

STRATEGIE DI CONTROLLO CONTRO LE MALATTIE INFETTIVE IN ACQUACOLTURA: DATI PRELIMINARI

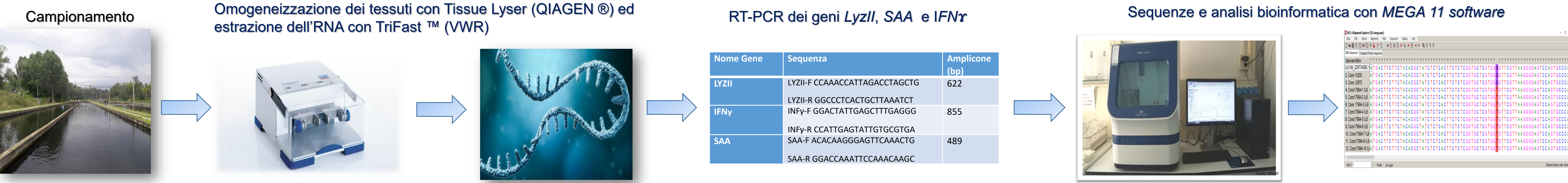
Torricelli M.¹, Fratto A.¹, Ciullo M.¹, Agnetti F.¹, Radicchi E. ¹, Scoccia E.¹, Manfrin A.², Biagetti M.¹

1. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Umbria e delle Marche “Togo Rosati”, Perugia (Italy)
2. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Centro di Referenza Nazionale per le malattie dei pesci, molluschi e crostacei – Padova Italy

INTRODUZIONE: Negli ultimi anni, la ricerca veterinaria si è concentrata sull'individuazione di metodologie per prevenire o contrastare le patologie con un approccio non chemioterapico che eviti l'uso esclusivo di farmaci. Tra queste, di grande interesse è la possibilità di sfruttare le risorse genetiche di resistenza/resilienza, potenziando le risorse immunogenetiche e biologiche che consentono il benessere animale e la qualità igienica dei prodotti alimentari. Secondo un rapporto della FAO del 2021, l'acquacoltura riveste un'importanza fondamentale per soddisfare una domanda alimentare in continua crescita. In acquacoltura, malattie infettive e parassitarie generano ingenti perdite economiche. Una delle possibili strategie per prevenire l'insorgenza di patologie è rappresentata dal miglioramento genetico per la resistenza alle malattie.

OBIETTIVI DEL PROGETTO: Questo progetto mira a studiare, in trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*) infette e non infette da *Yersinia ruckeri*, i polimorfismi genetici sui geni che codificano per le proteine della fase acuta dell'infezione e peptidi antimicrobici come il serum Amyloid A (SAA), Lisozima (LyzII) e geni che intervengono nella risposta adattativa (IFN γ). I genotipi dei singoli animali, ricavati dalla sequenza dei geni esaminati contenenti gli SNP, sono stati messi in associazione con lo stato di infezione dell'animale. Gli obiettivi a lungo termine consistono nella valorizzazione delle risorse immunogenetiche e biologiche degli animali e nell'adozione di approcci preventivi alternativi alla vaccinazione (ad esempio MAS, selezione assistita da marcatori). Queste strategie potrebbero portare a un miglioramento degli standard di benessere animale, come la qualità del cibo e l'impatto sull'ambiente.

MATERIALI E METODI: Sono stati utilizzate le milze di 30 animali sani e 30 animali infetti con *Yersinia Ruckeri*. Dopo omogeneizzazione degli organi, è stato estratto l'RNA totale mediante il reagente TriFast™ (VWR Life Science) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. La RT-PCR è stata eseguita mediante l'utilizzo di random primer e SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific®). Il cDNA prodotto è stato amplificato con i primer specifici dei tre geni studiati. I primer utilizzati sono stati disegnati in modo da coprire l'intero mRNA di ogni gene. I prodotti di PCR sono stati sequenziati con BrilliantDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (NimaGen® BV) mediante sequenziatore 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). Le sequenze sono state poi verificate e allineate con le sequenze di riferimento degli mRNA dei 3 geni candidati tramite ClustalW (software MEGA 11). Serum Amiloid A (SAA) mRNA AM422446.1, lisozima II mRNA (XM_029710445.1) e Interferon gamma mRNA (XM_029745206.1). Sui dati ottenuti è stato eseguito il test del chi-quadrato (X2).



RISULTATI: Sono stati rilevati 5 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nel gene del Lisozima (LyzII) e 4 polimorfismi nel gene dell' interferon gamma (IFN γ). Non sono stati rilevati SNP nel gene del SAA. Nelle Tabelle 1 e 2 sono riportate le frequenze alleliche degli SNP rilevati e le frequenze genotipiche, l'odds ratio (OR) e il valore p per entrambe i geni. I risultati mostrano che, per quanto riguarda il gene LYZII le associazioni risultate statisticamente significative (p<0,05) hanno evidenziato che i soggetti portatori del genotipo T/C per SNP 132, A/G per SNP 287 e A/C per SNP 302 presentano un rischio di infezione più elevato rispetto ai soggetti con genotipo selvaggio mentre per gli SNP 141 (A141T) e SNP 309 (C309T) non si evidenzia alcuna differenza significativa. Per quanto riguarda il gene dell' IFN γ le associazioni risultate significative hanno evidenziato che i soggetti portatori del genotipo T/C per SNP 234, A/G per SNP 238, T/C e C/C per SNP 285 e A/C per SNP403 presentano un rischio di infezione più elevato rispetto al genotipo selvaggio.

LYSOZYMA II		
SNP 132	Animali Sani (%)	Animali Infetti (%)
T	(58) 97	(50) 83
C	(2) 3	(10) 17
SNP 141	Animali Sani (%)	Animali Infetti (%)
A	(52) 87	(51) 85
T	(8) 13	(9) 15
SNP 287	Animali Sani (%)	Animali Infetti (%)
G	(59) 98	(53) 88
A	(1) 2	(7) 12
SNP 302	Animali Sani (%)	Animali Infetti (%)
C	(2) 3	(15) 25
A	(58) 97	(45) 75
SNP 309	Animali Sani (%)	Animali Infetti (%)
T	(0) 0	(9) 15
C	(60) 100	(51) 85
INTERFERON γ		
SNP 234	Animali Sani (%)	Animali Infetti (%)
C	(44) 73	(34) 28
T	(16) 27	(26) 22
SNP 238	Animali sani(%)	Animali infetti (%)
A	(60) 100	(51) 85
G	(0) 10	(9) 15
SNP 285	Animali Sani (%)	Animali infetti(%)
T	(27) 45	(60) 100
C	(33) 55	(0) 0
SNP 403	Animali Sani (%)	Animali Infetti (%)
C	(2) 3	(15) 25
A	(58) 97	(45) 75
SNP 309	Animali Sani(%)	Animali Infetti (%)
A	(60) 100	(51) 85
C	(0) 0	(9) 15

Tabella 1) Frequenze alleliche in percentuale degli SNP rilevati
(in parentesi il numero di alleli)

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI: Questi risultati preliminari sono cruciali per l'implementazione di programmi di Marker Assisted Selection (MAS) che includano la resistenza alla malattia all'interno dell'obiettivo per il controllo alternativo delle malattie nell'allevamento ittico. Sono in corso ulteriori analisi per aumentare il numero di campioni e di geni per definire meglio il profilo genetico degli animali in relazione allo stato di infezione.

BIBLIOGRAFIA

What Can Genetics Do for the Control of Infectious Diseases in Aquaculture?
Sciuto, S.; Colli, L.; Fabris, A.; Pastorino, P.; Stoppani, N.; Esposito, G.; Prearo, M.; Esposito, G.; Ajmone-Marsan, P.; Acutis, P.L.; Colussi S.
Animals 2022, 12, 2176-2187; <https://doi.org/10.3390/ani12172176>

LYSOZYMA II				
	Animali Sani %	Animali Infetti %	OR (IC95%)	P value
SNP T132C				
T/T	(28) 93	(21) 70	1	
T/C	(2) 7	(8) 27	5.33 (1.02-27.76)	0.0323
C/C	(0) 0	(1) 3	-	-
SNP A141T				
A/A	(24) 80	(21) 70	1	
A/T	(4) 12	(8) 27	2.29 (0.60-8.69)	0.2182
T/T	(1) 8	(1) 3	0.57 (0.05-6.76)	0.6536
SNP A287G				
A/A	(29) 97	(22) 73	1	
A/G	(1) 3	(8) 27	10.55 (1.23-90.67)	0.0114
G/G	(0) 0	(0) 0	-	-
SNP A302C				
A/A	(28) 93	(18) 60	1	
A/C	(2) 7	(11) 37	8.56 (1.70-43.18)	0.0038
C/C	(0) 0	(1) 3	-	-
SNP T309C				
T/T	(30) 100	(21) 70	1	
T/C	(0) 0	(9) 30	-	-
C/C	(0) 0	(0) 0	-	-
INTERFERON γ				
SNP C234T				
C/C	(16) 53	(5) 17	1	
T/C	(12) 40	(24) 80	6.4 (1.66-27.07)	0.0018
T/T	(2) 7	(1) 3	1.6 (0.02-36.60)	0.7216
SNP A238G				
A/A	(30) 100	(21) 70	1	
A/G	(0) 0	(9) 30	-	0.0038
G/G	(0) 0	(0) 0	-	-
SNP T285C				
T/T	(6) 20	(30) 100	1	
T/C	(15) 50	(0) 0	-	<0.0001
C/C	(9) 30	(0) 0	-	<0.0001
SNP A403C				
A/A	(30) 100	(21) 70	1	
A/C	(0) 0	(9) 30	-	0.0038
C/C	(0) 0	(0) 0	-	-

Tabella 2) Frequenze genotipiche, l'odds ratio (OR) e il valore p
(in parentesi il numero di alleli)