

PROGETTI DI RICERCA DA FINANZIARE
CON RISORSE DEL FONDO SANITARIO NAZIONALE

Progetto presentato da:

Laboratorio Malattie Esotiche

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE

DELLA SARDEGNA

Area tematica: Sanità animale

Titolo del progetto:

**Ricerca di miRNA prodotti in corso di infezione in vitro
con il virus della Peste Suina Africana**

Responsabile Scientifico: Dr. Annalisa Oggiano

Titolo del progetto: Ricerca di miRNA prodotti in corso di infezione in vitro con il virus della Peste Suina Africana

1. Durata del progetto (espressa in mesi): 24

2. Area tematica: Sanità animale

3. Responsabile scientifico del progetto:

Cognome: Oggiano. Nome Annalisa

Qualifica: Veterinario dirigente

Telefono 079/2892358 Fax 079/2892324

E-mail: annalisa.oggiano@izs-sardegna.it

Cognome: Dei Giudici. Nome Silvia

Qualifica: Biologo specialista

Telefono 079/2892355 Fax 079/2892324

E-mail: silvia.deigiudici@izs-sardegna.it

Curriculum del responsabile scientifico Dott.ssa Annalisa Oggiano U.O.1

- Laurea in Medicina Veterinaria conseguita il 12/11/1987 presso la Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari
- Abilitazione all'esercizio della professione conseguita nel 1987 presso la Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari
- Frequenza presso l' I. Z. S. della Sardegna in qualità di assistente volontario dal febbraio al luglio 1988, presso il Laboratorio di ispezione e microbiologia degli alimenti dell' IZS - Sardegna .
- Incarico Veterinario libero professionista nel 1988 presso U.S.L. n°2 di Olbia, per la campagna di profilassi vaccinale obbligatoria del bestiame.
- Vincitore di una borsa di studio presso l' I. Z. S. della Sardegna dal 15/07/1988 al 30/07/1990 presso il laboratorio di Virologia e Malattie Esotiche
- Assistente Veterinario di ruolo dal 01/08/1990 al 14/10/1996 presso l' I.Z.S. Sassari, laboratorio di virologia e malattie esotiche (vincitore di concorso).
- Dal 15/10/96 all'1/06/97 veterinario dirigente presso l' I.Z.S. Sassari, lab. Virologia e Malattie Esotiche
- Dall'01/06/97 a tutt'oggi ricopre l'incarico di responsabile del laboratorio di Malattie Esotiche

Descrizione attività svolta: studio, ricerca, diagnosi nel campo della ispezione e microbiologia degli alimenti di origine animale (nel 1998).

Dal Luglio del 1988 ad oggi: diagnostica routinaria delle principali malattie virali del suino, bovino, ovino, coniglio; determinazione degli anticorpi anti aftosi post vaccinazione in sieri bovini; studio, ricerca e diagnosi sulla peste suina africana: produzione di antigeni da utilizzare per la diagnosi sierologica di PSA in Elisa ed Immunoblotting; responsabile della diagnostica sierologica, virologica e biomolecolare relativa ai piani di eradicazione peste suina africana, peste suina classica, malattia vescicolare, malattia di aujeszky, blue tongue; standardizzazione di metodiche

PCR e RT PCR per la diagnosi virologica della peste suina africana (PSA), peste suina classica (PSC), malattia di Aujeszky, Blue Tongue (BT); genotipizzazione dei ceppi sardi di PSA; attività di coordinamento fra tutte le figure professionali presenti in laboratorio.

Lingua parlata e scritta: inglese, livello intermedio

Buona capacità di navigazione in Internet e di consultazione di banche dati;

Buona conoscenza dei principali programmi applicativi in uso presso il laboratorio e del pacchetto di Microsoft Office (Excel, Word, Power point, Outlook);

Ha partecipato in qualità di relatore e/o auditore a numerosi convegni, corsi di aggiornamento, congressi e riunioni inerenti le propria attività di lavoro o comunque correlati alle proprie funzioni.

In particolare:

Ha partecipato a numerosi convegni organizzati in occasione degli "Annual meeting of national African swine Fever Laboratories" organizzati dal centro di referenza comunitario.

Ha fatto parte del gruppo di lavoro sull'adeguamento del Piano Nazionale Malattia di Aujeszky partecipando alle riunioni tenutesi presso il Dipart. Alim. Nutr. San. Pubbl. Veter. Ministero della Sanità, Roma.

Ha fatto e fa parte delle unità di crisi locale costituite per la Blue tongue e per la Peste Suina Africana e Classica e partecipa alle riunioni delle unità di crisi regionale e nazionale. Partecipa alle riunioni delle unità di crisi regionale e nazionale indette per la Malattia vescicolare.

E' stato docente al:

- Corso formativo professionale per agenti tecnici IV livello professionale nel 1993
- Corso di formazione operatore per agente tecnico PSA-PSC nel 1998,
- Corso di formazione per fecondatori organizzato dall'ERSAT nel 2002
- Corso di formazione ECM per veterinari "Moderne tecniche di laboratorio per la diagnosi delle malattie infettive e per la ricerca di residui" organizzato dalla ASL n°8 di Cagliari nel 2005

E' in possesso del numero previsto di Crediti ECM (Educazione Continua in Medicina).

6 - Pubblicazioni scientifiche più significative del Coordinatore Scientifico

E' autore e coautore di 58 pubblicazioni inerenti la propria attività di lavoro in diverse riviste o atti di convegni nazionali ed internazionali dedicati al proprio settore di produzione.

1. Sanna G., Dei Giudici S., Bacciu D., Angioi P.P., Giammarioli M., De Mia G. M., Oggiano A. Improved strategy for molecular characterization of African swine fever viruses from Sardinia, based on analysis of p30, CD2V and I73R/I329L variable regions. **Inviato per la pubblicazione**
2. Balzano F., Deiana M., Dei Giudici S., Oggiano A., Baralla A., Pasella S., Mannu A., Pescatori M., Porcu B., Fanciulli G., Zinellu A., Carru C. and Deiana L. miRNA Stability in frozen plasma samples *Molecules* 2015, 20 (10), 19030-19040
3. Giammarioli M., Gallardo C., Oggiano A., Iscaro C., Nietto R., Pellegrini C., Dei Giudici S., Arias M., De Mia G.M. Genetic characterisation of African Swine Fever Virus from recent and historical outbreaks in Sardinia (1978-2009) *Virus Genes* 42: 377-387, 2011
4. Feliziani F., Rolesu S., Aloï D., Oggiano A., Carboni M.V., Zinellu S., Farina S., De Mia G.M., Patta C. Africa Swine Fever surveillance in wild boar population of Sardinia (2005-2010), 5° Annual Meeting Epizone "Science on alert" 11-14 aprile 2011 Arnhem, The Netherlands.
5. De Mia G.M., Rolesu S., Feliziani F., Oggiano A., Giammarioli M., Sanna M., Patta C. Epidemiological situation of African Swine Fever in Sardinia. Workshop on Laboratory Diagnosis of African Swine Fever (ASF and CSF) May 17-19 2011 Lipica, Slovenia.
6. Giammarioli M., Dei Giudici S., Oggiano A., Patta C., Iscaro C., Pellegrini C., De Mia G.M. Genetic characterization of ASFV isolates from Sardinia. In Report of Annual meeting of national African swine Fever Laboratories, CISA-INIA Madrid, giugno 2009.

7. Rolesu S., Aloï D., Oggiano A., Puggioni G., De Mia G.M., Rutili D. African swine fever in Italy. Updated epidemiological situation. Report Annual Meeting of National African Swine fever Laboratories, Hannover 7, May 2008.
8. De Mia G.M., Gallardo C., Martin E., Oggiano A., Pellegrini C., Arias M. Molecular Characterization of ASF strains causing outbreaks in Sardinia. Report Annual Meeting of National African Swine fever Laboratories, Hannover, 6 June 2007
9. Grünberger L., Dei Giudici S., Leori G.S., Oggiano A., Rolesu S., Carta T., Fiori A., Cuccuru C.L. Dinamica delle Interleuchine II- β E II-8 in latte di pecore di razza sarda in seguito a infezione sperimentale con stafilococco Aureus ed Epidermidis. Studio preliminare. Atti IX Congresso nazionale SIDILV, Roma 14-16/11/2007
10. De Mia G.M., Gallardo C., Martin E., Oggiano A., Pellegrini C., Dei Giudici S., Arias M., 2007. Caratterizzazione molecolare di stipiti virus della peste suina africana isolati in Sardegna nel corso della epizoozia 2004-2005. *Riassunti III Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria*, Abano Terme, 13-14 settembre 2007, p. 53
11. Aloï D., Rolesu S., Cossu P., Ladu A., Sanna M.L., Puggioni G., Cerchi S., Murtino A.P., Pintore A., Oggiano A. Epidemiosorveglianza della Peste Suina Africana nelle popolazioni suine selvatiche in Sardegna Atti del III Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria , Abano Terme, 13/14-09/07
12. Rolesu S., Aloï D., Ghironi A., Oggiano N., Oggiano A., Puggioni G., Patta C., Farina S., Montinaro S. GIS: a useful tool for a proper approach to African swine fever epidemiologic surveillance management in wild pig populations in Sardinia. Abstract book: 1th—OIE international conference “Use of GIS in Veterinary activities” Silvi Marina (TE) 8-11 october. 2006, pag.40
13. Aloï D., Rolesu S., Putzolu A., Scrugli A., Oggiano A., Chironi P., Dei Giudici S. , Patta C., Basciu G., Piroddi R. Use of GIS technology in epidemiological surveillance of African swine fever. Abstract book: 1th—OIE international conference “Use of GIS in Veterinary activities” Silvi Marina (TE) 8-11 october 2006, pag 26
14. Mannelli A., Sotgia S., Patta C., Oggiano A., Carboni A., Cossu P., Laddomada A. Temporal e spatial patterns of african swine fever in Sardinia. 1998.
15. Mannelli A., Sotgia S., Patta C., Carboni A., Cattina A., Cossu P., Firinu A., Madrau P., Oggiano A. African swine fever occurrence and sieropositivity in swine herds in Sardinia Atti dell' VIII Simposium International D'epidemiologie et D'economie Veterinarie 1997
16. Laddomada A., Caccia A., Patta C., Puggioni G., Oggiano A., Carboni A.Q., Cattina A. Utilizzo di metodiche diagnostiche innovative nell'ambito del piano di eradicazione della peste suina africana dalla Sardegna Atti della II Conferenza Nazionale su Stato dell'Arte delle Ricerche Italiane nel Settore delle Biotecnologie Applicate alle Scienze Veterinarie e Zootecniche. 1994, 97-104
17. Laddomada A., Patta C., Oggiano A., Caccia A., Ruiu A., Cossu P., Firinu A. Epidemiology of classical swine fever in Sardinia: a serological survey of wild boars and a comparison with african swine fever. *The Veterinary Record* 1994: 134, 183-187.
18. Caccia A., Laddomada A., Oggiano A., Patta C., Cherchi R. La polymerase chain reaction (PCR) applicata alla diagnosi della peste suina africana: ricerca del DNA virale in organi di suini domestici e cinghiali selvatici. Atti del XLVI Convegno Nazionale S.I.S.Vet. 1992: 46, 1179-1183.
19. Steiger Y., Caccia A., Laddomada A., Oggiano A., Ruiu A. Detection of african swine fever DNA in sardinian field samples by the polymerase chain reaction. Preliminary results. Report of the International Workshop on African Swine Fever. 1991,142.

Razionale del progetto

La Peste Suina Africana (PSA) è una patologia emorragica acuta altamente contagiosa dei suidi, attualmente presente solo in Sardegna, in Africa e nei paesi caucasici. È causata da un virus a DNA classificato come unico esemplare della famiglia Asfarviridae. I ceppi di Peste Suina Africana presentano una discreta variabilità delle caratteristiche biologiche e di patogenicità che va da forme altamente virulente a forme asintomatiche. A partire dai primi focolai la manifestazione clinica della malattia varia dalla forma iperacuta a forme acute, sub-acute e croniche. La durata della viremia è di 4-5 giorni, soprattutto nella forma acuta; il virus circola associato ai linfociti e ai globuli rossi e replica massivamente nelle cellule del sistema reticolo endoteliale (monociti e cellule endoteliali) causando una grave linfopenia associata ad immunodeficienza e danni indiretti ai trombociti e al sistema complemento. Gli animali che superano la malattia possono restare portatori. Infatti anche se il virus persiste nei tessuti a titoli bassi, in questi soggetti si può provocare viremia a seguito della somministrazione di corticosteroidi. Attualmente non esistono terapie o vaccini contro la Peste Suina Africana e l'unico metodo di controllo è costituito da misure sanitarie restrittive che vanno dal blocco delle movimentazioni e sequestro cautelativo con abbattimento dei soli soggetti sieropositivi fino allo stamping out dell'intero allevamento. In Sardegna la PSA è presente dal 1978 e persiste in forma endemica nonostante dal 1993 sia in atto un piano regionale di controllo ed eradicazione della malattia.

I miRNA sono piccoli RNA non codificanti, a singolo filamento, di lunghezza compresa tra i 21 e i 22 nucleotidi, che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale negli animali e nelle piante. Essi agiscono su specifici mRNA targets, legandosi alla regione 3'UTR, e determinando la loro degradazione o la repressione della traduzione. Numerosi processi vengono regolati dai miRNA, essi giocano un ruolo nella risposta immunitaria innata, nella differenziazione cellulare adattativa, nel metabolismo, nell'apoptosi, nella proliferazione cellulare, nel cancro e nel mantenere l'omeostasi durante lo stress. Anche alcuni virus sono in grado di produrre miRNA con la funzione di bloccare la biogenesi dell'ospite e controllare a proprio vantaggio l'espressione dei propri geni e di quelli dell'ospite. In tal modo regolano processi fondamentali quali l'immunità, l'apoptosi e, nel caso degli herpes virus, steps chiave del loro ciclo vitali quali la latenza e la transizione alla fase litica. Attualmente sono conosciuti solo pochi virus in grado di codificare miRNA, prevalentemente essi appartengono alla famiglia degli herpesvirus umani ed animali.

Niente si sa della capacità del virus della Peste Suina Africana di produrre miRNA e tantomeno dei miRNA eventualmente prodotti dalla cellula ospite in risposta ad esso.

Scopo di questa ricerca è cercare i miRNA prodotti in corso di infezione in vitro con il virus della Peste Suina Africana. Combinando studi computazionali e metodiche di deep sequencing sarà possibile dimostrare o escludere la produzione dei miRNA da parte del virus e della cellula ospite e migliorare la conoscenza sulla loro interazione. Ciò potrà gettare nuova luce sui meccanismi fondamentali attraverso cui il virus evade il sistema immunitario ma anche favorire lo sviluppo di vaccini e nuove terapie ad ampio spettro.

1. Malmquist W.A., 1963. Am J Vet Res 24, 450-9.
2. Sanchez-Vizcaino J.M., 2006. African swine fever. Diseases of Swine, 9th Ed. Blackwell Publishing. Chapter 13, 291-298.
3. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2012 Vol.2 Section 2.8. Chapter 2.8.1
4. Kinkaid R.K., Sullivan C.S. Virus-encoded microRNAs: an overview and a look to the future. 2012, Plos Pathogens, Volume 8, 1-11
5. Zhou and Rana. RNA based mechanism regulating host-virus interaction. Immun Rev. 2014, 1-14

Descrizione complessiva del progetto

1. Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento.

I microRNA (miRNA) sono piccoli oligonucleotidi di RNA non codificanti (ncRNAs), con lunghezza di circa ~22 nucleotidi che svolgono un ruolo importante nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica in una vasta gamma di organismi eucarioti unicellulari e multicellulari e con una varietà di meccanismi. Inizialmente, essi sono stati scoperti nel *Caenorhabditis elegans*, ma ora sono noti per essere molto diffusi in natura.

Finora, sono stati annotati 8.619 geni di miRNA da 87 organismi, l'*Homo sapiens* è in cima alla lista con 695 miRNA identificati finora.

Nel corso dell'evoluzione, i virus hanno sviluppato meccanismi altamente sofisticati per sfruttare il sistema biosintetico delle cellule ospiti ed eludere i meccanismi di difesa cellulari.

Recenti progressi della ricerca rivelano che la complessa interazione tra virus e cellule ospiti coinvolge anche le vie di silenziamento ad RNA mediate dai miRNA. Sono stati segnalati miRNA cellulari che modulano l'espressione di diversi geni virali, giocando così un ruolo fondamentale nella rete di interazione ospite-patogeno, e miRNA codificati da virus che li proteggono contro la risposta antivirale cellulare. Inoltre, i virus possono sfruttare i miRNA prodotti dalle cellule a proprio vantaggio. Thomas Tuschl e collaboratori hanno segnalato l'esistenza di miRNA virali per la prima volta nel virus di Epstein-Barr (EBV). Fino ad ora sono stati identificati 141 geni codificanti miRNA in 15 virus appartenenti a tre famiglie virali, herpesvirus, poliomavirus e retrovirus. La famiglia Herpesvirus con le tre sottofamiglie: α , β e γ -herpesvirinae esprime un gran numero di miRNA distinti. In particolare, i γ -herpesvirus codificano il numero maggiore di miRNA. Tra i virus codificanti miRNA ed appartenenti a questa famiglia ricordiamo l'Epstein-Barr Virus (EBV), il virus della pseudorabbia responsabile dell'Aujeszky's disease ed il virus associato al sarcoma di Kaposi(KSHV).

Inoltre, sono stati pubblicati report sulla identificazione di miRNA codificati da poliomavirus: il virus delle scimmie SV40, il citomegalovirus umano e murino (HCMV, MCMV), l'Herpes SimplexVirus-1e2(HSV-1e2).

Omoto et al. hanno riportato la presenza di miRNA in HIV-1, anche se vasti studi di Pfeffer et al. così come di Lin e Cullen non sono riusciti a confermare la loro esistenza. Recentemente, Ouellet et al. hanno identificato miRNA all'interno dell'elemento reattivo di trans-attivazione dell'HIV-1 (TAR).

Come altri grandi virus a DNA, il virus della Peste Suina Africana ASFV ha sviluppato un grande gamma di meccanismi di difesa per sfuggire dalle risposte immunitarie dell'ospite. La strategia principale utilizzato dal virus per eludere le difese dell'ospite è di modulare la via di segnalazione di macrofagi infetti al fine di interferire con l'espressione di alcuni geni, compresi quelli che giocano un ruolo nell'immunità innata e acquisita. I principali geni virali che svolgono un ruolo nel controllo sono A238L, A224L, A179L, EP153R, EP402R, B119L. La proteina secreta dal gene A238L agisce bloccando la sintesi delle citochine pro-infiammatorie, bloccando l'attivazione dei macrofagi e di conseguenza quella dei linfociti, riducendo l'espressione di cicloossigenasi-2 e la produzione di prostaglandina E2. Le proteine prodotte dai geni A224L, A179L ed EP153 possiedono attività anti apoptotica. La proteina codificata dal gene EP402R, riduce in vitro ed in vivo la proliferazione dei linfociti ed è responsabile della traslocazione delle proteine virali, regolando il traffico proteico all'interno delle cellule infette. Infine la delezione del gene 9GL (B119L), coinvolto nella morfogenesi di virus, riduce anche di 100 volte la replicazione del virus nei macrofagi e la virulenza nei suini.

Attualmente non sono riportati in bibliografia lavori riguardanti la produzione di miRNA da parte del virus della Peste Suina Africana o da parte della cellula ospite durante l'infezione. I meccanismi descritti sopra, attraverso i quali il virus elude il sistema immunitario, potrebbero anche essere mediati da miRNA virali o da quelli prodotti dalla cellula ospite, o come è più probabile essere una parte di una complessa interazione che passa anche attraverso la produzione dei miRNA.

Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre.

1. Studiare i cambiamenti dei miRNA durante la replicazione virale può aiutare a capire sia la regolazione molecolare delle difese dell'ospite che il tentativo da parte di virus di superarle durante l'infezione. Attraverso l'accoppiamento miRNA-mRNA durante l'interazione ospite-virus è possibile una vasta gamma di interazioni complesse: i virus cercano di utilizzare al meglio le strutture cellulari e di esprimere proteine virali, mentre le cellule ospite limitano l'invasione virale attivando le difese antivirali innate e adattative.

Questo progetto si prefigge di mettere in evidenza i miRNA prodotti durante l'infezione in vitro con il virus della PSA. Data l'assenza di informazioni attualmente disponibili si ritiene di poter scoprire o escludere la possibilità del virus di codificare miRNA ma sicuramente di evidenziare i miRNA cellulari prodotti durante l'infezione in vitro. Attraverso analisi computazionali e l'utilizzo di banche dati attualmente esistenti si ritiene di poter proporre alcuni geni target dei miRNA eventualmente rilevati. Scopo ultimo è quello di aggiungere informazioni sull'interazione virus-ospite, ma anche di gettare le basi per lo sviluppo di terapie antivirali efficaci, durevoli e non tossiche.

2. **Metodologia.** Il progetto verrà sviluppato mediante una prima fase consistente nello studio bibliografico per la scelta dei metodi di determinazione computazionale dei miRNA e di verifica della loro effettiva presenza in corso di infezione. Saranno selezionati i software e le banche dati in grado di prevedere la presenza di miRNA in un determinato genoma e i loro target mRNA. Saranno inoltre scelte delle aziende in grado di fornire in service un servizio di deep sequencing con analisi dei dati ottenuti. Saranno allestite colture di macrofagi suini secondo i protocolli in uso presso il nostro laboratorio. Le colture saranno infettate con un ceppo sardo di virus della Peste Suina Africana. Verrà evidenziata in citometria a flusso l'effettiva infezione del virus attraverso l'individuazione della proteina capsidica p72 nel citoplasma delle cellule infette. L'RNA sarà estratto ed una aliquota di un pool ottenuto verrà inviata per l'analisi di Deep sequencing. Una volta ottenuti i risultati con l'indicazione dei possibili miRNA, la loro presenza sarà verificata mediante Stem Loop RT-PCR e/o Northern blotting. Questa fase verrà preceduta dalla messa a punto di Stem Loop PCR specifiche per i miRNA da rilevare. Successivamente, sui singoli tempi di infezione, verrà effettuata una analisi in real time Stem Loop PCR per determinare in quale fase dell'infezione si realizza il picco di espressione. I miRNA così verificati saranno oggetto di analisi computazionale per determinare i loro possibili mRNA target.

3. **Descrizione dei criteri di trasferibilità e di diffusione dei prodotti e dei risultati da conseguire.** Il progetto si propone di migliorare le conoscenze sull'interazione virus-ospite mediata dai miRNA prodotti da entrambi. Ciò potrebbe portare all'individuazione di molecole target per lo sviluppo di terapie antivirali in grado di conferire resistenza all'infezione del virus.

4. **Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto.** Il progetto si prefigge di sostenere la massima diffusione e utilizzo di nuove tecnologie e servizi avanzati; innalzare il livello delle competenze e conoscenze scientifiche e tecniche del nostro Istituto. La collaborazione al presente progetto del laboratorio di Diagnostica Clinica - Stabulari dell'IZS consentirà l'impiego della citometria a flusso quale tecnica necessaria per lo studio della risposta immunitaria in vitro, contribuendo, in tal modo, ad un approccio sperimentale di tipo multidisciplinare. Il progetto è coerente con l'obiettivo strategico 5 del Piano Regionale Sanitario, che mira a valorizzare il settore sanitario degli ambiti della ricerca e dell'innovazione.

Descrizione e spiegazione dell'articolazione del programma in fasi

Il progetto si articolerà nelle seguenti fasi:

Fase 1 (durata 12 mesi)

Scelta dei metodi da utilizzare per la verifica della produzione dei miRNA da parte del virus o della cellula ospite. Studio della metodica Stem Loop PCR e real time PCR e messa a punto dei protocolli da utilizzare sui potenziali miRNA. Scelta dei geni housekeeping da utilizzare per la

determinazione quantitativa dei miRNA in real time PCR con metodica $\Delta\Delta Ct$. Scelta della azienda in grado di effettuare analisi in Deep Sequencing con relativa analisi dei dati. Scelta dei campioni di suino da utilizzare per l'infezione in vitro e dei ceppi da inoculare fra quelli appartenenti alla collezione dell'IZS della Sardegna, distribuiti negli anni dal 1978 ad oggi.

Quantificazione del virus tramite titolazione virale e determinazione delle MOI più adatte all'esperimento. Allestimento di colture di macrofagi suini secondo i protocolli in uso presso il laboratorio. Stesura dei protocolli operativi. Infezione di colture di macrofagi di suini con il ceppo di PSA scelto. Individuazione in citometria a flusso delle cellule infette mediante marcatura intracitoplasmatica della proteina capsidica virale p72. Estrazione dell'RNA, invio di un pool costituito da RNA estratto a tempi diversi alla ditta scelta per l'analisi in Deep Sequencing.

Fase 2 (durata 12 mesi)

Analisi dei dati ottenuti mediante il Deep Sequencing.

Verifica della presenza effettiva dei miRNA mediante Stem Loop RT-PCR e/o Northern blotting. Analisi dell'espressione relativa dei miRNA sui singoli tempi di infezione in real time Stem Loop PCR quantitativa con metodica $\Delta\Delta Ct$. Analisi computazionale per determinare i possibili mRNA target dei miRNA verificati.

Analisi dei dati ottenuti, stesura delle relazioni finali e delle eventuali pubblicazioni .

2. **Output del programma (es. documenti; metodologie; corsi di formazione, attivazione di servizi, etc.) con indicazione dei tempi previsti per la presentazione.** L'output del programma è rappresentato dalla messa a punto di un sistema basato sull'integrazione di analisi computazionale e deep sequencing per la rilevazione dei miRNA. Seguito da procedure di verifica della loro produzione in corso di infezione, con l'utilizzo di stem loop PCR e Real time PCR quantitativa con metodica $\Delta\Delta Ct$. Analisi computazionali verranno effettuate anche per l'individuazione dei possibili mRNA target. All'acquisizione di queste metodologie corrisponderà, durante le varie fasi ed a compimento del progetto, la stesura di protocolli operativi.

3. **Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati raggiunti.**

Verranno organizzate riunioni periodiche nelle quali si verificherà la coerenza dei lavori svolti in itinere in relazione agli obiettivi e, ovviamente, di affrontare specifici approfondimenti tematici; verranno stesi dei report intermedi con lo scopo di verificare lo stato di avanzamento della ricerca.

Alla fine del biennio di lavoro verranno analizzati i dati ottenuti, stesa la relazione finale e discussa la opportunità di presentare i risultati conseguiti alla comunità scientifica e istituzionale di riferimento; In tal caso verranno presentate comunicazioni a convegni nazionali ed internazionali e i lavori verranno pubblicati in riviste scientifiche nazionali ed internazionali. La pubblicità delle ricerche svolte, oltre che comprovare l'avvenuto svolgimento delle stesse, consente di raccogliere feedback utili per il loro ulteriore sviluppo e miglioramento.

Cronogramma del progetto (Max.1 pagina)

Fasi	Fase 1				Fase 2			
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
UO 1								

T = trimestre

Tabella n. 1

Titolo del progetto: Ricerca di miRNA prodotti in corso di infezione in vitro con il virus della Peste Suina Africana

Durata del progetto (espressa in mesi): 24
Responsabile scientifico Oggiano Annalisa

Voce di Spesa	Importo	Descrizione
Borsa di studio biologo		Biologo specialista in microbiologia, esperto in biologia molecolare, genotipizzazione, filogenesi e che abbia conoscenze approfondite sul virus della PSA

Firma del Responsabile Scientifico del progetto

