

P3.2 - APPLICAZIONE DI BIOSAGGI PER LA VALUTAZIONE DI SEMIOCHIMICI REPELLENTI/ATTRATTIVI PER INSETTI EMATOFAGI [S. SCHIPPA]

Borsista FILAS: Valentina TOTINO, Laurea Biologia Applicata alla Ricerca Biomedica, Specialista in Microbiologia e Virologia.

Data di attivazione della borsa di studio (6 mesi): maggio 2016.

Introduzione

Oltre all'attività molesta di ectoparassiti, le specie di zanzare (*Aedes* spp, *Culex* spp) autoctone nel nostro Paese rivestono interesse sanitario poiché potenziali vettori di arbovirus ed elminti del genere *Dirofilaria*. La trasmissione di arbovirus (virus della febbre gialla, Dengue, Zika ecc.) è diffusa ai tropici e nei paesi subtropicali ma, considerati i flussi migratori e il turismo di massa in continua crescita, non si può escludere un futuro interessamento del bacino del mediterraneo o l'introduzione di virus da parte di un turista al ritorno da un viaggio in un'area endemica. Alla luce di queste considerazioni, la circolazione di zanzare potenzialmente infette costituisce un rischio aggiuntivo per ogni singolo individuo, anche se l'esposizione è diversa per ciascuno. L'odore della pelle di ciascun individuo è influenzato da diversi fattori: età, sesso, abitudini alimentari, igiene personale e, non ultima, la presenza di batteri commensali. Uno studio del 2009 ha rilevato che le variazioni individuali nella composizione del microbiota della pelle, in termini di numerosità e variabilità di specie, potrebbero spiegare la diversa attrattività delle zanzare nei confronti di alcuni individui [1, 2, 3]. A proposito di malattie vettoriali, da circa un anno il virus Zika continua a mantenere alta la preoccupazione su scala mondiale, con oltre mille casi di contagio. Con focolai epidemici inizialmente confinati in America latina e poi via via diffusisi nel Mar dei Caraibi e nel Sud-est Asiatico, come pure diversi casi importati in Europa, il virus Zika è stato considerato dall'OMS una vera e propria emergenza sanitaria essendo stata confermata la correlazione tra infezione durante la gravidanza e l'insorgenza di gravi complicazioni neonatali. Il virus Zika è trasmesso dalla zanzara tropicale *Aedes aegypti*, ma anche la zanzara *Aedes albopictus*, più conosciuta come "zanzara tigre" ormai autoctona nel nostro Paese, può fungere da vettore.

Obiettivi e Risultati Attesi

Lo scopo della nostra ricerca è quello di valutare se le variazioni individuali nella composizione del microbiota della pelle, in termini di numerosità e variabilità di specie, possano influenzare la diversa attrattività delle zanzare nei confronti di alcuni individui. Attraverso un approccio metagenomico, sarà caratterizzato il microbiota della pelle di gestanti selezionate sulla base della loro diversa attrattività verso le zanzare. La valutazione delle differenze nella composizione del microbiota della pelle e l'individuazione di specifiche componenti microbiche con attività attrattive o repulsive potrà essere utile per la messa a punto di prodotti biologici che funzionino da attrattivi o repellenti nei confronti della zanzara *Aedes albopictus*.

Materiali e Metodi

Saranno arruolate donne che al momento dell'adesione allo studio rientrino nel secondo/terzo mese di gestazione. A partire dal primo incontro con il ginecologo, in caso di consenso informato delle pazienti, saranno forniti loro tanti gambaletti di nylon quante saranno le visite programmate. Ad ogni paziente sarà chiesto di indossare il gambaletto a partire da 24 ore prima dell'orario previsto per la visita, con l'accortezza di rimuoverlo solo una volta trascorso il tempo richiesto e di riporlo in un busta di plastica a chiusura ermetica, anche questa fornita dal gruppo di ricerca. Ogni busta sarà riposta a -20°C fino al momento in cui sarà possibile effettuare le prove di attrattività. Dopo la visita le gestanti dovranno sottoporsi anche ad un prelievo cutaneo, in modo tale da averne uno per ogni trimestre di gravidanza. Il prelievo, non affatto invasivo, consisterà nello sfregare per alcuni secondi un tampone inumidito con dell'acqua distillata sulla superficie del piede. L'operazione sarà effettuata in triplicato; due campioni saranno utilizzati per l'estrazione del DNA metagenomico (in modo tale da avere due replicati biologici) e l'altro conservato a -20°C con l'aggiunta di BHI e glicerolo per una migliore conservazione della microflora aerobia anaerobia facoltativa cutanea in vista di un'eventuale esame colturale. Il tampone cutaneo sarà conservato a -20°C con l'aggiunta del primo buffer di lisi fornito dal kit fino a quando non sarà possibile

eseguire l'estrazione del DNA mediante il kit *DNeasy tissue kit* (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo le istruzioni del produttore. Per caratterizzare le comunità batteriche sarà effettuato il sequenziamento degli ampliconi mediante new generation sequencing (NGS) su una piattaforma Illumina MiSeq. L'analisi metagenomica si baserà su metodi di valutazione della distribuzione delle specie presenti e calcolo di indici di diversità ecologica, al fine di quantificare le differenze significative nella struttura delle comunità batteriche tra soggetti più o meno attrattivi.

Messa a punto delle condizioni del tunnel del vento

Abbiamo effettuato diverse prove al fine di settare le condizioni di volo degli insetti. Dopo aver apportato qualche modifica tecnica al sistema, abbiamo osservato che, le condizioni sperimentali ideali per assicurare che gli insetti liberati da un'estremità del tunnel fossero in grado di raggiungere senza difficoltà il lato opposto, in cui era stata collocata una miscela odorosa attrattiva (BG-lure) fossero: una temperatura di 26°C, un'umidità relativa del 60% e un flusso di aria pari a 0,3m/s.

Saggi di attrattività

Abbiamo saggiato preliminarmente l'attrattività di zanzare *Anopheles gambiae* ed *Aedes albopictus* nei confronti di ceppi singoli: uno *Staphylococcus epidermidis* e uno *Staphylococcus aureus* isolati dalla pelle e un ceppo ATCC di *Pseudomonas aeruginosa*. Le prove sono state effettuate in gabbiette contenenti 30 zanzare ciascuna che erano state private della fonte di glucosio da alcune ore e quindi predisposte ad un comportamento di ricerca dell'ospite. Le condizioni sperimentali sono state testate in triplicato. I batteri utilizzati come esche sono stati preparati sia in forma planctonica che sessile, e sono stati quantizzati allo spettrofotometro per la forma planctonica e con l'utilizzo del *Biotimer* per la forma sessile. In ogni prova è stata confrontata per 30 minuti l'attrattività dei ceppi rispetto al controllo negativo. Al termine di ogni esperimento le valutazioni sono state effettuate comparando il numero di zanzare adese alle retine nelle diverse condizioni testate. I batteri cresciuti sotto forma di biofilm sono stati preparati sia su vetrino che su biglie di vetro, in quest'ultimo caso grazie al supporto del Dott. Luigi Rosa (Gruppo Prof.ssa Valenti). Gli esperimenti effettuati finora non hanno mostrato differenze significative tra i ceppi testati e i controlli negativi. Nel caso dei biofilm su biglie di vetro di *S.epidermidis* si è osservato un maggior trend di attrattività, sempre non significativo. Gli esperimenti ci hanno comunque permesso di affinare la tecnica per il conteggio degli insetti attratti.

Comitato etico

La documentazione richiesta per l'approvazione dello studio è stata preparata solo dopo aver preso contatto con la Prof.ssa Paola Ciolli, dirigente medico di I livello presso il dipartimento di Ginecologia e Ostetricia, Neonatologia e Puericoltura (UOC04) del Policlinico Umberto I, che si occuperà dell'arruolamento delle pazienti. La ricerca è stata inquadrata come studio osservazionale non farmacologico. La previsione è di riuscire ad iniziare il reclutamento delle gestanti entro il mese di novembre.

Biibliografia

1. Grice EA, Kong HH, Renaud G, Young AC; NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard GG, Blakesley RW, Wolfsberg TG, Turner ML, Segre JA. 2008 A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res.* 18(7):1043-50.
2. Dormont L, Bessièrè JM, Cohuet A. 2013 Human skin volatiles: a review. *J Chem Ecol.* 39(5):569-78.
3. Mathieu A, Delmont TO, Vogel TM, Robe P, Nalin R, Simonet P. 2013. Life on human surfaces: skin metagenomics. *PLoS One* 8(6).