IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Studi di competenza vettoriale in popolazioni italiane di *Culicoides*

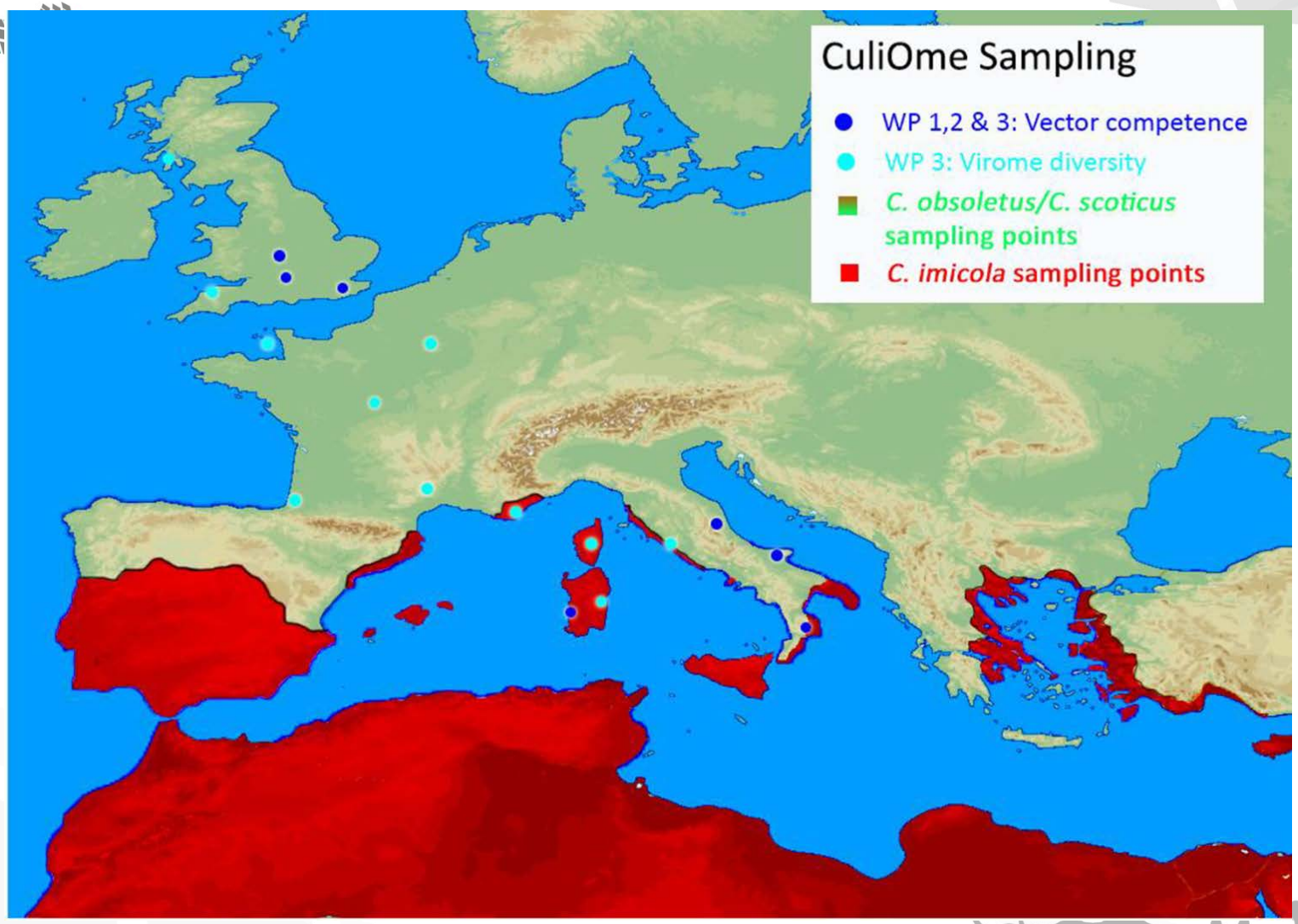
Giuseppe Mancini

Titolo del progetto

Can we predict emergence and spread of *Culicoides*-borne arboviruses in Europe according to genetic drivers of vector competence and virome diversity?

CuliOme – MSAATE0115

Scopo del progetto



Attività IZSAM

- Studi di competenza vettoriale **(WP1)** **<u>IZSAM leader</u>**

- Indagini di viromica **(WP3)**

WP1 + WP3

- Attività di campo
- Attività di laboratorio

Attività di campo

- Selezione dei siti di cattura
- Siti monitorati per WP1 e WP3
- Rete degli IIZZSS + Servizi Veterinari locali

Attività di campo -WP1- competenza vettoriale

Metodo cattura – insetti vivi

- 4-7 trappole luce UV del tipo Blacklight per azienda

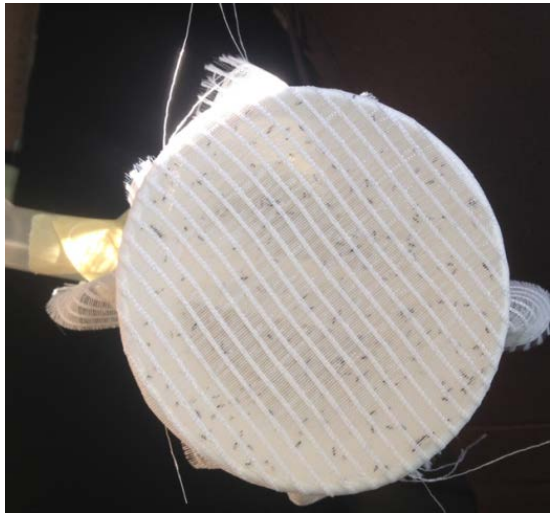
- Accese circa un'ora prima del tramonto
- 2-3 giorni di cattura

Attività di campo -WP1-

- 61 catture di *Culicoides* vivi tra giugno ed ottobre, 2016 e 2017

- *Culicoides* recuperati in Cardbox 64 mm

Attività di campo -WP1-



- *Culicoides* trasferiti in laboratorio e mantenuti per 2 giorni in fase di acclimatamento con soluzione di saccarosio al 10%, seguiti da 1 giorno di digiuno forzato
- 25°C, 40-70%HR

Attività di laboratorio WP1

Alimentazione artificiale - Infezione Orale

Isolati Virali

2016

- **BTV2**, ceppo 2000TE8341, da milza pecora, Sardegna 2000
- **BTV4 ITA**, ceppo 2014TE31172 da sangue pecora, Puglia 2014

2017

- **BTV4 MOR**, ceppo MOR2009-07, da sangue pecora, Marocco 2009
- **BTV8**, ceppo UKG2007-82, da sangue bovino, UK 2007

Attività di laboratorio WP1

Preparazione sangue infetto

- Sospensione virale diluita 1:3, 1:4, 1:5 con sangue di bovino o ovino defibrinato
- Titolazione su cellule VERO, utilizzando la formula di Reed e Muench

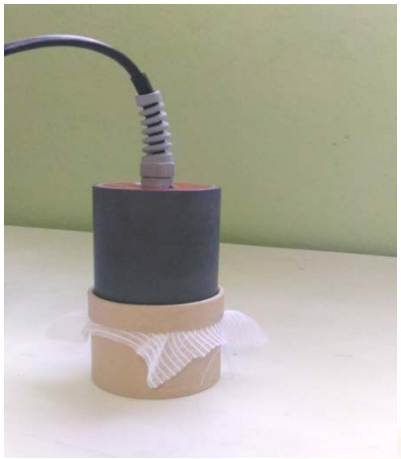
Ceppo BTV	Titolo virale minimo	Titolo virale massimo
BTV4 ITA	10^5,30	10^6,54
BTV2	10^5,01	10^6,14
BTV4 MOR	10^5,68	10^6,39
BTV8	10^5,00	10^6,30

Attività di laboratorio WP1

Alimentazione artificiale - infezione orale

GIORNO 4 (dopo acclimatamento e digiuno)

- alimentazione su membrana (Parafilm) tramite apparecchio Hemotek (sangue a 37°C)



- dischetti di cotone imbevuto di sangue
- durata pasto 45-60 minuti
- in totale 73 pasti infetti

Attività di laboratorio WP1

- alcuni *Culicoides* ingorgati uccisi e testati per BTV a T0

- restanti insetti: 25°C, HR 40-70% per 10 giorni, soluzione di saccarosio al 10%
- a 10 dpi, tutti i *Culicoides* sopravvissuti al periodo di incubazione sono stati u

107 *Culicoides* per popolazione e per ciascun sierotipo BTV a 10 dpi

Attività di laboratorio WP1

- 10 dpi: dissezione per ogni singolo insetto di testa e torace/addome

- Testa e torace/addome conservati in provette distinte a -80°C

Attività di laboratorio WP1

- Teste: ricerca virale

- Torace/addome: indagini di trascrittomica (WP2)

EMBL-EBI

THE Pirbright INSTITUTE

Alimentazione artificiale BTV4 ITA

BTV 4 ITA		Alimentati con Hemotek					Alimentati con cotone				
SPECIE	**SITO**	**INGORGATI**	**NUMERO TOTALE**	**FEEDING RATE (%)**	**0 dpi**	**10 dpi**	**INGORGATI**	**NUMERO TOTALE**	**FEEDING RATE (%)**	**0 dpi**	**10 dpi**
Culicoides obsoletus/scoticus	Lazio Isoletta di Arce						229	752	30.45	**11**	**186**
Culicoides obsoletus/scoticus	Abruzzo Teramo	5	9,139	0.05	0	**4**	566	3,923	14.43	**16**	**190**
Culicoides imicola	Sardegna Bari Sardo	1,107	54,471	2.03	**35**	**359**	330	2,078	15.88	**10**	**258**
Culicoides imicola	Calabria Isola di Capo Rizzuto	0	2,586	0.00	0	0	400	2,196	18.21	**15**	**269**

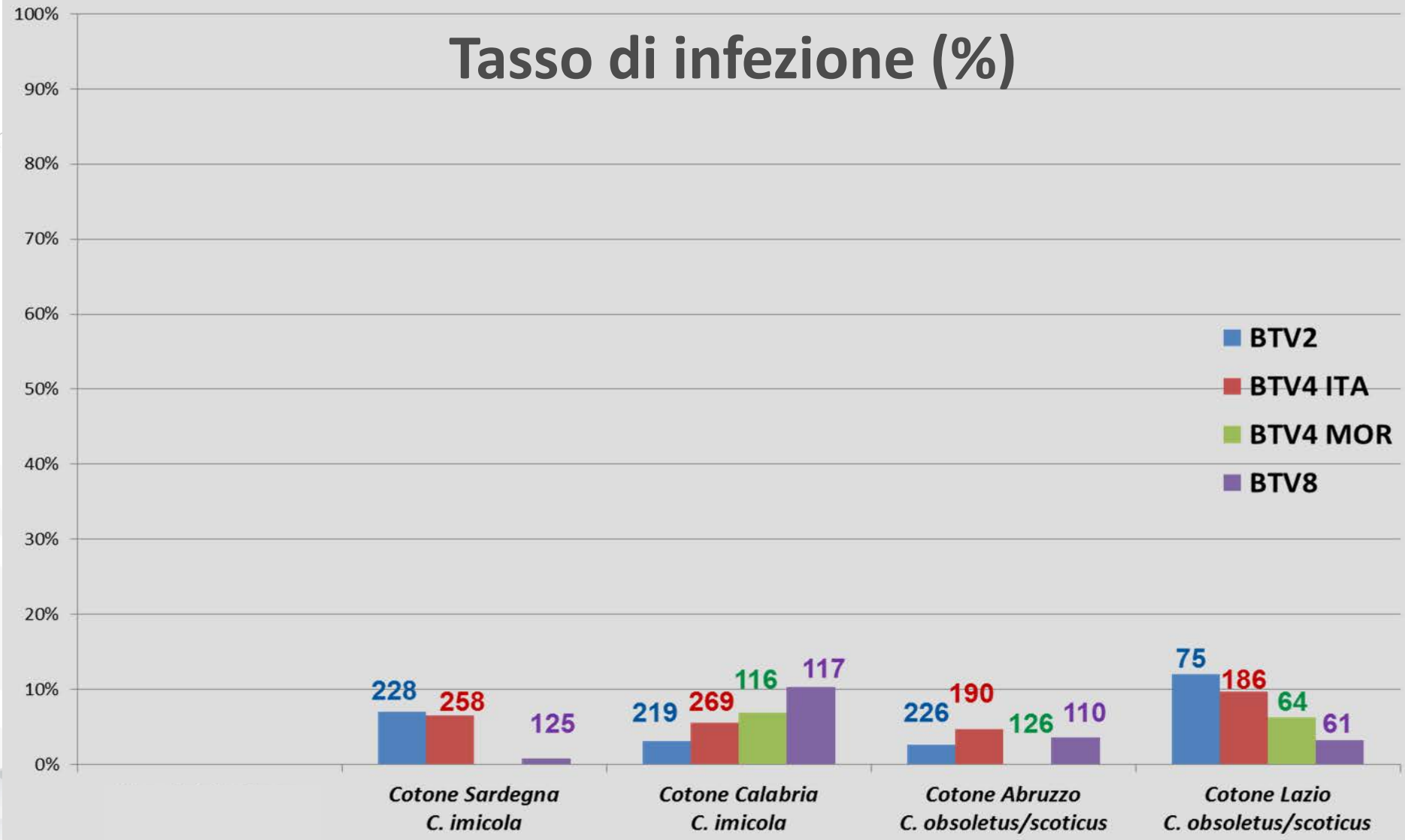
Alimentazione artificiale - infezione orale risultati

	2016		2017	
	BTV 4 ITA	BTV 2	BTV 8	BTV 4 MOR
Lazio *C. obsoletus/scoticus*	✓	✓	✓	✓
Abruzzo *C. obsoletus/scoticus*	✓	✓	✓	✓
Sardegna *C. imicola*	✓	✓	✓	✓
Calabria *C. imicola*	✓	✓	✓	✓

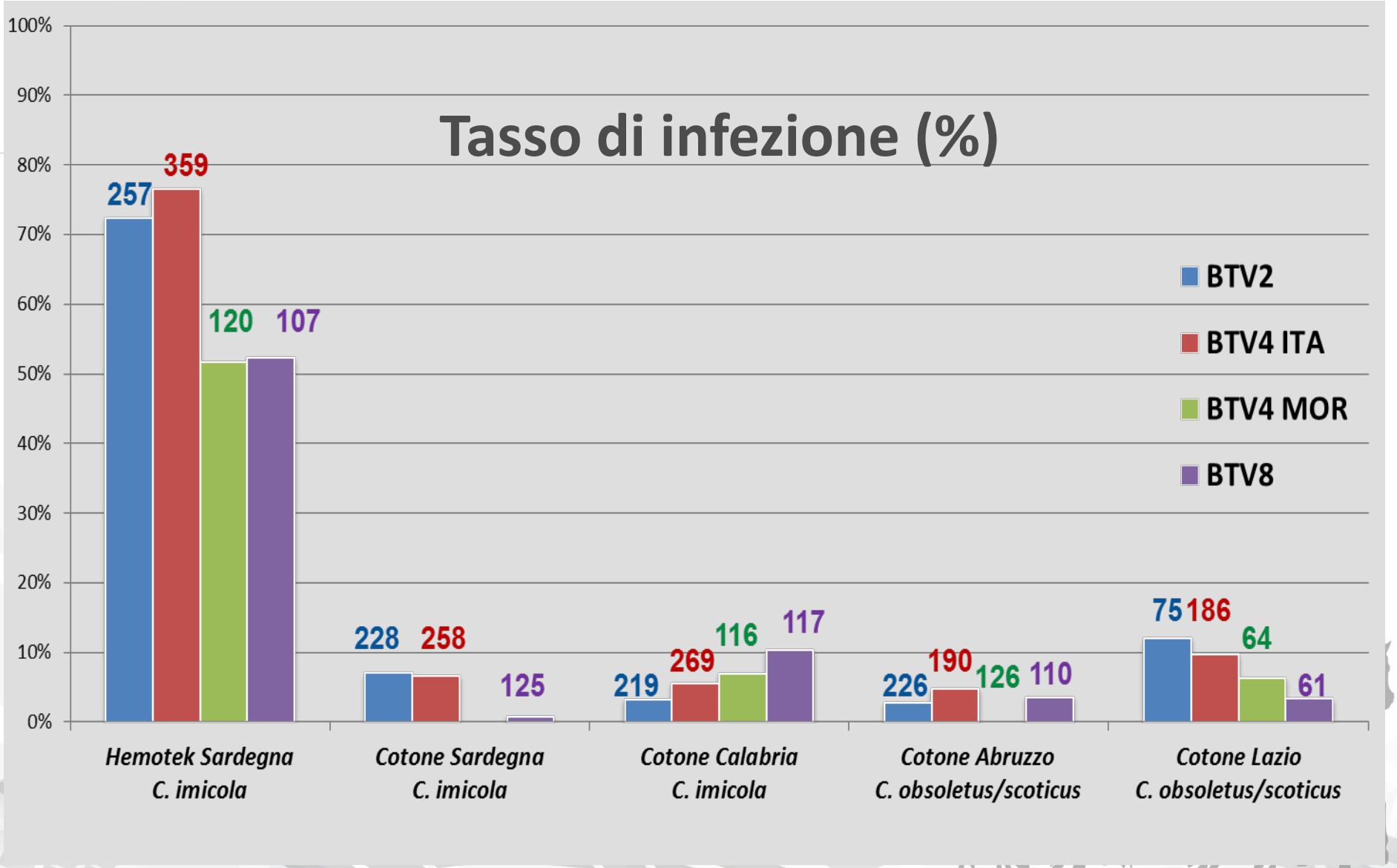
✓ *Culicoides* ≥ 107

✓ *Culicoides* <107

Analisi virologica teste positive 10 dpi



Analisi virologica teste positive 10 dpi



Attività di campo WP3 indagini di viromica

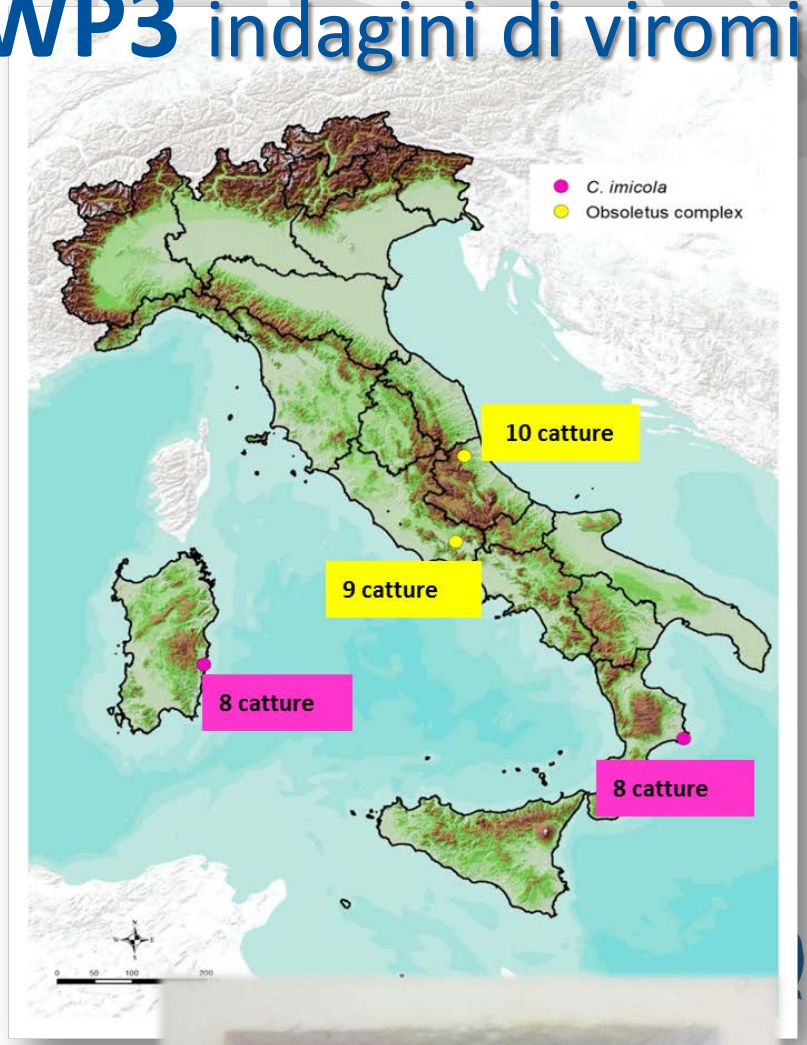
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Metodo cattura – insetti morti

- 1-3 trappole luce UV del tipo Blacklight per azienda
- Accese un'ora prima del tramonto
- 1 cattura al mese
- **35** catture da giugno ad ottobre, 2016-2017

Soluzione RNAlater + detergente

Al mattino seguente recupero del campione e conservazione a +4 °C per trasporto in laboratorio



Attività di laboratorio WP3
indagini di viromica

Identificazione morfologica e preparazione dei pools

- Campioni filtrati e conservati in soluzione di etanolo al 70% a -20°C fino alla successiva identificazione morfologica
- *Culicoides* riposti su un piano refrigerato e identificati allo stereomicroscopio
- Maschi e femmine appartenenti alle specie *C. obsoletus/scoticus* e *C. imicola* raggruppati separatamente
- 600 femmine (min. 100) eccetto ingorgate e gravide riunite in un singolo pool, conservate a -20°C in etanolo 96%
- maschi ritrovati nel campione raggruppati e conservati in pools alle stesse condizioni

58 pools

Dettaglio pools C. imicola – Sardegna

2016

Periodo cattura	No. *Culicoides*	Composizione pools
Luglio	600	296 np + 304 p
	6	maschi
Agosto	600	231 np + 369 p
	52	maschi
Settembre	600	403 np + 197 p
	1	maschio
Ottobre	600	341 np + 259 p
	4	maschi
np: non pigmentate; p: pigmentate		

8 pools femmine 600 (np + p)
8 pools maschi

2017

Periodo cattura	No. *Culicoides*	Composizione pools
Luglio	600	330 np + 270 p
	22	maschi
Agosto	600	283 np + 317 p
	16	maschi
Settembre	600	309 np + 291 p
	1	maschio
Ottobre	600	440 np + 160 p
	2	maschi
np: non pigmentate; p: pigmentate		

2016
4 pools aggiuntivi
1110 *C. imicola* femmine pigmentate

Dettaglio pools C. imicola – Calabria

2016
1 pool - **4**
C.obsoletus/scoticus
femmine non pigmentate

2016

Periodo cattura	No. *Culicoides*	Composizione pools
Luglio	600	413 np+ 187 p
	32	maschi
Agosto	600	308 np + 292 p
	103	maschi
Settembre	389	244 np + 145 p
	13	maschi
Ottobre	600	321 np + 279 p
	35	maschi
np: non pigmentate; p: pigmentate		

8 pools femmine (np + p)
8 pools maschi

2017

Periodo cattura	No. *Culicoides*	Composizione pools
Luglio	367	216 np + 151 p
	116	maschi
Agosto	581	371 np + 210 p
	96	maschi
Settembre	272	194 np + 78 p
	40	maschi
Ottobre	600	349 np+ 251 p
	33	maschi
np: non pigmentate; p: pigmentate		

Dettaglio pools C.obsoletus/scoticus– Abruzzo

2016

Periodo cattura	No. *Culicoides*	Composizione pools
Giugno	600	226 np + 374 p
	7	maschi
Luglio	600	373 np + 227 p
Agosto	600	369 np + 231 p
Settembre	600	207 np + 393 p
Ottobre	600	204 np + 396 p
	1	maschio
np: non pigmentate; p: pigmentate		

10 pools femmine (np + p)
4 pools maschi

2017

Periodo cattura	No. *Culicoides*	Composizione pools
Giugno	600	392 np + 208 p
	3	males
Luglio	383	173 np + 210 p
Agosto	600	295 np + 305 p
	1	male
Settembre	113	66 np + 51 p
Ottobre	397	312 np + 85 p
np: non pigmentate; p: pigmentate		

Dettaglio pools C.obsoletus/scoticus– Lazio

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

2016

Periodo cattura	No. *Culicoides*	Composizione pools
Luglio	600	417 np + 183 p
	6	maschi
Agosto	533	268 np + 265 p
Settembre	600	144 np + 456 p
Ottobre	600	387 np + 213 p
np: non pigmentate; p: pigmentate		

9 pools femmine (np + p)
3 pools maschi

2017

Periodo cattura	No. *Culicoides*	Composizione pools
Giugno	209	154 np + 55 p
	10	maschi
Luglio	162	98 np + 64 p
	1	maschio
Agosto	253	196 np + 57 p
Settembre	118	59 np + 59 p
Ottobre	109	55 np + 54 p
np: non pigmentate; p: pigmentate		

CONCLUSIONI

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

WP1 – WP3

WP2 – invio campioni

***C. imicola* + Hemotek**

Studi competenza vettoriale IZSAM:

BTV, SCHMALLENBERG, EHDV **AHSV**

WNV

Hanno collaborato:

Reparti IZSAM
Entomologia
Virologia

IZS Mezzogiorno, IZS Lazio e Toscana, IZS Puglia e Basilicata, IZS Sardegna

Servizi Veterinari locali