

MODULISTICA DI PRESENTAZIONE

PROGETTI INTERNI IZS SARDEGNA 2015

**N. identificativo progetto: Interno IZS specialistico
“livello super” 2015**

Progetto presentato da:

**Struttura Complessa Sanità Animale
Laboratorio di Batteriologia Speciale**

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA SARDEGNA**

Area tematica: Sanità Animale

Titolo:

Mycobatteri, tubercolari e non, isolati da fauna selvatica e da allevamenti: Ricerca colturale, caratterizzazione e definizione del significato patogenetico.

Responsabile Scientifico: dr. Stefano Lollai

CURRICULUM VITAE ET STUDIORUM DI STEFANO A. LOLLAI RESPONSABILE SCIENTIFICO DEL PROGETTO E DELLA UO N. 1

Titoli di studio

Laurea magistrale in Scienze. Corso di Laurea in Sc. Biologiche, 110/110 con lode.

Specializzazione in Microbiologia e Virologia.

Attività professionale

Dal 04/1994 responsabile del Laboratorio di Batteriologia Speciale e Collezione ceppi batterici della sede centrale dell'IZS Sardegna.

Dal 12/1992 dipendente dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna.

Dal 1986 al 1992 Becton Dickinson, azienda multinazionale leader nella diagnostica di laboratorio, responsabile delle vendite nell'area di competenza

Corsi (indicativo)

2007 Corso per valutatori di Sistemi Qualità

1993 The London School of Economics and Political Science, London

Pubblicazioni (indicativo)

1. 2015. Maestrale C, Lollai S. et al. Genetic and pathological characteristics of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from meningoencephalitis in autochthonous goats and mouflons, Sardinia, Italy. *Veterinary Microbiology* 177 409–413
 2. Magistrali C.F., Lollai S. et al. Characterisation of *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from animals with yersiniosis during 1996–2013 indicates the presence of pathogenic and Far Eastern strains in Italy. *Vet Microbiol.* 2015 Oct 22;180(1-2):161-6
 3. 2014. Ilaria Duprè, Vittoria D'Ascenzo, Carla Longheu, Simone Dore, Sebastiana Tola, Stefano Lollai, Agnese Cannas. Virulence determinants of coagulase-negative staphylococci isolated from sheep milk. *Proceedings of the 3rd Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (EAVLD) – Pisa (I)*
 4. 2012. Jusy Perillo, Daniela Ceccarelli, Matteo Spagnoletti, Stefano Lollai, Piero Cappuccinelli, Mauro M. Colombo. Molecular characterization of enterotoxigenic and borderline oxacillin Resistant *Staphylococcus* strains from ovine milk. *Food Microbiology*, 2012, 32: 265-273
 5. 2012. Gabriella Masu, Sara Sechi, Raffaella Cocco, Valentina Chisu, Antonio Tanda, Stefano Lollai, Giovanna Masala. Validation of a serological test for the diagnosis of canine rickettsial disease Ticks and Tick-borne Diseases, 2012, 3(5-6); 322-6
 6. 2010. Marogna G, Rolesu S, Lollai S, Tola S. and Leori G. Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. 2010. *Small Ruminant Research*, 2010, 88: 119-125
 7. 2010. Onni T., Sanna G., Cubeddu G.P., Marogna G., Lollai S., Leori G. and Tola S. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and gap genes. *Vet Microbiol.*, 2010, 144(3-4); 347-52
2008. Stefano A. Lollai, Maria Ziccheddu, Corrado Di Mauro, Daniela Manunta, Anna Nudda, Guido Leori. Profile and evolution of antimicrobial resistance of ovine mastitis pathogens (1995–2004). *Small Ruminant Research*, 2008, 74, 249–254

Modulo 1 - Presentazione complessiva del progetto

Progetto presentato da: **ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA - LABORATORIO DI BATTERIOLOGIA SPECIALE E COLLEZIONE CEPPI BATTERICI – S. C. SANITA' ANIMALE**

N. identificativo progetto: **Interno IZS specialistico “livello super”**

Titolo del progetto:

Mycobatteri, tubercolari e non, isolati da fauna selvatica e da allevamenti: Ricerca culturale, caratterizzazione e definizione del significato patogenetico.

Durata del progetto (espressa in mesi): 12

1. Area tematica: Sanità animale

Linea di ricerca n. 1 -

2. Responsabile scientifico del progetto:

Cognome: Lollai Nome: Stefano A.

Qualifica: **Dirigente. Responsabile Laboratorio Batteriologia Speciale**

Telefono **0792892327** Fax **0792892324**

E-mail: stefano.lollai@izs-sardegna.it

4. Elenco delle Unità operative impegnate nel progetto:

a) n. identif. U.O.:1.....Responsabile U.O.: Stefano Lollai

b) n. identif. U.O.:2.....Responsabile U.O.: M. Lodovica Pacciarini

(*) Identificativi per IZS: **AM**=Abruzzo; **LT**=Lazio; **LE**=Lombardia; **ME**=Mezzogiorno; **PLV**=Piemonte; **PB**=Puglia; **SA**=Sardegna; **SI**=Sicilia; **UM**=Umbria; **VE**=Venezie

Esempio: IZS AM 01/07 RC

RC = Ricerca Corrente

ALLEGARE Curricula vitae et studiorum dei responsabili scientifici delle UU.OO. (max 1 pagina ciascuno). Periodo di riferimento: ultimi 5 anni con indicazione anche delle 10 pubblicazioni scientifiche ritenute più significative, con particolare riferimento a quelle dell'area scientifica sulla quale insiste il progetto.

Razionale del progetto

La Tuberculosis (TB) animale è presente in Sardegna sia in specie di allevamento (bovini, capre) sia nella fauna selvatica. Il *Mycobacterium bovis*, responsabile della TB animale, è stato infatti riscontrato in Sardegna nei cinghiali (Lollai et al. Caratterizzazione molecolare di Mycobatteri tubercolari isolati in Sardegna da varie specie animali di allevamento e selvatiche, 2008). *M. bovis* ha spettro d'ospite molto ampio, e causa tubercolosi oltre che negli animali di allevamento anche in numerose altre specie anche selvatiche tra cui i cinghiali. Per tal motivo, la tubercolosi bovina, oltre a determinare gravi problemi economici per le industrie agricole (Caffrey, 1994; de Kantor and Ritacco, 1994; Tweddle and Livingstone, 1994), può rappresentare un rischio zoonotico. Mentre l'infezione da *M. bovis* è la causa significativa di lesioni tubercolari, altri bacilli acido-alcòl resistenti (AFB), in particolare Micobatteri non-tubercollari (NTM), possono sia rappresentare considerevoli cause di infezione, coinfezione e malattia, oltreché interferire con gli attuali test diagnostici di tubercolosi bovina. Si tratta di microrganismi ubiquitari ambientali la cui patogenicità per l'uomo e gli animali va dalla innocua colonizzazione alla malattia.

Il progetto si prefigge la ricerca colturale di Mycobatteri da organi di cinghiale che perverranno in base al piano di prevenzione regionale 2014-2018, obb. 10 "Rafforzare le attività di prevenzione in sicurezza alimentare e sanità pubblica veterinaria ..." l'identificazione e la caratterizzare microbiologica. degli isolati. Per completezza il progetto prevede inoltre la caratterizzazione retrospettiva di tutti gli isolati da cinghiale presenti in Collezione al fine di definirne la reale portata patogenetica.

Descrizione complessiva del progetto

Formulare una sintesi (min. 3 - max. 7 pagine, Times New Roman 12) rappresentativa dell'attività di ricerca di tutte le unità operative impegnate.

Dovranno essere chiaramente esplicitati:

1. Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento (max 40 righe);
2. Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre (max.15 righe);
3. Metodologia (max 1 pag)
4. Descrizione dei criteri di trasferibilità e di diffusione dei prodotti e dei risultati da conseguire (max.1/2 pagina);
5. Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto (max 10 righe);
6. Descrizione e spiegazione dell'articolazione del programma in fasi fra le varie UU.OO. (max.3 pagine)
7. Output del programma (es. documenti; metodologie; corsi di formazione, attivazione di servizi, etc.) con indicazione dei tempi previsti per la presentazione (max 1/2 pagina)
8. Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati raggiunti (max.1/2 pagina).

1. Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento (max 40 righe);

M. bovis appartenente *M. tuberculosis complex* è l'agente responsabile della Tuberculosis bovina (bTB), una malattia infettiva dei bovini caratterizzata dalla formazione di lesioni granulomatose (tubercoli) prevalentemente a livello polmonare con coinvolgimento dei linfonodi drenanti. *M. bovis* ha uno spettro d'ospite molto ampio, infatti può causare tubercolosi oltre che nei bovini in numerose altre specie di mammiferi. Generalmente la maggior via di infezione tra i selvatici e dai selvatici agli animali domestici è quella aerogena (Corner,2006). E' quindi cruciale stabilire oltre alle già citate misure di controllo anche una osservazione attenta dei reservoir tra i selvatici (Corner, 2006). Mentre l'infezione da *M. bovis* è la causa significativa di lesioni tubercolari, è frequente il riscontro anche in Sardegna di altri Micobatteri non-tubercolari (NTM), il cui significato patogenetico al momento sfugge. Gli NTM sono rappresentati da specie saprofitiche ritenute di potenziale patogenicità. Sono microrganismi ubiquitari ambientali la cui patogenicità per l'uomo e gli animali va dalla innocua colonizzazione alla malattia.

Gli NTM inoltre possono interferire con gli attuali test diagnostici di tubercolosi bovina.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati e valutati per uso clinico, metodi rapidi alternativi per l'identificazione dei micobatteri come metodi di ibridazione con sonde a DNA, l'analisi degli acidi micolici, il sequenziamento del DNA, microarrays, e test basati sulla PCR. La fine identificazione dei Micobatteri circolanti nei cinghiali in Sardegna si rende a questo punto necessaria per stabilire la reale patogenicità degli isolati. Il progetto si propone la loro caratterizzazione molecolare tramite PCR, sequenziamento genico o altri test di biologia molecolare (RFLP).

2. Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre (max.15 righe)

(i) Esatta identificazione delle specie mycobatteriche circolanti nella fauna selvatica in Sardegna, loro caratterizzazione genetica; correlazioni e definizione del loro significato patogenetico.

3. Metodologia

Obiettivi generali, specifici e operativi che il progetto si propone di raggiungere.

I Micobatteri non tubercolari (NTM) sono rappresentati da specie saprofitiche e potenzialmente patogene, spesso indicate come bacilli MOTT (Mycobacteria Other Than Tuberculosis) o micobatteri "atipici". Come sottolinea Wayne (Wayne, L. G. 1985) sono microrganismi ubiquitari ambientali la cui patogenicità per l'uomo e gli animali va dalla innocua colonizzazione alla malattia. Pertanto, la determinazione del significato clinico di un NTM rilevato in un campione non è sempre facile e richiede che vengano soddisfatti specifici criteri (American Thoracic Society, 1997). Campioni della campagna veatoria 2015 verranno sottoposti ad esame culturale specifico per la ricerca di Mycobatteri. Gli isolati verranno caratterizzati tramite test PCR e ulteriormente caratterizzati tramite spoligotipo e VNTR analysis al fine di evidenziarne correlazioni con gli isolati rinvenuti da bovini per i quali sono già noti i pattern identificativi. Particolare attenzione verrà riservata ai Non Tuberculosis Mycobacteria (NTM) microrganismi che si sono mostrati di frequente riscontro nella fauna sarda selvatica e di allevamento. Gli isolati verranno caratterizzati per sequenziamento genico e con tenciche RFLP al fine di evidenziarne l'esatta specie microbica ed eventualmente le somiglianze con gli omologhi isolati in passato sia nella fauna selvatica e che di allevamento. Ciò permetterà di tracciare un quadro della loro correlazione epidemiologica. Il progetto evolverà secondo le seguenti fasi.

Isolamento culturale. organi di cinghiale nell'ambito del piano di prevenzione regionale 2014-2018 verranno analizzati con metodo culturale.

Identificazione. Gli isolati verranno identificati con metodi molecolari tramite PCR utilizzando un set di 4 coppie di primer (Wilton S. and D. Cousins 1992; Kulski et al., 1995) che permetteranno di confermare l'appartenenza al genere Mycobacterium (target 16S rRNA), di assegnare il ceppo al gruppo Mtb complex (target gene proteina MPB70) oppure di rilevare e identificare il *M. avium* complex tramite un target specifico 16S rRNA o infine identificare il *M. intracellulare* attraverso l'amplificazione di uno specifico target 16S rRNA.

PRA-RFLP: gli isolati verranno caratterizzati tramite PRA-RFLP, metodo basato sull'amplificazione di 441-bp del gene della heat shock protein di 65-kDa, seguito dall'analisi di restrizione enzimatica dei prodotti di PCR con enzimi BstEII e HaeIII. Dopo elettroforesi i profili di restrizione ottenuti verranno valutati. Si potrà anche ricorrere a software open source (es. PRASITE, <http://app.chuv.ch/prasite>).

16S-rDNA sequencing: L'ulteriore caratterizzazione verrà effettuata con sequenziamento di segmenti del gene della subunità ribosomale 16S. Gli isolati che presenteranno dubbi profili PRA saranno sottoposti all'analisi di sequenza del 16S rDNA locus (Han XY et al., 2002). Il DNA degli isolati da analizzare sarà amplificato utilizzando coppie primers universali per il 16S rDNA (Di Cello F. et al., 1997): P0 (27f), P3b (765r) e P2 (704f), P6 (1495r). I prodotti di amplificazione ottenuti verranno sottoposti a sequenziamento utilizzando la chimica Big-Dye Ver 3.1 (Applied Biosystems) sul modello di sequenziatore capillare automatizzato Applied Biosystems 3500. Le sequenze ottenute, elaborate ed allineate e verranno utilizzate nelle ricerche BLAST del database NCBI oppure, in alternativa, potrà essere utilizzato il sistema MicroSeq-500 (Applied Biosystems).

B) Studio retrospettivo. I ceppi NTM presenti in collezione crioconservati, verranno incluse nello studioe caratterizzate come indicato ei punti precedenti.

Tipizzazione molecolare di Micobatteri tubercolari (MTC): tutti gli isolati appartenenti al complesso dei Micobatteri tubercolari, eventualmente riscontrati, verranno sottoposti a tipizzazione molecolare utilizzando le tecniche spoligotyping e MIRU-VNTR, allo scopo di valutare la distribuzione dei ceppi e tipi molecolari maggiormente diffusi nell'isola nella fauna selvatica, precisare e aggiornare il quadro di diffusione già evidenziato in precedenti progetti.

Bibliografia essenziale

Indicata nel testo

4. Descrizione dei criteri di trasferibilità e di diffusione dei prodotti e dei risultati da conseguire (max.1/2 pagina);

Comunicazioni a congressi/pubblicazioni scientifiche, pubblicazione nel sito internet dell'Ente

5. Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto (max 10 righe);

NA

6. Descrizione e spiegazione dell'articolazione del programma in fasi fra le varie UU.OO. (max. 3 pagine)

WP1

Aggiornamento dei metodi esistenti

Durata: 2 mesi

Unità operative coinvolte: UO1; contributo UO2

WP2

Esecuzione dei test/ elaborazione dei dati

Durata: 12 mesi

Unità operative coinvolte: UO1; contributo UO2

7. Output del programma (es. documenti; metodologie; corsi di formazione, attivazione di servizi, etc.) con indicazione dei tempi previsti per la presentazione (max 1/2 pagina)

I risultati del progetto verranno resi disponibili tramite:

- Comunicazioni scientifiche e/o poster in occasione di convegni scientifici
- Pubblicazione sul sito internet dell'Ente

Le attività sopra ricordate saranno realizzate dopo la conclusione del progetto e preferibilmente entro i 12 mesi successivi

8. Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati

Obiettivi:

Indicatori:

stabilire il profilo degli isolati

stabilire (possibili) correlazioni microbiologico/epidemiologiche tra i profili

Modulo 1bis - Progetto dell'Unità Operativa di ricerca

(Si devono presentare tanti moduli 1 bis quante sono le unità operative coinvolte)

1. Unità Operativa

Titolo del progetto:

Mycobatteri, tubercolari e non, isolati da fauna selvatica e da allevamenti: Ricerca culturale, caratterizzazione e definizione del significato patogenetico.

Numero identificativo dell'Unità Operativa e tipo: **1 IMS**

(riportare il n. assegnato nel modulo 1 e indicare se U.O. IMS o EMS);

Ente di appartenenza dell'Unità Operativa: **Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna**

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa:

Cognome **Lollai** Nome: **Stefano A.**

Qualifica **Responsabile del Laboratorio Batteriologia Speciale / Sanità Animale / CReNMOC**

Telefono **+39 0792892327** Fax **+39 0792892324**

E-mail: stefano.lollai@izs-sardegna.it

Compiti della UO

- Stesura dettagliata dei metodi e protocolli diagnostici
- Analisi microbiologiche
- Caratterizzazione biomolecolare degli isolati
- Conclusioni
- Sequenziamenti (in collaborazione con il LAB 09TSE che assicura il servizio come Servizio di Dipartimento)

Numero identificativo dell'Unità Operativa e tipo: 2 **IMS**

(riportare il n. assegnato nel modulo 1 e indicare se U.O. IMS o EMS);

Ente di appartenenza dell'Unità Operativa: **Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna**

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa:

Cognome **Pacciarini** Nome: **M. Lodovica**

Qualifica **Responsabile del Centro di Referenza Nazionale per la Tuberculosis da M. bovis
- IZS Lombardia ed Emilia - Brescia**

Telefono **tel.: +39 0302290308** fax: **+39 0302290559**

E-mail: maria.pacciarini@izsler.it

Compiti della UO

- Supporto scientifico al progetto come da competenze istituzionali

Cronogramma del progetto (Max.1 pagina)

Fasi	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12	M 13	M 14	M 15	M 16	M 17	M 18	M 19	M 20	M 21	M 22	M 23	M 24
WP 1																								
WP 2																								
WP 3																								
WP 4																								
WP 5																								
WP 6																								

Tabella n. 1 – Risorse umane impegnate nel progetto per singola U.O.

N. identificativo progetto: Interno **IZS specialistico**

Titolo del progetto **Mycobatteri, tubercolari e non, isolati da fauna selvatica e da allevamenti: Ricerca colturale, caratterizzazione e definizione del significato patogenetico.**

Durata del progetto (espressa in mesi): 12 mesi

Unità Operativa n. 1 IMS

Ente di appartenenza della Unità Operativa: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

Responsabile scientifico dell'U.O.: Cognome **Lollai** Nome **Stefano**

NOME	Laboratorio/Sezione di	QUALIFICA	Rapporto di lavoro	MESI UOMO
Lollai Stefano	Laboratorio Batteriologia Speciale IZSSA - Sassari	Dirigente sanitario biologo	Dipendente	2
Capitta Paola	Laboratorio Batteriologia Speciale IZSSA - Sassari	Tecnico di laboratorio	Dipendente	1
D'Ascenzo Vittoria	Laboratorio Batteriologia Speciale IZSSA - Sassari	Tecnico di laboratorio	Dipendente	1
Personale a contratto	Laboratorio Batteriologia Speciale	N. 1 Biologo/a esperto nella materia "specialista "livello super"	Borsista	12
				TOTALE: 14

Firma del Responsabile scientifico dell'Unità
Operativa

Firma del Responsabile Scientifico del progetto
(per ciascuna U.O.)

Firma del Commissario Direttore Generale
dell'IZS capofila

(solo per U.O. proponente)

Tabella n. 2 - Spese complessive intero progetto

N. identificativo progetto: N. identificativo progetto: **IZS Interno specialistico 2015 "livello super"**

Titolo del progetto: Mycobatteri, tubercolari e non, isolati da fauna selvatica e da allevamenti: Ricerca colturale, caratterizzazione e definizione del significato patogenetico.

Durata del progetto (espressa in mesi): 12 mesi

Responsabile scientifico del progetto: Cognome **Lollai** Nome **Stefano**

UNITA' IMS

VOCI DI SPESA	UNITÀ 1	UNITÀ 2	UNITÀ 3	/	/	/	/	TOTALE
- attrezzature	0	//		//	//	//	//	//
- materiale di consumo	In assenza di fondi destinati il progetto si avvarrà di materiali acquisiti con fondi ordinari	//	//	//	//	//	//	//
- personale non dipendente	24955			//	//	//	//	24955
- missioni	//	//		//	//	//	//	//
- spese generali (max. 10%)	//	//		//	//	//	//	//
(1) TOTALE PARZIALE IMS	24955	0	//	//	//	/	/	24955

(1+2) TOT. GENERALE								24955
----------------------------	--	--	--	--	--	--	--	-------

Firma del Responsabile scientifico

Firma del Direttore Generale