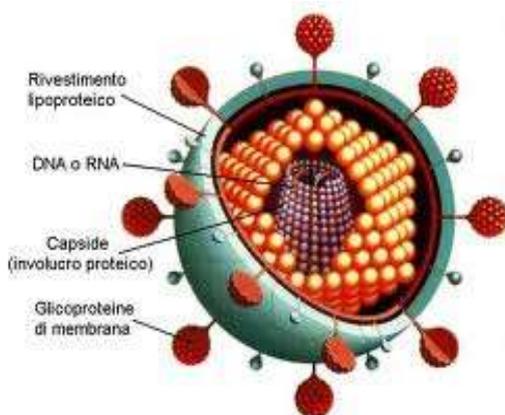


PROGETTO "SUMMER SCHOOL"

Attività di formazione presso i **LABORATORI DELL'ISTITUTO ZOOPROFILATTICO** Sperimentale della Puglia e della Basilicata

Il **13 Giugno 2014** si è tenuto presso la sede centrale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, il primo incontro della "Summer School": un progetto proposto dai docenti di scienze e indicato per gli studenti di terzo e quarto anno. Il Direttore Dr. Dorianò Chiocco e i responsabili dei vari laboratori hanno illustrato la storia dell'Ente che fu istituito per il controllo delle malattie infettive e diffuse di animali da reddito, tra cui le zoonosi, malattie che possono colpire animali e uomo. Sono stati presentati i tutor di laboratorio che, attraverso una visita guidata, hanno illustrato le attività svolte presso i vari laboratori.

Il **17 Giugno**, dopo essere stati divisi in 4 gruppi, ci siamo recati nei rispettivi laboratori e dopo una breve presentazione abbiamo dato il via alle attività. Noi ragazzi di terzo siamo stati assegnati al laboratorio di Diagnostica Virologica ed Entomologia Sanitaria, afferente alla Struttura Complessa di Virologia. Inizialmente è stata affrontata una lezione teorica sui virus e sul funzionamento del microscopio elettronico a trasmissione, tenuta dai tutor, Dott. Giuseppe Mancini e Dott. Domenico Galante.



I virus sono parassiti endocellulari obbligati e possiedono una struttura semplice. Sono mediamente circa 100 volte più piccoli di una cellula e vengono misurati in nanometri (nm). Un

virus è composto da un acido nucleico (RNA o DNA) che può essere circolare, lineare, segmentato, non segmentato, a singola o a doppia elica.

Esso è rivestito da una capsula proteica detta "capside". Alcuni virus presentano anche un ulteriore rivestimento fosfolipidico esterno detto "envelope" o "mantello" che ha la funzione di proteggere il genoma e riconoscere i recettori delle cellule da infettare; su di esso possono essere presenti delle glicoproteine di superficie chiamate "spikes". I virus vengono identificati sulla base delle seguenti caratteristiche:

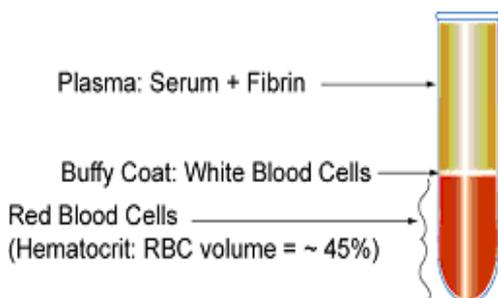
- Tipo di acido nucleico (DNA o RNA);
- Morfologia e dimensioni del virus: cubica o icosaedrica, elicoidale, complessa (non ha una geometria distinta);
- Presenza dell'envelope.

La replicazione virale è caratterizzata dalle seguenti fasi:

1. riconoscimento cellula target;
2. attacco;
3. penetrazione;
4. denudamento (perdita dell'eventuale capside);
5. sintesi;
6. assemblaggio (si riforma il rivestimento);
7. rilascio.

I virus, come gli altri patogeni, possono essere diagnosticati attraverso due differenti processi:

- Diagnosi diretta: si ricerca direttamente il virus o l'agente patogeno (microscopia, ELISA diretta, colture cellulari, IFD, PCR);



- Diagnosi indiretta o sierologica: si ricercano gli anticorpi prodotti in seguito all'infezione, i quali sono proteine contenute nel siero del sangue (IgM, IgG, IgA, IgE) (ELISA indiretta, sieroneutralizzazione, IFI). Gli anticorpi si ritrovano nel siero del sangue.

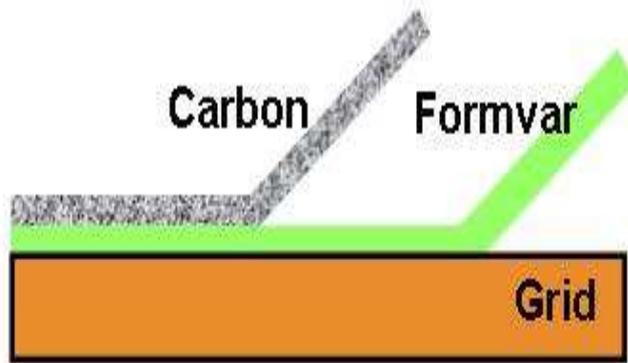
Il microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

Il microscopio elettronico a trasmissione (TEM) è composto da tre strutture:

- sistema di illuminazione: da dove si origina il fascio elettronico
- sistema formazione immagine;
- sistema traslazione immagine.



Questo tipo di microscopio sfrutta un fascio di elettroni propagati nel vuoto e convogliati verso il campione grazie a lenti elettromagnetiche. Gli elettroni sono eccitati dalla differenza di potenziale dovuta alla presenza di un filamento di tungsteno portato al punto di saturazione con alta tensione. Per il corretto funzionamento del microscopio elettronico, è necessaria la condizione di vuoto il perché il fascio di elettroni potrebbe subire deviazioni. Inoltre, l'aria potrebbe ossidare il



filamento stesso e il campione potrebbe essere contaminato. Il TEM può ingrandire fino a circa 200 mila volte e a differenza del microscopio ottico, che sfrutta una sorgente luminosa, permette osservazioni in bianco e nero, attraverso la distinzione di zone elettroni-chiare e zone elettroni-scure. Il campione non viene posto come nella microscopia ottica su supporti di vetro ma su piccole griglie di metallo (es. rame) rivestite

da uno strato di similcellulosa (Formvar).

Il **19 Giugno** dopo un breve ripasso della lezione precedente abbiamo parlato della preparazione del campione. La griglia per il microscopio elettronico può essere in rame, nichel o oro ed è divisa in diversi quadranti o "mesh" (200-400...). Sulla griglia viene inoltre messa una polvere di grafite o di carbone che ne aumenta la conducibilità elettrica e la resistenza al calore. Ci sono diversi metodi per preparare il campione che differiscono per tempi e modalità:

- Metodo della goccia
- Metodo dell'ultracentrifugazione;
- Metodo IEM (immuno-elettromicroscopia): sfrutta i legami che si creano tra anticorpi e virus, e necessita di siero specifico verso quel determinato virus. Metodica simile a quella dell'ultracentrifugazione, a cui si aggiunge la fase dell'incubazione con il siero. Il siero può essere convalescente, immune o iperimmune. Durata: 5h ca.
- Metodo IEM Gold: stesso procedimento dell'IEM, ma è il metodo più costoso perché vengono utilizzate delle particelle di oro colloidale per marcare gli anticorpi. Durata: 5h ca.

Inoltre per studiare anatomia e patogenesi di malattie ed infezioni si utilizza il metodo ultrastrutturale che permette di capire l'azione del virus sulla cellula ospite attraverso l'ultramicrotomo.

Il campione, prima di essere osservato al microscopio a trasmissione, deve essere sottoposto ad una colorazione:

- positiva: il virus appare scuro su fondo chiaro; vengono adoperati l'acido fosfotungstico (NaPT) a pH neutro o il molibdato di ammonio;
- negativa: il virus appare chiaro su fondo scuro; vengono adoperati l'acetato di uranile, il citrato di piombo o l'acido fosfotungstico (NaPT) a pH acido.

Metodo della goccia

E' il più rapido, ma richiede un'alta carica virale all'interno del campione (es. croste di ovino causate dal *Parapoxvirus*, virus cutaneo a DNA, dalle grandi dimensioni con forma ovoidale allungata che può causare zoonosi).



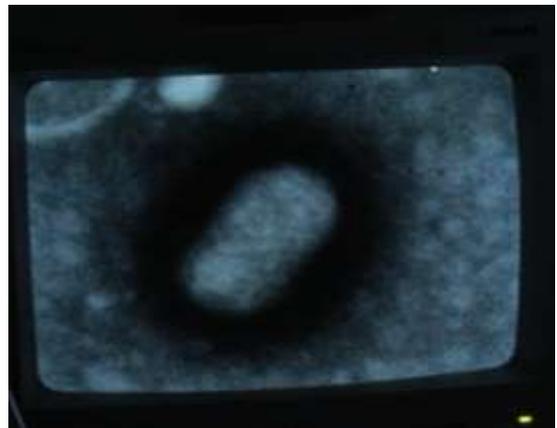
Campione di croste ovine con relativo numero di accertamento



Attraverso una pipetta, il campione pestato viene posto su una piastra Petri



Posizionare la griglia per 10 min su una goccia di campione



Osservazione di un *Parapoxvirus* al microscopio elettronico a trasmissione

Metodo ultracentrifugazione (4h)

- Il campione viene sottoposto a cicli di congelamento/scongelo per rompere la cellula e liberare eventualmente il virus,

- prima centrifuga a 6500 giri per 30min per mandare in sospensione le particelle virali;
- prelevare tramite siringa il sovrantante e porne 80 microlitri in una provetta piccola a contatto con la griglia di rame;
- seconda centrifuga a 21 psi per 15 min con centrifuga ad aria compressa Airfuge
- colorazione del campione con acido fosfotungstico al 2%, per 2 min (colorazione negativa).

Rotore Centrifuga



Il **24 Giugno** ci siamo dedicati ad attività di laboratorio mettendo in pratica il metodo ultracentrifugazione con Airfuge e la metodica ELISA Sandwich (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) per analizzare due campione di feci di vitello diarroiche.

METODICA ELISA SANDWICH

Campione da analizzare: feci di vitello

<p>Materiale: 9 pozzetti di plastica con degli anticorpi sul fondo; soluzione tampone, soluzioni anticorpi colorati; reagente; campioni; soluzione di lavaggio; soluzione di blocco della reazione.</p>

<p>In tutti i pozzetti sono stati dapprima dispensati 50 μL di soluzione tampone, poi nei primi tre pozzetti è stato aggiunto il campione di feci da testare per <i>Rotavirus</i> (R), <i>Coronavirus</i> (C), <i>Escherichia coli</i> (K99). Nei successivi tre il controllo positivo dei campioni, e negli ultimi tre il controllo negativo. Incubazione per 30min a temperatura 18-26°C coperto da foglio di alluminio; primo lavaggio per tre volte di tutti i pozzetti con 2ml di soluzione e 38ml di acqua (circa 300 μL). Aggiunta di 100 μL di anticorpi colorati nei rispettivi pozzetti e incubazione per altri 30 min. Secondo lavaggio (tre volte) e aggiunta di 100 μL del reagente che causa reazione colorimetrica. Il pozzetto con campione e anticorpi anti-K99 e i tutti i controlli positivi si sono colorati. Il nostro campione è risultato positivo all'<i>Escherichia coli</i> K99.</p>
--



Pozzetti di plastica e anticorpi marcati con diversi colori



Preparazione soluzione di lavaggio



Pozzetti prima del 1° lavaggio



Inserimento anticorpi colorati



Primo lavaggio



Inserimento anticorpi in tutti i pozzetti



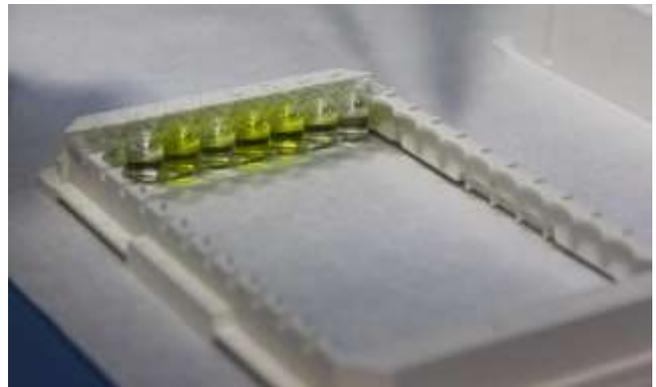
Secondo lavaggio



Incubazione tra
campione-controlli e relativi anticorpi



Aggiunta del reagente che
permette la reazione colorimetrica



Aggiunta soluzione che blocca la reazione
(stop solution)



Osservazione al microscopio TEM PHILIPS
208 S di un *Coronavirus* rilevato in
campione di feci, preparato con metodo
dell'ultracentrifugazione

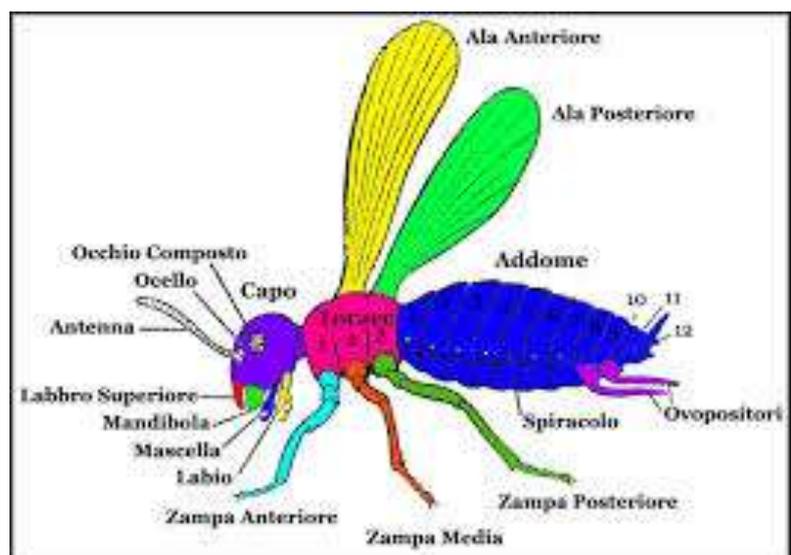
Il **26 Giugno** abbiamo parlato di Entomologia Medico-Veterinaria, scienza che si occupa dello studio degli artropodi (dal greco *arthros*- “articolato” e *-podos* “zampa”) di interesse sanitario con il dr. Donato Raele.

L’Istituto Zooprofilattico si occupa soprattutto di entomologia medico-veterinaria perché studia artropodi che possono arrecare un danno a uomo o animali. Esiste infatti nella Sede Centrale IZSPB di Foggia un laboratorio di Entomologia che riceve campioni inviati dalle AASSLL, dagli ospedali e dai privati da tutta la Puglia e la Basilicata, che sono le due regioni di competenza dell’Istituto Zooprofilattico IZSPB. Sono soprattutto studiati gli artropodi ematofagi ossia parassiti che si nutrono di sangue, come la zanzara, il pidocchio, o alcuni acari come il *Dermanyssus gallinae*, un acaro degli uccelli (anche piccioni) che può anche nutrirsi sull’uomo e causare fastidiose dermatiti.

Gli ectoparassiti arrecano un danno all’uomo non solo per la loro azione ematofaga ma anche perché alcuni di essi possono essere vettori di virus o parassiti (virus della Febbre Gialla, della Peste equina, plasmodi della malaria, ecc.) pericolosi per gli animali o per l’uomo o per entrambi.

Gli artropodi hanno delle caratteristiche comuni:

- sono animali invertebrati;
- sono ricoperti da un esoscheletro composto da chitina;
- hanno arti articolati presenti su alcuni segmenti del corpo;
- hanno un sistema circolatorio aperto che funziona per diffusione, il loro non è sangue ma emolinfa e questo liquido si distribuisce per differenza di gradiente;
- hanno un sistema nervoso formato da gangli;
- hanno una metamorfosi che può essere completa (uovo - larva – ninfa – adulto) o incompleta (uovo – stadio larvale – adulto).



La maggior parte degli artropodi di interesse medico appartengono a due classi: *Insecta* e *Aracnida* (Acari). Osservando le forme adulte di detti artropodi, meglio se con l’aiuto di lenti (lente ingrandimento e/o microscopio), le 2 classi sono facilmente distinguibili esaminando la loro conformazione. Gli insetti, infatti, hanno il corpo suddiviso in 3 parti (testa, torace, addome), hanno 3 paia di zampe e 2 antenne sul capo mentre gli acari hanno il corpo distinto in 2 segmenti (cefalotorace e addome), 4 paia di zampe e sono sprovvisti di antenne.

Nell’ambito di ogni classe vi sono poi altri raggruppamenti denominati Ordini.

Per la classe *Insecta* i più importanti ordini di interesse medico-veterinario sono i seguenti:

Ordine

- Diptera (es.: mosche, zanzare) detti così perchè hanno un solo paio di ali;
- Phthiraptera (es.: pidocchi), insetti senza ali;
- Hemiptera (es.: cimici) tra cui anche alcune che pungono uomo;
- Siphonaptera (es.: pulci);
- Hymenoptera (es.: api, calabroni).

Per la classe *Aracnida* il più importante ordine di interesse medico-veterinario è quello degli Acarida (zecche e acari).

Tutti gli artropodi elencati possono essere identificati da personale altamente specializzato (entomologi; entomologi medici, entomologi veterinari ed entomologi biologi) grazie a chiavi di identificazione morfologica. In alcuni casi è anche possibile utilizzare tecniche di biologia molecolare.



Centopiedi

Il 1 luglio ci siamo esercitati a distinguere le zecche femmine dai maschi e le loro forme immature (uova, larva e ninfa). Il carattere distintivo che ci permette di distinguere il sesso è lo scudo chitinoso: esso nel maschio ricopre tutto il dorso mentre nella femmina si estende in misura ridotta per non ostacolare l'estensione dell'addome durante il pasto di sangue.

Le larve di zecca hanno 3 paia di zampe ma non sono da confondere con gli insetti! Infatti, a differenza di queste, gli insetti hanno sempre il corpo suddiviso in testa, torace ed addome. Le ninfe di zecca hanno 4 paia di zampe come nella forma adulta ma sono prive, sul ventre, dell'apertura genitale.

Dopodiché siamo passati alla distinzione degli artropodi in:

- Ovipari: depongono le uova;
- Vivipari: depongono già le larve;

Stereomicroscopio STEMI SV 11, Zeiss



- Ovovivipari: le cui uova restano all'interno della femmina gravida fino al momento della schiusa;
- Partenogenesi: capacità di riprodursi senza copula.

Microscopio elettronico a scansione

Lo studio di alcuni dettagli morfologici degli artropodi, utili per una corretta identificazione, è reso possibile grazie all'utilizzo del microscopio elettronico a scansione (SEM). Il SEM permette di vedere immagini tridimensionali in bianco e nero e di ottenere alti ingrandimenti (100000).

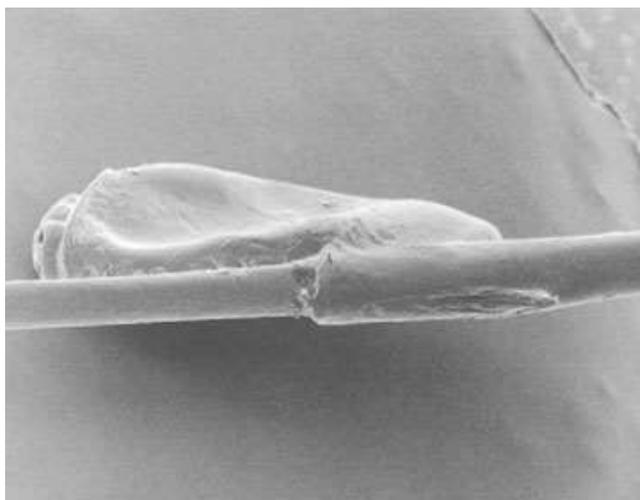
Dopo opportuna preparazione, il campione viene attaccato ad una piastra adesiva che poggia su un supporto di metallo (stub), il quale viene inserito nella camera portacampioni. Come il microscopio elettronico a trasmissione, anche il microscopio elettronico a scansione necessita di condizioni di vuoto spinto. Come per l'identificazione allo stereomicroscopio, lo studio dei caratteri morfologici al SEM richiede una preparazione specifica ed è affidato a personale altamente specializzato, non solo in entomologia ma con adeguate competenze di microscopia elettronica.

Al microscopio elettronico a scansione abbiamo osservato:

- Uovo di pidocchio dell'uomo (*Pediculus humanus capitis*) ancora attaccato al capello
- Pidocchio del pube dell'uomo (*Phthirus pubis*)
- Pulce del cane e del gatto (*Ctenocephalides felis*)



**Microscopio elettronico a scansione SEM
Phenom World Pro in dotazione al
Laboratorio di Entomologia Sanitaria IZSPB**



Al termine della lezione tenuta dal dr. Donato Raele, il dr. Giuseppe Mancini ha introdotto un nuovo argomento: lo studio delle zanzare.

Le zanzare o culicidi

Tassonomia: *Animalia* (regno)

Arthropoda (phylum)

Insecta (classe)

Diptera (ordine)

Nematocera (sottordine)

Culicidae (famiglia)

Culicinae – Anophelinae (sottofamiglie)

Anatomia delle zanzare

Le zanzare sono insetti (corpo distinto in testa, torace ed addome) appartenenti all'ordine *Diptera* (o Ditteri), dal greco dis- (due volte) e -pteron (ali), caratterizzati dalla presenza a livello del torace di due sole ali funzionali affusolate. Sono presenti inoltre i cosiddetti "bilancieri", delle ali modificate che hanno funzione di stabilizzazione del volo.

Hanno una lunghezza generalmente di 1 cm tuttavia alcuni esemplari possono misurare oltre 4 cm.

L'apparato buccale dei Ditteri può essere di diverso tipo:

- apparato masticatore (es. coleotteri)
- succhiatore (es. farfalle)
- masticatore lambitore e succhiatore (es. api)

pungitore e succhiatore (zanzare)

Le zanzare hanno l'apparato boccale di tipo pungitore-succhiatore e infatti presentano all'estremità del capo una proboscide lunga e sottile formata da un labbro superiore, labbro inferiore, mascella, mandibola e ipofaringe. Le zanzare femmine tramite la proboscide pungono gli ospiti e ne succhiano il sangue che è indispensabile per garantire la ovodeposizione. I maschi invece si nutrono di sostanze zuccherine di natura vegetale.

La testa inoltre presenta un paio di antenne: nei maschi, dove sono ricche di peli, vengono definite "piumose" e svolgono una funzione sensoriale olfattiva che permette il riconoscimento delle femmine e garantire

l'accoppiamento. Sul capo si trovano ancora un paio di occhi composti e un paio di palpi, strutture che svolgono una funzione tattile importante soprattutto per favorire l'alimentazione.



Il torace presenta nella sua estremità caudale lo scutello che permette di distinguere le due sottofamiglie. A livello toracico prendono inserzione le ali che sono ricoperte di scaglie, è importante che queste non vengano rovinare durante l'osservazione in quanto sono necessarie per una corretta identificazione di specie.

L'addome termina nelle femmine con due piccole strutture appendicolari dette cerci mentre nel maschio si riconosce l'"armatura genitale" o "ipopigio" formata da gonoxite e gonostilo. L'ipopigio permette al maschio di unirsi ai cerci della femmina durante l'accoppiamento.

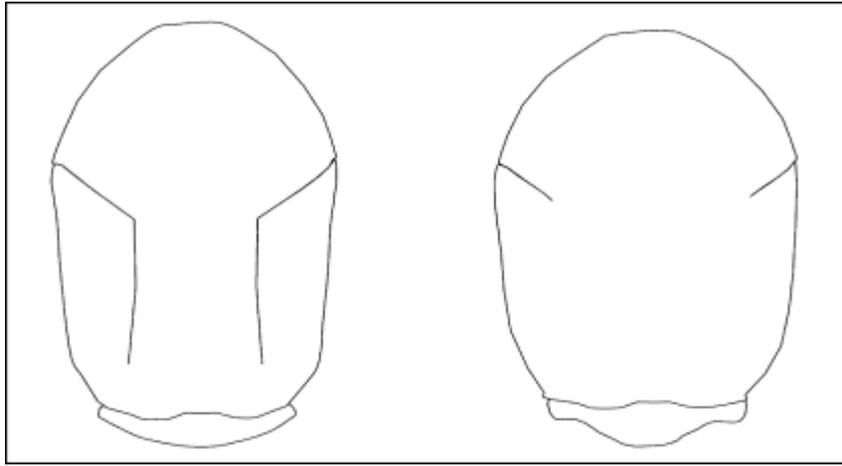
Armatura genitale ("ipopigio")



In Italia sono presenti 65 specie e 7 generi: *Aedes*, *Culex*, *Culiseta* (più grande), *Uranotaenia* (più piccola), *Ochlerotatus*, *Orthopodomyia*, *Coquillettidia*.

Le due sottofamiglie *Culicinae* e *Anophelinae* differiscono per alcune caratteristiche:

ANOPHELINAE	CULICINAE
- scutello unico arrotondato	- scutello trilobato
- palpi lunghi quanto la proboscide in entrambi i sessi	- palpi lunghi quanto la proboscide nei maschi, più corti nelle femmine
- gonostilo più lungo del gonocoxite	- gonostilo più corto o uguale al gonocoxite
- in fase di riposo assumono posizione sulla superficie ad angolo acuto	- in fase di riposo assumono posizione con la superficie ad angolo retto
- fase di sviluppo larvale priva di sifone	- hanno il sifone respiratorio durante la metamorfosi
- le larve si posizionano a pelo d'acqua	- larve si posizionano verticalmente nell'acqua



Conformazione dello scutello nelle due sottofamiglie di Culicidae:

a sx Anophelinae

a dx Culicinae

Aedes (aggressiva) albopictus ("picchiettata di bianco") o "zanzara tigre" è una zanzara esotica, originaria del Sud Est asiatico. Il suo habitat naturale è rappresentato dalle foreste pluviali. A seguito degli interventi di deforestazione e di urbanizzazione, *Aedes albopictus* ha abbandonato il suo habitat naturale per spostarsi nelle aree urbane dove era garantita la disponibilità del suo ospite elettivo, l'uomo. Nel 1990 la zanzara tigre viene identificata per la prima volta in Italia, a Genova e nel 2006 viene segnalata anche nella città di Foggia.



Infatti un piano di monitoraggio eseguito dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata e dalla Facoltà di Agraria dell'Università di Foggia ha permesso di

identificare uova di zanzara tigre, deposte in diverse aree della città. Ma *Aedes albopictus* come è riuscita a raggiungere luoghi così lontani da quelli di origine?

Alcune femmine hanno deposto le loro uova in alcuni copertoni in cui si erano create piccole raccolte di acqua. I pneumatici infatti mimano le condizioni ambientali create dalle canne di bamboo che rappresentano il loro naturale luogo di sviluppo: luogo buio protetto da raggi solari diretti, ottime condizioni di umidità quando si raccoglie acqua stagnante. I copertoni infestati dalle uova furono dapprima trasportati sulle navi dal Giappone negli Stati Uniti d'America e infine portati in Italia.

Caratteristiche

- lunghezza dai 5mm agli 8 mm
- nera con strisce bianche (striscia bianca continua sul torace e sul capo)
- attività ectoparassitaria diurna
- scarsa volatrice, volo basso
- aggressiva e antropofila
- vive bene in città
- l'intero ciclo biologico dura mediamente 15 giorni, da adulta può sopravvivere dai 7 gg ai 15 gg

- una sola zanzara può deporre 300 uova nell'arco della sua vita
- uova deposte a pelo d'acqua e dette "DIAPAUSANTI", riconoscono il numero di ore di luce e la temperatura (il ciclo di sviluppo si completa più rapidamente se le temperature sono alte e le ore di luce maggiori, più lento se le temperature sono basse e le ore di luce scarse). Le uova deposte nei mesi di ottobre-novembre vanno in letargo: nei mesi di aprile-maggio, quando le ore di luce aumentano e le temperature incominciano ad alzarsi, le uova riprendono il loro normale ciclo.



Osservazione delle zanzare allo stereomicroscopio

Il giorno **3 Luglio** si è tenuto l'ultimo incontro tenuto dal dr. Giuseppe Mancini per concludere l'argomento relativo allo studio delle zanzare.

Si è proceduto all'osservazione ad occhio nudo e allo stereomicroscopio di forme immature:

- uova di *Aedes albopictus* su bacchetta di legno;
- larve di Culicinae – osservazione del sifone respiratorio.

Successivamente sono state preparate 4 piastre Petri, una per ciascun alunno, contenenti diversi insetti tra cui zanzare appartenenti alle due sottofamiglie, Anophelinae e Culicinae, di sesso differente e si è proceduto alla osservazione allo stereomicroscopio e alla distinzione per sottofamiglia e sesso di tutti i culicidi.

Infine sono stati presentati i dispositivi utilizzati per la cattura di forme adulte ed immature di zanzare:

Ovitrapola



- CDC LIGHT CO₂ per zanzare adulte notturne, trappola a ventilazione dotata di una luce e di una ventola che le aspira verso il basso, convogliandole in un retino. L'effetto attrattivo aumenta se si utilizza del ghiaccio secco che sciogliendosi rilascia anidride carbonica (CO₂), composto chimico che attrae le zanzare. Il sacchetto, contenente zanzare vive e zanzare morte, viene trasportato in laboratorio e lasciato per pochi minuti in congelatore a -20°C, in modo da uccidere le zanzare vive.

CDC light CO₂



- BG-SENTINEL per zanzara tigre, è una trappola a ventilazione, costituita da un grande sacco bianco che viene poggiato sul terreno, al cui interno è presente la ventola che crea un flusso d'aria verso il basso, dove ci sono un primo sacchetto nero bucato ad una estremità che convoglia le zanzare in un secondo sacchetto di raccolta. Nella trappola è possibile aggiungere i feromoni o il ghiaccio secco per aumentarne il potere attrattivo.

BG-SENTINEL



- GRAVID TRAP, è una trappola a ventilazione disposta su una bacinella piena di acqua e materiale organico vegetale, le zanzare femmine gravide che si avvicinano per deporre le uova vengono aspirate e raccolte all'interno di un sacchetto.

GRAVID TRAP



-ASPIRATORE ELETTRICO a corrente elettrica per aspirare e catturare le zanzare in luoghi chiusi o sull'ospite.

ASPIRATORE ELETTRICO



Si ringrazia tutti coloro che hanno permesso la realizzazione del progetto in particolar modo:

Il Direttore IZSPB: Dr. Dorianò Chiocco

La responsabile di laboratorio: Dr.ssa Maria Assunta Cafiero

I Tutors di laboratorio: Dr. Domenico Galante, Dr. Giuseppe Mancini, Dr. Donato Raele

Relazione di: Cristina Crovara 3^AH, Diletta Menga 3^AH, Gioele di Paolo 3^AI, Graziana di Paolo 3^AL

