

Mattia Calzolari

IZSLER

Laboratorio Entomologia Sanitaria - ST Reggio Emilia



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA  
"BRUNO UBERTINI"  
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

LA NOSTRA  
ESPERIENZA,  
LA VOSTRA  
**SICUREZZA.**

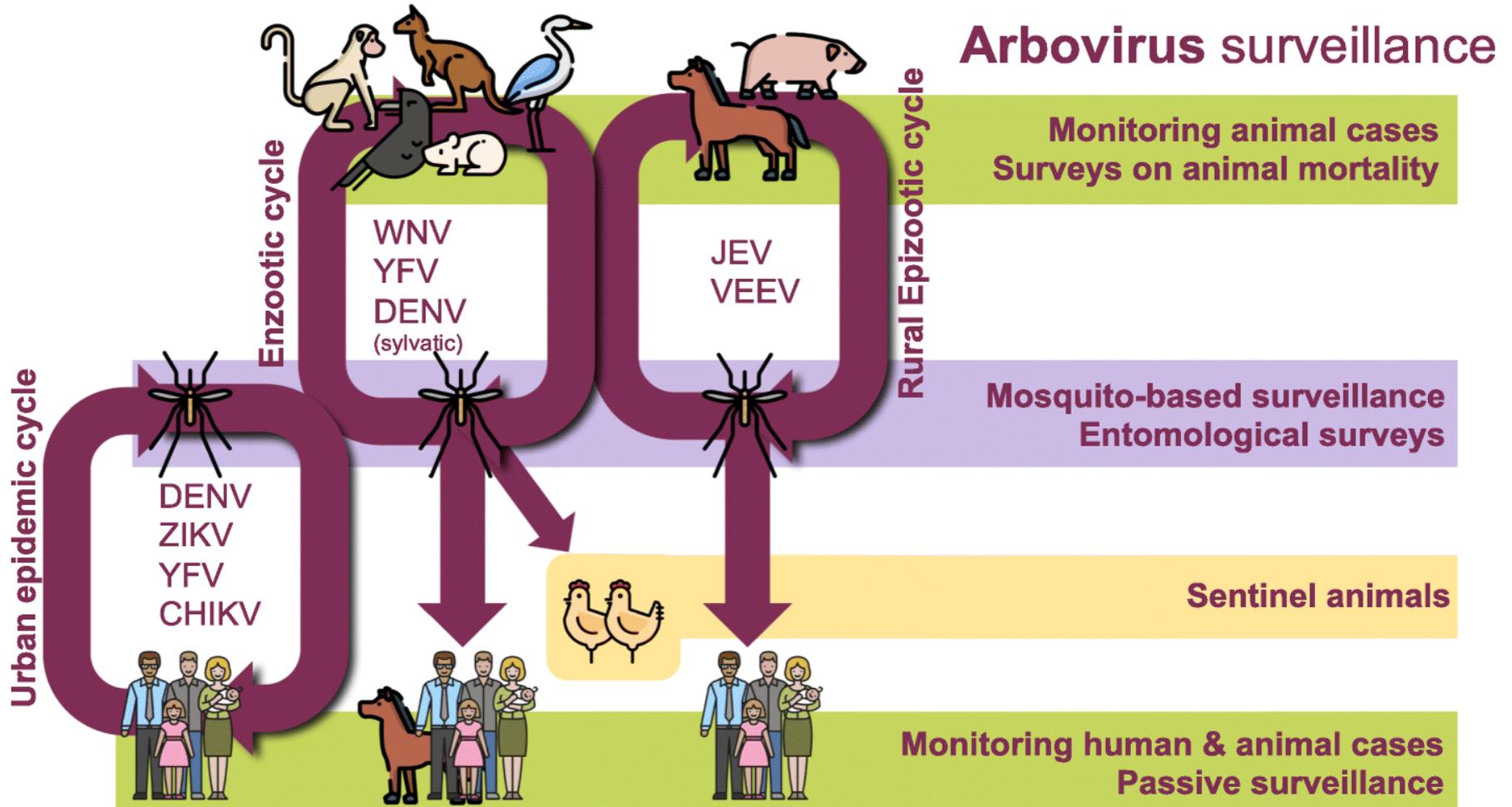
# Analisi virologiche su campioni entomologici a supporto del Piano arboviroosi

Zanzara *Aedes* e la diffusione della dengue  
Bologna – lunedì 6 maggio 2024



- Il Laboratorio di Entomologia Sanitaria IZSLER (ST Reggio Emilia, Laboratorio di riferimento regionale per la diagnostica di malattie trasmesse da vettori negli animali e negli artropodi e per l'entomologia sanitaria) è coinvolto nella sorveglianza di diversi virus trasmessi da diversi vettori
  - West Nile virus e Usutu virus nelle zanzare
  - Toscana virus nei flebotomi
  - Tick borne encephalitis nelle zecche
- Vettori e patogeni diversi richiedono metodi di sorveglianza diversi







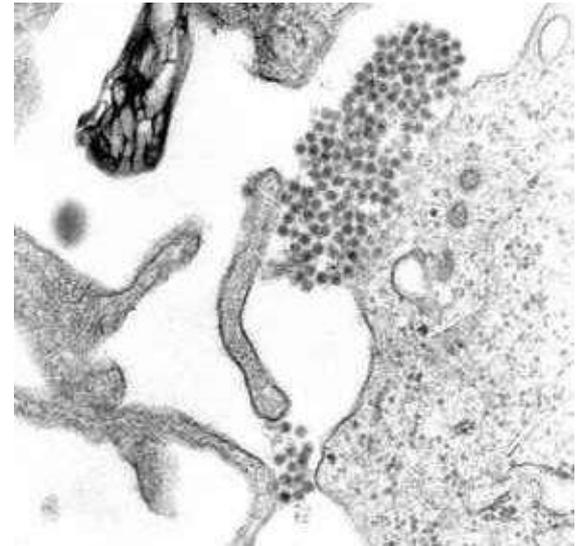
# Dengue e zanzare invasive



- Dengue virus (genere *Orthoflavivirus*), ssRNA+, 4 sierotipi principali con medesima epidemiologia ma geneticamente distinti
- La zanzara tigre è un vettore competente
- Rischio introduzione di *Aedes aegypti*

## Attività laboratorio

- Rilevazione del virus nel vettore
- Monitoraggio delle zanzare invasive
- Resistenza agli insetticidi



*Ae. albopictus*

*Ae. aegypti*



# Sorveglianza entomologica



Efficacia dei diversi modelli di trappola per diverse zanzare invasive

**Table 5: Methods of collection of IMS adult or detection by egg collection and their efficacy according to mosquito species**

Targeted species	Host-seeking females					Oviposition-seeking females		
	HLC	CO <sub>2</sub> traps	MM (CO <sub>2</sub> )	Light traps	BG-Sentinel	Gravid traps	Sticky traps	Ovitrap
<i>Ae. aegypti</i>	+++	+/-	+	-	++	+/-	++	++
<i>Ae. albopictus</i>	+++	+/-	+	-	++	+/-	++	++
<i>Ae. atropalpus</i>	++	+	+	-	+/-	-	?	+
<i>Ae. japonicus</i>	+	+/-	+	+	+/-	++	+	+/-
<i>Ae. koreicus</i>	?	?	?	?	?	-	?	+
<i>Ae. triseriatus</i>	+++	++	++	?	++	+	+	++

**HLC** = human landing collection; **CO<sub>2</sub> traps** = CO<sub>2</sub>-baited suction traps; **MM** = MosquitoMagnet, CO<sub>2</sub>-baited suction traps with chemical attractant; **light traps** = light-baited suction traps; **BG-Sentinel** or **Mosquitaire** = odour-baited suction traps; **gravid traps** = infusion-baited suction traps; **sticky traps** = water/infusion-baited oviposition trap with sticky element; **ovitrap** = water/infusion-baited oviposition traps (only eggs are collected); - low efficacy; + fair efficacy in some situations; ++ good efficacy; +++ excellent performance; ? not known



# Trappole



Trappole a CO<sub>2</sub>

CDC a luce



Black Light mod. Onderstepoort  
Culicoidi (attira anche i flebotomi)

Gravid trap



BG-sentinel zanzare







# Trasporto in laboratorio



## PER RICERCA PATOGENI (MANTENIMENTO CATENA DEL FREDDO)

- Il campione deve essere trasportato in laboratorio il più velocemente possibile
- Refrigerato nella retina di cattura (in modo che le zanzare arrivino vive in laboratorio), se il campione impiegherà più giorni ad arrivare in laboratorio dovrà essere messo in un sacchetto di plastica (mantenimento umidità)

## PER IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

- A secco (per ditteri ematofagi, esclusi culicoidi) in adeguato contenitore rigido refrigerato. Per uccidere gli insetti è possibile utilizzare il congelatore a  $-20^{\circ}\text{C}$  per 30-40 min





# Zanzare





# Procedura diagnostica-zanzare



Campionamento delle zanzare  
(trappole attrattive a CO<sub>2</sub>)

Identificazione e formazione pool  
(specie, data, sito)  
Macinazione

Prep. aliquota per analisi biomolecolare  
PCR o RT PCR

Isolamento Virus su culture cellulari

Parte rimanente dell'omogenato stoccata a -80°C

**PCR POSITIVA**

Comunicazione del risultato positivo

Indagini a fini sperimentali (whole genome sequencing, produzione di antigeni per test sierologici, ecc.)

Sequenziamento degli ampliconi (GB Blast)  
Eventuali conferme presso il CRN

Attivazione Misure di Sanità Pubblica



# Dalla zanzara alla ricerca del patogeno



## Omogeneizzazione dei pool monospecifici

- Omogeneizzazione del campione, deve essere rapida ed avvenire in un mezzo Dnasi – Rnasi free (PBS per BM, MEM se si intende procedere con isolamento)
- L'omogenato si può ottenere attraverso vari sistemi comunemente presenti nei laboratori di biologia molecolare
  - Potter in vetro
  - Pestelli in plastica (pellet pestle)
  - O tramite azione meccanica di sfere rame di vetro (no ferro o piombo perché inibiscono la PCR)

## Estrazione DNA RNA

- Tutti i virus di interesse trasmessi da zanzare sono virus a RNA per cui l'estrazione deve essere finalizzata all'isolamento di questo delicato materiale genetico
- Dopo omogeneizzazione occorre rapidamente prelevare l'aliquota di campione da estrarre (tipicamente 200  $\mu$ l) e porlo in un sistema di lisi idoneo a bloccare la degradazione dell'RNA estratto

## Retro-trascrizione

- I virus di interesse dalle zanzare sono a RNA, per cui prima di andare in PCR occorre retro-trascrivere il materiale genetico estratto. RNA estratto -> retrotrascrizione (Tramite random primer (preferibile) Tramite primer specifico)





# Protocolli applicati

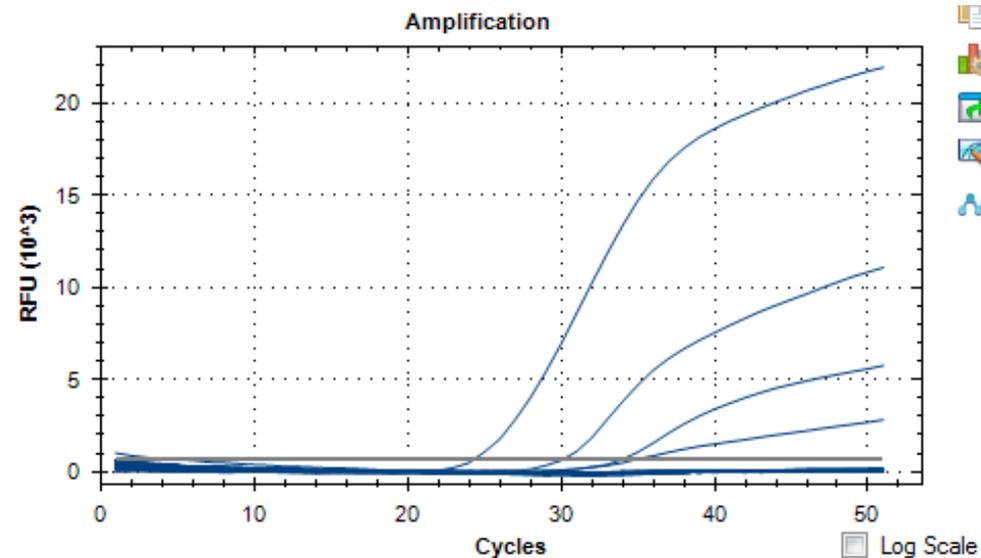
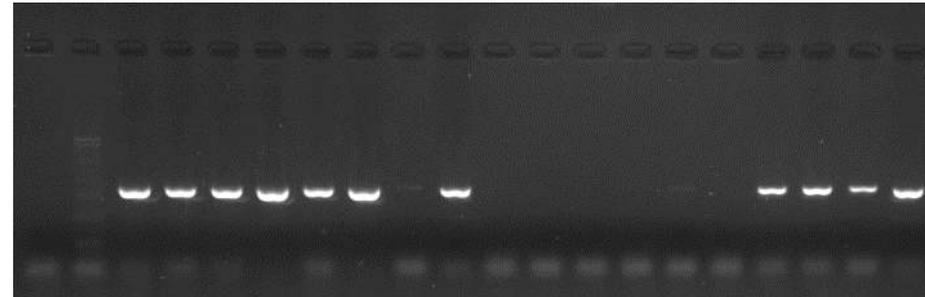


- PCR, Polymerase chain reaction (lettura su gel)
- Real Time PCR, two steps
  - Elevata sensibilità (10-100 volte più sensibile di una PCR tradizionale)
  - Minori problemi di inquinamento
  - Problemi di inibizione della reazione da monitorare durante la reazione
  - Presenza di reazioni che necessitano di conferma (ct>36-38 ciclo)

PCR specifiche per diversi virus più o meno noti (e con diverse probabilità di essere importati)

Dengue viruses (1,2,3,4),  
Chikungunya virus, Zika virus ...

Mayaro virus, O'nyong-nyong virus,  
Oropouche virus





# PCR di Genere e sequenziamento

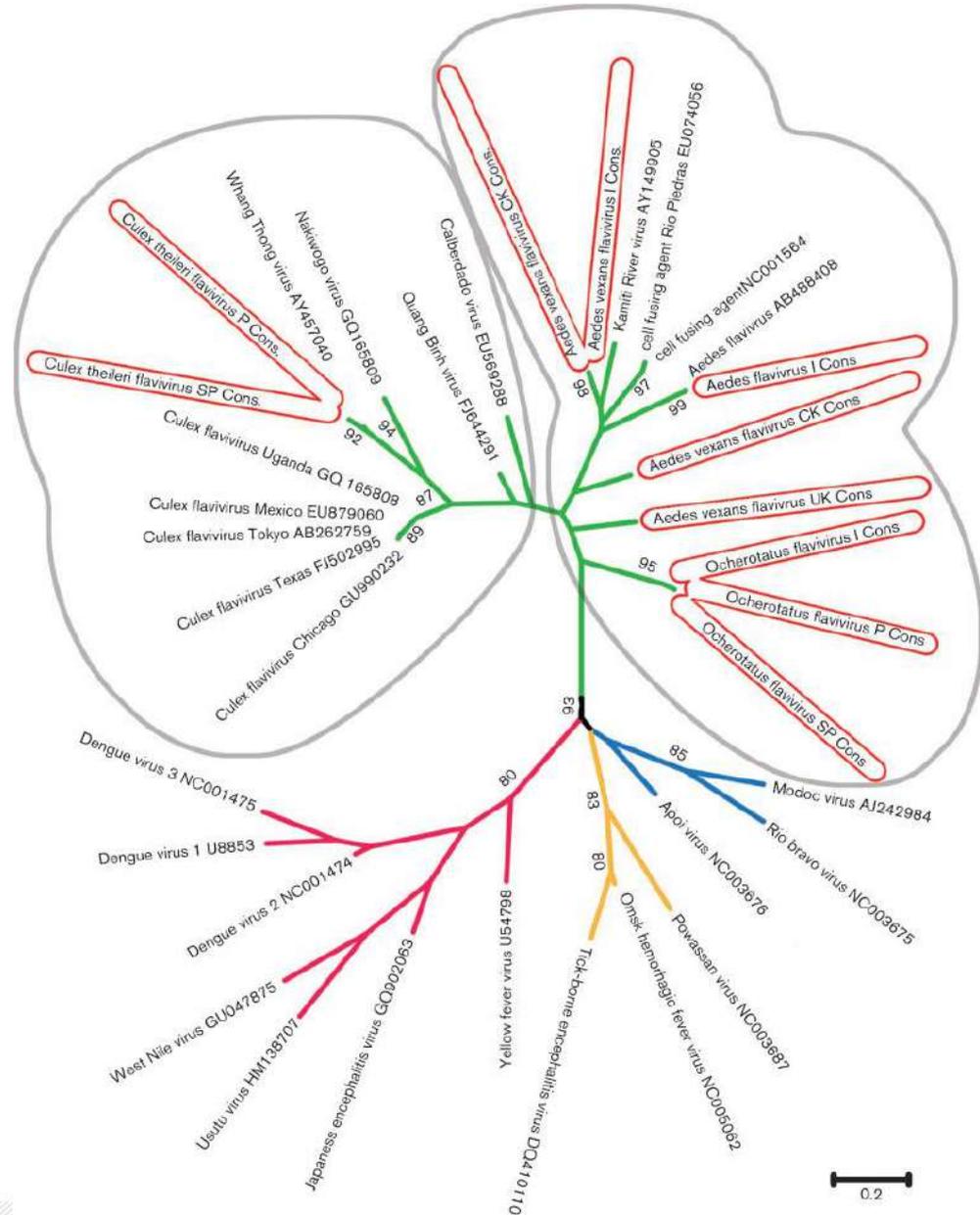


- PCR di genere permettono rilevamento dei virus appartenenti ad un genere virale
- PCR «classica» più sequenziamento
- Rilevanti per il nostro territorio sono almeno queste:
  - PAN-flavivirus PCR *Orthoflavivirus*
  - PAN-bunyavirus PCR *Orthobunyavirus*
  - PAN-phlebovirus PCR *Phlebovirus*



# (Ortho)Flavivirus

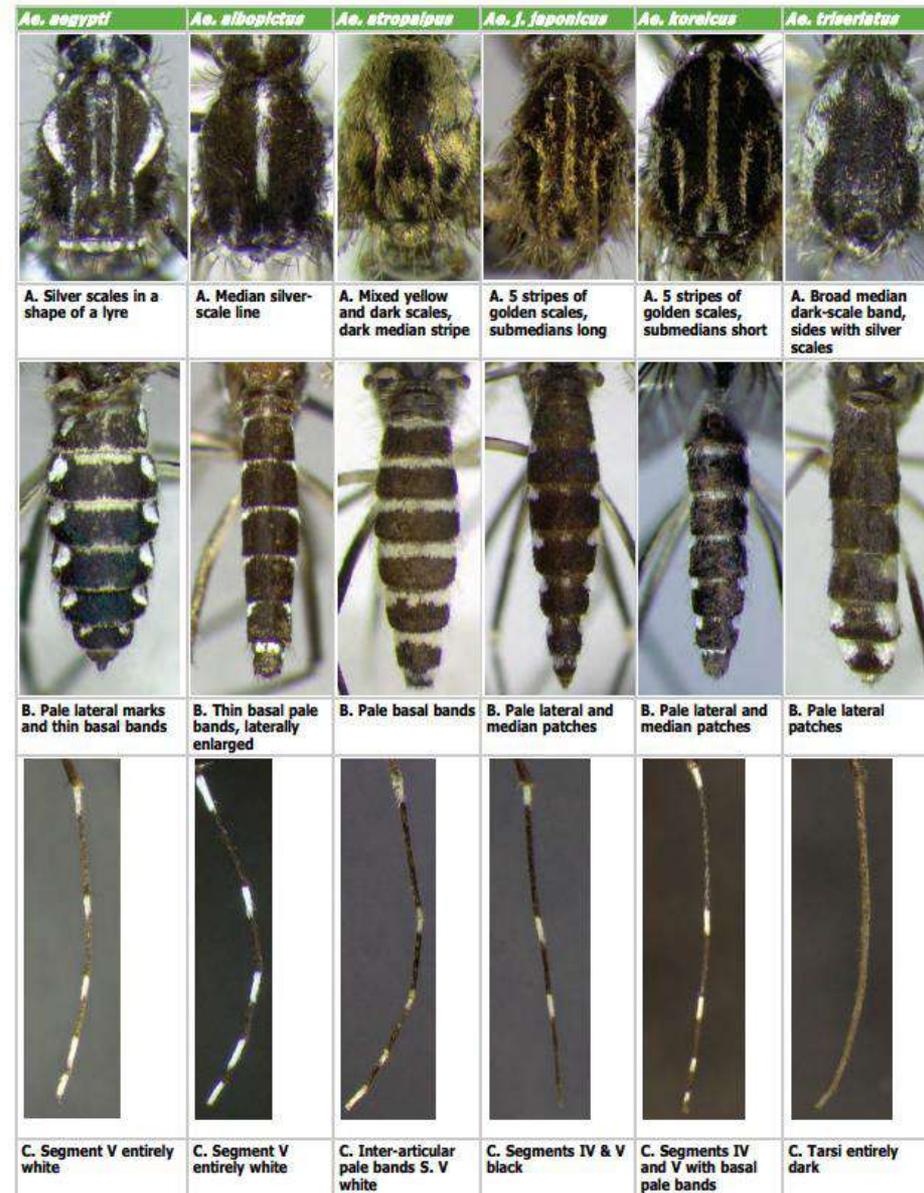
- All'interno di questo genere cadono molti dei principali virus trasmessi da vettori tra cui Dengue, Yellow fever virus, Japanese encephalitis, West Nile virus, St. Louis encephalitis e Usutu virus.
- I primer individuati a questo fine sono stati proposti inizialmente da Kuno et al. al 1998 (cFD2 and MA) e modificati per migliorarne la sensibilità da Scaramozzino et al. 2001 (cFD2 reverse, MAMD forward e FS778 forward eminedsted PCR).
- cFD2  
GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC
- MAMD  
AACATGATGGGGAARAGRGARAA





# Zanzare invasive

- Zanzare esotiche invasive, larve in grado di sfruttare come focolai larvali raccolte d'acqua artificiali
- Identificazione morfologica
- Real Time PCR per identificazione di *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. koreicus*, *Ae. japonicus*





# Resistenza agli insetticidi

- L'utilizzo prolungato degli insetticidi può creare fenomeni di resistenza negli insetti bersaglio
- Questo fenomeno è particolarmente grave in caso di epidemia, in particolare per gli adulticidi

Ricerca resistenze in laboratorio

- Saggi in vivo
- PCR specifiche per valutare le mutazioni legate alle specifiche resistenze

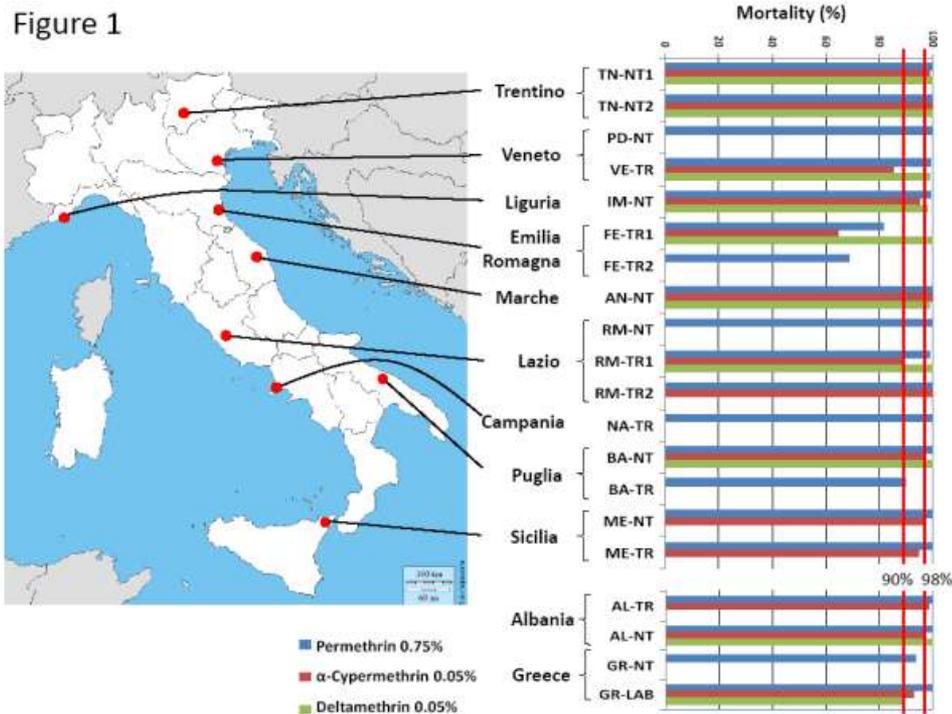


Figure 1 – Distribution of *Aedes albopictus* tested populations and mortality (%) after 1h exposure to pyrethroids. Permethrin 0.75%: blu;  $\alpha$ -cypermethrin 0.05%: red; deltamethrin 0.05%: green. Red vertical lines indicate 90% and 98% mortality thresholds (34,68). Sites for which adulticide treatments have been reported during the sampling season are labelled with –TR. Sites in which adulticide treatments were not carried out during the sampling season are labelled with –NT. GRLAB= laboratory-selected temephos resistant colony.

GRAZIE PER  
L'ATTENZIONE



[mattia.calzolari@izsler.it](mailto:mattia.calzolari@izsler.it)