoccate immediatamente a -20°C sino al loro impiego (tal quale o previa liofilizzazione).

Individuazione del miglior sistema di liofilizzazione. Sono stati confrontati tre diversi tipi di liofilizzazione ed è stato scelto quello che ha determinato la minor degradazione dei principi attivi, (Figura 1), dopo aver analizzato sia il liofilizzato che l’omogenato.



È stata presentata la documentazione al Ministero per l’autorizzazione alla sperimentazione: fase preliminare (somministrazione unica di aloe omogenato o liofilizzato) e trattamenti nel periodo pre-post messa in asciutta.

- Contemporaneamente è stato eseguito uno studio su bovine da latte, a differente livello produttivo alla loro messa in asciutta, per valutare le principali variazioni a livello metabolico ed infiammatorio che si verificano in questa fase e comprendere l’eventuale interferenza sul più noto periodo di transizione (Mezzetti, M.; Minuti, A.; Piccioli-Cappelli, F.; Trevisi, E. 2019. Innate immune response and metabolic

changes at dry-off in high yield dairy cows. Ital. J. Anim. Sci. 19(1):51–65)

- L’autorizzazione ministeriale è stata rilasciata solo per la prova preliminare, ovvero sia la comparazione tra omogenato e liofilizzato di aloe. Si è pertanto proceduto a svolgere il seguente confronto tra:

- 200 mL di aloe omogenato;
- 10 g di aloe liofilizzato (la sostanza secca dell’omogenato utilizzato era pari al 5%).

- La prova è stata eseguita presso lo stabulario dell’Università Cattolica del S. Cuore (CERZOO), su 8 bovine: 4 in fase avanzata di lattazione e 4 in fase di asciutta, ospitate in box adiacenti, secondo un modello sperimentale a quadrato latino, 4 bovine (2 in lattazione e 2 in asciutta) hanno ricevuto in dose unica per bocca aloe omogenato e 4 bovine (2 in lattazione e 2 in asciutta) hanno ricevuto aloe liofilizzata (l’aloe liofilizzata come bolo e l’omogenato con bottiglia). Campioni ematici sono stati prelevati a 0, 2, 4, 6, 10, 24 ore dalla somministrazione per monitorare il contenuto di albina secondo la metodica presentata in Bani et al. (2016). Dopo 14 giorni la prova è stata ripetuta a gruppi invertiti.

- Sono in corso le analisi su plasma e aloe omogenata e liofilizzata per la determinazione del contenuto in aloina. Con i risultati ottenuti si inoltrerà al Ministero la richiesta per il rilascio dell'autorizzazione a svolgere la sperimentazione sulla messa in asciutta

Attualmente si stanno predisponendo i protocolli sperimentali per testare la messa in asciutta selettiva con uso o meno di aloe, in una stalla sperimentale (CERZOO) e in una stalla commerciale, dove verrà utilizzato un protocollo semplificato.

Analisi microbiologica di latte e valutazione della presenza di microrganismi antibiotico-resistenti

Attività svolta da CNR ISPA

Nel corso della prima parte di questo progetto sono stati analizzati 20 campioni di latte di singole bovine determinando la carica batterica totale (CBS) ed il contenuto di Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, batteri psicotrofi, batteri lattici ed enterococchi.

E' noto in letteratura che ceppi di *E. coli* e di enterococchi possono facilmente presentare resistenza ad un ampio numero di antibiotici in conseguenza di una trasmissione orizzontale di materiale genico; per questo motivo abbiamo determinato la presenza di ceppi resistenti alla Penicillina G e Neomicina, principi attivi contenuti nel prodotto utilizzato per il trattamento endomammario durante il periodo dell'asciutta (Penicillina/Neomicina 2:1).

La presenza di ceppi antibiotico-resistenti è stata verificata aggiungendo Penicillina G e Neomicina ai terreni colturali utilizzati per la determinazione di *E. coli* (SENECA agar) ed enterococchi (KAA agar) utilizzando i *cut-off* riportati da Pillar et al. (2014) per quanto riguarda i batteri Gram negativi (Penicillina/Neomicina: 32/16 ug/mL) e Gram positivi (16/8 ug/mL).

Campioni	CBS	Enterobacteriaceae	<i>E. coli</i>	Batteri psicotrofi	Enterococchi	Batteri lattici
RAL 15-16-17-18	2.100	< 100	< 10	100	< 100	100
RAL 87-88-89-90	200	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL 129-130-131-132	200	< 100	< 10	< 100	200	< 100
RAL 1-2-3-4	1.400	< 100	< 10	< 100	< 100	300
RAL 5-6-7-8	140	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL 106-107-108-109	360	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL 36-37-38-39	1.100	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL 47-48-49-50	320	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL 59-60-61-62	1.360	< 100	10	< 100	< 100	< 100
RAL 91-92-93-94	40	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL 133-134-135-136	60	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL 23-24-25-26	40	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL27-28-29-30	40	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL 137-138-139-140	2.200	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL 51-52-53-54	120	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL 63-64-65-66	2.900	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL 141-142-143-144	60	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL 96-97-98-99	160	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100

RAL 110-111-112-113	830	250	< 10	< 100	< 100	< 100
RAL 114-115-116-117	560	< 100	< 10	< 100	< 100	< 100

Tabella 1 – Carica batterica totale (CBS), Enterobacteriaceae, *E. coli*, batteri psicotrofi enterococchi e batteri lattici nei campioni di latte delle singole bovine (dati espressi in ufc/mL).

Le analisi microbiologiche hanno evidenziato valori di carica batterica totale compresi tra 40 e 2.900 ufc/mL, la presenza di *E. coli* e di batteri psicotrofi in un solo campione con valore rispettivamente pari a 10 e 100 ufc/mL (Tab. 1). Enterobacteriaceae, enterococchi e batteri lattici presentavano cariche <100 ufc/mL ad eccezione dei campioni RAL 110-111-112-113 (Enterobacteriaceae: 250 ufc/mL), RAL 1-2-3-4 (batteri lattici 300 ufc/mL) e RAL 129-130-131-132 (enterococchi: 200 ufc/mL).

Campioni	<i>E. coli</i> *	Enterococchi*
RAL 15-16-17-18	< 10	< 10
RAL 87-88-89-90	< 10	< 10
RAL 129-130-131-132	< 10	< 10
RAL 1-2-3-4	< 10	< 10
RAL 5-6-7-8	< 10	< 10
RAL 106-107-108-109	< 10	< 10
RAL 36-37-38-39	< 10	< 10
RAL 47-48-49-50	< 10	< 10
RAL 59-60-61-62	< 10	< 10
RAL 91-92-93-94	< 10	< 10
RAL 133-134-135-136	< 10	< 10
RAL 23-24-25-26	< 10	< 10
RAL27-28-29-30	< 10	< 10
RAL 137-138-139-140	< 10	< 10
RAL 51-52-53-54	< 10	< 10
RAL 63-64-65-66	< 10	< 10
RAL 141-142-143-144	< 10	< 10
RAL 96-97-98-99	< 10	< 10
RAL 110-111-112-113	< 10	< 10
RAL 114-115-116-117	< 10	< 10

Tabella 2 – *E. coli* ed enterococchi resistenti a Penicillina G e Neomicina nei campioni di latte delle singole bovine (dati espressi in ufc/mL). *: Conte batteriche effettuate in SENECA agar e KAA agar addizionati di antibiotici (Pillar et al. 2014).

Per quanto riguarda i batteri antibiotico-resistenti (*E. coli* ed enterococchi), in tutti i campioni di latte analizzati non sono stati riscontrati stipiti resistenti a Penicillina e Neomicina (Tab. 2).

Analisi metagenomica di liquido ruminale, latte e feci

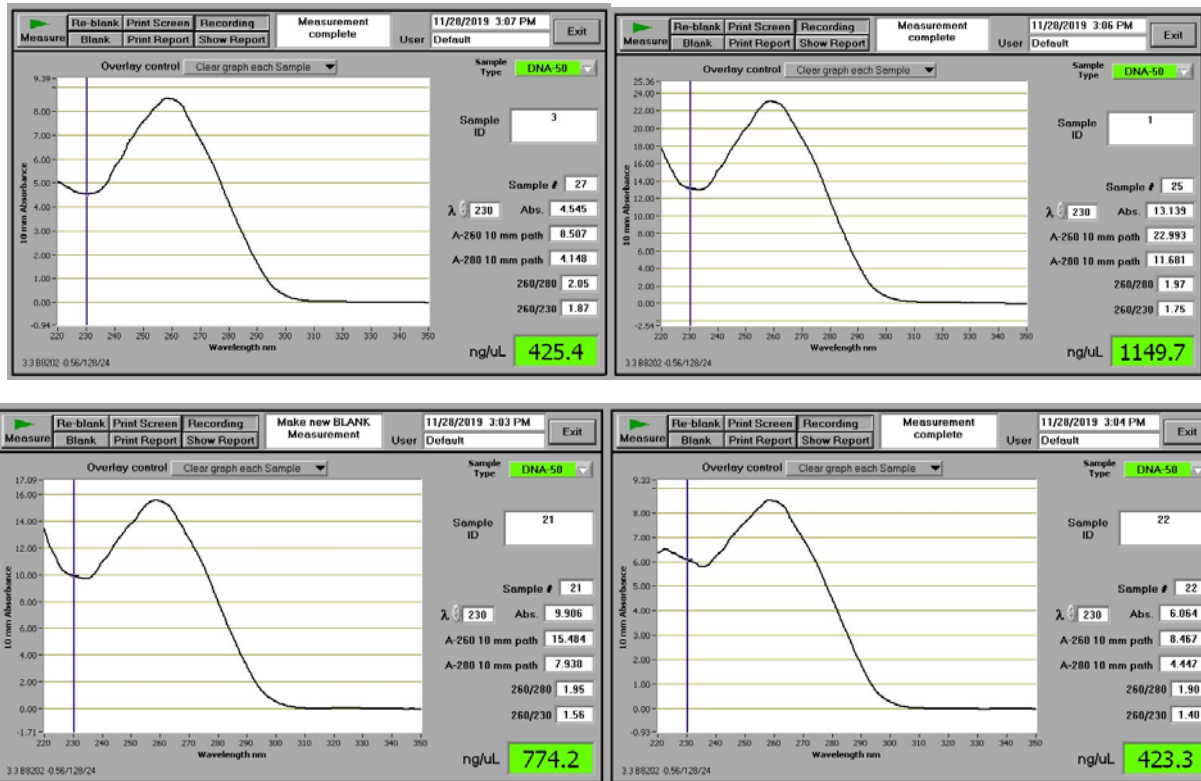
Attività eseguita da CNR IBBA Lodi

In questa fase del progetto è ancora in corso la raccolta dei campioni di liquido ruminale, latte e feci, coordinata dall'Università Cattolica di Piacenza. Al momento, 60 campioni di liquido ruminale sono stati raccolti e stoccati a -80°C; sono stati inoltre stoccati a -20°C, presso l'IBBA-CNR di Lodi, 168 campioni di latte prelevato da singolo quarto, e un centinaio di campioni di feci.

Rumine: sono stati liofilizzati 40 campioni di fluido ruminale e, utilizzando il protocollo pubblicato da Yu and Morrison (2004) è stato estratto il DNA da 24 campioni partendo da 250 mg di materiale liofilizzato. Al termine dell'estrazione è stata valutata la qualità e quantità del DNA estratto mediante strumentazione NanoDrop ND-1000.

Nella seguente tabella e nelle immagini sono riportati i risultati ottenuti nell'analisi con Nanodrop ND-100:

Sample ID	ng/ul	260/280	260/230
1	1094.8	1.97	1.76
2	94.6	1.91	0.93
3	425.3	2.05	1.87
4	1090.9	1.99	1.81
5	1140.2	1.94	1.79
6	1149.6	1.97	1.75
7	1144.5	1.95	1.80
8	346.3	1.89	1.14
9	796.5	1.94	1.60
10	674.0	1.97	1.59
11	434.6	1.93	1.36
12	875.9	1.92	1.43
13	312.4	1.96	1.12
14	392.8	1.90	1.24
15	523.9	1.94	1.51
16	401.3	1.97	1.17
17	648.3	1.98	1.75
18	252.0	1.88	0.77
19	410.2	1.91	1.23
20	234.4	1.92	0.81
21	774.2	1.95	1.56
22	423.3	1.90	1.40
23	162.2	1.94	0.79
24	328.4	1.91	1.18



Si sta procedendo con la liofilizzazione e l'estrazione del DNA dei restanti campioni. Il DNA estratto sarà successivamente utilizzato per la preparazione delle librerie per il sequenziamento su piattaforma Miseq.

Latte: utilizzando il protocollo di estrazione pubblicato in letteratura (Cremonesi et al., 2006), partendo da 5 ml di campione, dopo pre-trattamento è stato estratto il DNA da 40 campioni di latte; successivamente è stata verificata la qualità e quantità del materiale estratto mediante strumentazione NanoDrop ND-1000.

vacca	AD	PD	AS	PS	data prelievo	AD ng/ul	PD ng/ul	AS ng/ul	PS ng/ul
99	1	2	3	4	06/06/2019	11.84	10.44	4.31	10.48
113	5	6	7	8	06/06/2019	9.77	9.18	4.85	9.41
65	15	16	17	18	24/06/2019	6.45	11.75	2.64	12.43
158	23	24	25	26	01/07/2019	3.24	5.88	3.36	4.31
159	27	28	29	30	01/07/2019	3.70	5.59	2.99	21.9
137	36	37	38	39	08/07/2019	11.4	37.1	11.4	9.9
146	47	48	49	50	24/07/2019	9.3	22.4	10.5	5.9
191	51	52	53	54	24/07/2019	11.4	7.8	7.3	18.9
78	87	88	89	90	05/08/2019	12.8	9.4	5.9	2.5
147	91	92	93	94	05/08/2019	13.4	6.7	8.5	9.9

Si sta procedendo con l'estrazione del DNA dei restanti campioni, stoccati a -20°C. Il DNA estratto sarà successivamente utilizzato per la preparazione delle librerie per il sequenziamento su piattaforma Miseq.

Feci: al termine della raccolta di tutti i campioni prevista per la fine del prossimo febbraio 2020, si identificheranno i time-point "informativi", in relazione anche alle analisi microbiologiche classiche, da cui estrarre il DNA per la preparazione delle librerie per il sequenziamento Miseq.

WP 2 Utilizzo di un prodotto sperimentale a base di batteriocine nel *pre-* e nel *post-dipping*

Obiettivi specifici: verificare l'efficacia dei prodotti per la preparazione della mammella alla mungitura e la disinfezione dei capezzoli al termine della mungitura, nel garantire il mantenimento di una mammella sana, con bassa conta delle cellule somatiche.

Uno degli obiettivi del progetto RABoLA è quello di valutare, durante la fase di lattazione, l'impiego di *pre-* e *post-dipping* a base di una batteriocina prodotta dal ceppo di *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ITEM 18332 (FT27), appartenente alla collezione dell'Istituto di Scienze delle Produzioni alimentari (ISPA CNR) di Milano.

Durante il primo anno di lavoro, il WP2 ha visto il coinvolgimento di UNIMI e CNR ISPA nelle seguenti attività:

1. Valutazione della sensibilità di questo microrganismo a nove antibiotici diversi (Ampicillina, Vancomicina, Gentamicina, Kanamicina, Streptomina, Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclina e Cloramfenicolo) come previsto dall'European Food Safety Authority (EFSA, 2009). La determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) degli antibiotici è stata valutata mediante tecnica E-Test considerando i cut-off previsti dall'EFSA per quanto riguarda la specie *Lactococcus lactis* (EFSA, 2009).

Antibiotico	MIC EFSA (mg/L)	MIC E-test (µg/mL)
Ampicillina	2	0,5
Vancomicina	4	0,12
Gentamicina	32	8
Kanamicina	64	12
Streptomina	32	32
Eritromicina	1	0,25
Clindamicina	1	0,25
Tetraciclinae	4	0,03
Cloramfenicolo	8	3

Tab. 3 Minima Concentrazione Inibente (MIC) dei nove antibiotici considerati nei confronti di

Lc. lactis subsp. *cremoris* ITEM 18332 (FT27).

Come si osserva in Tab. 3, il ceppo ITEM 18332 (FT27) è risultato sensibile a tutti e nove gli antibiotici testati, mostrando valori di MIC inferiori ai cut-off previsti dall'EFSA (2009).

Una volta accertata l'idoneità all'utilizzo del ceppo ITEM 18332 (FT27) in ambito veterinario/zootecnico, si è proceduto alla verifica della sua attività antimicrobica nei confronti di *Staphylococcus aureus* ATCC 19095 (105 UFC/mL) mediante il metodo standardizzato della diffusione in agar (Morandi et al., 2019). Il ceppo *Lc. lactis* ITEM 18332 (FT27) ha confermato di possedere una forte attività inibente nei confronti di *S. aureus* ATCC 19095 dovuta alla produzione di batteriocina.

2. Preparazione di coltura fresca da destinare alla produzione di *pre-* e *post-dipping* da utilizzare in allevamento
3. messa a punto della produzione della batteriocina per l'allestimento di grandi quantità di entrambe le formulazioni sperimentali (*pre-* e *post-dipping*)
4. preparazione di un prodotto filmante da utilizzare per il *post-dipping*
5. scelta delle due stalle commerciali in cui effettuare la prova in campo
6. sviluppo dei protocolli di analisi proteomica del ceppo di *L. lactis* subsp. *cremoris*

Per il punto 1, è stato necessario effettuare alcune prove utilizzando un apposito impianto, presso l'azienda Biorama S.a.S.

Si è dovuto dapprima verificare le condizioni di sterilità del prodotto, quindi la sua attività. A tale scopo, è stata testata la Minima Concentrazione Inibente (MIC) della soluzione contenente la batteriocina, verso i principali batteri mastitogeni (*S. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae*, *E. faecalis*, *E. coli*), ed i risultati sono stati comparati con quelli pubblicati in precedenza.

Il punto 2 ha visto l'attiva collaborazione della ditta Allegrini, fornitrice delle basi per il *pre-* e il *post-dipping*. Il prodotto *post-dipping* ha necessità di avere una certa viscosità, in quanto viene applicato sui capezzoli al termine della mungitura e deve effettuare la sua azione disinfettante almeno per la successiva ora: la diluizione della base commerciale con la soluzione contenente la batteriocina rendeva il prodotto finale troppo liquido. È stato quindi necessario aggiungere filmanti per ottenere la densità desiderata.

Per il punto 3, la scelta delle stalle commerciali in cui effettuare la sperimentazione non è stata semplice, essendo necessarie due mandrie di almeno 130 vacche in lattazione e con una gestione della mungitura affidabile, dovendo applicare su metà mandria i prodotti in uso per il *pre-* e *post-dipping*, e sull'altra metà le formulazioni sperimentali. Le due stalle sono situate rispettivamente in provincia di Monza-Brianza e Lodi.

Per il punto 4, sono in fase di sviluppo e ottimizzazione i metodi per l'analisi delle proteine del microrganismo. In particolare si è lavorato allo sviluppo di metodi per l'analisi del secretoma al fine di individuare la quantità di batteriocina secreta e la frazione attiva presente nel lisato totale e nel surnatante della coltura batterica.

WP3 Individuazione di composti naturali efficaci nei confronti di *Prototheca* spp.

Obiettivi specifici: ricerca di composti inibenti *Prototheca* spp. e messa a punto di un saggio diagnostico specifico

L'obiettivo previsto durante il primo anno per il WP3 era la realizzazione del Task 1: messa a punto di saggi di suscettibilità in vitro per *P. zoppii*, gen 2 e *P. blaschkeae* adatti alle diverse tipologie di sostanze/estratti.

Questo passaggio è infatti indispensabile per allestire un sistema di screening rapido di molecole o estratti naturali ad attività alghicida/fitotossica. Il test deve essere infatti ottimizzato sia in base al tipo di sostanza da testare (es. idrofiliche/idrofobiche), sia al tipo di microorganismo: nel nostro caso le due specie patogene di *Prototheca*, *P. zopfii gen2* (da qui in poi *P. bovis* sp. nov., in base alla nuova classificazione) e *P. blaschkeae*. Numerose sono infatti le variabili che possono influenzare gli esiti di un saggio di suscettibilità ed è noto dalla letteratura che diversi tipi di saggi non sempre danno risultati comparabili. Per quanto riguarda il patogeno *Prototheca*, non esiste alcun saggio standardizzato, né alcun criterio interpretativo. In letteratura è spesso riportato l'utilizzo di protocolli utilizzati per la valutazione della suscettibilità di lieviti patogeni (*Candida* spp) agli antifungini, organismi simili nell'aspetto a *Prototheca*, ma molto diversi dal punto di vista biochimico-fisiologico. Su *Prototheca* sono stati effettuati test di suscettibilità a numerosi antibiotici e antifungini mediante saggi di microdiluzione o mediante E-test con kit commerciali. Occasionalmente sono stati utilizzati altri tipi di saggi. I risultati ottenuti concordano nel riscontrare una elevata resistenza di *Prototheca* a quasi tutti i composti antibatterici ed antifungini testati, con l'eccezione di amfotericina B e nistatina. I dati quantitativi risultano però estremamente variabili tra le diverse pubblicazioni. Alcuni saggi di suscettibilità ad olii essenziali riportati in letteratura hanno dato risposte quantitativamente ancora più variabili (2 ordini di grandezza!) tra i diversi autori, a seconda del protocollo sperimentale usato, non sempre chiaramente descritto, a dimostrazione dell'importanza dell'ottimizzazione e standardizzazione del metodo per poter effettuare dei confronti. Abbiamo pertanto ritenuto assolutamente necessario un approfondimento che permettesse di ottenere dati replicabili e comparabili.

Messa a punto del saggio per lo screening preliminare

Per l'ottimizzazione di un test di screening, sono state in primo luogo stabilite le condizioni ottimali di crescita per le due specie di *Prototheca* in terreno Sabouraud-glucosio, che si sono rivelate diverse: infatti mentre *P. bovis* appare termotollerante, con crescita ottimale tra i 30 e i 37°C *P. blaschkeae* predilige temperature inferiori (25-30°C) mentre cresce molto lentamente a 37°C. A 30°C, la velocità di crescita in terreno liquido è simile per le due specie e i saggi possono essere così condotti in parallelo. Analogamente, in terreno solido si osserva una crescita paragonabile delle due specie a 30°C. Questa temperatura è quindi stata scelta per i saggi. Il tempo per la valutazione dell'inibizione della crescita è stato stabilito a 48 h.

Per la messa a punto sono state considerate le due categorie di sostanze che si intendono testare: molecole pure, ad attività citocida nota (erbicidi, alghicidi, antiprotozoari) ed estratti naturali (oli essenziali, estratti vegetali grezzi o variamente purificati). Per le prime abbiamo utilizzato come composto di riferimento un agente antimicrotubulare ad attività erbicida, la dinitramina (DAM), che si era rivelato in grado di inibire la crescita di *Prototheca* in un saggio preliminare in coltura liquida (nostri dati).

Per i secondi, abbiamo utilizzato come riferimento l'olio essenziale di cannella (*Cinnamomum zeylanicum*), la cui attività antibatterica è nota, e già riportato in letteratura come inibente la crescita di *Prototheca*. Sono stati presi in esame i principali saggi di suscettibilità in vitro comunemente utilizzati per i microrganismi: test di diffusione su piastra (Kirby-Bauer), test di microdiluzione in terreno liquido e di diluizione in agar. Nonostante il test di microdiluzione su piastra sia il maggiormente impiegato a causa della sua semplicità e dei ridotti volumi impiegati, diverse prove da noi condotte hanno evidenziato numerose criticità che ne riducono l'efficacia. *Prototheca* ha grosse cellule dotate di una parete idrofobica, che tendono a sedimentare sul fondo, a formare

aggregati o una pellicola sulla sua superficie liquida. Tendono inoltre ad aderire alla plastica di puntali e pipette. Ne risultano difficoltà di diluizione e nel conteggio delle cellule tali da rendere difficile anche l'ottenimento di diluizioni seriali affidabili. La densità ottica (OD600) non risulta un parametro attendibile per misurare la crescita cellulare a causa della dimensione variabile delle cellule e delle differenze di diffrazione della luce della loro parete cellulare. Per questo motivo, dopo ripetuti tentativi, abbiamo escluso questo tipo di saggio, preferendo sviluppare quelli in fase solida, su terreno agarizzato, che danno invece risultati maggiormente riproducibili e facilmente valutabili visivamente.

Screening di sostanze pure

Per uno screening preliminare si è messo a punto un saggio di **diffusione su piastra** (disk-diffusion). La sospensione cellulare, ottenuta da 4-5 colonie cresciute su terreno agarizzato, viene diluita in 4 mL di top-agar (Saboraud + agar 0,7%), che vengono stratificati su una piastra di terreno Saboraud-destrosio agarizzato. È stata in primo luogo ottimizzata la concentrazione di cellule da piastrare per ottenere una crescita confluyente in 48 ore a 30°C. La densità di inoculo ottimale è risultata pari a 1×10^6 /mL, contate all'emocitometro. La concentrazione di composto da utilizzare in un simile saggio non è prevedibile a priori in quanto dipende dalla velocità di diffusione nel terreno agarizzato, a sua volta dipendente principalmente dalla idrofilicità e dalla dimensione delle molecole. Si è pertanto deciso di preparare una soluzione stock di 20 mg/mL di ciascuna sostanza da testare, in tampone fosfato se idrosolubile o in dimetilsolfossido (DMSO) se idrofobica, e di utilizzare per questo tipo di saggio concentrazioni elevate, pari a 100 µg/dischetto, in modo da ridurre l'evenienza di un falso negativo. Abbiamo verificato che il DMSO in questa condizione non ha alcun effetto negativo sulla crescita di *Prototheca*, al contrario dell'etanolo che inibisce la crescita anche a basse concentrazioni (<5%).

Il principale vantaggio di questo saggio è dato dal fatto di essere semplice e dalla possibilità di testare contemporaneamente più molecole diverse sulla stessa piastra. L'informazione che si ottiene è esclusivamente qualitativa e permette una prima selezione, tuttavia non può essere utilizzata come unico discriminante, in particolar modo per molecole idrofobiche.

L'assenza di aloni di inibizione non permette tuttavia di escludere in modo assoluto un effetto. Oltre che dalla diffusione nel terreno, questo saggio può essere influenzato anche da altri fattori, come il meccanismo di inibizione e il tempo necessario perché questa si manifesti.

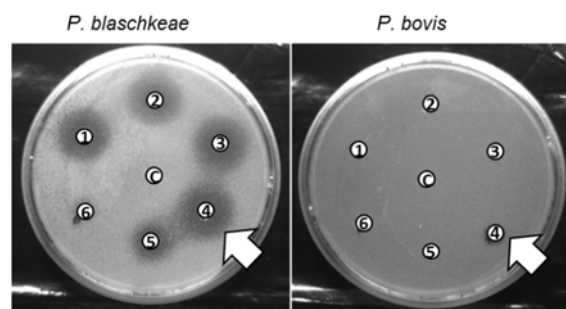


Figura 1 Messa a punto del test di diffusione su disco. Diluizioni seriali dinitrammina da 32 a 1 microgrammo/disco

Ne abbiamo avuto un esempio proprio con la dinitramina, la nostra sostanza di riferimento depositata su dischetti a diverse concentrazioni. Come mostrato in Figura 1, l'effetto di inibizione appare molto evidente su *P. blaschkeae* già alla concentrazione di 4 µg/disco (freccia), mentre nessuna inibizione

è evidente su *P. bovis*, anche a concentrazioni elevate (32 µg /dischetto). Quest'ultima risulta però sensibile in un saggio di diluizione in agar, sebbene a concentrazioni più elevate rispetto a *P. blaschkeae* (Figura 2).

E' possibile che in questo caso l'effetto tossico, a causa della lenta diffusione della dinitramina in agar e/o della necessità di raggiungere una concentrazione-soglia in cellula, si manifesti dopo che le cellule hanno già raggiunto una crescita confluyente sulla piastra.

Accanto a questo saggio si è deciso quindi effettuato un saggio mediante spot su agar, su piastre contenenti una concentrazione elevata (20 mg/L) di ciascun inibitore disciolto in fase di preparazione del terreno agarizzato.

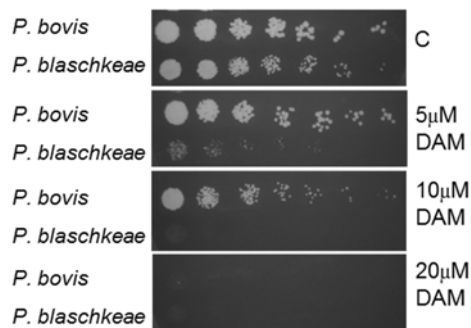


Figura 2- Spot agar assay. Confronto della suscettibilità alla dinitramina di *P. bovis* e *P. blaschkeae*

Oltre ad ottenere una informazione complementare rispetto al precedente saggio, questo permette di confrontare sulla stessa piastra più ceppi di ciascuna specie. Saranno saggiati tutti i ceppi eventualmente isolati durante la sperimentazione in stalla dei WP1 e WP2. La sospensione cellulare viene diluita a una concentrazione di 5×10^5 cell/mL, dalla quale vengono ottenute diluizioni seriali 1:3, di ciascuna delle quali vengono depositi su piastra 10 microlitri (Figura 2). La crescita viene valutata a 48h dall'inoculo.

Screening preliminare di estratti vegetali o olii essenziali

L'ottimizzazione del saggio per lo screening degli olii ed estratti vegetali grezzi o parzialmente purificati è ancora in corso. Per gli olii essenziali la diffusione da dischetto pone ulteriori problematiche dovute sia alla scarsa diffusione di sostanze lipofile nel mezzo acquoso della piastra, sia al fatto che molte delle componenti attive degli olii essenziali, quali i terpeni, sono volatili. E' inoltre necessario diluire l'olio in un solvente organico o in un tensioattivo per poterlo poi diluire nel mezzo acquoso. Si stanno quindi studiando diverse modalità di diluizione sull'olio essenziale di cannella, per identificare la condizione ottimale.

Si sta inoltre mettendo a punto un saggio di diluizione in agar che possa essere utilizzato in mcropiastra, che dovrebbe ovviare alle problematiche incontrate coi saggi effettuati su *Prototheca* in fase liquida, coniugando i vantaggi della microdiluizione in terreno liquido (utilizzo di volumi ridotti di reagenti e delle sostanze da testare) e dell'agar dilution (facile valutazione della crescita cellulare (maggiore solubilizzazione di sostanze lipofile, minore perdita dei composti volatili). Se efficace, questo saggio sarà anche utilizzato per gli estratti vegetali grezzi e potrebbe anche essere inserito nello screening delle sostanze pure al posto dell'analogo saggio su piastra.

Determinazione della MIC e IC50 mediante agar dilution

A seguito dello screening preliminare, le sostanze che daranno risultati positivi saranno valutate in termini quantitativi per determinarne la minima concentrazione inibente (MIC) e la concentrazione che riduce la crescita del 50% delle cellule (IC_{50}). Un metodo molto semplice e rapido che abbiamo sviluppato per valutare i parametri quantitativi mediante una curva dose-risposta è quello di effettuare un **saggio di diluizione in agar**, su piastre contenenti diluizioni seriali della sostanza da testare, nel quale la sospensione cellulare, anziché essere deposta sulla piastra, viene distribuita in modo da dare un numero contabile di colonie (30-300/piastra). Riportando in grafico la percentuale di inibizione (% CFU osservate alle 48 ore rispetto al controllo) in funzione della concentrazione è possibile estrapolare dal grafico il valore di MIC e IC_{50} (Figura3).

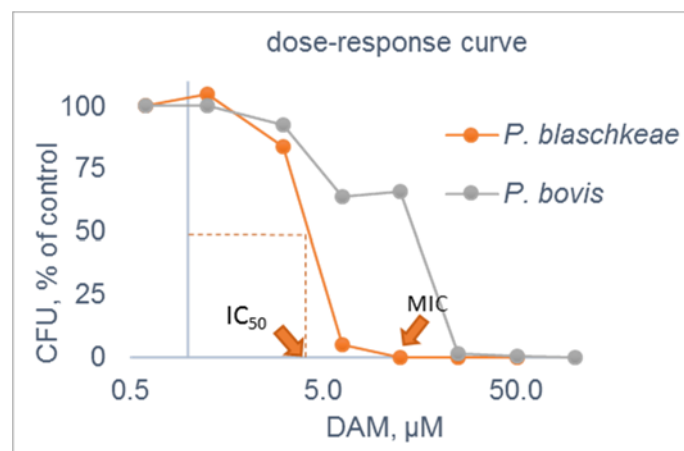


Figura 3 Grafico dose-risposta dell'effetto della dinitramina su Prototheca, ottenuto mediante agar dilution

Selezione del panel di composti da analizzare

Preliminare alla realizzazione del Task 2, relativo allo screening, è fondamentale la selezione delle molecole/estratti naturali che si vogliono testare. A questo scopo è stata effettuato un approfondito lo studio della letteratura recente (dal 2000) nel campo degli allelochimici di origine vegetale con dimostrata attività algicida e fitotossica, degli erbicidi, con preferenza per gli antimitotici, dei farmaci antiprotozoari con attività fitotossica e di estratti vegetali dotati di attività antimicrobica. Sono stati attualmente selezionati una trentina di composti dei quali si sta procedendo all'acquisto, ma si prevede di ottenere un panel di un centinaio di sostanze, disponibili commercialmente o reperibili attraverso la rete scientifica, da utilizzare per lo screening preliminare. Sulla base di questo saranno poi effettuati altri saggi più dettagliati (quantitativi) sui composti che saranno risultati positivi, ed eventualmente selezionato un secondo panel di sostanze a questi più affini e di potenziale interesse.

Conclusione

Il lavoro del Task 1 si è svolto senza particolari imprevisti e sarà concluso nei tempi previsti. La procedura di screening per le sostanze purificate è stata definita per le due specie patogene di Prototheca. Si sta ultimando la messa a punto del saggio di olii essenziali ed altri estratti naturali. Si sta inoltre procedendo all'acquisto dei composti da testare e a reperimento di sostanze/estratti naturali.

Personale in formazione

CNR IBBA: Una Borsa di studio di 12 mesi è stata assegnata alla Dott.ssa Serena Cecilia Pagliara che ha preso servizio il 2 settembre 2019 e sta completando la messa a punto dei protocolli di sistema di screening e collaborando alla ricerca bibliografia delle sostanze di interesse.

CNR ISPA: E' in pubblicazione il bando per un assegno di ricerca

UNIMI: Una Borsa di studio di 24 mesi è stata assegnata alla Dott.ssa Alessandra Gazzola che ha preso servizio il 1 novembre 2019 e si sta occupando dello sviluppo dei prodotti pre e post-dipping e seguirà la sperimentazione nei due allevamenti.

Comunicazione

Azioni

E' stata ideata l'immagine coordinata del progetto al fine di identificarlo in maniera chiara, immediata e univoca in tutte le sue azioni.



Si è inoltre proseguito con i seguenti strumenti di comunicazione e disseminazione finalizzati al raggiungimento degli obiettivi del piano di comunicazione:

Eventi

E' stato svolto un convegno di presentazione del progetto il 4 dicembre 2019 a Lodi di cui si allega la locandina e che al quale hanno presenziato oltre 70 partecipanti e uno finale di disseminazione dei risultati.

Pubblicazioni su riviste specializzate

E' stato pubblicato un primo articolo scientifico su rivista con IF Mezzetti, M.; Minuti, A.; Piccioli-Cappelli, F.; Trevisi, E. 2019. Innate immune response and metabolic changes at dry-off in high yield dairy cows. *Ital. J. Anim. Sci.* 19(1):51-65

Parte dei risultati ottenuti sono entrati a far parte di una pubblicazione in collaborazione con ISPA-MI, accettato per la pubblicazione: Morello L, Tirolì T, Aretino F, Morandi S, Breviaro D. *In vitro* Susceptibility

of *Prototheca spp.* to Antimicrotubular Agents: Preliminary Results, Perspectives and Proposal for a Screening Method. *Antimicrob Agents Chemother.*

Sono inoltre in stesura due articoli che avranno come focus le tematiche affrontate dal progetto e il progetto stesso.

Social network

Per avvicinare il grande pubblico al progetto verranno create le pagine ufficiali su Facebook, Twitter, Instagram, You Tube. Qui verranno pubblicati, con i dovuti adattamenti, gli articoli, i comunicati e le news del progetto.

Monitoraggio dei risultati di comunicazione

Al fine di valutare l'effettiva capacità del presente PdC di produrre gli effetti per cui è stato ideato, si predisporranno i seguenti metodi di verifica e di misurazione dei risultati raggiunti: rassegne stampa; monitoraggio accessi ai siti web; indice di posizionamento dei contenuti pubblicati sui motori di ricerca; numero di fan/follower, commenti, visualizzazioni, condivisioni e iscrizioni su blog e social network; rilevazione delle presenze agli eventi organizzati; questionario di valutazione della soddisfazione per i partecipanti ai vari eventi pubblici. Questi strumenti hanno quindi lo scopo di permettere non solo il monitoraggio delle attività di comunicazione, ma anche una oggettiva valutazione dell'efficacia delle stesse.