

Sviluppo e valutazione preliminare di una real-time PCR per l'identificazione di *Culicoides obsoletus sensu strictu*, *C. scoticus* e *C. montanus* all'interno del complesso *Obsoletus* in Italia

Federica Monaco, Leonardo Benedetto, Valeria Di Marcello, Rossella Lelli & Maria Goffredo

Riassunto

Oggetto dello studio è la messa a punto di un metodo PCR real time che utilizza il Power SYBR Green come colorante fluorescente intercalante, seguito dall'analisi delle curve di melting in fase di post-amplificazione. La sequenza target è l'*Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2) del DNA ribosomiale e rappresenta l'evoluzione della metodica tradizionale PCR gel-based utilizzata per identificare tre differenti specie di *Culicoides* incluse nel cosiddetto *Obsoletus complex*. Con il metodo sviluppato sono stati analizzati centoquaranta *Culicoides* morfologicamente classificati come appartenenti all'*Obsoletus complex*, e i risultati confrontati con quelli ottenuti combinando l'identificazione morfologica con PCR su gel. Mediante l'analisi del pattern specie-specifico delle curve di dissociazione, è stato possibile identificare tra gli insetti 52 *C. scoticus*, 82 *C. obsoletus sensu strictu* e 6 *C. montanus*. Questi risultati concordano con quelli ottenuti combinando l'identificazione morfologica con la PCR gel-based che rappresenta il metodo impiegato di routine nelle attività diagnostiche del piano di sorveglianza entomologico della Bluetongue. Considerando la flessibilità diagnostica, la rapidità, la possibilità di automazione, il più elevato livello di qualità ed espressione dei risultati, la PCR real time ITS2

ha dimostrato di essere più funzionale ed efficace rispetto alla PCR su gel, soprattutto nell'ambito di un'estesa attività di monitoraggio.

Parole chiave

Bluetongue, *Culicoides*, *Culicoides montanus*, *Culicoides obsoletus*, *Culicoides scoticus*, Italia, PCR Real-time, *Obsoletus complex*, Virus.

Introduzione

La bluetongue (BT) è una malattia virale infettiva non contagiosa trasmessa da vettori, che colpisce i ruminanti domestici e selvatici. E' causata dal virus della bluetongue (BTV), virus a RNA a doppia catena della famiglia *Reoviridae*, genere *Orbivirus* (7) di cui sono stati identificati ventiquattro diversi sierotipi (9). Il BTV è trasmesso da vettori biologici appartenenti al genere *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Negli ultimi 10 anni la BT ha causato gravi perdite economiche nel settore zootecnico europeo. Come vettori, i *Culicoides* svolgono un ruolo essenziale nel determinare la presenza e la diffusione del virus in tutto il mondo (10). Diverse specie di *Culicoides* sono coinvolte in Europa nella trasmissione del BTV, a diverse latitudini, in una serie di nuovi focolai. Nei paesi

Laboratorio di riferimento OIE per la bluetongue; Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italia
f.monaco@izs.it

meridionali *Culicoides imicola* Kieffer, 1913, è ancora il più importante vettore, anche se insetti del *Pulicaris* (2) e dell'*Obsoletus complex* (5, 19) potrebbero aver svolto un ruolo importante. Al contrario, le specie dell'*Obsoletus complex* insieme a *C. dewulfi* Goetghebuer, 1936 e *C. chiopterus* Meigen, 1830 (8, 17) sono considerati i principali vettori del BTV nei paesi dell'Europa settentrionale.

L'*Obsoletus complex* in Italia comprende almeno tre specie:

- *C. obsoletus* Meigen, 1818,
- *C. scoticus* Downes e Kettle, 1952
- *C. montanus* Schakirzjanova, 1962.

La loro identificazione basata solo sulla morfologia è molto difficile, pertanto sono raggruppate in un "complesso" (16).

In Italia, dopo i primi focolai di bluetongue nel 2000, è stato implementato un Piano Nazionale di Sorveglianza per la BT (PSN) che comprende anche attività entomologiche (14) dal momento che la conoscenza delle specie di *Culicoides* coinvolte nella circolazione del BTV è cruciale per predire e comprendere l'evoluzione dell'infezione. La sorveglianza entomologica si basa su catture settimanali di *Culicoides* in circa 200 siti permanenti in tutta Italia, secondo i metodi standardizzati per la raccolta e l'identificazione degli insetti (11). Attualmente viene utilizzata una identificazione molecolare tramite PCR su gel (12, 13) per integrare e migliorare l'identificazione morfologica nonché differenziare *C. obsoletus sensu strictu* (ss), *C. scoticus* e *C. montanus* a livello di specie.

La combinazione dell'identificazione morfologica e di quella bio-molecolare, nonostante il miglioramento della accuratezza, è una procedura piuttosto complessa, non adeguata ad una indagine entomologica che processa di routine una grande quantità di campioni. In questo contesto un sistema di PCR real-time (rPCR) potrebbe rivelarsi più efficiente dal momento che la sua flessibilità di diagnostica, la velocità, il basso rischio di contaminazione e l'oggettività della interpretazione rendono la procedura di prova più funzionale e molto più rapida rispetto alla PCR convenzionale. Inoltre, poiché il target amplificato viene

rilevato durante i cicli di PCR, il processo può essere facilmente automatizzato e la mancata manipolazione dei prodotti amplificati riduce notevolmente il rischio di contaminazioni, spesso ulteriore motivo di dubbio nell'interpretazione dei risultati nei sistemi convenzionali di PCR, soprattutto quando viene processato un elevato numero di campioni. Questo studio descrive lo sviluppo e la valutazione di una rPCR disegnata sull'Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) del DNA ribosomiale per l'identificazione di *C. obsoletus ss*, *C. scoticus* e *C. montanus*, all'interno dell'*Obsoletus complex*.

Materiali e metodi

Insetti

Venticinque *Culicoides*, di cui 10 *C. obsoletus s.s.* maschi, 10 *C. scoticus* maschi e 5 *C. montanus* femmine, raccolti all'interno del Piano di Sorveglianza Nazionale, sono stati selezionati per la messa a punto del metodo e per la costruzione dei plasmidi di controllo. La specie di appartenenza degli insetti è stata identificata morfologicamente (1, 6), e geneticamente, confrontando le sequenze di DNA dell'ITS2 con quelle pubblicate in Genbank.

Estrazione del DNA e PCR real time specie-specifica

Il DNA totale è stato estratto dai singoli insetti mediante il sistema automatizzato Maxwell 16 (Promega, Madison, Wisconsin, USA) con il kit DNA IQ casework, secondo le istruzioni del produttore, e il DNA eluito in 20 µl di acqua DNase free.

È stata messa a punto e ottimizzata una rPCR multiplex sul segmento ITS2 del rDNA. Il DNA dei singoli insetti è stato amplificato utilizzando i primer elencati nella Tabella I (13). Il volume di reazione è stato di 25 µl, costituito da 12,50 µl di Power SYBR Green (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 1 µM di primer 5.8SF e MON227R, 0,2 µM dei primer 28SR, SCOT194R e MOU316F, e 5 µl di DNA. La PCR è stata effettuata utilizzando il 7900 HT fast real-time PCR system (Applied Biosystems).

Tabella I
Coppie di primers usati nello studio e profilo di amplificazione

Target	Primer pairs	Amplificato (bp)
ITS 2	5.8 SF-28 SR	400
<i>Culicoides montanus</i>	5.8 SF-MON227R	252
<i>C. scoticus</i>	5.8 SF-SCOT194R	213
<i>C. obsoletus</i> ss, <i>C. montanus</i>	MOU316F-28 SR	89

ITS2 internal transcribed spacer 2

L'amplificazione è stata articolata in una prima fase a 95°C per 10 minuti per l'attivazione della polimerasi, uno step iniziale di denaturazione a 95°C per 30 s, seguito da 40 cicli a 95°C per 30 s, a 58°C per 30 s e a 72°C per 30 s. Al termine della PCR è stata effettuata l'analisi della curva di melting in una fase di denaturazione da 60°C a 95°C con un incremento di temperatura standard. I valori del picco T_m sono stati assegnati come riportati dal software SDS 2.3 (Applied Biosystems).

Cloni positivi

Per evitare risultati falsi negativi dovuti ad una mancata amplificazione e per creare i controlli positivi per la PCR, le sequenze target specie-specifiche di *C. obsoletus* ss, *C. scoticus* e *C. montanus* sono state clonate in plasmidi batterici.

L'intero target ITS2 è stato amplificato per ogni specie e i prodotti purificati sono stati sequenziati con i primer esterni descritti. La reazione di sequenziamento è stata realizzata utilizzando il kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems), l'eccesso di marcatori fluorescenti è stato rimosso con il kit di purificazione Big Dye X Terminator (Applied Biosystems) e le sequenze nucleotidiche sono state determinate con il sequenziatore di DNA ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). I dati grezzi delle sequenze sono stati assemblati con Contig Express (Vector NTI Suite 9.1, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e le sequenze consenso sono state allineate e comparate alle omologhe disponibili su Genbank: AY599796, AY599811 (*C. scoticus*), AY599779, AY599769 (*C. montanus*), AY599780, AY599795 (*C. obsoletus* ss) con ClustalX (21).

I prodotti PCR purificati sono stati clonati in plasmidi PCR4 Topo (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizzando cellule chimicamente

competenti di *E. coli*. Per valutare l'assenza di mutazioni indotte dalla procedura di clonazione, cloni positivi sono stati selezionati mediante analisi di restrizione e quindi sequenziati come descritto in precedenza. I batteri trasformati sono stati conservati a -70°C in glicerolo e inclusi come controlli positivi nelle reazioni di amplificazione.

Studio in campo

Per valutare la robustezza della PCR, 140 femmine adulte appartenenti al complesso *Obsoletus* e selezionate in modo casuale, sono state identificate utilizzando due differenti PCR su gel (13, 3) e la real-time PCR, e i risultati sono stati confrontati.

Risultati

rPCR specie-specifica e cloni positivi

Il prodotto dell'amplificazione delle tre specie è stato clonato e sequenziato. L'allineamento delle sequenze prodotte in questo studio con quelle omologhe pubblicato in Genbank ha confermato che le sequenze clonate non hanno subito modificazioni e sono orientate correttamente all'interno dei plasmidi (Figura 1).

La regione target dei 25 insetti è stata amplificata mediante rPCR. La visualizzazione grafica della curva di dissociazione ottenuta in presenza di Power SYBR green ha prodotto picchi di melting chiaramente distinguibili, uno di 73,1° (deviazione standard [DS] \pm 0,2) per *C. obsoletus* ss, uno di 79,2°C (DS \pm 0,2) per *C. scoticus* e due picchi di 72,4°C (DS \pm 0,2) e 79,2°C (DS \pm 0,4) per *C. montanus* (Figura 2).

Studio in campo

I 140 moscerini femmina sono stati esaminati mediante una PCR su gel comunemente impiegata nel laboratorio entomologico

dell'IZS A&M che amplifica l'ITS2 e confermati con un secondo test PCR su gel che amplifica l'ITS1. Gli stessi campioni sono stati quindi testati con il metodo real-time PCR sviluppato, e tutti i test hanno identificato 52 moscerini come *C. scoticus*, 82 come *C. obsoletus* ss e 6 moscerini come *C. montanus*. Il valore medio di T_m per *C. scoticus* è stato $79,3^\circ\text{C}$ ($DS \pm 0,5$), per *C. obsoletus* ss è stato $73,2^\circ\text{C}$ ($DS \pm 0,5$) e per *C. montanus* è stato evidenziato un primo picco con un valore di T_m di $72,8^\circ\text{C}$ ($DS \pm 0,2$) e un secondo picco di $79,2^\circ\text{C}$ ($DS \pm 0,2$).

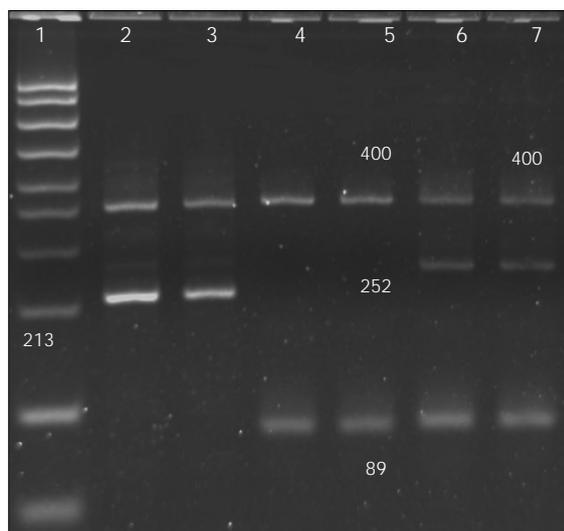


Figura 1
Profilo di amplificazione dei plasmidi specie-specifici
Colonna 1 Marker DNA 50-2000 bp (Biorad, Hercules, CA, USA)
Colonne 2-3 Plasmide *C. scoticus*
Colonne 4-5 Plasmide *C. obsoletus* ss
Colonne 6-7 Plasmide *C. montanus*
I numeri indicano la grandezza degli amplificati

Discussione

La tecnologia molecolare è sempre più spesso utilizzato nel settore entomologico, così come in altri settori diagnostici. Attualmente Sono disponibili per l'identificazione numerose procedure molecolari che hanno come bersaglio diversi segmenti del genoma delle specie di *Culicoides*. Le tecniche più comunemente utilizzate sono quelle dirette contro ITS2 rDNA (13) o ITS1 rDNA (3, 15, 20) o la sequenza della subunità I della citocromo ossidasi mitocondriale (COI) (18). Esse

vengono utilizzate principalmente per supportare l'identificazione fenotipica convenzionale quando non è possibile distinguere le specie di *Culicoides* solo in base alla morfologia. Il loro impiego è frequente per le specie appartenenti al complesso *Obsoletus* in cui le femmine di specie quali *C. obsoletus* ss, *C. scoticus* e *C. montanus* sono estremamente difficili da separare in base alle chiavi classiche di identificazione morfologica.

L'identificazione di tali specie e la determinazione della loro distribuzione è un'informazione estremamente importante dal punto di vista epidemiologico. È un dato di fatto che le specie dell'*Obsoletus* complex siano diffuse in tutta Europa e che alcune siano coinvolte nella trasmissione del BTV nel Nord Europa.

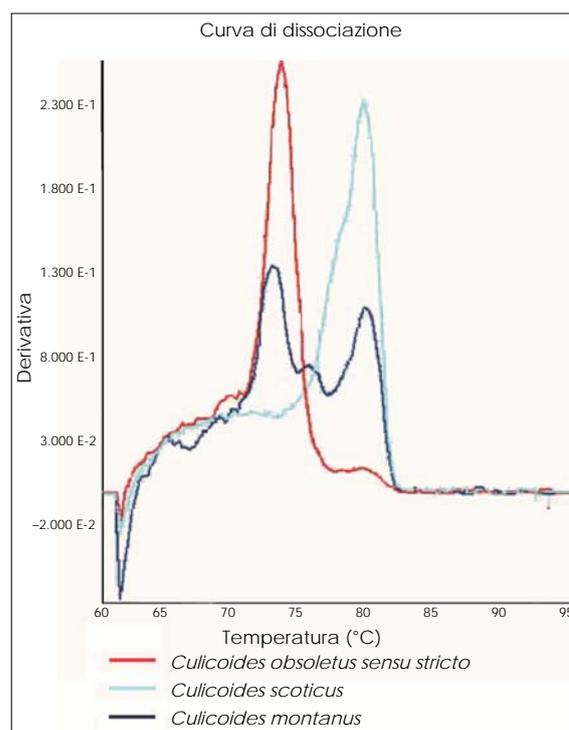


Figura 2
Analisi della amplificati ottenuti testando plasmidi contenenti l'ITS2 del rDNA di *Culicoides obsoletus*, *C. scoticus* e *C. montanus*
La real-time PCR è stata realizzata utilizzando il Power SYBR Green come colorante e il 7900HT (Applied Biosystems, Carsberg, CA, USA). A seguito dell' i prodotti sono stati analizzati per la temperatura alla quale la doppia elica del DNA si dissocia
Questa analisi della curva di dissociazione ha evidenziato un pattern specie-specifico

Per affrontare il problema dell'identificazione all'interno dell'*Obsoletus* complex, è stata associata all'identificazione morfologica convenzionale (12) una PCR su gel per il frammento ITS2 rDNA (13).

Nonostante il miglioramento dell'efficacia diagnostica rispetto all'identificazione morfologica convenzionale, la PCR su gel, tuttavia, conserva ancora alcune carenze che potrebbero rappresentare una grave lacuna, in uno scenario come quello del PSN in cui devono essere rapidamente identificati migliaia di insetti. In questa circostanza una PCR Real Time potrebbe essere molto più funzionale. Ad oggi solo una PCR Real Time è stata sviluppata e utilizzata con successo per l'identificazione di *Culicoides imicola* (4). In questo studio è stata sviluppata una PCR Real Time sul ITS2 di rDNA, in grado di identificare correttamente le specie di *C. obsoletus* ss, *C. scoticus* e *C. montanus*. I picchi di melting sono risultati chiari e ben definiti per i plasmidi e i campioni di insetti. Nonostante sia stato segnalato nei campioni di campo un leggero aumento della DS, dovuto probabilmente alla diversa quantità di DNA utilizzata nelle reazioni, le temperature medie sono risultate chiaramente distinte e non si è verificata sovrapposizione tra i picchi specie-specifici. Grazie ad un sistema automatizzato di estrazione del DNA, il nuovo sistema sviluppato è stato più veloce rispetto alla PCR su gel. L'automazione della fase di estrazione del DNA da un intero insetto ha migliorato anche la qualità del prodotto ottenendo livelli di purezza elevati. La purezza del DNA si è rivelata un fattore importante in grado di interferire con la successiva fase di amplificazione (F. Monaco, dati non riportati). In ogni seduta sono stati inclusi i plasmidi contenenti le sequenze bersaglio specie-

specifiche per l'amplificazione. Questo ha permesso di monitorare il processo di amplificazione, per evitare false reazioni dovute a fenomeni di inibizione della PCR e fornire per ciascuna specie identificata, se correttamente amplificata, un picco di «riferimento» per l'interpretazione dei risultati. Un altro vantaggio del nuovo metodo è la possibile applicazione su parti (es. zampe) di insetti (dati non riportati) senza perdere l'efficacia diagnostica. Questo permette di conservare le restanti parti, come ali e corpo, per ulteriori indagini morfologiche e/o virologiche. La possibilità di effettuare sia l'identificazione molecolare che l'isolamento del virus su un numero elevato di insetti sarebbe di grande utilità nella valutazione della competenza vettoriale.

Conclusioni

Sulla base di questi risultati si può concludere che il metodo fluorogenico di PCR real-time su ITS2 di rDNA sviluppato in questo studio è stato in grado di identificare correttamente le specie *C. obsoletus* ss, *C. scoticus* e *C. montanus*, raggiungendo il 100% di concordanza con la PCR su gel. Anche se sono necessari ulteriori test per conclusioni più esaurienti, grazie alla sua flessibilità diagnostica, rapidità di risultato, capacità di automazione, elevata qualità dei risultati e dell'espressione degli stessi, la PCR real time su ITS2 di rDNA sembra essere più funzionale ed efficace rispetto alla PCR su gel, specialmente quando si è alle prese con una estesa attività di monitoraggio come quella di un piano di sorveglianza su scala nazionale.

Bibliografia

1. Campbell J.A. & Pelham-Clinton E.C. 1960. A taxonomic review of the British species *Culicoides* Latreille (Diptera, Ceratopogonidae). *Proc R Soc Edinb (B)*, **67**, 181-302.
2. Caracappa S., Torina A., Guercio A., Vitale F., Calabrò A., Purpari G., Ferratelli V., Vitale M. & Mellor P.S. 2003. Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Vet Rec*, **153**, 71-74.
3. Cetre-Sossah C., Baldet T., Delécolle J.-C., Mathieu B., Perrin A., Grillet C. & Albina E. 2004. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Vet Res*, **35**, 325-337.

4. Cetre-Sossah C., Mathieu B., Setier-Rio M.L., Grillet C., Baldet T., Delécolle J.-C. & Albina E. 2008. Development and evaluation of a real-time PCR assay for *Culicoides imicola*, one of the main vectors of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Res Vet Sci*, **85** (2), 372-382.
5. De Liberato C., Scavia G., Lorenzetti R., Scaramozzino P., Amaddeo D., Cardati G., Scicluna M., Ferrari G. & Autorino G.L. 2005. Identification of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus in central Italy. *Vet Rec*, **156**, 301-304.
6. Delécolle J.-C. 1985. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du nord-est de la France. PhD thesis, Université Louis Pasteur de Strasbourg, UER des sciences de la vie et de la terre, Strasbourg, 238 pp (bluetongue.cirad.fr/FichiersComplementaires/1985_Delecolle_TheseOriginaleCulicoides.pdf ultimo accesso il 1 Giugno 2010).
7. de Mattos C.A., de Mattos C.C., Osburn B.I. & MacLachlan N.J. 1994. Evolution of the L2 gene of strains of bluetongue virus serotype 10 isolated in California. *Virology*, **201**, 173-177.
8. Dijkstra E., van der Ven I.J.K., Hölzel D.R., Van Rijn P.A. & Meiswinkel R. 2008. *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Vet Rec*, **162**, 422.
9. Erasmus B.J. 1990. Bluetongue. In *Virus infection of ruminants*, Vol. 3 (Z. Dinter & B. Morein, eds). Elsevier Science, Amsterdam, 227-237.
10. Gibbs E.P. & Greiner E.C. 1994. The epidemiology of bluetongue. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **17**, 207-220.
11. Goffredo M. & Meiswinkel R. 2004. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. In *Bluetongue, Part I. Proceedings Third International Symposium, Taormina, 26-29 Ottobre 2003* (N.J. MacLachlan & J.E. Pearson, eds). *Vet Ital*, **40**, 260-265.
12. Goffredo M., Benedetto L., Di Marcello V. & Monaco F. 2008. Identification of *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. montanus* and *C. dewulfi*: an integrated morphological and genetic approach. In *Proc. Bluetongue Satellite Symposium Bluetongue in Europe: back to the future!*, 7 June, Brescia. Epizone, Brescia, 81.
13. Gomulski L.M., Meiswinkel R., Delécolle J.-C., Goffredo M. & Gasperi G. 2005. Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Syst Entomol*, **30**, 619-631.
14. Italia: Ministero della Salute 2000. Nota del 6 ottobre 2000 n. 600.6/24461/82N/3903 Sistema Nazionale di Sorveglianza per Bluetongue. Ministero della Salute, Roma.
15. Mathieu B., Perrin A., Baldet T., Delécolle J.-C., Albina E. & Cetre-Sossah C. 2007. Molecular identification of Western European species of *obsoletus* complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an internal transcribed spacer-1 rDNA multiplex polymerase chain reaction assay. *J Med Entomol*, **44** (6), 1019-1025.
16. Meiswinkel R., Gomulski L.M., Delécolle J.-C., Goffredo M. & Gasperi G. 2004. The taxonomy of *Culicoides* vector complexes – unfinished business. In *Bluetongue, Part I. Proceedings Third International Symposium, Taormina, 26-29 Ottobre 2003* (N.J. MacLachlan & J.E. Pearson, eds). *Vet Ital*, **40**, 151-159.
17. Meiswinkel R., Van Rijn P., Leijts P. & Goffredo M. 2007. Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet Rec*, **161**, 564-565.
18. Nolan D.V., Carpenter S., Barber J., Mellor P.S., Dallas J.F., Mordue A.J. & Pieltney S.B. 2007. Rapid diagnostic assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Vet Microbiol*, **124**, 82-94.
19. Savini G., Goffredo M., Monaco F., Di Gennaro A., Cafiero M.A., Baldi L., De Santis P., Meiswinkel R. & Caporale V. 2005. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* Complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet Rec*, **157**, 133-143.
20. Stephan A., Clausen P.H., Bauer B. & Steuber S. 2009. PCR identification of *Culicoides dewulfi* midges (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue in Germany. *Parasitol Res*, **105**, 367-371
21. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewiak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4876-4882.