



Ministero della Salute
Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari
Ufficio 2

RICERCA CORRENTE 2020 Istituti Zooprofilattici Sperimentali

Proposta di progetto di ricerca

1. Istituto	Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini"
2. Codice della ricerca	
3. Titolo della ricerca (ACRONIMO e LOGO facoltativo)	Identificazione e screening virale delle zanzare in Emilia-Romagna mediante applicazione del metodo di sequenziamento Sanger e del sequenziamento tramite nanopori di ultima generazione- ZaNGVir
4. Area tematica	Sanità animale
5. Linea di ricerca	Studio degli aspetti clinici ed epidemiologici, relativi fattori di rischio, prevenzione, sistemi di sorveglianza ed early detection delle malattie trasmissibili, con particolare riguardo alle zoonosi ed alle malattie trasmesse da vettori.
6. Responsabile scientifico e relativi recapiti (specificare la qualifica professionale: dirigente o Ricercatore Sanitario della Piramide)	Dr. Michele Dottori – Sede Territoriale di Reggio Emilia michele.dottori@izsler.it – 0522921733 Veterinario Dirigente struttura complessa

ABSTRACT

(Max 5.500 caratteri spazi inclusi, Times new Roman 12)

1. Razionale (inquadramento della tematica /conoscenze disponibili sull'argomento);

Le zanzare, note per le abitudini ematofaghe, non costituiscono solo fonte di molestia ma possono trasmettere diversi agenti patogeni a uomo e animali. In Emilia-Romagna stiamo assistendo ad una recrudescenza di malattie trasmesse da zanzara: dalla epidemia di Chikungunya nel 2007 (1), sostenuta dalla zanzara tigre, alla endemizzazione del virus West Nile, trasmesso dalla zanzara comune di genere Culex (2).

I diversi patogeni sono trasmessi con diversa efficienza dalle diverse specie di zanzara. La corretta definizione della fauna culicidica e la conoscenza delle caratteristiche bio-ecologiche delle diverse specie, risultano fondamentali per valutare il rischio di diffusione di un certo patogeno in una data area. Inoltre la presenza di alcuni patogeni negletti può essere misconosciuta, come già registrato in Emilia-Romagna (3), per la scarsità dei casi di infezione o per la scarsa specificità dei sintomi.

2. Scopo del lavoro/ Pertinenza strategica della proposta/ Descrizione gap che il progetto intende colmare dal punto di vista scientifico;

Miglioramento delle conoscenze relative alle specie di zanzare circolanti sul territorio di competenza tramite l'abbinamento di tecniche di identificazione morfologica a tecniche di identificazione molecolare basate sulla tecnologia di sequenziamento Sanger e sulla innovativa tecnologia di sequenziamento tramite nanopori (MinION – Oxford, Nanopore). Costruzione di un database di sequenze genetiche delle specie circolanti sul territorio. Ricerca di patogeni virali tramite amplificazione di geni target seguita da sequenziamento Sanger o mediante nanopori. L'introduzione nell'Ente di una delle più moderne tecnologie di sequenziamento porterà ad un progresso delle conoscenze e delle potenzialità operative nel campo della diagnosi molecolare, del sequenziamento del DNA genomico e dell'RNA virale.

3. Originalità della proposta/Innovazione prodotta;

L'identificazione morfologica delle diverse zanzare è fondamentale per definire le specie presenti, ma la presenza di complessi di specie, il campionamento di esemplari danneggiati o di stadi vitali immaturi possono rendere necessario l'utilizzo di altre metodiche, come il sequenziamento di target genetici specifici (barcoding). Le sequenze ottenute saranno integrate in un database di riferimento per coadiuvare l'identificazione morfologica. Lo screening delle zanzare permetterà di rilevare eventuali patogeni negletti presenti sul territorio. Sviluppo ed innovazione tecnologica grazie all'acquisizione di una tecnologia di sequenziamento di ultima generazione, in rapido sviluppo e con grandi potenzialità diagnostiche relativamente ad accuratezza, rapidità e processività di analisi e risposta.

4. Metodologia applicata;

Le zanzare testate saranno campionate sul territorio nell'ambito dei piani di sorveglianza attivi e con campionamenti dedicati in ambienti poco campionati o in particolari situazioni epidemiologiche. Per ogni specie identificata su base morfologica, verrà raccolto un pool di alcune zampe da individui diversi, sottoposte ad estrazione del DNA e barcoding (sequenziamento in doppio di COI e ITS2), mediante sequenziamento Sanger. Pool di zanzare, con un massimo di 200 esemplari saranno sottoposti a PCR di genere Flavivirus, Orthobunyavirus e Phlebovirus e sequenziamento Sanger per l'identificazione virale. Verrà definito ed ottimizzato un protocollo da utilizzare sulla piattaforma a nanopori di sequenziamento mirato a pannelli di geni, per l'identificazione specifica delle zanzare e per

l'identificazione virale (targeted sequencing). Tale protocollo verrà implementato anche per l'identificazione di specie da pool di zanzare non monospecifici, e per la verifica della corretta definizione della presenza relativa tra le diverse specie all'interno del campione.

5. Obiettivi;

Stesura della checklist delle zanzare campionate in Emilia-Romagna. Screening di almeno 100 pool di zanzare per la ricerca di patogeni negletti.

Acquisizione delle competenze necessarie all'applicazione della nuova tecnologia di sequenziamento a nanopori. Messa a punto dei protocolli per identificazione di specie dei culicidi e ricerca/identificazione dei virus circolanti. Definizione e valutazione delle potenzialità applicative del sequenziamento tramite nanopori in termini di accuratezza dei risultati, tempi di analisi e acquisizione di nuovi dati relativamente al campo di applicazione del progetto.

6. Risultati attesi/ Deliverables;

Produzione di un database con sequenze di riferimento delle zanzare presenti in Emilia-Romagna. Rilevamento di eventuali agenti patogeni negletti nelle zanzare testate.

Raccolta organica delle caratteristiche bio-ecologiche delle diverse specie di zanzare campionate, con particolare attenzione alle specie più competenti per determinati patogeni e alla descrizione delle caratteristiche utili a definire il rischio sanitario legato alla loro presenza (preferenza d'ospite, stagionalità, dinamica di popolazione, distribuzione geografica in Emilia-Romagna), informazioni di fondamentale importanza per comprendere l'epidemiologia delle malattie trasmesse da vettori e progettare misure di controllo robuste ed efficaci.

7. Impatto atteso sugli stakeholders;

Il presente PRC permetterà di migliorare le conoscenze scientifiche su zanzare e loro patogeni mettendole a disposizione del gruppo Regionale di entomologia sanitaria della Regione Emilia Romagna. Dati utili per la valutazione e l'aggiornamento dei piani di monitoraggio in essere.

8. Trasferibilità dei risultati/ Interdisciplinarietà/Disseminazione;

Stesura di metodi analitici basati sul sequenziamento Sanger e/o mediante nanopori per l'identificazione delle zanzare, per la ricerca ed identificazione virale.

Le sequenze genomiche verranno depositate in banche dati di libero accesso.

L'acquisizione delle competenze nell'applicazione del sequenziamento a nanopori permetterà l'ampliamento delle capacità operative del laboratorio che potranno essere applicate anche ad altri ambiti diagnostici e di ricerca.

I risultati saranno diffusi mediante pubblicazioni e partecipazione a congressi.

9. Congruità economica: inserire tabella con bozza ripartizione voci di spesa che nell'eventualità dell'approvazione potrà subire una rimodulazione entro il 25%;

Voci di spesa	Importo	Descrizione
Noleggio Attrezzature	1000	Noleggio strumento di NGS
Materiale di consumo	€ 31.000	Reagenti per NGS, PCR e isolamento virale, consumabili e reagenti di laboratorio diagnostico
Personale non dipendente	€ 60.000	Borsa di studio per Laureato Biologo o Veterinario o Biotecnologo per 36 mesi
Missioni	€ 7.000	Spese campionamenti e divulgazione risultati a congressi

		nazionali/internazionali
Spese generali (max 10%)	€ 1.000	
TOTALE	€ 100.000	

10. Presenza Project manager (diverso dal PI); Paolo Bonilauri

11. Eventuale coinvolgimento dei Centri di Referenza Nazionale competenti per materia;

Non necessario, il laboratorio entomologico della sede di Reggio Emilia IZSLER è laboratorio di riferimento regionale per l'entomologia sanitaria.

12. Bibliografia di riferimento essenziale;

1. Batovska J, Lynch SE, Cogan NOI, Brown K, Darbro JM, Kho EA, Blacket MJ. Mol Ecol Resour. Effective mosquito and arbovirus surveillance using metabarcoding. 2018 Jan;18(1):32-40.
2. Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Angelini R, et al. Chikungunya virus in Aedes albopictus, Italy. Emerg Infect Dis. 2008 May;14(5):852-4. doi: 10.3201/eid1405.071144.
3. Brinkmann A, Ergünay K, Radonić A, Kocak Tufan Z, Domingo C, Nitsche A. Development and preliminary evaluation of a multiplexed amplification and next generation sequencing method for viral hemorrhagic fever diagnostics. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Nov 20;11(11):e0006075.
4. Calzolari M, Angelini P, Bolzoni L, Bonilauri P, et al. Enhanced West Nile Virus Circulation in the Emilia-Romagna and Lombardy Regions (Northern Italy) in 2018 Detected by Entomological Surveillance. Front Vet Sci. 2020 May 5;7:243.
5. Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Caimi M, et al.. Arboviral survey of mosquitoes in two northern Italian regions in 2007 and 2008. Vector Borne Zoonotic Dis. 2010 Nov;10(9):875-84.

13. Titolo e codice di Progetti di RC e RF degli ultimi 5 anni in cui il proponente è PI o responsabile di UO (inserire anche titolo abstract eventualmente presentato nelle due annualità precedenti di RC);

PRC2016006 Studio delle Zecche ed efficacia di prodotti acaricidi in cani, cavalli ed animali selvatici in Emilia Romagna

PRC2017013 MINSAN Isolamento di phlebovirus da flebotomi e valutazione sierologica della loro diffusione nell'uomo e negli animali domestici.

14. Pubblicazioni del PI con fondi della RC e RF del Ministero della Salute degli ultimi 3 anni: indicare titolo, rivista e IF, codice e nome del progetto; Calzolari, M., Ferrarini, G., Bonilauri, P., Lelli, D., Chiapponi, C., Bellini, R., & Dottori, M. (2018). Co-circulation of eight different phleboviruses in sand flies collected in the Northern Apennine Mountains (Italy). Infection, Genetics and Evolution, 64, 131-134. IF 2.611. PRC2017013

Calzolari, M., Chiapponi, C., Bellini, R., Bonilauri, P., Lelli, D., Moreno, A., ... & Dottori, M. (2018). Isolation of three novel reassortant phleboviruses, Ponticelli I, II, III, and of Toscana virus from field-collected sand flies in Italy. Parasites & vectors, 11(1), 84. IF 3.031

15. Graphical abstract (per quest'anno facoltativo);