

P2.2 - MESSA A PUNTO DI SAGGI ELISA PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE UMANA A VETTORI DI ARBOVIROSI (ZANZARE AEADES) [Bruno ARCA]

Borsista FILAS: Sara Buezo Montero, degree in Biochemistry and Biomedical Sciences, Master in Tropical Parasitic Diseases (University of Valencia, Spain).

Data di attivazione della borsa di studio (12 mesi: finanziamento 50% FILAS, 50% altri fondi di ricerca): Settembre 2016.

Obiettivi ed innovatività rispetto allo stato dell'arte (con bibliografia inserita nel testo)

Zanzare *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* sono responsabili della trasmissione di agenti patogeni di grande rilevanza per la salute pubblica (parassiti come *Plasmodium* o arbovirus come Dengue, Chikungunya, Zika o West Nile). Valutare il grado di esposizione a questi diversi vettori è essenziale per pianificare/implementare adeguate misure anti-vettoriali e stimare il rischio di trasmissione. Attualmente l'esposizione a culicidi vettori viene valutata con metodiche entomologiche, che tuttavia forniscono stime indirette e sono talvolta difficili da implementare (costi, necessità di personale qualificato, difficoltà logistiche, etc.). Nell'ambito di questo progetto intendiamo mettere a punto saggi immunologici atti a valutare l'esposizione umana a zanzare *Aedes* (in primis *Ae. albopictus* ed *Ae. aegypti*) sfruttando la risposta immunitaria dell'ospite a proteine salivari del vettore.

È noto che gli artropodi ematofagi, durante il pasto di sangue, iniettano nel loro ospite un cocktail di proteine ad attività antiemostatica, antiinfiammatoria ed immunomodulatoria. Queste proteine salivari, o quanto meno alcune di esse, si comportano anche da antigeni stimolando nell'ospite una risposta anticorpale che può essere usata come misura dell'esposizione al vettore (Peng Z & Simons FE, *Int Arch Allergy Immunol* 2004, **133**:198-209; Billingsley PF *et al.*, *Parasite Immunol* 2006, **28**:143-53; Fontaine A *et al.*, *Parasit Vectors* 2011, **4**:187). L'analisi trascrittomiche comparativa dei repertori salivari di culicidi ha mostrato la rapida diversificazione ed evoluzione dei geni salivari, evidenziando la presenza di gruppi piuttosto consistenti di proteine salivari genere-specifiche, che cioè si ritrovano per esempio nella sottofamiglia delle anophelinae (genus *Anopheles*) ma non in quella delle culicinae (genera *Aedes* e *Culex*), e viceversa (Ribeiro JM, Mans B & Arcà B, *Insect Biochem Mol Biol* 2010, **40**:767-84). Queste proteine, se immunogeniche, potrebbero rappresentare candidati ideali per lo sviluppo di marcatori di esposizione umana a punture di zanzare *Anopheles* o *Aedes*. Va sottolineato che la disponibilità di marcatori di questo tipo, basati sulla misurazione di IgG circolanti dirette contro proteine salivari specifiche di determinati vettori, offrirebbe alcuni importanti vantaggi: (i) consentirebbe di acquisire contemporaneamente, mediante misure serologiche, informazioni sul grado di esposizione ad un dato patogeno (antigeni del patogeno) ed al vettore che lo trasmette (antigeni salivari); (ii) permetterebbe una valutazione diretta del contatto uomo-vettore (sia al livello individuale che di popolazione); (iii) rappresenterebbe uno strumento estremamente prezioso per la valutazione dell'efficacia di misure antivettoriali.

Abbiamo in precedenza fornito una prova di principio con la proteina salivare gSG6 di *An. gambiae* mostrando che essa rappresenta un buon marcatore per valutare variazioni temporali e spaziali di esposizione umana ai tre principali vettori afrotropicali di malaria: *An. gambiae*, *An. arabiensis* ed *An. funestus* (Rizzo C *et al.*, *PLoS ONE* 2011, **6**(3):e17980; Rizzo C *et al.*, *Malaria J* 2011, **10**:206; Stone W *et al.*, *PLoS ONE* 2012, **7**(6):e40170; Rizzo C *et al.*, *Parasit Vectors* 2014, **7**:549; Yman V *et al.*, *Sci Rep* 2016, **6**:19472). Nell'ambito di questo progetto intendiamo sviluppare simili marcatori che permettano la valutazione dell'esposizione umana a zanzare *Aedes* (ed eventualmente a specifici vettori quali *Ae. albopictus* o *Ae. aegypti*).

- Risultati del I anno di ricerca nell'ambito del progetto

Questa linea di ricerca è iniziata con la presa di servizio del borsista (Settembre 2016) e pertanto si svilupperà principalmente durante il secondo anno del progetto. Vista la difficoltà di reperimento di un adeguato set di sieri umani abbiamo deciso di iniziare lo screening di proteine/peptidi salivari utilizzando un sistema murino. Durante il primo anno è stata effettuata una prima selezione di candidati e si è iniziato il protocollo di immunizzazione degli animali sperimentali.

Selezione dei candidati dai repertori salivari di *Ae. albopictus* ed *Ae. aegypti*. Sulla base di precedenti analisi trascrittomiche (Arcà B *et al.*, *Insect Biochem Mol Biol* 2007, **37**: 107-27; Ribeiro JM *et al.*, *BMC* 42

Genomics 2007, **8**:6; Ribeiro JM, Mans B & Arcà B, *Insect Biochem Mol Biol* 2010, **40**:767-84; Ribeiro JM *et al.*, *PLoS ONE* 2016, **11**(3): e0151400) abbiamo selezionato una decina di proteine salivari di *Ae. albopictus* che sono ristrette a culicinae e mostrano percentuali di identità a proteine di *Culex* \leq 40% (23.5 kDa, 30.5 kDa, 34k1, 34k2, 62k1, 62k2, HHHa, HHHb, W-rich, Hyp8.2).

Immunizzazione di topi BALB/c mediante esposizione a punture di culicidi. In collaborazione con il gruppo di ricerca della Dott.ssa Marta Ponzi dell'Istituto Superiore di Sanità è stato predisposto un piano di esposizione controllata rispettivamente ad *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* ed *An. gambiae*. Tre gruppi di 4 topi ciascuno saranno esposti ogni 2 settimane per 6 settimane (4 esposizioni in totale) a punture di 25-30 zanzare femmine adulte (20 minuti). Un quarto gruppo fungerà da controllo. Prelievi di circa 100 ul di sangue verranno effettuati ad intervalli stabiliti. Al momento sono stati effettuati il prelievo Baseline e le prime due esposizioni (vedi tabella).

timing	date	mice arrival	sera collection	exposure
-14	Sept 22 2016			
-7	Sept 29		BASELINE	
1	Oct 6			1
14	Oct 20			2
21	Oct 27		MID	
28	Nov 3			3
42	Nov 17			4
+7	Nov 24		TOP	
+30	Dec 17			
+60	Jan 17 2017			
+90	Feb 17			
+150	April 17			

- Attività previste per il II anno del progetto

Termine immunizzazione e raccolta di sieri da animali immunizzati e non. Si procederà a completare lo schema di immunizzazione come previsto ed a raccogliere aliquote di siero in modo da disporre per ciascun gruppo di topi di aliquote raccolte prima (baseline), durante (mid), al termine (top) ed a vari intervalli dopo la fine del regime di esposizione (1, 2, 3 e 5 mesi).

Predizione di immunogenicità e disegno di peptidi. Le proteine salivari candidate precedentemente selezionate verranno analizzate mediante programmi per la predizione di immunogenicità per identificare putativi epitopi lineari. Si prevede di impiegare almeno tre differenti programmi (BepiPred, BcePred ed ABCpred) e di considerare peptidi predetti da almeno due programmi indipendenti. Gli epitopi così identificati verranno poi confrontati sia fra di loro che ciascuno nelle diverse specie di interesse allo scopo di ottimizzare la selezione. Prevediamo di disegnare da 2 a 5 peptidi per i successivi saggi ELISA.

Messa a punto di saggi ELISA. Prendendo spunto dalle condizioni impiegate in precedenza per la proteina gSG6 di *An. gambiae* (Rizzo C *et al.*, *PLoS ONE* 2011, **6**(3):e17980) si procederà alla messa a punto delle condizioni ottimali per lo screening dei peptidi selezionati. Considerato il piano sperimentale ci si aspetta di poter valutare l'immunogenicità dei peptidi selezionati, la specificità della risposta e la sua persistenza nel tempo.