

Area tematica: Sanità Animale

Titolo del progetto: Sviluppo e valutazione di nuovi metodi biomolecolari da applicare nella sorveglianza di *Aethina tumida*

Responsabile Scientifico: dott.ssa Antonella Cersini

SINTESI

Titolo Sviluppo e valutazione di nuovi metodi biomolecolari da applicare nella sorveglianza di *Aethina tumida*

Aethina tumida è un parassita esotico, noto come piccolo coleottero dell'alveare o "Small Hive Beetle" (SHB), ordine *Coleoptera*, famiglia *Nitidulidae*, responsabile di una malattia denunciabile in UE, di natura parassitaria per la quale sono previste misure specifiche (Decisione 2003/881 e successive modifiche ed integrazioni) che regolamentano le importazioni di api da Paesi Terzi. In Calabria, è stato segnalato il primo focolaio di SHB nel settembre 2014, aprendo una nuova emergenza sanitaria in tutta Europa.

La diagnosi ufficiale di SHB in apiario è effettuata mediante visita clinica degli alveari, coadiuvata dal posizionamento di apposite trappole nel nido e con conseguente allungamento dei tempi di valutazione della presenza/assenza di SHB in apiario. Inoltre, le trappole permettono di rilevare soltanto gli adulti e non le forme larvali e le uova di SHB.

Per questo motivo è nata l'esigenza di accelerare la ricerca di *A. tumida* in apiario utilizzando i metodi molecolari e soprattutto considerando "nuove matrici" in base al ciclo biologico di *A. tumida* ed in base al modello di arnia.

Per la scelta delle matrici biologiche è stato preso in considerazione il ciclo biologico di SHB.

La metodologia applicata ha comportato tre fasi di lavoro. Nella prima fase sono stati reperiti e costruiti i controlli positivi per *A. tumida* con cui contaminare le matrici negative selezionate in modo tale da verificare la validità e robustezza dei protocolli di estrazione del DNA. Nello specifico, i controlli positivi per SHB sono stati: a) larve di *A. tumida* conservate in etanolo; b) clonaggio della porzione genomica rilevata in Real Time PCR e rappresentata da una regione di 109bp della Citocromo Ossidasi I (*COI*) di *A. tumida* all'interno di uno specifico plasmide (PCR[®] II-TOPO, Invitrogen) -plasmide ricombinante-*COI*. In questa prima fase è stata condotta una accurata ricerca bibliografica sia per valutare il miglior protocollo di Real Time PCR presente in letteratura e sia per capire come elaborare i protocolli di estrazione del DNA da matrici biologiche così complesse e ricche di inibenti.

Nella seconda fase sono stati messi a punto i protocolli di estrazione del DNA dai detriti fondo arnia, terra, coleotteri, larve, frutta marcia, miele fermentato, telaini, tamponi effettuati sia su fondo arnia che sulla superficie dei telaini.

Nella terza fase sono stati organizzati Ring Test per la verifica e validazione dei protocolli di estrazione del DNA da detriti fondo arnia, terra, frutta marcia, telaino, tampone da telaino, tampone da detriti fondo arnia, tampone da miele tra l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie-Centro di Referenza Nazionale in Apicoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentali dell'Abruzzo e del Molise e Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno-Sede Portici.

Tutti i protocolli testati hanno anche mostrato il 100% di ripetibilità tra i diversi laboratori.

Tutti i campioni positivi rilevati dalle varie matrici esaminate con metodiche molecolari sono stati riscontrati in Calabria.

Infine, va sottolineato che un risultato molto importante è stato raggiunto con l'accreditamento della prova *Aethina tumida* PCR Real Time dai detriti fondo arnia (POS VIR 030 INT).

Parole chiave: SHB PCR ricerca, alveare, tamponi

SUMMARY

Aethina tumida, order Coleoptera, family Nitidulidae is an exotic parasite, known as a small beehive beetle or "Small Hive Beetle" (SHB), responsible for a notifiable disease in the EU, for which specific measures for the import of bees from Third Countries are envisaged (Decision 2003/881 and subsequent amendments and additions).

The first SHB outbreak was in Calabria, Southern Italy, in September 2014 opening a new health emergency throughout Europe.

The official diagnosis of SHB in apiary is carried out through a clinical examination of the hives, by means of appropriate traps in the nest, which means a long time for the evaluation of SHB presence in the apiary. In addition, traps only detect adults not larvae or eggs.

For this reason, there was the need to accelerate the research of *A. tumida* in apiary using molecular methods and especially considering "new matrices" based on the biological cycle of *A. tumida* and on the model of an apiary.

The biological cycle of SHB was taken into consideration for the choice of matrices to sample.

The applied methodology involved three work phases.

In the first, positive controls for *A. tumida* were found and used to artificially contaminate selected negative matrices in such a way as to verify the validity and robustness of the DNA extraction protocols. Specifically, positive controls for SHB were: a) larvae of *A. tumida* preserved in ethanol; b) cloning of the genomic portion detected in Real Time PCR and represented by a 109bp region of Cytochrome Oxidase I (COI) of *A. tumida* within a specific plasmid (PCR® II-TOPO, Invitrogen) - recombinant plasmid-COI.

In the second phase, DNA extraction protocols were developed from the debris of the hive, soil, beetles, larvae, rotten fruit, fermented honey, burlap, swabs, sampled both on the arnia bottom and the frames' surface.

In the third phase a Ring Test was organized for the verification and validation of DNA extraction protocols from all the above cited matrices between the Istituto Zooprofilattico Lazio e Toscana, Istituto Zooprofilattico Lombardia ed Emilia Romagna, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle

Venezie – National Reference Laboratory for Apiculture, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo e Molise and Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno.

As a result of this Ring Test, amongst the different laboratories, all tested protocols showed a 100% repeatability.

All positive samples detected with molecular methods on the different tested matrices were found in Calabria.

Finally, it should be emphasized that a very important result was achieved with the accreditation of the *Aethina tumida* PCR Real Time test from the beehive bottom debris (POS VIR 030 INT).

Keywords: SHB PCR research, hive, swabs