



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



**L' ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA:  
principali risultati e loro trasferibilità operativa  
Roma, 19 giugno**

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

Antonella Cersini – UOC Virologia





## Introduzione (1)

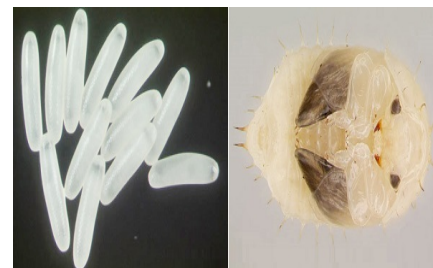
- *A. tumida* è un parassita esotico, noto come *Small Hive Beetle* (SHB), ordine Coleoptera, famiglia Nitidulidae.
- Responsabile di una malattia denunciabile in UE, di natura parassitaria per la quale sono previste misure specifiche (Dec. 2003/881 e successive modifiche ed integrazioni) che regolamentano le importazioni di api da Paesi Terzi





## Introduzione (2)

- In Sicilia ed in Calabria sono stati segnalati i primi focolai di SHB, rispettivamente, ad agosto ed a settembre 2014 aprendo una nuova emergenza sanitaria in tutta Europa
- Diagnosi ufficiale di SHB in apiario: effettuata mediante visita clinica degli alveari, coadiuvata dal posizionamento di apposite trappole nel nido (arnia) con conseguente allungamento dei tempi di valutazione della presenza/assenza di SHB in apiario
- Aspetto negativo legato all'uso di trappole: permettono di rilevare solo gli adulti e non le forme larvali e le uova di SHB





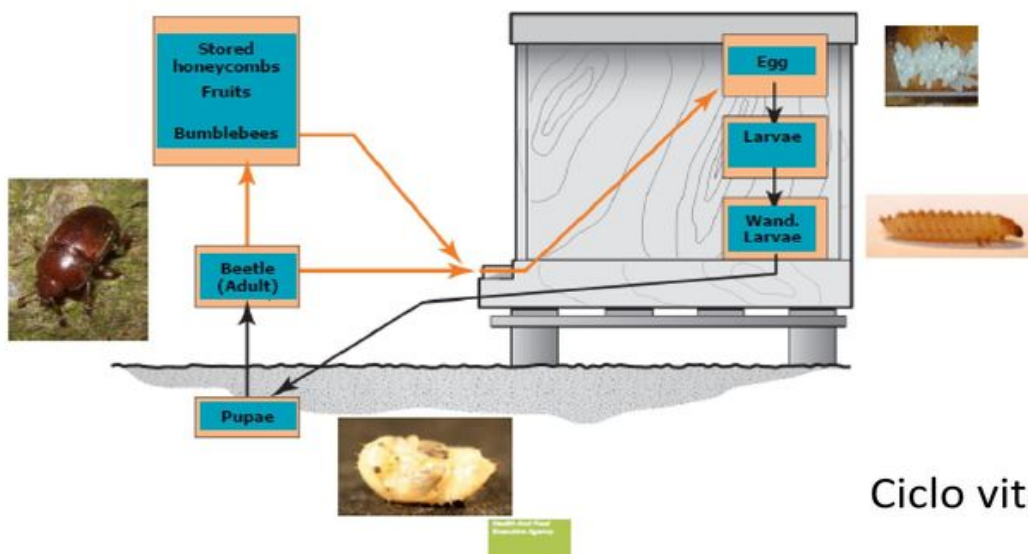
## Primo Obiettivo (1): fornire strumenti diagnostici di supporto – **selezione delle matrici da campionare**

Per capire quali matrici devono essere campionate è stato necessario studiare:

- a) Il ciclo biologico che SHB effettua sia all'interno che all'esterno delle arnie (in modo tale da capire dove possono essere localizzate le uova, le larve e gli adulti)
- b) i modelli di arnia, con particolare riferimento alla tipologia di arnie presenti in Calabria (dotate /non dotate di cassetto di ispezione, posizionato alla base dell'arnia)



## Primo Obiettivo (2): selezione delle matrici da campionare- ciclo biologico di SHB all'interno delle arnie



Ciclo vitale

27 - 79 giorni (da uovo ad adulto)

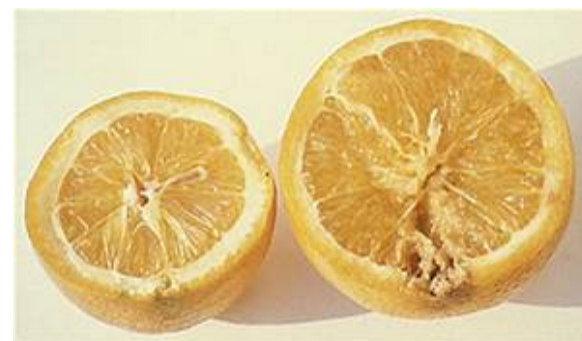




## Primo Obiettivo (3): selezione delle matrici da campionare – **ciclo biologico di SHB all'esterno delle arnie**

1) SHB può completare il suo ciclo biologico su frutta in marcescenza (es. meloni, agrumi, pesche), su verdure in marcescenza e su legna in decomposizione dato che è un coleottero necrofilo.

2) SHB può anche completare il suo ciclo biologico all'interno di famiglie di *Bombi* e di *Apis cerana* (Apoidei)







## Risultati relativi al primo obiettivo: **scelta delle matrici da campionare per la ricerca di SHB**

Considerando quanto detto, le matrici selezionate per favorire un valido supporto alla visita clinica degli alveari sono state:

- a) **detriti fondo arnia** (utili, per es. in condizioni di tempo cattivo, famiglie aggressive, numero elevato di arnie in apiario)
- b) **tamponi da detriti fondo arnia;**
- c) **miele** (specialmente miele fermentato; è un'ottima matrice per la diagnosi di SHB nei laboratori di smielatura che ricevono i melari da territori extra-regionali);
- d) **tamponi da miele;**
- e) **favo** (specialmente favi con covata che emettono un odore cattivo);
- f) **tampone da favo;**
- g) **agrumi in marcescenza** (es. limoni, mandarini, arance);
- h) **terra** (sottostante all'arnia);
- i) **uova, larve e coleotteri**



## Secondo Obiettivo (1): fornire strumenti diagnostici di supporto – **protocolli di estrazione del DNA dalle matrici selezionate**

**La metodologia applicata ha comportato tre fasi di lavoro**

La **prima fase di lavoro** ha richiesto:

- studio della letteratura scientifica per capire come elaborare i protocolli di estrazione del DNA da matrici biologiche così complesse e ricche di inibenti
- scelta ed utilizzo dei tre kit commerciali con opportune e mirate modifiche rispetto ai protocolli riportate dalle ditte commerciali (NucleoSpin® Tissue kit-Macherey-Nagel; Invisorb Spin® Food, Invisorb e QIAamp® DNA Blood Mini kit, Qiagen)





## Secondo Obiettivo (2): fornire strumenti diagnostici di supporto – **protocollo Real Time PCR specifico per SHB**

La **seconda fase di lavoro** ha comportato:

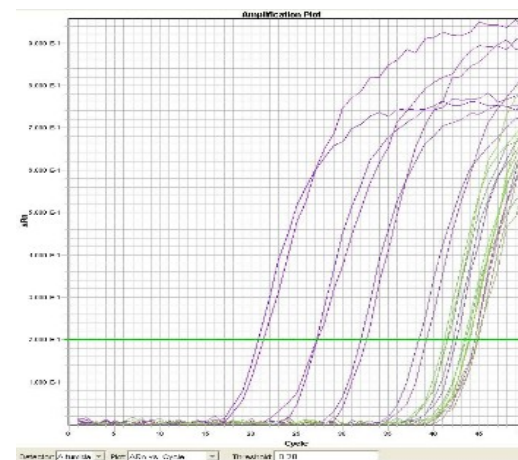
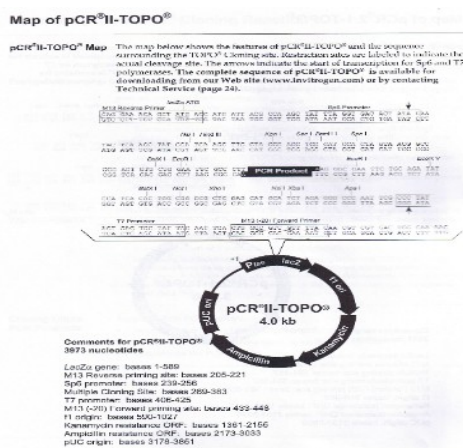
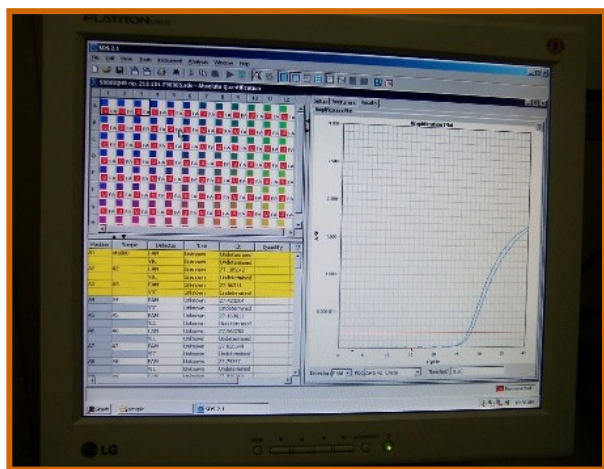
- ricerca bibliografica per valutare il miglior protocollo di Real time PCR presente in letteratura
- **selezione del protocollo di Real Time PCR che rileva una porzione di 109bp della Citocromo Ossidasi (COI) di SHB (Ward L. et al, 2007; Apidologie, Vol.38, pp: 1-9)**
- studio «in silico» della specificità dei primer e della probe (mediante la valutazione delle omologie di sequenza tra le sequenze COI di SHB disponibili in Genbank e la assenza di omologie di sequenza con le COI di acari (es. *Varroa* e *Tropilaelaps* spp.) e di altri insetti (es. *Galleria mellonella*-tarma della cera) rilevati nelle arnie





## Secondo Obiettivo (2): fornire strumenti diagnostici di supporto – **controlli positivi per SHB**

- La **terza fase di lavoro** è consistita nel **reperire e costruire i controlli positivi per SHB** con cui **contaminare le matrici negative selezionate** in modo tale da **verificare la validità e la robustezza dei protocolli di estrazione del DNA**
- I controlli positivi per SHB sono stati: a) **larve di SHB conservate in etanolo**; b) **clonaggio del target della Real Time PCR (109bp della COI di SHB) all'interno di uno specifico plasmide (pCR® II-TOPO, Invitrogen) ed ottenere così il plasmide ricombinante - PCR® II-109bp COI SHB**





## Terzo Obiettivo (1): fornire strumenti diagnostici di supporto – **validazione dei protocolli di estrazione del DNA e della Real Time PCR per le matrici selezionate mediante Ring Test mirati**

- A questo obiettivo hanno partecipato 5 Unità Operative: IZSLT, IZS della Lombardia ed Emilia Romagna, IZS delle Venezie, IZS del Mezzogiorno, IZS dell'Abruzzo e del Molise
- Le matrici scelte per i Ring Test sono state: **detriti fondo arnia, tampone dai detriti fondo arnia, tampone da miele, favo con covata, tampone da favo con covata, tampone da miele, terra e frutta marcia**





## Terzo Obiettivo (2): fornire strumenti diagnostici di supporto – **organizzazione dei Ring Test mirati**

- L'IZSLT ha inviato a ciascuna Unità Operativa le matrici analizzate drogate con **due differenti strategie**.
- La **prima strategia di contaminazione** ha permesso di stabilire il **limite di rilevabilità (LOD) della Real Time SHB utilizzando DNA contaminati con differenti quantità in numero di copie target della COI di SHB**. Quindi ciascuna Unità Operativa ha ricevuto un set di 12 campioni di DNA, estratti da ciascuna matrice scelta, contenenti un numero di copie di COI di SHB compreso tra  $1,81 \times 10^{12}$  e 5 copie totali.
- La **seconda strategia di contaminazione** ha permesso di stabilire **la fattibilità e robustezza dei protocolli di estrazione del DNA dalle matrici scelte**. Quindi ciascuna Unità operativa ha ricevuto un set di 14 matrici, ossia 2 campioni per ciascuna tipologia di matrice selezionata, contaminati con 1 larva e con  $\frac{1}{2}$  larva di SHB.







## Terzo Obiettivo (3): fornire strumenti diagnostici di supporto – **risultati dei Ring Test mirati**

- I risultati dei Ring Test sono stati molto utili ed hanno dimostrato che **il LOD per SHB dipende dalla natura della matrice**; inoltre, **i protocolli di estrazione del DNA sono risultati efficaci e di facile esecuzione.**

Nello specifico:

- a) detrito fondo arnia: **10 copie di COI/1grammo**; ~ 0,5 larva/1 grammo
- b) tampone da detrito fondo arnia: **120 copie di COI/0,2ml**; ~ 0,5 larve/0,2ml
- c) favo con covata: **20 copie di COI/70 grammi**; ~ 0,5 larve/70 grammi
- d) tampone da favo con covata: **5 copie di COI/0,2ml**; ~ 0,33 larve/0,2ml
- e) tampone da miele fermentato: **180 copie di COI/0,2ml**; ~ 5,9 larve/0,2ml
- f) agrumi in marcescenza: **500 copie di COI/10ml di succo**; ~ 0,5 larve/10ml
- g) terra: **1 larva/1grammo**





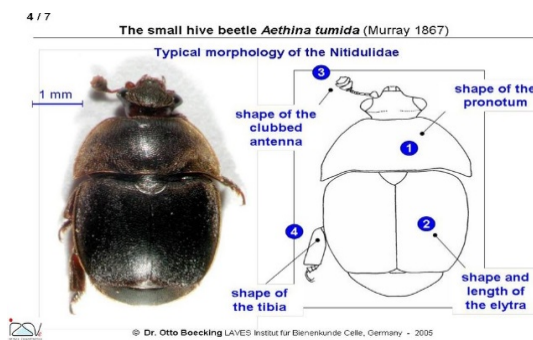
## Impatto e trasferibilità operativa (1)

L'impatto di questa ricerca può essere riassunto nei seguenti punti:

A. Su richiesta del Ministero della Salute è stata **accreditata la procedura di estrazione del DNA e di Real Time PCR da larve, coleotteri e detriti fondo arnia** (POS VIR 030 INT)

B. Sono state stabilite **le regole per campionature mirate delle matrici da effettuare in campo** considerando quantità e volumi specifici da prelevare per le analisi molecolari a seconda della matrice esaminata

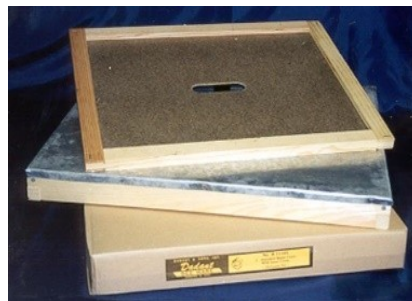
C. E' stata creata **una rete di pronto intervento per il controllo, la diffusione e la diagnostica molecolare di SHB tra gli IZZSS coinvolti nella ricerca e distribuiti sul territorio nazionale** (Lazio e Toscana, Friuli-Venezia Giulia, Lombardia ed Emilia Romagna, Abruzzo e Molise, Campania e Calabria, Sardegna)





## Impatto e trasferibilità operativa (2)

La trasferibilità del lavoro svolto nel corso della ricerca sulle realtà locali e nazionale può essere riassunta nei seguenti punti:



**A.Ciascuna Unità Operativa**, nell'ambito della propria regione di competenza, ha organizzato diversi incontri con le associazioni di apicoltori ed i veterinari per spiegare come riconoscere, contenere e monitorare in campo la presenza di SHB

**B.Sono stati lavorati**, presso gli IIZZSS coinvolti nella ricerca, i **campioni ufficiali** provenienti dalle zone rosse (Calabria e Sicilia) e dai focolai (Calabria) utilizzando i protocolli molecolari sviluppati

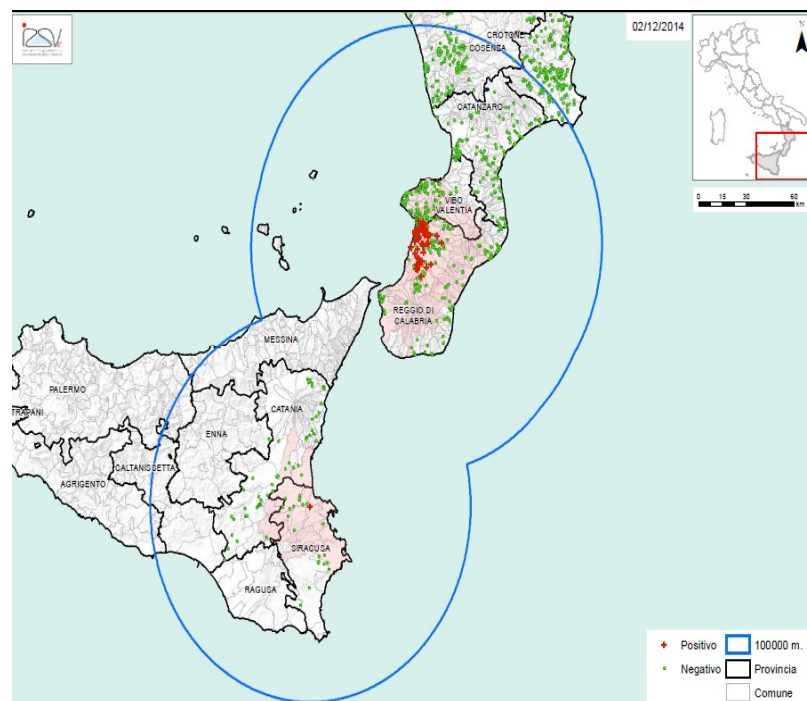
**C.E'** stata data pronta segnalazione degli esiti degli esami molecolari al Ministero della Salute





## Risultati (1) : campioni ufficiali esaminati

- I campioni ufficiali esaminati provenivano dalle **zone rosse** (Calabria e Sicilia) e dai **focolai attivi** (Calabria)
- Le misure di contenimento nel caso di focolai attivi:
  - a) distruzione delle arnie infettate;
  - b) terreni arati e disinfettati;
  - c) vietata la movimentazione di pacchi di api, api regine, cera grezza e sciame artificiali;
  - a) vietato lo scambio di materiale apistico;
  - b) eliminazione della frutta e verdura in marcescenza



Province interessate: **Palermo, Reggio Calabria e Cosenza**







## Risultati (2) : campioni ufficiali esaminati

Tra il 2015 ed il 2018 sono stati esaminati:

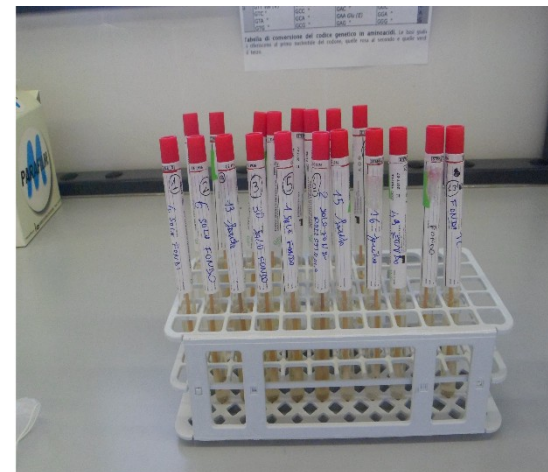
**-381 campioni di detriti fondo arnia** di cui 51 positivi (**13,38% positivi**)

**-115 campioni di tamponi da favo con covata (con o senza miele fermentato)** di cui 22 positivi (**19,13% positivi**)

**-7 campioni di favo con covata (con o senza miele fermentato)** di cui 2 positivi (**7,31% positivi**)

**-12 campioni di coleotteri adulti** (tutti confermati SHB)

-L'*Aethina tumida* rilevata sia in Calabria che in Sicilia deriva dal **ceppo Africano originario del Camerun (AfrCam3)**, appartenente al **clade B** e **cluster/gruppo B1**





## Conclusioni (1): pubblicazione scientifica in corso di valutazione

In corso di valutazione un articolo scientifico presentato alla rivista **Apidologie** (settembre 2018) in cui vengono descritte le modalità di campionamento per i detriti fondo arnia ed i tamponi da favo effettuati da specifiche aree interne dell'arnia

**Jorge Rivera-Gomis, Giovanni Formato, Valeria Antognetti, Gabriele Pietrella, Antonella Cersini: *New Aethina tumida detection methods using Real Time PCR from hive debris and swab samples***

## Conclusioni (2): comunicazioni scientifiche a congressi nazionali

1 comunicazione scientifica al **Convegno Nazionale SVETAP Apicoltura, Ambiente e Sicurezza dei prodotti dell'alveare, Paestum (SA), 12-13 aprile 2018.**





## **Conclusioni (3): comunicazioni scientifiche a congressi internazionali**

- A. 2 comunicazioni ad EurBee 2018-8<sup>th</sup> International Congress of Apidology; Ghent-Belgium, 18 - 20 September 2018**
- B. 4 comunicazioni a Proceedings of 45<sup>th</sup> APIMONDIA International Apicultural Congress, 29 September – 4 October, Istanbul (Turkey), 2017**





# Ringraziamenti

**Ai miei colleghi:** Valeria Antognetti, Gabriele Pietrella, Silvia Puccica per il grande aiuto nella messa a punto dei metodi molecolari e la lavorazione dei campioni ufficiali e Raffaella Conti e Maurizio Zini per il grande aiuto nel sequenziamento dei campioni positivi e dubbi.

A tutte le Unità Operative:

- 1) **IZSLT, Apicoltura, produzione e patologia delle api:** Dott. Giovanni Formato, Dott. Marco Pietropaoli, Dott.ssa Marcella Milito, Dott. Jorge Rivera-Gomis, Dott.ssa Viviana Belardo
- 2) **Università degli Studi di Roma «La Sapienza»:** Prof. Paolo Audisio
- 3) **IZS delle Venezie, Centro di Referenza Nazionale per L'Apicoltura:** Dott.ssa Anna Granato
- 4) **IZS del Mezzogiorno, UOS Diagnostica Generale, Portici:** Dott.ssa Anna Cerrone
- 5) **IZS del Mezzogiorno, Sezione Diagnostica Provinciale di Reggio Calabria:** Dott. Giovanni Federico
- 6) **IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Laboratorio di Biologia Molecolare, Sezione Diagnostica di Modena:** Dott.ssa Elena Carra
- 7) **IZS dell'Abruzzo e del Molise, Sezione Diagnostica di Isernia:** Dott. Luciano Ricchiuti e Dott.ssa Franca Rossi
- 8) **IZS della Sardegna, Reparto Osservatorio Fauna Selvatica:** Antonio Pintore
- 9) **Ministero della Salute:** Dott. Maroni Ponti

