

- se si tratta di strumento semplice/complesso
- se è richiesta la registrazione di manutenzioni e/o tarature (e che tipo di tarature, cioè di reparto e/o della Qualità)
- la matricola del termometro eventualmente associato (qualora lo strumento richieda una registrazione di temperatura)
- se lo strumento funziona o meno a temperatura costante (ed eventualmente quale)
- delta di errore associati al termometro utilizzato.

L'elenco delle apparecchiature di ciascun reparto, corredata da tutte le informazioni richieste ai fini della Qualità, può essere visualizzato e scaricato su file excel. Il file riporta la dotazione di apparecchiature del reparto alla data corrente e le altre informazioni richieste in conformità al punto 5.5 della ISO 17025.

Pianificazione delle attività di manutenzione/taratura

La compilazione del planner, ad opera del responsabile dello strumento o del suo sostituto, avviene attraverso un'apposita griglia su cui vengono riportati mesi e giorni e su cui l'operatore può indicare i giorni in cui si prevede di eseguire la manutenzione/taratura. Il planner evidenzia anche eventuali pianificazioni non eseguite o esecuzioni non pianificate. Date pregresse non sono modificabili. Anche la pianificazione delle tarature ad opera del Reparto Assicurazione Qualità (AQ) è registrata.

Registrazione delle Rilevazioni

Giornalmente, gli operatori abilitati, sono tenuti a registrare su APPA-RE le manutenzioni e tarature effettuate (anche quelle non pianificabili legate ad attività correttive e straordinarie) e le rilevazioni di temperatura.

Attività su Termometri

La pianificazione delle tarature sui termometri e la successiva registrazione dell'avvenuta taratura compete al reparto Qualità. Ogni taratura AQ di un termometro dovrà essere corredata dal certificato riportante parametri di taratura (temperature e delta) da allegare tramite applicativo; i certificati vengono salvati su DB e sono consultabili in qualsiasi momento dagli operatori abilitati.

Sistema di Allerte

Ogni notte un batch invia un email ai responsabili di strumento e/o agli operatori abilitati all'uso per notificare le tarature/manutenzioni da eseguire il giorno successivo.

Utilizzo dei Data Logger

APPA-RE si integra con il sistema dei Data Logger (sonde applicate ai frigo/congelatori) in grado di rilevarne la temperatura in modo pressoché "continuo". Tali temperature vengono scaricate in tempo reale su un db proprio, da cui APPA-RE, ogni notte, recupera un set significativo di valori che salva e collega all'apparecchiatura in modo da avere una visione completa direttamente sull'applicativo APPA-RE.

CONCLUSIONI

L'applicativo APPA-RE è in uso dal 2010 e se ne registra un utilizzo in progressivo aumento.

Accredia, durante le ultime visite annuali ha avuto modo di verificare che i dati e l'operatività del programma sono compatibili con quanto richiesto ai fini della Qualità.

Possibili sviluppi sono rappresentati dall'inserimento di una sezione di Reportistica (parzialmente già presente grazie alla possibilità di scaricare in excel tutti i risultati delle interrogazioni da form) e dall'estensione dell'uso dei Data Logger dai restanti reparti delle sezioni periferiche.

ASSOCIAZIONE TRA IL POLIMORFISMO 140T DEL GENE MHC DI CLASSE IIB E LA RESISTENZA ALLA LATTOCOCCOSI NELLA TROTA IRIDEA

ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISM 140T OF MHC CLASS IIB AND RESISTANCE TO LACTOCOCCOSIS IN RAINBOW TROUT

Colussi S., Prearo M., Maniaci M. G., Scanzio T., Peletto S., Bertuzzi S., Favaro L., Modesto P., Ru G., Desiato R., Acutis P. L.

Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, Torino

Key words: Lactococcosis, genetic resistance, rainbow trout

ABSTRACT

Genes within the major histocompatibility complex (MHC) are important for both innate and adaptive immunity in mammals; however, less is known regarding their contribution in teleost fish. We examined the involvement of *MHCII B* gene in resistance to *Lactococcus garvieae*, the causative agent of lactococcosis, after rainbow trout exposure to naturally contaminated water. The polymorphism 140t and the haplotype 25, including the same polymorphism, were found strongly associated with resistance to lactococcosis. This mutation and those present in haplotype 25 all code for phenylalanine, characterized by an aromatic side chain common in polyproline-binding sites and reported in staphylococci and streptococci surface proteins. This could explain the affinity between MHC class IIB mutated chain and *L. garvieae*. A study is ongoing to confirm the role of this mutation so to use it in the future for molecular marker-assisted selective breeding in rainbow trout.

INTRODUZIONE

La lattococcosi della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) è una streptococcosi di acqua calda, sostenuta da *Lactococcus garvieae*: essa determina l'insorgenza di una patologia a carattere iperacuto-acuto di notevole impatto economico per la trota colturalmente. Al momento le strategie di controllo disponibili si basano sull'utilizzo di vaccini stabulogeni e sul trattamento terapeutico. In entrambi i casi vi sono grossi limiti dovuti alla ridotta efficacia dei vaccini nelle forme giovanili il cui sistema immunitario non è ancora adeguatamente competente alla risposta e ad una funzionalità del vaccino ridotta nel tempo, non sufficiente a coprire l'intera durata della vita commerciale dei pesci. Il trattamento terapeutico, basato sull'utilizzo di eritromicina dispersa in acqua, determina d'altro canto una rilevante immissione di antibiotici nell'ambiente incrementando così l'insorgenza di ceppi antibiotico resistenti e determinando gravi problemi di management in allevamento e forti ripercussioni sulla salute animale e pubblica; *L. garvieae* è infatti caratterizzato da uno spettro d'ospite ampio che coinvolge anche bovini, suini, cani e gatti e soprattutto l'uomo in cui, in soggetti a rischio, può provocare miocarditi letali.

Da qui l'esigenza di sviluppare forme alternative di controllo della malattia, partendo da studi basati su diverse specie ittiche che hanno messo in luce il coinvolgimento dei polimorfismi del gene MHC di classe IIB, codificante per la catena beta delle molecole di classe II del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC), nella resistenza a patologie batteriche e virali (1, 2).

Nella trota è stata descritta la sequenza genica dei geni MHC, ma ad oggi non è stata riportata alcuna indagine relativa al possibile coinvolgimento di questo gene nella modulazione della resistenza alla lattococcosi. Il presente lavoro descrive in particolare modo l'associazione tra il polimorfismo 140t e l'aplotipo 25 e la resistenza genetica alla lattococcosi in una popolazione di trota iridea naturalmente esposta ad acque contaminate da *L. garvieae*.

MATERIALI E METODI

400 esemplari di trota iridea sono stati esposti nel mese di luglio ad acque naturalmente contaminate da *L. garvieae*. La temperatura dell'acqua ha oscillato tra i 19 e i 21°C, range ideale per lo sviluppo del batterio. Casi sono stati considerati i soggetti deceduti nel corso del periodo di esposizione naturale (luglio-ottobre), presentanti sintomatologia specifica, risultati positivi ad esame colturale per *L. garvieae* mediante prelievo dal rene (primo isolamento e isolamento su terreno selettivo e a seguito di caratterizzazione fenotipica e bio-molecolare del ceppo isolato. Controlli sono stati invece considerati i soggetti sopravvissuti all'infezione.

Per l'analisi genetica, da ciascun soggetto è stata prelevata la pinna adiposa sottoposta a congelamento -20°C: il DNA è stato estratto mediante il kit Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Mediante la PCR, utilizzando i primer B1RA e B1FA descritti da Miller (3), è stato amplificato un frammento dell'esone 2 di 257 paia di basi, codificante per il dominio b-1 della proteina (dal residuo aminoacidico 33 al 112). La reazione PCR è stata condotta su un volume pari a 25 µl utilizzando Platinum® qPCR Supermix-UDG (Invitrogen) a cui sono stati aggiunti 300 nM di ciascun primer descritto e circa 50 ng di DNA. È stato utilizzato il seguente profilo termico:

50°C per 2' e 95°C per 2' seguiti da 35 cicli 94°C per 30", 55°C per 1', 72°C per 1' ed estensione finale a 72°C di 7'.

Si è successivamente proceduto al sequenziamento mediante l'utilizzo degli stessi primer di PCR e la chimica BigDye 1.1 (Applied Biosystems) utilizzando il sequenziatore 3130 (Applied Biosystems).

L'allineamento delle sequenze è stato effettuato con il Software SeqMan (Lasergene). Per ciascun polimorfismo è stato calcolato l'equilibrio di Hardy-Weinberg; la definizione degli aplotipi è stata effettuata con il software PHASE v.2.1 (4). Il test del chi-quadrato di Pearson, è stato applicato sia ai singoli polimorfismi (alleli e genotipi), sia considerando gli aplotipi. Le associazioni risultate significative ($p < 0.05$) sono state ulteriormente indagate mediante analisi univariata basata sulla funzione di sopravvivenza di Kaplan-Meier e sul log-rank test per la significatività statistica. I polimorfismi risultati ancora significativi all'analisi univariata sono stati inseriti nel modello di regressione lineare di Cox. L'analisi di sopravvivenza è stata condotta mediante l'uso del software Stata 10.

La realizzazione di un modello per omologia della catena beta della molecola MHC di classe II della trota iridea è stata ottenuta attraverso il software SWISS-MODEL, utilizzando la struttura cristallina della catena beta umana (PDB id: 3lqz, B chain) come stampo. È stata poi effettuata una comparazione tra l'idrofobicità della proteina wild-type e della proteina mutata (aplotipo 25) utilizzando ProtScale (ExpASY Bioinformatics Resource Portal). Successivamente sono state analizzate le differenze alla struttura tridimensionale della proteina utilizzando il software DeepView-Swiss-Pdb Viewer (ExpASY Bioinformatics Resource Portal).

Risultati e Conclusioni

L'analisi della sequenza dell'esone 2 ha confermato l'estrema variabilità di questa regione in cui, infatti, sono stati riscontrati 37 siti polimorfici sui 257 analizzati.

Il calcolo del chi quadro ha però mostrato come soltanto tre dei polimorfismi, rispettanti l'assunto di Hardy-Weinberg, siano risultati associati alla lattococcosi: 140 c>t (47 S>F) e 253 a>t (85 I>F) a resistenza e 305 a>c (102 D>A) a suscettibilità. Per lo SNP 253 la significatività viene però persa considerando i genotipi.

I risultati del test chi-quadro sono stati confermati dall'analisi statistica dei dati di sopravvivenza. In particolare, per quanto riguarda il polimorfismo 140t, gli animali mutati presentavano un rischio inferiore rispetto agli individui wild-type (HR 0.24, 95% CI 0.11-0.54). Tale associazione si è mantenuta statisticamente significativa anche dopo aggiustamento per sesso e dopo valutazione dell'interazione tra sesso e genotipo.

I soggetti mutati portatori della mutazione 305c hanno invece presentato un rischio di morte di 2.16 superiore rispetto agli individui wild-type.

Inoltre, i due polimorfismi sono stati inseriti in un modello multivariato insieme alla variabile sesso: anche in questo caso i genotipi mutati hanno mantenuto la loro significatività statistica (HR 0.30, 95% CI 0.13-0.68 e HR 1.87, 95% CI 1.216-2.86 rispettivamente). Dei 37 aplotipi generati soltanto l'aplotipo 25, costituito da tre siti di mutazione 140t (47F), 143t (48F) e 145t (49F) (figura 1) è risultato significativamente associato alla resistenza alla malattia; in tal caso la significatività si mantiene anche effettuando l'analisi per genotipo (p = 0.00).

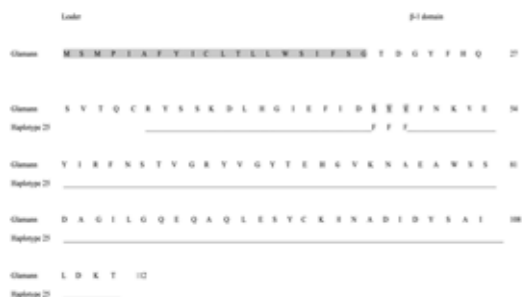
A livello proteico ciò causa la comparsa di un sito di poli-fenilalanina caratterizzato dalla presenza di questo amino acido ai residui 47, 48 e 49, a cui si aggiunge un quarto residuo di fenilalanina in posizione 50 codificato dalla sequenza wild-type.

Dal confronto fra i due profili di idrofobicità della catena beta, tra la struttura wild-type e quella mutata derivante dall'aplotipo 25, emerge un innalzamento dei picchi associati all'idrofobicità di ciascun residuo, in corrispondenza degli amino acidi mutati (Figura 2a e 2c). Inoltre, la rappresentazione grafica tridimensionale delle due proteine mette in evidenza un aumento dell'a-polarità nella forma mutata (Figura 2b e 2d). Ciò può comportare l'insorgenza di modifiche strutturali nella catena beta mutata poiché questi residui per le loro caratteristiche chimiche tendono ad essere presenti nelle parti della proteina meno esposte all'ambiente acquoso.

Una caratteristica estremamente interessante della fenilalanina è quella di legare siti di poli-prolina; infatti diverse proteine di superficie isolate in stafilococchi e streptococchi patogeni presentano una struttura caratterizzata da siti ricchi di prolina.

Questa ricerca è stata finanziata dal Ministero della Salute (IZSPLV 06/09 RC)

Figura 1: sequenza aminoacidica derivante dall'aplotipo 25



In particolare gli streptococchi di gruppo B a cui appartiene *Streptococcus agalactiae*, espongono sulla loro superficie una proteina, denominata b, con struttura caratteristica dei peptidi legati dalle molecole di classe II del sistema maggiore di istocompatibilità (5). *S. agalactiae*, *L. garvieae*, *Streptococcus parauberis* e *Streptococcus iniae* appartengono tutti alla famiglia delle *Streptococcaceae* e sono agenti associati all'insorgenza di patologie d'acqua calda nei pesci: ciò ci consente pertanto di ipotizzare che proteine con struttura analoga possano essere presenti anche sulla superficie di *L. garvieae*.

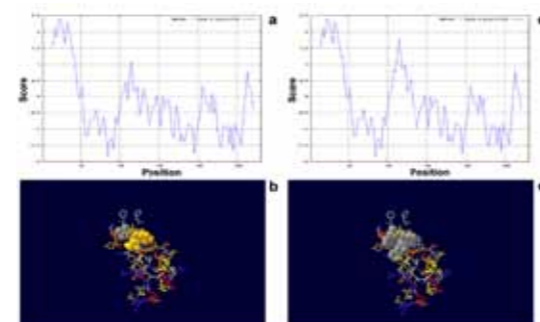
L'associazione con la mutazione 140t riscontrata sia come mutazione a singolo nucleotide sia come aplotipo induce a pensare che questa posizione da sola sia sufficiente a conferire resistenza alla lattococcosi, ma non consente di escludere che tale ruolo sia rafforzato dalle altre mutazioni coinvolte nell'aplotipo.

Ulteriori studi di approfondimento sono al momento in corso per verificare se questa mutazione possa rappresentare, in futuro, un marcatore d'elezione da applicare nella selezione genetica in tricoltura.

BIBLIOGRAFIA

- Langefors A., Lohm J., Grahn M., Andersen O. And Von Schantz T.**, 2001. Association between major histocompatibility complex class II alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon. *Proc R Soc Lond B*, 268, 479-485.
- Palti Y., Nichols K.N., Waller K.I., Parsons J.E., Thorgaard G.H.** 2001 Association between DNA polymorphisms tightly linked to MHC class II genes and IHN virus resistance in backcrosses of rainbow and cutthroat trout. *Aquaculture* 194, 283-289.
- Miller K.M., Withler R.E., and Beacham T.D.**, 1997. Molecular evolution at MHC genes in two populations of Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Molecular Ecology*, 6: 937-954.
- Stephens M, Smith N, and Donnelly P**, 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68: 978-989.
- Areschoug T., Linse S., Stålhammar-Carlén M., Heden L-O, Linahå G.** 2002. A proline-rich region with a highly periodic sequence in Streptococcal b protein adopts the polyproline II structure and is exposed on the bacterial surface. *Journal of Bacteriology* 184, 6376. DOI:10.1128/JB.184.22.6376-6393.2002.

Figura 2: profili idrofobici e struttura 3D della proteina wild-type e mutata raffrontata alla sequenza riportata da Glamann (1995)



MONITORAGGIO DEL VIRUS DELL'EPATITE A NEI PRODOTTI VEGETALI

Consoli M.¹, Galuppini E.¹, Ferrari M.¹, Malanga M.¹, Meletti F.¹, Pavoni E.¹, Petteni A.¹, Losio M.N.¹,

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Centro di Referenza Nazionale per i Rischi Emergenti in Sicurezza Alimentare

Key words: HAV, vegetali, nested-PCR

SUMMARY

Hepatitis A virus (HAV) is an RNA virus that cause enteric disease. It can provoke nausea, fever, headache and liver infection. It is possible to contract HAV by different foods, like mussels, vegetables, red fruits and water. From September 2009 to August 2013 it was conducted a monitoring work to research HAV in vegetables and to evaluate the risk associated to the consumption of this food category. At the laboratory of IZSLER of Brescia it was analyzed 1.484 samples using the molecular method of *hemined-PCR* and 24 of these were positive to HAV. Especially, plant broadleaf and red fruits were more involved. It will be interesting to understand the future trend of food contamination and to do more studies about the cause of the persistence of the virus in the different matrices.

INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite A (HAV) è un agente patogeno a trasmissione alimentare estremamente diffuso e di facile propagazione. Questo appartiene alla famiglia delle *Picornaviridae* ed è provvisto di un capsido icosaedrico di 27 nm di diametro. E' dotato di un genoma di 7.5 kb ad RNA a polarità positiva; all'estremità 5' è legata la proteina VPg, mentre in 3' è poliadenilato (Figura 1). Una sola Open-reading-Frame (ORF) codifica per le proteine virali: la regione P1 codifica per le proteine strutturali VP1, VP2 e VP3, mentre le regioni P2 e P3 codificano per le proteine non strutturali associate alla replicazione.

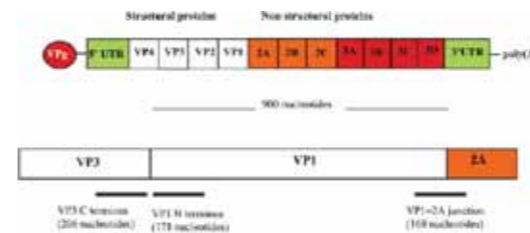


Figura 1: diagramma schematico del genoma di HAV

Il virus HAV è trasmesso tramite il circuito oro-fecale in condizioni di scarsa igiene o insufficiente sanitizzazione dell'acqua e degli alimenti. Una volta ingerito, penetra attraverso l'epitelio orofaringeo o intestinale nella circolazione sanguigna, per poi raggiungere il fegato ed attaccare gli epatociti, all'interno dei quali si replica. Viene così rilasciato per esocitosi nella bile e eliminato con le feci. Il virus ha un tempo di incubazione di 2-7 settimane e i sintomi si hanno dopo circa 15 giorni dall'infezione. I soggetti accusano ittero, febbre, anoressia, nausea, vomito, mal di testa e affaticamento; nei soggetti immunocompromessi e più a rischio possono verificarsi delle infezioni acute con epatiti anche fulminanti. A livello epidemiologico, negli ultimi anni si è registrato un incremento dei casi d'infezione da HAV, ma i dati a disposizione non possono fornire un quadro attendibile poiché le infezioni sono sottostimate, dato che possono verificarsi casi

asintomatici o non correttamente riconosciuti. Inoltre, nel primo semestre del 2013 si è assistito in Italia ad un incremento del 70% rispetto agli anni precedenti delle infezioni, soprattutto nei mesi di aprile-maggio nelle regioni del Nord ed in Puglia, tale da far concludere che vi fosse in atto un'epidemia da epatite A (1; 2). Il virus HAV è in grado di contaminare gli alimenti, dove resta in fase di quiescenza fino all'arrivo nell'ospite, per poi replicare. Gli alimenti maggiormente coinvolti nella trasmissione di HAV all'uomo sono i molluschi eduli lamellibranchi (cozze, vongole, ostriche), i vegetali (insalata, pomodori, frutti di bosco), così come ha un ruolo centrale l'acqua utilizzata per le coltivazioni o per le lavorazioni successive dei prodotti. Data l'importanza da un punto di vista sanitario di questo virus, sono stati effettuate delle indagini per valutare la presenza di HAV nelle diverse matrici alimentari, che potrebbero subire contaminazioni sia nelle fasi di produzione, di conservazione, sia di consumo. Scopo del seguente lavoro è stato quello di eseguire un'indagine di monitoraggio della presenza di HAV nei vegetali nel periodo 2009-2013, al fine di valutare il rischio associato al consumo.

MATERIALI E METODI

Nel periodo Gennaio 2010 - Agosto 2013, presso il laboratorio di Tecnologia degli Acidi Nucleici Applicata agli Alimenti dell'IZSLER di Brescia sono stati analizzati 1.484 campioni di vegetali. Tra i campioni presi in considerazione per l'anno 2013 sono stati considerati anche i vegetali analizzati nell'ambito del piano di emergenza per l'epidemia di epatite A. E' stato possibile suddividere i campioni in 4 categorie: 654 campioni di vegetali a foglia larga (insalata, rucola, scarola, lattuga), 107 campioni di verdure (pomodori, cipolle, carote), 588 campioni di frutti rossi (lamponi, mirtilli, ribes, fragole, more) e 135 campioni di altri vegetali (insalata mix, macedonia, kiwi, ananas, albicocche, funghi). Tutti i campioni presi in esame sono stati analizzati secondo un metodo accreditato presso l'IZSLER. I campioni presi in esame da giugno 2013 sono stati analizzati secondo un nuovo metodo accreditato in conformità alla ISO ISO_TS 15216-2 VirusFood (3). Di ciascun campione sono stati pesati 25g, che sono trattati con tampone TGBE e pectinase per staccare dalla loro superficie l'eventuale virus presente. In seguito, dopo aver portato il valore del pH a 9.5, una centrifugazione e una incubazione a 4°C per 60 minuti, il campione è stato sottoposto ad ulteriore centrifugazione e il pellet è stato risospeso in PBS e cloroformio/butanolo, in modo da ottenere un eluato. Da questo è stata effettuata l'estrazione dell'acido nucleico, svolta con il kit QIAamp Ultrasense Virus Kit (Qiagen). Una volta ottenuto l'RNA, è stata fatta una reazione di retro trascrizione, con l'uso di esameri random e l'enzima MuLV trascrittasi inversa, e il cDNA ottenuto è stato sottoposto ad una reazione di *nested-PCR*, facendo ricorso a tre diversi *primer* (AV 1 e AV2 per la reazione di prima PCR, AV2 e AV3 per la reazione di *nested-PCR*) che amplificano la regione conservata del genoma virale che codifica per il capsido, in modo da operare con sensibilità e specificità (Tabella 1).