



TORINO - SALA CONFERENZE IZS PLV
MERCOLEDÌ 22 GIUGNO 2016

**Presentazione risultati 2015
dei progetti di Ricerca Corrente
finanziati dal Ministero della Salute**

PREFAZIONE

Con la sua mission di attività di ricerca, l'Istituto approfondisce quotidianamente le conoscenze scientifiche, in collaborazione con i diversi attori della Sanità Pubblica Veterinaria e del Servizio Sanitario Nazionale, a supporto delle realtà produttive zootecniche del territorio di competenza e a tutela della salute dei cittadini.

Il convegno si è proposto di condividere e discutere i progetti di Ricerca Corrente, finanziati dal Ministero della Salute, e conclusi nell'anno 2015, al fine di rendere pubbliche le nuove conoscenze su diverse problematiche .

La giornata ha presentato i risultati più rilevanti e originali, spaziando su tutte le aree, tradizionali e nuove, di competenza dell'Istituto.

SESSIONE : COMUNICAZIONI ORALI

I RATTI E L'AMIANTO: INDIVIDUAZIONE DI FONTI DI ESPOSIZIONE DI ASBESTO UTILIZZANDO LA POPOLAZIONE MURINA COME SENTINELLA

Ingravalle F¹, D'Errico V¹, Ceballos L¹, Mirabelli D², Belluso E³, Capella S³, Dondo A¹, Giorgi I¹, Di Blasio A¹, Bozzetta E¹, Meister S¹, Vizio C², Fraccaro E², Ardizzone M⁴, Ru G¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² Azienda Ospedaliero-Universitaria San Giovanni Battista di Torino SCDU Epidemiologia Tumori 1; ³ Università degli Studi di Torino Dipartimento di Scienze della Terra; ⁴ EFSA

Key words: amianto, animali sentinella, fonti latenti

SINTESI

Il progetto ha voluto monitorare, attraverso un "sistema sentinella animale", la presenza di inquinanti ambientali ascrivibili a minerali classificati amianto e altri fasi inorganiche sul territorio urbano di Casale Monferrato per individuare potenziali fonti di contaminazione ancora ignote (hot-spot).

L'indagine è stata mirata alla ricerca, nel polmone di ratti, di fibre di amianto tramite microscopia elettronica in scansione con annesso microanalizzatore chimico ed istopatologia. Nel periodo di campionamento (primavera 2013 - primavera 2015), sono stati catturati complessivamente 40 ratti provenienti da 15 punti di cattura (siti). Le analisi hanno messo in evidenza la presenza di diversi tipi di amianto (crisotilo, tremolite di amianto, tremolite/actinolite di amianto, amosite) le cui concentrazioni sono risultate differenti tra i diversi siti di campionamento. L'analisi statistica ha consentito di individuare un sito quale possibile hot-spot di contaminazione da amianto.

INTRODUZIONE

Il termine amianto indica, come definito dalla normativa italiana nell'art23 del D.lgs 277/1991 e s.m.i., un gruppo di sei minerali caratterizzati da aspetto fibroso e dimensioni regolamentate, di cui cinque appartenenti alla famiglia degli anfibioli (crocidolite, grunerite o amosite, antofillite, tremolite e actinolite) ed una a quella del serpentino (crisotilo). Gli amianti che ebbero maggiore impiego in passato furono il crisotilo, la crocidolite ed l'amosite, utilizzati soprattutto nel campo dell'edilizia per la produzione del cemento-amianto (Eternit®) grazie alle loro proprietà di legante e basso peso specifico. L'amianto fu largamente impiegato anche in altri settori per le sue peculiari proprietà ignifughe, di isolante termico, acustico, elettrico, di resistenza agli acidi ed agli alcali, alla trazione e per la loro flessibilità.

L'abito fibroso è altresì responsabile di effetti nocivi sulla salute umana, in quanto tali fibre, quando sono aerodisperse e respirate, tendono a concentrarsi nei bronchi, negli alveoli polmonari e nella pleura, provocando danni irreversibili ai tessuti epiteliali e possono essere causa di gravi patologie a decorso infausto, quali il carcinoma polmonare e il mesotelioma maligno.

Il presente progetto ha voluto monitorare, attraverso un "sistema sentinella animale", la presenza di inquinanti ambientali ascrivibili a minerali classificati amianto e altri fasi inorganiche sul territorio urbano di Casale Monferrato per individuare potenziali fonti di contaminazione ancora ignote. La scelta di questo territorio è dovuta al particolare legame di Casale Monferrato con l'amianto e della presenza sino agli anni '80 del più grande stabilimento italiano di lavorazione dell'amianto (Eternit®).

MATERIALI E METODI

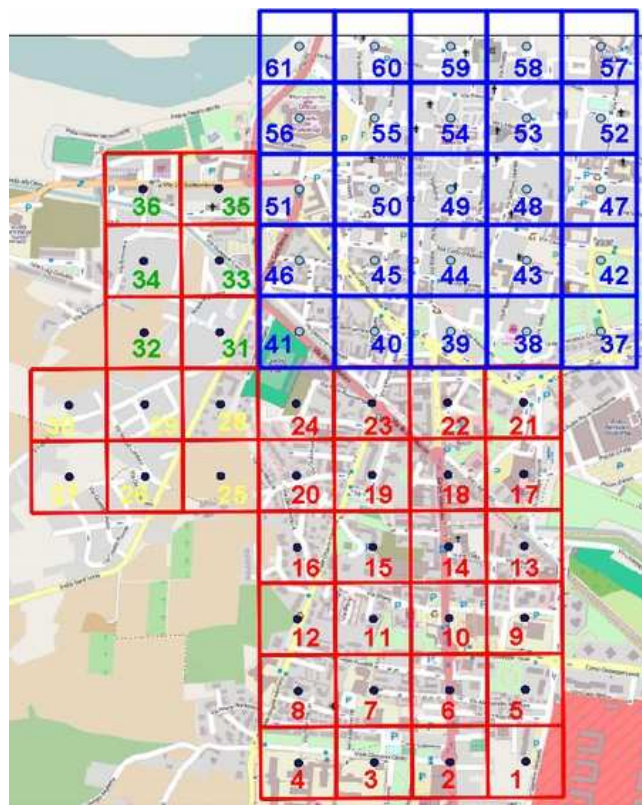
L'indagine è stata mirata alla ricerca, nel polmone di ratti selvatici, di fibre di amianto tramite microscopia elettronica in scansione (SEM) con annesso microanalizzatore chimico

(EDS) ed istopatologia. Lo svolgimento del progetto prevedeva lo svolgimento di 3 tre fasi:

Fase 1: progettuale. Sono stati individuati i criteri di inclusione nello studio sia dei roditori da catturare sia della porzione di territorio urbano del comune di Casale M^{to} da campionare. I criteri inerenti gli animali, riguardavano aspetti etologici della specie in studio (individui adulti) mentre i criteri riguardanti il territorio riguardavano caratteristiche abitative (presenza di abitazioni costruite nel periodo di maggiore produzione di materiali edili contenenti amianto) e la valutazione dell'impatto dei risultati attesi dello studio per la popolazione residente (aree con maggiore densità abitativa). Inoltre, sempre in base a questi criteri, il territorio incluso nello studio è stato suddiviso in 3 aree con priorità di cattura crescente: zona verde, gialla e rossa. Dopodiché è stata sovrapposta una griglia composta da quadrati di 200m di lato, all'interno dei quali collocare le trappole per la cattura dei roditori (Figura 1).

Nel corso dello studio, però, a causa dell'esiguo numero di ratti catturati sono stati rivisti alcuni dei criteri di selezione, includendo nello studio gli esemplari giovani ed ampliando il territorio di studio con un'area (zona blu) in cui era nota la presenza di ratti (Figura 1).

Figura 1 – Griglia di campionamento sovrapposta al centro abitato di Casale M^{to}.



Fase 2: operativa. Il campionamento è stato svolto utilizzando dispositivi di cattura Ekomille (soppressione eutanassica di uno o più animali) e tradizionali (cattura singola, a scatto), gestendo e spostando i dispositivi sul territorio in modo da favorire il più possibile la cattura di esemplari.

Per quanto riguarda le analisi di laboratorio, si è proceduto:

- all'esame anatomico-patologico su ciascun ratto: per escludere la presenza di lesioni riferibili a patologie zoonosiche;
- a SEM-EDS: per la quantificazione e caratterizzazione delle fibre trovate nel pool di ratti catturati in ciascun sito. I pool sono stati assortiti con ratti esclusivamente giovani o adulti (ad es: il sito 53A indica il pool di ratti adulti catturati nel sito 53, mentre 52G indica il pool di ratti giovani catturati nel sito 52);
- a approfondimento istologico: per rilevare eventuali alterazioni istopatologiche correlabili all'inhalazione di fibre di amianto.

Fase 3: conclusiva. L'elaborazione dei dati è stata svolta con la finalità di descrivere, utilizzando i metodi offerti dalla statistica, i risultati ottenuti dalle analisi di laboratorio e rapportandoli alla realtà del territorio si studio allo scopo di ipotizzare la presenza di hot-spot di contaminazione ancora ignoti.

RISULTATI E CONCLUSIONI

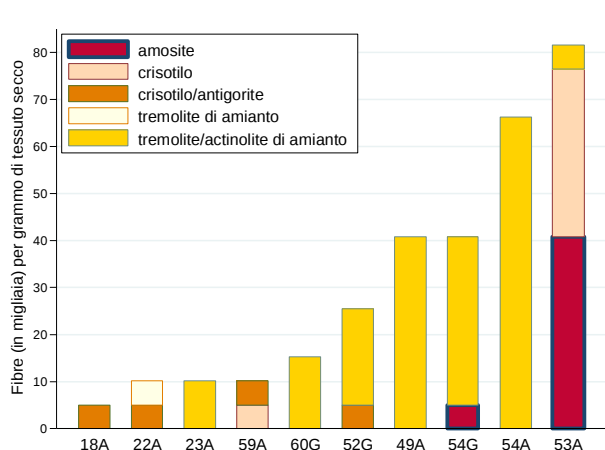
Nel periodo di campionamento (primavera 2012 - primavera 2015), sono stati catturati complessivamente 40 ratti selvatici (37 *Rattus norvegicus* e 3 *Rattus rattus*), provenienti da 14 siti interni alla griglia (12, 18, 22, 23, 47, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 59, 60) ed da un sito esterno. Di questi, 22 erano ratti adulti e 18 giovani.

Per quanto riguarda la ricerca di agenti zoonotici tutti i ratti sono risultati negativi per *Leptospira spp.* e *Francisella tularensis*.

L'esame istologico, svolto su 24 capi, a causa dell'avanzata autolisi del materiale, ha evidenziato la presenza di corpuscoli ferruginosi riferibili a corpuscoli d'asbesto solo in 5 ratti; in 2 di questi era ragionevole formulare una diagnosi istopatologica di asbestosi vista la compresenza di fibrosi polmonare di grado moderato/elevato.

L'elaborazione dei risultati delle indagini in SEM-EDS ha mostrato che in 8 dei 15 siti precedentemente citati, è stata rilevata la presenza di diversi tipi di amianto (crisotilo, tremolite di amianto, tremolite/actinolite di amianto, amosite). Le concentrazioni di amianto sono risultate differenti tra i diversi siti (Figura 2: è opportuno sottolineare che per le fibre classificate crisotilo/antigorite, non è stato possibile identificarle univocamente come fibre di crisotilo (amianto) o antigorite asbestiforme (non amianto)).

Figura 2 – Distribuzione per n° di sito di campionamento della quantità di fibre di amianto (ff/gts) rilevate mediate indagine in SEM-EDS.



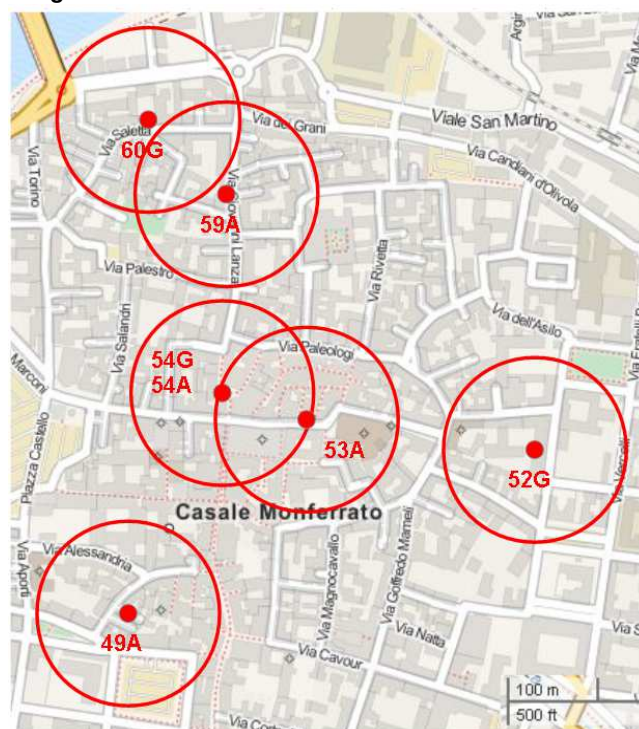
L'analisi statistica condotta su tali risultati ha consentito di individuare il sito 53 quale possibile hot-spot di contaminazione da amianto.

Grazie all'utilizzo delle coordinate geografiche rilevate al momento della cattura, è stato possibile definire il raggio di azione dei ratti e quindi individuare l'area compresa tra i siti 53 e 54 come target per la ricerca puntuale della fonte latente (Figura 3).

Inoltre l'assenza di fibre di crocidolite nei ratti analizzati induce a confidare, anche se limitatamente alle zone oggetto di studio, nella buona efficacia delle operazioni di bonifica attuate fin ad oggi.

In conclusione, questi risultati candidano l'utilizzo dei ratti come animali sentinella a strumento di monitoraggio di fonti ancora ignote di amianto e valido supporto ad altre strategie (ad es. campagne di igiene pubblica) che vengono messe in atto per la ricerca di fonti di amianto o per indirizzare interventi di bonifica.

Figura 3 – Distribuzione per n° di sito di campionamento della quantità di fibre di amianto (ff/gts) rilevate mediate indagine in SEM-EDS.



BIBLIOGRAFIA

- Decreto legislativo 277/1991 "Attuazione delle direttive n. 80/1107/CEE, n. 82/605/CEE, n. 83/477/CEE, n. 86/188/CEE e n. 88/642/CEE, in materia di protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da esposizione ad agenti chimici, fisici e biologici durante il lavoro, a norma dell'art. 7 della legge 30 luglio 1990, n. 212 "

IMPLEMENTAZIONE DI UN SISTEMA DI SORVEGLIANZA SULLE FRODI SANITARIE ITTICHE RELATIVE ALLA DICHIARAZIONE DELLO STATO DI CONSERVAZIONE

Meistro S, Pezzolato M, Varello K, Botta M, Baioni E, Ingravallo F, Acutis PL, Bozzetta E

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

Key words: pesce, stato di conservazione, frodi

SINTESI

L'obiettivo del progetto è stato sviluppare metodiche utili per poter disegnare e rendere applicativo un innovativo sistema di sorveglianza delle frodi ittiche, offrendo come ausilio alla rete dei laboratori ufficiali strumenti analitici robusti, promettenti, rapidi e *cost-effective*. Il test istologico risulta validato ed accreditato per la differenziazione di pesce fresco/congelato, inclusi i prodotti marinati, ed è stata verificata l'attuabilità di procedure in grado di accorciarne i tempi di esecuzione. Per prodotti affumicati e crostacei è in corso un'ulteriore valutazione delle *performance* del test istologico; per i cefalopodi esso non è applicabile ma sono promettenti i risultati ottenuti con la FFFS. Il piano di monitoraggio locale ha evidenziato che il 27% delle partite analizzate di pesce da consumarsi crudo non presentava alterazioni microscopiche da congelamento. Si è infine intrapreso uno studio sulla vita commerciale, mediante analisi delle proteine citoscheletriche.

INTRODUZIONE

Il consumo *pro capite* di pesce è passato a livello mondiale dai 17.6 kg del 2007 ai 19.2 kg del 2012 [1]. La dichiarazione dello stato di conservazione dei prodotti ittici assume un'importanza tutt'altro che trascurabile nella percezione della qualità dei prodotti stessi da parte del consumatore. La somministrazione di pesce decongelato dichiarato come fresco rappresenta una frode di tipo commerciale; nel caso, invece, di pesce dichiarato abbattuto termicamente che in realtà non sia stato sottoposto a tale trattamento si configura la possibilità di una frode sanitaria. In nessuna circostanza, tuttavia, il rischio sanitario può essere trascurato a priori. Il Regolamento CE 853/2004 [2], consolidato dal Regolamento UE 1276/2013 [3], prevede per gli OSA che immettono sul mercato o somministrano prodotti della pesca destinati ad essere consumati crudi o praticamente crudi l'obbligo di sottoporli ad abbattimento termico a -20°C per almeno 24 ore, oppure a -35°C per almeno 15 ore, al fine di tutelare i consumatori nei confronti dei parassiti Nematodi. Inoltre, il Regolamento UE 1169/2011 [4] prevede che un alimento venduto scongelato riporti in etichetta il termine "scongelato". Il Laboratorio di Istopatologia dell'IZSPLVA nel 2009 ha sviluppato, validato ed accreditato il metodo istologico per il riconoscimento dello stato di freschezza/congelamento del pesce. La relativa Procedura Operativa Standard presenta i seguenti parametri di validazione: Se 90.70 (IC95%:82.49-95.90), Se per pesce spada 100% (IC95%:94.94-100); Sp 92.59% (IC95%:95.71-99.09), Sp per pesce spada 100% (IC95%:94.94-100). Il metodo può essere applicato sia ai pesci ossei sia a quelli cartilaginei, sia di acqua dolce sia di acqua salata. I campioni, colorati con colorazione routinaria ematossilina-eosina (EE), vengono classificati come congelati in caso di riscontro di spazi otticamente vuoti o ripieni di materiale amorfo eosinofilo, collocati all'interno delle fibrocellule muscolari, e riferibili a congelamento, in quanto formati in seguito all'azione dei cristalli di ghiaccio; in caso contrario, i campioni vengono classificati come freschi.

MATERIALI E METODI

Nel corso dello svolgimento della ricerca si è perseguito l'obiettivo di ottimizzare il metodo istologico per l'identificazione dello stato di conservazione dei prodotti ittici, già messo a punto e validato negli anni precedenti con ottime *performance* su diverse specie ittiche, provando ad estenderne il campo di applicazione a prodotti ittici marinati ed affumicati, nonché a crostacei e molluschi cefalopodi. E' stata inoltre valutata la possibilità di ridurre le tempistiche dell'esame istologico.

Contemporaneamente si sono valutate le prestazioni di un metodo di spettroscopia a fluorescenza di superficie (FFFS) su differenti prodotti della pesca, per la sua applicazione per l'identificazione dello stato di conservazione di tali prodotti al fine di valutarne le *performance* e confrontarle con quelle del test istologico.

È stata effettuata un'indagine su 26 campioni di specie ittiche molto diffuse prelevati presso aree mercatali, ristoranti e GDO dell'area torinese, analizzandoli mediante esame istologico per identificarne lo stato di conservazione e sottoponendoli parallelamente ad identificazione di specie, al fine di riscontrare un'eventuale mancata corrispondenza tra specie dichiarata e specie rilevata.

Si è inoltre attivato un piano di monitoraggio per l'individuazione dei livelli di prevalenza locale della frode legata alla vendita di prodotto congelato dichiarato come fresco e della pratica di mancato abbattimento termico dei prodotti ittici destinati ad essere consumati crudi, allo scopo di offrire al Ministero della Salute dati robusti per la successiva implementazione di un piano di monitoraggio mirante a definire i livelli di prevalenza delle frodi a livello nazionale. Tale piano ha previsto l'analisi di 26 partite prelevate presso esercizi commerciali e ristoranti liguri.

Tramite la messa a punto di una metodica immunoistochimica, si è inoltre intrapreso uno studio allo scopo di valutare l'applicabilità della proteina citoscheletrica distrofina come *marker* in grado di fornire indicazioni sulla vita commerciale dei prodotti ittici sul mercato in relazione allo stato di conservazione dichiarato.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Il metodo istologico rappresenta uno strumento analitico valido e *cost-effective* nel differenziare il pesce fresco da quello decongelato ed è applicabile per proteggere il consumatore nei confronti di eventuali pratiche fraudolente. Tale strumento è oggi a disposizione sia per i controlli da parte delle autorità competenti, sia per le aziende che desiderino verificare la rispondenza dello stato di conservazione del prodotto a quanto dichiarato dai loro fornitori.

È stato possibile estendere il campo di applicazione della metodica istologica e della relativa POS ai prodotti della pesca marinati (Se 100% (IC95%:88.4%-100%), Sp 100% (IC95%: 8.4%-100%) (Figura 1). Sebbene la marinatura rappresenti un popolare metodo di conservazione del pesce e sia particolarmente apprezzata nelle aree costiere italiane, essa non sempre ha efficacia anisakicida, pertanto è obbligatorio abbattere termicamente anche i prodotti della pesca marinati crudi.

Il Regolamento CE 853/2004 [2], prescrive che i prodotti della pesca in caso di trattamento di affumicatura a freddo durante il quale la temperatura all'interno del prodotto non supera i 60°C, debbano subire abbattimento termico preventivo, salvo nei casi di evidenze scientifiche attestanti l'assenza di *Anisakis* nei siti di produzione. Le *performance* del metodo istologico applicato ai prodotti affumicati sono attualmente in fase di valutazione.

Per i prodotti della pesca derivati da molluschi cefalopodi vige il medesimo obbligo di abbattimento termico, ma attualmente non sono disponibili metodiche analitiche rapide, di facile esecuzione, dotate di elevate sensibilità e specificità per identificarne lo stato di conservazione. A tal fine il test istologico non è risultato applicabile. Appaiono invece di notevole interesse i risultati ottenuti con la metodica FFFS testata. I campioni di polpo comune sono infatti stati correttamente classificati nell'86,8% considerando gli spettri del triptofano e nel 93% dei casi considerando gli spettri dell'*NADH*. Sarà necessario a tal proposito estendere lo studio ad ulteriori specie, per poter stabilire l'accuratezza della metodica, che appare promettente, considerando la semplicità analitica, alta ripetibilità, minima preparazione del campione richiesta ed elevata velocità d'esecuzione.

Lo sviluppo e la validazione di un metodo analitico per la differenziazione dei crostacei freschi da quelli congelati sono altresì auspicabili, al fine di poter svelare eventuali frodi.

È stata verificata l'attuabilità di procedure in grado di accorciare le tempistiche di esecuzione del test istologico, mantenendone inalterate le *performance*.

In merito all'indagine eseguita nell'area torinese, per il 27% dei campioni è stata riscontrata una non corrispondenza tra stato di conservazione dichiarato e stato di conservazione effettivamente riscontrato mediante esame istologico; la percentuale di non corrispondenza rilevata tra specie ittica dichiarata e specie identificata è stata la medesima. La frode di sostituzione di specie rappresenta indubbiamente una delle frodi più comuni nel settore ittico, insieme alla dichiarazione mendace dello stato di conservazione e alla presenza non dichiarata di additivi. Questi dati, seppur riferiti ad un ambito locale, rappresentano una conferma del fatto che non bisogna mai abbassare la guardia.

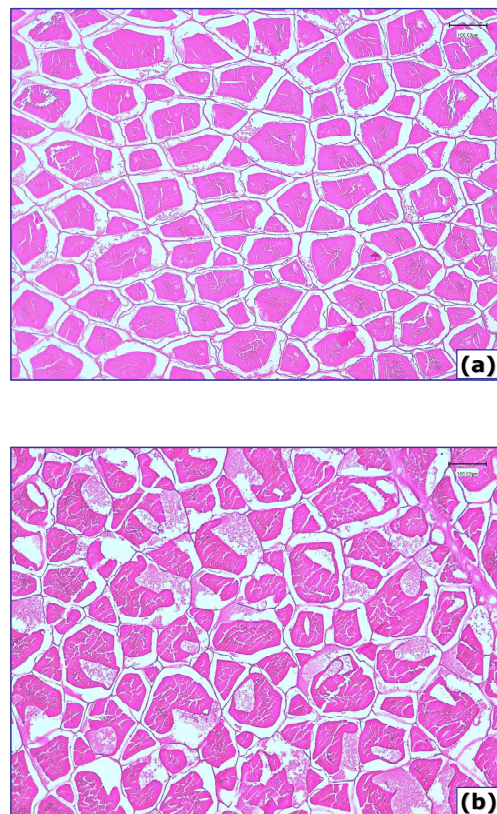
A partire dal 2012, il PRISA (Piano Regionale Integrato dei controlli sulla Sicurezza Alimentare) dedicato ai prodotti ittici prevede la verifica della prevalenza delle frodi di dichiarazione dello stato di conservazione del pesce tramite il metodo istologico e di sostituzione di specie mediante indagini genetiche, congiuntamente alla valutazione di parametri microbiologici e chimici. I dati del monitoraggio PRISA del 2014 costituiscono una fonte preliminare di informazione sulla consistenza del fenomeno di mancata bonifica dei prodotti ittici destinati ad essere consumati crudi. L'esame istologico ha rilevato la presenza di un 27% di partite che non presentavano alterazioni da congelamento. Sarà necessario disporre dei dati sulla consistenza numerica e distribuzione degli esercizi commerciali, per poter calcolare la numerosità campionaria necessaria per produrre una stima statistica della prevalenza di esercizi in cui possono essere rinvenute partite non congelate a livello nazionale.

I risultati sinora ottenuti per quanto riguarda la distrofina non consentono ancora di esprimere un giudizio articolato sulla sua applicabilità come *marker* di degradazione, sebbene la metodica immunoistochimica sia stata messa a punto.

Dall'analisi dei dati ottenuti nel presente progetto di ricerca emerge chiaramente l'esigenza di creare una rete di collaborazione multidisciplinare che possa essere in grado in futuro di affrontare in maniera rigorosa ed esaustiva le tematiche sanitarie relative ai prodotti ittici. I metodi analitici testati e valutati durante lo svolgimento del progetto

potrebbero essere applicati nell'ambito di un sistema di sorveglianza ufficiale, rispondendo ai dettami della legislazione europea in ambito di sicurezza alimentare e tutela della salute pubblica. L'impegno del Laboratorio è quello di proseguire nell'implementazione di un servizio analitico basato su metodologie standardizzate, validate, tecnologicamente avanzate, possibilmente *cost-effective* e caratterizzate da tempi rapidi di risposta, al fine di fronteggiare le molteplici e sempre nuove frodi messe in atto in ambito alimentare, in particolare nel settore ittico.

Figura 1. Alici marinate: (a) campione fresco, (b) campione congelato. Esame istologico, colorazione EE.



BIBLIOGRAFIA

1. The State of World Fisheries and Aquaculture", rapporto FAO, 2014.
2. Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.
3. Regolamento (UE) n. 1276/2011 della Commissione dell'8 dicembre 2011 che modifica l'allegato III del Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio relativamente al trattamento per l'uccisione di parassiti vitali in prodotti della pesca destinati al consumo umano.
4. Regolamento UE 1169/2011 del Parlamento europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE) n. 1924/2006 e (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione.

S.AUREUS IN AMBIENTI, IMPIANTI E AMBIENTI DI LAVORAZIONE: STUDIO DI FATTORI FAVORENTI LA SINTESI DI BIOFILM E STRATEGIE DI CONTROLLO NEL SETTORE LATTIERO-CASEARIO

Bellio A¹, Bianchi DM¹, Adriano D¹, Gallina S², Chiavacci L¹, Vitale N¹, Ianieri A³, Cocconcelli P⁴, Griglio B⁵, Gariano G¹, Macori G¹, Monfardini S¹, Lombard D⁶, Decastelli L²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ²IT LNR Stafilococchi coagulasi positivi compreso *S.aureus*; ³Università degli Studi di Parma; ⁴Università del Sacro Cuore di Piacenza; ⁵ASL TO5; ⁶EU-RL for Coagulase Positive Staphylococci

Key words: *S.aureus*; biofilm; lattiero-caseario

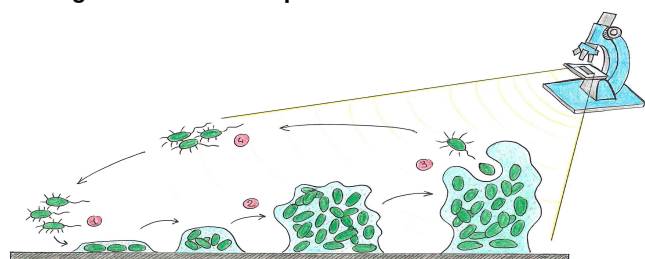
SINTESI

Staphylococcus aureus può essere presente nelle industrie alimentari del settore lattiero-caseario e persistere negli ambienti e sugli strumenti di lavorazione, grazie alla sua capacità di formare biofilm. L'obiettivo generale del progetto è stato quello di indagare i fattori favorenti la sintesi di biofilm da parte dei ceppi di *S. aureus* isolati nelle aziende lattiero-casearie presenti nella Regione Piemonte. Le prove fenotipiche hanno rivelato che il 90,3% dei ceppi isolati è in grado di produrre biofilm. La valutazione dell'attitudine dei ceppi a produrre biofilm su superfici con caratteristiche chimico-fisiche differenti (polistirene e acciaio) ed a temperature differenti (12 °C e 37 °C), ha mostrato una maggiore attitudine nella formazione di biofilm alla temperatura di 37 °C, rispetto a 12 °C, e sul polistirene, piuttosto che sull'acciaio. I risultati ottenuti durante lo studio sono stati divulgati agli operatori della filiera lattiero-casearia.

INTRODUZIONE

S. aureus è in grado di produrre enterotossine responsabili di malattie trasmesse da alimenti. Generalmente la sintomatologia è autolimitante e perdura solo per uno-due giorni, tuttavia nei casi più gravi il periodo di completa remissione può essere superiore. La presenza di *S. aureus* è spesso riscontrabile già nelle materie prime; tuttavia è frequente la contaminazione successiva, durante i processi produttivi degli alimenti, soprattutto quando questi prevedono un'elevata manipolazione da parte degli operatori. Questi ultimi sono considerati come una delle principali fonti di contaminazione degli alimenti stessi, in quanto spesso risultano portatori di *S. aureus* produttori di enterotossine. Oltre alla produzione di enterotossine negli alimenti, anche la capacità di produrre biofilm da parte di alcuni ceppi di *S. aureus* viene considerato un importante fattore di virulenza [8]. Il biofilm è definito come una comunità strutturata di cellule batteriche, richiuse in una matrice polimerica autoprodotta e aderente a una superficie inerte o vivente [1].

Immagine 1 – Fasi della produzione di biofilm



I biofilm batterici rivestono notevole importanza in campo sanitario, in quanto sono caratterizzati da una drastica diminuzione della sensibilità dei microrganismi coinvolti in tale tipo di crescita, a vari agenti disinfettanti e antibiotici. La resistenza osservata nei biofilm non è genotipica, cioè codificata da plasmidi e trasposoni o legata ad eventi mutazionali, ma è dovuta a strategie multicellulari e/o alla

capacità di singole cellule interne al biofilm di differenziarsi in uno stato protetto e tollerante nei confronti dell'azione antibiotica, conferendogli un vantaggio selettivo nell'eziologia delle successive infezioni [9]. Numerosi batteri patogeni hanno dimostrato capacità di formare biofilm e tra questi, particolare rilevanza in ambito clinico ed alimentare riveste *S. aureus*. Questo microrganismo è in grado di produrre biofilm su diverse superfici, come acciaio inox, plastica, vetro, policarbonato e su molti altri materiali destinati a venire a contatto con gli alimenti [3]. Nell'industria alimentare il biofilm causa notevoli problemi di ordine tecnologico e soprattutto igienico-sanitario, in quanto riduce sensibilmente l'efficacia dei disinfettanti convenzionali che riescono a penetrare solo parzialmente nel fitto strato di polimeri per giungere a contatto con le cellule batteriche, che non solo presentano caratteristiche alternative, ma sono spesso dotate di elevate potenzialità patogene [4].

Gli obiettivi che si prefigge questo studio sono la messa in luce dei punti critici presenti nelle fasi di lavorazione del settore lattiero-caseario, la valutazione dell'efficacia dei processi di detersione e disinfezione in uso e lo studio dei fattori favorenti la colonizzazione delle superfici e la produzione di biofilm da parte di *S. aureus*.

MATERIALI E METODI

La raccolta dei campioni per l'isolamento di ceppi di *S. aureus* è stata eseguita presso 18 caseifici della provincia di Torino (n. 11), Asti (n. 4) e Cuneo (n. 3) e presso un allevamento della provincia di Cuneo. Tali realtà sono state selezionate in base a positività pregresse per *S. aureus*. Presso tali aziende sono stati eseguiti dei campioni di alimenti e dei tamponi su superfici di attrezzature e piani di lavoro, precedentemente pulite e sanificate. I campioni alimentari e ambientali sono stati processati per la numerazione degli Stafilococchi coagulasi positivi utilizzando la metodica ISO 6888-2: 1999. L'identificazione batterica è stata eseguita mediante il sistema API, oppure attraverso il sistema VITEK. I ceppi di interesse sono stati caratterizzati mediante Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). La presenza dei geni responsabili della produzione della matrice extracellulare composta da sostanze polimeriche (ESP), che costituisce il biofilm ed è in grado di fornire ai ceppi una maggiore resistenza ai comuni detergenti e sanificanti, è stata verificata mediante PCR (Tabella 1).

Tabella 1 – Primer per ricerca geni codificanti le ESP

primer	Dimensione amplificato (bp)	reference
Bap-6m	971	[2]
Bap-6m		
cnaF	192	[10]
cnaR		
fnbA_F	191	[10]
fnbA_R		
clfA_F	1000	[10]
clfA_R		

icaA_F	188	[10]
icaA_R		
rbf_F	1200	[6]
rbf_R		

La produzione *in vitro* di biofilm di ogni singolo ceppo di *S. aureus*, è stata verificata utilizzando un metodo semiquantitativo in piastre microtiter da 96 pozzetti (Corning) come precedentemente descritto [5]. Inoltre è stata valutata la produzione *in vitro* di biofilm, su differenti superfici (polistirene e acciaio) e diverse temperature (12 °C e 37 °C). Per la valutazione della produzione di biofilm in relazione ai materiali e alla temperatura, è stata effettuata un'elaborazione statistica su due step;

- analisi descrittiva grafici, indici statistici di tutti i fattori considerati;
- analisi della varianza fattoriale (ANOVA) e t di Tukey per valutare le differenze.

La significatività statistica del modello è stata testata attraverso il test di Fisher. La differenza tra medie è stata testata attraverso il test t di Tukey. Tutte le elaborazioni statistiche sono state effettuate con il software SAS@v9.2. E' stato predisposto un questionario volto a raccogliere informazioni relative alle realtà presso cui sono stati eseguiti i campioni. Per la realizzazione, sono state prese come punto di riferimento le buone pratiche di igiene e di lavorazione, analizzando diverse fasi quali la mungitura, lo stoccaggio e il trasporto del latte munto, la caseificazione, l'idoneità dei locali di lavorazione, i processi di pulizia e sanificazione delle attrezzature. Il questionario così redatto è stato distribuito durante i sopralluoghi effettuati nei caseifici.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Nel presente studio sono stati isolati 65 ceppi di *S. aureus*, da campioni di prodotti lattiero-caseari (n. 51) e dalle superfici e strumenti di lavorazione precedentemente sottoposte ad operazioni di detersione e/o disinfezione (n. 14). Mediante la PFGE sono stati identificati 46 pulsotipi differenti riconducibili a 9 cluster genomici differenti, mostrando un'elevata variabilità genomica.

Le analisi in PCR volte alla valutazione della presenza dei più importanti geni coinvolti nella produzione di biofilm, ha rivelato la presenza della maggior parte dei geni considerati (*atlA*, *icaA*, *fbaA*, *cna*, *clfA*, *agr*), eccetto per due geni (*rbf* e *bap*) per i quali nessun ceppo risulta essere positivo.

Per quanto riguarda le prove di produzione di biofilm, i ceppi di *S. aureus* analizzati in singolo hanno rivelato differenti livelli di produzione *in vitro*: alta formazione (n. 11 ceppi), lieve formazione (n. 45 ceppi) e assenza di produzione (n. 6 ceppi). I dati confermano che la maggior parte dei ceppi di *S. aureus* (90,3%) isolati nel corso dello studio, presentano la capacità di produrre biofilm *in vitro*.

Sebbene, i dati indicano la presenza del gene *fbaA* per la quasi totalità di ceppi ad alta produzione di biofilm, l'ampiezza campionaria non ha permesso di rilevare con significatività statistica, la presenza di un pattern produttore di biofilm.

I risultati ottenuti nelle prove di produzione *in vitro* su differenti superfici e a differenti temperatura di crescita, ha confermato la capacità di produrre biofilm sui substrati normalmente impiegati nelle industrie alimentari (acciaio e polistirene) da parte dei ceppi di *S. aureus*.

Tabella 2 – Indice di produzione di biofilm

Mix ceppi	Polistirene 12 °C	Polistirene 37 °C	Acciaio 12 °C	Acciaio 37 °C
A	0,132	0,422	0,058	0,205
B	0,124	0,307	0,038	0,183
C	0,113	0,307	0,043	0,105
D	0,053	0,317	0,034	0,065
E	0,117	0,100	0,066	0,051

Le differenze fra i risultati di produzione di biofilm, in risposta al variare della temperatura e del materiale, risultano essere statisticamente significative (p <0,05). In accordo con altri autori [8], il processo di formazione del biofilm sembra influenzato da:

- temperatura di crescita
- tipologia del substrato
- caratteristiche del ceppo.

In accordo con altri autori, a 37 °C i ceppi di *S. aureus* mostrano una maggiore attitudine a produrre biofilm sul polistirene piuttosto che sull'acciaio inox [7]. I valori più alti di produzione di biofilm riscontrati per il polistirene, materiale noto per le sue proprietà idrofobiche, dimostrano l'importanza dell'idrofobicità durante il processo di adesione sulle superfici degli ambienti di lavorazione. A 12 °C nessun mix ha prodotto biofilm sui substrati considerati. Ciò ribadisce l'importanza del mantenimento delle temperature previste dalla normativa negli ambienti di lavorazione al fine di ridurre il rischio di produzione di biofilm da parte di *S. aureus*.

BIBLIOGRAFIA

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections; Science 1999, 284:1318-1322.
2. Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* Infect Immun. 2004;72(4):2177-85.
3. Di Ciccio P, Vergara A, Festino AR, Paludi D, Zanardi E., Ghidini S, Ianieri A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. Food Control 2015, 50: 930-936
4. Giubilesi M, Farina S. Superfici alimentari a prova di igiene. Le procedure da seguire; ALIMENTI&BEVANDE Nov-Dic 2008; Anno X - 11/12.
5. Kouidhi B, Zmantar T, Hentati H, Bakhrouf A. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. Microb Pathog. 2010 ;49(1-2):14-22.
6. Lim Y, Jana M, Luong TT, Lee CY. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2004;186(3):722-9.
7. Pagedar A, Singh J, Batish VK. Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms. J Basic Microbiol. 2010;50 Suppl 1:S98-106.
8. Rode, T. M., Langsrud, S., Holck, A., & Moretto, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. International Journal of Food Microbiology 2007, 116, 372e383.
9. Zampaloni C., Ripa S.; Sviluppo dell'antibiotico-resistenza in biofilm di *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilm Microbici 2005. I Workshop nazionale; Istituto Superiore di Sanità. Roma, 20-21 giugno 2005. Riassunti.
10. Zmantar T, Chaieb K, Makni H, Miladi H, Abdallah FB, Mahdouani K, Bakhrouf A J Basic Microbiol. Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus* 2008;48(4):308-14.

SVILUPPO DI PROTOCOLLI DIAGNOSTICI E GESTIONALI A SOSTEGNO DEL SETTORE CUNICOLO

Giorgi I¹, Possidente R¹, Masoero L¹, Gorla M¹, Pistone G¹, Lavazza A², Dondo A¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² Centro di Referenza Nazionale per le Malattie Virali dei Lagomorfi - Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia Emilia Romagna

allevamento cunicolo, protocolli diagnostici, indagini sierologiche

SINTESI

Le principali attività realizzate durante il progetto di ricerca sono così riassunte: aggiornamento dell'anagrafe regionale degli allevamenti industriali e rurali, creazione di mezzi informatizzati per la gestione anagrafica, potenziamento dell'attività diagnostica con sviluppo di protocolli operativi innovativi per Mixomatosi, Malattia Virale Emorragica (e variante RHDV2) ed Encefalitozoonosi, proposta di aggiornamenti della normativa sulle misure da adottare in caso di focolaio di mixomatosi, concreto contributo organizzativo per il piano regionale di sostegno economico a favore della vaccinazione contro la Mixomatosi. Gli incontri realizzati durante il progetto di ricerca tra le figure operanti nel settore cunicolo hanno reso possibile un miglioramento della comunicazione tra il settore veterinario pubblico e gli operatori del settore, facendo in modo che l'IZS non venga considerato solo un ente di controllo, ma anche un utile ed efficace organo tecnico di supporto.

INTRODUZIONE

L'allevamento cunicolo italiano è la prima realtà europea e la seconda a livello mondiale e rappresenta in Italia il 4° comparto zootecnico nazionale[1]; nonostante ciò può essere definito un settore "trascurato" in quanto carente di norme aggiornate, di informazioni riguardo la reale prevalenza di malattie infettive e di protocolli diagnostici innovativi. Ciò impone la necessità di potenziare i protocolli diagnostici e di studio nei confronti delle patologie oggetto dello studio, e di fornire linee guida per una corretta gestione aziendale in termini di biosicurezza e profilassi. In un contesto difficile sia per reperimento di risorse economiche che per realizzazione di attività di monitoraggio, diventa strategico disporre di metodiche diagnostiche innovative per una rapida evidenziazione degli agenti patogeni su soggetti in produzione. Nel 2010 è comparsa in Francia una nuova variante della Malattia Emorragica Virale (RHD), inizialmente denominata RHDVFra2010 e oggi indicata come RHDV2, per cui è importante migliorare la sorveglianza regionale ed implementare i protocolli diagnostici al fine di assicurare la rapida rilevazione della comparsa della nuova variante sul territorio.

Data l'importanza del settore cunicolo in Italia e in particolare nella regione Piemonte risulta impellente la necessità di disporre di dati anagrafici e sanitari aggiornati. E' pur vero che un incremento della fiducia degli allevatori nei confronti del Sistema Sanitario, renderebbe meno difficoltoso l'accesso a una parte del patrimonio cunicolo piemontese per l'acquisizione di tali dati, l'applicazione di metodiche diagnostiche innovative e lo sviluppo di protocolli diagnostici capaci di garantire una rapida identificazione degli agenti patogeni. Per questo motivo uno degli obiettivi del progetto di ricerca è stato quello di promuovere il ruolo dell'IZS come un ente di supporto tecnico oltre che analitico, in grado di offrire un valido e aggiornato servizio diagnostico anche per la gestione delle emergenze sanitarie rispettando le norme di sanità pubblica ma allo stesso tempo cercando di non penalizzare gli allevatori.

MATERIALI E METODI

Il progetto di ricerca, le attività previste per la sua realizzazione e i vantaggi derivanti sono stati presentati agli

operatori del settore cunicolo dal personale delle Unità Operative del progetto durante incontri appositamente organizzati, sottolineando il ruolo dell'IZSPLV nelle azioni di supporto tecnico-scientifico per le attività diagnostiche e gestionali del settore cunicolo. Per l'aggiornamento dell'anagrafe cunicola regionale sono stati predisposti dalle U.U.O.O, il CdR e il Servizio Veterinario della Regione Piemonte dei questionari, i quali sono stati compilati dai veterinari Asl mediante interviste agli allevatori, ponendo un particolare riguardo alle sezioni destinate ai dati sulla georeferenziazione delle aziende e sulle caratteristiche strutturali, gestionali e sanitarie degli allevamenti. L'attività di censimento ha coinvolto anche gli allevamenti cosiddetti "rurali" o "familiari", costituiti da pochi capi non registrati, in cui non vengono di solito adottate adeguate norme di biosicurezza e di profilassi vaccinale e che spesso fungono da ricettacolo per la sviluppo e la diffusione di malattie infettive trasmissibili. Utilizzando lo scheletro del medesimo questionario è stata attivata la creazione di un data-base specifico per l'inserimento dei dati annuali di ogni allevamento, al fine di ottenere e mantenere aggiornata l'anagrafe cunicola piemontese. Per quanto riguarda la necessità di aggiornamento della normativa vigente riguardo la gestione di focolai di mixomatosi è stato creato un gruppo di lavoro interno alla ricerca, costituito da diverse figure professionali competenti del settore (rappresentanti del IZSPLV, CdR malattie virali dei lagomorfi, rappresentanti della Regione Piemonte e Lombardia, Veterinari ASL e veterinari liberi professionisti), che si sono confrontate con lo scopo di individuare e analizzare le criticità della normativa di riferimento e redigere un protocollo operativo specifico per la gestione del focolaio in base alle osservazioni e all'esperienza dei componenti del gruppo di lavoro, valutando la possibilità di renderlo "ufficiale", uniformando così le azioni di controllo sul territorio della regione Piemonte e Lombardia. Inoltre, sempre per un maggior controllo delle patologie dei lagomorfi sul territorio, è stata realizzata e distribuita la brochure di tipo divulgativo sulla RHD appositamente predisposta dal CdR in collaborazione con l'a Diagnostica di Torino allo scopo di una gestione uniforme e puntuale dei focolai di malattia. Quest'ultima inoltre è stata coinvolta in un gruppo di lavoro in collaborazione con la Regione Piemonte (settore Sanità e Agricoltura), al quale sono state affidate la redazione e l'elaborazione dei criteri con i quali erogare il supporto vaccinale previsto da un piano Regionale, finalizzato all'incentivazione della vaccinazione per Mixomatosi negli allevamenti con più di 50 fattrici. Secondo indicazioni del CdR nel corso della ricerca, come da obiettivo, sono state affinate e applicate prove diagnostiche di tipo tradizionale e di biologia molecolare oltre che adottate e implementate metodiche sperimentali innovative, finalizzate all'approfondimento diagnostico e alla diagnostica differenziale delle tre malattie prese in esame. In particolare per la diagnosi diretta di RHDV sono state messe a punto e applicate dal laboratorio di Virologia dell'IZSTO metodiche immunoenzimatiche (ELISA) per il rilevamento del virus nei tessuti e tecniche biomolecolari (RT-PCR) per l'identificazione del virus e della variante RHDV2; in caso di focolaio, confermato dal CdR, se richiesto dall'allevatore, è stata studiata e verificata, la procedura operativa per la produzione del vaccino stabulogeno (secondo quanto

disciplinato dal DM 17.03.94 n. 287). Per quanto riguarda la Mixomatosi, secondo indicazioni del CdR, il laboratorio di biologia molecolare dell'IZSTO ha messo a punto una metodica in PCR capace di discriminare il virus vaccinale dal virus di campo. Infine la procedura per la diagnosi di *Encephalitozoon cunicoli* è stata potenziata grazie allo stesso laboratorio mediante l'introduzione di una metodica di biologia molecolare per la ricerca del microsporide da organi. Il progetto di ricerca ha previsto anche la conduzione di un'attività diagnostica sierologica sperimentale con lo scopo di valutare un utilizzo della sierologia nelle attività di monitoraggio sanitario oltre che per la valutazione della cinetica anticorpale di allevamento in risposta alle vaccinazioni. Sono state selezionate 3 aziende campionesi in base alle loro caratteristiche gestionali e alla loro storia sanitaria, in cui effettuare prelievi ematici 2 volte a distanza di 6 mesi da animali di diverse categorie produttive. I sieri sono stati testati utilizzando dei kit specifici (c-ELISA), per la ricerca di anticorpi antiRHDV e anti-Myxomavirus, prodotti dal CReMaViLa dell'ZSLER; quest'ultimo si è inoltre occupato dell'esecuzione dei test per la ricerca di Ig anti RHDV2 e della definizione delle sottoclassi anticorpali. Tutte le attività analitiche e la valutazione dei risultati sono state realizzate con il contributo delle UU.OO. coinvolte nel progetto con il supporto puntuale del CdR.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Grazie ai dati raccolti mediante la compilazione dei questionari è stato possibile aggiornare l'anagrafica Piemontese, risultando ad oggi presenti 144 allevamenti con più di 50 fattrici, stabilire le dosi vaccinali da acquistare per il supporto al programma di vaccinazione e prevenzione della Mixomatosi in Piemonte e creare un portale predisposto per essere accessibile via web.

Per quanto riguarda l'attività diagnostica, le U.U. O.O. hanno potenziato metodi di prova di tipo tradizionale e di biologia molecolare e ne hanno messe a punto delle nuove da affiancare all'esame anatomico-patologico per la ricerca delle malattie oggetto del progetto di ricerca (RHD, Mixomatosi, Encefalitozoonosi). In particolare per RHD il protocollo diagnostico utilizzato consente l'individuazione di RHDV2 e la sua efficacia è stata dimostrata nel 2013 in occasione di un focolaio di Malattia emorragica virale ceppo francese in Piemonte (RHDV2) in cui la diagnosi emessa dall'IZSTO, è stata confermata dal CdR con successiva produzione di 10.000 dosi di vaccino a partire da 320 fegati di animali morti nel focolaio. I diversi incontri realizzati durante il progetto di ricerca tra le figure operanti nel settore cunicolo hanno reso possibile un miglioramento della comunicazione tra il settore veterinario pubblico (ASL e IZS), e gli operatori del comparto conigliicoltura facendo in modo che l'IZS non venga più considerato solo un ente di controllo, ma anche un utile ed efficace organo tecnico di supporto. Il piano regionale di sostegno economico a favore della vaccinazione contro la Mixomatosi negli allevamenti piemontesi, a cui il gruppo di ricerca ha dato un concreto contributo organizzativo, può essere considerato un successo nella sensibilizzazione degli allevatori, volta a far percepire la vaccinazione o l'imposizione di determinate norme non come un "obbligo", ma come un'occasione di miglioramento e di scambio reciproco di informazioni. Infatti, l'applicazione di un piano vaccinale organizzato e ben pianificato, assieme all'adozione di buone pratiche gestionali e di biosicurezza, rimane uno dei metodi più efficaci per ridurre la diffusione delle due principali malattie virali (RHD e Mixomatosi) e per tale motivo deve continuare ad essere incentivato da parte dei Servizi Veterinari pubblici e privati, anche attraverso la distribuzione di materiale informativo come la brochure sulla RHD e lo schema vaccinale per la Mixomatosi, realizzati e distribuiti durante il progetto di ricerca.

La comparsa sul territorio piemontese di RHDV2, diagnosticata nel 2013 dall'IZSPLV, rende doveroso l'impegno nel promuovere e incentivare, lì dove necessario, la produzione di vaccini stabulogeni a partire da fegati di animali infetti da RHDV2, in quanto oltre a rappresentare un utile mezzo di controllo della sua diffusione, appare agli occhi dell'allevatore come un mezzo efficace e quasi indispensabile favorendo così la segnalazione della malattia da parte dello stesso. L'introduzione di nuove tecniche diagnostiche, come la RT-PCR in grado di identificare un'infezione da RHDV2 oltre che da RHDV1, realizzata grazie al presente progetto di ricerca, permette all'IZS di fornire all'Utenza privata e pubblica un servizio aggiornato, efficace e rapido. Il vantaggio derivante da una rapida informazione sulla presenza di RHDV2 è rappresentato da una riduzione dei tempi necessari per l'applicazione delle procedure di controllo della malattia e dell'eventuale produzione del vaccino stabulogeno contribuendo così al controllo della sua diffusione nel nostro territorio.

Risultati positivi e incoraggianti sono stati ottenuti dall'attività diagnostica sperimentale condotta con lo scopo di valutare l'efficacia della sierologia come mezzo diagnostico *intra-vitam* soprattutto per un suo affiancamento delle procedure di gestione, monitoraggio e chiusura dei focolai. Tali tecniche potranno essere utilizzate per valutare l'idoneità delle vaccinazioni nelle rimonte introdotte in allevamento e la presenza di circolazione virale negli animali sentinella in fase di controllo post-focolaio.

L'aggiornamento della normativa per la gestione del focolaio in caso di Mixomatosi proposto dal gruppo di ricerca focalizza l'attenzione sull'importanza dei controlli sierologici in allevamento, effettuati con le metodiche messe a punto nel progetto, che dovrebbero semplificare le azioni di controllo e chiusura del focolaio riducendo i danni economici agli allevatori. Tutto ciò contribuirebbe ad aumentare delle segnalazioni e renderebbe più reali i dati di prevalenza e incidenza di RHD e Mixomatosi a disposizione dell'IZSPLV, creando così un punto di partenza ideale per l'attivazione di un adeguato sistema di sorveglianza, soprattutto in seguito alla recente introduzione sul territorio piemontese della nuova variante genetica RHDV2.

La realizzazione delle diverse attività previste nel progetto permetteranno all'IZSPLV di aumentare il supporto tecnico verso il Servizio Veterinario pubblico e privato, compreso l'allevatore, in quanto quest'ultimo deve poter percepire questo servizio come un mezzo utile per la gestione del suo allevamento. Il progetto di ricerca ha permesso un aumento dell'efficacia dei protocolli diagnostici e operativi in uso presso il nostro istituto, che ad oggi risultano armonizzati e in sinergia tra le diverse Unità Operative dell'IZSPLV e il CdR; prezioso è stato il contributo di quest'ultimo, con un miglioramento dei livelli di professionalità e del grado di conoscenza tecnico-scientifica delle diverse figure professionali impiegate per lo svolgimento della attività diagnostica. Sono inoltre state introdotte nuove tecniche diagnostiche che garantiscono un'implementazione del servizio reso all'Utenza sia pubblica che privata con un recupero dell'efficienza dell'attività diagnostica attraverso la rapidità e l'appropriatezza degli interventi.

Il presente progetto di ricerca è stato realizzato grazie al prezioso contributo di: Paolo Cerrina, Claudio Caruso, Alessia Di Blasio, Donatella De Somma, Anna Grindatto, Angelo Romano, Ilaria Miceli, Lara Irico, Riccardo Prato, Giovanna Rizzo.

BIBLIOGRAFIA

1. Lavazza A., Cerioli M., Grilli G. (2009). Biosicurezza negli allevamenti cunicoli. La biosicurezza in veterinaria. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche Brescia, 74: 91- 120.

MIGLIORARE IL BENESSERE ANIMALE DURANTE LE MACELLAZIONI RITUALI: VALUTAZIONE DEL GRADO DI INCOSCENZA NEL BOVINO DA CARNE

Dezzutto D¹, Barbero R¹, Bergagna S¹, Pavoletti E², Gili S³, Gennero MS¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² Servizio Veterinario Regione Piemonte, A.S.L. VC; ³ Servizio Veterinario Regione Piemonte, A.S.L. T01

Key words: halal, benessere animale, incoscienza

SINTESI

The ritual slaughter has been always a much controversial and debated issue related to different cultural traditions, human rights and religious tolerance and to animal welfare. In Western society the welfare and protection of animals are timeless values of extreme importance and shared by all. However, in most EU countries, for religious reasons only for the Islamic people, beef animals may be excluded from the stunning of animals before bleeding. Obviously there are some difficulties due to this to ensure the protection of animal welfare.

The aim of this work is to contribute to the improvement of the condition of the animals during religious slaughter through the development of new protocols that enable the protection of animal welfare, in accordance with the religious rite.

INTRODUZIONE

Nella società occidentale il benessere e la protezione degli animali sono valori indiscussi e condivisi, anche durante il momento della macellazione. Il consumatore europeo, infatti, è sempre più attento alle condizioni di *welfare* a cui sono sottoposti gli animali che entrano a far parte della catena alimentare.

Poiché l'abbattimento degli animali, in tutte le fasi del suo processo, può provocare dolore, ansia, paura, stress o sofferenze, è opportuno che questi ultimi vengano ridotti al minimo mediante l'adozione di provvedimenti adeguati.

Il Regolamento 1099/2009 del Consiglio (24 settembre 2009) [5] stabilisce le norme minime comuni per la protezione degli animali durante l'abbattimento. Tuttavia, tale normativa prevede il mantenimento della deroga allo stordimento degli animali prima della macellazione, concedendo un certo livello di sussidiarietà a ciascuno Stato membro. Nella maggior parte delle Nazioni UE, infatti, è possibile derogare lo stordimento degli animali prima della iugulazione, per fronteggiare una crescente richiesta da parte dei distributori di carne "halal".

Difficilmente risulta pertanto garantire la tutela del benessere animale e forti sono le pressioni affinché si introducano nuovi protocolli che consentano di tutelare il benessere animale, pur nel rispetto del rito religioso.

Il presente lavoro è volto alla valutazione dell'utilità di alcuni indicatori monitorati direttamente sull'animale durante le operazioni di macellazione, da poter utilizzare in futuro per meglio comprendere lo stato di sofferenza a cui sono sottoposti tali animali.

MATERIALI E METODI

Per lo sviluppo di questo progetto è stato selezionato un macello presso il quale vengono eseguite routinariamente macellazioni religiose. All'interno dello studio sono stati selezionati 29 bovini adulti macellati, senza stordimento preventivo, utilizzando il metodo islamico tradizionale (*halal*). L'uccisione degli animali, infatti, è avvenuta mediante il taglio dei grossi vasi del collo, senza essere stati preventivamente sottoposti allo stordimento. Per l'immobilizzazione è stata utilizzata la gabbia normalmente impiegata nella

macellazione convenzionale. L'operatore dedicato è rimasto lo stesso per tutta la sessione di macellazione.

Durante tutte le operazioni di macellazione sono state eseguite delle osservazioni comportamentali ed è stata compilata una check-list precedentemente redatta, al fine di ottenere tutti i dati utili a valutare il grado di incoscienza degli animali dopo la iugulazione.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Per ogni animale, oggetto di studio, è stata misurata la durata di tempo medio a partire dall'inizio della contenzione fino alla iugulazione. Questo tempo è stato, infatti, considerato come tempo necessario per posizionare l'animale in modo corretto e adatto alla iugulazione (tabella 1). Il tempo medio è risultato essere 30,48 secondi; tale valore risulta molto più basso rispetto a quanto descritto in un lavoro precedente [1]. La spiegazione più plausibile risiede in alcuni fattori quali le abilità dell'operatore, la struttura del macello, la velocità della linea di macellazione e le caratteristiche della gabbia di contenimento [3].

Il raggiungimento e il mantenimento dello stato di incoscienza si valutano attraverso l'osservazione di comportamenti e di riflessi neurovegetativi [1]. All'interno di tale progetto, la valutazione del grado di incoscienza è stata effettuata attraverso l'osservazione di alcuni indicatori di sensibilità diretti sugli animali, successivamente all'uscita dalla gabbia di contenimento (tabella 2). Il 75,9% degli animali ha mostrato assenza di respiro ritmico, mandibola rilassata, lingua pendente e assenza del riflesso corneale. La compresenza di tali indicatori, presumibilmente dovuta alla perdita di ossigenazione a livello cerebrale dopo recisione dei grandi vasi, potrebbe essere considerato un segno favorevole del grado di incoscienza degli animali.

Durante le osservazioni comportamentali un animale ha prodotto vocalizzazioni durante il decubito laterale post-iugulazione. La vocalizzazione è considerata come indicatore di uno stato di ansia e sofferenza. Al contrario, però, la sua assenza, non può considerarsi sempre un segno favorevole. Anche l'ammiccamento delle palpebre, riscontrato nel 17,2% degli animali, potrebbe essere considerato un indice di parziale sensibilità, soprattutto se associato a presenza del riflesso corneale (20,7%). I dati ottenuti, pertanto, documentano come alcuni animali abbiano mostrato segni evidenti di una probabile incoscienza, mentre alcuni, seppur in parte, hanno mostrato una risposta negativa alla valutazione degli indicatori correlati al benessere animale.

Tale lavoro può considerarsi un contributo scientifico utile per lo studio futuro di nuovi sistemi in grado di valutare con efficienza, il grado di incoscienza degli animali durante le macellazioni religiose. Inoltre, vuole rappresentare uno stimolo a migliorare il benessere animale durante tali pratiche nel rispetto della libertà di religione e di culto, come stabilito nella Carta dei diritti fondamentali dell'Unione Europea.

Tabella 1. Media (s), deviazione standard (s) e intervallo (s) della durata di tempo dall'inizio della contenzione fino al momento della iugulazione

	Tempo (s)
Media	30,48 secondi
Dev. Standard	16,71 secondi
Intervallo	14-85 secondi

Tabella 2. Indicatori del grado di incoscienza, valutati attraverso la compilazione di un'apposita check-list, sugli animali macellati

Indicatori stato di incoscienza	N° animali (%)
Tentativo di raddrizzamento	5 (17,2)
Movimenti di pedalamento	16 (55,2)
Riflesso corneale	6 (20,7)
Assenza respiro ritmico	22 (75,9)
Lingua pendente	22 (75,9)
Mandibola rilassata	22 (1075,9)
Pupilla fissa dilatata	8 (27,6)
Occhi chiusi	13 (44,8)
Movimento palpebrale	5 (17,2)
Fascicolazioni muscolari	2 (6,9)
Vocalizzazioni	1 (2,9)

BIBLIOGRAFIA

1. Cenci Goga B. E Fermani A.G. (2010) La macellazione religiosa. Protezione degli animali e produzione igienica delle carni. PVI Point Veterinaire Italie.
2. Farouk MM, Al-Mazeedi HM, Sabow AB, Bekhit AE, Adeyemi KD, Sazili AQ, Ghani A Halal and kosher slaughter methods and meat quality: a review.
3. Grandin T., Regenstein J.M. - 1994 Religious slaughter and animal welfare: a discussion for meat scientists. Meat Focus International March 1994, 115-123.
4. Von Holleben K., Von Wenzlawowicz M., Gregory N., Anil H., Velarde A., Rodriguez P., Cenci Goga B., Catanese B., Lambooij B. (2010) Report on good and adverse practices - Animal welfare concerns in relation to slaughter practices from the viewpoint of veterinary sciences. Dialrel Project.
5. Regolamento(CE) n° 1099/09 del Consiglio del 24/09/09 relativo alla protezione degli animali durante l'abbattimento.

SORVEGLIANZA SULLA DETENZIONE DEGLI ANIMALI ESOTICI NEI GIARDINI ZOOLOGICI: MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO PER LA VALUTAZIONE DEL BENESSERE IN CONDIZIONI DI CATTIVITÀ E COSTITUZIONE DI UNA BANCA GENETICA

Biolatti C¹, Modesto P¹, Dezzutto D¹, Grattarola C¹, Varello K¹, Colussi S¹, Peletto S¹, Riina MV¹, Caruso C¹, Pera F², Di Nucci E², Malusa F², Tarantola M², Rocca F³, Decaro N⁴, Leonardi C⁵, Favaro L⁶, Pessani D⁶, Trincas E⁷, Isajia V⁷, Piga S⁷, Gorla M¹, Dondo A¹, Mandola ML¹, Iulini B¹, Casalone C¹, Gennero S¹, Maurella C¹, Acutis PL¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino; ³ Parco faunistico "La Torbiera"; ⁴ Università degli Studi di Bari; ⁵ Azienda Sanitaria Locale ASL NO; ⁶ Laboratorio di Zoologia e Biologia Marina, Dip. Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi; ⁷ Zoom Torino

Key words: zoo, benessere, genetica

SINTESI

La ricerca si basava su due work package.

Nel WP1 sono stati valutati il benessere di tigri, ara gialloblu e marà per mezzo di uno studio etologico multizoo. Gli animali non mostravano grossi segni di stress e godevano di uno stato di benessere di base. E' stato evidenziato il ruolo chiave, per il benessere delle tigri, di una vasca con acqua pulita nell'enclosure. Si è inoltre appurato che le necessità sociali degli ara gialloblu possono essere soddisfatte anche dalla creazione di un gruppo con altre specie di psittacidi.

Altro scopo del WP1 è stato creare un modulo come guida alla valutazione del benessere degli animali negli zoo.

Scopo principale del WP2 è stato costituire una banca DNA di animali presenti negli zoo piemontesi. Sono stati raccolti campioni provenienti da 86 esemplari.

Dalla frequentazione delle strutture zoologiche sono nate alcune collaborazioni: uno studio genetico su una colonia di pinguini africani e un case report di febbre catarrale maligna in un pudu.

INTRODUZIONE

La ricerca, oggetto della presente relazione, si basava su due work package: il WP1 relativo alla valutazione del benessere degli animali ospitati all'interno degli zoo piemontesi e il WP2 sulla costituzione di una banca genetica. Obiettivi principali del WP1 sono stati valutare il benessere di tigri, ara gialloblu e marà ospitati nei giardini zoologici piemontesi e relazionarlo a variabili riguardanti la tipologia di enclosure, la gestione e la storia dell'animale. Altro scopo del WP1 è stato creare un modulo, da fornire ai veterinari pubblici, responsabili della vigilanza sui giardini zoologici, come guida alla valutazione del benessere degli animali ospitati negli zoo.

Scopo principale del WP2 è stato costituire una banca biologica in cui conservare il DNA del maggior numero possibile di esemplari presenti nei giardini zoologici piemontesi.

Grazie alla frequentazione delle strutture zoologiche messa in atto per sviluppare il WP1, sono nate alcune collaborazioni tra il nostro laboratorio e gli zoo stessi. In particolare, due studi sono particolarmente interessanti: un case report di febbre catarrale maligna in un pudu e le analisi genetiche effettuate su una colonia di pinguini africani, ospitata dallo zoo Zoom di Cumiana, al fine di determinare il sesso dei 56 soggetti formanti la colonia, condurre un'analisi di parentela e verificare la presenza di accoppiamenti al di fuori della coppia.

MATERIALI E METODI

WP1: E' stato condotto uno studio etologico multizoo a cui hanno partecipato i sei zoo (A, B, C, D, E, F) presenti sul territorio piemontese. Sono stati inclusi nello studio sette tigri (zoo A, B, C, D), 10 ara gialloblu (zoo B, C, E, F) e 14 marà (zoo B, D, E, F). Dopo uno studio pilota, sono stati stilati gli

etogrammi delle tigre, dell'ara gialloblu e del marà. Sono state programmate cinque visite per ogni zoo. Per tigri e pappagalli giallo-blu, i dati sono stati raccolti mediante instantaneous focal sampling, per i marà, tramite instantaneous scan sampling. La valutazione della precisione nel riconoscimento dei singoli comportamenti è stata effettuata prima di iniziare lo studio etologico. Al termine dello studio etologico, sono stati costruiti gli activity budget per ogni soggetto. I comportamenti dei marà sono stati raggruppati in non attivi, negativi e attivi e successivamente analizzati tramite statistica descrittiva. Per tigri e ara gialloblu, i comportamenti sono stati categorizzati in indicativi di benessere ridotto, potenziato e neutro. Un modello di regressione logistica multinomiale, un modello a effetti misti per dati binari e un modello di regressione logistica a effetti misti sono stati utilizzati per individuare in quale zoo gli animali avevano più possibilità di mostrare comportamenti indicativi di benessere potenziato e quali variabili avevano maggiore influenza sul benessere. Inoltre è stato creato un documento per la valutazione del benessere degli animali ospitati negli zoo. Il modulo è stato testato in campo da 11 veterinari nei sei zoo piemontesi. Per valutare la concordanza tra gli operatori è stato utilizzato il test Kappa di Cohen.

WP2: Per costituire la banca genetica sono stati raccolti i campioni biologici (pelo, aculei, feci, sangue, tessuti, penne) del maggior numero possibile di animali ospitati negli zoo piemontesi.

Ulteriori sviluppi:

Analisi genetiche su una colonia di pinguini: Cinquantasei individui sono stati coinvolti nello studio. Il sessaggio molecolare si è basato sulla valutazione della lunghezza del gene chromo-helicase-DNA-binding1 (CHD1), che si trova sui cromosomi sessuali. Per l'analisi di parentela sono stati inizialmente selezionati 21 microsatelliti. Di questi 11 sono stati scelti per creare due multiplex PCR: PNN01, PNN09, PNN12, B3-2, Sh1Ca16 e Sh1Ca17 per la prima e PNN05, PNN06, PNN07, PNN08 e Sh2Ca22 per la seconda. Sono stati calcolati la ricchezza allelica della popolazione e il coefficiente di inbreeding con relativo p-value. Al fine di individuare i legami di parentela tra i pinguini della colonia, i dati sono stati analizzati con il software COLONY.

Case report di febbre catarrale maligna in un pudu (Pudu pudu): Un pudu maschio di sei anni, proveniente da uno dei giardini zoologici partecipanti alla ricerca, è stato sottoposto a necropsia completa in seguito a morte improvvisa. Campioni di tessuto sono stati sottoposti ad analisi istologiche, batteriologiche, virologiche e tossicologiche. Per la diagnosi di FCM, è stata condotta una Real Time PCR utilizzando primer in grado di amplificare una regione del gene della DNA polimerasi dei seguenti virus: OvHV-2, AIHV-1, CpHV-2, MCFV-ibex e MCFV-WTD e una nested PCR in grado di individuare i virus appartenenti alla famiglia Herpesvirinae. I prodotti della PCR sono stati sequenziati e

le sequenze sono state comparate con quelle disponibili in GenBank.

RISULTATI E CONCLUSIONI

WP1: Tigre: Il comportamento maggiormente riportato è stato sleeping (32,64%), seguito da resting (27,5%) e walking (17,3%). Complessivamente, le tigri hanno mostrato comportamenti indicativi di stress per lo 0,69% delle osservazioni. In particolare il pacing è stato registrato lo 0,43% delle osservazioni, mentre non vi sono stati episodi di aggressione. Nell'insieme, i comportamenti indicativi di benessere sono stati osservati per l'11,74% delle registrazioni. I risultati del modello di regressione logistica multinomiale hanno permesso di stabilire che tigri ospitate nello zoo A (OR=4,11, CI95% 3,2-5,3) e C (OR=1,83, CI95% 1,4-2,4) avevano più possibilità di esprimere comportamenti indicatori di benessere potenziato, rispetto agli animali appartenenti alle strutture B e D. Tra le variabili riguardanti le peculiarità individuali degli animali, la loro gestione e le caratteristiche dell'enclosure, la presenza di una vasca con acqua pulita è risultata essere significativamente associata al benessere delle tigri (OR=2,04, CI95% 1,40-3,04).

Ara gialloblu: Il comportamento maggiormente riportato è stato resting (34,34%), seguito da preen (15,35%) e hang (17,30%). Complessivamente, gli ara gialloblu hanno mostrato comportamenti indicativi di stress per il 4,73% delle osservazioni. In particolare chew e tongue (entrambe stereotipie orali) sono state l'1,87% e l'1,51% delle osservazioni. I risultati del modello di regressione logistica multinomiale hanno permesso di stabilire che gli ara gialloblu ospitati nello zoo B (OR=6,76; CI95% 3,2-14,2) ed E (OR=3,14; CI95% 1,5-6,6) avevano più possibilità di esprimere comportamenti indicatori di benessere potenziato, rispetto agli animali appartenenti alle strutture C e F. Tra le variabili riguardanti le peculiarità individuali degli animali, la loro gestione e le caratteristiche della voliera, la presenza di psittacidi di specie diversa dall'*Ara araruna* ha mostrato una correlazione significativa con lo stato di benessere potenziato (OR=1,3; CI95% 1,1-1,9). Al contrario, la coabitazione con volatili di altre specie, non psittaciformi, è implicata nella manifestazione di comportamenti indicativi di benessere ridotto (OR=0,44; CI95% 0,22-0,87). Anche le dimensioni della voliera sono risultate avere un ruolo chiave nel benessere di questi animali (OR=2,6; CI95% 1,4-4,8).

Marà: Il comportamento maggiormente riportato è stato rest (61,14%), seguito da interaction with environment/conspicuous (6,74%) e chew (5,78%). Comportamenti negativi sono stati osservati lo 0,28% delle registrazioni, mentre la percentuale di tempo attivo è stata del 29,07%.

Form per la valutazione del benessere negli zoo: I valori di concordanza tra gli operatori variavano tra $k=0,4$ (CI95% 0,28-0,53) e 0,9 (CI95% 0,72-1,00).

L'analisi degli activity budget dei soggetti delle tre specie ha suggerito che gli animali oggetto di studio non mostravano grossi segni di stress e godevano di uno stato di benessere di base, probabilmente il risultato degli sforzi che gli zoo hanno fatto per ridurre i comportamenti anormali, tramite l'adeguamento delle enclosure e della gestione. Comportamenti manifestamente stereotipati sono stati osservati con basse frequenze e maggiormente negli ara (ripetitive behaviours 0,90% e stereotipie orali 3,38%). È stato evidenziato, per la prima volta in modo statisticamente significativo, il ruolo chiave, per il benessere delle tigri, di una vasca con acqua pulita nell'enclosure e, per gli ara giallo blu, di una voliera di grandi dimensioni. Si è inoltre appurato che le necessità sociali degli ara gialloblu possono essere soddisfatte dalla creazione di un gruppo anche con altre specie di psittacidi, ma non di altri volatili. Dalla valutazione

della concordanza tra i veterinari che hanno testato il documento di valutazione del benessere degli animali negli zoo è emerso che questo modulo potrebbe rivelarsi un eccellente strumento e merita di essere condiviso con tutti gli interessati.

WP2: Durante i quattro anni di durata della ricerca, sono stati raccolti nella banca genetica campioni biologici provenienti da 86 animali, di cui 64 appartenenti alla classe Aves, 20 alla classe Mammalia e due alla classe Reptilia.

La scarsa adesione al progetto può essere in parte dovuta alla difficoltà nel reperire le matrici biologiche di interesse: anche se il campionamento non è invasivo, il solo contenimento è molto stressante per questi animali. Altra causa potrebbe essere la sicurezza, a volte malriposta, che gli zoo pongono nella documentazione che accompagna ogni soggetto.

Ulteriori sviluppi:

Analisi genetiche su una colonia di pinguini: La sequenza del gene mitocondriale cytb ottenuta dal soggetto Umbo ha dimostrato elevata similarità per sequenze depositate di pinguino di Humboldt rispetto a quelle di pinguino africano. Il sessaggio molecolare ha permesso l'assegnazione del sesso a 30 individui comprendenti nuovi nati e animali in età prepubere. Il sesso assegnato dai keepers è stato confermato in 25 casi, in un pinguino si è rivelato errato: l'animale, considerato maschio, è risultato essere femmina. L'albero genealogico creato tramite certificati di nascita dei singoli individui e osservazioni di campo è stato per lo più confermato: sono state individuate quattro discordanze tra le relazioni di parentela osservate e quelle emerse dall'analisi dei dati.

Il nostro studio ha reso possibile l'attribuzione certa del sesso in tutti i soggetti al momento presenti della colonia. L'analisi di parentela è la prima effettuata in una colonia di pinguini africani ospitata in uno zoo europeo e ha evidenziato la presenza di cinque "cambi di coppia" nel corso degli anni. Inoltre, l'albero genealogico realizzato a partire dall'osservazione delle coppie è stato perfezionato e modificato grazie ai dati genetici, permettendo ai curatori della colonia di effettuare scelte più oculate sugli animali da destinare alla riproduzione e quelli da movimentare.

Case report di febbre catarrale maligna in un pudu (*Pudu pudu*): Sia la PCR condotta per la diagnosi di FCM che la PCR pan-herpesvirus hanno dato risultato positivo nei seguenti organi provenienti dal pudu: polmone, rene, milza, encefalo, lingua e intestino tenue. Le sequenze ottenute dai prodotti PCR hanno mostrato un'omologia del 99% con una porzione del gene della DNA polimerasi del CpHV-2 (AF283477). Tutte le altre analisi sono risultate negative. Secondo gli autori, questo è il primo caso di FCM, causata da CpHV-2, descritto in un cervo pudu. In questo caso non è stato possibile individuare l'origine del virus. Portatrici sane possono essere le capre in transumanza che si fermavano, per alcuni giorni, nei pascoli adiacenti alla struttura. In conclusione, il percorso di diagnosi differenziale, in caso di morte di ruminanti esotici deve comprendere CpHV-2, anche se non vi sono indicazioni cliniche di FCM manifesta.

VALUTAZIONE DELLA PROBABILITA' DI INTRODUZIONE DEL VIRUS DELLA WEST NILE DISEASE IN UNA REGIONE CONSIDERATA LIBERA DA MALATTIA

Maurella C¹, Bertolini S¹, Desiato R¹, Ingravalle F¹, Casalone C¹, Iulini B¹, Florio C¹, Pautasso A¹, Mandola L¹, Rizzo F¹, Previto G¹, Ballardini M¹, Barcucci E¹, Orusa R¹, Robetto S¹, Spedicato R¹, Ru G¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta;

Key words: West nile, risk assessment, mappa

SINTESI

La recente diffusione del virus West Nile (WNV) nel bacino del Mediterraneo ci ha spinti a produrre una valutazione semi-quantitativa del rischio di introduzione e diffusione di tale virus in Piemonte, per permettere una maggior rapidità di intervento ed un risparmio di risorse. La rete di sorveglianza, attiva e passiva, è pertanto stata potenziata ed i dati ottenuti sono stati integrati in modello concettuale che ha permesso di ottenere e validare una mappa di rischio. Sono state riscontrate positività per Usutu, Marisma, Mosquito flavivirus e WNV. L'individuazione del WNV nelle zanzare ha evidenziato la necessità di proseguire con un efficace sistema di sorveglianza: se questo tipo di attività non fosse stato avviato, l'introduzione del virus della WN in Piemonte non si sarebbe riscontrato

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni la diffusione dell'infezione West Nile ha interessato parecchi paesi del bacino del Mediterraneo. Per l'Italia rappresenta una malattia da vettori emergente caratterizzata da un impatto potenzialmente importante a livello di sanità pubblica: il virus nel 2014 è stato rilevato per il settimo anno consecutivo causando oltre alle notifiche sui cavalli e sugli uccelli, anche casi umani di cui alcuni deceduti. Nel solo 2014 sono stati segnalati nell'uomo 21 casi confermati di malattia neuroinvasiva causati da WNV. L'obiettivo generale del progetto era quello di produrre una valutazione semi-quantitativa del rischio di introduzione e diffusione del virus della WN in Piemonte, per permettere una maggior rapidità di intervento ed un risparmio di risorse.

MATERIALI E METODI

Gli obiettivi specifici del lavoro possono essere così riassunti: A. Potenziamento dell'attività di sorveglianza attiva e passiva effettuata a livello regionale, attraverso una valutazione della distribuzione spazio-temporale dei vettori presenti e della loro potenziale competenza nei confronti del WNV; B. Costruzione di una mappa del rischio per integrare informazioni provenienti da diversi settori scientifici. A questo scopo il territorio regionale è stato suddiviso in celle di dimensioni pari a 20X20 km per avere una divisione omogenea del territorio. Parte delle attività è stata svolta in collaborazione con strutture dell'IZSPV non originariamente coinvolte nel progetto iniziale e con l'IPLA, creando un unico "gruppo di studio vettori" e identificando obiettivi comuni o specifici per ciascuna struttura. Tale approccio ha permesso di ottenere risultati altrimenti non raggiungibili, ottimizzando le risorse finanziarie di diversi progetti e condividendo competenze specifiche in settori differenti. Sono state svolte le seguenti attività:

A.1 Sorveglianza sulle zanzare, composta a sua volta da:

1) Sorveglianza entomologica: sono state posizionate trappole per la cattura delle zanzare dal 2011 al 2014. Il risultato delle catture è stato sottoposto ad un'analisi descrittiva iniziale e ad una valutazione attraverso tecniche di analisi delle serie temporali, con integrazione dei dati agrometeorologici.

2) Sorveglianza virologica: è stata condotta su una parte delle trappole posizionate considerando specifici fattori di rischio e criteri logistici.

A.2 Sorveglianza passiva : raccolta di dati su carcasse di volatili selvatici rinvenuti morti e cavalli e asini con sintomatologia nervosa.

B. Realizzazione di una mappa del rischio : per il calcolo del rischio di introduzione a livello di ciascuna cella della mappa, è stato sviluppato un modello concettuale costituito da quattro percorsi principali (scenari ad albero) e originanti da nodi non del tutto indipendenti tra di loro. All'interno dello stesso percorso si ha una probabilità condizionata sulla linea orizzontale, mentre una somma sulle colonne che rappresentano tutti i possibili eventi presenti su uno stesso nodo.

I quattro percorsi partono rispettivamente, per ciascuna cella, da:

- 1) rischio zanzare (densità dei vettori);
- 2) rischio uccelli (cella attraversata da una rotta di uccelli migratori e presenza di avifauna stanziale);
- 3) rischio ambiente (tipo di copertura del suolo e idrologia regionale);
- 4) rischio geografico (condivisione di un confine con una provincia positiva per WN e celle positive per Mosquito flavivirus / Marisma o per Usutu).

Il grado di rischio di ciascuna cella è dato dall'integrazione dei quattro percorsi.

Le positività per WNV rilevate in 2 pool alla fine della stagione del 2014 non sono state utilizzate nel modello finale ma per validare il modello.

RISULTATI E CONCLUSIONI

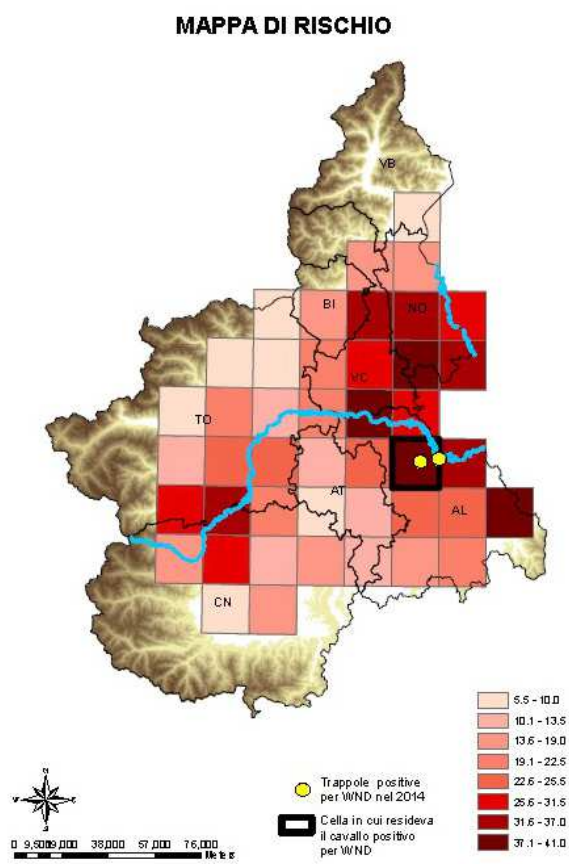
Sono state catturate un totale di 122.260 zanzare durante 1.882 sessioni di cattura.

Le specie *Culex pipiens* ed *Ochlerotatus caspius* rappresentano le più frequenti, evidenziando la presenza nella nostra regione di numerosi vettori competenti per la trasmissione della malattia. In totale sono state testate 47.046 zanzare per la ricerca di virus.

Sono state riscontrate positività per Usutu, Marisma, Mosquito flavivirus e WNV.

Sviluppato il modello concettuale di analisi del rischio è stata realizzata la mappa di rischio (Figura 1): le celle della mappa geografica di tonalità più scura sono quelle caratterizzate da un rischio di introduzione del virus più alto rispetto alle altre. La localizzazione delle trappole positive in celle con gradazione scura conferma la bontà del modello. L'individuazione del virus nelle zanzare ha evidenziato la necessità di proseguire con un efficace sistema di sorveglianza: se questo tipo di attività non fosse stato avviato, l'introduzione del virus della WN in Piemonte non si sarebbe riscontrato. In tale contesto, l'applicazione di una sorveglianza risk based permette di rendere il sistema più efficiente e quindi anche meno costoso

Figura 1 - Mappa di rischio di introduzione dell'infezione West Nile, frutto dell'integrazione dei 4 percorsi identificati nel modello concettuale



I MECCANISMI DI AMILOIDOGENESI COME NUOVO APPROCCIO AI TEST DIAGNOSTICI NELLE MALATTIE DA PRIONE

Favole A¹, Mazza M¹, Vallino Costassa E¹, D'Angelo A², Lombardi G³, Martinelli N³, Avanzato T¹, Meloni D¹, Orrù CD⁴,
Hughson A⁴, Acutis PL¹, Zanusso G⁵, Caughey B⁴, Casalone C¹, Corona C¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² Università di Torino, Dipartimento di Scienze Veterinarie;
³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; ⁴ Rocky Mountain Laboratories, National Institute for Allergy and Infectious Diseases, (MT, USA); ⁵ Università di Verona, Dipartimento di Neuroscienze e del Movimento

Key words: EST, RT-QuIC, Amiloidogenesi

SINTESI

La diffusione dell'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) nei piccoli ruminanti è una questione importante per la sorveglianza delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST). Pertanto lo sviluppo di un nuovo approccio per la diagnosi *ante mortem* potrebbe aiutare a ridurre il rischio di diffusione epidemica delle EST animali. Lo scopo di questo studio era di esaminare l'uso del test Real-Time QuIC (RT-QuIC) per la diagnosi delle EST nelle capre. I nostri risultati indicano che l'RT-QuIC può sensibilmente rilevare l'attività di seeding associata sia alla PrP^{Scrapie} che alla PrP^{C-BSE} e PrP^{BASE} nei tessuti cerebrali di capra in meno di 40 ore. Inoltre, la nostra capacità di rilevare diluizioni fino a 10⁻⁸ in tutti i tessuti cerebrali di capre infettate da vari ceppi prionici indica che l'RT-QuIC è sensibile almeno quanto i saggi biologici di infettività. Tutti i ceppi della PrP^{Sc} di capra sono stati rapidamente individuati anche nel liquido cerebrospinale (CSF) utilizzando le nuove e migliorate condizioni del protocollo di RT-QuIC.

INTRODUZIONE

La diffusione della BSE nei piccoli ruminanti è ad oggi uno dei punti di maggior interesse nella sorveglianza delle Encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) poiché non si può escludere che, in passato, anche la popolazione ovicaprina si sia trovata esposta in condizioni naturali a questo tipo di infezione. Inoltre, il passaggio dell'agente infettivo in un nuovo ospite può determinare una variazione delle proprietà del ceppo prionico e rendere difficile il riconoscimento del ceppo originario, aumentando il rischio della diffusione epidemica dell'agente infettivo. Ad oggi non sono stati riportati casi di BSE naturale negli ovini, mentre dal 2005, sono stati identificati due casi di BSE nella capra [1,2]. Su queste basi, lo sviluppo di un nuovo approccio per la diagnosi *ante mortem* e la caratterizzazione dei ceppi delle EST dei ruminanti potrebbe aiutare a ridurre il rischio di diffusione epidemica delle EST animali. Il presente progetto di ricerca si è pertanto proposto di verificare l'applicabilità del metodo RT-QuIC nella diagnostica delle EST dei piccoli ruminanti. In particolare, è stata valutata la sensibilità e la specificità del test nel rilevare la presenza della PrP^{Sc} in omogenati di cervello e nel liquido cerebrospinale (CSF) di animali infettati naturalmente e sperimentalmente con Scrapie e con isolati di BSE e BASE. Nell'ambito dello stesso progetto, il gruppo capofila ha inoltre svolto un'intensa attività di ricerca per caratterizzare nella specie bovina la deposizione di sostanza β -amiloide (A β) a livello del sistema nervoso centrale. Lo studio aveva infatti anche lo scopo di indagare il ruolo e la distribuzione della Beta amiloide nella specie bovina. Tuttavia ampia parte di questi risultati sono stati già oggetto di un precedente abstract per cui non saranno riportati anche in questo lavoro.

MATERIALI E METODI

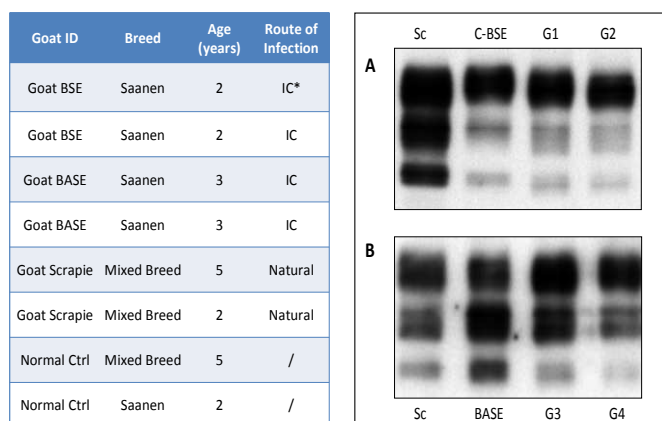
Omogenati di cervello caprino (10% peso/volume) normali (n=2) e provenienti da casi italiani di Scrapie (n=2) o da animali sperimentalmente inoculati con C-BSE (n=2) o BASE

(n=2) sono stati preparati e testati in western blot come descritto in precedenza [3]. Per l'analisi in RT-QuIC, gli omogenati di cervello sono stati diluiti in 0.1% SDS-PBS come precedentemente riportato [3]. La miscela di reazione di RT-QuIC (RTQ Buffer) aveva la seguente composizione: 10 mM tampone fosfato, 300 mM NaCl, 10 μ M ThT, 10 μ M EDTA e 0.1 mg/mL di rPrP. Il RTQB è stato caricato nei pozzetti di una multiwell da 96 con il fondo trasparente e le reazioni avevano come seed 2 μ L di diluizione di tessuto cerebrale o 10 μ L di CSF per un volume finale per reazione di 100 μ L. Le multiwell sono state sigillate ed incubate in un BMG Fluostar plate reader a 42°C o 55°C per 90 ore con cicli di 1 minuto di agitazione (700 rpm) ed 1 minuto di pausa durante tutto il periodo di incubazione della reazione. Le misurazioni della fluorescenza (ThT) sono state eseguite automaticamente dallo strumento ogni 45 minuti.

RISULTATI E CONCLUSIONI

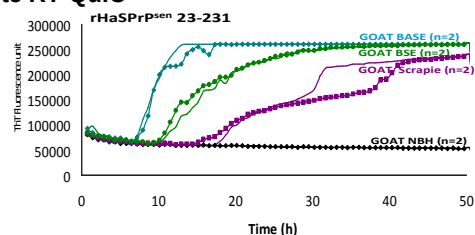
In questo studio abbiamo valutato la specificità e la sensibilità della tecnica di RT-QuIC per rivelare l'attività di seeding associata al prione in tessuti cerebrali e nel liquido cerebrospinale provenienti da animali naturalmente e sperimentalmente infettati con Scrapie o isolati di C-BSE e BASE bovina (Tabella 1).

Figura e Tabella 1 – Animali campionati



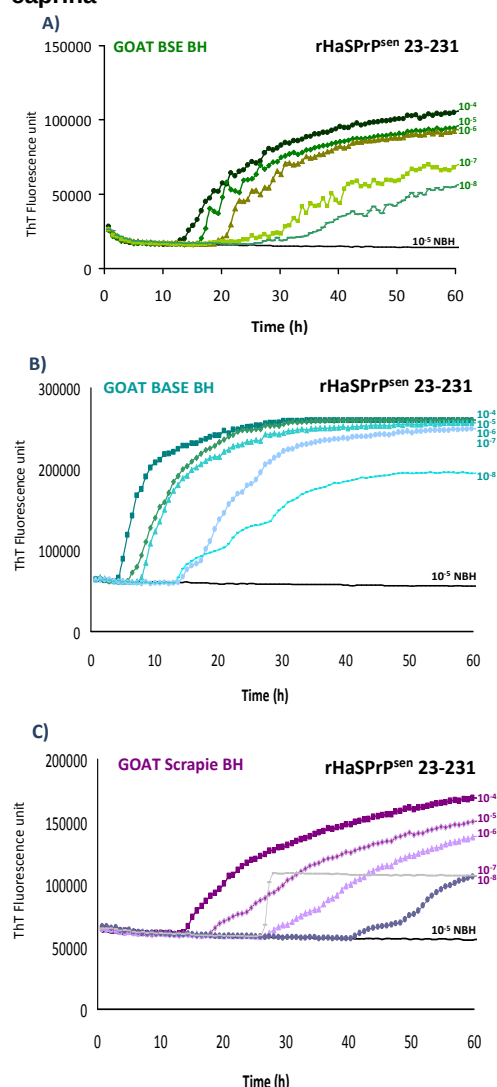
In tabella 1 sono riportati i dati epidemiologici degli animali testati in questo studio. I tessuti cerebrali sono stati testati in western blot per saggiare la presenza della PrP^{Sc} prima di procedere alle analisi in RT-QuIC (Figura 1 A e B).

Figura 2 – Rilevazione dei ceppi di EST nei caprini mediante RT-QuIC



La figura 2 riporta i risultati delle prove di RT-QuIC sulla rilevazione di PrP^{BASE} , $\text{PrP}^{\text{C-BSE}}$ e $\text{PrP}^{\text{Scrapie}}$ da omogenati cerebrali di capra. Il substrato $\text{rHaSPrP}^{\text{sen}} 23-231$ è stato utilizzato per rilevare sia la PrP^{BASE} (azzurro), la $\text{PrP}^{\text{C-BSE}}$ (verde) e la $\text{PrP}^{\text{Scrapie}}$ (viola). Gli omogenati di controllo di cervello provenienti da capre normali (nero) non hanno mostrato alcuna risposta. Il numero di campioni testato è riportato tra parentesi.

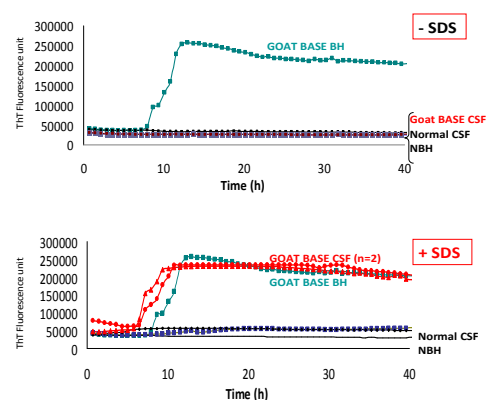
Figura 3 – Sensibilità di Rilevazione in RT-QuIC dei ceppi di EST caprina



In figura 3 sono rappresentate le sensibilità di rilevazione in RT-QuIC di $\text{PrP}^{\text{C-BSE}}$ (tonalità di verde), PrP^{BASE} (tonalità di azzurro), e $\text{PrP}^{\text{Scrapie}}$ (sfumature violacee) in omogenati di cervello (BH), utilizzando la $\text{rHaSPrP}^{\text{sen}} 23-231$ come substrato. Le diluizioni sono indicate accanto alla curva. Per ottimizzare ulteriormente le condizioni, abbiamo esaminato gli effetti della temperatura, come delle

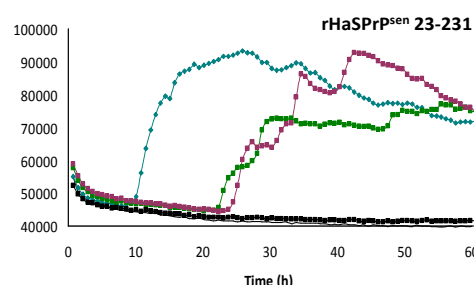
concentrazioni di sodio dodecil solfato (SDS) sulle reazioni di RT-QuIC utilizzando il CSF come innesco di reazione. L'incremento medio della fluorescenza è stato più forte e più veloce per il CSF infettato con BASE, che mostra segnali positivi rispetto ai campioni di controllo già dopo 10 h, rispetto alle 40 che sono necessarie per le reazioni in assenza di SDS. Per questo motivo abbiamo scelto di utilizzare l'SDS nelle analisi successive.

Figura 4 – Analisi del CSF di capre affette da BASE utilizzando le nuove condizioni del protocollo di RT-QuIC



In figura 4 è riportato il confronto tra le analisi di RT-QuIC utilizzando la $\text{rHaSPrP}^{\text{sen}} 90-231$ con o senza la presenza di SDS nel buffer di reazione. I CSF provenienti da due capre affette da BASE e da capre non infette sono stati testati a 55°C utilizzando la $\text{rHaSPrP}^{\text{sen}} 90-231$ come substrato con (inferiore) o senza (superiore) l'aggiunta di SDS. Simboli distinti rappresentano campioni di BASE differenti.

Figura 5 – Rilevazione in RT-QuIC di PrP^{BASE} , $\text{PrP}^{\text{C-BSE}}$ e $\text{PrP}^{\text{Scrapie}}$ dal CSF di capra



Le nuove condizioni migliorate del protocollo di RT-QuIC (55°C e l'aggiunta di SDS alla concentrazione finale dello 0,002%) sono state quindi utilizzate per rilevare sia la PrP^{BASE} (azzurro) che la $\text{PrP}^{\text{C-BSE}}$ (verde) e la $\text{PrP}^{\text{Scrapie}}$ (viola) nel CSF utilizzando il substrato $\text{rHaSPrP}^{\text{sen}} 23-231$. Il CSF del controllo normale (nero) non ha mostrato alcuna risposta (figura 5).

Presi insieme questi dati sono indicativi del grande potenziale di questi test di amplificazione del prione *in vitro* per la diagnosi *ante mortem* delle malattie da prioni nei piccoli ruminanti. Abbiamo prove sperimentali preliminari che dimostrano che l'RT-QuIC è un metodo sensibile e specifico per rilevare l'attività di seeding associata al prione nel liquido cerebrospinale di capre sintomatiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Spiropoulos J, Lockey R et al. Emerg Infect Dis. 2011 Dec;17(12):2253-61.
2. Eloit M, Adjou K et al. Vet Rec. 2005 Apr 16;156(16):523-4.
3. Orrù CD, Favole et al. J Clin Microbiol. 2015 Apr; 53(4):1115-20.

ALLESTIMENTO IN-HOUSE DI UN DATABASE PER LA GESTIONE DEI CEPPI BATTERICI ISOLATI PRESSO L' IZS PLV, ASSOCIATO ALLO STUDIO DELLE ANTIBIOTICO-RESISTENZE NEGLI ANIMALI SELVATICI

Domenis L¹, Restivo F¹, Orusa R¹, Robetto S¹, Spedicato R¹, Pepe E¹, Desantis E², Aliberti E², Dondo A³, Zoppi S³

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta: ¹SC Valle d' Aosta/Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Animali Selvatici (CeRMAS); ²SS Gestione impianti e Sistemi Informativi e Telematici ; ³SC Diagnostica Generale.

Key words: database, ceppo batterico, antibiotico-resistenza

SINTESI

Le attività individuate nel titolo del progetto hanno espresso i seguenti risultati.

1) Realizzazione di un database mediante la modifica della funzione "Ceppi" del sistema informatico SIGLA; per soddisfare le informazioni necessarie per la catalogazione di ogni ceppo batterico, sono stati inseriti i seguenti label: data di allestimento, genere e specie, fenotipo e genotipo, profilo biochimico, processo patologico, vitalità del ceppo, laboratorio di allestimento, modalità di conservazione, scadenza stoccaggio.

2) Studio delle antibiotico-resistenze in 287 ceppi di microrganismi patogeni isolati da animali selvatici (in prevalenza camoscio e cinghiale): 30 *Pasteurella* spp. (rilevati 2 ceppi MDR/Multi Drug Resistant), 64 *Staphylococcus aureus* (rilevati 2 ceppi MDR), 88 *Salmonella* spp. (rilevati 12 ceppi MDR) e 105 *Corynebacterium pseudotuberculosis* (con resistenze prevalenti a cloxacillina e sulfametossazolo-trimethoprim).

INTRODUZIONE

Con il presente progetto, ci siamo posti lo scopo di valorizzare le raccolte di ceppi batterici isolati negli anni presso le sezioni diagnostiche IZSPLV di Torino e di Aosta. Attualmente i rispettivi laboratori dispongono di circa 800 ceppi provenienti da animali selvatici e 8000 ceppi provenienti da animali domestici. Con l'intento di razionalizzare il materiale in nostro possesso, abbiamo realizzato un sistema di archiviazione informatico, capace di evidenziare ed integrare le caratteristiche correlate ad ogni singolo stipite (in particolare modo, origine geografica, animale di provenienza, processo patologico, antibiotipo, profilo biochimico, genotipo). Sfruttando la creazione del software e la rivitalizzazione dei ceppi che tale attività ha richiesto, abbiamo inoltre operato uno studio preliminare delle antibiotico-resistenze negli animali selvatici. Com'è noto, la fauna selvatica è da considerarsi un bioindicatore "privilegiato" per vari aspetti ambientali (ad es. variazioni climatiche, inquinamento, ecc.), non ultimo l'eventuale diffusione di cloni batterici antibiotico-resistenti provenienti dall'uomo oppure dagli animali da reddito e d'affezione.

MATERIALI E METODI

Per l'organizzazione informatica delle collezioni batteriche detenute presso le sezioni diagnostiche IZSPLV di Torino e di Aosta è stata sfruttata la funzione "Ceppi" contenuta in SIGLA 4, il programma in uso presso il nostro Istituto per l'accettazione dei campioni e la refertazione delle analisi. La funzione, in origine creata per l'archiviazione di vaccini stabulogeni e autovaccini, è stata adattata alle nostre esigenze grazie ad interventi correttivi apportati dalla ditta che ha sviluppato il software (Krene-Gruppo Bassilichi).

Per quanto riguarda invece i ceppi da sottoporre allo studio dell'antibiotico-sensibilità, l'attenzione è stata rivolta – sia per la valenza patogena dimostrata negli animali selvatici (per lo più camoscio e cinghiale), sia per il potenziale zoonotico – a *Pasteurella* spp. (n. 30 ceppi), *Staphylococcus aureus* (n. 64 ceppi), *Salmonella* spp. (n. 88 ceppi) e *Corynebacterium*

pseudotuberculosis (n. 105 ceppi). Per testare la sensibilità agli antibiotici di *Pasteurella* spp, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. è stato utilizzato il classico test di Kirby-Bauer che prevede la semina di un inoculo batterico su piastra insieme a dischetti a concentrazione nota di antibiotico, con valutazione successiva del diametro degli aloni di inibizione.

Per testare la sensibilità agli antibiotici di *Corynebacterium pseudotuberculosis* è stato utilizzato sia il metodo Kirby Bauer (su 61 ceppi) sia il metodo della microdiluzione in brodo (su 105 ceppi) per la definizione della MIC (Minimum Inhibitory Concentration) come prescritto per *Corynebacterium* spp. dalla norma CLSI M45-A2 (che mutua le indicazioni della ISO/FDISA 20776). Il metodo della microdiluzione è basato sulla preparazione di soluzioni a concentrazione crescente dei principi antibatterici, che vengono dispensati nei pozzetti di una micropiastra – in proporzione 1:1 – insieme all'inoculo del ceppo. Oltre a penicillina, vancomicina, eritromicina e gentamicina - gli antibiotici di prima scelta indicati dal protocollo CLSI per *Corynebacterium* spp. - è stata valutata la MIC dei seguenti principi attivi: cloxacillina, cefotaxime, ampicillina, tetraciclina, sulfametossazolo-trimethoprim, amoxicillina-acido clavulanico, amoxicillina e ciprofloxacina.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Per quanto riguarda il primo obiettivo, la funzione "Ceppi" è stata modificata sulla base delle informazioni ritenute indispensabili per caratterizzare ogni isolato batterico ovvero, oltre alle usuali note anamnestiche (origine geografica, animale di provenienza, ecc.), data di allestimento, genere e specie, fenotipo e genotipo, profilo biochimico, processo patologico, vitalità del ceppo, laboratorio di allestimento, modalità di conservazione, scadenza stoccaggio (Vedi Fig. 1). L'esistenza di collezioni batteriche detenute a livello dei singoli laboratori dell'Istituto ha già favorito in passato la realizzazione di numerose pubblicazioni scientifiche che divulgavano appunto approfondimenti di studio su stipiti rivitalizzati a posteriori. Il nuovo archivio informatico renderà accessibili a tutti le informazioni relative ai ceppi stoccati, favorendo ulteriori percorsi futuri, tra cui: formazione del personale, studi epidemiologici sulla base dei profili genetici, vendita di ceppi selezionati, utilizzo del database per l'archiviazione di altri microrganismi (virus, miceti, ecc.).

Figura 1: Schermata per l'inserimento di un ceppo batterico nel database (Funzione Ceppi-Sigla 4)

Tabella 1: Sensibilità agli antibiotici di 30 ceppi di *Pasteurella* spp. (9 *P. multocida*, 17 *M. haemolytica*, 5 *P. spp.*) isolati da camoscio (28) e capriolo (2). Metodo Kirby Bauer.

PRINC. ATTIVO	S	I	R
Amoxicillina	97%(29)	0%(0)	3%(1)
Ampicillina	80%(24)	0%(0)	20%(6)
Amox-Ac.clav.	97%(29)	0%(0)	3%(1)
Penicillina	63%(19)	0%(0)	37%(11)
Cloxacillina	33%(10)	7%(2)	60%(18)
Oxacillina	87%(26)	0%(0)	13%(4)
Cefalessina	100%(30)	0%(0)	0%(0)
Cefalotina	100%(30)	0%(0)	0%(0)
Cefuroxime	100%(30)	0%(0)	0%(0)
Cefoxitine	100%(30)	0%(0)	0%(0)
Cefotaxime	97%(29)	3%(1)	0%(0)
Cefquinone	100%(30)	0%(0)	0%(0)
Cephalonium	20%(30)	30%(9)	50%(15)
Enrofloxacin	100%(30)	0%(0)	0%(0)
Marbofloxacin	100%(30)	0%(0)	0%(0)
Tiamfenicolo	97%(29)	3%(1)	0%(0)
Cloramfenicolo	100%(30)	0%(0)	0%(0)
Neomicina	64%(19)	33%(10)	3%(1)
Streptomycin	57%(17)	30%(9)	13%(4)
Gentamicina	100%(30)	0%(0)	0%(0)
Eritromicina	17%(5)	43%(13)	40%(12)
Tetraciclina	100%(30)	0%(0)	0%(0)
Sulfam-Trimet	100%(30)	0%(0)	0%(0)
Spectinomycin	100%(30)	0%(0)	0%(0)
Tilmicosina	90%(27)	10%(3)	0%(0)
Aminosidina	80%(24)	17%(5)	3%(1)

Tabella 2: Sensibilità agli antibiotici di 64 ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati da cinghiale (43), camoscio (13), capriolo (4) e stambecco (4). Metodo Kirby Bauer.

PRINC. ATTIVO	S	I	R
Amoxicillina	75%(48)	22%(14)	3%(2)
Ampicillina	58%(37)	16%(10)	26%(17)
Amox-Ac.clav.	95%(61)	2%(1)	3%(2)
Penicillina	95%(61)	0%(0)	5%(3)
Cloxacillina	91%(58)	3%(2)	6%(4)
Oxacillina	92%(59)	5%(3)	3%(2)
Cefalessina	81%(52)	16%(11)	3%(2)
Cefalotina	98%(63)	2%(1)	0%(0)
Cefuroxime	96%(62)	2%(1)	2%(1)
Cefoxitine	86%(55)	8%(5)	6%(4)
Cefotaxime	14%(9)	78%(50)	8%(5)
Cefquinone	100%(64)	0%(0)	0%(0)
Cephalonium	95%(61)	2%(1)	3%(2)
Enrofloxacin	100%(64)	0%(0)	0%(0)
Marbofloxacin	100%(64)	0%(0)	0%(0)
Tiamfenicolo	58%(37)	39%(25)	3%(2)
Cloramfenicolo	98%(63)	2%(1)	0%(0)
Neomicina	80%(51)	20%(13)	0%(0)
Streptomycin	81%(52)	19%(12)	0%(0)
Gentamicina	98%(63)	2%(1)	0%(0)
Eritromicina	8%(5)	86%(55)	6%(4)
Tetraciclina	96%(62)	2%(1)	2%(1)
Sulfam-Trimet	100%(64)	0%(0)	0%(0)
Spectinomycin	19%(12)	59%(38)	22%(14)
Tilmicosina	98%(63)	0%(0)	2%(1)
Aminosidina	97%(62)	3%(1)	0%(0)

Per quanto riguarda *Salmonella* spp. la percentuale di ceppi resistenti sugli 88 isolati (per lo più da volpe, mustelidi e avifauna selvatica) è risultata la seguente: amikacina (0%), streptomycin (46.6%), neomicina (7.9%), gentamicina (0%), kanamicina (4.5%), ampicillina (13.6%), amoxicillina-acido clavulanico (7%), cefotaxime (0%), cefalotina (1%), cloramfenicolo (1%), colistina (1%), acido nalidixico (3.4%), enrofloxacin (3.4%), ciprofloxacina (0%), sulfametossazolo-trimethoprim (1%), ossitetraciclina (72.3%), tetraciclina (81.8%). Il profilo MDR (Multi Drug Resistant, ovvero resistenza a 3 o più classi di antibiotici), è stato osservato su due ceppi di *Pasteurella* spp., 2 di *Staphylococcus aureus* (di cui uno resistente a ben 11 molecole) e 12 di *Salmonella* spp. Significativo è il fatto che ad albergare gli stipiti di *Salmonella* MDR – per inciso in forma del tutto asintomatica - siano soprattutto la volpe e gli uccelli selvatici predatori, animali che per le loro diverse abitudini (frequentazione di discariche e ambienti urbani e peri-urbani per i primi, possibilità di percorrere lunghe distanze, maggior contatto con acque reflue e rifiuti per i secondi) possono essere definiti come sinantropi, cioè vicini ai territori dove vive l'uomo. Analogamente alle nostre osservazioni, vari Autori [1] riferiscono che gli uccelli predatori, insieme all'avifauna acquatica, sono i reservoir privilegiati di ESBL-*Escherichia coli* e Vancomycin-resistant-enterococchi. Riguardo a *Corynebacterium* spp. secondo i breakpoints stabiliti dal CLSI, i ceppi testati con il metodo della microdiluzione sono risultati in prevalenza resistenti ad amoxicillina (76.1%), amoxicillina-acido-clavulanico (82.7%), cloxacillina (81.9%) e sulfametossazolo-trimethoprim (38%). I dati di resistenza (a parte la cloxacillina e il sulfametossazolo-trimethoprim) non sembrano confermati dai test eseguiti con il Kirby-Bauer (prevalenza ceppi resistenti/antibiotico: 11.5% penicillina, 6.6% ampicillina, 1.6% cefalotina, 85.3% cloxacillina, 21.3% eritromicina, 3.3% neomicina, 41% streptomycin, 26.3% sulfametossazolo-trimethoprim). Tale discrepanza è analoga a quanto osservato da Weiss et al. [2], i quali su 101 isolati di *Corynebacterium* spp. hanno rilevato che solo il 48% dei ceppi sensibili alle penicilline con il metodo Kirby-Bauer si comportava allo stesso modo se testati con il metodo per la MIC. In conclusione, il fatto di dimostrare la presenza in animali selvatici di batteri insensibili ad uno o più antibiotici, e soprattutto di ceppi MDR come rilevato nel caso di *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella* spp. e *Salmonella* spp., desta particolare attenzione, soprattutto alla luce dei recenti allarmi lanciati dalle organizzazioni sanitarie mondiali riguardo all'antibiotico-resistenza [3,4]. Considerato che animali a vita libera non hanno mai subito alcun trattamento farmacologico, si può a ragione ipotizzare che gli stipiti antibiotico-resistenti isolati possano essere il frutto della pressione selettiva causata da terapie umane e/o veterinarie, con successiva diffusione (per inquinazione ambientale o per contatto diretto con i portatori) alle specie selvatiche colpite, oggetto del nostro studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Silva N., Ingrejas G., Rodrigues P., Rodrigues T., Gocalves A., Radhouani H., Rodrigues J. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum beta-lactamases-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from Azores Archipelago. Avian Pathol. 40, 2011, pp 473-479
2. Weiss K., Laverdière M., Rivest R. Comparison of Antimicrobial Susceptibilities of *Corynebacterium* Species by Broth Microdilution and Disk Diffusion Methods. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996, 40, 4, pp 930-933
3. Surveillance Report. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2013. European Centre for Disease Prevention. www.ecdc.europa.eu.
4. Antimicrobial Resistance. WHO Global Report on Surveillance. Section 1: Resistance to antibacterial drugs.
5. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf

CANINE DISTEMPER VIRUS: INDAGINE SULLA CIRCOLAZIONE DI CDV NEI CARNIVORI SELVATICI SENSIBILI ALL'INFEZIONE DEL NORD OVEST ITALIANO E ANALISI FILOGENETICA DEGLI ISOLATI

Di Blasio A¹, Masoero L¹, Gorla M¹, Peletto S¹, Casalone C¹, Varello K¹, Chiavacci L¹, Robetto S¹, Mignone W¹, Dondo A¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ²

Key words: cimurro, filogenesi, alpi occidentali

SINTESI

Wildlife Europe 2006-2009 è un sottogruppo virale del *lineage* Europe/South America 1 responsabile dal 2006 di un'epidemia di Cimurro nei carnivori selvatici alpini. Il progetto di ricerca è stato avviato con lo scopo di verificarne la presenza nel Nord-Ovest Italiano. Sono stati analizzati 557 carnivori selvatici mediante indagini dirette e indirette ottenendo positività in tutte le specie delle tre regioni indagate oltre all'isolamento di CDV in animali provenienti dalla Valle d'Aosta. L'analisi filogenetica indicava l'appartenenza delle sequenze al *lineage* Europe-1 e dimostrava una diffusione multi-ospite nelle popolazioni selvatiche delle Alpi occidentali di un CDV strettamente correlato allo stipite responsabile della nota epidemia. Il progetto di ricerca oltre a colmare la mancanza di dati relativi alla diffusione del CDV nell'arco alpino occidentale ha fornito una base diagnostica solida per lo studio di altre malattie con epidemiologia simile.

INTRODUZIONE

Canine Distemper Virus (CDV) è l'agente causale del cimurro, una malattia contagiosa dei carnivori. La trasmissione avviene prevalentemente mediante aerosol o secreti ed essudati, con manifestazioni cliniche variabili in base alla patogenicità del ceppo e all'immunità dell'ospite. Il CDV è un virus a RNA a singolo filamento, non segmentato, a polarità negativa appartenente alla famiglia *Paramyxoviridae* e genere *Morbillivirus*. Il suo genoma codifica per sei proteine strutturali, tra cui l'emoagglutinina (H) coinvolta nelle fasi di adsorbimento cellulare e trasmissione intercellulare dell'infezione, la quale, essendo frequentemente interessata da variazioni genetiche e antigeniche, viene usata negli studi volti alla distinzione dei *lineage* genetici e classificazione degli stipiti circolanti [1]. In Italia è riconosciuta la circolazione di tre *lineage* genetici di CDV: Europe/South America 1, European Wildlife e Arctic-like. Il Wildlife Europe 2006-2009, un distinto sottogruppo del *lineage* Europe 1, è responsabile della recente epidemia transnazionale europea di CDV che dal 2006 coinvolge carnivori selvatici dell'arco alpino orientale con un fronte di avanzamento diretto verso ovest [2,3]. Le analisi filogenetiche di tutti i ceppi isolati hanno evidenziato una mutazione della proteina H, associata ad un ampliamento dello spettro d'ospite e incremento della sua virulenza [3]. L'ampia circolazione virale descritta e la mancanza di dati riguardanti il territorio alpino occidentale hanno promosso l'avvio di un progetto di ricerca nel 2013. Lo scopo di tale progetto era quello di verificare la presenza della malattia nel nostro territorio e contribuire alla definizione di un quadro attendibile della sua diffusione mediante la messa a punto e applicazione di un protocollo diagnostico standardizzato integrato da un'analisi filogenetica dei ceppi circolanti.

MATERIALI E METODI

Il progetto di ricerca condotto dal 2013 al 2015 ha coinvolto 9 Unità Operative dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta (IZSPLV), distribuite tra i laboratori diagnostici di Torino, Imperia ed Aosta. Il campione era costituito da carnivori e mustelidi selvatici

rinvenuti morti sul territorio, cacciati (volpi) o sottoposti a eutanasia a causa di gravi patologie, integrato da carnivori domestici con sospetta infezione da CDV. Per ogni animale sono state raccolte informazioni anamnestiche mediante una modulistica e un database formato Access creati *ad hoc*. Su tutti gli animali è stato eseguito un esame necroscopico e, successivamente all'esito negativo del test per la ricerca del virus della Rabbia, uno screening con tecniche di immunofluorescenza diretta (IFD) e biomolecolari (RT-PCR one step) in uso presso i laboratori dell'IZSPLV per la ricerca di CDV su tessuto polmonare e nervoso. Parallelamente è stata eseguita una real time RT-PCR messa a punto e validata nei laboratori del CeRMAS su milza, polmone e SNC. In base al referto necroscopico le indagini sono state integrate da ulteriori esami per un'efficace diagnosi differenziale. Sugli organi di animali con sintomatologia e/o lesioni macroscopiche compatibili con infezione da CDV sono stati effettuati esami neuropatologici, istopatologici e immunohistochimici. Per tutti i campioni risultati positivi alle indagini di screening è stato eseguito l'isolamento virale su monostrato cellulare, utilizzando linee cellulari Vero Dog SLAM. Infine su ogni isolato identificato dalla RT-PCR one-step sono state determinate le sequenze del gene H e confrontate con quelle di riferimento depositate nel database GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Le sequenze consenso generate mediante assemblaggio con il software SeqMan (Lasergene package, DNASTAR Inc.) sono state allineate con 99 sequenze di riferimento dei diversi *lineage* di CDV utilizzando BioEdit v. 7.0.5.3. L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando il programma MEGA6 secondo il metodo della massima verosimiglianza (*maximum likelihood method*, ML) e la robustezza dell'albero è stata determinata mediante test di *bootstrap* selezionando 1.000 reiterazioni. Parallelamente è stata condotta un'indagine sierologica su campioni ematici applicando una metodica ELISA per la determinazione semiquantitativa del titolo anticorpale degli anticorpi IgG specifici per CDV (kit commerciale prodotto da Biopronix e distribuito da Agrolabo). A conclusione delle attività diagnostiche è seguita un'analisi descrittiva e statistica dei risultati (test del chi quadrato e indice K di Koehn).

RISULTATI E CONCLUSIONI

Sono stati esaminati 557 carnivori per un totale di 2467 esami. Durante l'esecuzione degli esami necroscopici sono stati osservati vari stadi d'infezione da CDV caratterizzati da congiuntivite sierose e/o mucopurulente, polmonite interstiziale diffusa, scolo nasale mucopurulento, ipercheratosi dei cuscinetti plantari (Hard Pad Disease) e del tartufo, splenomegalia, necrosi multifocali epatiche e spleniche, enterocolite e cistite catarrale-emorragica. I risultati degli esami istopatologici, immunohistochimici, di IFD e RT-PCR vengono riassunti in tabella 1. I quadri istopatologici risultavano sovrapponibili a quanto descritto in bibliografia [4] eccetto che per il frequente riscontro di corpi inclusi intracitoplasmatici o intranucleari dell'epitelio di transizione. Tali considerazioni insieme alle positività ottenute da tamponi rettali e tracheali analizzati (sebbene in numero limitato) mediante real time RT-PCR (tutt'ora in uso nei

laboratori del CeRMAS secondo una Procedura Operativa Standard), suggeriscono la possibilità del ricorso ad escreti e secreti come matrici idonee per la diagnosi in vita di CDV. Infine risulta interessante sottolineare il rilievo a livello encefalico di positività all'esame immunoistochimico in assenza di lesioni infiammatorie compatibile con una morte ai primi stadi d'infezione.

Tabella 1 – Risultati delle indagini istopatologiche, immunoistochimiche, di IFD e RT-PCR,

	Tessuto Polmonare	Sistema Nervoso Centrale
Metodo/esame	Pos/n*	Pos/n*
IFD	50/523	41/534
RT-PCR	148/529	138/539
Istologico (E-E)	24/28	/
Neuropatologico (E-E)	/	15/38
Immunoistochimico	7/8	19/26

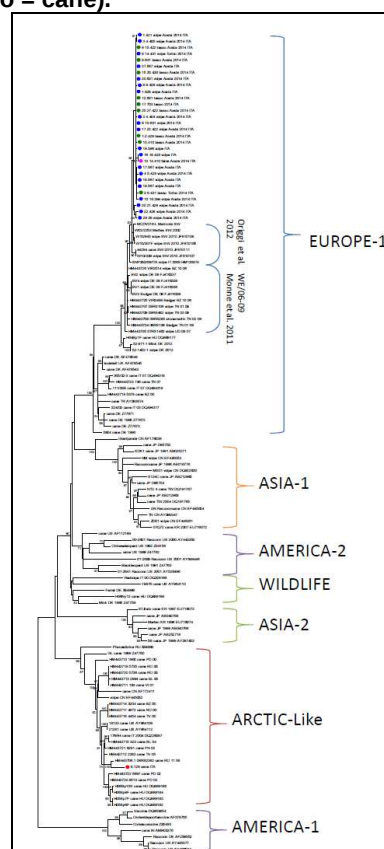
*influenzato dalla qualità/quantità del campione; inoltre, gli esami istologici, neuropatologici e immunoistochimici sono stati eseguiti solo su animali con lesioni e/o sintomi sospetti

Anche se non è noto quale sia il titolo anticorpale protettivo nei selvatici, il 29,8% di sieropositività ottenuto conferma, seppur con un'immunità di popolazione differente, la circolazione di CDV nei carnivori selvatici nel territorio indagato. Essendo il campione costituito per la metà da animali rinvenuti morti non è stato possibile garantire un adeguato stato di conservazione per tutte le matrici collezionate e ciò ha inciso sulle *performances* diagnostiche di alcuni test, come l'analisi filogenetica, l'isolamento virologico o l'IFD. Nonostante ciò in 5 volpi e 2 tassi è stato isolato CDV. Le tecniche biomolecolari applicate si sono invece dimostrate un utile mezzo diagnostico di screening anche per campioni in cattivo stato di conservazione. Per quanto riguarda l'analisi filogenetica (Fig. 1), tutte le sequenze sono risultate appartenenti al *lineage* Europe-1 e portatrici della mutazione amminoacidica Y→H in posizione 549, presente negli stipiti di CDV dei focolai tedeschi e italiani e di quelle in posizione 266 (L→F), 590 (S/T→I) e 597 (R→H) tipiche del cluster Wildlife Europe 2006-2009. Sebbene sia stato possibile analizzare solo una sequenza del gene H di CDV canino, il dato ottenuto è in accordo con studi precedenti [3] riguardo la presenza di CDV Arctic-like nei cani in Italia fin dal 2000 e l'assenza di *spill over* del cluster Wildlife Europe/06-09 alla popolazione canina probabilmente dovuta alla mancanza di contatto o a un adattamento di questo stipite agli ospiti selvatici. Per quanto riguarda i test di significatività, le associazioni individuate identificano il polmone come matrice più idonea per la diagnosi di cimurro mediante RT-PCR (57,7% di sensibilità, contro il 54,5% che si ottiene utilizzando il SNC) e i giovani ($\chi^2 = 6,53$; $p < 0,05$) come classe di età più suscettibile all'infezione. Inoltre, il territorio valdostano viene considerato come "area a rischio" ($\chi^2 = 16,123$; $p < 0,0001$) e ciò è avvalorato anche dalle segnalazioni di sintomatologie e/o mortalità anomale osservate dal Settembre 2013 in volpi e mustelidi del territorio. Infine l'analisi statistica eseguita ha stabilito come significativa ($\chi^2 = 8,24$; $p < 0,05$) l'elevata frequenza di positività del 2013 riconducibile ad un andamento epidemico e successivo declino della malattia. La mancanza di una sufficiente conoscenza dell'epidemiologia della malattia nel nostro territorio non ha reso possibile la definizione di un piano di campionamento idoneo per la determinazione di valori di prevalenza e incidenza. Per tali considerazioni il progetto di ricerca è stato strutturato con lo scopo di ottenere il maggior numero di dati utili all'acquisizione di informazioni riguardanti eziologia e patogenesi oltre che a mettere a punto un idoneo iter diagnostico. I risultati ottenuti forniscono dunque una base

diagnostica solida e standardizzata per il proseguimento dello studio riguardo la diffusione spazio-temporale della malattia, lo stato immunitario di popolazione e i ruoli epidemiologici delle diverse specie selvatiche, applicabile anche per altre malattie con epidemiologia simile.

Il progetto è stato realizzato con il prezioso contributo di: Grattarola C, D'Errico V, Pinto L, Soncin A e Perruchon M della SS Patologia Animale, Caruso C, Prato R, Angiolillo S e Biosi T della SS Virologia, Sant S, Ferraro G e Romano A della SS Microbiologia Molecolare e Analisi Genomiche, Acutis PL e Trisorio S della SS Genetica e Immunobiochimica, Iulini B e Florio CL della SS Neuropatologia, Di Vietro D della SS Istopatologia, Travaglio S, Irico L e Radaelli C della SS Osservatorio Epidemiologico, Orusa R, Domenis L, Guidetti C e Pepe E del CeRMAS, Spina S e Durante S, della Sezione di Imperia.

Figura 1 – Albero filogenetico ottenuto da un allineamento di 130 sequenze del gene H di CDV (1.659 bp) con indicazione mediante cerchi colorati delle sequenze generate (blu = volpe; verde = tasso; rosa = faina; rosso = cane).



BIBLIOGRAFIA

1. Nikolin, V.M., Wibbelt, G., Micler, F.U., Wolf, P., East, M.L., (2012). Susceptibility of carnivores hosts to strains of canine distemper virus distinct genetic lineages. *Veterinary Microbiology*, 156 (1.2), 45-53.
2. Sekulin, K., Hafner-Marx, A., Kolodziejek, J., Janik, D., Schmidt, P., Nowotny, N., (2011). Emergence of canine distemper in Bavarian wildlife associated with a specific amino-acid exchange in the hemagglutinin protein. *Veterinary Journal* 187 (3): 399-401.
3. Monne, I., Fusaro, A., Valastro, V., Citterio, C., dalla Pozza, M., Obber, F., Trevisiol, K., Cova, M., De Benedictis, P., Bregoli, M., Capua, I., Cattoli, G., (2011). A distinct CDV genotype causing a major epidemic in Alpine wildlife. *Veterinary Microbiology* 150 (1-2):63-69
4. Caswell, J.L., Williams K.J., (2007). Respiratory System. In Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N.C. Elsevier - Saunders, Pathology of domestic animals

STUDI MOLECOLARI E DI VALIDAZIONE DELLA CATENA β DEL FIBRINOGENO QUALE POTENZIALE MARCATORE DIAGNOSTICO INTRA-VITAM PER LA SCRAPIE OVINA

Mazza M¹, Guglielmetti C¹, D'Angelo A², Candiano G³, Acutis PL¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, ² Università degli Studi di Torino, Clinica Medica Veterinaria, Grugliasco; ³ Ospedale Gaslini, Laboratorio di Fisiopatologia dell'Uremia, Genova

Key words: scrapie, proteomica, β -fibrinogeno

SINTESI

Il presente lavoro ha approfondito un precedente Progetto di Ricerca e, mediante tecniche di proteomica, si prefiggeva di valutare la specificità del β fibrinogeno quale marcatore di scrapie classica negli ovini, valutarne le possibili modifiche post-traduzionali associate alla patologia e ricercare marcatori plasmatici addizionali per una diagnosi *ante-mortem*. Gli studi condotti hanno mostrato una mancanza di specificità del β fibrinogeno quale marcatore di scrapie ovina, mentre quelli di caratterizzazione molecolare hanno rivelato isoforme diverse di questa proteina tra ovini scrapie negativi e positivi, forse dovute a modificazioni post-traduzionali correlate alla patologia. Inoltre, la ricerca di marcatori addizionali, ed in particolare lo studio degli esosomi, ha permesso di evidenziare nel proteoma di tali vescicole un altro target molto promettente per una diagnosi *ante-mortem* di scrapie.

INTRODUZIONE

La scrapie è una malattia neurodegenerativa, appartenente al gruppo delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST), che colpisce gli ovi-caprini. Il controllo di queste malattie risulta difficoltoso in quanto non è possibile al momento effettuare una diagnosi *ante-mortem*, per questo motivo negli ultimi anni particolare attenzione è stata rivolta allo sviluppo di diverse tecniche diagnostiche anche di tipo indiretto, miranti a ricercare mediante tecniche di proteomica dei marcatori diagnostici alternativi alla proteina prionica patologica. Nel corso degli ultimi anni, infatti, diversi studi condotti nel campo delle EST umane e animali hanno permesso di identificare diversi marcatori proteici verosimilmente associati a queste neuropatologie [1-2]. Nell'ambito di un precedente progetto di ricerca (IZS PLV 05/08 RC), mediante elettroforesi bidimensionale (2DE) e sfruttando la tecnologia del ProteoMiner® Protein Enrichment Kit (Bio-Rad), basata sulla concentrazione delle proteine meno espresse, è stata evidenziata nel plasma di ovini affetti da scrapie classica, una sovra-espressione statisticamente significativa di due spot proteici identificati, mediante spettrometria di massa, come due isoforme della catena β del fibrinogeno.

Gli obiettivi del presente progetto di ricerca sono stati:

- la valutazione della specificità del β fibrinogeno quale marcatore di scrapie classica negli ovini;
- la valutazione delle possibili modifiche post-traduzionali della catena β del fibrinogeno nel processo patologico della scrapie ovina;
- la ricerca di marcatori plasmatici addizionali al fine di giungere ad una diagnosi *ante-mortem*.

MATERIALI E METODI

Valutazione della specificità del fibrinogeno:

Le analisi sono state condotte su campioni di plasma prelevati da 5 ovini con sintomatologia neurologica non ascrivibile ad EST e da 4 animali con patologie infiammatorie di varia natura. I campioni sono stati preparati utilizzando il kit ProteoMiner®, secondo il protocollo fornito dalla ditta. Gli estratti proteici sono stati successivamente sottoposti ad elettroforesi bidimensionale (2DE) e le mappe

proteiche, ottenute in triplicato da ogni campione, sono state analizzate con il software "BioNumerics® 2D Gel Types" (Applied Maths). Al fine di verificare la specificità del β fibrinogeno come marcatore di scrapie, le mappe ottenute da questi campioni sono state confrontate con quelle ottenute dai campioni scrapie positivi e negativi analizzati nel corso del precedente progetto (IZS PLV 05/08 RC).

Caratterizzazione molecolare della catena β del fibrinogeno:

Sono stati applicati due differenti approcci analitici:

d) Two Dimensional Differential In Gel Electrophoresis (2D-DIGE) su campioni di plasma prelevati da ovini scrapie positivi e scrapie negativi, precedentemente preparati con il kit ProteoMiner®. Le mappe proteiche, ottenute dopo elettroforesi bidimensionale, sono state acquisite mediante Typhoon 9400 (GE-Healthcare), impostando i parametri per le cianine Cy3 e Cy5. L'analisi delle immagini è stata effettuata tramite il software Image Quant (GE-Healthcare).

e) Preparazione della frazione β del fibrinogeno da campioni di plasma, prelevati da ovini sani e affetti da scrapie, tramite un protocollo analitico di precipitazione in metanolo. Al fine di confermare la presenza della catena β del fibrinogeno nella frazione di precipitazione selezionata, sugli estratti sono state condotte prove di immunoblotting rivelando poi gli immunosegnali sia attraverso reazioni di chemiluminescenza sia di fluorescenza.

Ricerca di marcatori plasmatici addizionali per una diagnosi *ante-mortem*:

Sono stati seguiti due approcci analitici diversi:

1. analisi di campioni di plasma preparati con il kit ProteoMiner®, utilizzando per la rivelazione degli spot proteici l'Oriole® Fluorescent Stain (Bio-Rad), una colorazione fluorescente più sensibile rispetto al metodo con il Blue Silver;
2. analisi del proteoma di microvescicole (esosomi) ottenuti mediante diverse procedure di centrifugazione dei campioni di plasma prelevati da ovini sani e affetti da scrapie. Gli esosomi sono stati ottenuti tramite diverse fasi di centrifugazioni e ultracentrifugazioni, al termine delle quali sono stati sottoposti ad analisi bidimensionale. Le mappe proteiche sono state colorate con l'Oriole®.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Valutazione della specificità del fibrinogeno:

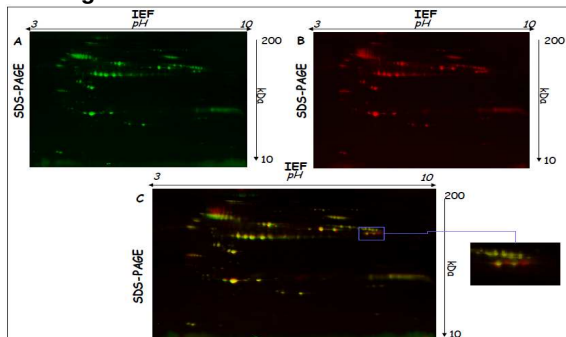
L'analisi comparativa delle mappe proteiche ottenute da animali affetti da varie patologie infiammatorie e da animali con sintomatologia nervosa non ascrivibile ad EST ha mostrato un profilo proteico simile a quello ottenuto dai campioni prelevati in ovini affetti da scrapie classica naturale, caratterizzato da una sovra-espressione statisticamente significativa delle due isoforme della catena β del fibrinogeno rispetto ai campioni scrapie negativi. Tale risultato ha chiaramente indicato una mancanza di specificità di tale marcatore nei confronti della scrapie ovina, almeno per quanto concerne il dato quantitativo relativo al livello di espressione della proteina.

Caratterizzazione molecolare della catena β del fibrinogeno:

L'analisi 2D-DIGE delle proteine totali plasmatiche preparate con il kit ProteoMiner® e trattate con differenti cianine, ha

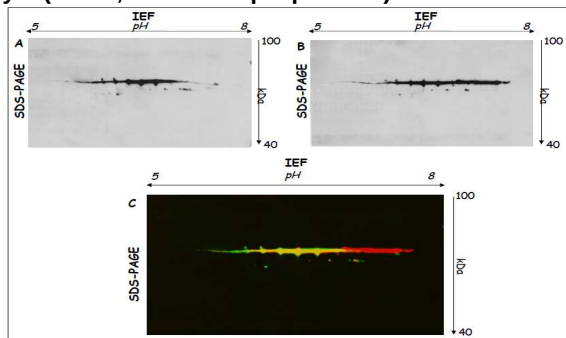
evidenziato un netto spostamento di carica, verso il polo basico, della frazione β del fibrinogeno negli animali affetti da scrapie, come evidenziato nella Figura 1.

Figura 1: Analisi 2D-DIGE rappresentativa delle proteine plasmatiche preparate con ProteoMiner®, rivelate con (A) Cy-5, verde, ovino scrapie negativo) e (B) Cy-3, rosso, ovino scrapie positivo; (C) sovrapposizione delle due immagini.



Tali risultati sono stati confermati anche dalle analisi di immunoblotting (Figura 2).

Figura 2: Immunoblotting della frazione β del fibrinogeno rappresentativa di un campione ovino scrapie negativo (A) e positivo (B) rivelata mediante chemiluminescenza. Sovrapposizione di immagini di immunoblotting della frazione β del fibrinogeno (C) immunorivelate con Cy-5 (verde, ovino scrapie negativo) e Cy-3 (rosso, ovino scrapie positivo).

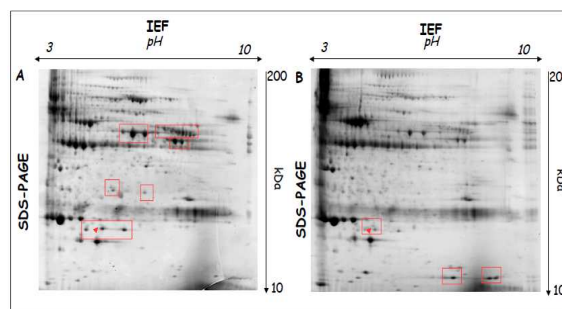


Lo spostamento delle isoforme potrebbe indicare una possibile riduzione di cariche negative sulle due subunità β del fibrinogeno nei campioni affetti da scrapie, oppure un aumento di cariche positive sulla molecola, ad esempio per fenomeni di glicosilazione, importanti nel regolare le funzioni di alcune proteine chiave nei processi patologici [3].

Ricerca di marcatori plasmatici aggiuntivi per una diagnosi ante-mortem:

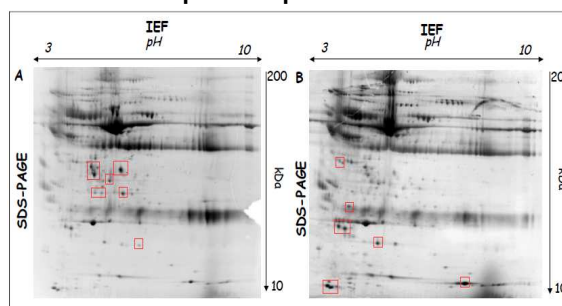
Le analisi bidimensionali condotte sui campioni di plasma ovino prelevati da animali scrapie positivi e negativi, trattati con ProteoMiner® e colorati con Oriole®, oltre a confermare la sovra-espressione degli spots corrispondenti alle due subunità β del fibrinogeno (pI 6,5-7 e PM 65-70 kDa) negli ovini scrapie positivi rispetto ai negativi, hanno evidenziato differenze statisticamente significative nei livelli di espressione e nel pattern di diverse altre proteine plasmatiche (Figura 3). L'utilizzo dell'Oriole® ha portato al raddoppiamento degli spot rilevati.

Figura 3: Analisi 2DE rappresentativa dei campioni di plasma di ovini positivi (A) e negativi (B) per scrapie, preparati con il ProteoMiner® e colorati con Oriole®. Nei riquadri rossi sono evidenziati una serie di spot proteici sovra-espressi in un campione rispetto all'altro.



Anche lo studio del proteoma degli esosomi, ottenuti per centrifugazione dai campioni di plasma di ovini positivi e negativi per scrapie e colorati con Oriole®, ha portato all'individuazione di diverse proteine sovra-esprese in un campione rispetto all'altro (Figura 4).

Figura 4: Analisi 2DE rappresentativa del proteoma degli esosomi ottenuti per centrifugazione dai campioni di plasma di ovini positivi (A) e negativi (B) per scrapie. Nei riquadri rossi sono evidenziati gli spot proteici sovra-espressi in un campione rispetto all'altro.



Gli esosomi, il cui contenuto è tipico del tessuto di derivazione e protetto dalle proteasi extracellulari [4], rappresentano un altro target molto promettente per future diagnosi ante-mortem di scrapie.

Sebbene da queste indagini sia emersa un'assenza di specificità del fibrinogeno β quale marcatore ante-mortem di scrapie ovina, gli studi di caratterizzazione molecolare hanno permesso di evidenziare la presenza di differenze rilevanti tra le isoforme di questo marcatore in animali scrapie positivi e negativi. Ulteriori studi saranno necessari per definire un loro possibile ruolo nella patologia. La ricerca di marcatori aggiuntivi ha inoltre mostrato come diverse strade siano percorribili, attraverso l'applicazione di sistemi di analisi più sensibili e lo studio del profilo proteico di nuovi target quale gli esosomi.

I risultati ottenuti confermano le potenzialità delle tecniche proteomiche, seppur lunghe ed indagose, nella ricerca di biomarcatori in tale ambito.

BIBLIOGRAFIA

1. Simon SLR, Lamoureux L, Plews M et al. The identification of disease-induced biomarkers in the urine of BSE infected cattle; *Proteome Science* 2008; 6:23.
2. Fratini F, Principe S, Puopolo M et al. Increased levels of acute-phase inflammatory proteins in plasma of patients with sporadic CJD; *Neurology* 2012; 79(10):1012-8.
3. Karlaftis V, Perera S, Monagle P et al. Importance of post-translational modifications on the function of key haemostatic proteins; *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015 Oct 17. [Epub ahead of print]
4. Boukouris S, Mathivanan S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers; *Proteomics Clin Appl* 2015 Apr; 9(3-4):358-67.

STUDIO DELLA PREVALENZA DI INFEZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI SOTTOTIPI DI BPV ASSOCIATI AL SARCOIDE EQUINO E VALUTAZIONE PRELIMINARE DI UN AUTOVACCINO CONTRO LA PAPILOMATOSI EQUINA

Miceli I¹, Grindatto A¹, Ferraro G¹, Callipo R¹, Crescio M¹, Varello K¹, Bozzetta E¹, Goria M¹, Nappi R¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

Key words: Bovine papillomavirus, Sarcoide equino, PCR

SINTESI

I Bovine Papilloma Virus sono un gruppo di virus oncogeni che infettano principalmente la specie bovina. Recentemente è stato visto come i BPV rappresentano anche il principale agente eziologico per lo sviluppo del sarcoide equino. Sono stati analizzati 71 campioni di lesioni patologiche asportate chirurgicamente da bovini (67), da 1 equino e da 3 asini; le lesioni sono state esaminate mediante tecniche istologiche di routine, PCR e analisi di sequenziamento.

Questo studio ha indagato le caratteristiche istopatologiche e molecolari legate all'infezione di BPVs, la frequenza dell'infezione da BPV associata al S.E. ed è stato testato in via sperimentale un vaccino inattivato contro la papillomatosi equina. Le analisi in PCR e di sequenza hanno evidenziato positività per i campioni in esame rivelando la presenza di diversi ceppi virali, e casi di co-infezione virale. Anche nei campioni di equidi è stata rilevata la presenza di BPV1, dato che conferma il suo ruolo nello sviluppo del tumore.

INTRODUZIONE

I BPV sono un gruppo di virus appartenenti alla famiglia Papillomaviridae che, soprattutto nella specie bovina, determinano varie tipologie di lesioni a livello della cute e delle mucose con esiti che possono variare da forme benigne di papillomatosi a neoplasie aggressive del tratto digerente e della vescica urinaria [1]. Benchè i BPV non determinino di norma la morte dei bovini affetti, sono responsabili di ingenti perdite economiche dal momento che, determinando rallentamento dell'accrescimento, perdita di peso e diminuzione della produzione di latte e negli animali colpiti, incidono pesantemente sulle performance produttive aziendali [2]. Al momento sono stati identificati e caratterizzati 14 BPV suddivisi in 4 generi: Xipapillomavirus (BPV3, 4, 6, 9, 10, 11 e 12), Deltapapillomavirus (BPV1, 2, 13, 14), Epsilonpapillomavirus (BPV5, 8) e Dyoxipapillomavirus (BPV7) [3].

Numerosi studi hanno dimostrato nel tumore cutaneo più diffuso negli equidi (Sarcoide Equino) la presenza e l'espressione di DNA virale di BPV, supportando l'ipotesi che l'infezione attiva da BPV possa essere associata al SE.

Il Sarcoide equino rappresenta il tumore cutaneo più diffuso negli equidi (particolarmente presente nei cavalli, nei muli e negli asini) ed è caratterizzato da una bassa probabilità di regressione e da un'alta percentuale di recidive dopo l'intervento chirurgico. Sebbene il SE non rappresenti un pericolo per la vita dell'animale, esso costituisce un problema di benessere animale in quanto, a seconda della localizzazione, è responsabile di danni funzionali che compromettono i movimenti e provocano lesioni che ulcerandosi possono dare luogo ad infezioni secondarie.

Scopo di questo lavoro è quello di effettuare una caratterizzazione delle lesioni istopatologiche determinate dai BPV completata da indagini filogenetiche, di studiare la frequenza dell'infezione da BPV associata al S.E. in animali afferenti al territorio di competenza dell'IZSPLV e di sperimentare un vaccino inattivato contro la papillomatosi equina.

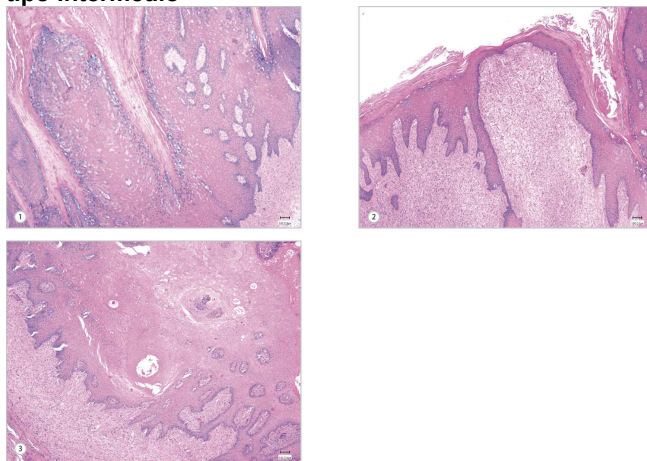
MATERIALI E METODI

Nell'ambito di questo studio, sono stati analizzati 71 campioni (67 prelevati da bovini, 1 da un equino e 3 da asini) di cute con lesioni papillomatose pervenuti all'Istituto Zooprofilattico.

I campioni, fissati in formalina neutra tamponata al 10% e processati secondo le procedure standard di inclusione in paraffina, sono stati sottoposti a colorazione con Ematossilina Eosina. I quadri istopatologici sono stati classificati in: papilloma squamoso, fibropapilloma e lesioni di tipo intermedio (Fig. 1). I campioni sono inoltre stati analizzati con metodica PCR utilizzando 2 coppie di primers specifici per le regioni conservate del gene L1 dei BPV (Maeda *et al.*, 2007[4]): Sottogruppo A (Deltapapillomavirus: BPV1, 2, 13; Epsilonpapillomavirus: BPV5, 8) e Sottogruppo B (Xipapillomavirus: BPV3, 4, 6, 9, 10, 11, 12).

Ulteriori analisi di sequenziamento seguite da studi di filogenesi sono state condotte su campioni selezionati in virtù della significatività dei casi clinici e della loro distribuzione geografica.

Figura 1. Quadri istopatologici (Ginn *et al.*, 2007[5]). (1) Papilloma squamoso, (2) Fibropapilloma, (3) Lesioni di tipo intermedio



RISULTATI E CONCLUSIONI

Tutti i campioni analizzati sono stati identificati come papillomi. In particolare, il 55% dei campioni sono stati classificati come fibropapilloma, il 42% come papilloma squamoso e 3% hanno rivelato lesioni di tipo intermedio.

Le indagini in PCR hanno individuato la presenza di BPV, in particolare positività per BPV-Subgroup A e in particolare due campioni sono anche risultati positivi per BPV-Subgroup B. L'analisi di sequenza ha permesso di identificare il genere Deltapapillomavirus [BPV1(82,6%), BPV2(8,7%)] e Xipapillomavirus [BPV3(4,35%), BPV9(4,35%)]. I due campioni positivi per BPV-Subgroup A e BPV-Subgroup B hanno rivelato la co-infezione di BPV 1 e BPV3 e di BPV1 e BPV 9.

L'albero filogenetico è stato generato con il metodo Neighbouring Joining utilizzando il software MEGA (V. 6) su tutti i campioni precedentemente amplificati e sequenziati.

Campioni positivi per BPV-Subgroup A sono stati classificati come BPV1 e suddivisi in clusters. I campioni positivi per BPV-Subgroup B sono stati classificati come BPV3 e BPV9 e sono in stretta omologia con sequenze depositate (Accession no. AF486184 e accession no. AB331650).

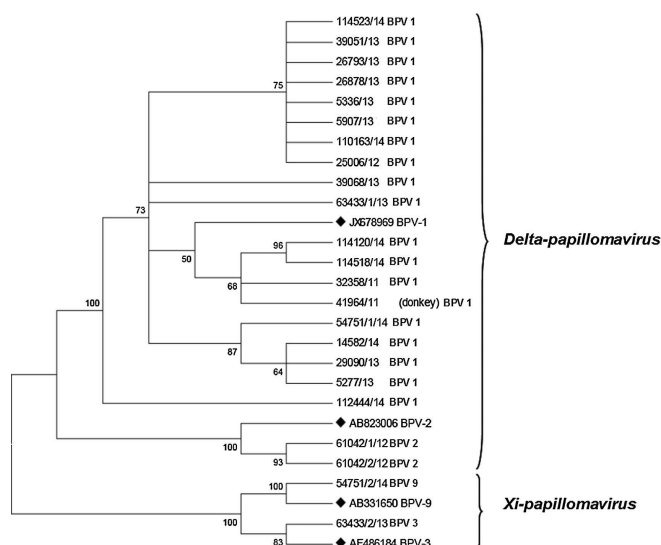
Le lesioni papillomatose caratterizzate istologicamente non hanno mostrato una correlazione tra tipi virali coinvolti e la morfologia delle lesioni stesse. Le analisi biomolecolari hanno rilevato la presenza di 4 tipi virali nell'area Piemontese sottoposta a studio (BPV1,2,3,9). In particolare lo studio ha rilevato ampia diffusione del *Deltapapillomavirus*, ed in particolare di BPV1, correlato sia a lesioni cutanee che gastrointestinali. Il campione di asino analizzato positivo per BPV1 dimostra come l'infezione da BPV possa essere associata all'insorgenza del sarcoide equino.

Inoltre, anche se è stato rilevato BPV1 nel 90 % dei campioni analizzati, l'analisi filogenetica (Fig. 2) rivela la presenza di diversi cluster e quindi una notevole varietà genetica tra i tipi virali analizzati.

È interessante notare l'elevata similitudine tra sequenza BPV1 di asino e bovino campionato a 10km di distanza.

Infine è stato prodotto e somministrato un autovaccino per la papillomatosi equina. Sono state monitorate la risposta immunitaria (SN) e la regressione delle lesioni (misurazione e monitoraggio fotografico): purtroppo l'efficacia riscontrata non ha soddisfatto le aspettative. Il vaccino autologo, sebbene nel bovino ci siano comprovati riscontri di efficacia, non ha mostrato negli equidi altrettanto vigore. Tuttavia l'estrema limitatezza della casistica non consente di esprimere conclusioni definitive.

Figura 2. Albero filogenetico basato sulla sequenza del gene L1. L'albero comprende le sequenze ottenute in questo studio e 4 sequenze presenti in banca dati

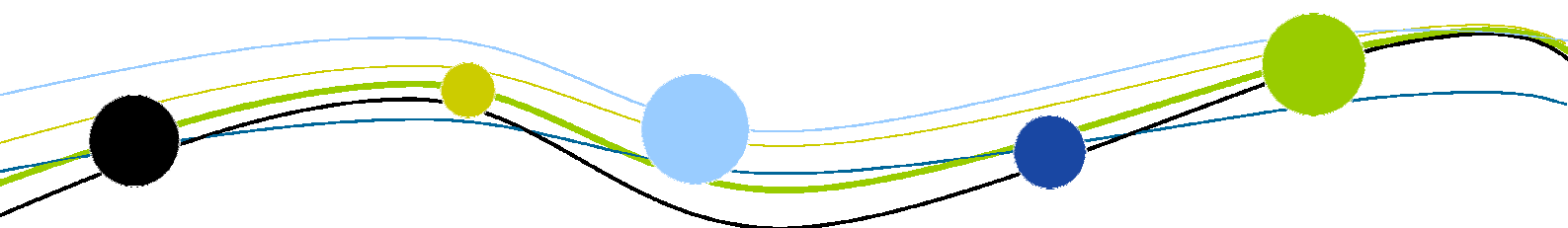


BIBLIOGRAFIA

1. Batista, M.V.A., Silva, M.A.R., Pontes, N.E., Reis, M.C., Corteggio, A., Castro, R.S., Borzacchiello, G., Balbino, V.Q., Freitas, A.C., 2013. Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in
2. Brazilian cattle. Vet. J. 197, 368–373.
3. Bocaneti, F., Altamura, G., Corteggio, A., Velescu, E., Roperto, F., Borzacchiello, G., 2014. Bovine papillomavirus: new insights into an old disease. Transbound. Emerg. Dis.
4. Rector, A., Van Ranst, M., 2013. Animal papillomaviruses. Virology 445, 213–223.
5. Maeda, Y., Shibahara, T., Wada, Y., Kadota, K., Kanno, T., Uchida, I., Hatama, S., 2007. An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. Vet. Microbiol. 121, 242–248.

6. Ginn, P.E., Mansell, J.E.K.L., Rakich, P.M., 2007. Skin and appendages. In: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N.C. (Eds.), Pathology of Domestic Animals. Elsevier, Saunders, pp. 748–750.

SESSIONE : POSTER



NETWORK ITALIANO DEI LABORATORI PER L'ONCOLOGIA VETERINARIA (NILOV)

Ferrari A¹, Crescio M I¹, Campanella C¹, Porcario C¹, Vito G¹, Longo A¹, Baioni E¹, Aiassa A¹, Bozzetta E¹, Domenis L¹, Vascellari M², Eleni C³, Manuali E⁴, Degli Uberti B⁵, Puleio R⁶, Petrella A⁷, Ligos C⁸, Ratto A¹, Ru G¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie; ³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana; ⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e Marche; ⁵ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno; ⁶ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia; ⁷ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata; ⁸ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

Key words: cancer, database, harmonisation

SINTESI

In Italia i laboratori che si occupano di oncologia nei piccoli animali afferiscono a diverse realtà: Università, Istituti Zooprofilattici (IIZZSS), strutture private. La frammentazione delle informazioni relative alla casistica oncologica frena l'approfondimento dello studio di tali patologie. Scopo del progetto è stato creare un network tra i laboratori di oncologia veterinaria basato sulla condivisione della casistica tumorale. Tale sistema è alimentato dai partecipanti secondo un tracciato record unico, che raccoglie dati in formato standard per codifica (ICD-O) e classificazione (WHO). In 2 anni di attività sono state raccolte 6800 diagnosi (90% cani, 20% gatti). Le sedi tumorali predominanti erano: cute (38% sia cane, che gatto) e mammella (27% cane, 16% gatto). La riproducibilità diagnostica tra gli istologi del network è soddisfacente. L'adozione di codici standard e la raccolta di dati di base rendono il sistema facilmente estendibile a laboratori esterni alla rete IIZZSS.

INTRODUZIONE

I tumori spontanei, oltre ad essere la principale causa di morte negli animali da compagnia, in particolare quelli nella specie canina, possono essere utilizzati come modello di studio per approfondire i complessi aspetti molecolari delle neoplasie nell'uomo. Analogamente lo studio della epidemiologia dei tumori del cane, a partire dai dati raccolti dai registri tumori animali, potrebbe contribuire a chiarire l'epidemiologia di alcune forme di cancro in oncologia veterinaria e comparata. Scopo di questo progetto è stato attivare un network tra tutti i laboratori di istologia degli IIZZSS operanti nel campo dell'oncologia veterinaria in grado non solo di garantire la qualità e l'uniformità delle diagnosi mediante l'adozione di un sistema unico di classificazione e di codifica delle neoplasie, ma anche di facilitare lo scambio di informazioni relative alla casistica disponibile nei singoli IIZZSS, favorendo la realizzazione di studi e ricerche per l'approfondimento della tematica oncologica mediante studi ad hoc.

MATERIALI E METODI

Metodologicamente il progetto è stato articolato in 2 parti, sviluppate parallelamente:

1) Creazione di una base di dati unica per la raccolta delle diagnosi istopatologiche di tumore degli animali domestici, alimentata da ciascun partecipante seguendo un modello comune (tracciato record, Tabella 1), che raccoglie dati in formato standard per codifica (ICD-O) e classificazione (WHO).

2) Consolidamento della qualità diagnostica, tramite la periodica organizzazione di circuiti interlaboratorio per la verifica della riproducibilità diagnostica.

RISULTATI E CONCLUSIONI

I laboratori che attualmente alimentano il sistema informativo

sono 9, afferenti a 8 diversi IIZZSS e rappresentano il 90% dei laboratori di istopatologia della rete degli IIZZSS; tra questi si trovano tutti i registri tumori animali attualmente attivi in Italia. Nei primi due anni di attività nella base dati comune sono state caricate oltre 6800 diagnosi di tumore di piccoli animali, 90% delle quali relative a cani e 10% relative a gatti. Le neoplasie maggiormente presenti appartengono al gruppo degli adenomi ed adenocarcinomi, sia nel cane (26% dei tumori totali) sia nel gatto (19%); in quest'ultima specie la proporzione è pari a quella delle neoplasie fibromatose. In entrambe le specie le sedi principali di tumore sono la cute (38%) e la mammella (27% nel cane e 16% nel gatto). Tali risultati sono in linea con quanto riportato in letteratura.

La riproducibilità diagnostica è stata verificata seguendo lo stesso protocollo in due anni successivi, con un coinvolgimento di un numero di istopatologi crescente e con risultati che si possono ritenere soddisfacenti, permettendo di affermare che il livello di diagnosi istologica, è uniforme nella rete diagnostica degli IIZZSS.

In conclusione gli obiettivi principali del progetto di ricerca si sono pienamente realizzati attraverso l'adozione di un sistema di classificazione e di codifica unico all'interno della rete e la creazione di una base dati comune di diagnosi istopatologiche, a cui possono liberamente accedere gli istopatologi afferenti alla rete degli IIZZSS. Tali elementi sono indispensabili per facilitare gli scambi di informazioni e di casistica, con la finalità di creare studi mirati.

Tabella 1- Tracciato record (i campi evidenziati sono obbligatori)

Nome	Tipo	Dimensione
Cognome proprietario	alfanumerico	25
Codice istat proprietario	alfanumerico	25
Nome veterinario inviante	alfanumerico	25
Cognome veterinario inviante	alfanumerico	25
Codice istat veterinario inviante	alfanumerico	25
Identificativo animale	alfanumerico	25
Specie	alfanumerico	2
Razza	alfanumerico	10
Sesso	numerico	2
Data di nascita	data	10
Data prelievo	data	10
Codice topografico	alfanumerico	5
Data accettazione	data	10
N° di protocollo	alfanumerico	10
Diagnosi	alfanumerico	25

LE TERRE RARE: UNA NUOVA GENERAZIONE DI PROMOTORI DI CRESCITA?

Squadrone S¹, Benedetto A¹, Bocca C², Brizio P¹, Abete MC¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche Unità di Patologia Generale, Corso Raffaello, 30 – Torino, Italy

Key words: lantanio, cerio, proliferazione, citotossicità

SINTESI

Il lantanio (La) e il cerio (Ce) appartengono al gruppo dei REE (rare earth elements), metalli di transizione che da circa 20 anni vengono utilizzati in Cina in ambito zootecnico come promotori di crescita, mentre la comunità europea non ne ha ancora autorizzato l'utilizzo in mancanza di studi approfonditi. Questa ricerca ha valutato le alterazioni indotte da La e Ce a diverse concentrazioni su cellule tumorali umane di carcinoma epatico (HepG2) e colon-rettale (HT-29). Sono stati effettuati studi di proliferazione, citotossicità e valutazione dei sistemi antiossidanti. La e Ce hanno agiscono sia come promotori di crescita che come inibitori della proliferazione, in relazione alla dose utilizzata. In entrambe le linee cellulari sono up regolati i geni che codificano per proteine coinvolte nei pathways di risposta allo stress ossidativo o nell'eliminazione di sostanze tossiche dalla cellula. Sono down regolati i geni che codificano per proteine coinvolte nella proliferazione cellulare e differenziazione, indicando che le cellule stanno andando verso il blocco della proliferazione cellulare all'aumentare delle concentrazioni di lantanidi utilizzati.

INTRODUZIONE

Le terre rare sono un gruppo di 17 metalli di transizione appartenenti al III sottogruppo della tavola periodica; tra questi il lantanio e il cerio sono in realtà abbastanza diffusi in natura ma riscontrabili solo in tracce nei sistemi biologici. La più grande riserva naturale di questi elementi è la Cina (circa l'80%), di conseguenza questo paese è il principale fornitore di REE del mercato mondiale. A causa delle loro eccellenti proprietà fisico chimiche, le terre rare trovano svariati impieghi nell'industria chimica, elettronica ed in campo medico. Da circa 20 anni vengono utilizzate in Cina in campo agricolo come fertilizzanti e in ambito zootecnico come promotori di crescita. Nel 2006 nella UE è stato proibito l'uso degli antibiotici come promotori di crescita: la comunità scientifica e l'industria dei feed additives sono alla continua ricerca di sostanze alternative. Secondo le normative europee (REG. EC 1831/2003) i feed additives possono essere immessi sul mercato solo dopo la dimostrazione di assenza di effetti deleteri sulla salute umana e degli animali, e sull'ambiente. Dalla letteratura (soprattutto cinese) si evince che piccole quantità di miscele di REE (principalmente lantanio e cerio) nella dieta portano ad un incremento non solo del peso degli animali (bovini, suini, ovini e pollame) ma anche della produzione di latte e uova. Le terre rare sembrano poter costituire una nuova e poco costosa generazione di promotori di crescita. Siamo, dunque, vicini ad una possibile introduzione di queste terre rare come additivi zootecnici anche nella Comunità Europea? Per il momento i lantanidi non sono ancora stati autorizzati per l'alimentazione degli animali da reddito, mentre lo sono come additivi per mangimi destinati a cani e gatti, con un fine farmacologico e non di promotori di crescita grazie alla capacità di legare i fosfati. Lo stato dell'arte suggerisce la necessità di studi più approfonditi, volti da un lato a verificare la presunta bassa tossicità delle terre rare e dall'altro ad approfondirne i meccanismi d'azione.

MATERIALI E METODI

Le cellule sono state coltivate in terreno di coltura McCoy's 5A per le HT-29 e DMEM per le HepG2, contenenti siero fetale bovino, glutammina e una miscela di penicillina-streptomycin-anfotericina B, mantenute a 37°C in atmosfera umidificata (95% aria, 5% CO₂) ed utilizzate per gli esperimenti durante la fase logaritmica di crescita. E' stato effettuato uno screening ad ampio spettro, somministrando alle cellule lantanio e cerio come elementi singoli, a varie concentrazioni (da 0.1 µM a 10 mM per le HT-29 e da 0.1 µM a 1mM per le HepG2) e per tempi prolungati (24, 48 e 72h). L'effetto anti-proliferativo è stato quindi valutato mediante analisi spettrofotometrica utilizzando il test colorimetrico dell'MTT. L'estrazione dell'RNA totale è stata effettuata tramite "miRNeasy Mini Kit" (Qiagen), e la determinazione quantitativa dell'RNA totale è stata effettuata tramite fluorimetro Q-Bit (Life Technologies), utilizzando il kit "Quant-IT High Sensitivity (HS) RNA assay" (Life Technologies). La sintesi del cDNA, necessaria alle successive analisi tramite saggi Real-Time PCR, è stata eseguita mediante retrotrascrizione dell'RNA estratto. Per tale passaggio è stato utilizzato il kit "RT2 First strand kit" (Qiagen), caricando per ogni reazione circa 500 ng di RNA totale. L'amplificazione e la quantificazione dei livelli di 88 target genetici coinvolti nei pathways di risposta a stress ossidativo è stata eseguita mediante l'utilizzo degli Array precast di Sabiosciences (PAHS-065ZC Human Oxidative Stress).

RISULTATI E CONCLUSIONI

Citotossicità dei lantanidi su cellule di origine umana, HT-29 ed HepG2

HT-29: il lantanio esercita un effetto promuovente la proliferazione cellulare anche alle concentrazioni più basse mentre le dosi più elevate, al contrario, inibiscono la capacità proliferativa delle cellule in modo dose dipendente e tale effetto si associa verosimilmente ad un marcato effetto citotossico (Figura 1). Il cerio esercita un effetto promuovente la crescita cellulare solo alla dose più bassa utilizzata, e l'effetto inibente è più efficace rispetto a quello esercitato dal lantanio, in quanto si evidenzia già alle concentrazioni 500 µM e 1 mM.

HepG2: il lantanio promuove la proliferazione cellulare in un range di concentrazioni più ampio (0.1-200 µM) soprattutto dopo 48 e 72 h di trattamento, mentre l'effetto inibitorio si manifesta già alle dosi 500 µM e 1 mM a tutti i tempi considerati (Figura 3).

Parallelamente, l'esposizione al cerio non si associa ad un significativo incremento dell'indice proliferativo ma, alle dosi più elevate (500 µM e 1 mM), causa una riduzione della crescita cellulare significativa già a partire dalle 48 h e particolarmente evidente dopo 72 h di trattamento (Figura 4).

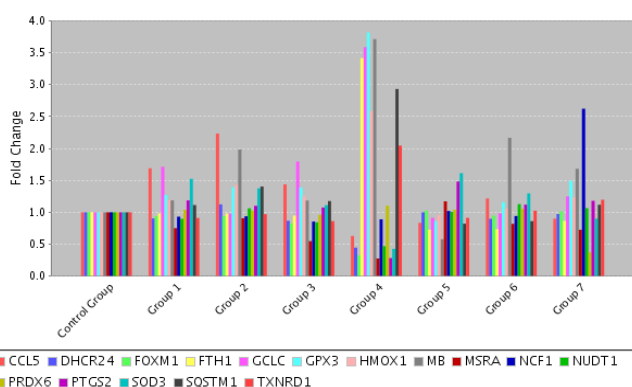
Il cerio e il lantanio sono stati utilizzati anche in combinazione a concentrazioni comprese fra 50 µM e 1 mM e somministrati alle cellule per 24, 48 e 72 h. I risultati ottenuti evidenziano come la somministrazione combinata potenzi l'effetto inibente la crescita delle cellule alle dosi più

elevate mentre alle dosi più basse non si riscontrano variazioni significative rispetto ai trattamenti. Inoltre, in accordo con alcuni studi condotti su cellule NIH3T3 (Yu et al., 2005), dati preliminari ottenuti mediante analisi citofluorimetrica di campioni di cellule trattate con lantanio (500 μ M e 1 mM) e quindi marcati con Annessina V fluoresceinata hanno evidenziato la comparsa di una popolazione significativa di cellule apoptotiche in entrambe le linee cellulari.

Analisi in microarrays su colture cellulari umane per quantificare i livelli di 88 target genetici coinvolti nei pathways di risposta a stress ossidativo

Linee HT-29: dall'analisi degli 88 target considerati, 16 sono risultati quelli significativamente alterati rispetto al controllo (Figura 1). In particolare sono *sovra espressi* i geni che codificano per glutathione perossidasi (GPX3), eme-ossigenasi 1 (HMOX1), piridina nucleotide ossidoriduttasi A (TXNRD1), mioglobina (MB), glutammato-cisteina ligasi, subunità catalitica (GCLC), ferritina (FHT1), sequestosoma 1 (SQSTM1). Sono *down regolati* i geni che codificano per C-C chemochina ligando (CCL5), DHCR24 (24-deidrocolesterolo riduttasi), FOXM1 (Forkhead box M1), MSRA (metionina sulfossido riduttasi A), NUDT1 (Nucleoside Diphosphate Linked Moiety X-Type Motif 1), PTGS2 (prostaglandina endoperoxidasi sintasi), SOD3 (superossido dismutasi 3).

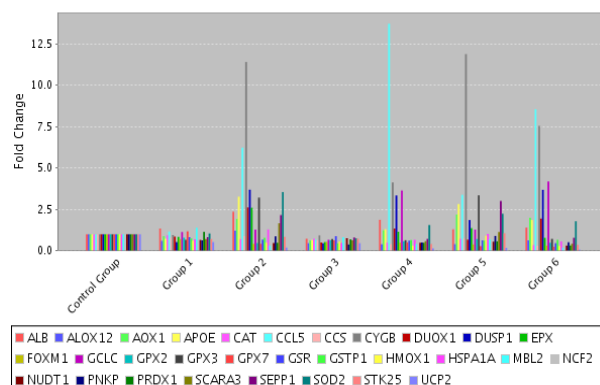
Figura 1 – Confronto tra HT-29 non trattate (Control Group) e diversi gruppi di HT-29 trattate per 48 ore con miscele singole o combinate di lantanio e cerio.



Linee HEP-G2: di tutti i marcatori considerati nell'esecuzione dell'Array Sabiosciences, 34 sono i geni (Figura 2) che sono risultati significativamente alterati dai trattamenti applicati sulle HEP-G2 al time point considerato (48 ore di esposizione). Rispetto alle linee HT-29 il numero di geni coinvolti nella risposta alla stimolazione con lantanidi singoli e miscele degli stessi è sensibilmente maggiore.

Tra i geni *sovra espressi*: ALB (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1), CYGB (citoglobina), DUSP1 (fosfatasi 1 a doppia specificità), GCLC (glutammato cisteina ligasi), APOE (apolipoproteina E), SOD 2 (superossido dismutasi 2). Tra i *geni down regolati* nelle cellule HEPg2 stimulate con 1 mM di cerio per 48h in particolare i geni che codificano per ALOX12, CAT, STK25, UCP2, GPX2, GPX3, HMOX1, MBL2.

Figura 2 – Confronto tra HEP-G2 non trattate (Control Group) e diversi gruppi di HEP-G2 trattate per 48 ore con miscele singole o combinate di lantanio e cerio.



Nonostante il crescente interesse per i REE come growth promoter poco costosi e alternativi agli antibiotici nella UE, il FEEDAP Panel (EFSA) che ha recentemente valutato (2012) un additivo costituito da lantanio e cerio (Lancer) proposto per i suini, ha sottolineato la scarsità di studi sull'accumulo nei tessuti degli animali concludendo di non potersi attualmente esprimere sulla potenziale tossicità dei REE per il consumatore ma anche per la specie target. I pochi studi esistenti sottolineano che la distribuzione nei tessuti degli animali è specie dipendente (Von Rosenberg et al., 2013). Come molti altri elementi in traccia i lantanidi vengono accumulati attraverso la catena alimentare arrivando all'uomo tramite la dieta, per cui lantanio e cerio e la loro combinazione sono stati studiati su linee cellulari umane, HT-29 (carcinoma colon-rettale umano) e HEP-G2 (carcinoma epatico umano).

Tra i geni *sovra espressi* vi sono quelli che codificano per proteine coinvolte nella risposta al danno al DNA e allo stress ossidativo e nella regolazione negativa della proliferazione cellulare, oltreché nella modulazione di processi infiammatori e ossidativi. Sono invece *down regolati* in particolare i geni che codificano per proteine coinvolte nell'apoptosi e nel controllo della proliferazione cellulare, regolazione della morte cellulare, attivate in risposta a stress ambientali. L'abilità dei REE di sostituire un gran numero di ioni metallici come calcio, ma anche magnesio, ferro o manganese è nota da tempo (Evans, 1983), ed è dovuta a similitudini nella dimensione, nei siti di legame e nella geometria di coordinazione degli elementi. I lantanidi possono sostituire il Ca^{2+} in vari processi fisiologici e in alcuni enzimi ciò causa una perdita di funzionalità.

La capacità dei lantanidi di interferire nella proliferazione cellulare e nella differenziazione li rende interessanti come antitumorali ma è critica la scelta del dosaggio che deve essere in grado di bloccare la proliferazione delle cellule tumorali senza esercitare tossicità per l'uomo o gli animali.

BIBLIOGRAFIA

1. Regolamento (CE) n. 1831/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio sugli additivi nell'alimentazione animale.
2. Von Rosenberg S, Rambeck W and Wehr U, 2013. Lanthanum and cerium do not accumulate in organs, muscle or bone following highly elevated oral supplementation of lanthanide citrate in weaned piglets. Proceedings of the Society of Nutrition and Physiology, vol 22, p. 183.
3. Evans CH, 1983. Interesting and useful biochemical properties of lanthanides. Trends in Biochemical Science, 8(12):445-449.

RICERCA DI FATTORI GENETICI COINVOLTI NELL'INSORGENZA DELL'IPERTROFIA MUSCOLARE LIPOMATOSA NELLA RAZZA BOVINA PIEMONTESE: APPROCCIO GENOME-WIDE BASATO SU DNA POOLING E SNP-CHIP AD ALTA DENSITÀ.

Peletto S¹, Capucchio MT², Strillacci MG³, Boin C¹, Biasibetti E², Modesto P¹, Schiavini F³, Acutis PL¹, Bagnato A³

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² Università degli Studi di Torino; ³ Università degli Studi di Milano

Key words: Ipertrafia Muscolare Lipomatosa; Distrofia Lipomatosa; Razza Bovina Piemontese; Genome-Wide Association Study; DNA pooling

SINTESI

Nella razza bovina Piemontese è riportata la presenza occasionale dell'ipertrofia Muscolare Lipomatosa (IML), caratterizzata da sostituzione delle miofibre del tessuto muscolare con tessuto adiposo, la cui eziologia non è del tutto chiara. Scopo del presente Progetto è stato quello di indagare l'esistenza di *loci* genetici associati con l'IML mediante uno studio di associazione genome-wide basato su DNA pooling. I campioni di muscolo sono stati classificati in casi (CS, 91 animali) e controlli (CT, 70 animali) in base agli esami istopatologici. Sono stati allestiti 2 pool CT e 2 pool CS (35-46 animali ciascuno), prevedendo replicati di pooling e di genotyping. La genotipizzazione è stata effettuata con tecnologia Illumina BovineHD BeadChip. Sono stati identificati 123 SNP significativi in 29 autosomi e 57 SNP nel cromosoma X. Un sottogruppo di marcatori si localizza in corrispondenza dei geni *LARGE*, *PDZRN3* e *DMD*, per i quali si è evidenziato un ruolo plausibile nell'insorgenza dell'IML.

INTRODUZIONE

Nella razza bovina Piemontese, la letteratura scientifica riporta la presenza occasionale di distrofia muscolare lipomatosa, anche denominata ipertrofia muscolare lipomatosa (IML). La patologia consiste nella degenerazione/infiltrazione del tessuto muscolare caratterizzata da sostituzione delle miofibre con tessuto adiposo. E' una distrofia frequente nel bovino e nel suino, segnalata anche in pecora, cavallo e cane. La malattia resta un rilievo anatomopatologico al macello in quanto asintomatica in vivo. Raramente sono coinvolti quasi tutti i muscoli, con una perdita economica netta per l'allevatore costretto a mandare alla distruzione l'intero animale [1]. La presenza di questa patologia comporta comunque un deprezzamento della carcassa e la distruzione delle parti interessate non idonee al consumo. Poco si conosce riguardo il meccanismo eziopatogenetico di questa distrofia. Nessuna delle teorie proposte ha evidenze che la supportino pienamente. La patologia è probabilmente multifattoriale, con fattori nutrizionali, vascolari e genetici coinvolti [2]. Sebbene si sia proposta la multifattorialità nella patogenesi, si tende a considerare la lipomatosi una forma ereditaria in conformità a quanto osservato nel suino. A supporto di una causa genetica alla base dell'IML, sono le similitudini con la distrofia muscolare di Duchenne dell'uomo, causata da una mutazione del gene della distrofina al locus Xp21.

Scopo del presente Progetto di Ricerca è stato quello di indagare l'esistenza di *loci* genetici associati con l'IML nella razza bovina Piemontese attraverso uno studio di associazione *genome-wide* (GWAS) basato sulla tecnica del DNA pooling. L'approccio DNA pooling prevede che il DNA di campioni con le stesse caratteristiche fenotipiche sia utilizzato per creare un unico pool di individui così da ridurre il numero di genotipizzazioni e i relativi costi associati [3].

MATERIALI E METODI

I campioni sono stati prelevati presso il laboratorio sezionamento carni del consorzio "La Granda" (<http://lagranda.it>). Al rinvenimento, durante le operazioni di sezionamento, di un capo sospetto IML sono state prelevate due aliquote di tessuto muscolare: i) in sede di lesione, per gli esami istologici e istochimici, da conservare a +4°C; ii) per le analisi genetiche, da conservare a -20°C. La strategia di campionamento ha previsto l'appaiamento di casi e controlli

per allevamento (matching), in modo da normalizzare per le differenze genetiche inter-allevamento: in relazione al numero di casi di IML rilevati, si è periodicamente stabilito un elenco di prelievi da effettuare su animali non affetti da IML ed appartenenti agli stessi allevamenti dei casi. I campioni raccolti sono stati classificati in casi (CS, 100 animali) e controlli (CT, 100 animali) in base ai risultati delle indagini istopatologiche.

Per le analisi genome-wide su array Illumina è essenziale isolare un DNA genomico di buona qualità (in termini di integrità, purezza e concentrazione). Si è proceduto alla valutazione del metodo di estrazione più adeguato comparando diversi kit di estrazione. Per la valutazione dell'integrità, il DNA estratto è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%. La purezza del DNA è stata valutata spettrofotometricamente. I campioni per i quali la verifica di integrità e la valutazione della purezza hanno dato risultato positivo, sono stati sottoposti a misurazione della concentrazione del DNA genomico utilizzando il fluorimetro GloMax®-Multi Detection System. I dati di concentrazione sono stati utilizzati per la costituzione preliminare di 4 pool equimolari: 2 per i casi (pool 1 e pool 2, costituiti da 35 campioni ciascuno) e 2 per i controlli (pool 3 e pool 4, costituiti da 45 e 46 campioni rispettivamente); si è quindi proceduto alla costituzione di replicati di *pool construction* e *pool genotyping*. È stato infatti allestito un duplicato tecnico per ogni pool di controlli e di casi, ottenendo così 8 pool equimolari (4 per i casi e 4 per i controlli). Infine sono stati analizzati 3 replicati di genotyping per ogni pool (ottenendo così 24 set di dati di genotipizzazione).

La genotipizzazione è stata effettuata su Illumina BovineHD BeadChip, array ad alta densità (con più di 770mila marcatori SNP). I pool sono stati analizzati secondo un approccio di *selective DNA pooling*, che prevede la stima delle frequenze geniche di ciascun marcatore in pool costituiti di quantità equimolari di DNA da più individui e il confronto di tali frequenze tra casi e controlli [4,5]. La B-allele frequency (BAF) è un buon indicatore della frequenza allelica degli individui in un pool per ogni replicato di array [6]. La BAF è stata ottenuta per ciascun pool ed i rispettivi duplicati e replicati attraverso il software GenomeStudio di Illumina. Per verificare l'omogeneità dei valori di BAF è stata calcolata la Deviazione Standard (SD) per ciascun pool rispetto ai replicati di pooling e genotyping. Una specifica pipeline con software R è stata messa a punto per il numero di pool, duplicati e replicati di questo studio per poter applicare a ciascun marcatore SNP un test *multiple marker* secondo la seguente statistica: $Ztest = Dtest/SD(Dnull)$, dove $Dtest$ è la differenza delle medie delle BAF tra casi e controlli e $Dnull$ è la differenza delle medie delle BAF tra replicati. Il test statistico è stato distribuito come un χ^2 con 1 grado di libertà e ipotesi nulla di uguale frequenza allelica tra casi e controlli. È stato escluso il 5% degli SNP che mostravano elevata variabilità nel valore delle medie tra replicati di array all'interno dello stesso gruppo (casi o controlli) e gli SNP monomorfici.

I risultanti Manhattan plot sono stati creati utilizzando il log10 dei p-values del test di linkage. Un Manhattan plot descrive graficamente una serie di SNP lungo i cromosomi numerati da destra a sinistra. Le altezze con cui si separano gli SNP dalla base corrispondono al livello di significatività dell'associazione degli SNP stessi con il fenotipo.

RISULTATI E CONCLUSIONI

L'esame macroscopico ha permesso di notare come i muscoli colpiti presentassero un diverso grado di infiltrazione del tessuto adiposo, che coinvolgeva sia muscoli singoli sia interi gruppi muscolari. I numerosi reperti istopatologici osservati hanno confermato la diagnosi di IML classificando questa miopatia come una distrofia muscolare caratterizzata da variazioni nelle dimensioni delle fibre, necrosi, infiltrazione di cellule mononucleate, aumento del tessuto connettivo e soprattutto, da una sostituzione di tessuto muscolare con tessuto adiposo. Le colorazioni enzimatiche non hanno rivelato cambiamenti metabolici nei muscoli colpiti.

I risultati migliori in termini di resa, purezza e qualità del DNA estratto si sono ottenuti con il kit Gentra Puregene Cell&Tissue kit (Qiagen), basato sul principio del salting out. Tutti i 200 campioni di DNA sono stati sottoposti a verifica dell'integrità. Anche se in quasi tutti i campioni si è osservata la presenza di piccoli segmenti di DNA (<500 bp), la parte più consistente di ciascun campione appariva costituita da filamenti lunghi circa 10 Kb non frammentati e quindi idonei alla genotipizzazione. Per tutti i campioni, il rapporto tra l'assorbanza a 260 e 280 nm è risultato tra 1.8 e 1.9, valori che indicano assenza di contaminanti. La lettura fluorimetrica dei campioni di DNA ha messo in evidenza una elevata variabilità nella concentrazione dei campioni (tra 10.1 e 452.5 ng/ul). Sono stati eliminati 10 campioni aventi concentrazione inferiore a 50 ng/ul e 29 campioni per persistenza di CV>6% tra letture indipendenti. I campioni sono stati diluiti per poter rendere più precise le attività di costituzione dei pool.

I segnali di fluorescenza (*raw data*) ottenuti dal genotyping sono stati analizzati con specifico software Illumina (GenomeStudio) e i valori di BAF sono risultati omogenei per ogni categoria. Di conseguenza nessun pool è stato eliminato. Un replicato è stato eliminato dalle successive analisi a causa del suo *call rate* basso (0.44).

L'analisi statistica dei pool per identificare regioni cromosomiche associate a IML è stata effettuata utilizzando una pipeline in R (<http://www.r-project.org/>). I cromosomi autosomici e il cromosoma X sono stati analizzati separatamente. Sono stati identificati un totale di 123 SNP significativi in 29 autosomi e 57 SNP significativi nel cromosoma X, al di sopra della soglia di significatività pari a ($-\log_{10}(5e-08)$). Le Figure 1 e 2 riportano i Manhattan plot delle associazioni *genome-wide* per il fenotipo IML; sono indicate due diverse soglie di significatività: ($-\log_{10}(5e-08)$) e ($-\log_{10}(1e-05)$).

Figura 1 – Manhattan Plot (casi vs controlli), Autosomi

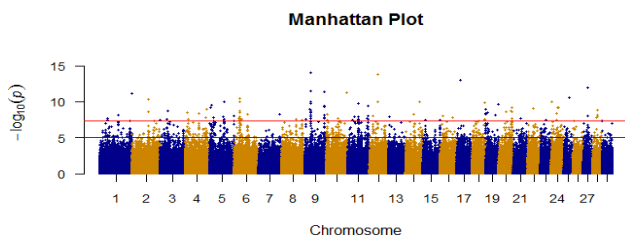
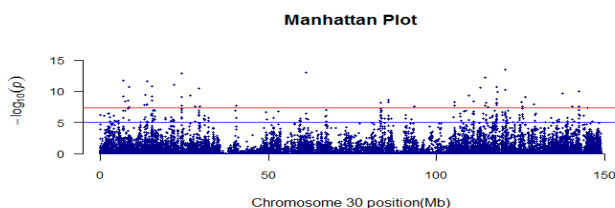


Figura 2 – Manhattan Plot (casi vs controlli), Cromosoma X



Un sottogruppo dei marcatori identificati si localizzava all'interno o in vicinanza dei geni *LARGE*, *PDZRN3* e *DMD*. L'analisi delle funzioni note per le proteine codificate da questi geni, basata sull'interrogazione del database GeneCards, ha evidenziato un loro ruolo plausibile nell'insorgenza dell'IML, in

correlati a forme di distrofia oppure allo sviluppo embrionale della rete vascolare. In particolare, una forte associazione è stata identificata con il gene *DMD*, codificante per la distrofina, sul cromosoma X, responsabile della distrofia di Duchenne nell'uomo. Ulteriori studi sono necessari per chiarire se l'IML del bovino possa essere considerata un nuovo modello animale di studio della distrofia di Duchenne.

Il presente Progetto di Ricerca rappresenta il primo studio volto ad indagare l'esistenza di una componente genetica dell'IML nel bovino. I risultati ottenuti sembrano confermare questa ipotesi. L'uso di array ad alta densità di ultima generazione ha permesso di sondare con un'alta definizione il genoma bovino e rilevare una distribuzione significativamente diversa di una serie di marcatori genetici tra casi di IML e controlli, e di identificare geni con una funzione plausibile nell'eziopatogenesi della malattia.

L'identificazione di profili genetici associati ad una maggiore o minore predisposizione all'insorgenza dell'IML costituisce un importante passo verso l'utilizzo di riproduttori selezionati (*genomic o marker-assisted selection*). A tal scopo sarà opportuno mettere in atto studi caso-controllo confirmatori, basati sull'approccio del gene candidato, che prevedano il sequenziamento genico dei *loci* individuati in questo studio *genome-wide*. L'identificazione di polimorfismi causali associati a IML costituirà un dato utile a formulare ipotesi sulla eziopatogenesi della malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. Biasibetti E, Paciello O, Botta M, Amedeo S, Capucchio MT. Tre casi atipici di miopatia lipomatosa in bovine di razza Piemontese: reperti anatomo-istopatologici. *Large Animal Review* 2011, pp. 3- 5, Vol. 18.
2. Biasibetti E, Amedeo S, Brugiapaglia A, Destefanis G, Di Stasio L, Valenza F, Capucchio MT. Lipomatous muscular 'dystrophy' of Piedmontese cattle. *Animal*. 2012, 6(11):1839-47.
3. Macgregor S, Zhao ZZ, Henders A, Martin NG, Montgomery GW, 2008. Highly cost-efficient genome-wide association studies using DNA pools and dense SNP arrays. *Nucleic Acids Research* 36(6):e35.
4. Strillacci MG, Frigo E, Schiavini F, Samoré AB, Canavesi F, Vevey M, Cozzi MC, Soller M, Lipkin E, Bagnato A. Genome-wide association study for somatic cell score in Valdostana Red Pied cattle breed using pooled DNA. *BMC Genet*. 2014 Oct 6; 15:106.
5. Strillacci MG, Frigo E, Canavesi F, Ungar Y, Schiavini F, Zaniboni L, Reghenzani L, Cozzi MC, Samoré AB, Kashi Y, Shimoni E, Tal-Stein R, Soller M, Lipkin E, Bagnato A. Quantitative trait loci mapping for conjugated linoleic acid, vaccenic acid and $\Delta(9)$ -desaturase in Italian Brown Swiss dairy cattle using selective DNA pooling. *Anim Genet*. 2014 Aug;45(4):485-99.
6. Janicki PK, Liu J: Accuracy of allele frequency estimates in pool DNA analyzed by high-density Illumina Human 610-Quad microarray. 2009 *Intern J Genomics Proteomics* 5:1

ACCUMULO DI DIOSSINE E COMPOSTI DIOSSINO-SIMILI NEL FEGATO DI PECORA: INDAGINI ANALITICHE E BIOMOLECOLARI

Benedetto A¹, Stella C¹, Brizio P¹, Ru G¹, Girolami F², Nebbia C², Abete MC¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Italy.

Key words: diossine, bovini, ovini, enzimi biotrasformativi

SINTESI

Le "diossine" sono un gruppo di composti aromatici policlorurati accomunati da proprietà chimico-fisiche simili, suddivisibili in policloro-dibenzo-p-diossine (PCDD) e policloro-dibenzofurani (PCDF). Condividono inoltre un meccanismo d'azione simile alcuni policlorobifenili (PCB), che vengono pertanto definiti congeneri diossina-simili (DL-PCB). Gli svariati effetti tossici conseguenti all'esposizione a tali molecole ne rendono il loro studio di estrema importanza, sia dal punto di vista della sicurezza alimentare, sia sul fronte ecotossicologico.

Una recente indagine dell'EFSA ha evidenziato come nel fegato di ovini e cervidi le concentrazioni di tali composti siano molto superiori a quelle registrate in altri ruminanti.

Oggetto del seguente progetto è stato quindi la valutazione del grado di contaminazione da diossine e DL-PCB nel fegato di ovini e bovini allevati nel territorio di competenza dell'IZS, al fine di correlare i livelli di contaminazione epatica con l'espressione di alcuni enzimi biotrasformativi coinvolti nel loro metabolismo, necessari a spiegare le notevoli differenze di accumulo tra le due specie considerate.

I risultati ottenuti, pur confermando un basso livello di contaminazione ambientale, presupposto nelle aree di campionamento scelte, hanno permesso di evidenziare una netta differenza nei profili di accumulo delle due specie considerate (ovini e bovini) con livelli medi di DL-composti nelle pecore superiori di più di 4 volte a quelli determinati nei bovini. Le indagini molecolari hanno identificato le ridotte efficienze dei pathway di detossificazione di fase I come i maggiori responsabili dell'accumulo selettivo di DL-composti nel fegato degli ovini.

INTRODUZIONE

Con il termine generico di "diossine" si indica un gruppo di composti aromatici policlorurati accomunati da proprietà chimico-fisiche simili ed in particolare 75 policloro-dibenzo-p-diossine (PCDD) e 135 policloro-dibenzofurani (PCDF), dei quali i più conosciuti sono la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD), nota per il disastro di Seveso del 1976, e il 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-furano.

Studi biochimici e biomolecolari hanno ampiamente dimostrato come la maggior parte di tali effetti sia mediata dall'interazione con il recettore AhR, un fattore trascrizionale che determina l'induzione di numerosi geni, fra cui quelli codificanti alcuni enzimi farmaco metabolizzanti. Tale meccanismo d'azione è inoltre comune a 12 policlorobifenili (PCB), la cui struttura coplanare conferisce loro la capacità di interagire con l'Ahr e che vengono pertanto definiti congeneri diossino-simili (DL-PCB). Caratterizzati da scarsa idrosolubilità, notevole stabilità chimica e da un ciclo ambientale molto complesso, con fenomeni di accumulo nel suolo e dispersione nell'aria tramite polveri e particolati, le diossine e i DL-PCB rappresentano un serio problema per la salute pubblica: tali molecole, essendo particolarmente liposolubili, tendono a concentrarsi negli alimenti di origine animale (AOA) ricchi in lipidi (latte e derivati, pesce, uova e carni grasse) che rappresentano pertanto la principale fonte di esposizione per l'uomo.

Recentemente una "Opinion" dell'EFSA riguardante il rischio per la Salute Pubblica correlato alla presenza di alti livelli di diossine e DL-PCB nel fegato di ovini e cervidi ha evidenziato come, a parità di contaminazione ambientale, le concentrazioni di tali composti siano molto superiori a quelle registrate in altri

ruminanti (EFSA J. 2011, 9: 2297). Fra le ipotesi formulate per spiegare tale fenomeno, evidenze indirette depongono per una diversa espressione/attività di alcuni enzimi farmaco-metabolizzanti (es. CYP1A1) coinvolti nella biotrasformazione delle diossine.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Sono stati prelevati 37 campioni di fegato ovino e 16 di fegato bovino da animali provenienti da allevamenti situati in aree selezionate sul territorio di competenza delle ASL TO3, TO5 e CN1, perché considerate con un rischio di contaminazione (presente o passata) trascurabile.

Analisi Chimiche

Per la determinazione degli alogeno derivati oggetto d'indagine si è proceduto tramite estrazione in Soxhlet (260 cicli in miscela 70:30 v/v di Toluene:Etanolo), purificazione in PowerPrep (Fluid Management Systems), assemblato con colonne in silice, allumina e carbone attivo, e conclusiva analisi in HRGC-HRMS, secondo quanto riportato da Benedetto et. al, (2016).

Espressione genica

L'RNA è stato estratto dai campioni di fegato con il Trizol (Invitrogen) e quantificato su Nanodrop. 1µg di RNA di ciascun campione è stato retrotrascritto a cDNA tramite QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). La successiva amplificazione (denaturazione 95 °C per 30", 40 cicli a 95 °C per 15" e 60 °C per 1') tramite SYBR Green Supermix (Biorad), di 500 ng di cDNA ha riguardato i seguenti target: AHR, ARNT, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, GSTA1, UGT1A1, UGT1A3-4, UGT1A6, UGT1A9, NQO1 e ABCG2. I valori di quantificazione relativa di ciascun campione sono stati calcolati secondo il metodo $\Delta\Delta C_t$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Analisi espressione Proteica e attività catalitiche

I campioni di fegato sono stati processati per la separazione delle frazioni subcellulari (microsomi e citosol) tramite ultracentrifugazione. Si è proceduto alla quantificazione del contenuto proteico con il metodo di Lowry per le successive indagini di attività enzimatica: O-dealchilazione delle alcossiresorufine (Cyp1A2/1A1), glutatione S-transferasi (metodo in continuo), attività della DT-diaforasi (NQO1), quantificazione delle uridin-difosfo-glucuronil-transferasi (UGT).

RISULTATI E CONCLUSIONI

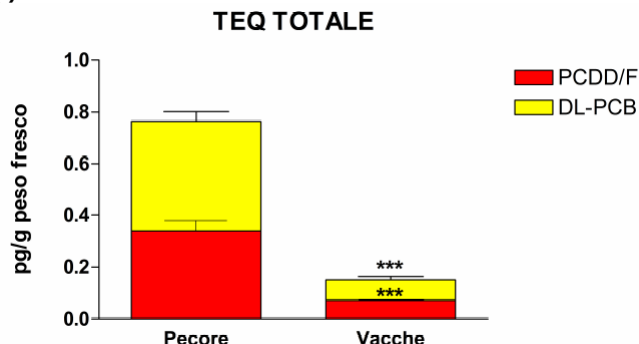
Analisi Chimiche

L'analisi dei dati ottenuti tramite le determinazioni chimico analitiche ha permesso di evidenziare su tutti gli animali campionati (bovini e ovini) tenori di diossine, PCB diossina simile e PCB marker non diossina simili inferiori agli attuali limiti di legge (Regolamento N. 1067/2013). Nello specifico i tenori mediani di diossine e furani (PCDD/Fs) sono stati di 0.27 pg WHO-TEQ₂₀₀₅ g⁻¹ w/w negli ovini e di 0.07 pg WHO-TEQ₂₀₀₅ g⁻¹ w/w nei bovini. Relativamente alla somma di PCDD/Fs e DL-PCB negli ovini si sono riscontrati tenori mediani di 0.77 pg WHO-TEQ₂₀₀₅ g⁻¹ w/w, mentre nei bovini di 0.15 pg WHO-TEQ₂₀₀₅ g⁻¹ w/w.

Questi dati, pur confermando un basso livello di contaminazione ambientale di composti diossino simili

presupposto nelle aree di campionamento scelte, hanno permesso comunque di evidenziare una netta differenza nei profili di accumulo delle due specie considerate (ovini e bovini): infatti la differenza di tenori medi di DL-composti tra pecore e bovini è risultata superiore di più di 4 volte negli ovini (Figura 1).

Figura 1 – Concentrazioni mediane del gruppo ovino e bovino a livello di TEQ totale (upper bound) di diossine/furani (rosso) e di-PCB (giallo), espressi in pg TEQ₂₀₀₅/g peso fresco. Le differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) sono contrassegnate da un asterisco (*).

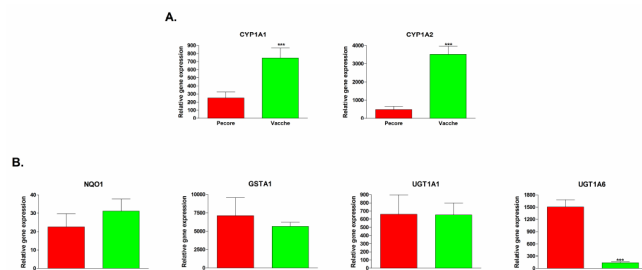


Analisi Molecolari

Complessivamente le indagini molecolari sugli enzimi biotrasformativi epatici di fase I responsabili del metabolismo dei DL-composti hanno dimostrato che l'espressione sia genica sia proteica di CYP1A1 e 1A2 è maggiore nel bovino, così come la dealchilazione della 7-etossioresorufina (EROD), catalizzata dal CYP1A1 (Figura 2 e 3).

Per quanto riguarda gli enzimi di fase II, i nostri risultati confermano che la pecora esprime 5 isoforme dell'enzima UGT1A (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6 e UGT1A9) (Pretheeban et al., 2011), mentre il bovino ne esprime soltanto due (UGT1A1 e UGT1A6) (Darwish et al., 2010). Inoltre, la ridotta espressione sia genica sia proteica di questa famiglia di UGT nel bovino, insieme ad una minore attività di coniugazione, conferma la limitata capacità glucuronidativa complessiva epatica in questa specie rispetto all'ovino. Relativamente alle GSTα, nonostante il presente studio non abbia evidenziato differenze significative tra ovino e bovino nell'espressione genica e proteica di questi enzimi, l'attività catalitica è risultata nuovamente inferiore nel bovino (Figura 3).

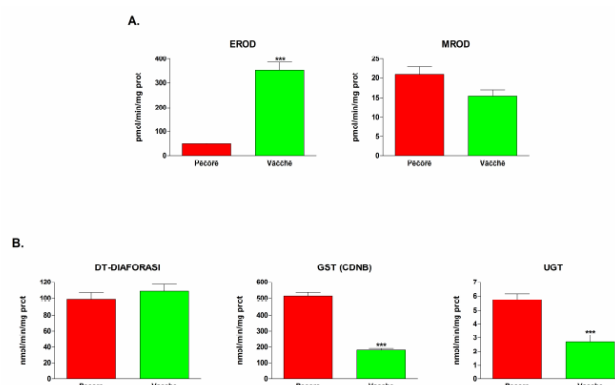
Figura 2 – Confronto dell'espressione genica degli enzimi biotrasformativi di fase I (A) e di fase II (B) nel fegato di pecore (n=30) e vacche (n=10). * = $P < 0,001$**



In base ai risultati ottenuti nel presente studio, è possibile formulare delle ipotesi circa le cause del maggiore accumulo epatico dei DL-composti nel fegato ovino rispetto al bovino. La maggiore espressione del CYP1A2 nel bovino sembra smentire l'ipotesi secondo la quale tale enzima sia responsabile del sequestro epatico dei DL-composti, come osservato nel ratto (Hakk et al., 2009) e proposto da Hoogenboom e collaboratori (2015) fra i possibili meccanismi di accumulo nella pecora. Al contrario, la minore espressione nell'ovino degli enzimi di fase I (CYP1A1 e CYP1A2) depone

per una minore entità di idrossilazione dei DL composti, reazione indispensabile per la loro successiva eliminazione.

Figura 3 – Confronto dell'attività catalitica degli enzimi biotrasformativi di fase I (A) e di fase II (B) nel fegato di pecore (n=30) e vacche (n=10). * = $P < 0,001$.**



Infine, è importante ricordare che i campionamenti sono stati effettuati da animali di razze diverse provenienti da diversi allevamenti, fattori che determinano una notevole variabilità individuale.

Nonostante ciò, la dispersione dei valori di espressione di ciascun gene all'interno di ogni specie è risultata particolarmente limitata, rafforzando la significatività statistica e la solidità di questi risultati.

BIBLIOGRAFIA

- Scientific Opinion on the risk to public health related to the presence of high levels of dioxins and dioxin-like PCBs in liver from sheep and deer. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, 2011. EFSA J. 2011, 9: 2297.
- Benedetto A, Brizio P, Guaraldo P, Stella C, Cappa C, Baioni E, Spalenza V, Nebbia C, Abete MC. Dioxins, DL-PCB and NDL-PCB accumulation profiles in livers from sheep and cattle reared in North-western Italy. Chemosphere, Volume 152, June 2016, Pages 92-98.
- Pretheeban M, Hammond G, Bandiera S, Riggs W, Rurak D. Ontogenesis of UDP-glucuronosyltransferase enzymes in sheep. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol; 2011; 159: 159-166.
- Darwish W.S, Ikenaka Y, El-Ghareeb WR, Ishizuka M. High expression of the mRNA of cytochrome P450 and phase II enzymes in the lung and kidney tissues of cattle; Animal; 2010; 4: 2023-2029.
- Hakk H, Diliberto JJ, Birnbaum LS. The effect of dose on 2,3,7,8-TCDD tissue distribution, metabolism and elimination in CYP1A2 (-/-) knockout and C57BL/6N parental strains of mice; Toxicol Appl Pharmacol; 2009; 241: 119-126.
- Hoogenboom, R, Stark M. L, Spolders M, Zeilmaker MJ, Traag W. A, ten Dam G, Schaff HA. Accumulation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in livers of young sheep; Chemosphere; 2015-B; 122(0): 137-144.

TRACCIABILITÀ MOLECOLARE DEI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI “FROM FORK TO FARM”

Modesto P¹, Biolatti C¹, Cognata D², Caroggio P³, Bagnato A⁴, Schiavini F⁴, Benso A⁵, Rossi F⁵, Peletto S¹, Acutis PL¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² ASL BI - Dipartimento di Prevenzione - Servizio Veterinario Area B; ³ ASL 1 Imperiese, Dipartimento di Prevenzione - S.C. Sanità Animale; ⁴ Dipartimento VESPA, Università di Milano; ⁵ Politecnico di Torino

Key words: prodotti lattiero-caseari, tracciabilità molecolare, microsatelliti

SINTESI

Obiettivo del presente progetto è stato la messa a punto di un metodo per identificare, nel latte di massa (LM) e nei formaggi derivati (FOR), un “DNA fingerprinting” di azienda. Sono state coinvolte due aziende, per un totale di 26 animali. Il DNA è stato estratto dal sangue di ciascun animale prelevato a inizio esperimento, dal latte e dal formaggio inviati mensilmente dalle due aziende. E' stato selezionato un pannello di 20 microsatelliti (STRs) e i campioni sono stati testati per ognuno dei marker.

I dati genotipici sono stati analizzati con un algoritmo per verificare la possibilità di attribuzione del LM e FOR a ciascun gruppo di produzione.

I LM e FOR, prodotti da gruppi di animali diversi, hanno mostrato profili genetici differenti.

L'algoritmo sviluppato è in grado di correlare un gruppo di produzione a LM e FOR, dimostrandosi uno strumento utile nell'attribuzione/esclusione di una stalla ad un determinato prodotto caseario ai fini della sua tracciabilità.

INTRODUZIONE

La tracciabilità è uno strumento indispensabile per svelare frodi alimentari, per garantire la qualità e la sicurezza degli alimenti, per salvaguardare categorie a rischio (ad esempio individui allergici o intolleranti a particolari alimenti o additivi), per tutelare scelte alimentari individuali e per la protezione e valorizzazione di alimenti tradizionali e di alta qualità come quelli DOP e IGP. I sistemi di tracciabilità molecolare per risalire dalla vendita al dettaglio di un prodotto di origine animale alla sua origine di specie, di razza, di individuo ed eventualmente geografica, rivestono una funzione importante nel garantire l'origine e la sicurezza dei prodotti alimentari e nel valorizzare settori della produzione zootecnica nazionale, nonché nel sostenere lo sviluppo di aree ad economia marginale attraverso la valorizzazione di prodotti tipici e di nicchia. Non sempre è possibile avere a disposizione strumenti efficaci per tracciare gli alimenti e svelare e reprimere le frodi alimentari, che rappresentano non solo un danno commerciale, ma anche un pericolo per la salute del consumatore. Negli ultimi anni sta trovando sempre maggiori applicazioni la tracciabilità genetica, grazie al fatto che il DNA costituisce una prova oggettiva e difficilmente confutabile ed è applicabile a diverse matrici ed anche a prodotti lavorati.

Tra le frodi nel settore lattiero-caseario, è stato segnalato, da veterinari preposti alla vigilanza, un problema di tracciabilità di formaggi prodotti in piccoli allevamenti con annesso caseificio, autorizzati alla vendita diretta in loco. In alcune realtà esistono fondati sospetti che i formaggi venduti non provengano solo dall'azienda autorizzata, ma anche da aziende che non possiedono l'autorizzazione alla caseificazione, in modo da aumentare l'offerta di prodotto e trasformare latte eccedente di altre aziende. Tale frode presenta implicazioni di tipo sanitario, in quanto il latte di allevamenti non autorizzati non viene sottoposto ai controlli previsti per la verifica dei requisiti igienico-sanitari e nulla si conosce circa le condizioni igieniche di produzione. L'analisi del DNA potrebbe permettere di tracciare la provenienza dei prodotti, svelando la frode che non può

essere altrimenti dimostrata. La tracciabilità genetica dei prodotti lattiero caseari incontra però maggiori difficoltà, in quanto questi vengono ottenuti dal latte di massa (contenente il DNA di tutti gli individui in lattazione al momento) e vanno incontro a modificazioni durante il processo di stagionatura. In genere, la tracciabilità molecolare in campo lattiero-caseario viene applicata solo alla certificazione di provenienza del latte utilizzato per la produzione di formaggi tipici (certificazione di specie e di razza).

Obiettivo del presente progetto è stato la messa a punto di un metodo per l'analisi di STRs in pool di DNA per identificare, nel latte di massa (LM) e nei formaggi derivati (FOR), un “DNA fingerprinting” di azienda in grado di collegare il prodotto finale con l'allevamento di origine dei prodotti.

MATERIALI E METODI

Considerata l'assenza completa di studi analoghi e le difficoltà insite nella matrice, nel metodo e nell'interpretazione dei risultati, si è deciso di condurre il presente studio in condizioni controllate, sviluppando il protocollo e valutandone l'efficacia in aziende di piccole dimensioni ed esaminando l'influenza sul risultato data dalle diverse variabili che intervengono durante il processo produttivo.

Sono state coinvolte due aziende: una situata nella provincia di Biella e costituita da 12 bovine di razza Pezzata Rossa d'Oropa (BI) e una situata nella provincia di Imperia e costituita da 14 vacche di razza Bruna Alpina (IM). Sono stati prelevati, all'inizio dello studio, sangue e latte di ogni animale in lattazione. In seguito, a cadenza mensile e per la durata di un anno, sono stati inviati campioni di LM (n=12). Successivamente è stato ricevuto il formaggio caseificato a partire dal latte di massa precedentemente inviato. Il DNA è stato estratto da sangue individuale e dalle cellule somatiche raccolte dai campioni di latte (individuale e di massa) con il kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega) e dal formaggio con il QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen).

E' stato valutato un pannello di 83 STR dinucleotidi, già testati in bovini di razza Brown. I marker sono stati testati su campioni di FOR e sangue tramite PCR end point. Sono stati selezionati quei microsatelliti che hanno mostrato la presenza di ampliconi della banda attesa all'elettroforesi in gel di agarosio al 2%. I primer Forward dei marker rivelatisi più polimorfi sono stati marcati con il fluoroforo FAM o HEX per poter essere rilevati tramite elettroforesi capillare su sequenziatore automatico. In un secondo step tutti i campioni sono, quindi, stati testati tramite PCR simplex per ognuno dei 20 marker scelti.

Tramite l'analisi degli elettroferogrammi è stata eseguita la tipizzazione genica di tutti gli animali inclusi nello studio e dei campioni di LM e FOR raccolti. I dati genotipici sono stati analizzati con un algoritmo implementato durante lo studio per verificare la possibilità di attribuzione del LM e FOR a ciascun gruppo di produzione (BI e IM).

RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati hanno evidenziato che i campioni LM e FOR mostrano un profilo allelico composto da un sottogruppo di alleli appartenenti agli animali in lattazione al momento del campionamento. Inoltre, nei LM e FOR prodotti dal latte di gruppi di animali diversi in mesi differenti, si osservano profili diversi qualora si considerino tutti i marker analizzati.

Al fine di verificare l'efficacia dell'algoritmo appositamente implementato, è stata condotta un'analisi su sei LM (tre provenienti da BI e tre da IM) e sei FOR (tre provenienti da BI e tre da IM). In Tabella 1 vengono riportati i valori di *penalty* e *correlazione* ottenuti applicando, rispettivamente, due diversi tipi di analisi previste dall'algoritmo (verifica e la simulazione rispettivamente). Il *penalty* ha valori compresi tra 0 e 1, quanto più tende a zero tanto più la simulazione che segue è da considerare affidabile e viceversa. La valutazione qualitativa della correlazione espressa ha valori che vanno da 0 a 1, valori prossimi a 1 indicano una alta correlazione.

I valori di *penalty* sono allineati per entrambe le stalle e variano da 0,06 a 0,20 per LM e FOR di BI e da 0,00 a 0,29 per LM e FOR di IM.

I valori di correlazione variano da 0,44 a 0,80 per i LM e FOR di BI e da 0,44 a 0,75 per i campioni di IM.

In Tabella 2 vengono riportati di dati di correlazione e *penalty* ottenuti confrontando i prodotti LM e FOR di BI con la stalla di IM e di seguito i prodotti LM e FOR di IM con la stalla di BI (prova 1, 2, 3 e 4 rispettivamente). I valori di *penalty* variano da 0,54 a 0,86, quelli di correlazione da 0,106 a 0,348.

L'algoritmo implementato nella fase terminale del progetto si è, quindi, dimostrato in grado di verificare quanto il pattern/fingerprinting del prodotto (LM o FOR) sia correlato con le caratteristiche genetiche del gruppo di animali di partenza.

L'algoritmo sviluppato fornisce un valore di *penalty* e correlazione di un gruppo di produzione ad un prodotto LM e FOR, il valore è confrontabile/valutabile dal punto di vista statistico. In tal modo *penalty* e valore di correlazione forniranno dati significativi da utilizzare nell'attribuzione e/o esclusione di una stalla ad un determinato LM o FOR ai fini della tracciabilità prodotto caseario.

Tabella 1 – Output dell'algoritmo per le analisi di verifica e simulazione eseguita su ciascun GP ed i rispettivi LM e FOR

BIELLA			IMPERIA		
	CORR	PENALTY		CORR	PENALTY
LM_GEN13	0.62	0.17	LM_FEB13	0.68	0.21
F_GEN13	0.80	0.20	F_FEB13	0.75	0.00
LM_GIU13	0.58	0.11	LM_LUG13	0.65	0.00
F_GIU13	0.70	0.35	F_LUG13	0.61	0.08
LM_DIC13	0.64	0.06	LM_FEB14	0.44	0.00
F_DIC13	0.44	0.12	F_FEB14	0.66	0.29

Tabella 2 – Output dell'algoritmo per le analisi di verifica e simulazione crociata eseguita su ciascun GP ed i LM e FOR dell'altro GP. Prova 1: LM BI vs GP IM; Prova 2: FOR BI vs GP IM; Prova 3: LM IM vs GP BI; Prova 4: FOR IM vs GP BI

	CORR	PENALTY
PROVA 1	0.348	0.86
PROVA 2	0.424	0.75
PROVA 3	0.106	0.57
PROVA 4	0.176	0.54

Concludendo, il progetto ha portato nuove conoscenze sull'efficienza di amplificazione di STR in matrici complesse (LM e FOR) e sulla perdita di informazioni genetiche rispetto all'analisi di matrici semplici quale sangue e latte. Sono state chiarite l'influenza della stagionatura e l'applicabilità del metodo per confrontare le informazioni ottenute dal campione prelevato in stalla (sangue o LM) e da quello prelevato a fine stagionatura (punto vendita). Grazie all'attività svolta si è arrivati alla definizione di un pannello di marcatori utili alla tracciabilità di pool di latte e di formaggio, ed è stata dimostrata la sua efficacia nella tracciabilità dei prodotti caseari ottenuti da piccoli produttori.

POSSIBILE INTRODUZIONE DI INSETTI VETTORI ESOTICI IN ITALIA: MONITORAGGIO ENTOMOLOGICO COME STRUMENTO DI PREVENZIONE

Pautasso A¹, Radaelli MC¹, Verna F¹, Francese DR¹, Mignone W¹, Ballardini M¹, Ferrari A¹, Orusa R¹, Giacobini M², Prearo M¹,
Torina A³, Capelli G⁴, Dottori M⁵, Gavaudan S⁶, Tiberti D⁷, Toma L⁸, Mosca A⁹, Vitale N¹, Chiavacci L¹, Casalone C¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ²Università degli Studi di Torino ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia; ⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie; ⁵Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna; ⁶Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche; ⁷Seremi (ASL AL); ⁸Istituto Superiore di Sanità; ⁹IPLA

Key words: zanzare esotiche, sorveglianza entomologica; network

SINTESI

Negli ultimi decenni con la globalizzazione sono state introdotte in Europa zanzare vettori di arbovirus "esotiche" di interesse medico umano e veterinario (Chikungunya, West Nile, Usutu e Dengue). Queste zanzare, endemiche di zone tropicali e subtropicali si stanno insediando stabilmente anche alle nostre latitudini (Schaffner et al., 2009; Capelli et al., 2011). Uno degli strumenti più efficaci per controllare l'introduzione di nuove specie e applicare tempestivamente misure di eradicazione è il monitoraggio entomologico nei punti di scambio e collegamento nazionali e internazionali.

Obiettivo del lavoro è descrivere l'attività di monitoraggio attivata nel 2013 e 2014 in luoghi a particolare rischio per l'introduzione di specie esotiche di Liguria, Piemonte, Valle d'Aosta, Veneto, Emilia Romagna, Marche, Lazio e Sicilia, grazie alla costituzione di un network operativo interregionale.

INTRODUZIONE

Le malattie trasmesse da vettori (VBDs - vector borne diseases) rappresentano un gruppo eterogeneo di infezioni contraddistinte da aspetti epidemiologici peculiari, che sono il risultato di una complessa interazione tra agenti patogeni (virus, batteri, protozoi, elminti), ospiti vertebrati, artropodi vettori ed ecosistema (clima e ambiente). Nell'ambito delle VBDs particolare attenzione deve essere rivolta alle malattie infettive virali trasmesse da zanzare (Mosquitoes borne diseases- MBDs) come West Nile, Chikungunya, Dengue e Usutu. L'incremento demografico mondiale e la conseguente urbanizzazione, l'intensificazione dei flussi e delle movimentazioni legate allo spostamento di persone, alla dispersione di animali e alla commercializzazione di beni di consumo, hanno permesso l'introduzione in aree indenni di nuove specie di vettori e di patogeni provenienti da altri Paesi.

Nel presente studio attraverso l'attivazione di piani di sorveglianza entomologica, è stata indagata la possibilità di introduzione in Italia di nuovi vettori attraverso vie di scambio commerciale, flussi turistici provenienti da paesi europei e paesi Terzi, aree di sosta merci e animali e aree di confine dove alcuni vettori sono presenti. Hanno preso parte al progetto otto Regioni del Nord, Centro e Sud Italia con differenti tipologie d'ambiente e territorio: montano, marittimo e di pianura. È stato creato un network che ha coinvolto gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali presenti sui territori, l'Istituto Superiore di Sanità, l'Università della Tuscia, la Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, il Servizio di riferimento Regionale di Epidemiologia per la sorveglianza, la prevenzione e il controllo delle Malattie Infettive (SEREMI) e l'Istituto per le Piante da Legno e l'Ambiente (IPLA).

MATERIALI E METODI

Sono state scelte e monitorate un totale di 25 aree comprendenti porti, aeroporti, autoporti e zone di afflusso

turistico presenti sul territorio di Piemonte, Liguria, Valle d'Aosta, Veneto, Emilia Romagna, Marche, Lazio e Sicilia. Da giugno a ottobre (anni 2013 e 2014), nei siti individuati nella maggior parte delle Regioni sono state posizionate diverse tipologie di trappole (BG-Sentinel, Gravid Trap, CDC CO2, CDC light, ovitrappole), e in particolari situazioni (ispezione di aeromobili) sono stati impiegati aspiratori. In Veneto invece sono stati monitorati 105 Comuni compresi nelle Province di Belluno, Vicenza, Treviso e Trento.

Gli esemplari adulti di zanzara sono stati identificati tassonomicamente sulla base delle chiavi per il riconoscimento morfologico pubblicate presso l'Istituto Superiore di Sanità (Romi et al., 1997) e di parametri morfologici in accordo con Stojanovich (1997).

Le stecche di masonite o la carta bibula prelevate dalle ovitrappole sono state portate in laboratorio e le uova sono state contate e poste in vaschette di schiuma con acqua e nutrimento (cibo secco per animali da affezione tritato). Gli esemplari sviluppati fino allo stadio adulto sono stati soppressi in congelatore e identificati secondo le chiavi proposte da Rueda (2004).

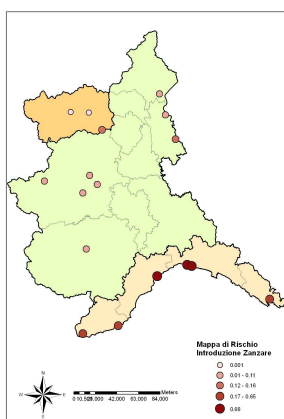
Su un campione di *Culex pipiens* catturate presso il porto di Civitavecchia è stata effettuata un'analisi molecolare con il metodo basato sull'amplificazione del marcatore CQ11 per distinguere le 2 bioforme di *Culex pipiens* (*pipiens* vs *molestus*).

RISULTATI

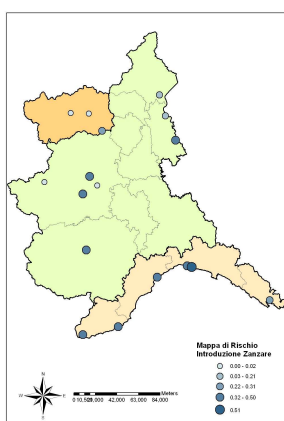
In Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, nei due anni di monitoraggio sono state catturate in totale 17467 zanzare e raccolte 7162 uova; le due specie maggiormente catturate sono state *Aedes albopictus* (7780 esemplari, 44,54%) e *Culex pipiens* (7472 esemplari, 42,78%). Nel principale aeroporto regionale piemontese (Torino Caselle), è stato attuato l'impiego degli aspiratori per campionare le cabine degli aerei provenienti da luoghi in cui alcune specie esotiche di zanzare sono endemiche. In diciotto aerei provenienti da 7 località nazionali e internazionali, è stato trovato solo un adulto di *Aedes albopictus* morto.

Per queste Regioni sono state prodotte due mappe di rischio basate su due diversi modelli di analisi: 1) localizzazione geografica e temperature medie, 2) flussi turistici e commerciali. Secondo tali mappe hanno una maggior probabilità di introduzione di zanzare esotiche i siti della Regione Liguria (probabilità che aumenta ulteriormente quando le temperature medie superano i 24°C) e le località attraversate da maggiori flussi commerciali (per portata e provenienza). (Mappa n. 1 e Mappa n.2)

Mapa n. 1
Mapa di rischio introduzione zanzare esotiche in Piemonte
Liguria e Valle d'Aosta in base alle temperature medie



Mapa n. 2
Mapa di rischio introduzione zanzare esotiche in Piemonte
Liguria e Valle d'Aosta in base ai flussi commerciali



In Sicilia sono state catturate 5601 zanzare appartenenti a quattro specie: *Culex pipiens* (75%), *Aedes albopictus* (12%), *Culiseta longiareolata* (3%), *Anopheles maculipennis* (0,1%). Sono state raccolte 8628 uova tramite ovitrappe

In Veneto è stata riscontrata la presenza di *Aedes koreicus* in 46 comuni dei 105 monitorati. In aggiunta ad *Aedes koreicus* sono state identificate 6 specie di zanzare: *Culex pipiens*, *Culex hortensis*, *Aedes albopictus*, *Ochlerotatus geniculatus*, *Anopheles maculipennis* s.l. e *Culiseta longiareolata*.

In Emilia Romagna sono state catturate 7467 zanzare. Fra le specie catturate prevale *Culex pipiens*, quindi *Aedes caspius* ed infine *Aedes albopictus*. Nelle Marche sono state catturate 3146 zanzare. La gran parte delle quali costituite da *Culex pipiens* e *Aedes albopictus*.

Nel Lazio sono state catturate 875 zanzare appartenenti a 3 specie: *Aedes albopictus*, *Culex pipiens* e *Culiseta longiareolata*. Sono state raccolte 1042 uova. Le zanzare adulte sfarfallate sono state identificate come *Aedes albopictus*. 223 zanzare (*Culex pipiens*) sono state processate e distinte nelle seguenti forme: *Culex pipiens* f. *pipiens* 66% (n=147), *Culex pipiens* f. *molestus* 21% (n=47) e ibridi 13% (n=29).

CONCLUSIONE E DISCUSSIONI

I monitoraggi nelle diverse Regioni partner hanno permesso di rilevare la comparsa della zanzara tigre (*Aedes albopictus*) in Valle d'Aosta (considerata indenne) e la consolidata presenza della zanzara coreana (*Aedes koreicus*) in Veneto. I risultati ottenuti dimostrano che il monitoraggio entomologico rappresenta un valido

strumento di rilevazione dell'introduzione di specie esotiche e non solo: le informazioni derivanti dalla sorveglianza infatti, possono essere utilizzate per la pianificazione di attività mirate e la gestione di eventuali emergenze sanitarie legate a MBDS.

In questo quadro si evidenzia l'importanza della collaborazione tra diverse figure professionali (medici, veterinari, biologi, epidemiologi, entomologi) per la creazione di un flusso continuo di informazione necessario a mettere in atto l'attività di prevenzione e controllo della salute pubblica. La creazione di un network di raccolta dati provenienti da diverse Regioni con caratteristiche ambientali differenti, rappresentanti le peculiarità del territorio nazionale, ha fornito una visione d'insieme della complessa realtà epidemiologica italiana dando un valore aggiunto al progetto.

BIBLIOGRAFIA

1. Capelli G, Drago A, Martini S, Montarsi F, Soppelsa M, Delai N, Ravagnan S, Mazzon L, Schaffner F, Mathis A, Di Luca M, Romi R, Russo F. First report in Italy of the exotic mosquito species *Aedes (Finlaya) koreicus*, a potential vector of arboviruses and filariae. *Parasites & Vectors* 2011; 4:188
2. Schaffner F, Aufmann CK, Hegglin D, Mathis A. The invasive mosquito *Aedes japonicus* in Central Europe *Medical and Veterinary Entomology* 2009; 23, 448–451.
3. Romi R, Sabatinelli G. Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli stadi preimaginali (Diptera, Culicidae). *Fragmenta Entomologica XXIX Supplemento*;1997; 1-141
4. Stojanovich, C.J. Scott HG. Mosquitoes of the Italian biogeographic area which includes the Republic of Malta, the French island of Corsica and all of Italy except the northern provinces. *Mosquitoes of Italy*. Ed. Stojanovich CJ & Scott HG. 1997.

SORVEGLIANZA SINDROMICA VETERINARIA: APPLICAZIONI ALLA MORTALITÀ BOVINA

Crescio MI, Massarotto V, Aiassa E, Marra A, D'Errico V, Grindatto A, Zoppi S, Careddu ME, Biolatti PG, Pistone G, Dondo A, Ru G

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta;

Key words: syndromic surveillance, dairy, mortality

SINTESI

La sorveglianza sindromica (SyS), ha recentemente svelato il suo potenziale in campo veterinario. In questo lavoro abbiamo implementato, valutato e validato un SyS finalizzato ad individuare anomalie nella mortalità dei bovini da latte in Piemonte. Inoltre è stata formulata una definizione sintetica delle principali cause di mortalità, basandosi sui risultati di uno studio di coorte che prevedeva l'esecuzione di esami necroscopici su tutti gli animali morti nelle aziende arruolate. Le anomalie segnalate dal SyS sono riconducibili a condizioni climatiche estreme. Lo studio di coorte ha permesso di identificare le principali cause di morte dei bovini da latte e di classificarle in sindromi per una futura integrazione con il SyS. I metodi proposti per la SyS sono applicabili all'intera nazione, in quanto sviluppati sui dati standardizzati a livello nazionale.

INTRODUZIONE

Nata per fronteggiare la minaccia bioterroristica e per individuare rapidamente malattie emergenti, la sorveglianza sindromica (SyS) ha dimostrato il proprio potenziale su entrambi i versanti della salute pubblica (umano e veterinario). La mortalità è tradizionalmente riconosciuta come un indicatore di base della salute di una popolazione. Il monitoraggio degli eccessi di mortalità negli animali domestici si è già dimostrato utile nell'individuare epidemie di malattie (per es. Bluetongue sierotipo 8 in Francia), e nel valutare l'impatto di condizioni climatiche estreme (per es. ondate di calore) tuttavia una migliore comprensione del fenomeno non può prescindere dalla definizione della causa specifica di morte. Lo scopo del progetto è strutturare un sistema di sorveglianza sindromica nel bovino da latte utilizzando i dati dell'anagrafe bovina nazionale, verificando contestualmente la possibilità di applicare un sistema di classificazione delle cause di morte, utilizzando il Piemonte come modello.

MATERIALI E METODI

Il SyS è stato implementato 1) tramite uno studio retrospettivo che valutava l'andamento della mortalità nel tempo tramite analisi descrittiva dei dati e sviluppando modelli per dati longitudinali (Poisson, Autoregressive Integrated Moving Average (ARIMA)), 2) tramite una applicazione a dati prospettici di carte di controllo (Shewhart e exponentially weighted moving average (EWMA)) opportunamente adattate a dati autocorrelati. Le performance del SyS sono state valutate mediante applicazione ai dati reali e tramite simulazione di outbreak. Per definire le cause di morte una coorte di bovini da latte è stata selezionata in base a caratteristiche aziendali predefinite (stratificata per provincia, appartenenza ad associazione allevatori, con un numero di capi superiore a 19, desiderio di cooperare). Tutti i bovini morti nel periodo di studio (01/04/2012-31/03/2015) sono stati sottoposti a necropsia ed esami collaterali. Integrando i dati di laboratorio con quelli dell'anagrafe bovina è stato possibile calcolare tassi di mortalità grezzi e specifici per classe di

età (< 6 mesi, 6-24 mesi >24 mesi) e la proporzione di cause di morte per ciascuna classe di età.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Il SyS implementato ha segnalato 13 anomalie nel periodo 2011-2014, la maggior parte delle quali identificate come legate a condizioni climatiche estreme (Tabella 1). La simulazione degli outbreaks mostra una elevata specificità del SyS, ma una sensibilità che varia a seconda della forma, ampiezza e durata degli outbreaks. Nello studio di coorte sono stati arruolati 13935 bovini (19825 anni-bovino), appartenenti a 38 diverse aziende. Il tasso di mortalità grezzo è 3.6/100 anni bovino (IC95% 3.3-3.9). I vitelli (<6 mesi) hanno un rischio relativo di morire rispetto ai vitelloni pari a 23.5 (IC95% 18.-30.3). Tra le patologie infettive, quelle del tratto gastroenterico sono la principale causa di mortalità in tutte e tre le classi di età (Tabella 2). Benchè applicati al Piemonte i metodi proposti per la SyS sono applicabili all'intera nazione, in quanto sviluppati sui dati standardizzati a livello nazionale. Lo studio di coorte ha permesso di identificare le principali cause di morte dei bovini da latte e di classificarle in sindromi per una futura integrazione con il SyS

Tabella 1 – .Allarmi segnalati dall'EED applicato a dati reali nel periodo 2011-2014. SH=Shewhart, EWMA=Exponentially Weighted Moving Average

Settimana	<6 mesi	6-24 mesi	24 mesi	Causa
34-2011	n.r	n.r	SH+EWMA	Onda di calore
35-2011	n.r	n.r	SH+EWMA	Onda di calore
6-2012	SH+EWMA	n.r	n.r	Freddo estremo
7-2012	EWMA	EWMA	n.r	Freddo estremo
8-2012	EWMA	n.r	EWMA	Freddo estremo
27-2012	n.r	n.r	EWMA	Non individuata
31-2012	EWMA	n.r	n.r	Non individuata
34-2012	n.r	n.r	SH+EWMA	Onda di calore
51-2012	n.r	SH+EWMA	n.r	Freddo
52-2012	n.r	EWMA	n.r	Freddo
31-2013	n.r	n.r	EWMA	Onda di calore
38-2013	n.r	EWMA	n.r	Non individuata
48-2013	n.r	EWMA	n.r	Non individuata

Tabella 2 – .Tassi specifici di mortalità per causa di morte (numero di morti/100 anni bovino) nel periodo 01/04/2012-01/04/2015 e relativi intervalli di confidenza al 95% (IC 95%)

Causa di morte	<6 mesi		6-24 mesi		>24 mesi	
	Tasso	IC 95%	Tasso	IC 95%	Tasso	IC 95%
Accidentali	32.4	15.4-67.9	1.8	0.6-5.7	1	0.6-1.5
Gravidanza e parto	364.5	211.7-627.8	n.r	n.r	0.9	0.6-1.4
Sistema gastro-enterico	22.1	17.3-28.3	1.5	0.8-3.1	1.2	0.9-1.5
Sistema respiratorio	5.6	4.1-7.6	1.5	0.8-3.0	0.8	0.4-1.9
Metaboliche	n.r	n.r	n.r	n.r	4.7	0.7-33.2
Mammella e capezzolo	n.r	n.r	n.r	n.r	1.1	0.5-2.2
Altre	22.4	17.0-26.9	2.6	1-7.0	0.8	0.5-1.1
Totale	13.8	11.9-16.0	1.7	1.1-2.5	1	0.8-1.2

BIOFILM BACTERIA IN MEDICINA VETERINARIA: VALUTAZIONE DI NUOVE STRATEGIE MIRATE A CONTRASTARE LE INFEZIONI PERMANENTI

Goria M¹, Zoppi S¹, De Somma D¹, Romano A¹, Rizzo G¹, Callipo MR¹, Sant S¹, Mei D¹, Pinto L¹, Vitale M², Dondo A¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² Istituto Zooprofilattico della Sicilia

Key words: BFA, MBEC, MLST

SINTESI

I microrganismi in forma di biofilm vivono in una matrice extracellulare autoprodotta che media l'adesione alle superfici e svolge la funzione di sistema difensivo esterno, mantenendo enzimi extracellulari prossimi alle cellule attivi contro molecole antagoniste. Numerosi studi sono stati condotti per conoscere i meccanismi e i geni coinvolti nella formazione del biofilm in diverse specie batteriche responsabili d'infezioni persistenti nell'uomo, ma in Medicina Veterinaria il campo al momento è meno sondato. Poiché le infezioni associate a biofilm difficilmente sono focalizzate nella normale routine diagnostica, esse concorrono attraverso l'uso massiccio e inappropriato di antibiotici alla diffusione dei fenomeni di antibiotico-resistenza.

INTRODUZIONE

Il batteri, negli ambienti naturali, sono presenti in due forme: liberi allo stato planctonico (P) o in forma sessile (S) adesi tra di loro su un substrato. La forma planctonica è fondamentale per la proliferazione e la diffusione batterica nell'ambiente, ma allo stesso tempo rende più vulnerabili tali microrganismi all'azione degli antibiotici e ai meccanismi di difesa dell'ospite. Per sopravvivere in condizioni ostili, alcune specie batteriche dalla forma planctonica si organizzano in forma sessile, inducendo la produzione di una matrice extracellulare polisaccaridica che include la popolazione batterica, consentendone l'adesione a superfici di varia natura. Tale organizzazione viene definita biofilm. La Biofilm-Forming Ability (BFA), ampiamente studiata in campo umano, si osserva anche in diversi patogeni di interesse veterinario. Un'infezione spesso non attribuita a patogeni organizzati in biofilm può interferire nel percorso diagnostico ordinario ma soprattutto in quello terapeutico che, se somministrato con schemi convenzionali, può cronicizzare la forma morbosa rendendola refrattaria ai tradizionali trattamenti antibiotici. Ciò favorisce altresì la diffusione di fenomeni di antibiotico-resistenza (AR).

Obiettivi principali del progetto sono stati:

- studio di una serie di marcatori molecolari, fenotipici e genotipici, al fine di plasmare gli approcci diagnostici mirati a riconoscere le infezioni sostenute da patogeni con BFA e per mirare gli interventi terapeutici e di profilassi praticati in campo veterinario, nelle forme infettive ad eziologia batterica con carattere cronico-ricorrente;
- caratterizzazione e mappatura mediante genotipizzazione dei ceppi di *E. coli*, riconosciuti come patogeni, presenti negli allevamenti sul territorio di competenza dell'IZSTO.

MATERIALI E METODI

Campionamento. Considerando una serie di infezioni a carattere cronico-ricorrente, sono stati selezionati 31 ceppi patogeni comprendenti le seguenti specie batteriche: *E. coli*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.* e *P. aeruginosa*.

Pannello di antibiotici. Gli antibiotici utilizzati nei test di screening fenotipici sono stati scelti in base alla sensibilità dei ceppi agli stessi, determinata mediante antibiogramma con metodica Kirby-Bauer. Il pannello selezionato è stato

così composto da: Tetraciclina, Sulfametoxazolo/Trimetoprim, Ciprofloxacina, Gentamicina, Amikacina, Streptomina, Penicillina, Amoxicillina/Acido Clavulanico, Cefalexina ed Enrofloxacin.

Test di screening fenotipico. Per valutare fenotipicamente la BFA dei ceppi oggetto di studio è stato utilizzato il saggio della Safranina, secondo le indicazioni riportate in letteratura da Ceri *et al.* 2001. La determinazione della sensibilità della forma P e della forma S dei ceppi batterici nei confronti dei diversi antibiotici è stata determinata rispettivamente mediante calcolo della Minima Concentrazione Inibente (MIC) e della MBEC (Minima Concentrazione di Eradicazione del Biofilm).

Test di screening genotipico. E' stato allestito un pannello di prove in PCR end-point per la ricerca di 13 geni da utilizzare come marcatori per la BFA. I geni indagati codificano per fattori di adesione (*EAF*, *EPE*), per fimbrie e pili (*aggA*, *agg3A*, *aggR*, *traa*, *pilS*) per fattori di colonizzazione (*cfaA*), per geni presenti su plasmidi (*traJ* - *pCTX plasmids*, *pet*) e per substrati che compongono la matrice su cui si instaura il biofilm (*pic* - *Mucinase*, *pgaA* - *PGA synthesis*).

Caratterizzazione molecolare. I ceppi di *E. coli* sono stati caratterizzati dal punto di vista molecolare mediante MLST (MultiLocus Sequence Type), secondo lo schema proposto dall'Università di Warwick, basato sull'analisi dei polimorfismi di sequenza di 7 geni *housekeeping*: *adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA*. (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>)

RISULTATI E CONCLUSIONI

Risultati. In Tabella 1 sono riportati i risultati del saggio di espressione della BFA: sulla base delle indicazioni riportate in letteratura (Ceri *et al.* 2001) è stato possibile classificare i 31 diversi microrganismi come segue: 2 ceppi STRONG (forti produttori di biofilm), 16 ceppi WEAK (deboli produttori di biofilm) e 13 ceppi NON BIOFILM FORMER.

Tabella 1. Categorizzazione dei diversi ceppi come potenzialmente BFA in funzione del saggio della safranina

SPECIE BATTERICHE	RANGE DO	CATEGORIZZAZIONE DEI CEPPI
<i>E.coli</i> (n=10)	41-76	2 Biofilm Former Weak 1 Biofilm Former Strong 7 No Biofilm Former
<i>Salmonella spp</i> (n=10)	50-81	9 Biofilm Former Weak 1 Biofilm Former Strong
<i>P. aeruginosa</i> (n=1)	66-80	Biofilm Former Weak
<i>S. aureus</i> (n=10)	43-85	4 Biofilm Former Weak 6 No Biofilm Former

I risultati delle prove MIC e MBEC, indicanti la sensibilità di ogni ceppo batterico in forma P e in forma S agli antibiotici testati, hanno dimostrato una maggior resistenza agli antibiotici nella forma S rispetto alla forma P.

Per quanto riguarda il profilo genico dei 13 ceppi di *E.coli* per i marcatori genetici della BFA, si rilevano 5 ceppi positivi per il gene *traa* e 2 ceppi positivi per il gene *pet*, mentre solo un ceppo ha mostrato positività per il gene *agg3A*, codificante per la fimbria aggregativa III. Il maggior numero di positività, 9 ceppi su 13, si è riscontrato per la presenza del gene *pgaA*, direttamente correlato alla BFA, poichè codifica per il componente polisaccaridico della matrice.

In Tabella 2 sono invece riportati i risultati su 10 ceppi di *E.coli* della variazione dell'espressione genica di *AggaR*, *stx2B* e *pggA*, normalizzati rispetto al gene *rrsH*, valutati per confronto in ciascun ceppo nella forma P e S. E' possibile notare la diminuita (down) o l'aumentata espressione (up) relativa ai geni implicati nella formazione del biofilm. La maggior parte dei ceppi non mostra variazione di espressione genica (No change). In particolar, soltanto un ceppo classificato come STRONG per la produzione di biofilm ha mostrato un'elevata upregolazione del gene *stx2B*, confermando la correlazione di tale gene con la BFA.

Tabella 2. Variazioni dell'espressione genica relativa ai ceppi di E.coli sulle prove di MBEC.

<i>E.coli</i>	Espressione			Geni presenti		
	<i>AggaR</i>	<i>Stx2B</i>	<i>pggA</i>			
Ceppo 1	No change	No change	No change		pggA	
Ceppo 2	No change	UP	UP		pggA	
Ceppo 3	UP	UP	No change		pggA	
Ceppo 4	No change	No change	No change	traa	pggA	
Ceppo 5	UP	UP	DOWN		pggA	pet
Ceppo 6	No change	DOWN	DOWN		pggA	
Ceppo 7	No change	No change	UP		pggA	
Ceppo 8	No change	UP	UP			
Ceppo 9	No change	DOWN	DOWN		pggA	
Ceppo 10	No change	UP	No change		pggA	

L'utilizzo della MLST per la caratterizzazione molecolare dei ceppi di *E.coli* pervenuti in IZSTO ha evidenziato un'alta eterogeneità dei ceppi circolanti sul territorio di competenza: su 42 ceppi (selezionati per rappresentatività geografica tra circa 80 che nel 2014 sono stati isolati e utilizzati per la produzione di vaccini stabulogeni), sono stati riscontrati 38 diversi SequenceType (ST). In particolare, appena 3 profili sono stati riscontrati più di una volta: ST950 in 2 ceppi, ST5002 in 2 ceppi e ST5060 in 3 ceppi.

E' stato inoltre creato in modo residente presso l'IZSTO il Database Biofilm Bacteria, che permette di catalogare i ceppi caratterizzati collegandoli alla marca auricolare identificativa dell'animale e all'azienda di provenienza, in modo da costituire una banca dati utile per studi di epidemiologia molecolare.

CONCLUSIONI

I risultati sembrano mostrare una scarsa correlazione tra la classificazione fenotipica operata sulla base del test della

Safranina e il genotipo evidenziato, sia con lo screening per la presenza di geni coinvolti nell'aderenza e nella formazione del biofilm, sia con i fenomeni di variazione dell'espressione genica dei ceppi al termine delle prove di MBEC. E' stato riportato in letteratura come il mezzo di coltura e la limitatezza delle condizioni sperimentali possano influire sulla capacità dei ceppi di formare biofilm: l'assenza in vitro di adeguati stimoli ambientali potrebbe condizionare il passaggio dei batteri alla forma in biofilm diversamente da quanto avviene in vivo. Ulteriori studi sarebbero necessari per ampliare il pannello di markers genetici di BFA. L'acquisizione di metodi fenotipici e genotipici per lo screening e la caratterizzazione dei ceppi per BFA ha permesso di irrobustire il know-how disponibile per l'applicazione di nuove strategie nella lotta all'AR. La creazione del DB Biofilm Bacteria, quale strumento utile all'epidemiologia molecolare delle infezioni da *E.coli*, potrà supportare tali strategie evidenziando le potenziali problematiche correlate ai Biofilm Bacteria in Medicina Veterinaria.

BIBLIOGRAFIA

1. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res. 2002 Apr; 66(2):86-92.
2. Ceri H, Olson M, Morck D, Storey D, Read R, Buret A, Olson B. The MBEC Assay System: multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. Methods in Enzymology, 2001, 337:377-385.
3. Mohamed, J. A., Huang, D. B., Jiang, Z. D., DuPont, H. L., Nataro, J. P., Belkind-Gerson, J. & Okhuysen, P. C. (2007). Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. J Clin Microbiol 45, 121-126.
4. Jianfa Bai, Zachary D. Paddock, Xiaorong Shi, Shubo Li, Baoyan An, and Tiruvor G. Nagaraja. Applicability of a multiplex PCR to detect the seven major Shiga toxin-producing *Escherichia coli* based on genes that code for serogroup-specific O-antigens and major virulence factors in cattle feces Foodborne Pathogens and Disease. June 2012, 9(6): 541-548. doi:10.1089/fpd.2011.1082.
5. Safadi R., Abu-Ali G.S., Sloup R.E., Rudrik J.T., Waters C.M., Eaton K.A., Manning S.D. Correlation between In Vivo Biofilm Formation and Virulence Gene Expression in *Escherichia coli* O104:H4. PLoS ONE. July 2012. 7.7.
6. Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C., Ochman, H., and Achtman M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol.Microbiol. 60(5), 1136-1151

STUDIO CROSS-SECTIONAL SU CEPPI DI ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI SHIGA TOSSINE (STEC) IN UN'AREA CIRCOSCRITTA DEL PIEMONTE

De Somma D¹, Sant S¹, Bossotto T¹, D'Errico V¹, Perosino M¹, Di Blasio A¹, Marra A¹, Monnier M¹, Romano A¹, Maugliani A², Ingravalle F¹, Crescio M¹, Bertolini S¹, Morabito S², Maurella C¹, Gorla M¹, Dondo A¹, Zoppi S¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² Istituto Superiore di Sanità

Key words: E. coli verotoxigenic O26, PFGE, drug susceptibility, dairy cattle

SINTESI

E. coli verocitotossici (VTEC) sono un gruppo eterogeneo di patogeni zoonotici, e i ruminanti, in particolare i bovini, sono considerati il naturale reservoir del sierogruppo O157, mentre per gli altri membri i dati epidemiologici sono ancora controversi. Per questo e per rispondere in modo appropriato con misure di controllo e di prevenzione, un monitoraggio continuo del profilo genetico dei fattori di virulenza sia in ceppi isolati animali sani che in casi clinici di infezione è essenziale. Il presente studio rappresenta il primo esempio di analisi sistematica della presenza e circolazione di VTEC nei bovini in Piemonte, dove si assiste ad una maggiore prevalenza di *E. coli* O26, in particolare negli animali giovani.

I dati ottenuti dalla cluster analysis dei ceppi O26 corroborerebbero l'ipotesi di una non correlazione fra i casi umani e la presenza di allevamenti positivi O26 STEC.

INTRODUZIONE

Escherichia coli è un importante componente della microflora commensale dell'intestino degli esseri viventi omeotermi. Questa specie batterica, tuttavia, include una varietà di ceppi patogeni in grado di causare un ampio spettro di patologie non solo negli animali ma anche nell'uomo.

Molti sono gli studi che attestano al bovino il ruolo di reservoir per *E. coli* O157, ma in generale, non è ancora del tutto chiarito il ruolo degli animali domestici e selvatici nel mantenimento e nella loro trasmissione all'uomo. La prevalenza di STEC sia nell'animale sia nell'ambiente è alquanto difficile da stimare e in letteratura nel corso del tempo è cambiata molto. È certo che la colonizzazione degli animali non dura più di due mesi e che generalmente ha carattere epidemico con picchi stagionali. In Italia i tassi più elevati d'incidenza della SEU sono stati riscontrati nelle regioni del Nord che costituiscono le aree a maggiore densità zootecnica. Negli ultimi anni, in particolare, il sierogruppo O26 è stato responsabile del maggior numero di casi. Nel corso del piano di sorveglianza della SEU, avviato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) nel 1988, sono stati individuati alcuni focolai epidemici di SEU associati a infezione da VTEC. In particolare in Piemonte la stragrande maggioranza dei casi si è concentrata in due raggruppamenti principali, uno in provincia di Torino e uno in provincia di Cuneo (Scavia, Caprioli, unpublished). Il progetto, che si delinea come uno studio "cross-sectional", si propone di stimare la prevalenza di STEC nell'area della provincia di Torino coinvolta nei focolai umani di SEU e definire il razionale per uno studio successivo in un contesto territoriale più ampio, procedendo inoltre alla valutazione dei potenziali fattori di rischio (management, presenza di patogeni enterici). Infine, tecniche di epidemiologia molecolare saranno utilizzate al fine di studiare la correlazione tra i casi umani e gli STEC isolati dal serbatoio animale.

MATERIALI E METODI

Per definire l'area di studio sono stati analizzati i dati del registro dei casi di SEU [http://www.iss.it/seu] che si sono verificati negli ultimi 10 anni (2003-2013). Sono stati selezionati i 45 comuni in cui sono stati registrati questi casi (n=64). È stata quindi prodotta una mappa tematica utilizzando il software ArcGIS versione 9.2 (ESRI, Redlands, CA, USA) per rappresentare la distribuzione di questi comuni. In 12 di questi comuni non risultava registrato alcun allevamento attivo da latte o misto, per cui la popolazione per l'estrazione del campione si è riferita a 33 comuni (N=302). La dimensione media di queste aziende era pari a 94. È stata utilizzata la mediana in quanto la distribuzione della variabile era asimmetrica. La dimensione campionaria è stata stimata sulla base di un campionamento a 2 livelli, secondo un criterio di 'definizione della prevalenza della malattia' sul territorio piemontese per la selezione delle aziende e di una 'detection of disease' per la definizione del numero dei capi da testare all'interno di ciascuna azienda. Per la definizione della dimensione campionaria è stato utilizzato il software EpiTools [http://epitools.ausvet.com.au/]. A cadenza settimanale per circa otto mesi, sono stati programmati i campionamenti nelle aziende selezionate. Mediante dispositivi monouso che prevedono la raccolta di almeno 50 g di materiale, sono stati raccolti in almeno cinque punti differenti del locale feci fresche, distinguendo il prelievo per settore: concimaia, infermeria, lattazione, asciutta, sala parto, vitellaia (<1 mese, 1-3 mesi, 3-6 mesi, >6mesi) e prevedendo campioni aggiuntivi in presenza di altri settori e/o di animali con sintomatologia enterica in atto. I campioni così ottenuti da ciascun settore, sono successivamente uniti in laboratorio e ne viene estratto un sub-campione di circa 25g da sottoporre ad analisi microbiologiche (immuno-magneto-separazione, isolamento su terreni cromogeni per STEC [3]; isolamento su Herrold's Medium per paratubercolosi (MAP), test ELISA per *E. coli* K99, Coronavirus, *Cryptosporidium* e Rotavirus), parassitologiche e biomolecolari (RT-PCR per fattori di patogenicità STEC – eae, vtx1, vtx2; Heminested e RT-PCR MAP). Sui ceppi STEC isolati è stato inoltre eseguito test di sensibilità agli antibiotici [2] e a campione l'analisi PFGE [1]. In queste aziende, oltre al prelievo di materiale fecale è stato somministrato anche un questionario con l'obiettivo di valutare i possibili fattori di rischio per la positività a STEC attraverso una raccolta sistematica e standardizzata di informazioni sulla base dei dati presenti in letteratura. Il questionario è stato strutturato in modo da raccogliere i dati relativi a:

- aspetti legati alla struttura dell'azienda e alla sua localizzazione geografica (ASL di appartenenza e quota, dimensione aziendale, numero di capi giovani, numero di strutture presenti, indirizzo produttivo e razze presenti, ecc)
- aspetti legati alla gestione degli animali (pratica del pascolo, pratica dell'alpeggio, igiene e biosicurezza dell'allevamento, tipo di alimentazione e componenti dei mangimi utilizzati; autoproduzione dei mangimi,

insilamento dei mangimi, fonte dell'acqua utilizzata per l'abbeverata degli animali)

- aspetti legati alla sanità della mandria (mortalità per problemi gastro enterici in particolare nella vitellaia, frequenza di diarree, utilizzo di farmaci e vaccini).

RISULTATI E CONCLUSIONI

30 (31%) allevamenti sono risultati positivi per MAP, segnalando un solo allevamento con problemi di diarrea negli animali adulti. Confrontando i risultati MAP con STEC, dei 30 allevamenti MAP positivi erano positivi n. 16 per STEC, n. 11 sospetti STEC e n. 3 negativi.

36 (38%) allevamenti hanno presentato problemi di diarrea nella vitellaia, riscontrando positività per almeno un agente patogeno in 21 allevamenti (22%). Confrontando i risultati ENTERITI NEONATALI (EN) con STEC, le 21 vitellaie EN positive appartenevano ad allevamenti positivi per STEC (12), sospetti STEC (9) e negativi (0).

Il progetto, che si delinea come uno studio "cross-sectional", ha stimato la prevalenza di *E. coli* STEC in circa il 65% degli allevamenti testati e in particolare per il sierogruppo O26, risulta pari al 23.4% (Ic95%: 14.7-35.4) nell'area della provincia di Torino coinvolta nei focolai umani di SEU. In particolare, la categoria dei vitelli è quella che è stata caratterizzata da un livello di prevalenza più alto (22.3%). In quasi tutte le aziende positive (21 su 22) è stato identificato almeno 1 campione positivo proveniente da una delle categorie dei vitelli. Tra le differenti categorie di vitelli quelli di età >6 mesi hanno una prevalenza maggiore (18.6%) ma comunque anche quelli di 1-3 mesi e di 3-6 mesi sono caratterizzati da una prevalenza maggiore rispetto alle categorie di adulti. La dimensione dell'azienda risulta associata sia al rischio di positività a livello aziendale che dei vitelli, così come la localizzazione nell'ASL TO5, l'isolamento dei capi che stanno per partorire e l'aver avuto casi di mastite. La provenienza dell'acqua utilizzata nelle stalle e la pratica del pascolo sono associate solo al rischio a livello aziendale (quest'ultimo sembra avere un effetto protettivo), mentre solo sul rischio a livello dei vitelli risultano associate la rapidità con cui viene somministrato il colostro e la presenza di problemi gastroenterici. Nel modello di regressione logistica in cui sono state inserite tutte le variabili associate al rischio di positività a livello aziendale o dei vitelli, si può osservare che in entrambi i casi tutte le variabili, ad eccezione della presenza di mastiti in azienda, perdono di significatività. Infine, dalla cluster analysis con i profili dei ceppi O26 isolati da casi umani e i ceppi di derivazione animale, non è stata individuata alcuna omologia al 100% (figura 1).

Sono stati sottoposti ad antibiogramma 102 ceppi di *E. coli* O26, come riportato in tabella 1. I ceppi STEC si sono dimostrati particolarmente sensibili alle molecole che usualmente vengono impiegate per il trattamento delle enteriti neonatali (tetraciclina, gentamicina e fluorochinoloni). Questo aspetto potrebbe aver contribuito alla riduzione della carica batterica utile all'isolamento del ceppo VTEC, rispetto alla flora commensale ed a ceppi enteropatogeni (EPEC) normalmente multiresistenti.

Tabella 1 – esiti dell'antibiogramma eseguito sui ceppi *E. coli* O26 STEC isolati.

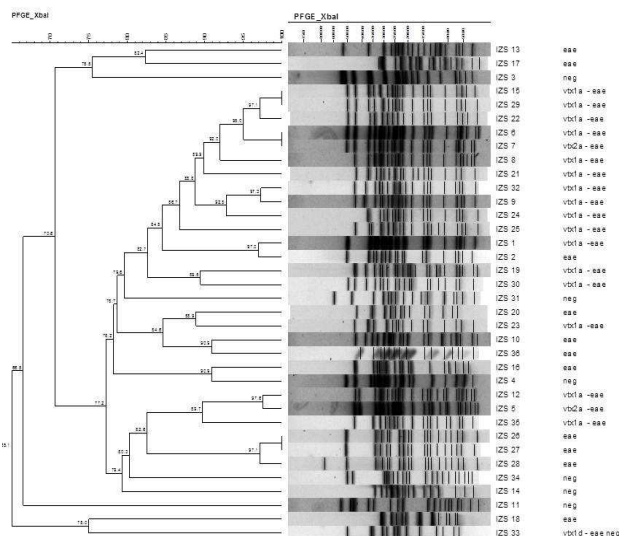
Molecola	n. test	% RES
Ampicillina	99	17,2
Oxacillina	34	100,0
Amoxicillina Acido Clavulanico	100	4,0
Cefalotina	86	15,1
Cefazolina	87	4,6
Cefpodoxime	65	4,6
Clindamicina	76	98,7
Eritromicina	91	90,1

Tetraciclina	102	27,5
Sulfa-trimetoprim	101	13,9
Sulfisoxazolo	58	82,8
Enrofloxacin	98	4,1
Cloranfenicolo	82	8,5
Kanamicina	79	30,4
Gentamicina	101	5,0

Il presente studio rappresenta il primo esempio di analisi sistematica della presenza e circolazione di VTEC nei bovini in Piemonte, definendo pertanto non solo il ruolo del bovino nei confronti del sierogruppo O157, ma anche per altri sierogruppi emergenti per impatto sulla salute umana, come *E. coli* O26.

In linea con quanto riportato in letteratura [4], il gene *vtx1* sembra essere il più rappresentato tra i ceppi isolati dagli animali, in particolare nei ruminanti a differenza dei ceppi isolati dai casi umani, in cui il sottotipo *vtx2a* è più rappresentato. I dati ottenuti nel presente progetto di ricerca confermerebbero il trend e sosterrebbero l'ipotesi di una non correlazione fra i casi umani e la presenza di allevamenti positivi O26 STEC (Figura 1). Sono tuttavia necessari ulteriori approfondimenti sul ruolo degli altri sierogruppi, non affrontati in questo progetto, ma dotati dei fattori di patogenicità responsabili dei casi di SEU umana.

Figura 1 - Dendrogramma e caratterizzazione dei ceppi di *E. coli* O26 (profilo PFGE e positività *vtx1 vtx2 eae*) eseguiti presso l'ISS di Roma



BIBLIOGRAFIA

1. Caprioli A, Maugliani A, Michelacci V and Morabito S, 2014. Molecular typing of Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) strains isolated from food, feed and animals: state of play and standard operating procedures for pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing, profiles interpretation and curation. EFSA supporting publication 2014:EN-704, 55 pp.
2. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals - Approved Standard Fourth Edition; CLSI Document VET01-A4; Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013
3. Possé B, De Zutter L, Heyndrickx M, Herman L. (2008). Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157. *Fems Microbiol. Lett.* 282: 124-131
4. Tozzoli R., Scheutz F., "Diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections in humans" in "Pathogenic *Escherichia coli* – Molecular and Cellular Microbiology" Stefano Morabito Editor. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 2014, pp. 1-18

SVILUPPO DI UNA METODOLOGIA PER LA VALUTAZIONE DELLA SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE DELLE AZIENDE ZOOTECNICHE

Baioni E¹, Marra A¹, Bertolini S¹, Filipello V¹, Bertola G², Capaldo S³, Solito F⁴, Curti P⁵, Maurella C¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ³ Asl CN1; ⁴ Consorzio La Granda; ⁵ ASL AT; ⁶ ASL CN1

Keywords: sustainable barn, beef production, environment

SINTESI

La tendenza verso l'intensificazione e l'industrializzazione delle produzioni zootecniche in ambienti territoriali geograficamente ristretti ha sollevato nuove problematiche inerenti l'impatto che queste attività hanno sull'ambiente. La sostenibilità di un allevamento è determinata dalla sua pressione sugli equilibri ambientali, che includono molteplici aspetti, tra cui la qualità dell'aria e delle acque, il suolo, la biodiversità e la qualità del paesaggio. L'obiettivo della ricerca è stato la costruzione e l'applicazione di un sistema di valutazione e confronto della sostenibilità ambientale dei singoli allevamenti di bovini da carne nel contesto della realtà zootecniche piemontese. Il sistema di valutazione ha permesso di determinare un punteggio finale che potesse sintetizzare l'impatto ambientale di ogni allevamento considerato. Infine sono state prodotte delle linee guida per fornire indicazioni sulle procedure di gestione con un impatto ambientale minore.

INTRODUZIONE

I trend globali di crescita demografica hanno portato a stimare che nei prossimi 40 anni il consumo di alimenti di origine animale è destinato ad aumentare del 70% [1], in accordo con la crescente richiesta di prodotti alimentari di origine animale a livello mondiale. Ne conseguirà un proporzionale aumento delle produzioni zootecniche e nuove problematiche relativamente all'impatto che queste attività potranno avere sia su un ambiente geograficamente ristretto, che a livello globale. La sostenibilità è determinata a livello locale dalla pressione che l'allevamento esercita sugli equilibri ambientali, in particolare sull'utilizzo e inquinamento dell'acqua, sfruttamento del suolo, biodiversità, consumo di risorse non rinnovabili e qualità del paesaggio [2]. Nelle zone a grande intensità produttiva, come il Piemonte, i maggiori margini di miglioramento in termini di sostenibilità si possono ottenere principalmente migliorando la gestione dei reflui, l'uso razionale dell'energia e l'approvvigionamento di alimenti destinati agli animali da fonti che garantiscano basso impatto ambientale.

L'obiettivo generale del progetto è stato quello di identificare una metodologia per valutare e confrontare la sostenibilità ambientale delle singole aziende di bovini da carne in una determinata area. In particolare ci si è proposti di costruire degli indicatori sintetici come strumenti di valutazione dell'impatto ambientale degli allevamenti nei diversi contesti territoriali, attraverso l'analisi di variabili quantitative e qualitative rappresentative dei vari sistemi di produzione zootecnica. Tali indicatori hanno l'obiettivo di valutare in modo semiquantitativo l'impatto ambientale (negativo o positivo) in modo globale, semplice ed intuitivo.

MATERIALI E METODI

La prima fase operativa del progetto ha permesso di individuare i criteri di valutazione della sostenibilità ambientale di un'azienda zootecnica di bovini da carne.

È stato fatto un confronto tra gli strumenti di valutazione dell'impatto ambientale già utilizzati in altre nazioni

europee, con lo scopo di evidenziare punti di forza e criticità in vista dell'applicabilità nel territorio regionale piemontese. A tal fine, di ogni strumento di valutazione sono stati esaminati in particolare le tematiche ambientali considerate, gli indicatori sviluppati, la categoria di utilizzatori finali per la quale lo strumento è stato pensato (es.: allevatori, ricercatori, governo locale, ecc.) e la capacità di fornire indicazioni sull'impatto ambientale a livello locale o a livello globale.

Sono stati, quindi, selezionati i seguenti temi, che permettono di esplorare l'impatto ambientale a livello di singolo allevamento:

- a) biodiversità;
- b) acqua;
- c) sfruttamento del suolo;
- d) utilizzo razionale delle risorse non rinnovabili;
- e) livello di integrazione del sistema.

Successivamente sono stati sviluppati i relativi indicatori, in accordo con specifici bisogni di informazioni riguardanti le caratteristiche degli allevamenti di bovini da carne. Si è scelto di utilizzare indicatori che hanno permesso di esprimere l'impatto per unità di prodotto (kg). Nei casi in cui l'indicatore non permettesse di esprimere il risultato della valutazione con un valore si è proceduto con l'assegnazione di un punteggio (Tabella 1). Sulla base dei criteri di valutazione individuati è stato prodotto un questionario che ha permesso di raccogliere le informazioni sui temi sopra descritti da un gruppo di 44 aziende del territorio regionale, la maggior parte delle quali appartenenti al consorzio allevatori "la Granda". La selezione delle aziende è avvenuta mediante l'impiego di un campionamento di convenienza e con l'ausilio dei veterinari dell'ASL. Le caratteristiche aziendali identificate come particolarmente impattanti sono state suddivise in aspetti di tipo gestionale, legati al management aziendale, e strutturali, dovute a caratteristiche della struttura stessa.

Gli indicatori sintetici di sostenibilità, aggregati in un punteggio finale hanno tenuto conto di tutti gli aspetti considerati, gestionali e strutturali, sintetizzando l'impatto ambientale complessivo di ciascun allevamento. In questo modo è stato possibile attribuire un punteggio globale a ciascuna azienda che esprime il livello di impatto ambientale conseguente alle sue caratteristiche gestionali e strutturali. È stata svolta una ricerca bibliografica, utilizzando parole chiave per meglio stringere il campo degli argomenti trattati, attraverso riviste scientifiche online, siti internet specializzati, siti internet istituzionali nazionali e internazionali, video divulgativi.

RISULTATI E CONCLUSIONI

È stato valutato l'impatto ambientale di ciascuno dei 44 allevamenti. Ad ogni indice è stato associato un punteggio scaturito dalla somma dei valori dei singoli indicatori (tabella.1). Il punteggio massimo (75) indica un alto livello di sostenibilità ambientale.

Tabella.1 – Tabella riassuntiva dei punteggi assegnati ad ogni indice

INDICE	PUNTEGGIO MASSIMO	INDICATORE
ACQUA E SISTEMI DI ABBEVERATA	15	Dispositivi contro lo spreco
		Posizionamento sistemi d'abbeverata
		Tipologia sistemi d'abbeverata
		Origine acqua
		Volume consumato
CERTIFICAZIONI	4	Possesso certificazione ecologica
COMMERCIALIZZAZIONE DEI PRODOTTI	5	Distanza distribuzione prodotti
		Presenza di macello interno
		Presenza di spaccio aziendale
		Prodotti forniti alla GDO
GESTIONE REFLUI	11	Trattamento di gestione reflui
		Stoccaggio liquame
		Raccolta acque scolo
		Tempo di maturazione
		Stoccaggio letame
DISINFESTANTI	7	Residui
		Tipologia
ALIMENTAZIONE	1	Provenienza alimenti
ENERGIA	5	Consumo per kg carne prodotta
		Fonti rinnovabili
		Tipologia di energia
GESTIONE INTEGRATA INFESTANTI	2	Applicazione
		Formazione
INFRASTRUTTURE NATURALI	3	Tipologia e numero di infrastrutture naturali
LETTIERA	2	Tipologia
MACELLAZIONE/VENDITA ANIMALI	4	Distanza
		Trasporti
PASCOLO	7	Delimitazioni con mezzi fisici
		Erogatori acqua d'abbeverata
		Intensità di pascolo
		Presenza di animali di altra specie
		Sentieri guida
		Sistemi di rotazione delle aree di pascolo
		Trasporto acqua di abbeverata
PRODOTTI FITOSANITARI	8	Pressione fitosanitaria
ANIMALI	6	Densità aziendale
		Provenienza capi
		Presenza altre specie

Dall'analisi dei dati ottenuti, il livello di sostenibilità ambientale delle 44 aziende si attesta ad uno valore medio di 38 punti, con uno range tra 27 e 48 punti (Tabella.2).

Tabella.2– Media dei valori complessivi dello score finale delle aziende esaminate

	Media	Min	Max
Sostenibilità	38	27	48

Sono state redatte (in collaborazione con il Politecnico di Torino, agronomi della provincia di Cuneo e Università di Torino) delle linee guida rivolte agli allevatori, sulle pratiche di gestione dell'allevamento e sulle caratteristiche strutturali che permettono di ridurre l'impatto aziendale e sensibilizzare alla produzione nel rispetto dell'ambiente. La collaborazione ha portato inoltre allo sviluppo di un modello plastico e virtuale (figura.1) di una stalla per bovini da carne a basso impatto ambientale [3] .

Figura.1 Modello virtuale stalla sostenibile



Gli indicatori identificati hanno permesso di mettere a confronto le aziende stimandone il loro impatto ambientale sotto diversi profili, da quello dell'alimentazione a quello della gestione dei reflui e alla commercializzazione dei prodotti aziendali. Il sistema proposto non vuole limitarsi a valutare l'efficienza dei sistemi aziendali, ma vuole includere anche quegli aspetti che, incidendo sulla salute e il benessere animale, ne potrebbero condizionare la salubrità dei prodotti derivati. La scarsità di dati statistici e di letteratura su alcuni valori di riferimento ha comportato in alcuni casi la scelta di criteri di valutazione basati su una distribuzione dei dati stessi. Per altri, sono stati presi come riferimento i valori medi riportati da alcuni paesi europei. Il progetto ha potuto avvantaggiarsi di una collaborazione multidisciplinare che ha reso possibile la realizzazione di linee guida nate dal confronto diretto tra gli allevatori e gli esperti che possono indirizzare le aziende nella scelta di pratiche d'allevamento a basso impatto ambientale.

BIBLIOGRAFIA

- Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B , Mottet A , Opio C, Dijkman J , Falcucci A, & Tempio G; .Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities; Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2013) Rome.
- Pointereau P , Bochu JL, Doublet S , Meiffren I , Dimkic C, Schumacher W, Backhausen J , Mayrhofer P. (1999) Le diagnostic agri-environnemental pour une agriculture respectueuse de l'environnement. Trois méthodes passées à la loupe ; Travaux et Innovations Société Agricole et Rurale d'Edition et de Communication Paris France.
- Baioni E.,Marra A., Bertolini S., Thiebat F., Savio L., Bosia D. , Bozzetta E., Maurella C. (2015). A model of barn for the environmental sustainability of beef production;; Controversies&Consensus in bovine health, industry and economics; Berlino.

RISCHIO ZONOSI E FAUNA SELVATICA: EPIDEMIOSORVEGLIANZA DELLE MICOBATTERIOSI NEGLI UNGULATI SELVATICI NEL CONTESTO DELL'INTERAZIONE DI SPECIE (ANIMALI SELVATICI - ANIMALI DI INTERESSE ZOOTECNICO - UOMO)

Orusa R^{1,2}, Domenis L^{1,2}, Robetto S^{1,2}, Zoppi S², Bollo E⁴, Meloni D², Mignone W², Monnier M², Possidente R², Marianelli C³

¹ Centro di referenza Nazionale per le Malattie degli Animali Selvatici (CeRMAS); ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ³ Istituto Superiore di Sanità (ISS); ⁴ Università degli Studi di Torino

Key words: tubercolosi bovina, paratubercolosi, fauna selvatica

SINTESI

L'oggetto dello studio sono state la tubercolosi bovina e la paratubercolosi su cinghiali e ruminanti selvatici. La tubercolosi bovina da *M. bovis* coinvolge animali e uomo [1,2] e nei selvatici può essere correlata con la presenza della malattia negli animali domestici [3]. Ad esempio i suidi, si comportano come animali sentinella e sono bioindicatori della circolazione di micobatteri in un territorio [4]. La Paratubercolosi è un'infezione cronica sostenuta da *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) che interessa diversi animali e può colpire varie specie di ungulati selvatici [5,6]. Il MAP è uno dei patogeni responsabili della malattia di Crohn [7] e sembra correlato con la sclerosi multipla nell'uomo [8]. Diversi studi hanno evidenziato la circolazione di ceppi di MTC resistenti ad uno o più antibiotici [9,10]. Per valutare la suscettibilità agli antibiotici dei ceppi di *M. bovis* isolati, è stato eseguito uno screening per la valutazione dell'antibiotico-resistenza.

INTRODUZIONE

La tubercolosi è una delle più importanti zoonosi riemergenti in Europa ed è stata riportata in numerose specie di mammiferi ed uccelli selvatici. Responsabili dell'infezione sono microrganismi asporigeni appartenenti al genere *Mycobacterium*. Considerando la tassonomia generale dei micobatteri, è utile sottolineare che le specie patogene per i mammiferi vengono riunite nel *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) in cui si trovano *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedi*, *M. africanum* e *M. canettii*. Nel mondo i più importanti focolai di tubercolosi negli animali selvatici, che rappresentano un rischio sanitario sia per gli allevamenti di bestiame sia per l'uomo, sono spesso causati da *M. bovis*. La paratubercolosi, o malattia di Johne, è un'infezione cronica sostenuta da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Si ritiene che tutti i ruminanti, sia quelli a vita libera, che quelli allevati, siano suscettibili all'infezione da MAP e sensibili a tutti i ceppi del microrganismo. Sporadicamente, sono state rinvenute positività per MAP anche in specie selvatiche non ruminanti: lepre bruna, ratti, topi, procione, opossum, armadillo, gatto selvatico e moffetta. Tra le specie non ruminanti che possono essere infettate da MAP, si ritiene che il coniglio selvatico (*Oryctolagus cuniculus*) sia quella che pone maggiori rischi di trasmissione ai bovini.

MATERIALI E METODI

Protocollo di prelievo

- Tubercolosi bovina: linfonodi mediastinici e retrofaringei (ungulati ruminanti), sottomandibolari (suidi) e organi lesionati.

- Paratubercolosi: linfonodi meseraici, feci e tamponi fecali, intestino (valvola ileo-cecale - retto), siero di sangue.

Protocollo diagnostico

- esame anatomico-patologico classico di linfonodi, di organi e di visceri di ungulati;

- esame batteriologico: protocollo di diagnosi differenziale su lesioni simil-tubercolari di incerta classificazione;
- esame istologico su organi lesionati;
- esame sierologico per la ricerca di anticorpi anti-MAP;
- isolamento di micobatteri (*Mycobacterium tuberculosis* complex - MTC, *Mycobacterium other than tuberculosis* - MOTT, *Mycobacterium avium* complex - MAC);
- identificazione e tipizzazione molecolare. Le colonie classificate come MTC sono state sottoposte ad ulteriori indagini diagnostiche: a) spoligotyping di *M. bovis* e VNTR-typing (ETRA-E); b) heminested PCR dell'elemento d'inserzione IS6110; c) PCR/RFLP del gene *gyrB*; d) spoligotyping di *M. bovis*/*M. caprae*; e) VNTR/QUBs-typing per la ricerca di 7 marcatori molecolari. I micobatteri atipici sono stati identificati con sequenziamento di rRNA 16S;
- Real time PCR e altri metodi molecolari per la ricerca di MAP;
- monitoraggio della sensibilità agli antibiotici antitubercolari in ceppi di *Mycobacterium* isolati dalla fauna selvatica.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Tubercolosi

In merito ai risultati ottenuti durante il periodo di campionamento (2012-2015), effettuato nelle regioni Valle d'Aosta, Piemonte e Liguria, sono stati esaminati 3527 linfonodi (ungulati selvatici) di cui 153 presentavano lesioni riferibili a tubercolosi. Complessivamente, sono stati isolati e identificati 2 ceppi di *M. bovis*, 23 ceppi di *M. microti*, 18 ceppi di *M. avium* e 31 ceppi di *Mycobacterium* spp. I 23 ceppi isolati di *M. microti* e i 2 ceppi di *M. bovis* sono stati caratterizzati e tipizzati usando tecniche molecolari quali spoligotyping e VNTR. I 2 ceppi di *M. bovis* provenivano rispettivamente da un cinghiale (*Sus scrofa*) della provincia di Imperia e da un esemplare di daino (*Dama dama*), proveniente dalla Provincia di Novara (Ticino). Inoltre, dal 2012 al 2013, presso la Facoltà di Veterinaria dell'Università degli Studi di Torino, sono stati esaminati per la ricerca di bTB, 288 capi di cinghiale (anno 2012) e 69 capi di cinghiale (anno 2013), provenienti dalla regione Piemonte; non sono stati evidenziati casi sospetti o confermati di tubercolosi. Infine, nella Regione Sicilia, sono stati esaminati 28 cinghiali cacciati (risultati tutti negativi), 473 Suini Neri del parco dei Nebrodi (di cui 34 capi sono risultati avere lesioni macroscopiche compatibili con bTB) e 1 daino, il quale presentava una forma tubercolare generalizzata da *Mycobacterium bovis*. Le indagini biomolecolari e la genotipizzazione effettuate su un Suino Nero dei Nebrodi positivo hanno identificato la presenza di *M. caprae*, spoligotype SB0866 e MIRU-VNTR 4,1,5,4,4,11, 4,2,4,3,8,7. Lo stesso genotipo è stato trovato in due aziende bovine situate nella stessa area territoriale suggerendo una trasmissione interspecie, anche se poco è noto circa la sensibilità del suino all'infezione da *M. caprae*.

Paratubercolosi

Mediante test ELISA, dal 2011 al 2015, sono stati esaminati 861 campioni di siero di ungulati selvatici per

paratubercolosi e nessun esame ha dato esito positivo. Inoltre, sono state applicate metodiche biomolecolari dirette che hanno permesso di riscontrare positività in 2 caprioli, 1 cervo e 1 camoscio. L'unica positività per paratubercolosi confermata dal CdR è stata riscontrata in un camoscio proveniente dalla Valle d'Aosta (Fontainemore -AO), che presentava un grave quadro patologico.

Sensibilità agli antibiotici

Nel corso del progetto è stato possibile valutare la sensibilità agli antibiotici mediante il test di antimicrobicità REMA per i soli ceppi identificati come MOTT (n=1) e *M. avium* (n=2), le cui subcolture hanno raggiunto la crescita minima necessaria richiesta dal test. Il ceppo di *M. nonchromogenicum* è risultato resistente sia alla claritromicina che alla rifampicina; i ceppi di *M. avium* sono risultati entrambi resistenti al solo etambutolo. Tramite sequenziamento sono state rilevate tre mutazioni per il gene *embB*.

In base ai risultati ottenuti e confrontandoli con il trend degli anni precedenti, si può osservare come la presenza di lesioni TB-like nel cinghiale e la positività molecolare a MTC siano essenzialmente stabili negli anni. Nel cinghiale, l'assenza di isolamento di *M. bovis*, ad eccezione della regione Liguria, depone a favore del fatto che le positività per MTC, in questa specie, siano principalmente legate alla presenza di *M. microti*. Tuttavia la capacità di isolamento di *M. microti* è molto limitata per le esigenze di crescita e per i lunghi tempi di incubazione richiesti.

In riferimento alla caratterizzazione molecolare dei ceppi di *M. microti* isolati in Piemonte e Liguria, a differenza di quanto osservato in altre realtà territoriali, non può essere determinato agevolmente lo spoligotype. In generale, differenti genotipi sono stati identificati attraverso la tecnica di spoligotyping. I profili più comuni sono il llama type (SB0112) e il vole type (SB0118): entrambi sono stati associati ad infezioni sia in animali che nell'uomo.

La presenza di ceppi non tipizzabili per le delezioni *Mid1*, regolarmente riscontrata per gli isolati del presente studio, è confermata anche dalle indagini condotte da altri gruppi di lavoro in Italia.

Nel corso dello studio sono emerse due positività per *M. bovis* nel daino rispettivamente in Piemonte e in Sicilia. Nel daino Piemontese il ceppo di *M. bovis* isolato è stato caratterizzato successivamente mediante spoligotyping e analisi VNTR (ETR A,B,C,D,E) come SB0120 45533. Anche nel capo proveniente dalla Sicilia è stato isolato *M. bovis* spoligotype SB0120. Questo profilo è uno dei più comuni tra quelli isolati negli allevamenti delle regioni oggetto dell'indagine.

Il comune denominatore di tutti gli isolamenti di *Mycobacterium* spp. (MtbCx, MAC, MOTT) è rappresentato dalla possibilità del cinghiale di venire a contatto con una varietà di micobatteri presenti nell'ambiente più facilmente di altre specie animali a causa della sua abitudine al grufolamento. In particolare, analizzando i dati ottenuti con indagini di tipo molecolare eseguite sui ceppi di *M. bovis* isolati, si può osservare che, nella nostra realtà territoriale, gli spoligotype BCG-like (SB0120) sono più diffusi di altri, e il ricorso all'analisi dei profili VNTR li differenzia ulteriormente, identificando dei cluster utili per confronti e correlazioni di tipo epidemiologico. Confrontando la combinazione di spoligotype e di profilo VNTR con l'area di provenienza di questi ceppi, in alcuni casi è stato possibile osservare omologia nel profilo molecolare tra ceppi isolati da cinghiali e da bovini, in particolare nelle province di Cuneo e di Imperia. In altri casi, la mancanza di omologia potrebbe essere spiegata da un differente sviluppo dell'infezione, vale a dire che la sorgente di infezione potrebbe essere stata diversa per le due specie animali, presupponendo quindi un ciclo proprio dei selvatici, oppure

che l'esposizione a ceppi bovini di *M. bovis* sia stata differita nel tempo, poiché i micobatteri presentano una solida resistenza nell'ambiente.

Sulla base dei riscontri ottenuti, è quanto mai realistico pensare che nella nostra realtà, il cinghiale funga da "bio-indicatore" della presenza di *M. bovis*.

Per quanto riguarda gli aspetti legati all'antibiotico resistenza, il saggio REMA ha evidenziato la resistenza alla CLA e RIF per il ceppo di *M. nonchromogenicum*, ed all'EMB per entrambi i ceppi di *M. avium*. L'analisi delle sequenze nucleotidiche dei geni target, ha evidenziato nei ceppi di *M. avium* la presenza di tre mutazioni significative nel gene *embB* che potrebbero giustificare la resistenza osservata all'EMB.

I ceppi di *M. microti*, a causa della loro stentata crescita in vitro, sono stati analizzati soltanto molecularmente. I principali geni target analizzati non hanno evidenziato mutazioni nucleotidiche associate alla resistenza. Pertanto, i nostri risultati suggeriscono che i ceppi di *M. microti* analizzati sono sensibili agli antibiotici antitubercolari testati.

BIBLIOGRAFIA

1. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. Gortazar C., et al. *Veterinary Research* 2005; 36: 43-52
2. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in lymph nodes of wild boar (*Sus scrofa*) by a target-amplified test system. Bollo E. et al. *Journal of Veterinary Medicine* 2000; B 47: 337-342
3. Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. Serraino A. et al. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 2766-2771
4. Use of released pigs as sentinels for *Mycobacterium bovis*. Nugent G. et al. *Journal of Wildlife Disease* 2002; 38: 665-677
5. Paratuberculosis in Red Deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in the Western Alps. Nebbia P. et al. *Veterinary Research Communications* 2000, Volume 24, Number 7, 435-443
6. Identification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in wild cervids (*Cervus elaphus hippelaphus* and *Capreolus capreolus*) from Northwestern Italy. Robino P. et al. *European Journal of Wildlife Research* 2008; Volume 54, Number 2, 357-360
7. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's Disease and Johne's Disease: common neural and immune pathogenicities. Scanu, A.M. et al. *Journal of Clinical Microbiology-JCM*. 2007 Dec; 45(12): 3883-3890
8. Association of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis with multiple sclerosis in Sardinian patients. Cossu D. et al. 2011. *PLoS ONE*. 6; 4; e 18482
9. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Ramaswamy S.V. et al. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:326-336
10. Molecular basis of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium bovis* strains isolated in Sardinia, Italy. Sechi LA., et al. 2011, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45(6): 1645-1648

FILODINAMICA, FILOGEOGRAFIA E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE FULL GENOME DI BOVINE VIRAL DIARRHOEA VIRUS (BVDV)

Cerutti F¹, Ebranati E², Luzzago C³, Lauzi S³, Caruso C¹, Masoero L¹, Giammarioli M⁴, Moreno A⁵, Cannella V⁶, Guercio A⁶, Ciccozzi M⁷, De Mia GM⁴, Acutis PL¹, Zehender G², Peletto S¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta; ² Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche "Luigi Sacco", Università di Milano; ³ Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Milano; ⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche; ⁵ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; ⁶ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A.Mirri"; ⁷ Istituto Superiore di Sanità

Key words: BVDV; filogeografia; catene di contagio; NGS

SINTESI

Il virus della diarrea virale bovina (BVDV) è un *Pestivirus*, classificato in due genotipi (BVDV-1 e 2) principali e numerosi sottotipi.

Nel corso del Progetto è stata effettuata un'analisi filogenetica e filogeografica su 404 campioni positivi raccolti in Italia nel periodo 1995-2013, utilizzando le regioni geniche virali 5'-UTR e *Npro*.

Nell'albero filogenetico di BVDV-1b non sono state osservate strutture geografiche significative. L'albero di 1e si divide in tre *clade* principali, con un *clade* piemontese. In BVDV-1f, le sequenze si dividono in tre *clade* geograficamente distinti, con un cluster ad alta similarità. *Outbreaker* ha identificato come antenato un isolato proveniente da Asti, mentre l'indagine epidemiologica ha evidenziato la frequentazione di eventi comuni (fiere, mostre, ecc.).

Otto campioni da casi di malattia delle mucose sono stati sequenziati mediante NGS. L'analisi dei dati ha evidenziato la presenza di inserzioni del genoma dell'ospite e di SNP nella quasispecie virale.

INTRODUZIONE

Il virus della diarrea virale bovina (BVDV) è un virus a RNA a singolo filamento e polarità (+) appartenente al genere *Pestivirus*, famiglia *Flaviviridae*. In base all'analisi filogenetica, si possono identificare due specie: BVDV-1 e BVDV-2, con 20 sottotipi di BVDV-1 (a-t) e 3 di BVDV-2 (a-c) (4). BVDV può esistere in due diversi biotipi, citopatogeno (cp) e non-citopatogeno (ncp), in base all'effetto citopatico in colture cellulari. Il virus è associato a forme morbose tra cui infezioni subcliniche, immunodepressione, forme respiratorie, intestinali e disturbi della sfera riproduttiva. Nelle bovine gravide, l'infezione può essere causa di aborto, malformazioni fetali, nascita di soggetti disvitali o asintomatici Persistentemente Infetti (PI), fulcro epidemiologico della malattia. Questi soggetti sviluppano invariabilmente la malattia delle mucose (MDM), una forma letale, con insorgenza entro i 2 anni. In casi di MDM si osserva l'isolamento quasi costante di coppie di virus cp e ncp antigenicamente correlati. Si pensa che la MDM si sviluppi a seguito di una mutazione del ceppo ncp persistente.

Scopi di questo progetto sono stati: i) studiare la diffusione spazio-temporale dei sottotipi di BVDV-1 in Italia con metodi di filogeografia; ii) tracciare catene di trasmissione tra allevamenti basandosi su similarità genetica, strumenti bioinformatici e indagini epidemiologiche; iii) individuare mutazioni del genoma virale in casi di MDM mediante NGS.

MATERIALI E METODI

I campioni di sangue o tessuto inclusi nello studio sono stati raccolti in tutto il territorio italiano nel periodo 1995-2013. I campioni risultati positivi alla RT-PCR sulla regione 5'-UTR (3, 5) sono stati sequenziati per la caratterizzazione

molecolare e catalogati utilizzando la seguente codifica: sigla provincia, progressivo allevamento, progressivo animale e anno (es. TO14a@11).

I tre sottotipi più numerosi (Tabella 1) sono stati utilizzati per l'analisi filodinamica e filogeografica mediante BEAST (1).

Tabella 1 - Tabella descrittiva dei campioni considerati

	BVDV-1b	BVDV-1e	BVDV-1f
Centro-Sud	20	11	0
Emilia-Romagna	12	16	3
Lombardia	61	29	9
Piemonte	40	71	22
Veneto	6	7	0
Valle d'Aosta	0	0	16
Anno	1995-2013	1996-2013	1999-2013

Dagli alberi filogenetici sono stati individuati cluster di sequenze simili (>99%) identificate in allevamenti diversi. In un secondo livello di risoluzione, il gene *Npro* dei campioni selezionati è stato amplificato mediante nested-PCR (4) e sottoposto a sequenziamento. Il nuovo dataset è stato utilizzato per la successiva indagine epidemiologica e per le analisi bioinformatiche con *Outbreaker* (2).

Otto campioni di milza da casi di MDM sono stati sottoposti ad isolamento virale e l'RNA totale è stato estratto con Trizol da surnatante cellulare. Le library sono state preparate con NEBNext Ultra RNA Library Prep kit e Illumina Nextera XT. Il sequenziamento NGS è stato eseguito su piattaforma Illumina MiSeq. L'assemblaggio *de novo* delle sequenze è stato effettuato mediante Trinity RNAseq v.2.1 e la ricerca di SNP mediante il software GATK v.3.5.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Nell'albero filogenetico di BVDV-1b (Figura 1a), non sono state osservate strutture geografiche significative, la maggior parte delle sequenze proviene dalla Lombardia e sono distribuite tra cluster geograficamente diversi. L'origine del sottotipo è stimata all'inizio del XX secolo in Lombardia. L'albero di BVDV-1e (Figura 1b) si divide in tre *clade* principali e il tMRCA è stimato al 1990 in Lombardia. Le sequenze piemontesi si raggruppano insieme per due possibili cause: recente campionamento o recente introduzione. La radice di BVDV-1f (Figura 1c) è stimata al 1988 in Lombardia. Le sequenze si raggruppano in tre *clade*, con significatività geografica: tutte le sequenze

piemontesi si raggruppano in due *subclade*, di cui uno include tutte le sequenze valdostane. Nel sottotipo 1f, un cluster di 12 sequenze è risultato caratterizzato da alta similarità, ma con sequenze di diversa provenienza. *Outbreaker* ha identificato come sorgente dell'infezione un isolato proveniente da Asti, che ha infettato un allevamento di Aosta, da cui ne sono stati infettati altri in Valle (Figura 2). L'indagine epidemiologica presso i veterinari Asl ha evidenziato la precedente introduzione di un capo valdostano infetto nell'allevamento di Asti e la frequentazione comune di fiere, mostre e mercati da parte di alcuni allevamenti appartenenti ai cluster selezionati, come anche parentele tra allevatori.

La biologia molecolare, associata all'analisi computazionale, in questo caso è uno strumento fondamentale, per comprendere relazioni difficilmente identificabili in altro modo.

Figura 2 - Catena di contagio ricostruita con Outbreaker da un cluster di sequenze BVDV-1f

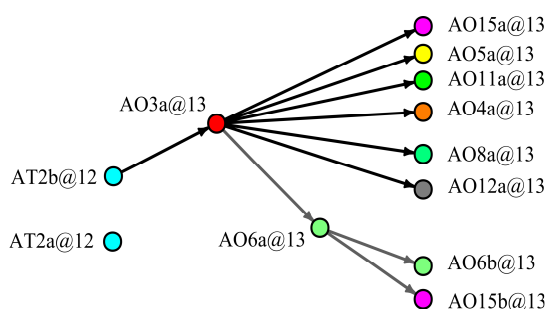
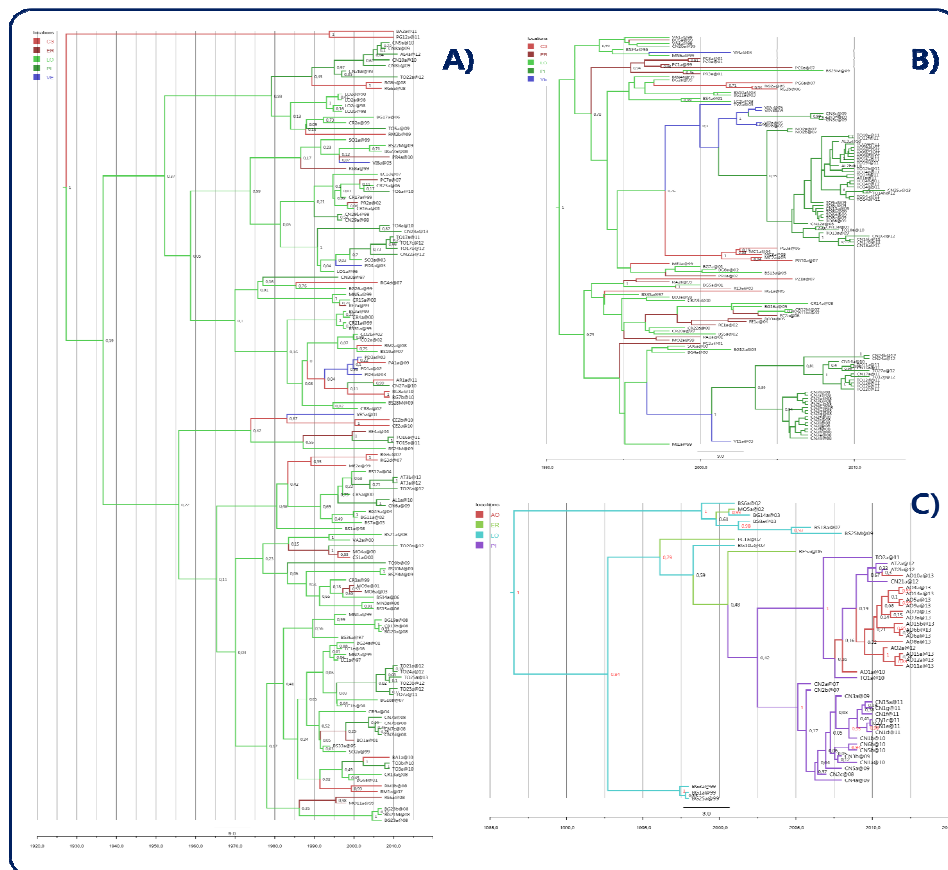
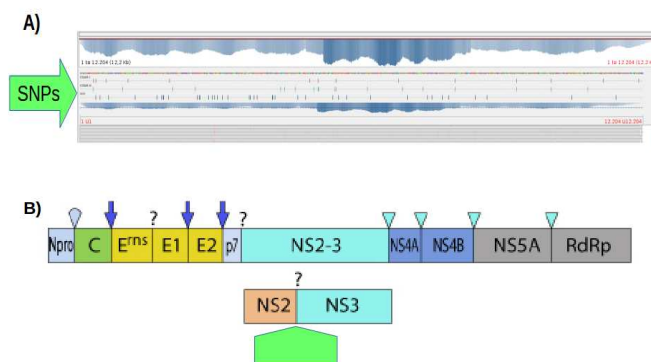


Figura 1 - Alberi filogeografici dei tre principali sottotipi di BVDV-1: A) BVDV-1b; B) BVDV-1e; C) BVDV-1f



Lo studio degli isolati virali da casi di MDM mediante sequenziamento massivo ha permesso di ottenere un ottimo *coverage* del genoma di BVDV (~4000x) idonea all'identificazione di mutazioni nella quasispecie virale. L'analisi dei dati mediante assemblaggio *de-novo* delle reads indica la presenza di numerosi SNP lungo tutto il genoma virale, compresa la regione NS2-NS3, responsabile della transizione a cp. In un campione è stata riscontrata l'inserzione di un frammento di ubiquitina C bovina tra il gene NS2 e NS3.

Figura 3 – Risultati da NGS: A) read allineate al genoma virale; B) sito di inserzione dell'ubiquitina C bovina



BIBLIOGRAFIA

1. Drummond AJ, Rambaut A, 2007, Beast: bayesian evolutionary analysis by sampling trees, BMC Evol. Biol. 7(1):214
2. Jombart T, Cori A, Didelot X, Cauchemez S, Fraser C, Ferguson N, 2014, Bayesian reconstruction of disease outbreaks by combining epidemiologic and genomic data., PLoS Comput. Biol. 10(1):e1003457
3. Letellier C, Kerkhofs P, Wellemans G, Vanopdenbosch E, 1999, Detection and genotyping of bovine diarrhea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region., Vet. Microbiol. 64(2-3):155-67
4. Vilček S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, et al., 2001, Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups., Arch. Virol. 146:99-115
5. Vilček Š, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ, 1994, Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, Arch. Virol. 136(3-4):309-23

VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ ACUTA E CRONICA DI PESTICIDI ORGANOFOSFORATI IN ALCUNE SPECIE ITTICHE E STUDIO DELLA RISPOSTA ENZIMATICA E GENOTOSSICA ASSOCIATA

Prearo M¹, Scanzio T¹, Squadrone S¹, Gasco L², Elia AC³

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ² Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Grugliasco (TO); ³ Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale, Perugia

Key words: Chlorpyrifos, Trota iridea, *Oncorhynchus mykiss*, Enzimi dello stress ossidativo

SINTESI

Il presente studio mette in risalto i risultati ottenuti da un caso studio occorso nel 2015 in un laghetto privato di pesca sportiva con mortalità acuta in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) dovuta ad intossicazione da chlorpyrifos, nell'ambito della ricerca corrente sui pesticidi organofosforati. Vengono prese in considerazione la sintomatologia, le analisi chimiche di conferma e le analisi relative agli enzimi dello stress ossidativo.

INTRODUZIONE

Il Chlorpyrifos (CP) è stato introdotto sul mercato dal 1965 ed è ampiamente utilizzato in agricoltura in tutto il mondo, con molteplici problemi di inquinamento dei sistemi idrici e del terreno. Il CP è altamente tossico per gli organismi acquatici, a causa della sua potenziale azione di bioaccumulo nei tessuti. Infatti, si conoscono per alcune specie ittiche le dosi di LC₅₀ a 96 ore: ad esempio, per la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) la dose è di 0,007-0,051 mg/l. La presenza di questo pesticida e dei suoi metaboliti nel muscolo di organismi acquatici può rappresentare un potenziale pericolo per i consumatori, soprattutto per alcune categorie a maggior rischio, come le donne in gravidanza, i bambini e gli anziani. L'organo bersaglio del CP è il sistema nervoso, poiché il metabolita CP-Oxon inibisce l'acetilcolinesterasi (AChE). Questo pesticida, proprio per le sue azioni e per l'elevata tossicità nei confronti degli organismi acquatici, può rappresentare un serio problema in acquacoltura, oltre che in tutti gli ambienti d'acqua dolce e può rappresentare una delle cause per minori rese di produzione a causa della comparsa degli effetti cronici sui pesci allevati o comunque pescati a scopo remunerativo (pesci in risaia, ecc.). Alcuni studi sugli enzimi dello stress ossidativo sono già stati condotti anche sulle specie in oggetto, ma manca un quadro complessivo di tutti gli indici biochimici, la sintomatologia ed il quadro anatomopatologico, nonché delle eventuali modificazioni dell'espressione genica e dei fenomeni di genotossicità correlata nel breve e nel lungo periodo, con valutazione del possibile miglioramento durante una fase di detossificazione protratta.

MATERIALI E METODI

Viene descritto un caso studio su trota iridea. Nel mese di aprile del 2015, presso un laghetto privato, sono stati immessi oltre 300 esemplari di trota iridea di circa 400 grammi, per ripopolamento della fauna ittica presente; nel mese di maggio il proprietario ha raccontato di avere effettuato un trattamento delle piante che circondano il laghetto, aspergendo una soluzione pronta, a base di chlorpyrifos. In concomitanza del trattamento insetticida, la comparsa di eventi atmosferici temporaleschi ha permesso un forte dilavamento delle piante trattate con riversamento del pesticida utilizzato nel bacino idrico. Il proprietario nelle 24 ore successive ha osservato uno strano andamento natatorio letargico dei pesci presenti ed ha chiamato subito l'allevatore che aveva fornito i pesci, il quale ha consigliato di sentire il laboratorio di Ittiopatologia di Torino; contattati nella stessa giornata, si è proceduto ad effettuare un sopralluogo direttamente in loco nella giornata successiva, osservando una sintomatologia nervosa conclamata; l'anamnesi fornita dal proprietario ha fatto subito sospettare la possibile intossicazione acuta, permettendo di effettuare dei prelievi di pesci moribondi; sono stati effettuati pertanto un primo prelievo di 10 trote al secondo giorno dopo la presunta

intossicazione (T₁), per poi effettuare successivamente altri 2 prelievi a distanza di 24 ore (T₂) e 72 ore (T₄) dal primo. Tutti i pesci sono stati pescati moribondi e subito soppressi in soluzione anestetica sovrassatura con MS-222, stoccati singolarmente in sacchetti di plastica per alimenti, mantenuti in condizioni di refrigerazione e portati immediatamente in laboratorio entro 1 ora dal prelievo. In laboratorio sono stati effettuati i prelievi come descritto dal protocollo sperimentale messo a punto per la ricerca e stoccati a -80°C. Sono stati prelevati per le analisi chimiche 10 campioni di branchie dai soggetti prelevati per le analisi biochimiche; inoltre sono stati analizzati 5 pool di branchie provenienti da trote iridee prelevati da un allevamento in cui non si evidenziavano segni di mortalità. Le analisi chimiche, condotte presso i laboratori della S.C. Controllo Chimico e ambientale con annesso CREAA, hanno previsto una omogeneizzazione di 5 g di tessuto branchiale per soggetto esaminato, in 60 ml di diclorometano; l'estratto è stato raccolto in un pallone da 100 ml, dopo una anidificazione mediante solfato di sodio anidro; il tutto è stato portato a secchezza mediante l'uso di un evaporatore rotativo a pressione ridotta, alla temperatura di 45°C e ripreso successivamente in 500 µl di diclorometano; il residuo ottenuto è stato filtrato con filtro inerte da 0,2 µl ed analizzato in GC/MS. Le analisi biochimiche sono state condotte su frazioni citosoliche di fegato di trota. I tessuti sono stati omogeneizzati in tampone TRIS-HCl 100 mM, pH 7,8, contenente difenilmetilsulfonil-fluoride (PMFS) 100 µM, bacitracina 0,1 mg/ml e aprotinina 0,008 TIU/ml (Elia *et al.*, 2003). La concentrazione delle proteine totali citosoliche è stata determinata secondo il metodo di Lowry *et al.* (1951). La determinazione delle attività enzimatiche è stata condotta tramite analisi spettrofotometrica. I saggi sono stati eseguiti in triplicato alla temperatura di 25°C. L'attività della **catalasi (CAT)** è stata determinata secondo il metodo di Greenwald (1985), seguendo il decremento dell'assorbanza a 240 nm dato dal consumo di H₂O₂ ($\epsilon = -0,04 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). L'attività enzimatica della **glutazione perossidasi (GPx)** è stata determinata usando il metodo di Lawrence & Burk (1976), seguendo l'ossidazione del NADPH a 340 nm ($\epsilon = -6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), utilizzando come substrato H₂O₂. L'attività enzimatica della **glutazione reduttasi (GR)** (Chung *et al.*, 1991) è stata valutata seguendo il decremento dell'assorbanza a 340 nm ($\epsilon = -6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), dovuto all'ossidazione di NADPH. L'attività enzimatica della **glutazione-S-transferasi (GST)** è stata misurata secondo il metodo di Habig *et al.* (1974), usando come substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), con formazione del tioetere misurata a 340 nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Per la determinazione dei livelli di **glutazione totale (GSH+2GSSG)** nei campioni analizzati, i campioni sono stati omogeneizzati con una diluizione 1:5 utilizzando acido sulfosalicilico al 5% ed EDTA 4 mM e centrifugati. Il saggio è stato effettuato utilizzando tampone K-P 100 mM pH 7 ed EDTA 1 mM, NADPH 4 mg/ml di NaHCO₃ 0,5%, DTNB 1,5 mg/ml di NaHCO₃ 0,5%, GR 1U. Il prodotto della reazione (TNB), di colore giallo, è stato misurato spettrofotometricamente a 412 nm.

RISULTATI E CONCLUSIONI

L'episodio riscontrato naturalmente, ha permesso di avere un numero sufficiente di soggetti intossicati per poter effettuare almeno un esame degli enzimi dello stress ossidativo. Le trote intossicate, nel giro di una settimana dall'inizio della

sintomatologia nervosa, sono giunte a morte; nel medesimo ambiente erano presenti anche altri pesci (Ciprinidi appartenenti alla specie *Carassius carassius* e persici sole – *Lepomis gibbosus*) tutti di piccola taglia, che hanno subito la medesima sorte, ma che non sono stati campionati per le loro piccole dimensioni. La sintomatologia è apparsa caratteristica, con trote che presentavano una iperreattività, con nuoto parossistico a scatti lungo una traiettoria lineare spezzata, percorrendo una distanza approssimativa che poteva variare da 50 cm ad alcuni metri dal punto di osservazione. La fuga terminava solitamente al di sotto dei getti d'acqua di alcuni ossigenatori a fungo o nelle zone d'ombra create dalle piante lungo la riva. Molti pesci presentavano anche un nuoto a mezz'acqua e circa un 10% del totale rimaneva appoggiato sul fondo. Durante il secondo giorno di campionamento i pesci hanno risposto allo stimolo visivo nel 20% dei soggetti circa, con una fuga rapida e uno scarto laterale; tutti gli altri sono entrati in allarme, ma non sono fuggiti ed hanno reagito compiendo brevi movimenti a scatti, oppure ruotando su se stessi. Alcuni soggetti sono rimasti sul fondo, nelle zone d'ombra. In quarta giornata i pochi soggetti rimasti apparivano tutti appoggiati sul fondo; si è potuto evidenziare alcuni esemplari riversi su di un fianco, vicino alla griglia di scarico. I pochi esemplari apparentemente reattivi non sono riusciti a fuggire e si sono manifestati in modo evidente sia l'incurvamento ad "s" della colonna vertebrale, sia la perdita dell'assetto di nuoto. Durante il quarto giorno di prelievo, si è effettuato un ulteriore campionamento in un allevamento commerciale di trote iridee in cui non era manifesta nessuna patologia in acqua: tutti i soggetti prelevati sono stati osservati a lungo e non hanno evidenziato nessun scompenso natatorio o comportamentale. All'esame anatomopatologico, tutti i soggetti campionati non hanno evidenziato lesioni agli organi interni. L'analisi chimica delle branchie dei pesci campionati durante l'evento in campo ha confermato l'intossicazione da chlorpyrifos. Nonostante l'assenza di una procedura purificativa, al fine di ridurre al minimo il rischio di perdita dell'analita, il tracciato ottenuto dell'estratto branchiale è apparso chiaramente leggibile, con segnali netti e di buona risoluzione. Il profilo frammentografico del tracciato ottenuto dell'estratto branchiale evidenzia in dettaglio la presenza del pesticida (Figura 1). L'attività enzimatica di catalasi (Figura 2) ha mostrato livelli più bassi di circa la metà negli esemplari esposti al chlorpyrifos campionati al 4° giorno, rispetto a quelli del primo giorno. Inoltre per gli stessi esemplari si riscontra che l'attività è più bassa anche rispetto ai campioni dell'area di controllo. Gli esemplari esposti al chlorpyrifos hanno presentato variazioni significative nell'attività epatica di glutazione perossidasi selenio-dipendente (Figura 3). In particolare, tale attività è circa la metà in CHP1 e CHP2 rispetto a CHP4 e ai controlli dello stesso tempo di campionamento. L'attività epatica di glutazione reduttasi (Figura 4) ha mostrato un aumento (2 x) tempo-dipendente nei campioni esposti al chlorpyrifos nei 3 tempi sperimentali, ma anche rispetto agli esemplari del controllo (2-3x). La glutazione S-transferasi (Figura 5) è marcatamente più alta negli esemplari CHP4 ed anche rispetto ai controlli nello stesso tempo di campionamento (2x).

Figura 1 – Tracciato frammentografico dell'estratto branchiale delle trote campionate.

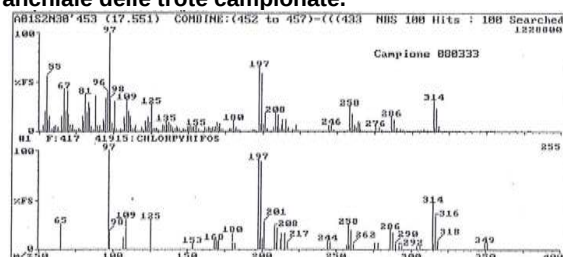


Figura 2 (a sinistra) - Attività enzimatica di catalasi (CAT) nel fegato di trota iridea. Figura 3 (a destra) - Attività enzimatica di glutazione perossidasi selenio-dipendente (GPx) nel fegato di trota iridea.

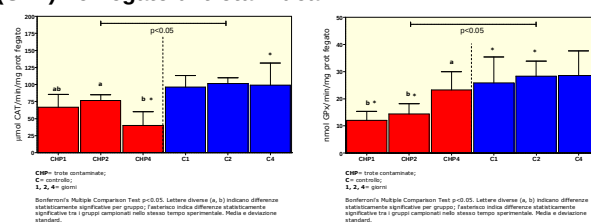
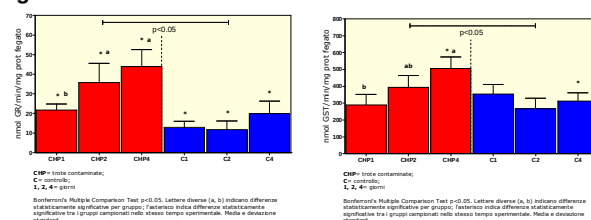


Figura 4 (a sinistra) - Attività enzimatica di glutazione reduttasi (GR) nel fegato di trota iridea. Figura 5 (a destra) - Attività enzimatica di glutazione S-transferasi (GST) nel fegato di trota iridea.



In conclusione, i risultati di questo studio incrementano le attuali conoscenze scientifiche sugli effetti del chlorpyrifos su alcuni marcatori antiossidanti di trota iridea. Tali biomarcatori rivestono un ruolo chiave per una migliore definizione dello stato di salute degli animali e potrebbero essere anche utili nel comprendere potenziali fenomeni di mortalità anomala in pesci selvatici. La valutazione dell'alterazione dello "stato di salute", mediante l'utilizzo di questi indici biochimici nella specie ittica considerata, rende possibile degli interventi risanatori tempestivi, prima che il danno possa diventare irreversibile. Si ribadisce come uno studio completo mediante l'approccio integrato proposto, avrebbe potuto consentire una maggiore conoscenza sui meccanismi tossicologici del chlorpyrifos su queste specie ittiche target, consentendo di valutare situazioni al limite dell'effetto tossico, ma che possono dare gravi problematiche in ambienti d'allevamento particolarmente deteriorati o con livelli molto bassi di inquinamento da questi pesticidi, creando vere e proprie perdite economiche nelle performance produttive, difficilmente quantificabili e valutabili, ma che possono creare delle problematiche al settore ittico che attualmente non riversa in situazioni altamente remunerative.

BIBLIOGRAFIA

1. Chung P.M., Cappel R.E.E. & Gilbert H.F. (1991). Inhibition of glutathione disulfide reductase by glutathione. Arch. Biochem. Biophys., 288: 48-53.
2. Greenwald R.A. (1985). Handbook of methods for oxygen radicals research. CRC press, Boca Raton, FL: 1-447.
3. Habig W.H., Pabst M.J. & Jakoby W.B. (1974). Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem., 249: 7130-7139.
4. Lawrence R.A. & Burk R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun., 71: 592-598.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO RELATIVA A PCDD/F E DL-PCB IN AREE CONTAMINATE: DEFINIZIONE DI MODELLI MATEMATICI E PROTOCOLLI DI INTERVENTO SANITARIO.

Desiato R¹, Salizzoni P², Marro M², Natangelo U¹, Baioni E¹, Bottazzi I³, Possamai S³, Ru G¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – BEAR – Via Bologna 148, Torino; ² Ecole Centrale de Lyon - 36 av. Guy de Collongue 69134 Ecully; ³ Arpa Piemonte - Polo Microinquinanti - Via Sabaudia 164, Grugliasco (TO)

Key words: diossine, modello, trasferimento

SINTESI

La contaminazione da diossine e composti ad esse simili è un problema legato alla contaminazione persistente del territorio. La commistione geografica di insediamenti industriali inquinanti e realtà zootecniche favorisce il trasferimento e l'accumulo degli inquinanti lungo la catena alimentare fino all'uomo. Quando gli episodi di contaminazione vengono individuati, la gestione del rischio richiede che preliminarmente vengano svolte le necessarie attività di valutazione del rischio. Il presente progetto ha permesso di sviluppare un modello matematico, che partendo dalle misure ambientali e sfruttando le conoscenze sui meccanismi di trasferimento degli inquinanti dalle sorgenti lungo la catena alimentare, consentisse la predizione in campo dei livelli di contaminazione del latte.

L'importanza di disporre rapidamente di stime dei livelli di contaminazione ha il vantaggio di rendere gli interventi conoscitivi mirati ed economicamente efficienti.

INTRODUZIONE

Diossine, furani e policlorobifenili diossino-simili (dl-PCB) sono sostanze chimiche prodotte da molti processi industriali e definite inquinanti organici persistenti. Queste sostanze destano particolare attenzione e preoccupazione in quanto estremamente resistenti nell'ambiente a causa della loro resistenza alla degradazione chimica e biologica, altamente lipofile, cioè in grado di accumularsi negli organismi viventi e di determinare effetti tossici a breve e lungo termine nell'uomo e negli animali, quali disfunzioni della sfera endocrina e riproduttiva, del sistema nervoso e immunitario e sviluppo di neoplasie. Infatti, alcune di queste sostanze sono sospette o dimostrate cancerogene (IARC International Agency for Research on Cancer: Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. In IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Volume 69. Lyon. IARC; 1997, 33-343).

Questi composti, una volta emessi nell'ambiente, presentano caratteristiche chimico-fisiche tali da permetterne il trasporto per lunghe distanze e dinamiche di trasferimento nei diversi comparti ambientali tali da giustificare il fenomeno del bioaccumulo attraverso la catena alimentare.

E' noto, infatti, che il 95% dell'esposizione nell'uomo è rappresentata dagli alimenti di origine animale (Fürst P., Beck H., and Theelen R., 1992), in particolare il latte (Rychen et al., 2005 and 2006, Fattore et al., 2006) e i prodotti lattiero-caseari. Altri autori hanno stabilito che per il bestiame la fonte di esposizione maggiore è rappresentata da suolo nel foraggio (Huwe, 2002).

Per questi motivi la Commissione Europea ha stabilito dei livelli massimi tollerabili di diossine e dl-PCB sia per le derrate alimentari che per mangimi e additivi (Regolamento (UE) N. 1259/2011 della Commissione che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 e Dir 2006/13/CE).

Nonostante esistano in letteratura numerosi lavori scientifici che hanno lo scopo di valutare l'esposizione alla contaminazione ambientale tramite l'utilizzo di modelli matematici (Glorennec et al., 2005, Adefunke et al., 2010,

Cangialosi et al., 2007, Meneses et al., 2004) manca da un lato la standardizzazione delle procedure per la raccolta e l'utilizzo dei dati, dall'altro un'integrazione delle diverse fasi che interessano la modellazione della contaminazione nell'ambiente, negli animali e nell'uomo.

L'obiettivo generale è quello di realizzare uno strumento da mettere a disposizione delle autorità competenti per la valutazione del rischio, per l'individuazione delle sorgenti di contaminazione e per la gestione efficace ed efficiente dei rischi. Allo scopo è stato possibile contare sull'esperienza accumulata nello studio di un episodio di contaminazione da

diossine e furani e DL-PCB delle aziende zootecniche bovine e delle loro produzioni alimentari verificatosi in Val di Susa a partire dalla prima metà degli anni Duemila. Tale episodio è servito da esempio per costruire uno strumento pratico in forma di protocollo da fornire ai decisori in contesti analoghi.

MATERIALI E METODI

Per la creazione del modello matematico sono stati utilizzati i dati storici provenienti dalla Bassa Val di Susa. I prelievi hanno interessato diversi comuni, da Almese a Susa in un arco temporale pari quasi a 10 anni (dal 2003 al 2012). Le matrici disponibili erano campioni di emissione, di suolo, alimenti per animali, latte prodotto da bovini allevati in loco e alimentati con mangimi e fieno di origine locale. Arpa Piemonte ha fornito i dati relativi alle polveri deposte nei deposimetri collocati nei pressi dell'acciaieria, i flussi di massa a camino in un periodo temporale di 9 anni (2004-2012). Per quanto riguarda i flussi, i campionamenti degli aeriformi sono stati effettuati 4 volte l'anno esclusivamente durante l'attività fusoria del forno e non durante gli altri tipi di lavorazione. Il periodo di attività campionatoria dei deposimetri era pari a 25 giorni e le quantità totali raccolte venivano messe in relazione ai giorni di lavorazione, al periodo temporale relativo al campionamento, alla superficie di deposizione. I 45 campioni di suolo sono stati prelevati sempre da tecnici Arpa tra l'inizio del 2003 e la fine del 2004, mentre sono disponibili gli esiti relativi a 3 ulteriori campioni di suolo prelevati in terreni appartenenti ad un allevatore del comune di San Didero nel 2010. L'area sottoposta ad indagine è stata quella del fondovalle principale, nel settore compreso tra il comune di Avigliana e il comune di Susa. Sono stati selezionati, sulla base di una griglia di 2 km per 2 km, aree con ridotte influenze antropiche: assenza di seminativi o tracce di recente coltivazione, assenza di evidente concimazione, assenza di segni di rivoltamento del suolo o deposizione di inerti o terreni di riporto.

Gli alimenti per gli animali riguardavano sia prodotto fresco (erba di pascolo ed erba sfalcata) sia prodotto essiccato (fieno maggengo, agostano e terzuolo) somministrato al bestiame lungo tutta la stagione invernale. I campioni riguardavano 6 campioni di fieno, 2 di granella di mais, 1 campione di trinciato di mais, 2 campioni di erba fresca e 3 campioni di mangime non specificato. L'analisi del trasporto della diossina nelle varie matrici ambientali e del suo trasferimento nella catena alimentare è stato analizzato con un approccio di modellazione (multiple

pathway exposure model) ad hoc ma del tutto analogo a quello utilizzato da vari programmi di calcolo di ampia diffusione (ad es. CalTox), volti alla stima dei rischi sanitari, ma con due differenze fondamentali:

- 1) data la natura della contaminazione, è stato considerato un numero ridotto di vie di trasferimento ed esposizione rispetto a quelle modellate in CalTOX,
- 2) le variabili di input ed i parametri del modello sono definiti come variabili aleatorie, il che permette di valutare gli intervalli di confidenza dei risultati e la loro sensibilità ai dati di input. La affidabilità del modello è stata valutata tramite un confrontandone le predizioni con i risultati raccolti sperimentalmente (dati osservati).

Infine per permetterne l'applicazione ad altri casi studio, il modello è stato implementato in un software 'open-source' – Gnumeric (www.gnumeric.org) – e corredato di un manuale d'uso. Tale software integra algoritmi per simulazioni stocastiche e permette pertanto di valutare la sensibilità dei risultati all'incertezza che caratterizza i dati di input.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Al fine di ricostruire il percorso dei contaminanti si è focalizzata l'attenzione sui campioni di suolo, fieno, latte provenienti da due aziende in particolare, presenti nel comune di Bruzolo e San Didero. È stata svolta un'analisi sulla parametrizzazione dei fenomeni di deposizione (secca e umida) e del loro accumulo nel suolo superficiale e nel fieno. In seguito, è stato analizzato l'insieme delle catene modellistica che, dalle concentrazioni misurate in aria, permette di stimare quelle nel latte bovino.

Il modello implementato permette di calcolare la quantità di diossine presenti nel latte vaccino a partire dalla concentrazione misurata in aria. Il calcolo prevede di considerare i vari sotto-processi che determinano il trasporto globale:

- deposizione umida e secca;
- accumulo e ripartizione dell'inquinante nel suolo e nella vegetazione;
- trasferimento del contaminante nel latte tramite l'alimentazione del bestiame.

E' stato sviluppato un modello a parametri concentrati (Fig.1) per la valutazione dell'esposizione in caso di contaminazione ambientale da PCDD/F e dl-PCB. Sono stati integrati due moduli:

- uno per la simulazione della deposizione degli inquinanti dall'aria al suolo, per stimare la concentrazione di contaminante presente nel terreno e nei vegetali;
- uno che quantifica i fenomeni di biotrasferimento nel latte bovino (Fig.2).

Il modello valuta l'incertezza associata ai risultati adottando un approccio Monte Carlo, e considerando dati di input come variabili aleatorie a cui è associata una funzione densità di probabilità.

Figura 1 – Modello concettuale di trasferimento di PCDD/F e dl-PCB nelle varie matrici ambientali (aria, suolo, vegetali).

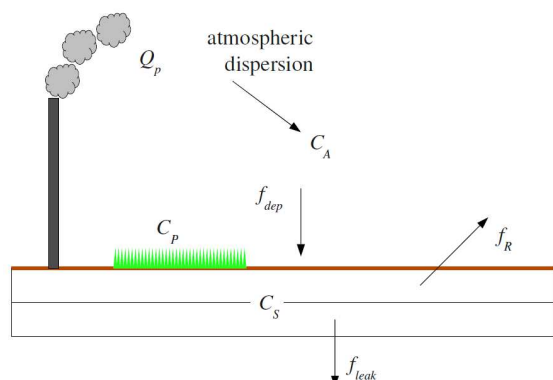
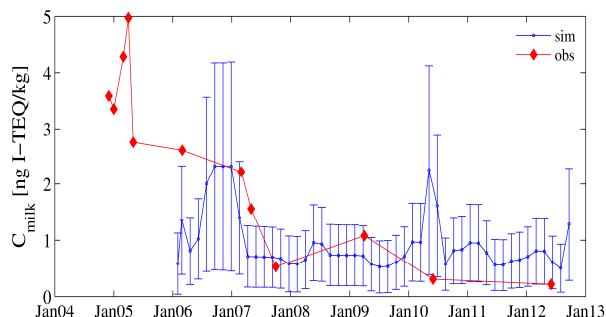


Tabella 2 – Confronto tra i valori di concentrazioni di diossina rilevate nel latte e i valori forniti dal modello.



Il modello si è dimostrato capace di prevedere, con una buona approssimazione, le concentrazioni di diossina misurate, riproducendo la riduzione delle concentrazioni nel latte, come conseguenza della diminuzione osservata in atmosfera.

BIBLIOGRAFIA

1. Aberg A, MacLeod M, Wiberg K (2015) Performance of the CalTOX fate and exposure model in a case study for a dioxin-contaminated site. Environ Sci Pollut Res, 22, 8719-8727.
2. Fiedler H., Hutzinger O., Dr. Welsch-Pausch K., Schmiedinger A. Evaluation of the Occurrence of PCDD/PCDF and POPs in Wastes and Their Potential to Enter the Foodchain. Ecological Chemistry and Geochemistry (2000).
3. Final Report Evaluation of the Occurrence of PCDD/PCDF and POPs in Wastes and Their Potential to Enter the Foodchain del 2000.
4. Laurent C., Feidt C., Laurent F. Contamination des sols: Transferts des sols vers les animaux. LesUlis, EDP Science/ADEME, 2005.
5. REGOLAMENTO (UE) N. 1259/2011 della Commissione del 2 dicembre 2011 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi per i PCB diossina-simili e i PCB non diossina-simili nei prodotti alimentari.

LA DISCIPLINA IN MATERIA DI ALIMENTI E BEVANDE TRA DIRITTO DELL'UNIONE EUROPEA E ORDINAMENTO NAZIONALE

Zuccon F¹, Traversa A¹, Andrea Gandino², Alessandro Paire², Ferrara R² and Decastelli L¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ² Università degli studi di Torino facoltà di Giurisprudenza

Key words: sicurezza alimentare; etichettatura; legislazione vigente; diritto UE; ordinamento nazionale

SINTESI

Il progetto ha voluto valutare lo stato attuale e le relative criticità della legislazione alimentare italiana e dell'Unione Europea in materia di sicurezza alimentare e di etichettatura evidenziandone le parti implicitamente o tacitamente abrogate, le eventuali conflittualità con la legislazione regionale e le ricadute della legislazione dell'Unione Europea. Il progetto ha previsto lo svolgimento di attività di ricognizione, analisi e revisione della normativa del settore attualmente in vigore presso la Comunità Europea, lo Stato Italiano e la Regione Piemonte.

In forza del principio del primato del diritto dell'UE rispetto al diritto nazionale, le disposizioni in materia di produzione e commercio degli alimenti di fonte UE sono da ritenersi prevalenti rispetto alla produzione normativa nazionale.

Riguardo all'etichettatura alimentare, la gran parte delle disposizioni previste nel d.lgs. n. 109/1992 è da intendersi superata dal Reg. (UE) n. 1169/2011, che prevale nella gerarchia delle fonti di diritto.

INTRODUZIONE

Nel nostro Paese, prima dell'avvento del cosiddetto "pacchetto igiene", la normativa nazionale in materia di sicurezza alimentare era costituita principalmente da normative orizzontali specifiche per i principali settori di produzione. Con l'avvento e la successiva entrata in vigore dei Regolamenti Comunitari quali il Reg. 2002/178/CE e il cosiddetto "pacchetto igiene" si è rivelato necessario valutare a livello nazionale quali norme mantenere in vigore. La fase di passaggio ha tuttavia incontrato non poche criticità in termini di armonizzazione e ancora oggi è possibile percepire le difficoltà durante l'espletamento delle attività professionali nel settore alimentare correlate alla complessità legislativa e alle lacune normative ancora esistenti.

Uno studio che riguardi lo stato attuale della legislazione alimentare italiana e dell'Unione Europea in materia di sicurezza alimentare nonché in materia di etichettatura degli alimenti costituisce un valido strumento al fine di comprendere quanta parte della legislazione interna sia ancora vigente in ragione del carattere oramai datato di alcune parti di essa ed è in grado di fornire informazioni utili a comprendere le ripercussioni del rapporto intercorrente tra diritto derivato dell'UE e ordinamento nazionale.

MATERIALI E METODI

-Ricognizione della legislazione nazionale vigente in materia di tutela igienico - sanitaria e di etichettatura alimentare.

-Valutazione dei sistemi di controllo e dei poteri ispettivi dell'autorità sanitaria alla luce delle fonti dell'Unione Europea in materia di sicurezza alimentare.

-Ricognizione delle norme regionali vigenti in materia di tutela igienico-sanitaria e di etichettatura.

-Analisi dei rapporti tra il diritto derivato dell'Unione Europea e l'ordinamento nazionale in materia di tutela igienico-sanitaria e di etichettatura alimentare.

-Valutazione del ruolo conformativo del diritto derivato dell'Unione Europea - analisi dei criteri di riparto dei poteri normativi e delle competenze amministrative nel sistema di

governo multilivello (UE, stato, Regioni, ASL, Enti locali) in materia di tutela igienico-sanitaria e di etichettatura alimentare.

-Analisi della l. n. 283/1962, del D.P.R. n. 327/1980 e del d.lgs. n. 109/1992 alla luce del diritto dell'Unione Europea derivato.

RISULTATI E CONCLUSIONI

In forza del principio del primato del diritto dell'UE rispetto al diritto nazionale, le disposizioni in materia di produzione e commercio degli alimenti di fonte UE sono da ritenersi prevalenti rispetto alla produzione normativa nazionale. Le fonti primarie dell'UE non disciplinano espressamente il settore alimentare, l'alimentazione, tuttavia, è una materia trasversale che abbraccia ambiti diversi e, pertanto, viene fatta rientrare tra le materie di competenza concorrente tra UE e Stati membri. L'UE e gli Stati Membri sono legittimati a porre in essere atti vincolanti in tale settore, benché gli Stati membri possono esercitare la loro competenza soltanto nella misura in cui l'UE non ha esercitato o ha deciso di non esercitare la propria.

Quanto alla materia dell'etichettatura alimentare, la gran parte delle disposizioni previste nel d.lgs. n. 109/1992 è da intendersi superata dal Reg. (UE) n. 1169/2011, il quale prevale sia nella gerarchia delle fonti di diritto, sia in ragione della successione temporale. In attesa dell'entrata in vigore del "decreto sanzioni", le autorità di controllo sono ad oggi sprovviste di strumenti sanzionatori al di fuori delle sole penalità applicabili alla violazione dei doveri di cui agli articoli 13 (indicazione del codice di lotto) e 16 (informazioni sui prodotti sfusi e preincartati) del d.lgs. 109/92, ai sensi del suo successivo articolo 18, le altre sanzioni contenute nel d.lgs. n. 109/1992 non hanno più valore.

Addentrando nella disamina della legge n. 283/1962, la disciplina penale contemplata agli artt. 5,6 e 12 non può che ritenersi in vigore. Dall'altra parte, non si può ad oggi ritenere integralmente abrogata la legge in oggetto correndo il rischio di incorrere in un vuoto legislativo con la conseguente diminuzione del livello di tutela della salute pubblica. Sarebbe però auspicabile, a fronte della riforma alimentare compiuta dall'UE, rimuovere le parti incompatibili con il diritto alimentare dell'UE e provvedere ad un aggiornamento delle disposizioni oramai obsolete. Attraverso l'approvazione di siffatta riforma scomparirebbe la legislazione concorrente tra Stato e Regioni e verrebbero ampliate le competenze esclusive statali tra cui quella in materia di salute e sicurezza alimentare; così verrebbe cancellata l'attuale legislazione concorrente in materia di tutela della salute e sicurezza alimentare. Alle Regioni, invece resterebbe la competenza legislativa esclusiva nell'organizzazione dei servizi sanitari, sociali,e regionali.

BIBLIOGRAFIA

1. O. ABBAMONTE, Il diritto privato delle regioni: una riflessione sui poteri locali nell'età repubblicana, in Dir. Amm., 2, 2007.
2. F. ALBISSINI, Strumentario di diritto alimentare europeo, Milano, 2009.
3. BERNARDI, La disciplina sanzionatoria italiana in materia alimentare dopo la riforma del 1999, in Annali dell'Università di Ferrara – Scienze Giuridiche, vol. XVIII, 2004.

4. R. BIN – G. PITRUZZELLA, Diritto Pubblico, Torino, 2012.
5. S. BOLOGNINI, La disciplina della comunicazione business to consumer nel mercato agro-alimentare europeo, Torino, 2012.
6. P. BORGHI - S. RIZZOLI - L. COSTATO, Compendio di diritto alimentare, Padova, 2013.
7. -F. BRUNO, Commento all'art. 19, in Commentario al reg. (CE) 178/2002, in Le nuove leggi civili commentate, 2003.
8. -F. BRUNO, Commento all'art. 14, in Commentario al reg. (CE) 178/2002, in Le nuove leggi civili commentate, 2003.
9. -CANFORA, Commento all'art. 2, in Commentario al reg. (CE) 178/2002, in Le nuove leggi civili commentate, 2003.
10. -F. CAPELLI - B. KLAUS - V. SILANO, Nuova disciplina del settore alimentare e autorità europea per la sicurezza alimentare, Torino, 2006.
11. -CORRERA, Prodotti alimentari. Sicurezza, igiene e qualità, Rimini, 1998.
12. -L. COSTATO, Il reg. 178/2002 e la protezione dei consumatori di alimenti, in Nuovo Dir. Agr., 2002.
13. -G. DE CRISTOFARO, I contratti del consumo alimentare, in Riv. Dir. Alimentare, 2, 2008.
14. -G. DE GIOVANNI, L'esigenza di un codice alimentare nazionale, in Alimenta, 1, 2011.
15. -DI LAURO, Commento all'art. 17, in La sicurezza alimentare nell'Unione europea, Commentario a cura dell'Istituto di diritto agrario internazionale e comparato (IDAIC), in Le nuove leggi civili commentate, 2003.
16. -M. DONINI, Il progetto di riforma dei reati in materia di sicurezza alimentare, in Cass. Pen., 12, 2010.
17. -M. DONINI - D. CASTRONUOVO, La riforma dei reati contro la salute pubblica, Padova, 2007.
18. -FERRETTI, No al beneficio della sospensione condizionale in caso di frode tossica, Nota a Cassazione penale, 4 dicembre 2013, n. 6621, sez. III, in Diritto & Giustizia, 2014.
19. -S. GABBI, L'Autorità europea per la sicurezza alimentare. Genesi, aspetti problematici e prospettive di riforma, Milano, 2009.
20. -GARGANI, Reati contro l'incolumità pubblica, in C. F. GROSSO - T. PADOVANI - A. PAGLIARO (diretto da) "Trattato di diritto penale. Parte speciale", Torino, 2013.
21. -F. GENCARELLI, Il caso "Berger": come informare il consumatore su un alimento inadatto al consumo umano, in Diritto dell'Unione Europea, 2, 2014.
22. -M.P. GENESIN, La disciplina dell'alimentazione fra Stato e Regioni: verso quali scenari?, in Foro Amm. TAR, 10, 2009.
23. -GERMANÒ, Corso di diritto agroalimentare, Torino, 2007.
24. -L. GRADONI, Commento all'art. 7, in La sicurezza alimentare nell'Unione europea, Commentario a cura dell'Istituto di Diritto Agrario Italiano e Comparato, in Le nuove leggi civili commentate, 2003.
25. -JANNARELLI, Commento all'art. 1, in La sicurezza alimentare nell'Unione europea, Commentario a cura dell'Istituto di diritto agrario internazionale e comparato (IDAIC), in Le nuove leggi civili commentate, 2003.
26. -L. LAPERTA, Addio alla legge comunitaria, arrivano la legge di delegazione europea e la legge europea, in Normativa nazionale, 2012.
27. -MACRÌ - G. SCAVIA - L. BUSANI, La valutazione scientifica del rischio. I criteri di valutazione del rischio alimentare, in Alimenta, 11-12, 2009.
28. -V. MARCENÒ, Legge abrogata. Esistenza, validità, efficacia, Torino, 2013.
29. -MARTUFI, Eterointegrazione penale e norme europee. Il caso della legislazione penale alimentare, in Riv. Trim. Dir. Pen. Econ., 3, 2012.
30. -U. MATTEI, Tutela del consumatore, sicurezza alimentare, qualità e valorizzazione dei prodotti agroalimentari attraverso la tracciabilità di filiera, in Progetto della Regione Piemonte, 2006.
31. -M.P. MIANI, Pacchetto igiene: evoluzione normativa, in Commercio & Attività Produttive, 5, 2010.
32. -MONTAGNA, Quali le regole per i prelievi e le analisi dei prodotti alimentari. Le norme regionali non possono incidere sulle norme statali, in Alimenta, 11 -12, 2009.
33. -MOR - S. SCIUTTO, Gli aspetti più significativi dell'aggiornamento della legislazione alimentare e del suo adeguamento alla normativa comunitaria (dal 1/1/1988 al 15/3/94), in Rassegna di diritto e tecnica dell'alimentazione, 1994.
34. -V. PACILEO, Il diritto degli alimenti, Padova, 2003.
35. -V. PACILEO, Autocontrollo igienico-sanitario nell'impresa alimentare e modelli di organizzazione aziendale: un confronto possibile tra d.lgs. n. 155/97 e d.lgs. n. 231/01, in Cass. Pen., 7 - 8, 2003.
36. -PADOVANI, Leggi penali complementari, Torino, 2007.
37. -G. PERONI, La nuova procedura di adozione degli atti agrari dopo "Lisbona": verso una nuova governance in materia di politica agricola comune?, in Diritto del Commercio Internazionale, 2, 2014.
38. -G. PICA, Voce Illeciti alimentari, in Enciclopedia del diritto, aggiornamento VI, Torino, 2002.
39. -PIERGALLINI, Depenalizzazione e riforma del sistema sanzionatorio nella materia degli alimenti, in Riv. It. Dir. e Proc. Pen., 4, 2000.
40. -PISANELLO, Obblighi di sicurezza alimentare nel mercato unico europeo tra gestione del rischio e responsabilità d'impresa, in Dir. Comm. Sc. Int., 4, 2008.
41. -PISANELLO, La disciplina sanzionatoria per la violazione degli obblighi generali di sicurezza ex artt. 18, 19 e 20 reg. 178/02, in Alimenta, 6, 2006.
42. -M. POTO - E. ROLANDO - C. ROSSI, La sicurezza alimentare tra Unione Europea, Stato e Regioni dopo la riforma del titolo V della Costituzione, Torino, 2006.
43. -RICCI, La tutela multilivello del diritto alla sicurezza e qualità degli alimenti, Torino, 2012.
44. -ROOK BASILE - A. GERMANÒ, Commento all'art. 3, in La sicurezza alimentare nell'Unione europea, Commentario a cura dell'Istituto di diritto agrario internazionale e comparato (IDAIC), in Le nuove leggi civili commentate, 2003.
45. -M. SAVINO, Autorità e libertà nell'unione europea: la sicurezza alimentare, in Riv. Trim. Dir. Pubbl., 2, 2007.
46. -SCIPIONI - D. ANDREAZZA, Il sistema HACCP, Milano, 1997 (ristampa 2001).
47. -SGARBANTI - P. BORGHI - L. GRADONI - D. VITI - M. VALLETTA - F. BRUNO - M. MAZZO - A. DI LAURO - E. SIRSI - S. RIZZOLI e F. ALBISINNI, in La sicurezza alimentare nell'Unione europea, Commentario a cura dell'Istituto di diritto agrario internazionale e comparato (IDAIC), in Le nuove leggi civili commentate, 2003.
48. -F. SICCARDI, Vende cibi conservati male: il proprietario del supermercato ne risponde penalmente, Nota a Cassazione penale, 20 giugno 2013, n. 37380, sez. III, in Diritto e Giustizia online, 2013.
49. -F. TRIMARCHI, Principio di precauzione e "qualità" dell'azione amministrativa, in Riv. It. Dir. Pubbl. Comunit., 6, 2005.
50. -L. VICINI - N. MALANDRINO - C. MUCCIOLO, L'auspicato nuovo "Codice degli alimenti" e la possibile riforma dei reati in materia di sicurezza alimentare. Prospettive di riordino e ammodernamento della disciplina italiana, in Il Pesce, 6, 2013.
51. -VITALE, Manuale di legislazione alimentare, Milano, 2007.

VALUTAZIONE DELL'IMMUNOGENICITÀ E DELLA TOSSICITÀ DELLE PROTEINE DEL GLUTINE DI *TRITICUM MONOCOCCUM* MEDIANTE ANALISI DI PROTEOMICA E TEST *IN VITRO* SU COLTURE CELLULARI DI PAZIENTI CELIACI

Mazza M¹, Gazza L², Martucci F¹, Guglielmetti C¹, Dell'Atti L¹, Candiano G³, D'Ambrosio C⁴, Scaloni A⁴, Acutis PL¹, Pogna NE²

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, SS Genetica e Immunobiochimica, Torino; ² Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Roma; ³ Ospedale "G. Gaslini", Laboratorio di Fisiopatologia dell'Uremia, Genova; ⁴ CNR-ISPAA, Laboratorio di Proteomica e Spettrometria di Massa, Napoli

Key words: celiachia; grano monocolto; ω -gliadine

SINTESI

Studi *in vitro* hanno evidenziato che le proteine del glutine di alcune linee di *Triticum monococcum*, un antico grano diploide, presentano ridotta citotossicità e ridotto potere immunostimolante nei pazienti celiaci. Tuttavia l'effetto tossico mostrato da alcuni genotipi di grano monocolto, privi della frazione ω -gliadinica, ha fatto ipotizzare un ruolo protettivo e antinfiammatorio di queste proteine. Approfonditi studi sulla composizione e sull'effetto citotossico delle ω -gliadine estratte da diverse linee di grano monocolto, hanno permesso di confermare questa ipotesi e di identificare, in una specifica ω -gliadina, un peptide con ruolo protettivo peraltro presente in molte delle linee di grano monocolto analizzate. I risultati ottenuti da questa ricerca sono molto promettenti in quanto permettono di selezionare i genotipi di grano monocolto contenenti il peptide protettivo, di sviluppare varietà di grano non tossiche e pertanto utili a prevenire l'insorgenza della malattia celiaca.

INTRODUZIONE

La celiachia è una malattia cronica infiammatoria immuno-mediata causata, in individui geneticamente predisposti, dall'ingestione delle proteine del glutine. Le gliadine, la principale componente tossica del glutine, appartengono alla famiglia delle prolamine (proteine ricche di prolina e glutamina) e sono parzialmente resistenti alle proteasi. I peptidi prolaminici, che resistono alla digestione gastrica, possono oltrepassare la membrana epiteliale dell'intestino ed interagire con le cellule del sistema immunitario adattativo presenti nella mucosa. Considerata un tempo una malattia genetica, la celiachia è vista attualmente come una patologia alimentare che può comparire a qualunque età. Alcuni studi hanno rivelato che il numero di peptidi che interagiscono a livello della mucosa e l'intensità della risposta delle cellule T, indotta da ciascun peptide prolaminico, determinano una soglia che deve essere superata affinché, in un individuo geneticamente predisposto alla celiachia, si abbia una reazione immunitaria patologica verso le proteine del glutine [1]. Il largo consumo di alimenti contenenti glutine ha determinato un aumento della prevalenza della malattia (circa 1%), da qui la necessità di sviluppare varietà di grano con ridotta citotossicità ed immunogenicità da utilizzare per la prevenzione della celiachia. Studi *in vitro* hanno evidenziato che le proteine del glutine di alcune linee di *Triticum monococcum*, un antico grano diploide, presentano ridotta citotossicità e ridotto potere immunostimolante nei confronti dei pazienti celiaci. Tuttavia le prolamine di alcuni genotipi di grano monocolto privi della frazione ω -gliadinica, hanno mostrato un effetto tossico pari a quello del grano tenero. Questi risultati hanno fatto ipotizzare un ruolo protettivo e antinfiammatorio di questa classe di gliadine [2]. Al fine di chiarire il ruolo di queste gliadine nella celiachia e soprattutto nell'ottica di sviluppare varietà di grano utilizzabili per la prevenzione di questa malattia, nell'ambito di questo progetto di ricerca sono state approfondite le conoscenze delle proteine di riserva di diverse linee di grano monocolto.

MATERIALI E METODI

Gli studi sono stati focalizzati su tre diverse linee di grano monocolto (Monlis, ID331 e Stendhal) caratterizzate da

diverse quantità di ω -gliadine. Parallelamente sono state analizzate anche 46 accessioni di grano monocolto provenienti da diverse aree geografiche. Per la realizzazione di questi studi sono state utilizzate tecniche di elettroforesi mono- e bidimensionale (A-PAGE; A-PAGE x SDS-PAGE), di immunoblotting e spettrometria di massa (nanoLC-ESI-LIT-MS/MS e MALDI-TOF-MS). La tossicità e l'immunogenicità dei peptidi prolaminici delle linee Stendhal, Monlis e ID331 è stata valutata attraverso test *in vitro* condotti su linee cellulari di mieloma umano K562(S), di adenocarcinoma colon-rettale (CaCo2) e linfociti T, questi ultimi ottenuti dalla mucosa intestinale di alcuni pazienti celiaci.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Le analisi elettroforetiche delle ω -gliadine hanno confermato: l'assenza di questa frazione gliadinica nella varietà Monlis; la presenza di una sola proteina in ID331 e di diversi componenti nella linea Stendhal, questi ultimi classificati in quattro famiglie con diverso peso molecolare, in cui, la famiglia B, a maggior peso molecolare, comprendente 4-5 peptidi, mentre la famiglia A, a basso peso molecolare, con un solo peptide e corrispondente a quello della ω -gliadina presente in ID331 (ω -331) (Figura 1 e 2).

Figura 1. Confronto in A-PAGE delle ω -gliadine di Stendhal (1), Monlis (2) e ID331 (3).

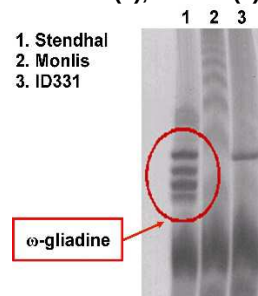
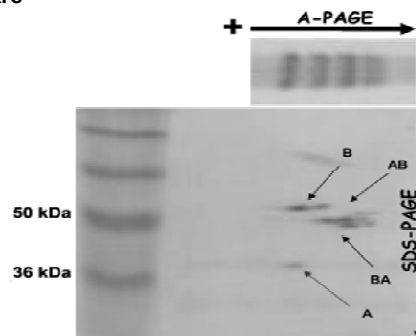


Figura 2. Elettroforesi bidimensionale (A-PAGE x SDS-PAGE) delle ω -gliadine di Stendhal e loro classificazione nelle famiglie A, B, AB e BA sulla base del peso molecolare



La classificazione delle ω -gliadine di Stendhal in quattro famiglie corrispondenti a quattro regioni distinte, è risultata in accordo con l'analisi effettuata a partire dalle sequenze

amminoacidiche delle ω -gliadine di *Triticum monococcum* depositate in banca dati (Tabella 1). La prima famiglia, denominata famiglia A, risulta caratterizzata da proteine di diverso peso molecolare e dalla presenza di un nonapeptide QQPQRQPF molto simile alla sequenza QQPQDAVQPF, presente nel grano duro Adamello e con accertata attività antinfiammatoria nella malattia celiaca [3]. Questa analisi ha inoltre portato ad ipotizzare, anche sulla base del peso molecolare, una corrispondenza tra la ω -331 e la ω -21, una proteina appartenente alla famiglia A (e quindi contenente il peptide protettivo). Le indagini con spettrometria di massa, condotte per identificare la sequenza amminoacidica della proteina ω -331 presente nella varietà ID331, hanno rivelato la presenza del nonapeptide QQPQRQPF tipico della famiglia A delle ω -gliadine. Il confronto delle sequenze ha inoltre rivelato una corrispondenza della ω -331 con la proteina ω -2, e non con la ω -21 come inizialmente ipotizzato (Tabella 1).

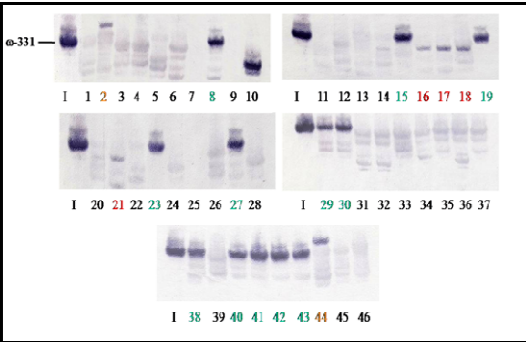
Tabella 1. Classificazione delle ω -gliadine di grano monococco in base alla sequenza amminoacidica. La sequenza protettiva (aa 109-117) è presente solo nella famiglia A

Fam.	Clone ω	No. amminoac.	MW	Sequenza 17-19	Sequenza terminale	Sequenza 109-117
A	2	337	39338	LYP	VVE	QQPQRQPF
	4	344	39311	LYP	VVE*	QQPQRQPF
	21	271	31707	LYP	VVE	QQPQRQPF
	47	-	-	LYP	-	QQPQRQPF
B	19	348	40492	SFF	GGQ	assente
	42	348	40575	SFF	GGQ	assente
	18	-	-	SFF	-	assente
AB	45	342	39819	LYP	GGQ	assente
	68	342	39819	LYP	GGQ	assente
BA	17	326	38275	SFS	VVE	assente
	35	-	-	SFS	-	assente

*Termina con QASVANE dopo VVE

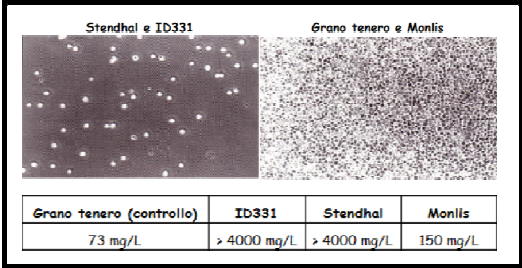
Le differenze di peso molecolare piuttosto significative con la ω -2 potrebbero essere riferite molto probabilmente alla presenza di una delezione nella regione 131-203 della gliadina ω -331. Le analisi di immunoblotting hanno confermato la presenza del nonapeptide QQPQRQPF nella ω -331, portando così ad ipotizzare pertanto un ruolo protettivo di questa proteina, risultata presente anche in molte delle 46 accessioni di grano monococco analizzate nell'ambito di questi studi (Figura 3).

Figura 3. Analisi western blot delle diverse accessioni di grano monococco immunorivelate con l'anticorpo identificante il nonapeptide protettivo QQPQRQPF. I:ID331



L'assenza di tossicità *in vitro*, sia su cellule K562(S) sia su cellule CaCo2, dei digesti prolaminici estratti dalle linee Stendhal e ID331, contrariamente a quanto emerso per il Monlis, ha permesso infine di confermare il ruolo protettivo della ω -331 (Figura 4).

Figura 4. Cellule di mieloma leucemico umane K562(S) trattate con digesti prolaminici di grano monococco ID331 e Stendhal, Monlis e grano tenero



Inoltre, sebbene i test *in vitro* condotti sui linfociti T abbiano rivelato un certo potere immunogenico da parte delle prolamine della varietà Stendhal è possibile ipotizzare che *in vivo* tale condizione non si realizzi essendo l'attivazione del sistema immunitario acquisito una conseguenza dell'attivazione di quello innato. Questo è in accordo con gli studi condotti da Gianfrani *et al.* [4]. In conclusione da questi studi è emerso che le prolamine delle linee Stendhal e ID331, contrariamente a quelle del Monlis, non sono in grado di stimolare l'immunità innata e quindi di essere tossiche; l'assenza di tossicità è dovuta alla presenza di un peptide protettivo presente nella gliadina ω -331; questa proteina è presente in molte varietà di grano monococco. Sebbene i meccanismi molecolari con cui questo peptide protettivo esercita la sua azione antinfiammatoria non siano ancora noti, la possibilità di poterlo identificare in molte linee di grano monococco mediante un semplice approccio immunobiochimico, rende i risultati di questa ricerca molto promettenti al fine di selezionare e sviluppare in futuro varietà di grano monococco non tossiche e quindi utili per prevenire l'insorgenza della malattia celiaca nei soggetti geneticamente predisposti.

BIBLIOGRAFIA

- Vader W, Stepniak D, Kooy Y, Mearin L, Thompson A, van Rood JJ, Spaenij L, Koning F. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten- specific T cell responses. Proceedings of the National Academy of Sciences; 2003; Oct 14; 100(21): 12390-12395.
- Gazza L, Vincentini O, De Vincenzi M, Piccinnini M, Petrangeli V, Ng PKV, Pogna NE. Variation in toxicity of monococcum and dicoccum wheat plants for celiac patients. Proceed 10th International Workshop; INRA; 2010; Parigi; p.:298-303.
- Silano M, Vincentini O, Iapello A, Mancini E, De Vincenzi M. Antagonist peptides of the gliadin T-cell stimulatory sequences: a therapeutic strategy for celiac disease. Journal of Clinical Gastroenterology; 2008; 42 (Suppl.3); S191-2.
- Gianfrani C, Maglio M, Rotondi A, Valfiorio V, Camarca A, Vocca I, Iaquinto G, Giardullo N, Pogna N, Troncone R, Auricchio S, Mazzarella G. Immunogenicity of monococcum wheat in celiac patients; American Journal of Clinical Nutrition; 2012; Dec; 96(6):1339-1345.

STRESS OSSIDATIVO IN CELLULE STAMINALI TUMORALI: BIOLOGIA E STRATEGIE DI MODULAZIONE

Ratto A¹, Bassi AM², Scanarotti C², Vernazza S², Campanella C¹, Vito G¹, Thellung S³, Barbieri F³, Florio T³, Ferrari A¹

¹Centro di Riferenza Nazionale per l'Oncologia Veterinaria e Comparata, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Genova; ²Sezione di Patologia Generale – DIMES, Università degli Studi di Genova; ³Sezione di Farmacologia – DIMI, Università degli Studi di Genova.

Key words: cellule staminali tumorali, pets, stress ossidativo.

SINTESI

Dai dati disponibili in letteratura si evidenzia un'associazione tra stress ossidativo (SO), infiammazione e cancro. Molti tipi di neoplasie sono caratterizzate da meccanismi di adattamento nei confronti di tale condizione biochimica, che potrebbero essere coinvolti nella progressione tumorale. Recentemente è stato dimostrato che le cellule staminali tumorali (CST) sono resistenti ad elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno (SRO) in grado invece di indurre un'azione citotossica nei confronti di altre popolazioni cellulari. Obiettivo della ricerca è stato quello di studiare lo stato ossido-riduttivo di CST isolate da neoplasie mammarie spontanee di cani e gatti per valutarne il ruolo nello sviluppo tumorale; è stato in particolare approfondito l'effetto della modulazione dello stress ossidativo sulla tossicità antitumorale, attraverso l'utilizzo di uno stimolo pro-ossidante.

INTRODUZIONE

Lo stress ossidativo rappresenta uno stato biochimico determinato da uno squilibrio tra specie reattive/radicali liberi e antiossidanti. Nonostante in condizioni fisiologiche la produzione di SRO costituisca un processo positivo coinvolto in molteplici funzioni cellulari (es. reazioni immunitarie), una massiva produzione non bilanciata di tali componenti può indurre un danno cellulare/tissutale. I dati riportati in bibliografia sottolineano un'associazione tra SO, infiammazione e cancro. Molti tipi di tumore sono caratterizzati da meccanismi di adattamento nei confronti dello stress ossidativo, che potrebbero contribuire alla progressione della malattia.

Le CST sono state identificate per la prima volta in tumori mammarie felini attraverso un protocollo di isolamento messo a punto dal gruppo del CEROVEC [1]. Tale popolazione cellulare rappresenta un'esigua componente di tutta la massa tumorale rispetto alla controparte differenziata. Le CST sono caratterizzate da proliferazione lenta, ma teoricamente illimitata ed hanno sviluppato efficaci meccanismi di difesa nei confronti di agenti citotossici, inclusi i chemioterapici convenzionali [2-3]. Recentemente alcune ricerche hanno evidenziato che le cellule staminali tumorali sono resistenti ad alti livelli di SRO. Analogamente, le CST mammarie sembrano mostrare una marcata espressione di antiossidanti potenzialmente associata ad una maggiore resistenza ad alti valori di SRO e, conseguentemente, ai possibili meccanismi di farmaco-resistenza e comparsa di recidive. Obiettivo del progetto è stato quello di studiare l'equilibrio ossido-riduttivo di CST isolate da tumori mammarie spontanei canini e felini per valutarne il loro possibile ruolo nella progressione neoplastica. E' stato inoltre testato l'effetto *in vitro* della modulazione dello stress ossidativo nell'indurre tossicità antitumorale mediante l'utilizzo di uno specifico stimolo pro-ossidante.

MATERIALI E METODI

Un totale di 66 sospette neoplasie spontanee mammarie sono state incluse nello studio e diagnosticate, secondo WHO, da parte del CEROVEC: 57 tumori canini e 9 felini. Per ogni campione, oltre all'esame istologico è stata

eseguita una indagine immunoistochimica per alcuni marcatori di interesse. Quindici frammenti di tessuto fresco mostravano condizioni sperimentali ottimali atte a consentire l'allestimento di colture cellulari primarie. Specifiche proprietà staminali (formazioni di sferoidi, capacità di differenziamento, espressione del marcatore CD44) sono state verificate in tutte le colture, mantenute in condizioni selettive (assenza di siero e presenza dei fattori di crescita bFGF/EGF).

Con l'obiettivo di studiare i meccanismi di stress ossidativo, le colture primarie di CST sono state esposte ad uno stimolo pro-ossidante per 24-48h: una miscela di lipoperossidi (LOOHs), denominata K600, a diverse concentrazioni (0.1-1% e 0.01-0.1%). K600 deriva da un trattamento perossidativo di olio extra vergine che permette di ottenere una concentrazione di LOOH pari a 600 EqO₂/Kg olio (K600, Patente Internazionale n° PCT/IT 2008/000693).

Gli effetti di K600 sulle cellule staminali sono stati studiati attraverso la valutazione della tossicità cellulare (saggio MTT che testa l'attività metabolica di cellule vitali), la determinazione fluorimetrica del contenuto cellulare di DNA (come indice di proliferazione), il dosaggio di prodotti di stress ossidativo (prodotti reattivi con l'acido tiobarbiturico, TBARs) così come di livelli di espressione proteica della RTKN, Rhotekin; infine attraverso il test colorimetrico NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*), che valuta la formazione di acqua ossigenata (H₂O₂).

RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti evidenziano come l'esposizione delle colture primarie di CST a K600 induca un incremento dei livelli intracellulari basali di stress ossidativo: i valori di TBARs indicano un aumento dell'indice di perossidazione lipidica (prodotti della malondialdeide) già dopo le prime 24h di trattamento. Il test NBT mostra che l'anione superossido deriva principalmente dal compartimento mitocondriale rispetto a quello citosolico. I risultati derivati dal saggio MTT dimostrano che K600 determina una riduzione (80%) dell'indice di vitalità cellulare rispetto al controllo (cellule non trattate con K600). E' stata osservata una significativa inibizione dell'indice di proliferazione cellulare a concentrazioni di K600 pari a 0.025% dopo 48h di trattamento, così come una diminuzione (60%) dopo 24h di esposizione, valutato in immunoblotting e densitometria. I dati emersi da questo studio indicano la capacità di K600 di indurre un effetto citostatico/citotossico attraverso la modulazione del bilancio ossidativo. E' possibile infine sottolineare che i risultati ottenuti possano per il futuro fornire utili informazioni e conoscenze nel campo della ricerca antitumorale, in particolare per quanto riguarda la comprensione dei processi di sviluppo neoplastico, così come l'identificazione di nuovi bersagli prognostici e terapeutici traslabili sia in oncologia veterinaria che umana.

BIBLIOGRAFIA

1. Barbieri F, Wurth R, Ratto A, Campanella C, Vito G, Thellung S, Daga A, Cilli M, Ferrari A, Florio T. Exp Cell Res 318 (2012) 847-860.
2. Kobayashi CI and Suda TJ. Cell. Physiol. 227 (2012) 421-430.
3. Michael B et al. Nature Reviews Cancer (2012) 12, 564-571.

INDAGINE SULLA PRESENZA DI VIRUS ENTERICI EMERGENTI CON POTENZIALE RISCHIO ZONOSICO IN SUIDI E RUMINANTI SELVATICI

Robetto S^{1,2}, Orusa R^{1,2}, Bona MC², Caruso C², Domenis L^{1,2}, Guidetti C^{1,2}, Masoero L², Modesto P², Alberti M³,
Di Martino B⁴

¹ Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Animali selvatici (CeRMAS);

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ³ Centro Educazione Regionale Faunistica (CERF) Valle d'Aosta;

⁴ Università degli Studi di Teramo

Key words: virus enterici, zoonosi, ungulati selvatici

SINTESI

Obiettivo del presente progetto di ricerca è stato quello di condurre un'indagine molecolare per valutare la circolazione di virus enterotropici quali norovirus (NoV), virus dell'epatite E (HEV) e kobuvirus in ungulati selvatici del Nord e Centro- Sud Italia a partire da campioni fecali e tissutali (bile e fegato). I risultati ottenuti, hanno permesso di dimostrare per la prima volta la presenza di kobuvirus appartenenti alle specie *Aichivirus B* e *D* nei ruminanti selvatici ed in particolare in tamponi rettali collezionati da caprioli cacciati in Valle d'Aosta (6,7%, 13/193). Un altro dato di particolare interesse riguarda l'identificazione di HEV in campioni fecali collezionati da cinghiali abruzzesi (6,3%, 3/48). L'analisi di sequenza dell'intero gene ORF2 di un ceppo, WB/P6-15/ITA, ha dimostrato l'appartenenza di quest'ultimo al genotipo 3, sottotipo c, e la più alta identità nucleotidica (94,0%) nei confronti del ceppo PeGe umano identificato in un paziente italiano con epatite acuta.

INTRODUZIONE

Il 60% delle malattie infettive che colpiscono l'uomo sono a carattere zoonosico e il 70% delle infezioni emergenti degli ultimi vent'anni trovano la loro fonte principale negli animali selvatici. Accanto a tale evidenza, più recentemente, l'impiego di metodiche molecolari e sierologiche alternative a quelle standard ha permesso di acquisire nuove conoscenze sulla recettività degli animali domestici e selvatici a patogeni virali geneticamente correlati con virus enteropatogeni umani. Tra questi hanno assunto un ruolo di particolare interesse per il loro potenziale zoonosico: norovirus (NoV), virus dell'epatite E (HEV) e kobuvirus. I NoV (famiglia *Caliciviridae*, genere *Norovirus*) sono riconosciuti come una delle principali cause di gastroenterite acuta di origine non batterica nell'uomo [1]. Sebbene i NoV siano considerati strettamente specie-specifici, la recente identificazione nei mammiferi domestici di ceppi geneticamente ed antigenicamente correlati con NoV umani ha sollevato ragionevoli dubbi sul loro potenziale zoonosico [2]. HEV (famiglia *Hepeviridae*, genere *Orthohepevirus*) [3] è l'agente eziologico dell'epatite E, un'importante problema di sanità pubblica soprattutto nei Paesi in via di sviluppo, nei quali è presente in forma endemica. Sulla base dell'analisi filogenetica dei geni ORF1 e ORF2, i ceppi HEV sono attualmente suddivisi in quattro genotipi a diffusione geografica diversa: i genotipi 1 e 2, presenti nei paesi in via di sviluppo, sono stati finora identificati solo nell'uomo e sono normalmente associati a epidemie da consumo di acqua e cibo contaminati, mentre i genotipi 3 e 4, associati a forme sporadiche di epatite E nei paesi industrializzati, riconoscono come ospiti recettivi sia l'uomo che gli animali. Sulla base delle più recenti acquisizioni, i suidi domestici e selvatici e i cervidi sono ritenuti un'importante fonte di infezione per l'uomo. I cibi più frequentemente incriminati sono rappresentati da prodotti di origine animale quali salsicce e fegatelli, spesso consumati crudi o poco cotti [4]. Il genere *Kobuvirus*

(famiglia *Picornaviridae*) comprende tre specie, *Aichivirus A* (aichi virus umano), *Aichivirus B* (kobuvirus bovino) e *Aichivirus C* (kobuvirus suino) ed una quarta specie non ancora ufficialmente riconosciuta, denominata *Aichivirus D* (kobuvirus caprino) [5]. In Europa finora sequenze aichi virus-like soprattutto associate a casi sporadici di gastroenterite pediatrica sono stati identificati in Francia, Ungheria, Germania e Finlandia. L'impiego di sistemi molecolari universali ha permesso di individuare sequenze kobuvirus-like anche nel bovino e nel suino e l'analisi genomica di alcuni ceppi ha confermato l'esistenza di kobuvirus specifici per entrambe le specie. Recentemente sequenze kobuvirus-like bovino sono state identificate in pecora e suino e sequenze kobuvirus-like porcino sono state identificate nel cinghiale [6], lasciando ipotizzare la possibile trasmissione interspecie.

Alla luce di tali informazioni, obiettivi principali del presente progetto di ricerca sono stati: i) indagare la circolazione di NoV, HEV e kobuvirus in ungulati selvatici; ii) caratterizzare geneticamente i ceppi identificati per valutare la diversità genetica e le correlazioni evolutive con i ceppi patogeni per l'uomo.

MATERIALI E METODI

Campionamento: lo studio è stato effettuato su capi cacciati nella regione Valle d'Aosta e Piemonte. Inoltre, sono stati collezionati campioni provenienti da cinghiali cacciati durante l'attività venatoria 2014-2015 in Abruzzo. In particolare, sono stati collezionati un totale di 811 fegati (324 cinghiali, 262 caprioli, 74 cervi, 144 camosci, 7 mufloni), 6 campioni di bile di cinghiale, 18 campioni di bile di camoscio e 822 tamponi rettali (231 cinghiali, 254 caprioli, 79 cervi, 248 camosci, 10 mufloni).

Ricerca dell'RNA di NoV: è stata effettuata mediante RT-PCR usando primer NoV-specifici e calicivirus generici che hanno per *target* i motivi altamente conservati "DYSKWDST" e "YGDD" della regione RdRp della polimerasi. Inoltre, sono state allestite due monoplex Real Time RT-PCR specifiche per NoV appartenenti ai genogruppi I e II.

Ricerca dell'RNA di HEV: è stata utilizzata una metodica one-step Real time RT-PCR che utilizza una sonda marcata FAM-BHQ-1 e una coppia di primer specifici per la regione dell'ORF3 altamente conservata in tutti i membri del genere *Orthohepevirus*. Inoltre, i tamponi fecali collezionati in Abruzzo sono stati sottoposti a nested RT-PCR al fine di amplificare due frammenti conservati dei geni ORF1 e ORF2 lunghi rispettivamente 286 pb e 148 pb.

Ricerca dell'RNA dei kobuvirus: tutti i campioni fecali sono stati sottoposti a RT-PCR per la ricerca di kobuvirus impiegando una coppia di primer ad ampio spettro (UNIKobu/F e UNIKobu/R) in grado di amplificare una porzione conservata del gene 3D (217 bp) comune a tutti i membri appartenenti al genere *kobuvirus*.

Real-time RT-PCR per kobuvirus: nell'ambito del progetto è stata messa a punto una Real-time RT-PCR per Kobuvirus che amplifica una porzione del gene 3D del genoma virale con rilevazione mediante SYBR Green.

Analisi di sequenza nucleotidica: sui campioni positivi si è proceduto con sequenziamento diretto usando la chimica BigDye Terminator Cycle ed il sequenziatore 3730 DNA Analyzer. Le analisi molecolari sono state condotte mediante il programma Geneious vers. 7 (Biomatters, New Zealand, <http://www.geneious.com>).

Analisi statistica: tutte le elaborazioni dei dati sono state svolte con l'ausilio del software statistico dedicato Stata 14.1.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Sono stati sottoposti a screening molecolare per NoV un totale di 741 tamponi rettali (205, cinghiali, 226 caprioli, 68 cervi, 232 camosci, 10 mufloni). In nessuno dei campioni esaminati sono stati evidenziati segnali di positività per la presenza dell'RNA dei NoV.

L'indagine molecolare per la ricerca del RNA di HEV è stata condotta per quanto riguarda i ruminanti selvatici su 487 campioni di fegato (262 caprioli, 74 cervi, 144 camosci, 7 mufloni) e 18 campioni di bile di camoscio, mentre relativamente ai cinghiali sono stati collezionati 48 tamponi rettali, 324 fegati e 6 campioni di bile. Tutti i campioni di origine tissutale (fegato e bile) sono risultati negativi per la presenza del RNA di HEV, mentre dei 48 tamponi rettali, 3 campioni (6,3%; IC95% 1,3-17,2) sono risultati positivi ad entrambe le metodiche di RT-PCR. Le analisi di sequenza delle regioni amplificate hanno mostrato la maggiore identità nei confronti di ceppi HEV appartenenti al genotipo 3. L'analisi di sequenza dell'intero gene ORF2 di uno dei ceppi, il WB/P6-15/ITA (GenBank accession number: KT245136), ha definitivamente dimostrato l'appartenenza di quest'ultimo al genotipo 3, sottotipo c, e la più alta identità nucleotidica (94,0%) nei confronti del ceppo PeGe umano [7] identificato in un paziente italiano con epatite acuta.

Nel corso del presente progetto sono stati sottoposti ad indagine molecolare per la ricerca di **kobuvirus**, i tamponi rettali collezionati da 168 cinghiali e 375 ruminanti selvatici (119 camosci, 63 cervi, 193 caprioli). Per quanto riguarda lo screening dei tamponi rettali collezionati dai cinghiali è stata evidenziata la presenza di una banda del peso molecolare atteso in un solo campione (1/168; 0,6% IC 95% 0,2-3,3) proveniente da un animale abbattuto in Piemonte. Le analisi molecolari condotte mediante i programmi BLAST e FASTA hanno permesso di rilevare relativamente alla positività riscontrata nel cinghiale, la più alta identità nucleotidica (92%) nei confronti del ceppo kobuvirus porcino, WB1-HUN/2011, identificato finora solo in cinghiali Ungheresi [6]. Dei 375 campioni prelevati da ruminanti selvatici, 13 (3,5%) sono risultati positivi per la presenza dell'RNA dei kobuvirus. Tale positività è stata riscontrata solo in tamponi rettali (13/193) collezionati da caprioli cacciati in Valle d'Aosta con una prevalenza generale del 6,7% (IC 95% 3,6-11,2). L'analisi di sequenza nucleotidica della regione 3D ha rilevato per nove ceppi (GenBank accession number: KP864070-8) la più alta identità nucleotidica (91,2-97,4%) nei confronti di sequenze di kobuvirus bovino precedentemente identificate sia in bovini diarroici che asintomatici; mentre per quattro campioni (GenBank accession number: KP864079-82) è stata riscontrata la più stretta correlazione genetica (84,2-87,6% di identità nucleotidica) con il nuovo kobuvirus di origine caprina, finora segnalato solo in capre con diarrea in Corea [8]. L'analisi filogenetica ha confermato il raggruppamento dei ceppi italiani con le sequenze coreane all'interno della nuova specie *Aichivirus D*.

Questo studio rappresenta la prima indagine epidemiologica a carattere molecolare che ha permesso di ottenere evidenze sulla circolazione di kobuvirus nei ruminanti selvatici, ed in particolare nel capriolo (*Capreolus capreolus*). Sulla base dei risultati da noi ottenuti, unitamente a quanto precedentemente osservato in studi simili condotti in altre specie selvatiche, è ipotizzabile che kobuvirus geneticamente correlati tra loro, siano in grado di infettare specie animali diverse. Tale ipotesi trova conferma nella dimostrata circolazione di kobuvirus canino sia nei cani domestici che nelle volpi [9], nell'identificazione di kobuvirus bovino nei furetti [10], nella recettività sia dei suini che dei cinghiali all'infezione sostenuta da kobuvirus porcino [6] ed infine nei dati collezionati nel presente lavoro. Tuttavia, se da una parte i risultati ottenuti, rinforzano il sospetto che le infezioni da kobuvirus siano comuni negli animali selvatici quanto nei domestici, dall'altra sollevano interessanti quesiti relativi al potenziale patogenetico di questi virus e al ruolo epidemiologico dei mammiferi selvatici per la loro diffusione nell'ambiente. Per quanto riguarda le ricadute sul territorio, nell'ambito del presente progetto di ricerca, la sinergica collaborazione di tutte le unità operative con il Centro Educazione Regionale Faunistica (CERF) della regione Autonoma Valle d'Aosta, ha permesso l'organizzazione di specifici incontri formativi per cacciatori e agenti forestali sulla tematica: "Malattie alimentari da virus enterici ad impatto zoonosico in suidi e ruminanti selvatici". A scopo didattico è stata messa a punto una breve presentazione in PowerPoint che è stata utilizzata durante l'attività formativa. Infine per evidenziare i potenziali rischi per l'uomo è stato realizzato, nell'ambito del progetto di ricerca e con il contributo di tutte le unità operative coinvolte un opuscolo informativo dal titolo: "Virus enterici emergenti con potenziale rischio zoonosico in suidi e ruminanti selvatici: informazioni per il cacciatore".

BIBLIOGRAFIA

1. Green KY. Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al. (Eds.), Fields virology, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007; pp 949-979.
2. Martella V, Campolo M, Lorusso E, Cavicchio P, Camero M, Bellacicco AL, et al. Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). Emerg Infect Dis 2007;13:1071-3.
3. Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel, WHM, Purdy MA. International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. J Gen Virol 2014;95:2223-32.
4. Pavio N, Merbah T, Thébault A. Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. Emerg Infect Dis 2014;20:1925-27.
5. Adams MJ, King AM, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol 2013;158:2023-30.
6. Reuter G, Nemes C, Boros A, Kapusinszky B, Delwart E, Pankovics P. Porcine kobuvirus in wild boars (*Sus scrofa*). Arch Virol 2013;158:281-2.
7. Garbuglia AR, Alessandrini AI, Pavio N, Tessé S, Grignolo S, Viscoli C, Lapa D, Capobianchi MR. Male patient with acute hepatitis E in Genoa, Italy: figatelli (pork liver sausage) as probable source of the infection. Clin Microbiol Infect 2015;21:e4-6.
8. Oem JK, Lee MH, Lee KK, An DJ. Novel Kobuvirus species identified from black goat with diarrhea. Vet Microbiol 2014;172:563-7.
9. Di Martino B, Di Profio F, Melegari I, Robetto S, Di Felice E, Orusa R, Marsilio F. Molecular evidence of kobuviruses in free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*). Arch virol 2014;159:1803-6.
10. Smits SL, Raj VS, Oduber MD, Schapendonk CM, Bodewes R, Provacia L, Stittelaar KJ, Osterhaus AD, Haagmans BL. Metagenomic analysis of the ferret fecal viral flora. PLoS One 2013;8:e71595