

Messa a punto di una metodologia innovativa per l'identificazione molecolare delle principali specie di *Culicoides* - IZS SI 16/16 RC

Responsabile Scientifico: Dott.ssa Alessandra Torina

Relatrice: Dott.ssa Valeria Blanda

SINTESI

Introduzione: I *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) sono insetti ematofagi a diffusione cosmopolita. A questo genere appartengono i principali vettori del virus della Bluetongue (BTV) e del virus della Peste equina Africana (AHSV); recentemente, alcune specie di *Culicoides* sono state correlate alla trasmissione di un virus di nuova introduzione in Europa, lo Schmallenberg Virus (SBV). La diffusione della BTV nei paesi mediterranei e in Europa Centrale ha spinto la ricerca verso lo studio della biologia ed ecologia dei *Culicoides* (Baylis & Mellor 2001; Baylis, 2002). In Italia, la specie *Culicoides imicola* rappresenta il vettore principale di BTV (Vanbist et al., 2009), seguita dai membri del complesso *C. obsoletus* e *C. pulicaris*. Anche la specie *C. newsteadi* è stata recentemente annoverata tra i vettori di BTV. A causa della sua rapidità di diffusione, la conferma di infezione in un territorio riveste notevole impatto economico, per il potenziale danno conseguente alle forme cliniche (perdite di produttività, mortalità), ma soprattutto in quanto determina il blocco delle movimentazioni dei capi potenzialmente infetti verso aree libere da malattia. Per tale ragione è stato istituito in Italia un Piano Nazionale di Sorveglianza Entomologica (O.M. 11 maggio 2001 e successive modificazioni) al fine di conoscere la composizione delle comunità di questi insetti. L'identificazione morfologica dei *Culicoides* a livello di specie o complesso di specie si basa sulla morfologia dell'ala dell'adulto (Campbell and Pelham-Clinton, 1960; Boorman, 1988; Nielsen and Kristensen, 2015). Tuttavia a causa delle elevate similitudini tra alcune specie, come i membri di *C. obsoletus* complex e *C. pulicaris* complex, talvolta l'analisi può risultare complessa ed imprecisa. Inoltre tale tecnica necessita un aggiornamento continuo delle chiavi d'identificazione. L'analisi molecolare, basata sulla tecnica della PCR barcoding, che amplifica e analizza una porzione del marker mitocondriale Citocromo c ossidasi I (COI), si è rivelata uno strumento utile per l'identificazione delle specie (Nielsen and Kristensen, 2015) e l'implementazione di studi filogenetici. Tale tecnica tuttavia necessita di effettuare sequenziamento e analisi delle sequenze per ogni singolo campione.

Obiettivi: Il progetto è stato rivolto alla messa a punto di una nuova tecnica molecolare basata sulla Reverse Line Blot (RLB) per l'identificazione delle principali specie appartenenti al genere *Culicoides* consentendo di discriminare anche tra specie morfologicamente affini.

Le fasi del progetto hanno previsto: a) L'identificazione e selezione mediante analisi morfologica degli esemplari appartenenti alla specie *C. imicola*, *C. newsteadi* e ai complessi *C. obsoletus* e *C. pulicaris*; b) La conferma molecolare dell'identificazione mediante PCR barcoding e sequenziamento; c) L'analisi bioinformatica delle sequenze ottenute al fine di identificare le regioni più idonee per disegnare le sonde per l'ibridazione specie-specifica; d) La messa a punto della tecnica RLB per rilevare e differenziare simultaneamente le principali specie di *Culicoides*; e) Analisi dei risultati.

Metodologie: Le catture entomologiche sono state effettuate attraverso trappole blacklight a luce UV, attivate all'interno dei ricoveri per gli animali da un'ora prima del tramonto a un'ora dopo l'alba. Gli insetti catturati, conservati in alcool al 70%, sono stati inviati al Laboratorio di Entomologia e Controllo Vettori Ambientali per l'identificazione morfologica e biomolecolare. L'identificazione morfologica è stata condotta sulla base delle chiavi morfologiche riportate in letteratura (Delécolle, 1985; Boorman, 1988; Campbell-Clinton, 1960; Nielsen & Kristensen, 2015). Per le analisi biomolecolari, il DNA è stato estratto a partire da singoli esemplari di *Culicoides* utilizzando Chelex 5% in Tris-EDTA 0,1% e 5µl di proteinasi K 20 mg/mL (Walsh et al., 1991). Un frammento di 523 pb del gene COI è stato amplificato mediante PCR barcoding utilizzando i primers C1-J-1718 e C1-N-2191 (Dallas et al., 2003). I prodotti di amplificazione sono stati purificati utilizzando il Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Italia), quantizzati al Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) e inviati alla ditta Macrogen. Inc per il sequenziamento.

Le sequenze sono state allineate mediante il software Bioedit e confrontate con quelle presenti nel database genetico GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando il sistema Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gci-bin/BLAST/>). Il software Muscle è stato utilizzato per lo studio filogenetico. Le sequenze allineate sono state sottoposte ad ispezione visiva al fine di identificare le regioni in cui disegnare le sonde specie- e complex- specifiche. Le sonde individuate sono state analizzate mediante OligoAnalyzer Tool (<http://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Per la Reverse Line Blot, il primer C1N 2191 è stato biotinilato e i prodotti di PCR ottenuti sono stati posti ad ibridare con le sonde molecolari delle diverse specie di *Culicoides* precedentemente legate alla membrana di nitrocellulosa. Sono state effettuate diverse prove con quantità di sonde differenti (100 pmol, 200 pmol e 400 pmol) al fine di individuare quella ottimale. Per la messa a punto della metodica ci si è basati su un protocollo di RLB in uso presso il laboratorio (Gubbles et al., 1999).

Risultati: Gli esemplari di *Culicoides* identificati allo stereomicroscopio sono stati sottoposti a conferma molecolare, ottenendo una buona concordanza tra l'identificazione morfologica e molecolare. L'esame molecolare ha anche permesso di discriminare tra specie di *Culicoides* appartenenti ad un unico complex, come nel caso delle specie *C.obsoletus s.s.* e *C.scoticus*, appartenenti entrambe al *C.obsoletus complex*. Il sequenziamento del frammento del gene COI ha inoltre permesso di valutare le relazioni filogenetiche tra le specie di *Culicoides*.

Per la messa a punto della RLB, è stato biotinilato al 5' il primer C1N 2191 e sono stati disegnati 13 probes. Di essi, 11 sono specie-specifici in grado di ibridare con le seguenti specie: *C.imicola*, *C.pulicaris*, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. newsteadi*, *C. dewulfi*, *C. chiopterus*, *C.grisescens*, *C. impunctatus*, *C.lupicaris*, *C.punctatus*, uno è specifico per il *C. obsoletus complex* e uno in grado di legarsi al DNA di tutte le specie, in modo da fungere da controllo positivo. Tra le diverse quantità di probes saggiate, si è scelto di utilizzare 400 pmol in quanto a queste condizioni, pur non inficiando la specificità della reazione, si riusciva a ottenere un segnale chiaramente distinguibile anche per quei campioni che alle altre concentrazioni di sonda determinavano uno spot molto tenue.

Discussioni e conclusioni: Come atteso, lo studio filogenetico ha mostrato la vicinanza all'interno dell'albero filogenetico delle sequenze degli esemplari di una stessa specie o complex. All'interno del *C. obsoletus complex*, si aveva un'organizzazione in cluster delle specie *C. obsoletus s.s.*, *C.scoticus* e *C.chiopterus*. I campioni identificati come *C.obsoletus s.s.* clusterizzavano insieme alle sequenze *C.obsoletus s.s.* di riferimento prelevate da GenBank, mentre gli esemplari identificati come *C.scoticus* si trovavano in prossimità delle sequenze *C.scoticus* di riferimento. La specie *C.dewulfi*,

in linea con quanto riportato in letteratura (Schwenkenbecher et al., 2009), si trovava al di fuori del cluster del complesso *C. obsoletus*. Le sequenze delle specie *C. imicola* e *C. newsteadi* clusterizzavano vicine tra loro e con le corrispondenti sequenze di riferimento ottenute da GenBank, ad eccezione di quelle degli esemplari *C. newsteadi* delle province di Ragusa e Siracusa che clusterizzavano vicine alle sequenze delle specie *C. impunctatus*, *C. lupicaris* e *C. pulicaris*.

Tale pannello di DNA di *Culicoides* è stato utilizzato per testare le sonde disegnate e per la messa a punto della RLB. La sonda per il *C. obsoletus* complex, si è rivelata in grado di riconoscere il DNA degli esemplari appartenenti sia alla specie *C. obsoletus* s.s. sia *C. scoticus*. Non è stato possibile determinare se è in grado di riconoscere anche il DNA delle specie *C. chiopterus*, *C. dewulfi*, in quanto non sono stati rinvenuti esemplari appartenenti a tali specie. Non si è osservata alcuna aspecificità tra questa sonda e il DNA delle specie esaminate, ad eccezione della reazione aspecifica verso il DNA di alcuni esemplari di *C. newsteadi*, che si aveva solo a 400 pmol. La sonda *catch all* riconosceva il DNA di tutte le specie o complessi di specie inclusi nell'analisi. Per quanto riguarda le sonde specie-specifiche, sia la sonda per *C. obsoletus* s.s. che per *C. scoticus* si sono rivelate molto specifiche. La sonda per la specie *C. newsteadi*, oltre a riconoscere il DNA degli esemplari di quella specie, ha dato qualche segnale aspecifico nei confronti del DNA di *C. pulicaris*. La sonda per la specie *C. pulicaris* e quella per *C. imicola* si sono rivelate sia sensibili che specifiche producendo un segnale forte solo in presenza del DNA delle corrispondenti specie. Per quanto riguarda le specie *C. chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. grisescens*, *C. impunctatus*, *C. punctatus* e *C. lupicaris*, non è stato possibile reperire esemplari appartenenti ad esse. Tali sonde sono state incluse nella membrana per valutare l'eventuale cross-reazione con le altre specie. Non sono state evidenziate reazioni aspecifiche per queste sonde, ad eccezione della sonda per *C. chiopterus* che ibridizzava con il DNA di *C. newsteadi*.

Il progetto descrive il primo tentativo di ottimizzazione di una Reverse Line Blot in grado di discriminare le principali specie di *Culicoides*. Attraverso l'utilizzo di sonde multiple, la tecnica permette di analizzare i campioni simultaneamente verso le diverse specie. La tecnica permette di superare alcuni limiti sia dell'identificazione morfologica che di quella molecolare basata sulla PCR barcoding. La nuova metodica, pur necessitando di qualche aggiustamento per migliorare la specificità di alcune sonde, quali quelle verso *C. newsteadi* e verso *C. chiopterus*, potrà rappresentare uno strumento efficace nel campo della sorveglianza entomologica, migliorando anche la sorveglianza delle malattie trasmesse da questi vettori.

Riferimenti bibliografici essenziali:

- Baylis M. The re-emergence of bluetongue Vet. J., 164: 5-6 (2002).
- Baylis M., Mellor P.S. Bluetongue around the Mediterranean in 2001. Vet. Rec., 149, 659 (2001).
- Dallas JF, Cruickshank RH, Linton YM, Nolan DV, Patakakis M, Braverman Y, Capela R, Capela M, Pena I, Meiswinkel R, Ortega MD, Baylis M, Mellor PS, Mordue Luntz AJ. Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel. Med Vet Entomol. 17 (4):379-87. (2003)
- Vanbinst T., Vandenbussche F., Vandemeulebroucke E., et al. Bluetongue virus detection by realtime RT-PCR in *Culicoides* captured during the 2006 epizootic in Belgium and development of an internal control. Transbound Emerg Dis, 56(5): 170-7 (2009).

Keywords: *Culicoides*, Bluetongue, barcoding, Reverse Line Blot, identificazione molecolare