

PROGETTI DI RICERCA DA FINANZIARE
CON RISORSE DEL FONDO SANITARIO NAZIONALE

Progetto presentato da:

Laboratorio Microbiologia e Terreni Colturali
Struttura Complessa Igiene Alimenti
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna “G.Pegreffi”

Area tematica:

Biosicurezza e Biotecnologie veterinarie

Titolo del progetto:

Sviluppo della Piattaforma “CloudSC4I” per applicazioni di Next Generation Sequencing (NGS) nella ricerca biomedica e in ambito veterinario: studio pilota e applicazione di tecniche innovative di sequenziamento massivo per una indagine epidemiologico molecolare di virus enterici – *Norovirus*.

Responsabile Scientifico: Dott.ssa Margherita Pisanu

Titolo del progetto:

Sviluppo della Piattaforma “CloudSC4I” per applicazioni di Next Generation Sequencing (NGS) nella ricerca biomedica e in ambito veterinario: studio pilota e applicazione di tecniche innovative di sequenziamento massivo per una indagine epidemiologico molecolare di virus enterici – *Norovirus*

Durata del progetto (espressa in mesi): 24**Area tematica:** Biosicurezza e Biotecnologie veterinarie**Responsabile scientifico del progetto:****Cognome:** Pisanu**Nome:** Margherita**Qualifica:** Dirigente Biologo**Telefono:** +39 079 2892 333 **Fax** +39 079 2892 344**E-mail:** margherita.pisanu@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.

Curriculum vitae et studiorum Dott.ssa Margherita Pisanu

Laurea in Scienze Biologiche conseguita in data 14/11/84 presso l'Università degli Studi di Sassari ed abilitata alla professione di Biologo nella II sessione nell'anno 1985. A partire dal Maggio 1991 al Luglio 1992 riveste il ruolo di Assistente Biologo presso il Laboratorio di Chimica Bromatologica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna. Dall'Agosto del 1992 al Dicembre del 1997 è Assistente biologo presso il Laboratorio di Ispezione e Microbiologia degli Alimenti di origine animale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna. Dal Gennaio 1998 a tutt'oggi ricopre l'incarico di Responsabile del Laboratorio di Microbiologia e Terreni Colturali nel Dipartimento Igiene degli Alimenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna. Partecipa in qualità di discente e docente a corsi di formazione, di perfezionamento, di aggiornamento, convegni e giornate di studio su tematiche inerenti l'igiene e la microbiologia degli alimenti di origine animale, sulla produzione e controllo di qualità dei terreni di coltura in conformità al Sistema Qualità implementato nel laboratorio. E' componente del gruppo UNI di "Analisi microbiologica degli alimenti e bevande". Dal 1997 a tutt'oggi è responsabile scientifico e di Unità Operativa di Progetti di Ricerca Corrente e Finalizzata inerenti la Sicurezza alimentare approvati e finanziati dal Ministero della Salute.

Pubblicazioni inerenti al tema progettuale:

1. Meloni D., Mureddu A., **Pisanu M.**, Serra S., Piras A., Virgilio S., Mazzette R. (2008). "Efficacia della depurazione sulla sicurezza di mitili allevati nel golfo di Olbia". Atti XVIII Convegno Nazionale Ass. It. Veterinari Igienisti. Atti XVIII Convegno Nazionale Ass. It. Veterinari Igienisti. Sabaudia.
2. Bazzardi R., Fattaccio M.C., Canu A., Salza S., Marongiu E., **Pisanu M.** "Monitoraggio sulla presenza di Norovirus, virus dell'epatite A e contaminazione batterica in Molluschi Eduli Lamellibranchi nella Regione Sardegna" – XIII Congresso Nazionale Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria – 12/14 Ottobre 2011 Trani (BA).
3. **M. Pisanu**, R. Bazzardi, M.C. Fattaccio, A. Canu, E. Marongiu, E. Suffredini, L. Croci (2011). "Presence of Norovirus in imported shellfish in Sardinia Region" – 4TH Congress of European Microbiologists – Geneva, Switzerland, June 26-30.
4. Bazzardi R., Fattaccio M.C., Salza S., Canu A., Marongiu E., **Pisanu Margherita** "Studio preliminare sulla presenza di Norovirus, virus dell'Epatite A, Escherichia coli e loro potenziale stagionalità in molluschi bivalvi allevati e commercializzati nella Regione Sardegna, negli anni 2009-2010-2011" – XXII Convegno Nazionale A.I.V.I. 19-21 Settembre 2012 Torino.
5. **Pisanu M. et al.** 2012 Epifood: network Italiano per la sorveglianza epidemiologica dei microrganismi patogeni di interesse alimentare - 3° convegno nazionale sulla ricerca in sanità pubblica veterinaria - Ministero della Salute.
6. Fattaccio Maria Caterina, Bazzardi Riccardo, Marongiu Laura, Sara Salza, Canu Antonella, Uras Luisella, **Pisanu Margherita** (2014). Investigation on Norovirus and Hepatitis A virus presence in catering companies and in convenience-foods in Sardinia region. Abstract Book 24th National Congress of A.I.V.I. Food Safety – 10-12 September 2014.
7. Riccardo Bazzardi, Monica Molotzu, Maria Caterina Fattaccio, Igor Arras, Alfonsina Marras, Edoardo Marongiu, **Margherita Pisanu** (2014). Surveillance of Verocytotoxigenic Escherichia coli in Sardinia foodstuffs. Abstract Book 3rd EAVLD Congress Pisa (Italy) 12-15 Ottobre 2014.

8. M.N.Losio, E.Pavoni, S.Bilei, B.Bertasi, D.Bovec, F.Capuano, S.Farneti, G.Biasi, D.Comin, C.Cardamone, L.Decastelli, E.Delibato, P.DeSantis, S.DiPasquale, A.Gattuso, E.Goffredo, A.Fadda, **M.Pisanu**, D.DeMedici (2015) Microbiological survey of raw and ready-to-eat leafy green vegetables marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 210, 88–91
9. R. Bazzardi, M.C. Fattaccio, L. Mara, M. Bulla, L. Uras, E. Marongiu, **M. Pisanu** (2015). Prevalenza di Norovirus genogruppo I e II in molluschi bivalvi nella regione Sardegna. Atti XVI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Montesilvano (PE), 30 Settembre - 2 Ottobre 2015.
10. Riccardo Bazzardi, Maria Caterina Fattaccio, Monica Rosaria Molotzu, Laura Marongiu, Antonella Canu, Alfonsina Marras, **Margherita Pisanu** (2015). Focus sul virus dell'Epatite A in molluschi eduli lamellibranchi allevati nella regione Sardegna. Atti XXV Congresso Nazionale A.I.V.I – Sorrento 28-30 Ottobre.

Descrizione complessiva del progetto

1. Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento

Lo studio dei dati epidemiologici sulle infezioni alimentari degli ultimi anni ha evidenziato un'importanza crescente dei virus enterici, anche a seguito del miglioramento delle tecniche di analisi che permettono di attribuire a questi agenti infettivi molti episodi epidemici prima classificati ad eziologia sconosciuta. Dati clinici nazionali inoltre dimostrano che il numero delle gastroenteriti virali nel nostro Paese è ancora sottostimato. A partire dagli anni '80 il Centro per il Controllo delle Infezioni di Atlanta (CDC) ha iniziato a censire le gastroenteriti acute non batteriche; tra queste, un ruolo emergente è stato assunto dal virus Norwalk, inizialmente chiamato così dal luogo della prima epidemia identificata, o "small round structured virus", per la sua struttura rotondeggiante e viene oggi incluso nella famiglia dei Caliciviridae. Appartiene ad un gruppo di virus che provocano gastroenteriti sia epidemiche che sporadiche nell'uomo ma anche negli animali e sono responsabili di oltre il 50% delle epidemie di gastroenterite acuta nell'adulto. I Norovirus (NoVs) sono geneticamente e antigenicamente differenti e la mancanza di un sistema di coltura in vitro o di un modello animale rende impossibile la classificazione in sierotipi, quindi il metodo principale di classificazione è attraverso l'analisi genetica. La loro classificazione è basata sull'analisi filogenetica della ORF2 (Open Reading Frame) che determina una suddivisione in 5 *genogruppi*: i genogruppi GI, GII e GIV sono tipici umani, mentre i genogruppi GIII e GV sono rispettivamente bovino e murino e il contagio interspecie non è ancora stato evidenziato, però alcuni ceppi di GII possono infettare i suini. All'interno di ogni genogruppo sono stati identificati uno o più *cluster* o *genotipi*. Esaminando le sequenze aminoacidiche derivanti dalla regione capsidica del Norovirus umano ed animale, sono stati identificati 5 genogruppi comprendenti 29 genotipi: 8 genotipi in GI, 17 in GII, 2 in GIII e 1 in GIV e in GV. L'accumulo di mutazioni puntiformi, associate ad errori di replicazione e ricombinazione, è alla base della diversità del Norovirus; in realtà sono pochi i genogruppi responsabili della maggior parte dei casi di gastroenteriti acute nell'uomo, tra questi il genogruppo II e più precisamente il genotipo 4 (GII.4). Recenti studi di epidemiologia molecolare, infatti, hanno dimostrato che il 70% delle epidemie causate da Norovirus sono dovute alla variante genotipica GII.4 ed alcuni ricercatori suggeriscono che la ricombinazione potrebbe essere quindi un importante meccanismo attraverso il quale GII.4 rimane persistente nella popolazione umana. I norovirus sono trasmessi principalmente per via oro-fecale. La contaminazione fecale di cibo, acqua, così come la diffusione diretta da persona a persona, sono responsabili della maggior parte delle epidemie e la contaminazione degli alimenti può avvenire in ogni punto della filiera alimentare. C'è un'alta incidenza della trasmissione per contagio interumano, che porta a un'amplificazione di un'epidemia in luoghi chiusi, come ospedali, navi da crociera, case di cura e scuole. Le infezioni da Norovirus possono continuare a trasmettersi perché è molto difficile eradicare il virus dalle aree contaminate a causa della loro relativa resistenza a molti disinfettanti. La breve durata dei sintomi e le difficoltà di diagnosi in molti casi non permettono l'identificazione della malattia, pertanto la diffusione del virus nella popolazione viene sottostimata con conseguente difficoltà nella raccolta ed elaborazione di dati epidemiologici. La maggior parte delle infezioni sono causate da un singolo ceppo ma possono esserci delle co-infezioni che possono portare ad una ricombinazione e di conseguenza alla generazione di nuovi ceppi virali. Il ciclo replicativo dei Norovirus è ancora oggi poco noto essendo impossibile sia coltivare tali virus in linee cellulari che riprodurre l'infezione in modelli animali. Possiede un genoma a RNA a singolo filamento a polarità positiva (ssRNA), che una volta entrato nel citoplasma della mucosa intestinale, lavora come RNA messaggero e sintetizza tutti i componenti utilizzando il sistema traduzionale della cellula ospite in quanto tutti i virus non sono in grado di codificare in modo autonomo le strutture necessarie per la

traduzione. In Europa è stato istituito l'FBVE (Foodborne viruses in Europe) per monitorare l'andamento dei focolai di gastroenterite virale nell'uomo. Il progetto "FBVE" è stato costituito per creare un database tale da permettere, in tempo reale, la divulgazione e la gestione di dati epidemiologici tra i diversi centri di ricerca; ciascun membro affiliato può segnalare eventuali focolai di gastroenteriti virali e condividere le informazioni acquisite. Nel 2004 un gruppo di ricercatori ha pubblicato un articolo su *Lancet* dove viene evidenziata la correlazione tra l'aumento significativo nel corso del 2002 del Norovirus in tre aree europee (Inghilterra e Galles, Germania e Paesi Bassi) e la comparsa di una nuova variante del virus, GI.4, identificata in nove Paesi europei. La comparsa di questa variante sembra aver preceduto un picco di epidemie anomale che si sono manifestate nel corso della primavera e non, tipicamente, nell'autunno-inverno. Lo studio ha messo quindi in evidenza le notevoli differenze tra i Paesi nella gestione dei dati analitici delle prove diagnostiche e sulla prevalenza della malattia, ma anche per i metodi di sorveglianza, le definizioni di caso, le modalità di campionamento e controllo della popolazione. In Italia, nel 2004, uno studio descrive invece il focolaio di gastroenterite che ha interessato un elevato numero di turisti nel litorale abruzzese tra luglio e settembre 2003, la causa dell'epidemia fu il consumo di cozze allevate o pescate sulla costa adriatica abruzzese. L'analisi di campioni fecali evidenziò la presenza di Norovirus di genogruppo I e II. Per quanto siano certamente presenti anche in Italia, i dati sulla diffusione dei Norovirus nel Paese sono molto frammentari a causa di una limitata attenzione alla notifica dei focolai epidemici di gastroenterite acuta in generale e delle tossinfezioni alimentari in particolare e alla scarsa integrazione tra i servizi di igiene pubblica e di sicurezza alimentare e veterinari. Attualmente la Norma *ISO/TS 15216:2013 "Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1 and Part 2"* è diventata un valido strumento per una più efficace determinazione dei Norovirus in differenti matrici biologiche e tutti i laboratori coinvolti nella ricerca di questo patogeno virale possono fornire uno strumento diagnostico ed epidemiologico più concreto. Grazie alla applicazione di saggi molecolari di RT-PCR si è potuto rilevare un aumento dei casi di positività del 90%. Nel Centro Europa i dati sulle gastroenteriti provocate da Norovirus sono stati elaborati basandosi sul numero dei casi di focolai rilevati dalla diagnostica di laboratorio. L'uomo è parte integrante del complesso ciclo epidemiologico di questa categoria di virus enterici che, sebbene siano trasmessi principalmente per via oro-fecale, non è da trascurare il contagio interumano attraverso la diffusione diretta da persona a persona. Spesso le gastroenteriti virali, infatti, sono dovute a cibo contaminato da operatori alimentari che possono trasmettere il virus durante il processo di produzione (contaminazione secondaria). La sorveglianza attiva e la caratterizzazione dei virus enterici sono strumenti essenziali per la preparazione contro potenziali eventi epidemiologici. Il Next Generation Sequencing (NGS) offre quindi la possibilità di ottenere in tempi brevi informazioni altamente specifiche sul genoma completo di patogeni infettivi. Questa recente tecnologia consente la sorveglianza dei flussi genici interspecie ed intraspecie di target microbiologici, utile ai fini della prevenzione in sanità umana ed animale ed il controllo continuativo del passaggio diretto o indiretto all'uomo di cluster animali con potenziale epidemico. In *Horizon 2020 – Work Programme 2016 – 2017 – Food security, sustainable agriculture and forestry, marine and maritime and inland water research and the bioeconomy*, viene sottolineata inoltre la necessità di utilizzare, implementare e sviluppare metodiche NGS nel campo della sicurezza alimentare e salute pubblica.

Next Generation Sequencing (NGS)

Nel 2005 si è affacciato sul mercato un sistema tecnologico alternativo definito come 'next generation sequencing' (NGS) o 'high-throughput sequencing' (HTS) che si basa su un processo di sequenziamento in parallelo massivo di molecole di DNA amplificate in modo

clonale o di singole molecole di DNA separate spazialmente in una cella a flusso (“flow cell”). Questa strategia rappresenta un cambiamento radicale rispetto al metodo di sequenziamento descritto da Sanger, che si basa sulla separazione elettroforetica di frammenti di lunghezza diversa ottenuti mediante singole reazioni di sequenziamento. Nelle tecnologie NGS, invece, il sequenziamento viene effettuato mediante cicli ripetuti di estensioni nucleotidiche ad opera di una DNA-polimerasi o, in alternativa, mediante cicli iterativi di ligazione di oligonucleotidi. Poiché la procedura è parallela e massiva, tali piattaforme consentono di sequenziare da centinaia di Mb (milioni di paia di basi) fino a Gb (miliardi di paia di basi) di DNA in un’unica seduta analitica. Un ulteriore vantaggio offerto dalle NGS, sia in termini di rapidità nella produzione dei dati che economici, è la possibilità di processare diversi campioni in uno stesso esperimento attraverso un metodo di marcatura delle sequenze (barcoding), che, nella fase di analisi informatica, permette di contraddistinguere e separare le sequenze proprie di ciascun campione.

Ion Torrent Suit e Next-Generation Sequencing Technology

Il sistema Ion PGM™ System - Personal Genome Machine, in dotazione presso la struttura proponente il progetto di ricerca, può essere considerato come l’unico strumento in grado di applicare una tecnologia *massive parallel sequencing* con peculiarità tali da differenziarla dagli altri sistemi NGS. Il PGM™ nasce infatti come sequenziatore di tipo "benchtop", letteralmente da “bancone” rendendo più economica, quindi maggiormente fruibile la tecnologia NGS per tutti i progetti (targeted DNA sequencing, targeted RNA sequencing, microbial sequencing) in cui la quantità di basi da sequenziare è notevolmente inferiore rispetto al sequenziamento di un intero genoma umano. Il protocollo Ion Torrent prevede l'amplificazione clonale del campione attraverso Emulsion PCR (ePCR) ma il processo di sequenziamento presenta due aspetti essenziali che lo caratterizzano rispetto alle altre tecnologie: a) l'utilizzo dei semiconduttori come elemento strutturale dei supporti in cui viene dispensato il campione per il sequenziamento (Ion Chips); b) l'impiego di un sistema di rilevamento non basato su reazioni luminescenti ma su variazioni di potenziale. Lo Ion Chip è la chiave e il cuore di questo sofisticato sistema: il dispositivo è costituito da pozzetti appositamente strutturati per poter accogliere le beads e i reagenti per il sequenziamento, rappresenta quindi una tecnologia di sequenziamento su supporto chip-semiconduttore con misurazione della variazione di pH.

Applicazioni specifiche – Animal Science Research

Poiché HT-NGS può generare in modo efficiente grandi quantità di dati di sequenza in tempi e costi ridotti rispetto agli altri sistemi di sequenziamento, diversi studi si sono concentrati sullo studio e l’assemblaggio dell'intero genoma di animali da reddito, tra cui bovino, maiale, ovino, equino, e sulle patologie aviarie. Questi studi hanno fornito una fonte di nuova conoscenza per la comprensione dell'evoluzione animale e per lo sviluppo di strumenti genetici all'interno della filiera delle produzioni zootecniche. Un chiaro esempio è lo studio sul genoma degli animali da reddito che ha facilitato l'identificazione delle funzioni e sistemi di regolamentazione che sono alla base di una migliore produzione. I progressi tecnologici delle metodiche HT-NGS consentono differenti applicazioni che possono anche essere applicate in processi di filiera per migliorare le produzioni animali e migliorare la sicurezza alimentare.

Bibliografia specifica di riferimento:

- Burt, D. M. 2002. Applications of biotechnology in the poultry. World’s Poult. Sci. J. 58:5-13
- Mote, B., and M. Rothschild. 2006. Cracking the genomic piggy bank: Identifying secrets of the pig genome. Pages 86–96 in Vertebrate Genomes. J. N. Volff, ed. Genome Dynamics, Karger, Basel, Switzerland.

- Chowdhary, B., and T. Raudsepp. 2006. The Horse Genome. Pages 97–110 in Vertebrate Genomes. J. N. Volff, ed. Genome Dynamics, Karger, Basel, Switzerland.
- Cockett, N. 2006. The Sheep Genome. Pages 79–85 in Vertebrate Genomes. J. N. Volff, ed. Genome Dynamics, Karger, Basel, Switzerland.
- Womack, J. 2006. The Bovine Genome. Pages 69–78 in Vertebrate Genomes. J. N. Volff, ed. Genome Dynamics, Karger, Basel, Switzerland.

Applicazioni specifiche – Food safety & Food chain

L'evoluzione delle tecniche basate sul sequenziamento massivo del DNA permetterà di sviluppare un miglior sistema di monitoraggio e di allerta nelle filiere alimentari. Le piattaforme HT-NGS giocheranno un ruolo importante per l'avanzamento dello stato dell'arte nelle produzioni degli alimenti di origine animale, infatti, in passato, quasi tutti gli sforzi della ricerca sul genoma si sono concentrati sul miglioramento genetico della specie attraverso la selezione di marcatori molecolari; ora invece, recenti ricerche mostrano una nuova era genomica funzionale richiedendo lo studio integrato sul cDNA, preparazione delle Librerie BAC, database EST e highthroughput technology, con l'obiettivo finale di sviluppare strumenti di metagenomica da impiegare nelle produzioni animali. Inoltre, la crescente consapevolezza di problemi legati alla sicurezza alimentare si concentra sulla riduzione dell'uso di prodotti chimici, antibiotici e altri additivi. Nuovi scenari si aprono sull'applicazione di studi basati sulla resistenza microbica nelle gestioni sanitarie delle filiere produttive; l'identificazione di geni e vie di virulenza, e l'interazione con cambiamenti ambientali potrebbero essere utili per la previsione di suscettibilità alla malattia e la risposta ai farmaci e, per esempio, la diagnosi precoce e la classificazione molecolare di malattie. Ciò è desiderabile non solo per l'economia del settore, risparmiando i costi perché i vaccini e gli antibiotici sono sempre meno efficaci, ma è utile anche per l'acquisizione di informazioni genomiche che possono portare a progressi terapeutici.

Bibliografia specifica di riferimento:

- Burt, D. M. 2002. Applications of biotechnology in the poultry. World's Poult. Sci. J. 58:5–13.
- Harlizius, B., R. van Wijk, and J. M. M. Merks. 2004. Genomics for food safety and sustainable animal production. J. Biotechnol. 113:33–42.
- Lander, E. S., and R. A. Weinberg. 2000. Genomics: Journey to the center of biology. Science 287:1777–1782.

Applicazioni specifiche – Food safety

Oggi giorno le NGS possono fornire un potente e più sofisticato approccio nel campo della epidemiologica correlata alla sicurezza degli alimenti. La tracciabilità e rintracciabilità dei microrganismi in alimenti di origine animale all'interno della catena alimentare farà parte del processo di monitoraggio e di studi pilota che già negli ultimi anni li vedono protagonisti della scena scientifica internazionale grazie alla partecipazione in progetti di ricerca a forte background tecnico-scientifico. Ad oggi sono in corso studi su sistemi molecolari basati su SNP. Inoltre sono in corso alcuni studi che evidenziano la potenza del sistema NGS per l'identificazione genetica ed evolutiva delle più importanti differenze tra i sierotipi di *Salmonella* enterica correlati a casi epidemici avvenuti durante gli ultimi anni con lo scopo di studiare i ceppi causa di focolai di infezione da essa provocati.

Bibliografia specifica di riferimento:

- Buzby, J. C., and T. Roberts. 2009. The economics of enteric infections: Human foodborne disease costs. Gastroenterology 136:1851–1862.

- Harlizius, B., R. van Wijk, and J. M. M. Merks. 2004. Genomics for food safety and sustainable animal production. *J. Biotechnol.* 113:33–42.
- Holt, K. E., J. Parkhill, C. J. Mazzoni, P. Roumagnac, F. X. Weill, I. Goodhead, R. Rance, S. Baker, D. J. Maskell, J. Wain, C. Dolecek, M. Achtman, and G. Dougan. 2008. High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi. *Nat. Genet.* 40:987–993.
- Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607–625.
- Scallan, E., P. M. Griffin, F. J. Angulo, R. V. Tauxe, and R. M. Hoekstra. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—Unspecified agents. *Emerg. Infect. Dis.* 17:16–22.

Applicazioni specifiche – Microbiology

Presso il laboratorio proponente, a partire dall'anno 2014, sono stati condotti degli studi in collaborazione con l'UOC di Malattie Infettive dell'Università degli Studi di Sassari per la identificazione e caratterizzazione molecolare di agenti infettivi virali associati a casi di gastroenterite acuta. Sono stati raccolti interessanti dati analitici che dovranno necessariamente essere sviluppati attraverso l'implementazione della piattaforma oggetto di questo studio. Tale metodica permetterà lo studio bioinformatico e filogenetico dei dati ottenuti tale da poter elaborare una potenziale correlazione tra i ceppi riscontrati nelle matrici alimentari, circolanti su territorio regionale, e i ceppi di origine umana. Nel campo delle malattie infettive umane e veterinarie infatti, un recente approccio è quello dedicato allo studio della Metagenomica e del 16s rDNA. La metagenomica è una scienza che segue come approccio lo studio di comunità microbiche direttamente nel loro habitat naturale. E' una branca della genomica che studia simultaneamente una comunità complessa di microorganismi presenti in un campione, evitando la crescita su terreni selettivi e il sequenziamento del 16S rDNA. In questo modo è possibile studiare le comunità batteriche residenti in habitat differenti. L'analisi metagenomica che permette l'analisi simultanea di una comunità di microorganismi ha reso possibile identificare ogni singolo microorganismo facente parte della comunità, ma soprattutto permette di studiare come i vari microorganismi interagiscono tra loro e con l'ambiente (ecologia microbica) e, non in ultimo, studiare le funzioni specifiche di quella comunità. Inoltre è possibile fare una valutazione sulle analogie di sequenza, definendo specie strettamente correlate o specie filogeneticamente distanti; l'analisi “*de novo assembly*” permette di porre le basi per l'individuazione di specie potenzialmente nuove.

Bibliografia specifica di riferimento:

- Gordon J.I., 2012. Honor thy gut symbionts redux. *Science* 336, 1251-1253.
- Kim M., Morrison M., Yu Z., 2011. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of Microbiological Methods* 84: 81–87.
- Krober M., Bekel T., Diaz N.N., Goesmann A., Jaenicke S., Krause L., Miller D., Runte K.J., Viehover P., Puhler A., Schluter A., 2009. Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *J. Biotechnol.* 142, 38–49.
- Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L., Pace N. R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 6955–6959.

Infine, l'acquisizione di nuove tecnologie per il sequenziamento "massivo" come lo "Ion Torrent Personal Genome Machine™ (PGM™)" consente di poter intervenire nei confronti di una emergenza epidemica di un agente infettivo e determinarne rapidamente la sua identità attraverso il sequenziamento dell'intero genoma, anche se tecnicamente difficile, in particolar modo se la specie del virus in questione è ignota o sconosciuta. Tale tecnologia consente inoltre la conduzione di progetti di ricerca nell'ambito dell'esoma, del sequenziamento di gruppi di geni o porzioni di genoma in campioni multipli (resequencing, analisi di mutazioni e indels), studi di metagenomica e sequenziamento del genoma di microrganismi e virus.

Bibliografia di riferimento

- Amelie Menard, Laetitia Ninove, Christine Zandotti, Isabelle Leparc-Goffart, Raphaelle Klitting, Cecile Baronti, Andreas Stein, Xavier de Lamballerie, Re'mi N. Charrel (2015). A secondary dengue 4 infection in a traveler returning from Haiti confirmed by virus isolation, complete genome sequencing and neutralisation assay: A brief report. *Travel Medicine and Infectious Disease* (2015) 13, 94e97.
- Collin EA, Sheng Z, Lang Y, Ma W, Hause BM, Li F. (2015). Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle. *J Virol* 89:1036 –1042. doi:10.1128/JVI.02718-14.
- Day JM, Oakley BB, Seal BS, Zsak L (2015). Comparative Analysis of the Intestinal Bacterial and RNA Viral Communities from Sentinel Birds Placed on Selected Broiler Chicken Farms. *PLoS ONE* 10(1): e0117210. doi:10.1371/journal.pone.0117210.
- Donglin Wu, Shumei Zou, Tian Bai, Jing Li, Xiang Zhao, Lei Yang, Hongmin Liu, Xiaodan Li, Xianda Yang, Li Xin, Shuang Xu, Xiaohui Zou, Xiyan Li, Ao Wang, Junfeng Guo, Bingxin Sun, Weijuan Huang, Ye Zhang, Xiang Li, Rongbao Gao, Bo Shen, Tao Chen, Jie Dong, Hejiang Wei, Shiwen Wang, Qun Li, Dexin Li, Guizhen Wu, Zijian Feng, George F. Gao, Yu Wang, Dayan Wang, Ming Fan & Yuelong Shu (2015). Poultry farms as a source of avian influenza A (H7N9) virus reassortment and human infection. *Scientific Reports* | 5 : 7630 | DOI: 10.1038/srep07630.
- Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, et al. (2013). Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses. *PLoS Pathog* 9(2): e1003176. doi:10.1371/journal.ppat.1003176.
- Howard J.Jacob, Ph.D (2013). Next-Generation Sequencing for Clinical Diagnostics. *The New England Journal of Medicine*. Downloaded from nejm.org on October 7.
- Ilias S Frydas1, Ivan Trus, Lise K Kvisgaard, Caroline Bonckaert, Vishwanatha RAP Reddy, Yewei Li, Lars E Larsen and Hans J Nauwynck1. (2015). Different clinical, virological, serological and tissue tropism outcomes of two new and one old Belgian type 1 subtype 1 porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) isolates. *Veterinary Research*; 46:37. DOI 10.1186/s13567-015-0166-3.
- Lin L, Yinhu L., Siliang L., Ni H., Yimin H., Ray P., Danni L., Lihua L., Law L. (2012). Comparison of Next Generation Sequencing Systems. Review Article, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article: ID 251364 – 2 April.
- Mardis E.R.. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*; vol. 24, no.3, pp.133–141.
- Mark D Stenglein, Eric Velazquez, Cheryl Greenacre, Rebecca P Wilkes, J Graham Ruby, Julia S Lankton, Donald Ganem, Melissa A Kennedy and Joseph L DeRisi (2012). Complete genome sequence of an astrovirus identified in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) with gastroenteritis. *Virology Journal* 2012, 9:216.

- Martin M. Nyaga, Khuzwayo C. Jere, Mathew D. Esona, Mapaseka L. Seheri, Karla M. Stucker, Rebecca A. Halpin, Asmik Akopov, Timothy B. Stockwell, Ina Peenze, Amadou Diop, Kader Ndiaye, Angeline Boula, Gugu Maphalala, Chipso Berejena, Jason M. Mwenda, A. Duncan Steele, David E. Wentworth, M. Jeffrey Mphahlele (2015). Whole genome detection of rotavirus mixed infections in human, porcine and bovine samples co-infected with various rotavirus strains collected from sub-Saharan Africa. *Infection, Genetics and Evolution* 31; 321–334.
- Michael A. Quail, Miriam Smith, Paul Coupland, Thomas D Otto, Simon R. Harris, Thomas R. Connor, Anna Bertoni, Harold P. Swerdlow and Yong Gu (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13:341.
- Prakash S, Jain A, Seth A, Singh AK, Jain B. (2015). Complete genome sequences of two isolates of human parvovirus 4 from patients with acute encephalitis syndrome. *Genome Announc* 3(1):e01472-14. doi:10.1128/genomeA.01472-14.
- Silvie Van den Hoecke, Judith Verhelst, Marnik Vuylsteke and Xavier Saelens (2015). Analysis of the genetic diversity of influenza A viruses using next-generation DNA sequencing. *BMC Genomics* 6:79. DOI 10.1186/s12864-015-1284-z.
- Stucker KM, Stockwell TB, Nyaga MM, Halpin RA, Fedorova N, Akopov A, Ngoveni H, Peenze I, Seheri ML, Mphahlele MJ, Wentworth DE. 2015. Complete genomic sequence for an avian group G rotavirus from South Africa. *Genome Announc* 3(2):e00107-15. doi:10.1128/genomeA.00107-15.

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

Recenti studi dimostrano l'elevata capacità dei Norovirus sia umani che animali di ricombinarsi a livello della sequenza di giunzione tra ORF1 e ORF2, attraverso un meccanismo simile al crossing-over. Questi shift genetici sono stati al momento descritti solo tra virus di una stessa specie, ma i dati restano ancora parziali. Da questo nasce la necessità di completare gli studi sui ceppi di origine diversa prima di escludere una evoluzione zoonotica dei Norovirus (Norovirus GII.4 in particolare) e il rischio di adattamento e salto di specie, soprattutto nel caso di virus ad RNA ad elevata diffusione e resistenza ambientale, come appunto i Norovirus, deve essere considerato realistico anche alla luce di quanto riportato recentemente per altri sistemi virali (Coronavirus).

Nel periodo tra Ottobre 2014 e Luglio 2015 è stato effettuato uno studio prospettico su pazienti affetti da gastroenterite acuta per la ricerca di NoVs. I pazienti erano stati ricoverati presso le strutture dell'UOC di Malattie Infettive dell'Università degli Studi di Sassari. Sono stati prelevati campioni fecali ed è stata inoltre eseguita la determinazione quantitativa della carica virale nei campioni che sono risultati positivi ai saggi molecolari. Sono risultati affetti da Norovirus GII il 13,7% dei pazienti di cui uno di sesso femminile e 3 di sesso maschile di età compresa tra i 33 e i 42 anni d'età. Tutti i pazienti presentavano dolori addominali, vomito e scariche diarroiche. La carica virale nei 4 campioni era compresa tra 1.13×10^6 e 1.44×10^9 copie/grammi di feci. Dall'analisi preliminare dei dati emerge che Norovirus genogruppo II è il maggior responsabile delle gastroenteriti osservate da Ottobre 2014 a Luglio 2015. Per la prima volta nella realtà regionale è stata diagnosticata la presenza di questo virus in pazienti affetti da gastroenterite acuta di origine non batterica. Benché la metodica molecolare risulti essere un valido strumento diagnostico ed un utile mezzo per la sorveglianza di possibili focolai epidemici e l'attuazione di misure di prevenzione e di contenimento, è doveroso implementare tali studi attraverso l'applicazione e lo sviluppo di tecniche di sequenziamento massivo. A tal proposito negli ultimi anni sono stati sviluppati protocolli per il sequenziamento dell'intero genoma virale partendo da campioni biologici

con metodi di Next Generation Sequencing (NGS). Questo sistema può determinare, da una parte, l'identità attraverso il sequenziamento dell'intero genoma dell'agente virale, dall'altra attraverso uno studio bioinformatico prima e di filogenesi poi, la comprensione "ecologica" ed epidemiologica dei fenomeni evolutivi dell'agente virale oggetto di questa ricerca prima e di potenziali altri agenti zoonotici in seguito.

Il presente studio si propone quindi di:

- ❖ Sviluppare e validare: a) un protocollo NGS utilizzando il sequenziatore Personal Genome Machine (PGM) Ion Torrent in dotazione nella struttura proponente il progetto e settare le condizioni di sequenziamento dell'intero genoma virale di virus a RNA a singolo filamento positivo; b) perfezionare il flusso di lavoro (preparazione del campione, estrazione degli acidi nucleici; amplificazione del genoma con primer costruiti ad hoc; costituzione delle librerie e analisi bioinformatica utilizzando il Ion Torrent suite software o il software CLC bio per le analisi de novo e mapping ed eventuale ricerca dei software dedicati più appropriati alla ricerca).
- ❖ Sviluppare, potenziare e creare una "infrastruttura di ricerca" attraverso la realizzazione di una Piattaforma altamente tecnologica e moderna di sequenziamento integrato: "CloudSC4I" (Sequencing Cloud for Integrated data IZS) che permetterà di far avanzare gli studi nel campo della biodiversità e della biologia evolutiva a partire dal sequenziamento massivo. Il Workflow delle analisi di sequenza nel campo infettivologico contribuirà a meglio pianificare e strutturare il Workprogram dedicato alla sua realizzazione.
- ❖ Sviluppare un network di lavoro integrato per studi di bioinformatica e di filogenesi applicabili nella diagnostica quotidiana clinica (correlazione filogenetica di ceppi virali) e nella ricerca.

Piattaforma "CloudSC4I": sistema integrato di sequenziamento ed elaborazione dati bioinformatici – il sistema prevede (Figura 1):

- ❖ Attivazione del LABIOSEQ: costituzione di un gruppo di lavoro scelto e qualificato nel campo della Bioinformatica, costituito da differenti tipologie di categorie professionali quali Biologi, Epidemiologi, Epidemiologi molecolari, Biotecnologi, Veterinari e Tecnici di Laboratorio, capaci di assicurare un supporto adeguato alle ricerche nell'ambito della medicina veterinaria e delle scienze, sicurezza e tecnologie alimentari con operatività nei seguenti piani distinti: Ricerca e Progettazione; Applicazioni bioinformatiche e filogenetiche sia nel campo delle ricerche che nella diagnostica quotidiana; Formazione e addestramento; Studio degli eventi epidemici. Costituzione di un Network di lavoro per l'approccio allo studio epidemiologico tra gli operatori dell'IZS e quelli dell'ISS con interscambio di dati, informazioni, procedure e modelli di calcolo.
- ❖ Collaborazione con il CED dell'IZS Sardegna per lo sviluppo di una pagina web dedicata per l'interscambio, gestione ed implementazione del flusso dei dati di sequenza e delle analisi bioinformatiche – CloudSC4I – creazione di un'infrastruttura informatica con tanta potenza elaborativa e un'architettura di storage in grado di gestire un volume di dati di molti terabyte in costante crescita.
- ❖ Attivazione di una piattaforma virtuale su web in collaborazione con gli IZZSS che prenderanno parte al progetto (corpo virtuale e digitale del CloudSC4I) nella quale gli operatori più esperti nell'oggetto della ricerca vengono contattati e coinvolti per aiutare gli altri ricercatori ed operatori a sfruttare appieno le nuove tecnologie, in modalità di multidisciplinarietà e di formazione continua.

Obiettivo della Piattaforma:

- ❖ Offrire attraverso la costituzione della Piattaforma servizi di rilevanza strategica per gli stakeholders. La struttura del lavoro si baserà su studi del genoma nel campo delle diversità biologica evolutiva.
- ❖ La piattaforma di ricerca ha inoltre lo scopo di aiutare il collegamento tra il settore privato e quello pubblico per evidenziare la qualità della ricerca cercando di attrarre investimenti privati e pubblici e di rendere il progetto sostenibile anche a lungo termine.
- ❖ Attraverso l'attivazione di LABIOSEQ e CloudSC4I si potranno creare le basi per un importante "Area della Ricerca" per l'IZS-Sardegna sia a livello locale che a livello internazionale, contribuendo attivamente al reclutamento di fondi, attraverso la stesura di Progetti di Ricerca Internazionali e nuovi pannel di lavoro.
- ❖ Realizzazione di una "rete" tra reciproco scambio di flussi di lavori basata tra l'IZS-Sardegna e gli IIZZSS partecipanti, Università ed Enti di ricerca nazionali e internazionali. Verranno sviluppate competenze, strutture e strumentazioni dedicate alle discipline così dette *omiche* e bioinformatiche con particolare attenzione alle problematiche riguardanti il mondo della sanità pubblica veterinaria.
- ❖ L'obiettivo strategico non è rappresentato solo dalla applicazione della tecnologia NGS e dai dispositivi, protocolli e metodiche che verranno sviluppati; il progetto si configura soprattutto come un *modello innovativo di ricerca e di sviluppo* costituendo una rete interattiva di "comunicazione" della ricerca. Il risultato che si intende raggiungere è quello della connessione tra le potenzialità delle nuove tecnologie ad alta processività (Ion Torrent PGM) per la caratterizzazione genetica degli agenti patogeni e i metodi informativi e le potenzialità delle tecnologie applicate alla diagnostica; ciò con il fine di rendere disponibili strumenti adatti alla applicazione dei nuovi contenuti emergenti e di aumentare la competitività degli stakeholders proponenti e richiedenti. L'ambito scelto, il cuore del progetto pilota, ovvero lo studio genomico di Norovirus, parte da una più generale ed elaborata considerazione ed interpretazione dei risultati raggiunti e potenzialmente raggiungibili dall'applicazione delle scienze "omiche" alla microbiologia. Si propone come uno dei temi più interessanti e di applicabilità più immediata rispetto agli altri pannel genici.

3. Metodologia

Il progetto sarà articolato seguendo due fasi lavorative distinte in FASE I e FASE II che inizieranno contemporaneamente a partire dal primo anno di ricerca. Durante i due anni di studio previsti, ciascuna fase lavorativa sarà articolata in Workprogram “WP” specifici:

FASE I – Applicazione metodiche NGS – messa a punto metodi analitici

WP1:

- Organizzazione e strutturazione del Progetto e delle collaborazioni tra le diverse strutture coinvolte.
- Studio e applicazioni di differenti flussi di lavoro per il setup del network molecolare.
- Analisi e setup dei protocolli della Piattaforma Ion Torrent PGM e kit di reazione.

WP2:

- Prelievo dei campioni selezionati per la ricerca attraverso il consolidamento di un partenariato tra Servizi Veterinari delle Aziende Sanitarie locali, Aziende private, Aziende di settore, Università, Centri di Ricerca, Case di cura/ricovero.
- Messa a punto di metodi di estrazione di acidi nucleici da differenti matrici biologiche.
- Sviluppo di metodi per saggi molecolari di Nested PCR e Booster PCR e Real Time PCR per la caratterizzazione molecolare di Norovirus da matrici biologiche contenenti inibitori di PCR.
- Preparazione ed immobilizzazione del DNA (cDNA): preparazione delle Sequencing library.
- Preparazione delle reazioni di amplificazione (ePCR).
- Nello specifico il disegno sperimentale prevederà: messa a punto di metodi di preparazione del campione per tecnologia Ion Torrent PGM:ottenere una sequenza del genoma virale attraverso un disegno di primer sulle regioni 3' e 5' conservate e verificare la loro disponibilità ed effettuare una ricerca sui maggiori server dedicati. Sviluppo di una Retrotrascrizione (random hexamer). Amplificazione del cDNA usando i primer delle regioni conservate. Creazione di una libreria a partire da tali ampliconi utilizzando dei barcode nucleotidici, in modo da analizzare più campioni (ceppi) contemporaneamente su uno stesso chip.

WP3:

- Sequenziamento Ion Torrent PGM.
- Valutazione della sensibilità e ripetibilità dei risultati.
- Elaborazione di procedure operative standard relative ai metodi sviluppati.
- Raccolta dei risultati e valutazione mediante applicazioni statistiche.

WP4:

- Assemblaggio del genoma utilizzando software dedicati.
- Verifica delle Suites a disposizione per l'analisi Bioinformatica: SAMTOOLS and BOWTIE (NIH high performance cluster).
- Verifica ed utilizzo del Ion Torrent suite software o il software CLC bio per le analisi de novo e mapping.

FASE II – Sviluppo della Piattaforma di lavoro LABIOSEQ e Cloud SC4I

WP 2

- Pianificazione della Piattaforma Cloud SC4I.

WP5

- Analisi filogenetiche e studio dei fenomeni evolutivi.
- Studio dell'applicabilità della tecnologia NGS come contributo alla sorveglianza dei flussi genici interspecie ed intraspecie di virus enterici .

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

Il Progetto per le sue caratteristiche e complessità trasversali e interdisciplinari avrà una trasferibilità su molteplici piani:

- I risultati ottenuti dalle attività saranno pubblicati su riviste di settore, presentati nell'ambito di manifestazioni scientifiche, eventi formativi per il personale del SSN e per i professionisti operanti nel settore.
- L'implementazione di metodi NGS innovativi, validi, di rapida esecuzione costituirà un supporto per l'attivazione di efficienti sistemi di sorveglianza epidemiologica, consentendo di produrre evidenze di eventuale circolazione virale, premessa fondamentale per le scelte e la gestione degli interventi sul territorio.
- Il progetto, inoltre, permetterà al nuovo servizio del Laboratorio proponente (LABIOSEQ) di ottenere esperienza e conoscenza su una attività di recente acquisizione, quale la piattaforma Ion Torrent PGM (Luglio 2015) che necessita ancora di ulteriori approfonditi studi ed applicazioni per poter ottenere la sequenza completa di un virus presente in un campione biologico (ed eventualmente alimentare).
- I risultati verranno elaborati e divulgati con la partecipazione e la comunicazione di lavori a convegni scientifici e attraverso pubblicazioni su riviste scientifiche.

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

Le strutture di ricerca esterne all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna che prenderanno parte alla costituzione della Piattaforma di lavoro, gli IIZZSS, i centri di ricerca nazionali ed internazionali, le Università partecipanti al progetto stesso diventeranno una rete integrata di "officine di ricerca" e di "servizio" in grado di apportare specifici contributi trasversale attraverso il coinvolgimento di differenti figure professionali come virologi, biologi molecolari e bioinformatici. I soggetti coinvolti nel Cloud SC4I, oltre ad aver sviluppato competenze specialistiche diversificate, andranno a gestire una trama di configurazioni e flussi di lavoro tra i differenti laboratori affinché possano svolgere azioni di Sanità Pubblica e Sanità Veterinaria. Nell'arco del periodo dedicato alla ricerca si getteranno le basi per la creazione e il consolidamento di *LABIOSEQ*: gruppo di lavoro scelto e qualificato dell'IZS Sardegna in collaborazione con l'ISS per la creazione di un centro specialistico che provveda a promuovere servizi e conoscenza alla comunità scientifica ed alle autorità competenti e contemporaneamente, sviluppare progetti ed attività avanzate per la pubblicazione di dati su riviste impattate. L'integrazione di tali competenze è in grado di avviare, già nel corso di esecuzione della ricerca, le prime azioni di sorveglianza epidemiologica nei confronti delle infezioni virali causa di gastroenterite acuta.

6. Output del programma (es. documenti; metodologie; corsi di formazione, attivazione di servizi, etc.) con indicazione dei tempi previsti per la presentazione

Al 6° mese:

- Disponibilità di materiali di riferimento non protetto da brevetto aziendale o da copyright o non disponibili in quanto Procedura Tecnica interna o solo condividibile dal personale interno ed esterno afferente al progetto di ricerca.
- Disponibilità di materiali di riferimento delle sequenze disegnate ed utilizzate e delle procedure molecolari utilizzati nella ricerca se condivisibili anche da soggetti estranei al progetto.

- Disponibilità e condivisione di protocolli sperimentali e procedure tecniche qualora ritenute di non importanza strategica per l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna.
- Disponibilità di materiali di riferimento del flusso di lavoro della piattaforma Cloud SC4I solo tramite approvazione dal responsabile della ricerca e del gruppo di lavoro.
- Disponibilità di materiali di riferimento dei primers, sonde e strutture molecolari per l'avanzamento del flusso di lavoro in PCR e Real time PCR come screening iniziale dei virus enterici.
- Costituzione panels e workgroup per la realizzazione del Cloud SC4I e piattaforma lavoro NGS.

Al 12° mese:

- Sviluppo dei metodi di sequenziamento con sistema Ion Torrent PGM e avanzamento lavori piattaforma NGS.
- Pubblicazioni a stampa su riviste specializzate di settore attraverso l'utilizzo dei primi dati sperimentali.

Al 14° mese:

- Consegna alla Direzione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna del primo report dell'avanzamento del progetto di ricerca – elaborato intermedio.
- Report dati settore bioinformatica.
- Pubblicazioni a stampa su riviste specializzate di settore.
- Pubblicazione sul sito internet dell'Ente.
- Implementazione e attivazione di un servizio di sequenziamento e di lavoro di gruppo attraverso la Piattaforma Cloud SC4I mediante messa a punto di metodiche di sequenziamento e studio dei dati preliminari.
- Riunioni organizzative fra i partecipanti per l'attivazione e meglio pianificazione dello studio.
- Raccolta ed elaborazione dei dati.
- Elaborazione e pubblicazione di un sito web con interfaccia Cloud SC4I

Al 24° mese:

- Consegna alla Direzione da parte del Responsabile Scientifico della Ricerca dell'elaborato finale.
- Realizzazione di un evento formativo per la presentazione dei prodotti della ricerca.

7. Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati raggiunti

Obiettivi

Al termine del primo anno:

- Messa a punto, sviluppo e definizione dei protocolli operativi analitici e delle metodiche molecolari impiegate ed implementate nello screening molecolare.
- Verifica delle procedure di campionamento, raccolta dati e selezione dei campioni da sottoporre a saggi molecolari e a diagnosi di sequenziamento. Prima verifica qualitativa e quantitativa relativa alle sequenze prodotte e dei dati bio-informatici ottenuti.
- Prima verifica strutturale e strumentale della Piattaforma di lavoro e verifica della compatibilità tecnica dei partecipanti esterni al progetto (unità operative coinvolte) sull'effettivo e reale funzione e sviluppo del Cloud SC4I.
- Messa a punto e standardizzazione di metodi biomolecolari ausiliari per le reazioni e fasi di sequenziamento.

- Studio dell'applicabilità e funzione di software d'analisi dei dati e degli output bio-informatici.
- Organizzazione di conferenze, incontri gruppi di lavoro via web con i partecipanti esterni al progetto (unità operative coinvolte) per la realizzazione ed implementazione della piattaforma di lavoro.
- Primo studio e valutazione epidemiologica e bio-statistica dei dati ottenuti.
- Verifica delle criticità del Cloud SC4I.

Al termine del secondo anno:

- Seconda verifica strutturale e strumentale della Piattaforma di lavoro e analisi della compatibilità tecnica dei partecipanti esterni al progetto (unità operative coinvolte) sull'effettivo e reale funzione e sviluppo del Cloud SC4I e verifica dell'operatività degli stessi.
- Seconda verifica della messa a punto e standardizzazione di metodi biomolecolari ausiliari per le reazioni e fasi di sequenziamento.
- Verifica dell'applicabilità e funzione di software d'analisi dei dati e degli output bio-informatici.
- Organizzazione di seminari e/o convegni ad hoc con i gruppi di lavoro coinvolti per la divulgazione delle conoscenze acquisite, dei dati ottenuti e del potenziale impatto scientifico sul territorio.
- Partecipazione funzionale dei gruppi di lavoro tramite Workproject tra i partecipanti al progetto per lo sviluppo della piattaforma di lavoro Cloud SC4I.
- Secondo studio e valutazione epidemiologica e bio-statistica dei dati ottenuti.
- Verifica delle criticità del Cloud SC4I.

Indicatori

- Fruibilità dei dati per gli utenti.
- Report annuale sui dati raccolti e relazioni intermedie e finali da parte di tutti i partecipanti al progetto.
- Produzione del materiale informativo per gli operatori di settore e della utenza esterna all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna interessato al tema in oggetto del progetto di ricerca.
- Conferenze tecniche coi partecipanti per la divulgazione degli avanzamenti ottenuti.

Cronogramma del progetto

Diagramma temporale delle attività

Fasi	WP	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	
FASE I e FASE II	WP1	<ul style="list-style-type: none"> Organizzazione del Progetto e studio strutturale delle Piattorfe di lavoro e Network genomico Organizzazione delle collaborazioni tra le varie strutture coinvolte Analisi e setup dei protocolli della piattaforma Ion Torrent PGM 													
	WP2	<ul style="list-style-type: none"> Prelievo dei campioni da sottoporre a prova Analisi molecolari e messa a punto di protocolli analitici ad hoc – verifica dei pannel di PCR e Real time PCR Estrazione acidi nucleici – preparazione delle library Sviluppo del Network genomico Pianificazione del Cloud SC4I 													
	WP3	<ul style="list-style-type: none"> Sequenziamento dei campioni con piattaforma PGM Ion Torrent 													
	WP4	<ul style="list-style-type: none"> Analisi bioinformatica e statistica dei dati di sequenziamento 													
	WP5	<ul style="list-style-type: none"> Studio, verifica e comparazione dei risultati ottenuti dal flusso di lavoro del sequenziamento e controllo dei dati elaborati dal punto di vista epidemiologico – preparazione articoli e poster Sviluppo di piani di lavoro Cloud SC4I Verifica della progettazione Cloud SC4I attraverso indicatori spazio/temporali 													

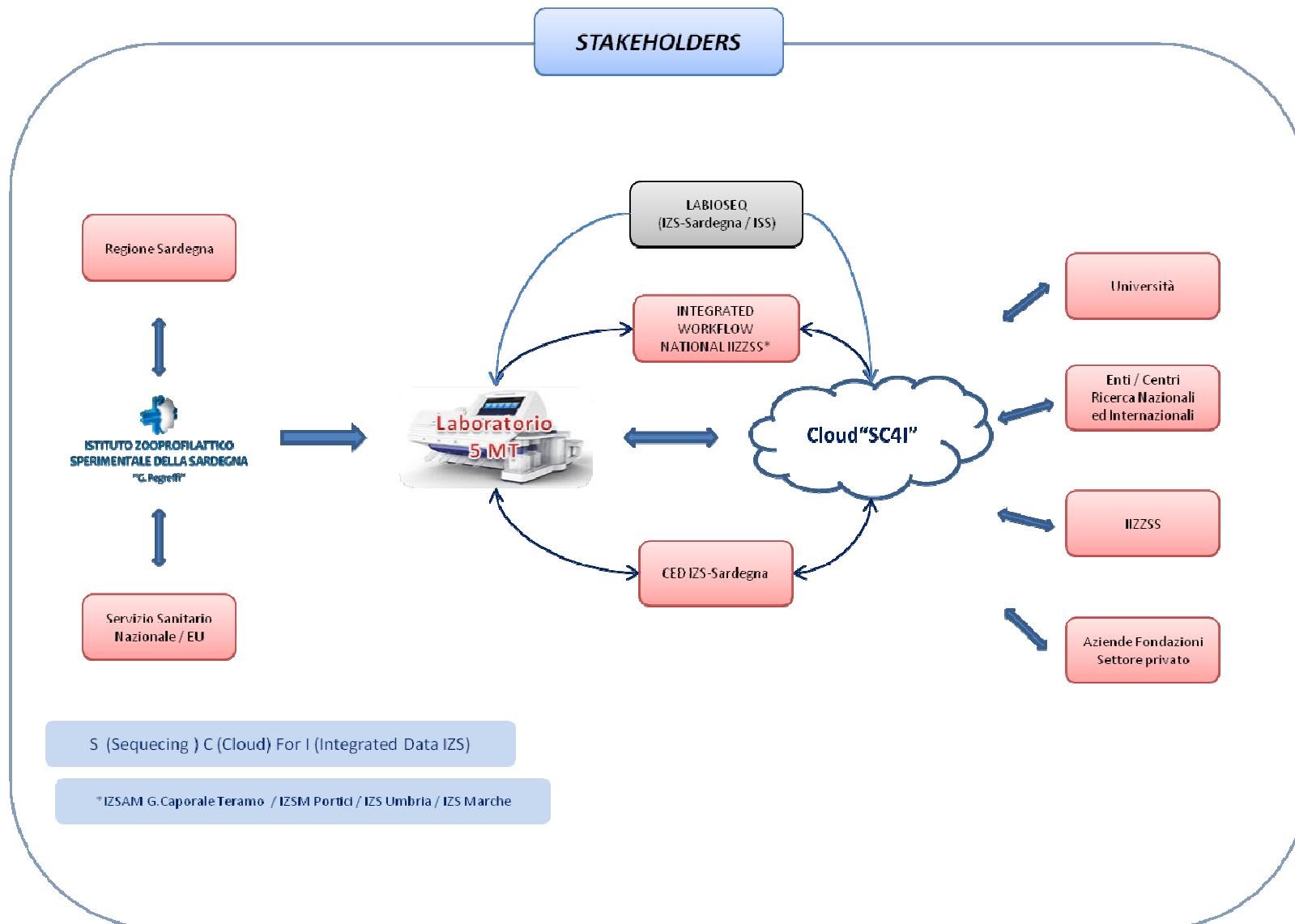


Figura 1. Descrizione del Network Cloud SC4I. In figura sono riportati gli stakeholders: rappresentano l'oggetto degli obiettivi strategici. Le frecce direzionali raffigurano il piano d'azione sinergico con le categorie di interesse.

Tabella n. 1

Titolo del progetto: Sviluppo della Piattaforma “CloudSC4I” per applicazioni di Next Generation Sequencing (NGS) nella ricerca biomedica e in ambito veterinario: studio pilota e applicazione di tecniche innovative di sequenziamento massivo per una indagine epidemiologico molecolare di virus enterici - *Norovirus*

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

Responsabile scientifico Cognome: **Pisanu** Nome: **Margherita**

VOCE DI SPESA	Importo	Descrizione
Borsa di studio		Biologo abilitato alla professione. Esperienza documentata su: Produzione e sicurezza degli alimenti di origine animale, esperienza e pratica nelle tecniche di biologia molecolare oggetto della ricerca attraverso partecipazione corsi formazione/aggiornamento inerenti.

Firma del Responsabile Scientifico del progetto

