

**PROGETTO DI RICERCA****“Farmacogenetica, salute e benessere animale: possibili effetti sulla qualità delle carni bovine venete e sulla sicurezza alimentare”.****Razionale ed obiettivi del progetto di ricerca**

Il settore del bovino da carne costituisce una realtà importante a livello comunitario, con oltre 42 milioni di capi macellati ogni anno. L'Italia è uno dei principali paesi produttori di carne bovina, ed il Veneto la prima regione produttrice su base nazionale (Anagrafe Zootecnica Nazionale, 2014; Faostat, 2012). Ciononostante, ad oggi non è ancora stata emanata una specifica normativa comunitaria relativa a protezione e benessere animale, eccezion fatta per una *Scientific Opinion* dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) del 2001, aggiornata nel 2012.

L'allevamento industriale intensivo rappresenta il principale sistema produttivo per il bovino da carne nella nostra regione. Diversi fattori possono influenzare il benessere e la salute degli animali; tra questi, tipo di stabulazione, spazio concesso ad ogni animale (Wechsler, 2011), adeguate misure di biosicurezza (Thomson e White, 2006) nonché l'atteggiamento dell'allevatore verso gli animali (Kielland *et al.*, 2010). La qualità dell'ambiente nell'allevamento intensivo è determinata dal microclima (i.e., aria, temperatura, ventilazione, umidità), dalla qualità dell'aria (presenza di microrganismi aerogeni, ammoniaca) e dalle caratteristiche delle superfici con cui gli animali vengono a contatto. I sistemi attualmente in uso per migliorare la qualità dell'ambiente sono la ventilazione (forzata o naturale), i ripari dalle situazioni meteorologiche avverse, schermi protettivi dai raggi solari diretti e sistemi per ridurre la temperatura elevata. In particolare, la diminuzione dell'umidità relativa e la ventilazione naturale possono ridurre la presenza di microrganismi aerogeni e, conseguentemente, l'incidenza di patologie respiratorie (Peli *et al.*, 2013).

Il “complesso della malattia respiratoria” o BRD (*Bovine Respiratory Disease*) rappresenta uno dei maggiori problemi nell'allevamento del vitellone, con un tasso di morbilità/mortalità rispettivamente pari a 30-40% e 4-10%. La BRD è una malattia polifattoriale; tra le principali concause si riconoscono diversi microrganismi patogeni (virus, batteri, micoplasmi), fattori di rischio ambientali e manageriali e fattori individuali (i.e., razza, sesso, età, stato di nutrizione). Inoltre, la BRD ha un significativo impatto sul benessere animale e, conseguentemente, economico (Holland *et al.*, 2010). L'approccio terapeutico è diversificato a seconda della percentuale di morbilità: mirato (morbilità <10%) o metafilattico. Quest'ultimo, secondo l'*European Centre for Disease Prevention and Control*, andrebbe minimizzato, poiché l'uso massivo dei antibiotici può favorire lo sviluppo di resistenze ai chemioterapici (ECDC, 2007). I farmaci di più comune impiego, se escludiamo i vaccini, sono gli antibiotici (e.g., i macrolidi *long-acting* di ultima generazione ed i fluorochinoloni). Questi antibiotici, nonché altri chemioterapici di comune impiego nell'allevamento intensivo del bovino da carne (i.e., tiamulina, moxidectina, monensin) sono metabolizzati dal citocromo P450 3A (CYP3A: Zweers-Zeilmaker *et al.*, 1999; Nebbia *et al.*, 2001; Carletti *et al.*, 2003). Il CYP3A è una sottofamiglia di enzimi

farmaco-metabolizzanti (o biotrasformativi) preposta al metabolismo di xenobiotici nonché importanti composti endogeni (steroidi, acidi biliari: Zanger e Schwab, 2013). Nel bovino, l'analisi filogenetica ha evidenziato tre isoforme di CYP3A, prevalentemente espresse nel fegato (CYP3A28, 3A38 e 3A48: Zancanella *et al.*, 2010).

Fattori individuali quali specie, sesso, età, razza, suscettibilità individuale (polimorfismi genetici), nonché condizioni fisio-patologiche diverse, possono modulare l'espressione e l'attività farmacologica degli enzimi biotrasformativi. Tra queste ultime annoveriamo la flogosi, le malattie infettive a diversa eziologia (inclusa anche la *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD: Lakdhar *et al.*, 2011), lo stress ossidativo nonché quello ambientale (Renton, 2001, 2005; Aitken *et al.*, 2006, Zordoy e El-Kadi, 2009; Konstandi *et al.*, 2014). Per quanto riguarda il CYP3A bovino, ad eccezione delle note differenze inter-specifiche (Ioannides, 2006; Fink-Gremmels, 2008), sono state osservate differenze attribuibili al sesso, l'età e la razza (Dupuy *et al.*, 1999; Sallovitz *et al.*, 2002; Dacasto *et al.*, 2005; Greger *et al.*, 2006; Giantin *et al.*, 2008; Ashwell *et al.*, 2011). Attualmente, non ci sono dati sulla presenza e gli effetti di eventuali polimorfismi genetici.

La gestione del farmaco veterinario nella filiera del bovino da carne costituisce un serio problema, non solo per il possibile utilizzo illecito di promotori della crescita, ma anche per il crescente riscontro di fenomeni di resistenza ai comuni chemioantibiotici (Bywater, 2004; Nebbia *et al.*, 2011; Oliver *et al.*, 2011). In questo specifico contesto, i summenzionati fattori individuali, nel loro insieme, possono alterare la biodisponibilità dei chemioterapici e/o di eventuali metaboliti. Le conseguenze di tale evenienza possono essere le seguenti:

- una diversa efficacia del chemioterapico, che può da ultimo esitare in possibili effetti collaterali od insorgenza di fenomeni di antibiotico resistenza;
- la presenza di una maggior quantità di residui nei prodotti di origine animale.

Conseguentemente, lo scopo del presente PdR è apportare nuove conoscenze sugli effetti di patologie respiratorie multifattoriali, di problemi di benessere, della variabilità genetica nella risposta ai chemioterapici (polimorfismi genetici del CYP3A), nonché delle loro eventuali interazioni, sulla qualità delle carni bovine prodotte nella Regione del Veneto e, indirettamente, sulla sicurezza del consumatore di carne bovina.

Il PdR si articola in sette distinti obiettivi intercorrenti, che vengono qui di seguito sommariamente descritti:

1. Indagine sulle patologie respiratorie multifattoriali (BRD) che interessano il bovino da carne in Veneto connesse al *management* (densità elevate, inadeguata ventilazione, creazione di gruppi di animali con diversa provenienza senza un periodo adeguato di quarantena, inadeguata/ritardata diagnosi e di conseguenza uso non corretto del farmaco veterinario);
2. Indagine relative al benessere animale (comportamento, pulizia, lesioni, stato di nutrizione, ecc.), associati ad inadeguata disponibilità di spazi ed inadeguata formulazione della dieta;
3. Sviluppo, validazione ed utilizzo di tecniche cromatografiche, associate o meno alla spettrometria di massa (HPLC e/o LC-MS/MS), per l'analisi di conferma di biomarcatori di stress/benessere (i.e., malondialdeide) su campioni di sangue vitellone;

4. Utilizzo di tecniche cromatografiche (HPLC e/o LC-MS/MS) per la determinazione dell'attività catalitica CYP3A-dipendente, tanto *in vitro* (*bioassays*) quanto, eventualmente, *ex vivo/in vivo*;
5. Individuazione di varianti alleliche (polimorfismi genetici) del CYP3A bovino e stima della loro rilevanza (potenziale alterata attività catalitica) in un sistema *in vitro* semplificato (*bioassay*);
6. Indagine su distribuzione e frequenza delle suddette varianti alleliche in due popolazioni, una di riferimento (vitelloni di razza Piemontese) ed una eterogenea;
7. Valutazione delle eventuali correlazioni tra i dati biomolecolari e quelli relativi a BRD e benessere animale.

Finanziamento richiesto e suo utilizzo

Il finanziamento richiesto è pari a 90.000 euro (€) e sarà destinato prevalentemente all'acquisto di materiale di consumo, per personale a contratto/consulenza/borse di studio, per servizi esterni, missioni, rimborso di spese di organizzazione di giornate formative/pubblicazione, secondo lo schema più oltre riportato (punto 1.6.). La composizione dei costi delle diverse UUOO potrà comunque essere rimodulata a seconda delle effettive necessità riscontrate in corso d'opera.

Durata del PdR

Diciotto (18) mesi.

Ripartizione dei costi globali del progetto di ricerca

Voce di spesa	Spesa (€)
materiale di consumo	47900,00
missioni	4000,00
servizi esterni	9000,00
personale a contratto/consulenza/ borsa di studio	17000,00
organizzazione giornate formative/spese pubblicazioni	2500,00
spese generali	9600,00
Costo complessivo del PdR	90000,00