

PROGETTI DI RICERCA DA FINANZIARE
CON RISORSE DEL FONDO SANITARIO NAZIONALE

Progetto presentato da: Sebastiana Tola

Area tematica: Sanità animale: sviluppo e validazione di vaccini ad uso veterinario, con particolare attenzione ai vaccini di nuova generazione

Titolo del progetto: Caratterizzazione degli antigeni immunogenici di ceppi *Staphylococcus aureus* isolati da mastite ovina da utilizzare per lo sviluppo di nuovi vaccini

Responsabile Scientifico: Sebastiana Tola

Titolo del progetto: *Caratterizzazione degli antigeni immunogenici di ceppi *Staphylococcus aureus* isolati da mastite ovina da utilizzare per lo sviluppo di nuovi vaccini*

Durata del progetto (espressa in mesi): 24

Area tematica: Sanità animale

Responsabile scientifico del progetto:

Cognome: Tola

Nome: Sebastiana

Qualifica: Dirigente sanitario

Telefono: 079 2892339

E-mail: sebastiana.tola@izs-sardegna.it

- **2015:** Cillara G., Manca M.G., Longheu C., **Tola S.**
*Discrimination between *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* using PCR-RFLP and PCR*
The Veterinary Journal 205:421-423
- **2014:** Sanna G., Lecca V., Foddai A., **Tola S.**
*Development of a specific immunomagnetic capture-PCR for rapid detection of viable *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples.*
Journal of Applied Microbiology 17:1585-1591
- **2013:** Corona L., Cillara G., **Tola S.**
*Proteomic approach for identification of immunogenic proteins of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.*
Veterinary Microbiology 167: 434-439
- **2013:** Corona L., Amores J., Onni T., De la Fe C., **Tola S.**
*Characterization of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* isolates by SDS-PAGE, Immunoblotting and PFGE.*
Small Ruminant Research 115:140-144
- **2013:** Tedde T., Piras G., Salza S., Rosa M.N., Sanna G., **Tola S.**, Culurgioni J., Piras C., Merella P., Garippa G., Virgilio S.
*Investigation into *Cryptosporidium* and *Giardia* in bivalve mollusks farmed in Sardinia region and destined for human consumption.*
Italian Journal of Food Safety 2: 91-93
- **2013:** De Carlo E., Martucciello A., De Donato I., Alfano D., Cerrone A., Guarino A., Cillara G., **Tola S.**
*Isolation of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* from diary buffalo (*Bubalus bubalis*)*
Buffalo Bulletin 32(2):1056-1058
- **2012:** Marogna G., Pilo C., Vidili A., **Tola S.**, Schianchi G., Leori S.G.
Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goats herds affected by recurrent infectious mastitis.
Small Ruminant Research 102:74-83
- **2012:** Onni T., Vidili A., Bandino E., Marogna G., Schianchi S., **Tola S.**
*Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from caprine milk samples by PCR-RFLP of *groEL* gene.*
Small Ruminant Research 104:185-190
- **2011:** Onni T., Sanna G., Larsen J., **Tola S.**
*Antimicrobial susceptibilities and population structure of *Staphylococcus epidermidis* associated with ovine mastitis.*
Veterinary Microbiology 148(1):45-50

- **2011:** Loria G.R., Puleio R., Agnello S., Chetta M. **Tola S.**, Nicholas R.J.
Infectious kerato-conjunctivitis (IKC) caused by *Mycoplasma conjunctivae*: a new risk for Italian sheep farming.
Large Animal Review: 17 (1): 13-17
- **2010:** Onni T; Sanna G; Cubeddu G P; Marogna G; Lollai S; Leori G; **Tola S**
Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and gap genes.
Veterinary Microbiology 144(3-4):347-52.
- **2010:** Capitta P., Zobba R., Masala G., Cocco R., **Tola S.**, Pinna-Parpaglia M.L.
Isolation and characterization of *Bartonella* strains in cats in Italy.
Transboundary and emerging diseases 57(3):201-4.
- **2010:** Marogna G, Rolesu S., Lollai S., **Tola S**, Leori G.
Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis.
Small ruminant research 88 (2-3):119-125.

Descrizione complessiva del progetto

In quest'ultimo decennio lo *Staphylococcus aureus* ha assunto una notevole e drammatica rilevanza sia in medicina umana che in medicina veterinaria. Per via della sua spiccata capacità di adattamento a differenti condizioni ambientali, rappresenta una delle cause primarie di infezione sia nell'uomo che in diverse specie animali. Negli ovini e nei caprini, lo *S. aureus* è responsabile prevalentemente di infezioni mammarie (IM). La mastite può svilupparsi in una forma acuta (mastite gangrenosa), che spesso porta a morte l'animale colpito.

Nei confronti della mastite stafilococcica, da oltre un ventennio, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna ha avuto particolare attenzione svolgendo attività di diagnostica, di ricerca e di profilassi mediante l'impiego di vaccini stabulogeni preparati nei propri laboratori.

La produzione di vaccini stabulogeni (brodocolture inattivate e adjuvate), è autorizzata dal Ministero della Salute, come previsto dal D.M. n°287 del 17 marzo 1994.

Attualmente, la Struttura Complessa Produzioni ha una collezione di centinaia di ceppi di *S. aureus* isolati da mastite ovina: di ogni ceppo si conosce l'anno d'isolamento, l'azienda di appartenenza del capo ovino e l'ubicazione geografica dell'azienda.

In uno studio precedente, finanziato dal Ministero della Salute, si è valutata l'antibiotico resistenza e la produzione di biofilm di tali isolati (IZS SA 06/09). La presente ricerca si pone l'obiettivo di analizzare gli antigeni che intervengono nella patogenesi delle mastiti ovine che, a differenza di quelle bovine, sono pochissimo studiate.

Molto brevemente, la patogenesi dell'infezione da *S. aureus* include 3 fasi: l'attacco, l'invasione o penetrazione e l'evasione dell'immunità dell'ospite. L'infezione da *S. aureus*, batterio presente nella superficie epiteliale, avviene solitamente quando sono infrante le difese dell'ospite.

Nel primo step dell'infezione e colonizzazione si ha l'adesione dello *S. aureus* alle cellule target dell'ospite o a proteine della matrice extracellulare. L'adesione avviene quando alcune molecole espresse dallo *S. aureus* (per es. la proteina che lega la fibronectina, il clumping factor, la proteina che lega il collagene, l'acido teicoico) si legano con proteine cellulari dell'ospite o della matrice extracellulare (Shinefield *et al.*, 2005).

Durante la moltiplicazione batterica, lo *S. aureus* produce un certo numero di tossine secrete [per es. le tossine emolitiche (α, β, γ e δ), le enterotossine, le leucocidine, la tossina da sindrome da shock tossico (TSST-1) ed enzimi (per es. proteasi, catalasi, coagulasi, nucleasi, lipasi e ialuronidasi) che possono indurre effetti diretti tossici o facilitare la penetrazione nel tessuto e determinare il richiamo delle cellule infiammatorie. I neutrofili sono le cellule fagocitiche primarie che intervengono nell'uccisione dello *S. aureus* nel sito dell'infezione (Paape *et al.*, 1981). La fagocitosi è facilitata dall'opsonizzazione con immunoglobuline e complemento; studi riguardanti le mastiti bovine hanno dimostrato che le IgG2 e le IgM sono le più importanti opsonine per la protezione nei confronti delle IM da *S. aureus* (Barrio *et al.*, 2003).

S. aureus produce vari fattori che permettono al batterio di evadere l'immunità dell'ospite, tra cui la proteina A, la capsula polisaccaridica extracellulare, la pseudocapsula e alcune esotossine (TSST-1). La proteina A distrugge l'opsonizzazione mediata da anticorpi e pertanto la fagocitosi di *S. aureus*, mediante la formazione di un legame con la porzione Fc piuttosto che con la Fab dell'IgG (Hermans *et al.*, 2004).

La capsula extracellulare polisaccaridica interferisce con la fagocitosi imponendo alle opsonine di legarsi alla parete batterica e impedendo, di conseguenza, l'attivazione del complemento (Peterson *et al.*, 1978). Watson e coll. (1992) hanno scoperto che alcuni ceppi di *S. aureus*, isolati da campioni di latte bovino, hanno la capacità di produrre una pseudo capsula con proprietà antifagocitiche.

Certe esotossine come la TSST-1 hanno la potenzialità di agire come superantigeni, senza essere processati in peptidi, stabilendo un legame diretto tra l'MHC di classe II e i recettori dei linfociti T, determinando una massiva proliferazione dei linfociti T e il rilascio di citochine proinfiammatorie (Shinefield *et al.*, 2005).

Negli anni, vari vaccini contro la mastite stafilococcica bovina sono stati formulati in modo da avere come bersaglio molti degli steps sopramenzionati, importanti nella patogenesi delle infezioni da *S. aureus*.

Per quanto riguarda i ceppi di *S. aureus* isolati da mastite ovina nel nostro territorio regionale, si hanno poche o niente informazioni sull'epidemiologia, sui fattori di virulenza prodotti (adesine, tossine e leucocidine) e sulla risposta anticorpale dell'animale all'infezione batterica.

Questo progetto di ricerca si pone l'obiettivo di valutare, nei ceppi utilizzati per le preparazioni vaccinali, la presenza dei geni codificanti per le adesine, per le principali enterotossine (SEs) e per le leucocidine. Contemporaneamente si effettuerà uno studio epidemiologico delle infezioni da *S. aureus* negli ovini mediante l'amplificazione della proteina A e della sequenza degli amplificati (*spa typing*). Queste conoscenze potranno essere utilizzate per meglio capire i *types* di *S. aureus* circolanti in Sardegna e confrontarli con quelli delle preparazioni vaccinali commerciali. Infatti, nel vaccino commerciale Ovax M.G.S. si utilizzano le alfa e beta emolisine stafilococciche inattivate ed adsorbite su idrossido di alluminio e un ceppo non meglio precisato di *S. aureus* inattivato con formalina.

Schematicamente gli **obiettivi** che si pone la ricerca sono:

1. Determinare la presenza, mediante PCR, dei geni codificanti per alcune MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) che si legano in maniera specifica a distinti componenti extracellulari dei tessuti dell'ospite. In particolare analizzeremo i geni per il *clumping factor A/B* (ClfA/B) che promuove il legame del fibrinogeno alla superficie batterica, per il *bbp* (bone binding protein), per il *cna* (collagen binding protein), per il *fnbA/b* (fibronectin A e B binding protein), per il *ebpS* (elastin binding protein), per l'*eno* (laminin binding protein), per il *fib* (fibrinogen binding protein) e per l'*sdr* (codificante per 3 proteine- SdrC, SdrD e SdrE-, con sequenze multiple di serina- aspartato ma con funzioni ancora non ben stabilite). L'analisi verrà applicata a circa 300 isolati di *S. aureus*.
2. Determinare la presenza, mediante PCR, dei geni codificanti per le enterotossine SEA, SEB, SEC, SED e SEE. L'analisi verrà applicata a circa 300 isolati di *S. aureus*.
3. Determinare la presenza, mediante PCR, dei geni codificanti le leucocidine che agiscono sui leucociti polimorfonucleati e sui macrofagi alterandone irreversibilmente la permeabilità della membrana. Si analizzeranno tutte le leucocidine conosciute: LukS-PV, LukF-PV, LukM, LukE, LukD e HlgA/B/C. L'analisi verrà applicata a circa 300 isolati di *S. aureus*.
4. Determinare la presenza, mediante PCR, dei geni codificanti per le esotossine (α , β , γ e δ) e per la TSST-1. Le α -tossine hanno effetto citotossico e citolitico su diversi tipi cellulari, la β -tossina agisce danneggiando la membrana grazie all'azione di una sfingomielinasi (la fosfolipasi C) mentre la γ -tossina agisce lisando le emazie di coniglio. Tutte le esotossine sono immunogeniche. L'analisi verrà applicata a circa 300 isolati di *S. aureus*.

5. Impiegare la tecnica dello *spa typing* per tipizzare tutti gli isolati ovini di *S. aureus* (amplificazione del gene della proteina A, sequenza degli amplificati ed analisi delle ripetizioni mediante il programma online del sito <http://www.spaserver.ridom.de/>). L'analisi verrà applicata a circa 300 isolati di *S. aureus*.
6. Associare l'isolamento clinico del batterio con il prelievo del sangue dall'animale malato, in modo da avere la correlazione ceppo-andamento anticorpale. I ceppi verranno messi in coltura e si analizzeranno gli antigeni riferiti alla brodocoltura *in toto*, al pellet cellulare e al surnatante ottenuto dopo centrifugazione della brodo coltura. Gli antigeni verranno analizzati in SDS-PAGE ed Immunoblotting con il sieri degli animali infetti naturalmente.

Bibliografia essenziale:

- Shinefield S. et al., 2005- *Prevention of Staphylococcus aureus infections: advances in vaccine development. Expert Review of vaccines* 4: 669-676.
- Paape MJ et al., 1981- *Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. Adv. Exp. Med. Biol.* 137: 555-578.
- Barrio MB et al. 2003. *Assessment of the opsonic activity of purified bovine IgA following intramammary immunization of cows with Staphylococcus aureus. J. Dairy Sci.* 86: 2884-2894.
- Hermans K et al., 2004. *Staphylococcus. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. Backwell Publishing, Ames, IA, USA* 43-55.

Tabella n. 1 (compilare solo per la voce “Borse di Studio”)

Titolo del progetto: **Caratterizzazione degli antigeni immunogenici di ceppi *Staphylococcus aureus* isolati da mastite ovina da utilizzare per lo sviluppo di nuovi vaccini**

Durata del progetto (espressa in mesi): **24**

Responsabile scientifico Cognome: **Tola** Nome: **Sebastiana**

VOCE DI SPESA	Importo	Descrizione
Borsa di studio		Biologo con esperienza sull' identificazione e caratterizzazione degli stafilococchi

Firma del Responsabile Scientifico del progetto