



Ministero della Salute
Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari
Ufficio 2

RICERCA CORRENTE 2020

Istituti Zooprofilattici Sperimentali

Proposta di progetto di ricerca

1. Istituto	Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)
2. Codice della ricerca	
3. Titolo della ricerca (ACRONIMO e LOGO facoltativo)	Nuovi metodi diagnostici per la rilevazione genomica (sistema CRISPR-Cas) e antigenica (LFD multiplex) di virus aftosi in campo
4. Area tematica	Sanità Animale
5. Linea di ricerca	Sviluppo di tecnologie diagnostiche rapide, accurate e facili da usare da impiegare per il rilevamento diagnostico sul campo.
6. Responsabile scientifico e relativi recapiti (specificare la qualifica professionale: dirigente o Ricercatore Sanitario della Piramide)	Foglia Efrem Alessandro Ricercatore Sanitario della Piramide (in attesa di conferma) e.foglia@izsler.it 030 2290600

ABSTRACT

(Max 5.500 caratteri spazi inclusi, Times new Roman 12)

1. Razionale (inquadramento della tematica /conoscenze disponibili sull'argomento)

L'afta epizootica (FMD) è una delle più importanti malattie infettive degli animali, causata dal virus FMD (FMDV, famiglia Picornaviridae), classificato in sette sierotipi (O, A, C, Asia 1, SAT1, SAT2 e SAT3) in continua evoluzione con emergenza di nuove varianti. FMD è endemica in molte regioni del mondo, prevalentemente in paesi in via di sviluppo con risorse limitate per diagnosi e controllo. In anni recenti, per svariate applicazioni diagnostiche, sono stati sviluppati e valutati Test "Point of Care" (POC), che permettono di ottenere risultati affidabili e veloci direttamente in campo. La messa a punto di test POC per la diagnosi di FMD, innovativi e migliorati rispetto a quelli già sperimentati, fornirebbe uno strumento strategico per i tre pillar del programma EUFMD/FAO/OIE, consistenti nella prontezza degli stati indenni ad affrontare eventuali incursioni della malattia, nella riduzione del rischio negli stati vicini/confinanti l'UE e nel controllo globale.

2. Scopo del lavoro/ Pertinenza strategica della proposta/ Descrizione gap che il progetto intende colmare dal punto di vista scientifico

Il progetto si propone di generare e potenziare sistemi diagnostici POC per la rilevazione di FMDV:

- Rilevazione del genoma attraverso amplificazione isotermica dell'acido nucleico e rilevazione tramite tecnologia CRISPR-Cas. Questi sistemi innovativi combinano una elevata sensibilità con la potenzialità di portabilità in campo.
- Lateral Flow Device (LFD) multiplex per l'identificazione e contemporanea tipizzazione di virus aftosi attraverso il riconoscimento con specifici Anticorpi Monoclonali (AcM). Benché meno sensibili rispetto ai test di amplificazione genomica, i LFD rappresentano il sistema più semplice per la diagnosi in campo da lesioni vescicolari e possono essere facilmente inviati ai laboratori di referenza per ulteriori approfondimenti e caratterizzazione dei virus identificati.

3. Originalità della proposta/Innovazione prodotta

La tecnologia di rilevamento genomico tramite CRISPR-Cas è un metodo innovativo che ha recentemente dimostrato la sua efficacia in varie applicazioni diagnostiche, compresa la rilevazione di SARS-CoV-2. Il progetto comporta la prima sperimentazione della tecnologia nella diagnostica di Afta.

I LFD attualmente disponibili identificano FMDV senza riconoscerne il sierotipo, o riconoscono solo quattro sierotipi ma la validazione è limitata ad alcune varianti antigeniche. I LFD multiplex che si intendono sviluppare mutuano dal kit ELISA già prodotto dal Centro di Referenza Italiano la potenzialità degli AcM, opportunamente selezionati, di riconoscere tutte le varianti all'interno di ogni sierotipo, permettendo l'identificazione e contemporanea tipizzazione di 6 sierotipi aftosi in un device (strip) multiplex idoneo a livello globale. Il progetto si avvale della expertise maturata dall'Università di Torino, coinvolta come U.O: esterna, nello sviluppo di metodi LFD multiplex.

4. Metodologia applicata

- Progettazione di un complesso CRISPR-Cas specifico per una selezionata regione (3D) del genoma di FMDV; valutazione della tecnologia di rilevamento sia previa amplificazione isotermica che direttamente sul campione; messa a punto della rilevazione su strip per la trasformazione in test POC;
- Trasferimento delle combinazioni di AcM già validate ed utilizzate nel kit ELISA distribuito globalmente in un test pen-side basato su tecnologia Lateral Flow per il rilievo di antigeni aftosi; ottimizzazione delle condizioni di test; produzione di prototipi per la validazione in campo in paesi endemici.

5. Obiettivi

Sviluppare e/o potenziare dispositivi POC innovativi per la diagnosi di Afta attraverso rilevamento genomico e antigenico.

6. Risultati attesi/ Deliverables

Conoscenza e valutazione di nuove tecnologie e disponibilità di nuovi pen-side test strategici per la diagnosi di Afta:

- per rilevazione genomica pan-FMD ad elevata sensibilità basata su tecnologia CRISPR-Cas;
- per rilevazione di antigeni FMDV (LFD), caratterizzati da massima semplicità e capacità di sierotipizzazione, seppur con minor sensibilità.

7. Impatto atteso sugli stakeholders

Una pronta diagnosi associata alla capacità di identificare rapidamente i sierotipi coinvolti è un elemento chiave nei programmi di controllo di Afta e della sua diffusione.

8. Trasferibilità dei risultati/ Interdisciplinarietà/Disseminazione

La disponibilità di nuovi sistemi diagnostici per l'Afta, semplici, veloci e con portabilità in campo, ha implicita l'immediata trasferibilità dei risultati. Tali strumenti strategici trovano applicazione nei Paesi dove l'afta è endemica, generalmente privi di expertise, di laboratori adeguatamente attrezzati e logistica per il trasferimento dei campioni, ma anche nei Paesi FMD-free, come componente strategico dei rispettivi Piani di emergenza, contribuendo in generale ai programmi di preparedness e controllo della malattia. I risultati saranno presentati a congressi nazionali e internazionali e pubblicati su riviste scientifiche.

9. Congruità economica: inserire tabella con bozza ripartizione voci di spesa che nell'eventualità dell'approvazione potrà subire una rimodulazione entro il 25%;

VOCI DI SPESA	UNITA' 1	UNITA' 2 (EMS)	UNITA' 3	TOTALE
- attrezzature	0	0	0	0
- materiale di consumo	45.000 €	8.000 €		53.000
- personale non dipendente	42.500 €	0		42.500
- missioni	7.500 €	1.000 €		8.500
- spese generali (max. 10%)	2.500 €	500 €		3.000
(1) TOTALE PARZIALE IMS	97.500 €	9.500 €		107.000

10. Presenza Project manager (diverso dal PI)

Dr.ssa Santina Grazioli
Reparto virus Vescicolari e Produzioni Biotecnologiche

11. Eventuale coinvolgimento dei Centri di Referenza Nazionale competenti per materia

Proposta presentata da un Centro di Referenza, unico laboratorio nazionale autorizzato a manipolare virus aftosi.

12. Bibliografia di riferimento essenziale

- Dukes *et al.*, 2006. "Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of Foot-And-Mouth Disease Virus". Arch Virol;
- Grazioli *et al.*, 2020. "Development and validation of a simplified serotyping ELISA based on monoclonal antibodies for the diagnosis of foot-and-mouth disease virus serotypes O, A, C and Asia 1". Transbound Emerg Dis. Online ahead of print;
- Joung *et al.*, 2020. "Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics". medRxiv preprint;
- Ferris *et al.*, 2009. "Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples". J Virol Methods;

- Morioka *et al.*, 2015. “Development and Evaluation of a Rapid Antigen Detection and Serotyping Lateral Flow Antigen Detection System for Foot-and-Mouth Disease Virus”. PLoS One;
- Myhrvold *et al.*, 2018. “Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13”. Science.

13. Titolo e codice di Progetti di RC e RF degli ultimi 5 anni in cui il proponente è PI o responsabile di UO (inserire anche titolo abstract eventualmente presentato nelle due annualità precedenti di RC)

Il proponente è alla prima proposta in qualità di PI e/o responsabile di UO, dato che le precedenti posizioni di borsista presso IZSLER non permettevano candidature come Responsabile Scientifico.

14. Pubblicazioni del PI con fondi della RC e RF del Ministero della Salute degli ultimi 3 anni: indicare titolo, rivista e IF, codice e nome del progetto

- Cardeti *et al.*, 2016. “Encephalomyocarditis virus infection in *Macaca sylvanus* and *Hystrix cristata* from an Italian rescue centre for wild and exotic animals”. *Virology*; IF_2018 2.464. PRC2013_001 “Indagini biomolecolari, sierologiche ed epidemiologiche sul virus della encefalomiocardite (EMCV) e sul potenziale ruolo zoonosico in Italia”.
- Foglia *et al.*, presentato a Epizone 2017, manoscritto in preparazione “Prevalence and characterization of Encephalomyocarditis virus (EMCV) in Italy”. PRC2013_001 “Indagini biomolecolari, sierologiche ed epidemiologiche sul virus della encefalomiocardite (EMCV) e sul potenziale ruolo zoonosico in Italia”.
- Nthiwa *et al.*, 2020. “Seroprevalence of Foot-And-Mouth Disease Virus in Cattle Herds Raised in Maasai Mara Ecosystem in Kenya”. *Prev Vet Med*; IF_2019 2.32. PRC2015_014 “Miglioramenti degli strumenti di controllo per l’Afta Epizootica: adeguamento dei kit per il monitoraggio post vaccinazione e approfondimento delle conoscenze sui virus circolanti in Nord Africa”.

15. Graphical abstract (per quest'anno facoltativo)

