

MODULISTICA DI PRESENTAZIONE

PROGETTI DI RICERCA DA FINANZIARE
CON RISORSE DEL FONDO SANITARIO NAZIONALE

Progetto presentato da: S.C Sanità Animale, laboratorio 09SI

Area tematica: Promozione della salute pubblica veterinaria e della sicurezza degli alimenti

Titolo del progetto: “INDAGINE EPIDEMIOLOGICA SULLA PRESENZA DI SPIROCHETE DEL GENERE BORRELIA BURGDORFERI IN SENSU LATO E LEPTOSPIRA SPP IN ANIMALI SELVATICI”

Responsabile Scientifico: Dott.ssa M. Nicoletta Ponti

Titolo del progetto: “Indagine epidemiologica sulla presenza di spirochete del genere *Borrelia burgdorferi* in sensu lato e *Leptospira* spp in animali selvatici”

Durata del progetto (espressa in mesi): 24 mesi

Area tematica: Promozione della salute pubblica veterinaria e della sicurezza degli alimenti

Responsabile scientifico del progetto:

Cognome: Ponti

Nome: M. Nicoletta

Qualifica: Veterinario dirigente

Telefono 079/2892329

Fax 079/2892324

E-mail: nicoletta.ponti@izs-sardegna.it

ALLEGARE - Curriculum vitae del responsabile scientifico.

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.

La Dr.ssa Maria Nicoletta Ponti, nata a Sassari il 02/02/1957, ha conseguito la laurea in Medicina Veterinaria presso l'Università di Sassari in data 03/07/1982, riportando la votazione di 110/110 e lode.

Attività professionale. E' stata titolare di Borse di Studio presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna dal 1983 al 1986. E' dipendente di ruolo del suddetto Istituto dal 1987 come Assistente e dal 1995 a tutt'oggi come responsabile del laboratorio di Sieroimmunologia della S.C. Sanità Animale, ricoprendo per oltre un anno l'incarico di capo dipartimento della stessa.

Nell'ambito del servizio prestato presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, si è dedicata allo studio degli aspetti diagnostici ed epidemiologici in particolare di alcune patologie soggette a piani nazionali di eradicazione quali la Brucellosi, la Tubercolosi e la Leucosi bovina enzootica o a piani regionali quali il Piano di Eradicazione dell'Echinococcosi/Idatidosi. Sono oggetto di interesse anche alcune importanti patologie quali le Leptosirosi animali con riferimento anche agli aspetti zoonosici e le Lentivirosi dei piccoli ruminanti.

Aggiornamento. Nell'ambito della propria attività ha partecipato a numerosi stages di aggiornamento presso laboratori italiani (Università, ISS e IZS) ed esteri. Ha inoltre partecipato a numerosi Corsi di aggiornamento, giornate di studio, seminari e convegni sia in Italia che all'estero.

Attività di ricerca e di insegnamento. Nell'ambito della attività prestata presso l'IZS coordina e/o collabora a progetti di ricerca finalizzata e corrente ed è autrice (o co-autrice) di circa 90 lavori di ricerca e divulgazione scientifica, pubblicati su riviste scientifiche italiane e straniere e presentati in convegni a carattere nazionale/internazionale.

Pubblicazioni.

- 1) **Ponti Nicoletta**, Canu Mariella, Carboni G. Antonio, Noworol Malgorzata, Palmas Bruna, Picardeau Mathieu, Cocco Raffaella, Piredda Ivana Canine Leptospirosis: report of an outbreak Abstracts European Meeting of Leptospirosis 2012
- 2) Pintore Antonio, Palmas Bruna, Noworol Malgorzata, Canu Mariella, Fiori Edi, Picardeau Mathieu, Tola Antonio, Piredda Ivana, **Ponti M. Nicoletta** First record of leptospira isolation from wild boars of Sardinia Abstracts European Meeting of Leptospirosis 2012
- 3) **Ponti M. N.** Palmas B., Noworol M., Canu M., Picardeau M., Carboni G.A., Pedditzi A., Pintore P., Piredda I. L. interrogans Serovar Bratislava: primo isolamento in Sardegna da un feto bovino. Atti XV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. 2013
- 4) Piredda I., Palmas B., Noworol M., Canu M., Picardeau M., Falchi A., Pintore A., Denurra D., Ruiu A., **Ponti N.** Leptosirosi in animali selvatici provenienti da differenti habitat Sardi. Atti XV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. 2013
- 5) Tagliabue S., Figarolli B.M., D'Incau M., Foschi G., Gennero M.S., Giordani R., Natale A., Papa P., **Ponti N.**, Scaltrito D., Spadari L., Vesco G., Ruocco L. Serological surveillance of leptospirosis in Italy: two year period national data (2010/ 2011) Atti LXVII Convegno Nazionale S.I.S.Vet 2013
- 6) Piredda I., Palmas B., Noworol M., Falchi A., **Ponti M.N.** Human Leptospirosis in Sardinia from 2005 to 2014 Atti 3° EAVLD Congress 2014

- 7) **Ponti M.N.**, Palmas B., Noworol M., Falchi A., Pintore A., Ruiu A., Vannini A. Boniotti M.B., Piras A., Picardeau M., Piredda I. A Leptospirosis overview on wild fauna in Sardinia, Italy Atti second ELS meeting on leptospirosis and other rodent borne haemorrhagic fevers 2015, pag. 46
- 8) Piredda I., Palmas B., Noworol M., Falchi A., Campus M., **Ponti M.N.** Human Leptospirosis in Sardinia from 2005 to 2014 Atti second ELS meeting on leptospirosis and other rodent borne haemorrhagic fevers 2015, pag. 17
- 9) Piras A., Piredda I. , Palmas B. , Noworol M. , Falchi A. , **Ponti M.N.** Leptospirosis in sardinian stray dogs Atti second ELS meeting on leptospirosis and other rodent borne haemorrhagic fevers 2015, pag. 83
- 10) **Ponti M.N.**, Palmas B., Noworol M. Falchi A., Pintore A.1, Piredda I. Leptospirosis: a serological survey in small ruminants from Sardinia (Italy) Atti XXII International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants 2015, pag. 168

Descrizione complessiva del progetto

Formulare una sintesi del progetto

Dovranno essere chiaramente esplicitati:

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

Sintesi

Specie del genere *Leptospira* e *Borrelia burgdorferi* sensu lato, sono spirochete in grado di infettare diversi animali sia domestici che selvatici tra cui l'uomo. Sono batteri di forma allungata, con il corpo avvolto a spirale; la cellula è provvista di una parete cellulare che è simile a quella dei batteri gram- ma è tuttavia dotata di una notevole flessibilità. Le spirochete si dividono in due gruppi principali, rappresentati dalle famiglie delle Spirochetaceae e delle Leptospiraceae. Alla prima appartiene il genere *Borrelia* che racchiude specie patogene, il cui corpo è avvolto da spire molto lasse, irregolari e con un passo molto ampio. Normalmente parassiti di alcuni artropodi, possono occasionalmente essere trasmesse all'uomo causando affezioni febbrili acute quali febbri ricorrenti o affezioni subacute sistemiche con spiccata tendenza ad evolvere in forma cronica in assenza di adeguato trattamento antibiotico (Malattia di Lyme).

Le leptospire, le quali comprendono specie sia patogene che saprofiti, racchiudono una serie di agenti eziologici responsabili di affezioni animali ed umane che costituiscono principalmente la specie *L. interrogans*. La leptospirosi è una tipica zoonosi, ossia una affezione propria di vari animali, occasionalmente trasmissibile all'uomo. Si tratta di un'unica forma morbosa che può tuttavia presentarsi con diversa sintomatologia e gravità, a seconda della sensibilità del soggetto infetto, della virulenza dello stipite microbico, della carica microbica infettante. Le manifestazioni cliniche variano da una forma asintomatica, rilevabile con una eventuale sierconversione, a due sindromi clinicamente riconoscibili, una autolimitante ed una fulminante (Weil's disease) caratterizzata da insufficienza renale, epatica e respiratoria.

Nell'Europa centrale la borreliosi è una malattia che può colpire tra 70 e 990 persone per 100.000 abitanti (Lindgren E, Jaenson TGT 2006). Dal punto di vista epidemiologico, secondo i dati raccolti dal Ministero della Sanità, nel periodo 1992-1998 in Italia, si sarebbero verificati circa un migliaio di casi di borreliosi di Lyme. Le Regioni maggiormente interessate sono il Friuli Venezia Giulia, la Liguria, il Veneto, l'Emilia Romagna, il Trentino Alto Adige (Provincia autonoma di Trento), mentre nelle Regioni centro meridionali e nelle isole le segnalazioni sono sporadiche. In Sardegna, da oltre vent'anni l'IZS è impegnato nella diagnostica di spirochete svolgendo indagini sierologiche, batteriologiche e molecolari su campioni umani e animali nell'ambito della leptospirosi e applicando tecniche di immunofluorescenza indiretta (IFI) come metodo di indagine sierologico per la borreliosi in sieri animali.

Si vuole quindi attuare un programma di individuazione e sorveglianza di due agenti potenzialmente patogeni quali leptospire e borrelie, atto a tutelare la salute dell'uomo attraverso la salvaguardia del patrimonio zootecnico e dei vettori animali sia domestici che selvatici. In Europa i piccoli roditori vengono considerati il serbatoio principale delle spirochete e quindi la principale causa di diffusione di leptospirosi e borreliosi. Differenti specie di mammiferi ed uccelli fungono da serbatoi per le diverse specie oltre ai topi selvatici *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus flavicollis*, *Clethrionomys glareolus* e il riccio (*Erinaceus europaeus*). Cani, bovini e cavalli possono contrarre la borreliosi (oltre alla leptospirosi), ma non è chiaro se sviluppino una batteriemia sufficiente per infettare le zecche.

Nello specifico, la trasmissione di *Borrelia burgdorferi* al proprio ospite, avviene attraverso una puntura di una zecca infetta, e nell'Europa centrale la comune zecca è *Ixodes ricinus* che assume l'importanza maggiore. In media il 21% delle zecche adulte ed il 14% delle ninfe sono infette con *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Nella maggior parte dei casi viene riscontrata *Borrelia afzelii*, seguita dalla *Borrelia garinii* e, con un distacco più grande, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. La

tassonomia di questo microorganismo è basata sul genotipo. Mediante l'utilizzo di innumerevoli metodiche impiegate nella genetica dei batteri, quali analisi comparata dei profili di restrizione del genoma, ribotyping, PCR di sequenze altamente specie specifiche, etc., all'interno delle superspecie *Borrelia burgdorferi* sensu lato, sono state descritte almeno 9 genomospecie (Barbour A., 1996; Le Fleche A., 1997). Nell'ambito delle genospecie più note (*B.burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* e *B. afzelii*), sono inoltre stati identificati serotipi, sulla base della diversa distribuzione delle proteine immunodominanti di superficie *OspA*, *OspB* e *OspC* (Wilske B. et al.,1993). L'infezione da *Borrelia burgdorferi* è una zoonosi, il cui ciclo di trasmissione riguarda una serie di ospiti invertebrati che fungono da vettori, ed ospiti vertebrati, alcuni dei quali fungono da serbatoi dell'infezione ed altri i quali adempiono al ruolo di ospiti occasionali, quest'ultimi senza uno spiccato significato epidemiologico. La trasmissione della borrelia avviene quindi nell'ambito di queste tre categorie di ospiti ed è mediata principalmente dall'esistenza dei vettori, rappresentati da artropodi ematofagi, per lo più zecche del genere *Ixodes*, i quali acquisiscono il microorganismo e rispettivamente lo trasmettono, durante il loro pasto di sangue. In Europa il vettore per eccellenza di tutte le specie descritte di *B.burgdorferi* è *Ixodes ricinus* anche se altre specie, pur di minore importanza come *I. exagonus* (Gern et al. 1992), non possono essere escluse. Si tratta di una zecca dotata di bassa specificità come quasi tutti gli Ixodidi, in quanto riesce a parassitare facilmente numerosi mammiferi, sia selvatici (piccoli roditori) che domestici ed uccelli. Negli ecosistemi isolati e privi sia di roditori che di insettivori la popolazione infetta da *B. burgdorferi* può venire mantenuta da *Lepus europaeus* (lepre).

Le segnalazioni sulla presenza di *Ixodes* spp ed in particolare di *I. ricinus* in Sardegna sono rare (Satta G. et al – Journal of Medical Microbiology, 2011, 60, 63–68 e Foxi C. et al Ticks and Tick-borne Pathogens International Conference 2011). Da qui nasce l'esigenza di verificare se nel nostro territorio altre specie di zecche possano ospitare *Borrelia burgdorferi* sensu lato e valutare la presenza e l'eventuale consistenza di questi parassiti soprattutto nei piccoli mammiferi, roditori ed uccelli.

L'obiettivo che ci si pone in questa ricerca è quello di migliorare gli studi sulla leptospirosi introducendo una nuova tecnica basata sui VNTR multi locus (MLVA) la quale permette di determinare il genotipo *L. interrogans* direttamente sulle matrici biologiche ovviando, in parte, a quelli che sono i problemi legati all'isolamento del microorganismo in terreni di coltura selettivi. Per quanto riguarda la borreliosi, le sole analisi immunologiche sul sangue (ELISA o IFA per la ricerca di anticorpi anti-Borrelia) attualmente disponibili non sono sufficientemente sensibili né precise (Circolare n. 10 del 13 luglio 2000 del Ministero della Salute). Da qui l'esigenza di introdurre tecniche molecolari di diagnosi rapida basate su PCR qualitativa e Real-Time-PCR utilizzando appositi primers, da applicare a substrati biologici provenienti da artropodi e piccoli mammiferi, perlopiù selvatici.

Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre

- Definire la prevalenza delle infezioni sostenute da *Borrelia burgdorferi* e *Leptospira* spp in specie selvatiche della Sardegna.
- Mettere a punto e/o standardizzare metodi diagnostici diretti quali/quantitativi
- Ampliare le conoscenze di epidemiologia molecolare analizzando gli stiptipi circolanti nel nostro territorio

Metodologia

Il piano di sorveglianza che si vuole attuare si articola nelle seguenti fasi:

➤ Fase 1: raccolta materiale biologico

Selezione di siti appositi dove procedere alla raccolta di zecche rimosse direttamente dagli animali e/o sul campo. Per quest'ultima si procederà con il metodo della coperta strisciata (*dragging sample*) che consiste nel raccogliere le zecche allo stato libero trascinando lentamente un panno bianco (1m²) su una superficie di terreno di ca. 100m² (Sonenshine, 1993). Una volta in laboratorio le zecche verranno contate e classificate per genere, specie, sesso e stadio, mediante le opportune chiavi di riconoscimento (Khoury e Lezzerini, 1980; Manilla, 1998) e verrà estratto il DNA. Contemporaneamente si provvederà alla raccolta di campioni di cute, sangue e liquor, per la diagnosi di borreliosi e di rene e fegato per la diagnosi di leptospirosi, da animali selvatici in particolare roditori, martore, volpi, nutrie, ricci etc.

➤ Fase 2: messa a punto di protocolli biomolecolari

Tutte le matrici biomolecolari verranno sottoposte prima ad estrazione del DNA mediante apposito kit di estrazione (Qiagen). Nell'ambito della leptospirosi, si procederà con i consueti metodi diagnostici quali PCR qualitativa, per una prima ricerca generale di specie patogene e saprofiti mediante una copia di primers LigA/LigB i quali amplificano una parziale sequenza del gene 16S e Real-Time PCR per una ricerca mirata all'individuazione di specie spp. utilizzando i primers LipL32-45F e LipL32-286R. Si procederà poi con la messa a punto di un nuovo protocollo diagnostico basato sull'analisi VNTR multi locus (MLVA), la quale permette di determinare il genotipo *L. interrogans* direttamente sulle matrici biologiche quali sangue e urine risultate positive ai primi metodi di indagine applicati di routine, anticipando gli eventuali tempi di isolamento. È una tecnica basata sulla Reazione a Catena della Polimerasi, che utilizzando quattro copie di primers:

VNTR-4a (5'-AAGTAAAAGCGCTCCCAAGA-3')

VNTR-4b (5'-ATAAAGGAAGCTCGGCGTTT-3')

VNTR-7a (5'-TCATCTGCTCCGGAGATTTCG-3')

VNTR-7b (5'-TCCCTCCACAGGTTGTCTTG-3')

VNTR-10a (5'-TCCAAAATTCAGCCCTCAAG-3')

VNTR-10b (5'-GACGCTTGGCATTTGTATCC-3')

VNTR-19a (5'-CAGAAACAAGAGGGAAGATTC-3')

VNTR-19b (5'-ACTCTCATTTAAGAGTGGCTG-3')

produce degli ampliconi più o meno estesi, la cui lunghezza dipende dal numero delle sequenze ripetute in tandem contenute all'interno della sequenza target. Le formule usate per la determinazione degli ampliconi sono: VNTR-4 425 + 34n bp; per VNTR-7 166 + 46n bp; per VNTR-10 149 + 45n bp e per VNTR-19 139 + 47n bp. Quindi, due ripetizioni per il locus VNTR-4 (dimensioni amplicone 493 bp), una ripetizione per il locus VNTR-7 (dimensioni amplicone 212 bp), una ripetizione per il locus VNTR-10 (dimensioni amplicone 194 bp), e due ripetizioni per il locus VNTR-19 (dimensioni degli ampliconi 233 bp). Il DNA verrà amplificato utilizzando la HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germania) con un ciclo di denaturazione a 94°C per 10 min; 90 cicli di denaturazione a 94°C per 10 s, annealing a 56°C per 30 s, e allungamento a 72°C per 1 min; e un allungamento finale a 72°C per 10 min. I prodotti amplificati verranno analizzati su

gel di agarosio all'1,5% (Pailhoriès H et al. International Journal of Infectious Diseases Vol 37, 2015, 119–121).

Nell'ambito della borreliosi, verrà applicato il protocollo diagnostico riguardante l'IFI e dovranno esser messi a punto i protocolli di amplificazione quali, PCR qualitativa usando la copia di primers Fla1/Fla2 seguita da una PCR nested per l'individuazione della specie di borrelia in senso stricto, quali *B. garinii* (BG1/BG3), *B. afzelii* (BA1/BA2) e *B. burgdorferi* sensu stricto (BB1/BB2). Successivamente, la messa a punto di un protocollo più sensibile e rapido quale quello di una Real-Time PCR utilizzando gli stessi primers Fla1/Fla2.

➤ Fase 3: elaborazione comparata dei dati

I dati ottenuti dalle attività svolte nell'ambito del progetto di ricerca verranno raccolti, elaborati e comparati ai fini di poter elaborare la relazione finale.

Descrizione dei criteri di trasferibilità e di diffusione dei prodotti e dei risultati da conseguire

Il contributo fornito dalle diverse unità operative sarà utile per il miglioramento delle conoscenze epidemiologiche e patogenetiche della Borreliosi e Leptosirosi e dei fattori di rischio correlati alla diffusione e persistenza di queste infezioni.

Lo sviluppo e l'adozione di metodiche di laboratorio innovative, di rapida esecuzione e soprattutto dotate di maggiore sensibilità permetteranno di migliorare l'efficacia dell'iter diagnostico delle Leptosirosi e Borreliosi.

I risultati delle diverse attività saranno divulgati all'interno dell'Ente, pubblicati su riviste scientifiche e presentati nell'ambito di manifestazioni scientifiche nazionali ed internazionali, eventi formativi per il personale del SSN, per i professionisti operanti nel settore e per tutti gli stakeholders coinvolti.

Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto

Parteciperanno e collaboreranno alla realizzazione del progetto il laboratorio di Protozoologia per tutti gli aspetti riguardanti gli artropodi vettori, l'Osservatorio Fauna Selvatica per l'identificazione delle specie di micromammiferi selvatici, la S.C. di Oristano per il contributo alla raccolta e prelievo del materiale, il centro di Referenza Nazionale per le Leptosirosi dell'IZSLER e l'Istituto Pasteur, Unité de Biologie des Spirochètes, National Reference Center and WHO Collaborating Center for Leptospirosis di Parigi per la conferma della genotipizzazione degli isolati.

Cronoprogramma

	Mesi
<ul style="list-style-type: none">➤ raccolta campioni biologici➤ sviluppo di protocolli diagnostici MLVA per leptospira➤ sviluppo Real Time PCR borrelia➤ esecuzione test di Microagglutinazione su sieri animali raccolti➤ isolamento di leptospire su terreno colturale selettivo➤ esecuzione di PCR e real time PCR per leptospira sui campioni collezionati	01-16
<ul style="list-style-type: none">➤ analisi degli isolati e sequenziamento genomico	17-20
<ul style="list-style-type: none">➤ elaborazione dati➤ stesura relazione	21-24

Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati raggiunti

- Messa a punto del protocollo per la diagnosi VNTR multi locus (MLVA) per leptospira spp
- Messa a punto di Real Time PCR per borrelia spp con l'utilizzo dei primers Fla1/Fla2

Gli indicatori saranno rappresentati dalla formalizzazione dei nuovi metodi di prova, dalla messa a disposizione dell'utenza delle prove e l'utilizzo a regime delle stesse

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

Titolo del progetto: “Indagine epidemiologica sulla presenza di spirochete del genere Borrelia burgdorferi in sensu lato e Leptospira spp in animali selvatici”

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

Responsabile scientifico Cognome Ponti Nome M. Nicoletta

VOCE DI SPESA	Importo	Descrizione
Borsa di studio	€ 23.586/anno	Messa a punto metodiche biomolecolari (MLVA, PCR end point e Real time PCR)

Firma del Responsabile Scientifico del progetto

