UNIVERSITA'DEGLI STUDI DI MESSINA

Dipartimento di Scienze Veterinarie

DOTTORATO DI RICERCA IN SANITÀ PUBBLICA ANIMALE E SICUREZZA ALIMENTARE XXXIII CICLO

Settore Scientifico Disciplinare VET/06

Indagini su vettori e patologie trasmesse in Sicilia

Candidata: Dott.ssa Giulia Caracappa

Coordinatore: Ch.ma Prof.ssa Rosaria Laurà

Tutor: Ch.mo Prof. Emanuele Brianti

ESAME FINALE 2021

Prefazione

I vettori e le malattie da questi trasmesse rappresentano da sempre un'importante minaccia sanitaria per l'uomo e gli animali costituendo oltre l'80% delle noxe infettive a livello globale.

I mutamenti climatici ed ambientali, associati all'aumento dei movimenti di persone e animali per cause sociali, commerciali o per turismo stanno notevolmente modificando l'epidemiologia di alcune di queste malattie trasformandole in emergenti o riemergenti. Tutto ciò desta non poca preoccupazione a livello nazionale e internazionale e galvanizza sempre più l'attenzione, mediatica e scientifica, verso tali malattie e incoraggia lo sviluppo di innovative strategie di controllo delle stesse. In questa tesi sono riportati i risultati degli studi che ho sviluppato o ai quali ho potuto partecipare durante il corso del dottorato di ricerca. La tesi, per la varietà delle tematiche affrontate e poiché alcune delle ricerche presentate sono state già pubblicate su riviste scientifiche internazionali, è proposta in forma di tesi per pubblicazioni ed articolata in tre capitoli:

Capitolo 1. Presenta i risultati di una ricerca pubblicati sulla rivista "Acta Tropica". Lo studio condotto su esemplari di flebotomi catturarati in diverse stagioni di campionamento in Sicilia ha avuto lo scopo di realizzare per la prima volta un database di riferimento utile per l'identificazione, mediante metodica MALDI-TOF, di alcune delle più comuni specie di flebotomi dell'area Mediterranea;

Capitolo 2. Presenta i risultati di uno studio pubblicato sulla rivista "PLoS One" che ha avuto come obiettivo principale quello di investigare origine e varietà dei pasti di sangue effettuati da flebotomi catturati in differenti ambienti e di determinare, contestualmente, il tasso di infezione da tripanosomatidi (es. *Leishmania*, *Tripanosoma*) negli stessi;

Capitolo 3. Presenta i risultati di una indagine in corso di pubblicazione che ha avuto lo scopo di approfondire gli studi sulla fenologia della fauna ixodida nella riserva di Ficuzza e determinare, mediante metodiche biomolecolari, la presenza di patogeni zoonotici negli esamplari catturati.

Le ricerche presentate in questa tesi sono state condotte prioritariamente presso il Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Messina ed hanno visto il mio coinvolgimento sia nelle fasi di campo sia in quelle di laboratorio oltrechè alla stesura degli articoli scientifici.

Le analisi molecolari riportate nel secondo capitolo (identificazione dei pasti di sangue e ricerca dei tripanosomatidi) sono state condotte presso l'Instituto di Medicina Tropicale, Università di Lisbona (Portogallo). Ed ancora, la ricerca dei patogeni nelle zecche catturate all'interno della riserva naturale di Ficuzza (Capitolo III) sono state effettuate presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari.

Gli studi riportati ai capitoli I e II sono stati parzialmente finanziati da Bayer Animal Health GmbH, 40789 Monheim, Germany (costi delle attività di campo e di pubblicazione) e dal programma 'Research and Mobility' (costo delle analisi molecolari svolte presso l'Università di Lisbona).

Introduzione

Obiettivo di questa tesi è stato quello di migliorare le attuali conoscenze su tassonomia, presenza, dinamica e funzione vettoriale dei flebotomi e delle zecche.

Questi parassiti svolgono un ruolo fondamentale, poiché sono vettori di malattie zoonosiche e occupano un importante ruolo nella interazione uomo/animale; infatti il controllo delle malattie, ad eziologia differente, trasmesse da vettori, rappresenta un problema emergente, reale e sempre attuale per la salute pubblica.

In questa tesi sono stati presi in considerazione i flebotomi, quali vettori biologici di *Leishmania* e le zecche, responsabili di trasmettere patogeni zonotici come *Babesia* spp e *Theileria* spp.

Tra i flebotomi presi in esame, *Phlebotomus perniciosus* è stato particolarmente studiato in quanto trattasi di una delle principali specie vettrici di leishmaniosi, il cui agente eziologico è *Leishmania infantum* ed è responsabile della leishmaniosi canina (CanL) nei cani e viscerale (VL) o leishmaniosi cutanea (CL) nell'uomo nell'area del Mediterraneo [1].

Secondo le indagini entomologiche disponibili sui vettori di *L. infantum* in Sicilia, *P. perniciosus* è la specie maggiormente presente, contrariamente a *P. neglectus* e *P. perfiliewi* che sono stati rilevati meno frequentemente [2-3], mentre *P. sergenti,* responsabile di *L. tropica,* è stato sporadicamente segnalato in Sicilia orientale [2-3].

Tra le metodiche utilizzate per lo studio di tali vettori la spettrometria di massa di tipo MALDI – TOF, ha assunto un ruolo rilevante nell’approccio alternativo all’identificazione tradizionale di specie di artropodi, ed oggi è adottata in molti laboratori.

L'identificazione delle specie di flebotomi da parte del MALDI-TOF MS è fattibile e rappresenta un nuovo strumento promettente per migliorare gli studi biologici ed epidemiologici di questi vettori, importanti da un punto di vista sanitario. Nello studio dei parassiti, oltre al sequenziamento del DNA, sono stati recentemente introdotti vari metodi di tassonomia molecolare per superare le carenze della tradizionale identificazione dei flebotomi, basata su caratteristiche morfologiche, permettendo una classificazione rapida e affidabile in situazioni di focolai di leishmaniosi. Durante l'ultimo decennio MALDI-TOF MS è divenuta metodica di routine per l’identificazione e la classificazione dei principali agenti patogeni nella diagnostica clinica, poiché offre analisi ad alto rendimento, sensibili e specifiche in microbiologia, con un buon rapporto costo-efficacia. Il metodo da un potere discriminatorio sufficiente per un'ampia gamma di batteri clinicamente rilevanti per l’identificazione di specie, sottospecie e ceppo, consentendo il rilevamento di linee epidemiche. [4] MALDI-TOF MS presenta numerosi vantaggi rispetto ad altri metodi di tipizzazione, inclusa la semplice preparazione del campione e il breve tempo di elaborazione [5].

La mole di dati accumulati ha permesso la creazione di data base di spettri, commerciali e non, messi a disposizione per le analisi microbiologiche di routine [4]. La prevenzione dell'insorgenza della leishmaniosi si basa sul controllo e il monitoraggio dei vettori, e in particolare è essenziale un'identificazione precisa degli esemplari di flebotomi a livello di specie; infatti gli attuali metodi morfologici e molecolari sono lunghi, costosi e laboriosi e limitano le indagini su larga scala. La recente applicazione del MALDI-TOF MS per l'identificazione degli artropodi, compresi i flebotomi, apre nuove frontiere in questo settore. Con la crescente importanza delle malattie trasmesse dai flebotomi, in medicina umana e medicina veterinaria, l'identificazione delle specie è il primo passo negli studi entomologici ed epidemiologici e l'identificazione errata può avere un impatto negativo sulla salute pubblica. A volte, l'identificazione morfologica può essere compromessa, come nel caso di campioni gravemente danneggiati, e contrariamente alle metodiche classiche, MALDI-TOF MS ha rivoluzionato l'identificazione di microrganismi clinicamente rilevanti (batteri, lieviti e funghi filamentosi) grazie al suo basso costo, tempo minimo di preparazione del campione e precisione [6].

Particolare importanza assumono le preferenze alimentari dei flebotomi, vettori di leishmania, e come esse possano influenzare le dinamiche epidemiologiche.

Le leishmaniosi sono malattie parassitarie causate da protozoi del genere *Leishmania,* che infettano diversi mammiferi selvatici e domestici, compreso l'uomo, e vengono trasmessi tramite morso dei flebotomi. A causa della vicinanza con le coste nord dell'Africa, Tunisia, Libia, Egitto, Algeria e Marocco, la Sicilia è un'area potenzialmente soggetta all'introduzione di specie di *Leishmania* [8], dovuto anche al grande flusso migratorio di persone tra i due continenti. Infatti, si riscontra un numero elevato di segnalazioni di infezioni umane da *L. tropica* in Italia [9,10,11-12], collegato al flusso di immigrati provenienti dalle regioni endemiche del Nord Africa e del Medio Oriente. Questo fenomeno potrebbe determinare così il primo passo per la sua potenziale diffusione in Sicilia e successivamente diffondere in altre aree dell'Europa meridionale in cui si è vista una sempre maggiore presenza del vettore competente [10].

In questo studio sono stati analizzati 3.090 flebotomi, di cui *S. minuta* era la specie più abbondante, seguita da *P. perniciosus, P. sergenti, P. perfiliewi e P. neglectus.* Contrariamente alle aspettative è stato evidenziato che il flebotomo mostra preferenze di ospite su cui effettuare il pasto di sangue. Nonostante i siti fossero rappresentati da canili, il coniglio selvatico e l'uomo sono state le fonti più frequenti, seguiti da altri vertebrati come bovidi, equidi, suidi, canidi e in minor misura muridi e felidi. Dati simili sono stati rilevati in uno studio relativo alle preferenze di pasti di sangue dei flebotomi, in cui è stato interessante notare come i lagomorfi siano stati la fonte di sangue più frequente per il *P. perniciosus,* così come in una grande epidemia di leishmaniosi umana a Madrid

[13-14]; da studi effettuati si è evidenziato l'importante ruolo inaspettato delle lepri e dei conigli selvatici come serbatoio ospitante di *L. infantum*.

In alcuni studi è stato rilevato che le specie di flebotomi del genere *Sergentomyia* sono comprovati vettori di *Leishmania* nei rettili, e sembrano non essere patogeni per l'uomo. Tuttavia, una considerazione del ruolo di *Sergentomyia* spp. nella circolazione della leishmaniosi dei mammiferi appare ripetutamente in letteratura e la possibilità di trasmissione della leishmania all'uomo rimane poco chiara. [15]

Anche le zecche, parassiti ematofagi obbligati, Chelicerati appartenetti alla sottoclasse Acari, zecche dure della famiglia Ixodidae, rivestono un importante ruolo come vettori nella trasmissione di zoonosi. Nello studio presentatato in questa Tesi è stata studiata la fenologia di questi artropodi vettori in un'area ristretta della Sicilia occidentale peculiare per le caratteristiche climatico/ambientali. Le zecche esaminate appartengono alle specie: *Ixodes ricinus, Ixodes frontalis, Dermacentor marginatus, Haemaphysalis punctata, Rhiphicephalus bursa, Rhiphicephalus turanicus* e *Hyalomma* sp. Si tratta di vettori di agenti patogeni appartenenti alla famiglia *Richettsaceae, Babesidae e Theileriidae, Anaplasmataceae, Spirochaetaceae*. Le zecche, oggetto dello studio, rivestono particolare interesse poiché si è visto come siano in grado di adattarsi alle variazioni climatico/ambientali e conseguentemente alla ricerca di un ospite per garantirsi la sopravvivenza e svolgere così il proprio ciclo biologico. Questo aspetto rileva la fondamentale importanza dello studio della fenologia con conseguente diffusione delle antropozoonosi. Dall'analisi molecolare delle zecche adulte è risultato che la principale zoonosi di carattere emergente è la piroplasmosi, con un elevato impatto sanitario sugli animali di interesse zootecnico e d'affezione.

Bibliografia

1. Maroli M., Feliciangeli M.D., Bichaud L., Charrel R.N., Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. Med Vet Entomol. 2013; 27(2):123–47. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x PMID: 22924419

2. Gaglio G., Brianti E., Napoli E., Falsone L., Dantas-Torres F., Tarallo V.D., et al. Effect of night time-intervals, height of traps and lunar phases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis. Acta Trop. 2014; 133:73–7. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.02.008 PMID: 24561074 13.

3. D'Urso V., Ruta F., Khoury C., Bianchi R., Depaquit J., Maroli M. About the presence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae) in Eastern Sicily, Italy. Parasite. 2004; 1(3):279–83.

4. Dvorak V., Halada P., Lavackova K., Dokianakis E., Antoniou M., Volf P., 2014. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Parasit. Vectors 7, 21

5. Muller P., Pfluger V., Wittwer M., Ziegler D., Chandre F., Simard F., Lengeler C., 2013. Identification of cryptic Anopheles mosquito species by molecular proteinprofiling. PLoS One 8, e57486.

6. Lafri I., Almeras L., Bitam I., Caputo A., Yssouf A., Forestier C.L., Izri A., Raoult D., Parol P., 2016. Identification of Algerian field-caught phlebotomine sand fly vectors by MALDI-TOF MS. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, e0004351.

7. Maia C., Depaquit J. Can Sergentomyia (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting Leishmania? Parasite. 2016; 23:55. https://doi.org/10.1051/parasite/2016062 PMID:27921993)

8. El Alem M.M.M., Hakkour M., Hmamouch A., Halhali M., Delouane B., Habbari K. et al. Risk factors and prediction analysis of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania tropica in Southwestern Morocco. Infect Genet Evol. 2018; 61:84–91. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.017 PMID: 29578084

9. Dujardin J.C., Campino L., Cañavate C., Dedet J.P., Gradoni L., Soteriadou K. et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. Emerg Infect Dis. 2008; 14(7):1013–8. https://doi.org/ 10.3201/eid1407.071589 PMID: 18598618

10. Di Muccio T., Scalone A., Bruno A., Marangi M., Grande R., Armignacco O. et al. Epidemiology of imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European endemic country. PLoS One. 2015; 10(7): e0134885. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134885 PMID: 26230719

11. Antinori S., Gianelli E., Calattini S., Longhi E., Gramiccia M., Corbellino M. Cutaneous leishmaniasis: an increasing threat for travellers. Clin Microbiol Infect. 2005; 11(5):343–6. https://doi.org/10.1111/j.1469- 0691.2004.01046.x PMID: 15819858

12. Gramiccia M., Di Muccio T., Marinucci M. Parasite identification in the surveillance of imported leishmaniasis cases in Italy. Parassitologia. 2004; 46: 207–10. PMID: 15305718

13. Gonza´lez E., Jime´nez M., Herna´ndez S., Martı´n-Martı´n I., Molina R. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. Parasit Vectors. 2017; 10:368. https://doi.org/10.1186/s13071- 017-2309-z PMID: 28764772

14. Gonza´lez E., Ga´llego M., Molina R., Abras A., Alcover M.M., Ballart C. et al. Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome b gene. Acta Trop. 2015; 152:96–102. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.020 PMID: 26342793

15. Sadlova J., Dvorak V., Seblova V., Warburg A., Votypka J., Volf P. *Sergentomyia schwetzi* is not a competentvector for *Leishmania donovani* and other Leishmania species pathogenic to humans. Parasit Vectors. 2013; 6:186. https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-186 PMID: 23786805

Capitolo 1

Identificazione di esemplari di flebotomi mediante sprettrometria di massa MALDI-TOF e realizzazione di un database di riferimento

Adattato dalla pubblicazione:

Identification of phlebotomine sand flies through MALDI-TOF mass spectrometry and in-house reference database

Francesca Arfuso[a], Gabriella Gaglio[a], Jessica Maria Abbate[a], Giulia Caracappa[a], Angelo Lupia[b], Ettore Napoli[a], Filippo Giarratana[a], Maria Stefania Latrofa[c], Salvatore Giannetto[a], Domenico Otranto[c], Emanuele Brianti[a]

[a] Department of Veterinary Sciences, University of Messina, Polo Universitario Annunziata, 98168, Messina, Italy

[b] Biologist Practitioner, Via A. Gramsci 15, 88050, Catanzaro, Italy

[c] Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Strada prov.le per Casamassima km. 3, Valenzano, Bari, Italy

Acta Tropica 2019 Jun 11; 194:47-52.

Riassunto

I flebotomi sono vettori di molti agenti patogeni responsabili di malattie umane e animali in tutto il mondo. La loro identificazione di specie è importante negli studi epidemiologici e nei programmi di controllo. Lo spettrometro di massa di tipo MALDI – TOF è stato sempre più studiato come approccio alternativo all'identificazione tradizionale di specie di artropodi. Per creare un database interno di spettri proteici per un'identificazione rapida e affidabile delle specie flebotomi, sono stati sottoposti ad analisi *MALDI-TOF MS* n.166 esemplari di flebotomi vettori catturati sul campo, morfologicamente identificati come *Flebotomus perniciosus* (n.=56; 26 maschi e 30 femmine*)*, *Phlebotomus neglectus* (n.=4 maschi), *Phlebotomus sergenti* (n.=6; 4 maschi e 2 femmine) e *Sergentomyia minuta* (n.=100; 45 maschi e 55 femmine). Su 166 vettori, 149 esemplari (89,8%) hanno prodotto un numero consistente di spettri proteici specie-specifici. Sono stati generati database di buona qualità per *P. perniciosus* e *S. minuta;* non sono stati ancora generati database adeguati per *P. neglectus* e *P. sergenti* a causa del esiguo numero di esemplari esaminati. L'identificazione di 80 vettori flebotomi (n.=20 *P. perniciosus*; n.=60 *S. minuta*) è stata confermata utilizzando il nuovo SuperSpectra generato come test di validazione. I risultati riportati supportano l'uso di MALDI-TOF MS per un'identificazione di specie dei flebotomi rapida, semplice e affidabile suggerendo la sua utilità in studi di indagine accurati, migliorando in ultima analisi la conoscenza biologica ed epidemiologica su questi vettori di agenti patogeni.

1. Introduzione

I flebotomi (Diptera, Psychodidae) sono insetti ematofagi di grande importanza nella medicina umana e veterinaria a causa del loro coinvolgimento nella trasmissione di virus (Bunyaviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae), batteri (Bartonella) e protozoi del genere Leishmania (Maroli et al., 2013; Gaglio et al., 2014, 2018; Halada et al., 2018a), molti causa di zoonosi. Nel mondo, infatti, la leishmaniosi è la terza più importante malattia trasmessa da vettori, dopo la malaria e la filariosi linfatica (OMS, 2002, 2018). I flebotomi del genere *Phlebotomus* e *Lutzomyia* sono gli unici vettori comprovati della specie *Leishmania infantum*, agente eziologico della leishmaniosi umana e canina. La trasmissione dei parassiti della Leishmania coinvolge interazioni tra parassiti-vettori e ospiti. I cambiamenti nella distribuzione dei vettori sono associati alle variazioni nella trasmissione del rischio di agenti patogeni e conseguentemente l'attività di monitoraggio degli artropodi diventa rilevante nei programmi di sorveglianza. In base a quanto detto l'accurata identificazione delle specie flebotomi è di importanza fondamentale per prevenire l'insorgenza della leishmaniosi e per stabilire adeguati programmi di controllo dei vettori (Lafri et al., 2016). L'identificazione convenzionale dei flebotomi in base alle caratteristiche morfologiche è laboriosa, richiede tempo e necessita di un certo grado di competenza (Depaquit et al., 2013). L'identificazione, infatti, è ostacolata dalla mancanza di chiavi morfologiche complete, caratteri distintivi delle specie minute e dall'esistenza di plasticità fenotipica tra le popolazioni (Prudhomme et al., 2012; Ready, 2013). Sono stati stabiliti approcci su base molecolare per diverse specie di flebotomi (Depaquit, 2014; Dvorak et al., 2014; Latrofa et al., 2011, 2012); tuttavia, questo metodo è oneroso e la sua validità può essere compromessa dalla variabilità genetica nel target locus (Depaquit et al., 2002; Dvorak et al., 2011). Negli ultimi anni, la tecnica MALDITOF MS (spettrometria di massa a tempo di volo con desorbimento / ionizzazione laser assistita da matrice), un metodo di routine per identificare e classificare principalmente i batteri per la diagnostica clinica (Sauer e Kliem, 2010) è stata studiata come approccio alternativo all'identificazione convenzionale degli artropodi (Kaufmann et al., 2011; Karger et al., 2012; Kaufmann et al.,2012; Yssouf et al., 2013a, 2013b, 2014a, 2014b; Dvorak et al., 2014). I progressi nella scienza tecnologica e informatica e lo sviluppo ben validato comprendono database completi di spettri di massa proteici abilitati e l'analisi dei dati associati. Degno di nota, questo approccio ha mostrato un'importante applicazione nell'identificazione di specie di una vasta gamma di batteri comuni e non esoterici e funghi (Patel, 2015). Sono in corso ricerche per migliorare e/o costruire ex novo banche dati per l'identificazione di organismi esoterici, e con alcune eccezioni, la tecnica MALDI-TOF MS si sta rivelando utile per la loro identificazione. MALDI-TOF MS è stato applicato per la prima volta per l'identificazione di specie *Culicoides* (Kaufmann et al., 2011, 2012) e su diverse specie di zanzare (Muller et al., 2013; Yssouf et al.,

2013b; Schaffner et al., 2014). Specie di flebotomi del Mediterraneo allevate in colonie di laboratorio (Dvorak et al., 2014; Mathis et al., 2015; Halada et al., 2018a) e/o catturate in natura, sono state valutate anche da MALDI-TOF MS (Mathis et al., 2015; Lafri et al., 2016; Halada et al., 2018b) mostrando le sua potenzialità per molte applicazioni in biologia dei vettori ed epidemiologia delle malattie trasmesse da vettori (Yssouf et al., 2016). Tuttavia, il MALDI-TOF MS non è mai stato utilizzato come strumento per il monitoraggio della fauna dei flebotomi provenienti dall'Italia. Lo studio attuale è volto a valutare l'idoneità di MALDI-TOF MS nel distinguere i flebotomi catturati in campo e per valutare se lo spettro di massa proteico ottenuto rappresenta un modello proteico unico che permette l'identificazione univoca delle specie. Questa indagine potrebbe rappresentare un primo step verso la creazione di un database di spettri proteici che consentirebbe un'identificazione rapida e affidabile delle specie.

2. Materiali e metodi

2.1 Catture e identificazione morfologica di flebotomi

I flebotomi utilizzati nello studio sono stati catturati nel periodo compreso tra maggio ed agosto 2018 con l'utilizzo di trappole luminose posizionate all'interno di 3 canili situati nelle provincie di Siracusa (2) e Catania (1), in Sicilia. I flebotomi sono stati conservati in etanolo al 70% identificando la specie con l'utilizzo di chiavi morfologiche (Dantas-Torres et al., 2014). Ogni esemplare è stato sezionato con aghi entomologici, e i genitali esterni dei maschi o la testa e gli ultimi tergiti posteriori delle femmine sono stati sezionati, chiarificati e posti su vetrini come descritto (Gaglio et al., 2017).

Un totale di 262 esemplari di flebotomi che non hanno effettuato il pasto di sangue e/o non gravidi, identificati come *Phlebotomus perniciosus* (no = 80; 41 maschi e 39 femmine), *P. neglectus* (no = 4 maschi), *P. sergenti* (no = 6; 4 maschi e 2 femmine) e *Sergentomyia minuta* (no = 172; 67 maschi e 105 femmine) è stato analizzato attraverso la generazione e la validazione di SuperSpectra.

2.2 Analisi MALDI TOF e la generazione di "super spettri"

La preparazione del campione e l'analisi MALDI-TOF MS sono state condotte seguendo un protocollo già descritto adattato per i flebotomi (Dvorak et al., 2014; Lafri et al., 2016). I toraci sezionati dei campioni sono stati omogeneizzati in 10 µL di acido formico al 25% (Sigma-Aldrich, Buchs, Svizzera) in microtubi da 1,5 ml con pestelli sterili monouso. Dopo breve centrifugazione (10.000 rpm per 60 s), 1 µL di surnatante di ogni campione, corrispondente all'estratto proteico, è stato depositato in duplicato su una piastra in acciaio (VITEK®MS, bioMérieux, Francia). In

seguito, 1 µL di matrice MALDI è stato direttamente sovrapposto su ogni campione sulla piastra di destinazione. La matrice MALDI è stata preparata quotidianamente come soluzione di acido sinapinico (30 mg/mL, Sigma-Aldrich, Buchs, Svizzera) al 60% acetonitrile, 40% dH2O con 0,3% di acido trifluoroacetico (TFA) (Sigma- Aldrich, Buchs, Svizzera). La piastra con i campioni e la matrice è stata lasciata asciugare all'aria a temperatura ambiente e posta per l'analisi nello strumento MALDI-TOF Mass Spectrometry Axima™ Confidence (Shimadzu-Biotech Corp., Kyoto, Giappone) con rilevamento in modalità lineare, positivo al laser frequenza di 50 Hz con un intervallo di massa da 2 a 30 kDa. Per ogni piastra di destinazione la calibrazione è stata effettuata utilizzando spettri del ceppo di riferimento *Escherichia coli* (ATCC® 8739™). Questo test batterico standard è stato introdotto in tutte le piastre per ogni analisi, al fine di controllare il caricamento su spettro di massa, la qualità della matrice e le performance di MALDI-TOF. Il surnatante costituito da toraci omogeneizzati dei 166 flebotomi è stato analizzato da MALDI-TOF MS per mettere a punto un database interno e valutare la riproducibilità intra-specie dello spettro della massa proteica. Gli spettri elaborati sono stati esportati come successione di picchi con valori m/z per ogni picco e intensità di segnale nel formato ASCII. L'analisi dei tratti caratteristici delle proteine di massa e la generazione di dendogrammi, basati su spettri interi compresi tutti i segnali che superano i criteri di rilevazione dei picchi, sono stati eseguiti utilizzando il pacchetto software SARAMIS™ Premium (archivio spettrale e sistema di identificazione microbica, AnagnosTec, Potsdam-Golm, Germania) come descritto altrove (Kaufmann et al., 2011). La successione dei picchi è stata ridotta ad un intervallo di massa di 2-30 kDa e i picchi con un'intensità relativa inferiore all'1% sono stati rimossi. Modelli di massa dei biomarcatori, denominati "superspettri", sono stati calcolati adoperando lo strumento SARAMIS™ SuperSpectra™, utilizzando 10 esemplari per specie con 4 replicati ciascuno. La specificità di queste potenziali masse di biomarcatori è stata determinata confrontandola con l'intero archivio spettrale SARAMIS™. Per la validazione del SuperSpectra™ generato, un totale di 96 campioni (n = 24, *P. perniciosus*, n = 15 maschi e n = 9 femmine; n = 72, *S. minuta*, n = 22 maschi e n = 50 femmine) sono stati analizzati in duplicato, e i tratti distintivi ottenuti sono stati importati in Software SARAMIS™. La soglia per l'identificazione è stata fissata con un 75% di corrispondenza con i biomarcatori, basandosi sul set dei dati di riferimento, secondo le linee guida di SARAMIS™. Spettri contenenti meno di 30 dati e picchi con un'intensità relativa < 1% sono stati considerati di bassa qualità. L'analisi Kappa è stata effettuata con l'ausilio del software statistico Prism v. 4.00 (Graphpad Software Ldt., USA, 2003) per valutare la corrsispondenza tra la MALDI-TOF MS e l'identificazione morfologica.

2.3 L'identificazione molecolare dei flebotomi

Le porzioni di campioni di flebotomi che hanno mostrato uno spettro di bassa qualità mediante analisi MALDI-TOF MS e/o che non erano correttamente identificati dal database interno di spettri proteici, sono stati sottoposti a indagine molecolare. Il DNA genomico è stato estratto dall'addome di 33 campioni di flebotomi con il kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germania) dopo l'omogeneizzazione per shock termico. L'identificazione molecolare è stata effettuata mediante amplificazione e sequenziamento del frammento di DNA mitocondriale (mtDNA) che comprende regioni del citocromo b (cytb) e della subunità 1 (nd1) della deidrogenasi NADH (nd1) (cytb-nd1~500 bp) utilizzando i primer (PhleF/PhleR) e il protocollo di esecuzione PCR (Latrofa et al., 2011). I prodotti amplificati sono stati esaminati su gel di agarosio al 2% colorato con GelRed (VWR International PBI, Italia) e visualizzati sul sistema GelLogic 100 gel (Kodak, New York, USA). Gli ampliconi sono stati purificati e sequenziati, in entrambe le direzioni utilizzando gli stessi primer della PCR e i reagenti Big Dye Terminator v.3.1 in un sequenziatore automatizzato (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Le sequenze sono state allineate utilizzando il programma ClustalW (Larkin et al., 2007) e confrontate con quelle disponibili in GenBank utilizzando il programma BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

3. Risultati

Su 166 flebotomi identificati morfologicamente (n = 56 *P. perniciosus*, 26 maschi e 30 femmine; n = 4 *P. neglectus*, maschi; n = 6 *P.sergenti*, 4 maschi e 2 femmine e n = 100 *S. minuta*, 45 maschi e 55 femmine), 149 (89,8%) hanno mostrato spettri di alta qualità con più di 30 dati all'analisi MALDI-TOF MS. Spettri di bassa qualità sono stati ottenuti da 16 campioni (cioè, n = 6 *P. perniciosus*, n = 1 *P. neglectus*, n = 2 *P. sergenti* e n = 7 *S. minuta*), mentre nessuno spettro è stato ottenuto dal campione di *P. sergenti*.

Spettri rappresentativi ottenuti da campioni di maschi e femmine appartenenti alle specie *S. minuta, P. perniciosus, P. neglectus* e *P. sergenti* sono riportati nelle Figg. 1-4.

I dendrogrammi di MALDI-TOF MS che riportano la percentuale di somiglianza generata da specie rappresentative sono riportati nella Fig. 5. Lo spettro delle proteine ha mostrato diversi picchi di specie uniche nel range di massa di 2-7 kDa, che ha permesso di identificare in modo affidabile le specie dei flebotomi analizzati. La maggior parte dei modelli di spettri di picchi proteici si sono sovrapposti in entrambi i generi della stessa specie.

I SuperSpectra™ sono stati generati per le specie di *P. perniciosus* e *S. minuta*, mentre non è stato possibile generare masse biomarcatrici per *P. neglectus* e *P. sergenti*, a causa del basso numero di esemplari disponibili.

Dopo la validazione del test, 80 insetti su 96 (83,3%) (n = 20 *P. perniciosus*, n = 12 maschi e n = 8 femmine; n = 60 *S. minuta*, n = 15 maschi e n = 45 femmine) sono stati correttamente identificati dal nuovo SuperSpectra™ generato. La corretta identificazione è stata ottenuta a partire dal 75% di corrispondenze del biomarcatore basato sul set dei dati di riferimento, secondo le linee guida per l'utente di SARAMIS™. Non si è verificato alcun errore di identificazione nel confronto con l'intero archivio spettrale di SARAMIS™. Nel complesso, su 16 esemplari che hanno prodotto una qualità scadente di spettri, 14 (n = 4 *P. perniciosus* e n = 10 *S. minuta*) non hanno dato risultati sull'identificazione automatica con SuperSpectra™. Infine, n.2 esemplari, morfologicamente identificati come *S. minuta*, nonostante siano stati ottenuti spettri di buona qualità non sono stati identificati dal nuovo SuperSpectra™ generato.

L'analisi Kappa ha mostrato una buona corrispondenza tra MALDI-TOF e l'identificazione morfologica (Tabella 1).

L' analisi BLAST della sequenza di mtDNA dei campioni di flebotomi, conferma l'identificazione morfologica di 26 su 33 campioni analizzati mostrando elevate identità nucleotidiche con sequenze disponibili nel database di GenBank (per esempio fino al 100% per il numero di accesso di *P. pernicious*: JF766958; 98% per il numero di adesione di *P. neglectus*: JF766962; 99% per il numero di adesione di *S. minuta*: JF766980). I 7 campioni non identificati dall'analisi molecolare appartenevano alla specie *P. sergenti* (no = 3) e *S. minuta* (no = 4) in seguito all'analisi morfologica.

4. Discussione

Nel presente studio è stata valutata l'utilità dell'analisi MALDI-TOF MS per l'identificazione della popolazione di vettori flebotomi nella regione mediterranea, e sono stati forniti i profili degli spettri di massa delle proteine.

Le applicazioni di questo metodo su organismi multicellulari, compresi insetti di interesse sanitario, sono state recentemente studiate (Kaufmann et al., 2011, 2012) e la banca dati di riferimento del set di massa dei biomarcatori è stata approvata per molte specie di flebotomi così da rendere possibile la loro identificazione automatica basata su una banca dati. I flebotomi sono candidati ideali per essere riconosciuti con MALDI-TOF MS anziché con l'identificazione tassonomica sia per le loro minuscole caratteristiche morfologiche specie-specifiche, che rendono difficile il riconoscimento convenzionale. (Dvorak et al., 2014; Mathis et al., 2015; Lafri et al., 2016; Halada et al., 2018a, b).

Infatti, secondo studi precedenti, gli spettri di massa delle proteine ottenuti da MALDI-TOF MS dai campioni di flebotomi sono riproducibili all'interno della specie e specifici interspecie (Lafri et al., 2016; Mathis et al., 2015; Halada et al., 2018a, b; Dvorak et al., 2014). I campioni analizzati nel presente studio hanno prodotto spettri proteici specie-specifici distinti, costanti e riproducibili, e nonostante i picchi minori specifici per genere, non ci sono differenze sostanziali tra maschi e femmine delle rispettive specie che sono state rilevate. In linea con le indagini precedenti dove sono stati analizzati entrambi i sessi delle specie di flebotomi (Dvorak et al., 2014; Mathis et al., 2015; Lafri et al., 2016), in questo studio il torace è stato utilizzato per l'analisi degli spettri delle proteine di massa, quindi, l'esclusione delle sezioni terminali del corpo dei campioni nell'estrazione degli acidi prima dell'analisi MALDI-TOF, probabilmente ha rimosso alcune proteine specifiche del sesso. Il presente studio riporta anche lo spettro proteico di massa di *P. neglectus* che non è mai stato presentato in letteratura scientifica. Sono stati registrati picchi di proteine di massa distinti e riproducibili per *P. neglectus* nonostante il basso numero di esemplari. La generazione di un database interno per questa specie di flebotomi rimane uno degli obiettivi per gli studi futuri.

Gli spettri proteici ottenuti *da P. perniciosus, P. sergenti* e *S. minuta* hanno mostrato profili con un range di massa inferiore rispetto gli spettri precedentemente proposti (Dvorak et al., 2014; Mathis et al.,2015; Lafri et al., 2016). Questa differenza nel range delle proteine di massa potrebbe essere data del metodo di conservazione (cioè, 70% di etanolo a temperatura ambiente) dei flebotomi studiati. Infatti, anche se la conservazione di campioni in etanolo è un metodo comune di conservazione in campo, lo stoccaggio dei campioni in alcool per un lungo periodo di tempo induce precipitazione delle proteine, riducendo la loro solubilità e, di conseguenza, portando ad una diminuzione dei profili degli spettri sia qualitativi che quantitativi, in particolare per le masse superiori a 9 kDa (Mathis et al., 2015; Lafri et al., 2016).

Tuttavia, è anche dimostrato che l'identificazione a livello di specie non è influenzata da questo vincolo in quanto le masse di riferimento sono nel range più basso (Mathis et al., 2015). I risultati conseguiti nel presente studio hanno evidenziato che i tratti caratteristici di massa proteica dei flebotomi ottenuti con il MALDI-TOF MS consentono un'identificazione affidabile delle specie utilizzando i rispettivi database e software (SARAMIS™). In particolare, il database degli spettri di riferimento interno, istituito per le specie più rappresentative *P. perniciosus* e *S. minuta,* è stato valutato con 96 campioni identificati morfologicamente.

L'identificazione di specie con MALDI-TOF MS ha rivelato risultati coerenti con l'identificazione morfologica per più dell'80% dei campioni testati evidenziando la moderata specificità dell'analisi con il MALDI-TOF MS. Dieci esemplari appartenenti alla specie *S. minuta* e 4 esemplari appartenenti alla specie *P. perniciosus* hanno mostrato spettri con bassi dati e intensità relativa

(rispettivamente < 30 e < 0,9%) e non sono stati identificati probabilmente a causa di una bassa qualità degli spettri. Secondo i risultati di un precedente studio (Mathis et al., 2015) una soglia di 30 dati con un picco di intensità relativa < 1% sembra essere un criterio utile per escludere gli spettri da analisi fuure.

Degno di nota, tra i campioni che mostrano spettri di proteine di bassa qualità, quelli con una soglia > 20 dati e con intensità relativa > 0,6% sono stati correttamente identificati da MALDI-TOF MS confermando l'identificazione morfologica e ulteriormente confermati dall'analisi molecolare. Anche se l'analisi molecolare ha confermato l'identificazione morfologica, non si è verificata alcuna amplificazione della regione cytb-nd1 in 7 campioni (no = 3, *P. sergenti*; no = 4, *S. minuta*) su 33 flebotomi caratterizzati da uno spettro di bassa qualità e/o non correttamente identificati dal database interno degli spettri proteici. Inoltre, nonostante gli spettri di buona qualità, 2 campioni riconosciuti morfologicamente come *S. minuta* non sono stati identificati né da MALDI-TOF MS e né dall'analisi molecolare a causa della mancata amplificazione della regione cytb-nd1. Questa incoerenza potrebbe essere correlata a difetti nell'estrazione e/o nelle procedure dell'operatore ma anche nell'analisi spettrometrica e molecolare, o per l'identificazione morfologica non corretta a causa di specie criptiche. Quest'ultima ipotesi è degna di interesse ma dovrebbe essere confermata da indagini molecolari più dettagliate.

5. Conclusioni

In questo studio è stato creato un database interno per i flebotomi *P. perniciosus* e *S. minuta* permettendo una generazione di SuperSpectrum; al contrario i database per le specie *P. neglectus* e *P. sergenti* sono ancora in via di sviluppo a causa del basso numero di campioni disponibili. Nel complesso, i risultati sin qui ottenuti supportano il potenziale di MALDI-TOF MS per l'identificazione di specie di flebotomi, rapida, semplice e affidabile. L'identificazione basata su MALDI-TOF di questi importanti insetti faciliterebbe gli studi di indagine e migliorerebbe da un punto di vista medico le conoscenze biologiche ed epidemiologiche di questi importanti vettori. La capacità di MALDI-TOF MS nell'identificazione di specie è fortemente connessa con la qualità dei database disponibili su spettri di proteine di massa, quindi il miglioramento e l'aggiornamento dei database dei flebotomi, grazie alla collaborazione con esperti tassonomisti e esperti del settore di spettrometri di massa, potranno fornire un'identificazione di specie di qualità nel prossimo futuro.

Figura 1. Rappresentazione di spettri di massa con desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice a tempo di volo (MALDI-TOF) di campioni di maschi (♂) e femmine (♀) della specie *Sergentomyia minuta*.

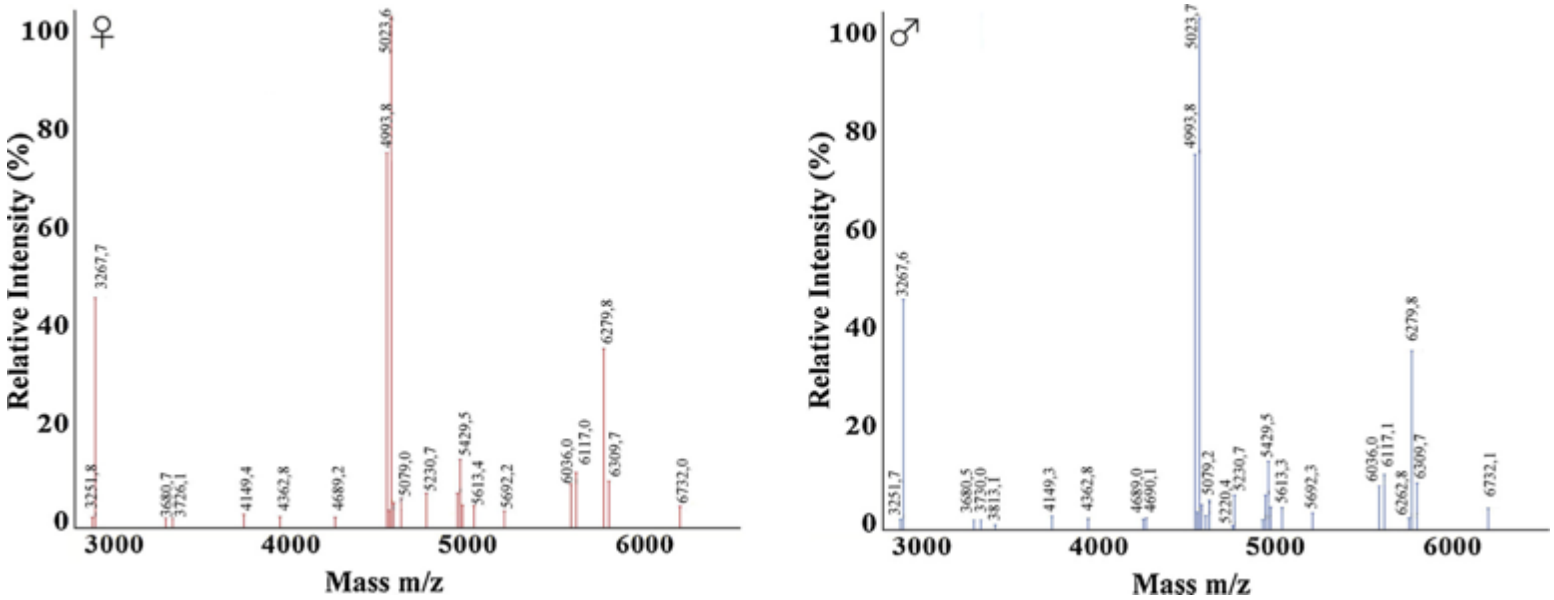


Figura 2. Rappresentazione di spettri di massa con desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice a tempo di volo (MALDI-TOF) di campioni di maschi (♂) e femmine (♀) della specie *Phlebotomus perniciosus*.

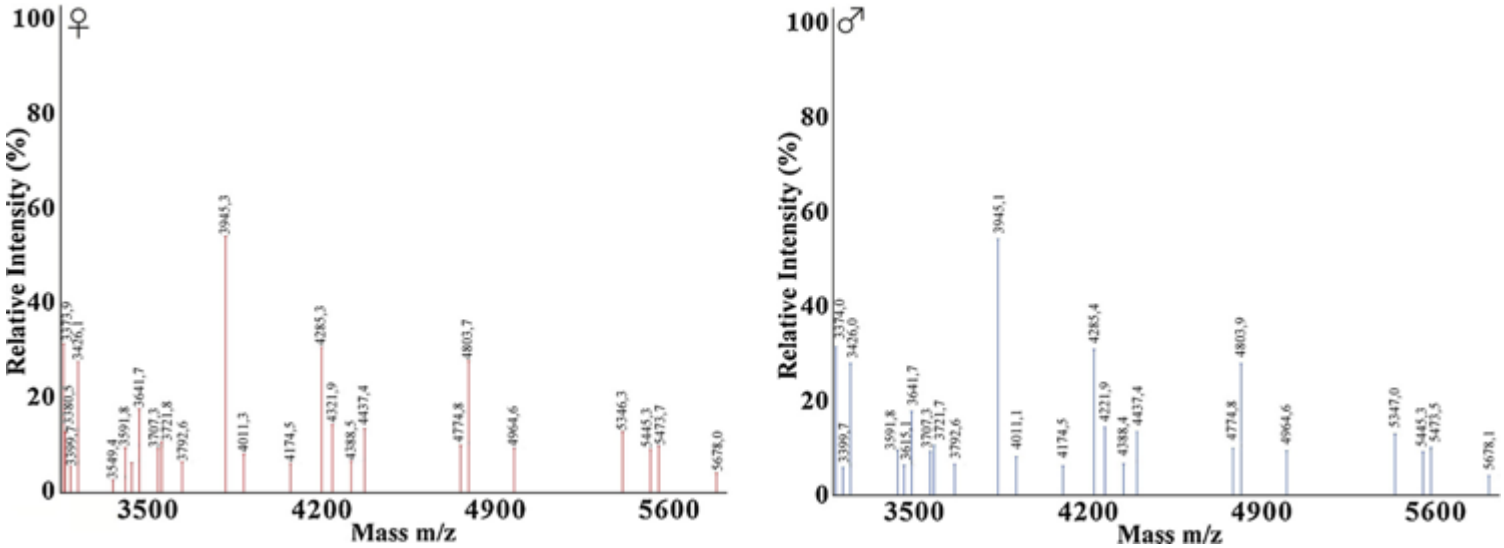


Figura 3. Rappresentazione di spettri di massa con desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice a tempo di volo (MALDI-TOF) di campioni di maschi (♂) della specie di *Phlebotomus neglectus*.

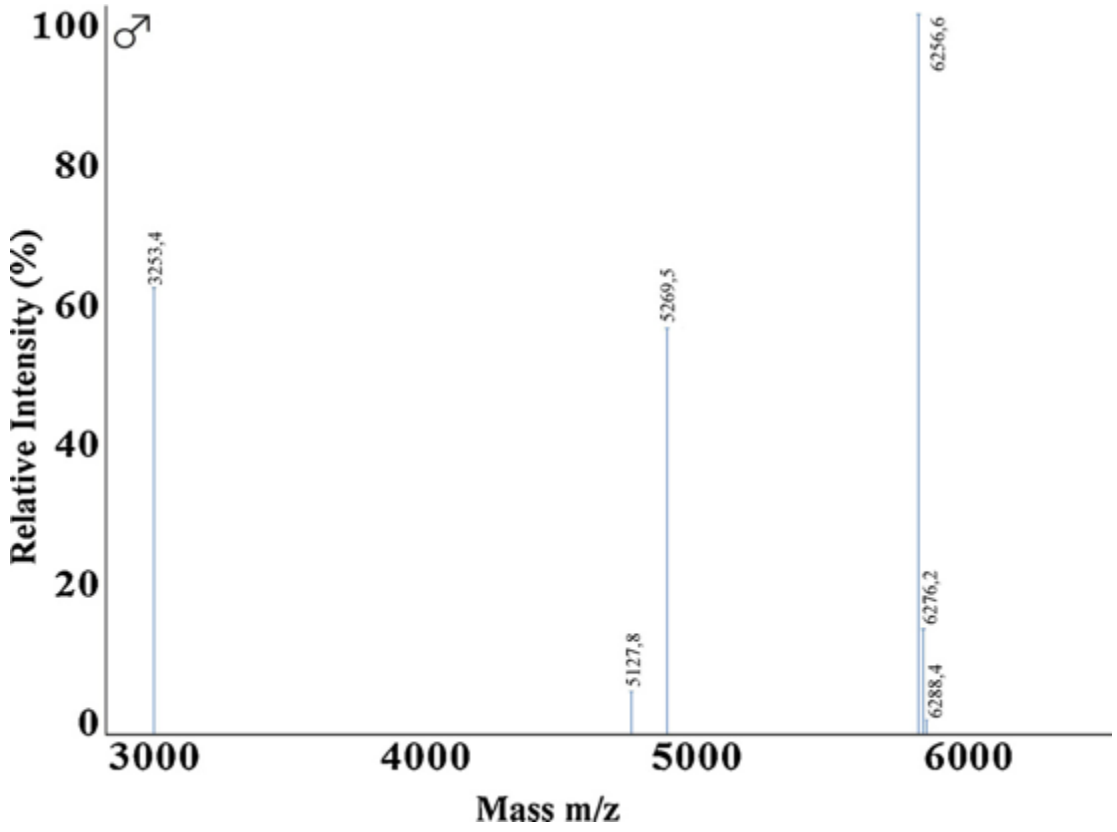


Figura 4. Rappresentazione di spettri di massa con desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice a tempo di volo (MALDI-TOF) di campioni di maschi (♂) e femmine (♀) della specie *Phlebotomus sergenti*.

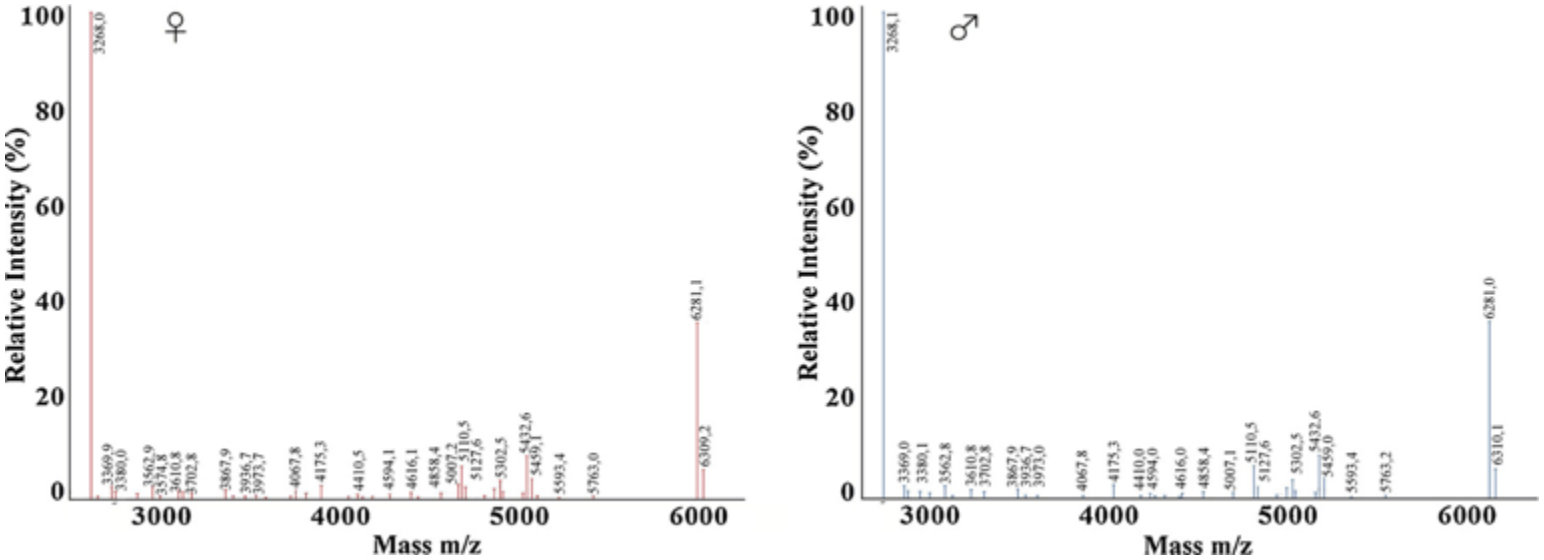


Figura 5. Dendogramma di spettri di massa con desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice a tempo di volo (MALDI-TOF) generati da campioni rappresentativi di ciascuna specie (*Sergentomyia minuta*, *Phlebotomus perniciosus*, *P. neglectus*, *P. sergenti*).

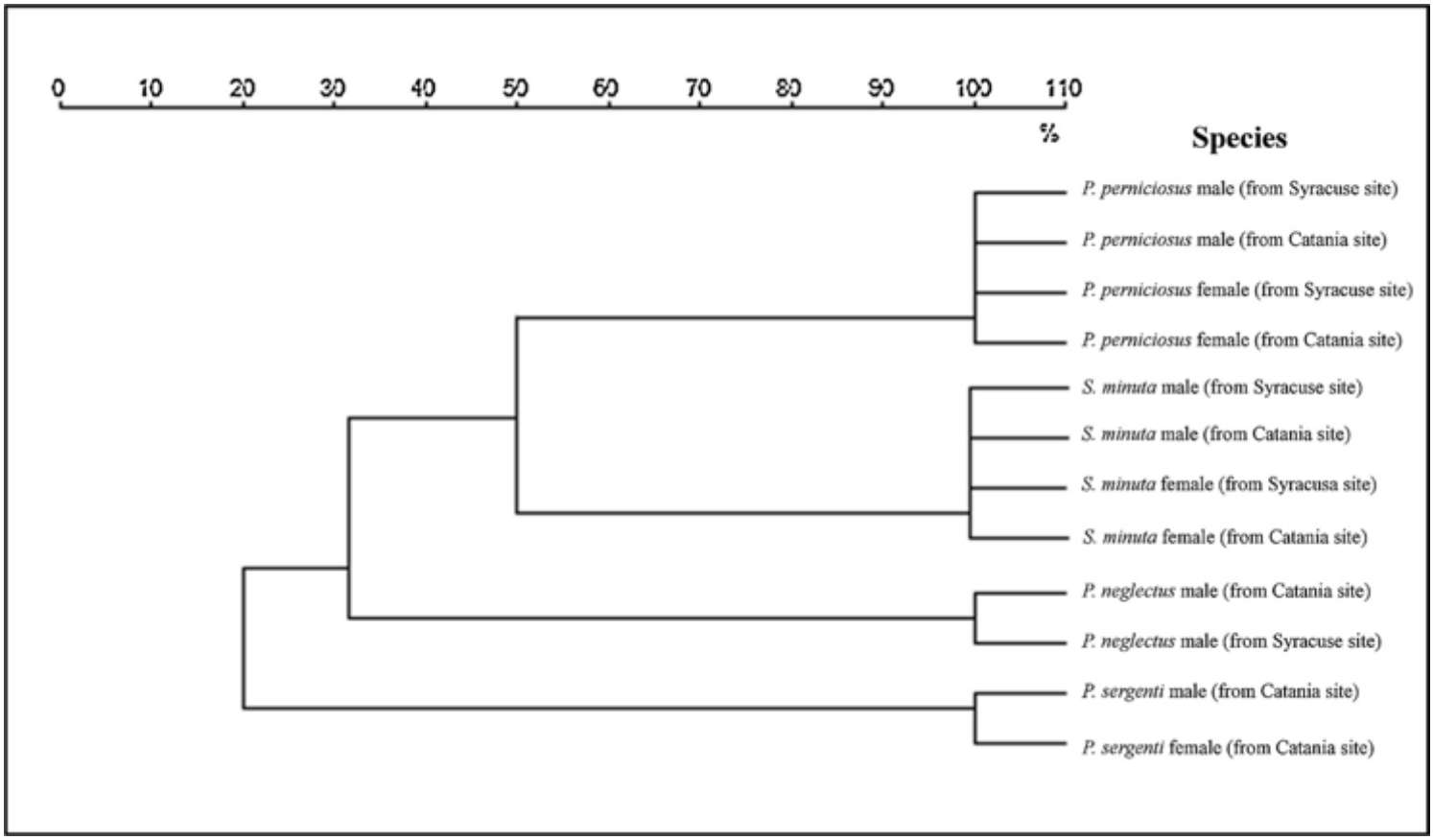


Tabella 1. Grado di accordtra MALDI-TOF MS e l'identificazione morfologica di specie di flebotomi.

	Morphology	**MALDI-TOF MS**
Number of identified sand flies	96	80
Kappa analysis		
Observed Agreement	83.3 %	
Expected by chance Agreement	58.3 %	
95 % Confidence Interval	0.43 – 0.77	
Kappa value	0.6	

Bibliografia

1. Dantas-Torres, F., Tarallo, V.D., Otranto, D., 2014. Morphological keys for the identification of Italian phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Parasit. Vectors 7, 479.

2. Depaquit, J., 2014. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: review and perspectives. Infect. Genet. Evol. 28, 744–756.

3. Depaquit, J., Ferte, H., Leger, N., Lefranc, F., Alves-Pires, C., Hanafi, H., Maroli, M., Morillas-Marquez, F., Rioux, J.A., Svobodova, M., Volf, P., 2002. ITS 2 sequences heterogeneity in Phlebotomus sergenti and Phlebotomus similis (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit Leishmania tropica. Int. J. Parasitol. 32, 1123–1131.

4. Depaquit, J., Bounamous, A., Akhoundi, M., Augot, D., Sauvage, F., Dvorak, V., Chaibullinova, A., Pesson, B., Volf, P., Léger, N., 2013. A taxonomic study of Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi s. l. infect. Genet. Evol. 20, 500–508.

5. Dvorak, V., Votypka, J., Aytekin, A., Alten, B., Volf, P., 2011. Intraspecific variability of natural populations of Phlebotomus sergenti, the main vector of Leishmania tropica. J. Vector Ecol. 36, S49–57.

6. Dvorak, V., Halada, P., Hlavackova, K., Dokianakis, E., Antoniou, M., Volf, P., 2014. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Parasit. Vectors 7, 21.

7. Gaglio, G., Brianti, E., Napoli, E., Falsone, L., Dantas-Torres, F., Tarallo, V.D., Otranto, D., Giannetto, S., 2014. Effect of night time-intervals, height of traps and lunar phases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis. Acta Trop. 133, 73–77.

8. Gaglio, G., Napoli, E., Falsone, L., Giannetto, S., Brianti, E., 2017. Field evaluation of a new light trap for phlebotomine sand flies. Acta Trop. 174, 114–117. Gaglio, G., Napoli, E., Arfuso, F., Abbate, J.M., Giannetto, S., Brianti, E., 2018. Do different LED colours influence sand fly collection by light trap in the Mediterranean? Biomed Res. Int. 2018, 6432637.

9. Halada, P., Hlavackova, K., Risueño, J., Berriatua, E., Volf, P., Dvorak, V., 2018a. Effect of trapping method on species identification of phlebotomine sandflies by MALDI-TOF MS protein profiling. Med. Vet. Entomol. 32, 388–392.

10. F. Arfuso, et al. Acta Tropica 194 (2019) 47–52 51 Halada, P., Hlavackova, K., Dvorak, V., Volf, P., 2018b. Identification of immature stages of hlebotomine sand flies using MALDI-TOF MS and mapping of mass spectra during sand fly life cycle. Insect Biochem. Mol. Biol. 93, 47–56.

11. Karger, A., Kampen, H., Bettin, B., Dautel, H., Ziller, M., Hoffmann, B., Süss, J., Klaus, C., 2012. Species determination and characterization of developmental stages of ticks by whole-animal matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Ticks Tick. Dis. 3, 78–89.

12. Kaufmann, C., Ziegler, D., Schaffner, F., Carpenter, S., Pfluger, V., Mathis, A., 2011. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for characterization of Culicoides nubeculosus biting midges. Med. Vet. Entomol. 25, 32–38.

13. Kaufmann, C., Schaffner, F., Ziegler, D., Pfluger, V., Mathis, A., 2012. Identification of field-caught Culicoides biting midges using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Parasitology 139, 248–258.

14. Lafri, I., Almeras, L., Bitam, I., Caputo, A., Yssouf, A., Forestier, C.L., Izri, A., Raoult, D., Parol, P., 2016. Identification of Algerian field-caught phlebotomine sand fly vectors by MALDI-TOF MS. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, e0004351.

15. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. Bioinformatics 23, 2947–2948. Latrofa, M.S., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Tarallo, V.D., Parisi, A., Traversa, D., Otranto, D., 2011. Multilocus molecular and phylogenetic analysis of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Italy. Acta Trop. 119, 91–98.

16. Latrofa, M.S., Annoscia, G., Dantas-Torres, F., Traversa, D., Otranto, D., 2012. Towards a rapid molecular identification of the common phlebotomine sand flies in the Mediterranean region. Vet. Parasitol. 184, 267–270.

17. Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. Med. Vet. Entomol. 27, 123–147.

18. Mathis, A., Depaquit, J., Dvořák, V., Tuten, H., Bañuls, A.L., Halada, P., Zapata, S., Lehrter, V., Hlavačková, K., Prudhomme, J., Volf, P., Sereno, D., Kaufmann, C., Pflüger, V., Schaffner, F., 2015. Identification of phlebotomine sand flies using one MALDI-TOF MS reference database and two mass spectrometer systems. Parasit. Vectors 10, 266.

19. Muller, P., Pfluger, V., Wittwer, M., Ziegler, D., Chandre, F., Simard, F., Lengeler, C., 2013. Identification of cryptic Anopheles mosquito species by molecular protein profiling. PLoS One 8, e57486.

20. Patel, R., 2015. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. Clin. Chem. 61, 100–111.

21. Prudhomme, J., Gunay, F., Rahola, N., Ouanaimi, F., Guernaoui, S., Boumezzough, A., Bañuls, A.L., Sereno, D., Alten, B., 2012. Wing size and shape variation of Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae) populations from the south and north slopes of the Atlas Mountains in Morocco. J. Vector Ecol. 37, 137–147.

22. Ready, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Ann. Rev. Entomol. 58, 227–250.
23. Sauer, S., Kliem, M., 2010. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 8, 74–82.
24. Schaffner, F., Kaufmann, C., Pfluger, V., Mathis, A., 2014. Rapid protein profiling facilitates surveillance of invasive mosquito species. Parasit. Vectors 7, 142.
25. World Health Organization, 2002. Annex 3: Burden of Disease in DALYs by Cause, Sex and Mortality Stratum in WHO Regions, Estimates for 2001. The World Health Report. Geneva: WHO, pp. 192–197.
26. World Health Organization, 2018. Surveillance of Leishmaniasis in the WHO European Region, 2016 and Global Leishmaniasis Surveillance Update, 1998–2016. No. 40, 2018, 93, 521–540.
27. Yssouf, A., Flaudrops, C., Drali, R., Kernif, T., Socolovschi, C., Berenger, J.M., Raoult, D., Parola, P., 2013a. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. J. Clin. Microbiol. 51, 522–528.
28. Yssouf, A., Socolovschi, C., Flaudrops, C., Ndiath, M.O., Sougoufara, S., Dehecq, J.S., Lacour, G., Berenger, J.M., Sokhna, C.S., Raoult, D., Parola, P., 2013b. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: an emerging tool for the rapid identification of mosquito vectors. PLoS One 8, e72380.
29. Yssouf, A., Socolovschi, C., Leulmi, H., Kernif, T., Bitam, I., Audoly, G., Almeras, L., Raoult, D., Parola, P., 2014a. Identification of flea species using MALDI-TOF/MS. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 37, 153–157. Yssouf, A., Parola, P., Lindstrom, A., Lilja, T., L'Ambert, G., Bondesson, U., Berenger, J.M., Raoult, D., Almeras, L., 2014b. Identification of European mosquito species by MALDI-TOF MS. Parasitol. Res. 113, 2375–2378.
30. Yssouf, A., Almeras, L., Raoult, D., Parola, P., 2016. Emerging tools for identification of arthropod vectors. Fut. Microbiol. 11, 549–566.

Capitolo 2

Preferenze del pasto di sangue e infezione da tripanosomatidi in specie di flebotomi comuni in Sicilia

Adattato dalla pubblicazione:

Identification of trypanosomatids and blood feeding preferences of phlebotomine sand fly species common in Sicily, Southern Italy

Abbate[1] J. M., Maia[2] C., Pereira[2] A., Arfuso[1] F.,Gaglio[1] G.,Rizzo[1] M., Caracappa[1] G., Marino[1] G., Pollmeier[3] M., Giannetto[1] S., Brianti[1] E.

[1]Department of Veterinary Sciences, University of Messina, Italy; [2]Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Institute of Hygiene and Tropical Medicine (IHMT), New University of Lisbon, Portugal; [3] Bayer Animal Health GmBh, Leverkusen Germany.

Plos One – March 10;15(3):e0229536.

Riassunto

In this study, the presence of *Leishmania* DNA and blood feeding sources in phlebotomine sand fly species commonly present in Sicily were investigated.

A total of 1,866 female sand flies including 176 blood fed specimens were sampled over two seasons in five selected sites in Sicily (southern Italy). *Sergentomyia minuta* (*n*=1,264) and *Phlebotomus perniciousus* (*n*=594) were the most abundant species at all the sites, while three other species from the genus *Phlebotomus (i.e., P. sergenti n*=4, *P. perfiliewi n*=3 and *P. neglectus n*=1) were only sporadically captured.

Twenty-eight out of the 1,866 (1.5%) sand flies tested positive for *Leishmania* spp. *Leishmania tarentolae* DNA was identified in 26 specimens of *S. minuta*, while the DNA of *Leishmania donovani* complex was detected in a single specimen each of *S. minuta* and *P. perniciosus*. Interestingly, seven *S. minuta* specimens (0.4%) tested positive for reptilian *Trypanosoma* sp..

Blood sources were successfully identified in 108 out of 176 blood fed females. Twenty-seven out of 82 blood sources identified in fed females of *P. perniciosus* were represented by blood of wild rabbit, *S. minuta* mainly fed on humans (16/25), while the sole *P. sergenti* fed specimen took blood meal on rat. Other vertebrate hosts including horse, goat, pig, dog, chicken, cow, cat and donkey were recognized as blood sources for *P. perniciosus* and *S. minuta*, and, surprisingly, no reptilian blood was identified in blood-fed *S. minuta* specimens. Results of this study agree with the well-known role of *P. perniciosus* as vector of *L. infantum* in western Mediterranean; also, vector's feeding preference herein described supports the hypothesis on the involvement of lagomorphs as sylvatic reservoirs of *Leishmania*. The detection of *L. donovani* complex in *S. minuta*, together with the anthropophilic feeding-behaviour herein observed, warrants further research to clarify the capacity of this species in the transmission of pathogens to humans and other animals.

Keywords:

Leishmania donovani complex, *Leishmania tarentolae*, *Trypanosoma* sp., *Phlebotomous perniciosus*, *Sergentomyia minuta*, blood sources.

1.Introduzione

I flebotomi (Ditteri: *Phlebotominae*) sono insetti di particolare interesse in medicina umana e veterinaria. Sono vettori di agenti patogeni virali e batterici, riconosciuti come principali artropodi ematofagi che hanno dimostrato di trasmettere protozoi del genere Leishmania quali come *Leishmania infantum*, l'agente causale della leishmaniosi canina (CanL) nei cani e viscerale (VL) o leishmaniosi cutanea (CL) nell'uomo nell'area del Mediterraneo [1].

I flebotomi sono distribuiti in molte regioni del mondo e la loro biodiversità e fenologia è stata studiata in particolare nelle aree endemiche da Leishmania. Nell'Europa occidentale, solo i flebotomi del genere *Phlebotomus* sono vettori competenti per la trasmissione della Leishmania e *P. perniciosus* è la specie più diffusa [2].

La sorveglianza sui flebotomi vettori è fondamentale per valutare il rischio di trasmissione di specie endemiche della Leishmania, ma anche cruciale per monitorare il rischio di introduzione di nuove specie della Leishmania in territori non endemici [2-3].

Diversi studi hanno messo in evidenza la presenza del DNA di Leishmania nei flebotomi, e il tasso di infezione riportato in *P. perniciosus* variava dallo 0,13% al 50% a seconda del contesto epidemiologico [4-5]. Anche se *L. infantum* è l'unica specie diffusa in Europa che causa malattie, i casi umani dovuti a specie non indigene di Leishmania sono sempre più numerosi [6].

In Italia, i casi di leishmaniosi importata sono principalmente associati ai viaggiatori e/o rifugiati provenienti da zone endemiche, e consistono in forme croniche diagnosticate molti mesi dopo l'ingresso nel paese [7-8]. Degno di nota, specie antroponotiche come *Leishmania tropica* e *Leishmania donovani* sono incluse tra gli agenti causali di casi umani importati, e il rischio di introduzione e/o di un più ampio insediamento di queste specie in Europa è più alta in quanto sono presenti flebotomi vettori idonei [3,6,9]. La Sicilia, si trova al centro del mar Mediterraneo ed è caratterizzata da un tipico clima temperato, con inverni miti e umidi e calde estati secche. Come noto è una regione iper-endemica per la CanL con una prevalenza di infezione fino al 40% nei cani che sono considerati il principale serbatoio domestico ospitante e fonte di infezione umana [10-11]. Secondo le indagini entomologiche disponibili sui vettori di *L. infantum* in Sicilia, *P. perniciosus* è stata riconosciuta come la specie più numerosa, con *P. neglectus* e *P. perfiliewi* molto meno frequentemente rilevati [12-14]. La presenza di *P. sergenti* è stata segnalata sporadicamente lungo sul lato orientale dell'isola [12-14] implicando il rischio di trasmissione di *L. tropica*. Sebbene non siano stati finora rilevati nell'Europa sud-occidentale casi di leishmaniosi cutanea autoctona (ACL) causati da *L. tropica*, la Sicilia è un'area potenzialmente soggetta a all'introduzione di questa specie di protozoo a causa della sua vicinanza al nord del Marocco, un'area emergente di ACL [15], e al grande flusso migratorio di persone tra i due territori. Infatti, il flusso di immigrati provenienti dalle

regioni endemiche del Nord Africa e del Medio Oriente, insieme al crescente numero di segnalazioni di infezioni umane da *L. tropica* in Italia [6,7,16-17], potrebbe costituire il primo passo per la sua potenziale diffusione in Sicilia e successivamente in altre aree dell'Europa meridionale in cui è stato descritto il vettore competente [7]. I flebotomi femmine sono insetti ematofagi ed effettuano pasti di sangue su molti ospiti vertebrati come rettili, uccelli, mammiferi domestici e selvatici ed esseri umani, oltre a mostrare un comportamento opportunistico di alimentazione [1,4,18-19]. È interessante notare che i lagomorfi sono stati la fonte di sangue più frequente per il *P. perniciosus* in una grande epidemia di leishmaniosi umana a Madrid [20-21], e, studi xenodiagnostici hanno dimostrato il ruolo delle lepri e dei conigli selvatici come serbatoio ospitante di *L. infantum*. Insieme questi risultati suggeriscono il possibile coinvolgimento di specie lagomorfe nell'epidemiologia dell'infezione da Leishmania [22-25]. Pertanto, l'identificazione delle fonti di pasti di sangue nei flebotomi catturati in natura fornisce informazioni sui modelli di alimentazione degli ospiti in condizioni naturali, il che, a sua volta, si traduce in dati sul potenziale serbatoio ospitante e conoscenze essenziali per l'istituzione di strategie di controllo efficienti. Alla luce di queste considerazioni, l'obiettivo del presente studio è stato quello di indagare sui tassi di infezione da Leishmania e sulle fonti di sangue delle specie flebotomi catturate in Sicilia nelle due stagioni di trasmissione.

2.Materiali e metodi

2.1 Raccolta e identificazione dei flebotomi

I flebotomi in questo studio sono stati campionati durante due diverse indagini entomologiche effettuate in aree di proprietà privata situate in Sicilia nel 2017 e nel 2018 (Fig 1). Nel 2017 i flebotomi sono stati catturati in un'area suburbana (Sito A. 38˚13'59" N; 15˚32'49" E; 263 m.a.s.l.) vicino alla fattoria didattica del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Messina utilizzando una classica trappola luminosa (CLT), dotata di una tradizionale lampada ad incandescenza (12V, 8W) e cinque trappole luminose Laika 4.0 con LED di diversi colori (fig. 1).
Le trappole sono state collocate dal tramonto fino all'alba per tre notti consecutive ogni mese da maggio a ottobre [26]. Nel 2018, le catture dei flebotomi sono state effettuate in quattro diversi siti, ovvero in tre rifugi situati in aree suburbane di Siracusa (sito B. 37˚04'54" N; 15˚12'43" E; 69 m.a.s.l.) (sito C. 37˚04'30" N; 15˚13'59" E; 416 m.a.s.l.) e Catania (sito D. 37˚36'45" N; 15˚01'46" E; 948 m.a.s.l.) e in un'azienda agricola situata in un'area rurale del comune di Messina (sito E. 38˚00'42" N; 15˚25'18" E; 177 m.s.l.). In ognuno dei siti sopra citati, le trappole luminose (cioè il

CLT) sono state collocate da maggio a ottobre e sono state lasciate in funzione dal tramonto fino all'alba per due notti consecutive due volte al mese (fig. 1).

L'accesso ai siti di raccolta e le procedure di campionamento sono state autorizzate dai proprietari delle fattorie (Sito A e Sito E) e dei rifugi (Siti B, C e D).

In laboratorio, i flebotomi sono stati differenziati per sesso con l'aiuto di uno stereomicroscopio e successivamente elaborati per l'identificazione. In breve, la testa e gli ultimi tergiti posteriori delle femmine sono stati sezionati, chiarificati e montati su vetrino per l'osservazione al microscopio come descritto altrove [12], e identificata la specie utilizzando chiavi morfologiche [27]. Le femmine sono state ulteriormente classificate come femmine che non hanno effettuato il pasto di sangue (nessun sangue visibile nell'addome), ingorgate (presenza di sangue nell'addome) e gravide (presenza di uova). Infine, il torace e l'addome di ogni esemplare è stato singolarmente posto in fiale da 2 ml contenenti il 70% di etanolo e conservato per l'analisi del DNA.

2.2 Estrazione del DNA e rilevazione della Leishmania spp.

Il DNA genomico è stato estratto da porzioni (torace e addome) di ogni campione di flebotomo conservato in etanolo al 70% utilizzando il kit Citogene Cell and Tissue (Citomed, Portogallo) secondo le istruzioni del produttore. Il DNA estratto è stato sospeso in 30 µL di acqua sterile e conservato a + 4˚C fino all'analisi.

2.3 Amplificazione del DNA di Trypanosomatidae

Per rilevare la presenza di DNA di Trypanosomatidae in femmine non nutrite, ingorgate e gravide il DNA è stato prima sottoposto a screening utilizzando un protocollo di PCR in un unico passaggio con una serie di primer che prendono di mira sezioni del distanziatore ribosomiale interno trascritto (ITS-rDNA) [28]. Per un'ulteriore caratterizzazione molecolare dei campioni con ITS-rDNA, è stato eseguito un protocollo PCR in due fasi che utilizza una serie di primer che mirano alle regioni conservate del gene per il citocromo b mitocondriale (cytB) [29]. È stata effettuata un’amplificazione parziale con un'ulteriore PCR in un solo passaggio utilizzando primer specifici per piccole subunità del gene del DNA ribosomiale (SSU-rDNA) [30], per caratterizzare i campioni in cui la presenza di *Trypanosoma spp.* è stata suggerita dall'analisi BLAST di sequenze cytB (Tabella S1).

2.4 Identificazione della fonte di sangue

L'identificazione delle fonti di sangue è stata condotta attraverso l'amplificazione di un segmento di 350bps del *cytB* mitocondriale dell'ospite, utilizzando primer specifici universali per i vertebrati

modificati (cytB1-F e cytB-2-R) sul sangue di campioni di flebotomi [31]. La PCR cytB è stata effettuata con 5µL di DNA estratto in un volume finale di 25µL, utilizzando 12.5 µL di NZYTaq 2× Green Master Mix (Nyztech, Portogallo) e 1.5µL di ogni primer (10 pmol/µL). L'amplificazione è stata eseguita come segue: un ciclo a 94℃ per 5 minuti, seguita da 40 cicli con una denaturazione a 94℃ per 1 minuto, annealing a 55℃ per 1 minuto e allungamento a 72℃ per 1 minuto, seguita da un allungamento finale a 72℃ per 7 minuti [4] (S1Table). L'elettroforesi dei prodotti PCR è stata effettuata in gel di agarosio all'1,5 % con 2,5 µL di Greensafe premium (Nzytech, Portogallo), utilizzando un ladder DNA di 100 bp come marcatore di peso molecolare e gli ampliconi finali sono stati visualizzati sotto raggi UV.

2.5 Analisi di sequenza

I prodotti PCR sono stati purificati e sequenziati con il metodo Sanger (StabVida, Portogallo), utilizzando gli stessi primer utilizzati per le reazioni PCR. Le sequenze di nucleotidi ottenuti sono state esaminate utilizzando 4Peaks v1.8 (Nucleobytes, Netherlands) e analizzati dal BLAST (http://blast.ncbi.nlm. nih.gov/Blast.cgi) per trovare le posizioni omologhe. Le sequenze ottenute sono state depositate al DNA Data Bank del Giappone (DDBI) (http://www.ddbj.nig.ac.jp/).

2.6 Analisi filogenetica

Allineamenti multipli di sequenza di set di dati nucleotidici sono stati eseguiti usando il metodo iterativo G-INS-I come è realizzato in MAFFTv7[32]. Gli allineamenti ottenuti sono stati ottimizzati tramite Gblocks [33], seguiti dalla loro correzione manuale considerando il frame di lettura della codifica. Gli alberi filogenetici sono stati costruiti utilizzando il metodo di Maximun Likelihood secondo il modello evolutivo più adatto (GTR+ G+I; GTR-general time reversal, G-gamma distribution, I-proportion of invariant sites), selezionati in base al criterio di informazione Akaike corretto, come suggerito da Megav6 [34]. La stabilità delle topologie degli alberi ottenuti è stata valutata mediante boot-strapping con 1000 ricampionamenti dei dati della sequenza originale. Gli alberi generati sono stati modificati per la visualizzazione utilizzando la Fig Treev1.4.3 (disponibile su http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

2.7 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata solo per i dati provenienti da siti in cui è stato catturato un gran numero di flebotomi. Le variabili sono state testate per la normalità della distribuzione utilizzando lo Shapiro-Wilk test. Poiché l'ipotesi di normalità non era valida ($P<0,05$), è stata effettuata un'analisi non parametrica. L'analisi del chi-quadro è stata eseguita per valutare la differenza nella

preferenza dell'ospite all'interno e tra le specie di flebotomi. Un valore P <0,05 è stato considerato statisticamente significativo. I dati sono stati analizzati utilizzando il software statistico Prism v4.00 (GraphPadSoftwareLtd., USA).

3. Risultati

3.1 Identificazione di flebotomi e tassi di infezione da Leishmania/Tripanosoma

Nel corso delle due indagini entomologiche sono stati catturati complessivamente 3.090 flebotomi (n= 1.866 femmine n= 1.224 maschi). Le specie e i dettagli dei flebotomi catturati in ogni sito sono riassunti nella Tabella 1. Tra le femmine di flebotomi, *S. minuta* è stata la specie più abbondante (n= 1.264; 67,7%); seguita da quattro specie del genere *Phlebotomus: P. perniciosus* (n= 594; 31,8%); *P. sergenti* (n= 4;0,2%); *P. perfiliewi* (n= 3;0,2%) e *P. neglectus* (n= 1; 0,1%). Centosettantasei femmine erano igorgate (9,4%) e 113 sono gravide (6,1%) (Tabella 2).

Il DNA della leishmania è stato rilevato in ventotto flebotomi femmine su 1.866 (1,5%). In dettaglio, 26 su 1.264 (2,1%) campioni di *S. minuta* (n= 21 non nutriti; n= 4 ingorgati e n= 1 gravida) sono risultati positivi al DNA di *Leishmania tarentole*; mentre il DNA del complex *Leishmania donovani* è stato identificato in una femmina non nutrita di *S. minuta* (1/1264; 0,1%) e in una femmina ingorgata di *P. perniciosus* (1/594; 0,2%). Diciassette delle 26 femmine positive *L. tarentolae* (n= 13 non nutrite; n= 3 ingorgate e n= 1 gravida) sono state catturate in ambiente rurale (Sito E), mentre 9 (n= 8 non nutrite e n= 1 ingorgata) sono state raccolte in ambienti periurbani (Siti A-D). Entrambe le femmine positive al complex di *L. donovani* (n= 1 non nutrita e n= 1 ingorgata) sono state catturate in ambiente rurale (Sito E). Le 26 sequenze *cytB* ottenute da *S. minuta* hanno rivelato un'identità di sequenza >99% e una copertura delle sequenze del 100% con sequenze di riferimento di *L. tarentolae* (numero di adesione: LC092878).

Le sequenze *cytB* ottenute da campioni di *S. minuta* e *P. perniciosus*, hanno rivelato un’identità > 99% e una copertura delle sequenze del 100% con sequenze del complex *L. donovani* (numeri di adesione: CP022652; KX061917). Tutte le sequenze *cty*B-rDNA ottenute sono state sottoposte al DDBJ (Numeri di adesione DDBJ: da LC464942 a LC464968; LC471400). Sulla base dell'analisi filogenetica, 24 su 26 sequenze ottenute da *L. tarentolae* amplificate da *S. minuta*, si isolano insieme con sequenze di riferimento *L. tarentolae* in un cluster monofiletico, supportato da un alto valore di bootstrap (cioè, 99). Nonostante l'eterogeneità delle sequenze, l'analisi filogenetica non ha evidenziato un'esistenza univoca dei diversi aplotipi. Le due sequenze del complex *L. donovani* qui amplificate da estratti di *S. minuta* e *P. perniciosus*, si isolano nel cluster del complex *L. donovani* (Fig 2). Sulla base dell'albero filogenetico *cyt*B, le sequenze ottenute da entrambi i campioni si

isolano indipendentemente. L'esistenza di intragruppi è stata suggerita all'interno del cluster del complex *L. donovani*, tuttavia nessuno di loro ha evidenziato la monofilia delle specie di *L. donovani*/*L. infanutm*.

Oltre alla *Leishmania*, il DNA del *Trypanosoma* è stato rilevato in sette campioni di *S. minuta*, catturati nel sito rurale E (n = 1) e nei biotopi periurbani (sito A, n = 3; sito B, n = 1; sito C, n = 2). Le 7 sequenze *cyt*B ottenute hanno rivelato un'identità di sequenza > 95% e una copertura della sequenza > 80% con una sequenza di riferimento *di Trypanosoma lewisi* di origine cinese (adesione numero: KR072974) [35]. Le sequenze sono state presentate al DDBJ (numeri di adesione del DDBJ: LC471393 a LC471399). Le sequenze nucleotidiche SSU-rDNA hanno mostrato sia il 100% di identità e la copertura con la sequenza di *Trypanosoma sp.* isolato da Gecko *Tarentola annularis* (numero di adesione: AJ620548) [36]. Le sequenze ottenute dal SSU-rDNA sono state sottoposte a DDBJ (Numeri di adesione DDBJ: da LC471401 a LC471407). L'albero filogenetico mostra che le sequenze ottenute condividono la stessa ascendenza comune di *Trypanosoma varani* (Adesione numero: AJ005279) formando insieme al *Trypanosoma sp.* isolato dal Gecko un cluster monofiletico supportato da un alto valore di bootstrap (cioè, 92); mentre due sequenze sono diverse. Queste due sequenze condividono anche la stessa ascendenza comune di *T. varani* ma si separano indipendentemente (Fig. 3).

Sono mostrati specifici valori di bootstrap dei nodi di ramo (da 1000 replicati casuali del set di dati originale) ≥ 75%. La barra delle dimensioni indica il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito. L'albero è stato creato utilizzando come outgroup una sequenza di riferimento di *Trypanosoma brucei brucei* (M94286). Le sequenze ottenute in questo studio sono identificate con "*" e il loro rispettivo numero di adesione è sottolineato.

Sono mostrati specifici valori di bootstrap dei nodi di ramo (da 1000 replicati casuali del set di dati originale) ≥ 75%. La barra delle dimensioni indica il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito. L'albero è stato creato utilizzando come outgroup una sequenza di riferimento di *Trypanosoma vivax* (U22316). Le sequenze ottenute in questo studio sono identificate con "*" e il loro rispettivo numero di adesione è sottolineato.

3.2 Identificazione dei pasti di sangue dei flebotomi

La maggior parte delle femmine ingorgate sono state catturate nel sito E (149/176; n = 128 *P. perniciosus* e n = 21 *S. minuta*) e sono state sottoposte ad analisi statistica, mentre il resto dei 27 esemplari ingorgati catturati negli altri siti (A, n = 4 *P. perniciosus*, n = 1 S. minuta; B, n = 6 *P. perniciosus*; C, n = 11 *S. minuta*; D, n = 4 *S. minuta*, n = 1 *P. sergenti*) non sono stati analizzati statisticamente (Tabella 2). Il *cyt*B mitocondriale dell'ospite è stato amplificato con successo da 169

su 176 femmine ingorgate (96%), e gli ospiti vertebrati di 108 pasti di sangue (64%) sono stati distintamente identificati (S2 Tabella).

Il coniglio selvatico (*Oryctolagus cuniculus*) (n = 28) e l'uomo (*Homo sapiens*) (n = 24) sono state le fonti di sangue più frequenti. Sono stati trovati anche altri ospiti vertebrati , ad esempio, la capra (n = 16), il cavallo (n = 13), il maiale (n = 9), il cane (n = 9), il pollo (n = 3), la mucca (n = 3), il gatto (n = 1), l'asino (n = 1) e il ratto (n = 1). Le fonti di sangue per ogni flebotomo e il sito di cattura sono riportati in Fig 4. L'identificazione della fonte di sangue è stata ottenuta con successo da due su quattro campioni ingorgati di *S. minuta* positivi per il DNA di *L. tarentolae*, ovvero l'uomo (*Homo sapiens*) e l'asino (*Equus asinus*); mentre il gene parziale mitocondriale *cyt*B dell'ospite non poteva essere amplificato dal *P. perniciosus* ingorgato positivo al DNA di *L. donovani* complex.

I conigli selvatici (27/82; 32,9%) rappresentano la specie di mammiferi preferita per *P. perniciosus*, mentre *S. minuta* predilige gli esseri umani (16/25; 64%). I risultati dell'analisi statistica sulla frequenza delle fonti di sangue per *P. perniciosus* e *S. minuta* nel sito E sono riassunte nella Tabella S3, dove è stata rilevata una frequenza statisticamente significativa più alta di pasti di sangue su coniglio da *P. perniciosus* rispetto a *S. minuta* ($\chi2$ = 183,1; P = 0,01), e sull'uomo da *S. minuta* rispetto a *P. perniciosus* ($\chi2$ = 27,7; P < 0,001).

4. Discussione

Il nostro studio mira a valutare la presenza di un'infezione naturale da *Leishmania* nelle specie catturate di flebotomi comuni in Sicilia; inoltre, la fonte di pasti di sangue delle femmine alimentate è stata anche determinante per acquisire prove sulle abitudini alimentari dei flebotomi e per permettere l'identificazione di potenziali/alternativi reservoir di ospiti per la *Leishmania*.

Quattro delle cinque specie di flebotomi analizzati in questo studio sono vettori comprovati della leishmaniosi umana. Nel genere *Phlebotomus*, *P. perniciosus* era la specie più presente, che è in accordo con le altre indagini entomologiche condotte nel Sud Italia [13,29,37-38], e la presenza di DNA di *L. donovani* complex in *P. perniciosus* qui riportato conferma il ruolo di questa specie nel mantenimento e nella diffusione della leishmaniosi nell'area mediterranea.

Solo un singolo campione di *P. perniciosus* (0,2%; n = 594) è risultato positivo per *L. donovani* complex. Per quanto di nostra conoscenza, i soli dati sulla prevalenza dell'infezione da *L. infantum* in *P. perniciosus* in Sicilia provengono da uno studio condotto nella città di Catania dove è stato rilevato un tasso di infezione più elevato (cioè, 11%; 8/72) [13]. Questa differenza può essere correlata all'elevata endemicità di leishmaniosi nella zona di Catania [11,13] e suggerisce che il rischio di trasmissione di *Leishmania* può essere elevato anche nelle aree urbane.

Gli esemplari di *Phlebotomus neglectus* e *P. perfiliewi* sono stati occasionalmente raccolti in periferia e in ambienti rurali, e *P. sergenti*, il vettore in grado di trasmettere *L. tropica*, è stato anche sporadicamente raccolto, con una sua presenza limitata sul lato orientale dell'isola [12-14].

Il rilevamento del DNA di *L. donovani* complex in una femmina non nutrita di *S. minuta* qui registrata, spinge a studiare meglio il ruolo potenziale di questa specie nella circolazione e nella trasmissione del parassita [39]. La positività di questo flebotomo può essere correlata al suo comportamento alimentare e alla grande disponibilità di un reservoir di ospiti mammiferi positivi per *Leishmania* in focolai endemici [38]. Sebbene le specie *Sergentomyia* si nutrano principalmente su vertebrati a sangue freddo, è stato già suggerito il suo comportamento alimentare antropofilo sporadico/opportunistico [4] e, di conseguenza, è stata qui dimostrata statisticamente una maggiore preferenza per il sangue umano. Ad oggi non sono disponibili prove scientifiche sulla competenza di *S. minuta* nel trasmettere *Leishmania* spp. ai mammiferi a sangue caldo; tuttavia, è stato recentemente dimostrato che *L. donovani*, *L. infantum* e *L. major* non sono in grado di sviluppare infezioni tardive nei flebotomi di *Sergentomyia schwetzi*. *Sergentomyia* spp. sono flebotomi molto diffusi nel Mediterraneo, e vettori dimostrati di specie di *Leishmania* nel rettile (ad esempio, *L. tarentolae*) non patogeni per l'uomo.

La positività di *S. minuta* per *L. tarentolae* qui registrata (2,1%; 26/1264) conferma che questa specie si nutre su animali a sangue freddo, poiché il parassita protozoo è diffuso nelle specie di *Gekkonidae* [41]. In Italia, la presenza di *Trypanosoma spp.* nei flebotomi è stata poco segnalata. In particolare, il *Trypanosoma platydactyli* è stato descritto in *S. minuta* [42], e l'infezione da un *Trypanosoma* appartenente al gruppo del *Trypanosoma theileri* con omologia molto elevata ad altri tripanosomi rilevati nei cervidi europei sono stati recentemente segnalati in *Phlebotomus perfiliewi* [43]. Nell'area del Mediterraneo, *Trypanosoma nabiasi*, un tripanosoma di coniglio, e la sua coinfezione con *L. infantum* è stata trovata in flebotomi femmine di *P. perniciosus* catturate nel contesto di un focolaio di leishmaniosi umana a Madrid [44], e l'infezione naturale dei flebotomi da tripanosomi di lucertole, anfibi, uccelli e roditori è già stata segnalata principalmente dal continente americano e dall'Asia [45-48]. Nonostante il *Trypanosoma* spp. sia un parassita protozoo trasmesso da insetti ematofagi [49-50] non è stato ancora chiarito il potenziale del flebotomo nella trasmissione dei tripanosomi. I risultati sin qui ottenuti, suggeriscono che *S. minuta* potrebbe essere potenzialmente un vettore sia della *Leishmania* che dei parassiti del *Trypanosoma* nel Sud Italia. Tuttavia, l'individuazione del DNA tripanosomatide non è sufficiente per incriminare la specie come vettore competente in quanto può semplicemente provenire da un pasto di sangue senza subire ulteriore sviluppo e/o trasmissione. Il rilevamento del DNA di *L. donovani* complex e, in inoltre, il rilevamento del DNA del *Trypanosoma* in *S. minuta* nei rettili indica che è richiesta una maggiore

attenzione quando si identificano gli organismi dei parassiti, tramite PCR, nei flebotomi in aree in cui la leishmaniosi è endemica. In effetti, è importante sottolinearlo, quando le specie *Trypanosoma* e *Leishmania* sono presenti nella stessa area geografica, le infezioni miste possono manifestarsi nello stesso ospite e/o vettore che rappresenta una sfida per la loro diagnosi [51-53].

Per quanto riguarda l'individuazione di sequenze di *L. donovani* complex sia in *P. perniciosus* che in *S. minuta*, non è possibile giungere ad un'identificazione specie-specifica basata sul *cyt*B. Infatti, la monofilia delle specie di *L. infantum* e *L. donovani* non è stata dimostrata in modo coerente [29].

Inoltre in questo studio per quanto riguarda l'identificazione delle fonti del pasto di sangue, diversi ospiti vertebrati sono stati riconosciuti come serbatoio delle specie di flebotomi più comuni (*P. perniciosus*, *S. minuta*), confermando il comportamento opportunistico nell'alimentazione di questi insetti ematofagi [4,18–19]. La conoscenza delle preferenze dell'ospite del flebotomo in condizioni naturali è essenziale per capire come la scelta dell'ospite e il comportamento alimentare dei flebotmi influenzano la loro capacità di trasmissione di focolai di leishmaniosi. Anche se il *Canis lupus familiaris* è considerato il principale serbatoio domestico per la leishmaniosi zoonotica, non sembra essere la specie preferita su cui alimentarsi [4,18]. I risultati dell'attuale studio mostrano che nonostante tre dei cinque siti selezionati, che sono rifugi con un'alta disponibilità di cani (cioè da 300 a 500 cani per sito), il DNA canino non è stato rilevato in esemplari di *P. perniciosus* ingorgati catturati all’interno siti. Questa constatazione potrebbe tuttavia essere influenzata dall'ampio uso di insetticidi e repellenti sui cani come misure preventive contro le punture del flebotomo e la trasmissione della *Leishmania*. In questo studio, durante il periodo di campionamento del flebotomo, circa un terzo di tutti i cani ospitati nei tre rifugi erano trattati con sostanze attive repellenti contro tali vettori.

L'85% del totale delle femmine ingorgate indagate in questo studio è stato catturato in un'azienda agricola che si trova in una fattoria in una zona rurale lontana dagli insediamenti umani. Lì erano presenti una grande varietà di ospiti vertebrati, come cani e conigli (domestici o selvatici) che sono le specie più abbondanti.

In questo sito, i conigli selvatici rappresentavano la specie di mammiferi preferita da *P. perniciosus*, che conferma quanto già riportato in Spagna [20-22]. Infatti, alti livelli di anticorpi anti *P. perniciosus* nella saliva dei conigli selvatici hanno suggerito la loro esposizione e la loro attrattiva per i flebotomi [54]. La grande disponibilità di lagomorfi potrebbe contribuire al mantenimento di alte densità di *P. perniciosus* nelle aree in cui queste specie di mammiferi sono abbondanti [54] e, il ruolo dei lagomorfi nel sostenere il ciclo della *Leishmania* silvestre è stato fortemente suggerito indipendentemente dal ciclo domestico [22,25].

I risultati ottenuti nello studio attuale mostrano un diverso modello di alimentazione di *S. minuta* rispetto a *P. perniciosus*, suggerendo che le due specie di flebotomo non preferiscono lo stesso ospite vertebrato. È noto che *S. minuta* si nutre di rettili a sangue freddo; degno di nota, il DNA dei rettili non è stato amplificato nelle femmine ingorgate qui analizzate, e solo il DNA dei vertebrati a sangue caldo è stato amplificato. È interessante notare che *S. minuta* catturata nel sito E si è nutrita principalmente di esseri umani, anche se la presenza di questo ospite vertebrato all'interno dell'azienda agricola è limitata a poche ore durante il giorno e non c'erano abitazioni nelle vicinanze.

5. Conclusioni

L'attuale indagine descrive il tasso di infezione della *Leishmania* in *P. perniciosus* e *S. minuta* e documenta, per la prima volta in Sicilia, la presenza del DNA del *Trypanosoma* in femmine di *S. minuta* che non avevano effettuato un pasto di sangue.

I risultati qui riportati, evidenziano il ben noto ruolo di *P. perniciosus* come vettore principale di *L. infantum* nell'area del Mediterraneo occidentale; inoltre, l'identificazione del pasto di sangue suggerisce l'importanza dei conigli selvatici nel mantenimento di *P. perniciosus* e del loro ruolo potenziale come serbatoi selvatici di *Leishmania*. Il ruolo dei selvatici nell'epidemiologia della leishmaniosi così come quello di *S. minuta* come un vettore della *Leishmania spp.* per gli esseri umani necessita di ulteriori approndimenti e studi per raggiungere un'efficiente strategia di controllo.

Figura 1. Caratteristiche geografiche dei siti di campionamento dei flebotomi e presenza di ospiti vertebrati.

Sand fly collection sites	Traps	Collection season	Environment	Vertebrate hosts available in 100 meters radius
Site A	Laika/ CLT	2017	Suburban	Dogs, horses, humans
Site B	CLT	2018	Suburban	Cats, dogs, humans, pigs
Site C	CLT	2018	Suburban	Cats, dogs, humans
Site D	CLT	2018	Suburban	Dogs, humans
Site E	CLT	2018	Rural	Cats, cows, dogs, goats, hens, horses, humans, rabbits, rusters, pigs

Figura 2. Albero filogenetico di massima somiglianza basato su sequenze di allineamento multiple non ambigue di *Leishmania cyt*B, utilizzando il modello di evoluzione GTR+G+I

Figura 3. Albero filogenetico di massima somiglianza basato su sequenze di allineamento inequivocabile di SSU-rDNA multiplo di *Trypanosoma*, utilizzando il modello di evoluzione GTR+G+I

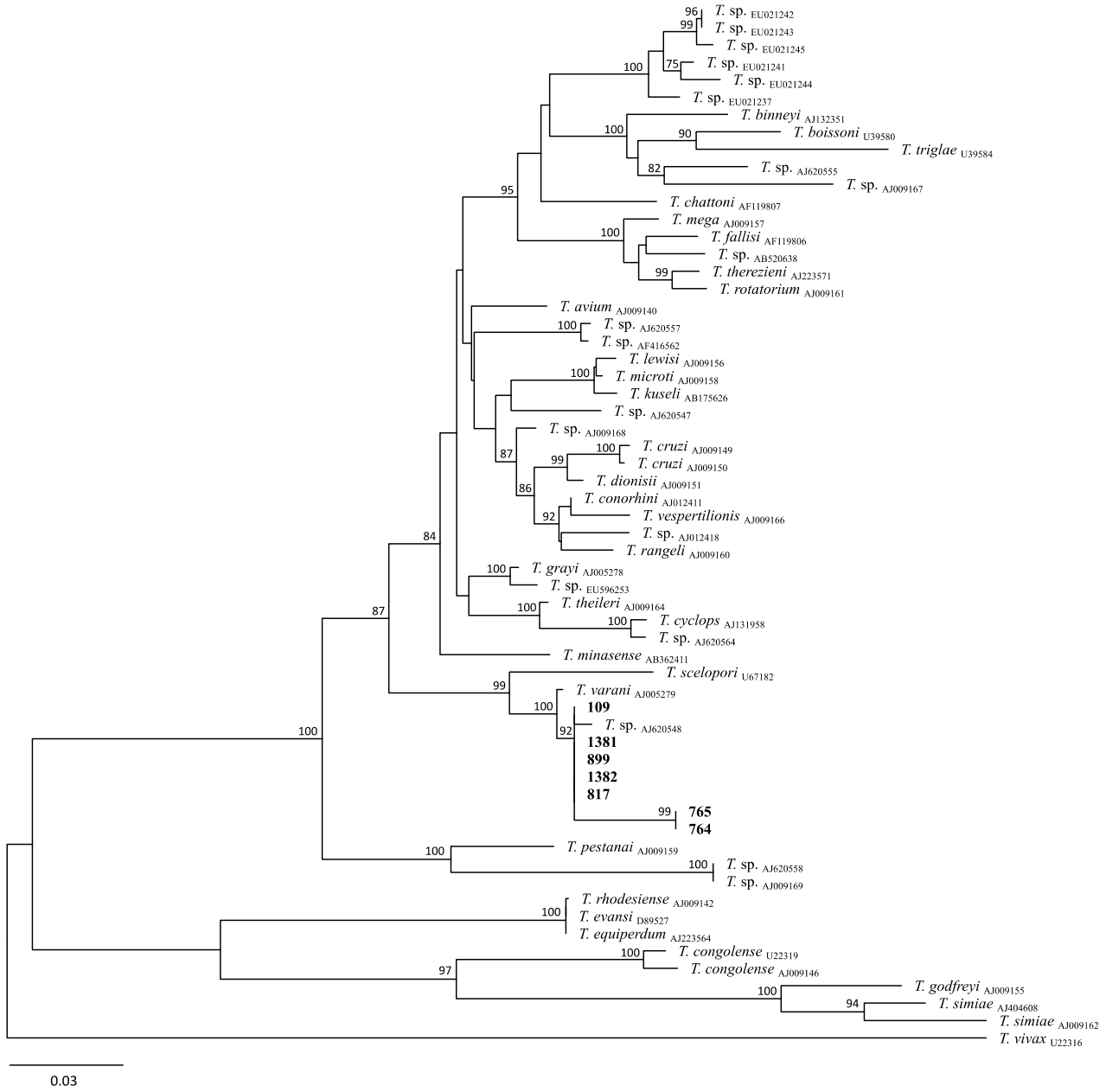


Figura 4. Ospiti di vertebrati identificati per ciascuna specie di flebotomo in siti di campionamento selezionati (A – E)

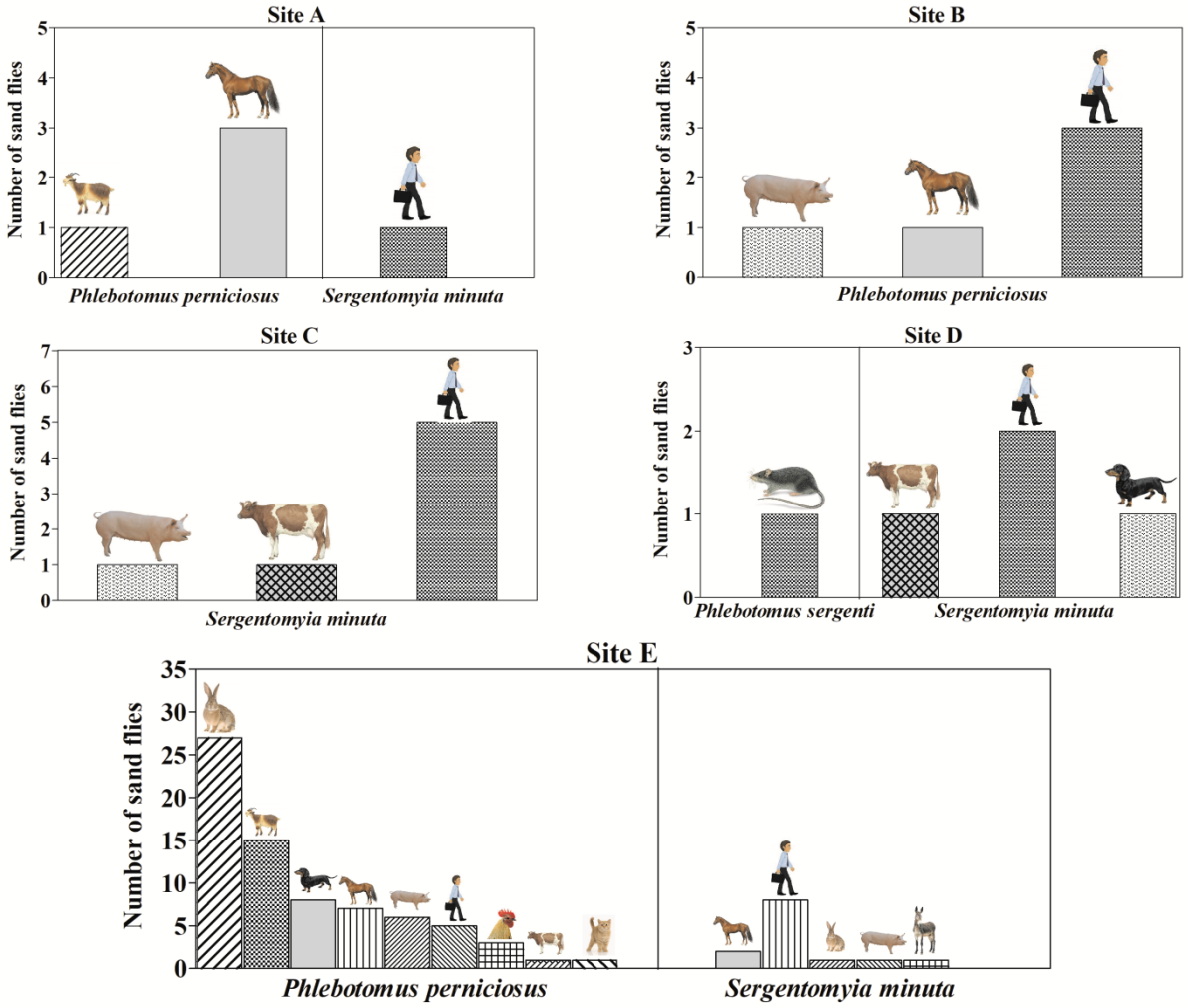


Tabella 1. Totale dei flebotomi raccolti durante le due indagini entomologiche

Table 1.

Site (Year)	Sand fly species									
	Sergentomyia minuta		*Phlebotomus perniciosus*		*Phlebotomus sergenti*		*Phlebotomus perfiliewi*		*Phlebotomus neglectus*	
	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males
Site A (2017)	62	48	157	141					1	2
Site B (2018)	154	99	54	81						2
Site C (2018)	153	172	1	22	1					
Site D (2018)	248	162	9	78	3	5				2
Site E (2018)	647	144	373	239			3			27
Total	1,264	625	594	561	4	5	3		1	33

Tabella 2. Flebotomi femmine campionati ed analizzati molecolarmente

Table 2.

Site (Year)	Female sand fly species														
	Sergentomyia minuta (no=1,264)			*Phlebotomus perniciosus* (no=594)			*Phlebotomus sergenti* (no=4)			*Phlebotomus perfiliewi* (no=3)			*Phlebotomus negle* (no=1)		
	Unfed	Blood fed	Gravid	Unfed	Blood fed	Gravid	Unfed	Blood fed	Gravid	Unfed	Blood fed	Gravid	Unfed	Blood fed	G
Site A (2017)	60	1	1	153	4								1		
Site B (2018)	121		33	43	6	5									
Site C (2018)	137	11	5	1			1								
Site D (2018)	239	4	5	7		2	2	1							
Site E (2018)	587	21	39	223	128	22				2		1			
Total	1,144	37	83	427	138	29	3	1		2		1	1		

Tabella 3. Differenze nella preferenza dell'ospite nelle specie più abbondanti di flebotomi catturati nel sito E

***Phlebotomus perniciosus* blood meal sources**								
	Capra hircus	*Canis familiaris*	*Equus caballus*	*Sus scrofa*	*Homo sapiens*	*Gallus gallus*	*Bos taurus*	*Felis catus*
Oryctolagus cuniculus	$\chi2$ = 4.8, P = 0.01	$\chi2$ = 13.6, P < 0.001	$\chi2$ = 15.3, P <0.001	$\chi2$ = 17.3, P <0.001	$\chi2$ = 19.4, P <0.001	$\chi2$ = 15.3, P <0.001	$\chi2$ = 24.2, P <0.001	$\chi2$ = 24.2, P <0.001
Capra hircus		$\chi2$ = 2.5, P = 0.06	$\chi2$ = 3.4, P = 0.03	$\chi2$ = 4.5, P = 0.01	$\chi2$ = 5.8, P = 0.008	$\chi2$ = 9.1, P = 0.001	$\chi2$ = 24.2, P <0.001	$\chi2$ = 13.8, P <0.001
Canis familiaris	$\chi2$ = 2.5, P = 0.06		$\chi2$ = 0.07, P = 0.39	$\chi2$ = 0.32, P = 0.29	$\chi2$ = 0.8, P = 0.19	$\chi2$ = 2.5, P = 0.06	$\chi2$ = 5.8, P = 0.008	$\chi2$ = 5.8, P = 0.008
Equus caballus	$\chi2$ = 3.4, P = 0.02	$\chi2$ = 0.07, P = 0.39		$\chi2$ = 0.08, P = 0.38	$\chi2$ = 0.36, P = 0.27	$\chi2$ = 1.7, P = 0.09	$\chi2$ = 4.7, P = 0.01	$\chi2$ = 4.8, P = 0.01
Sus scrofa	$\chi2$ = 4.5, P = 0.01	$\chi2$ = 0.32, P = 0.29	$\chi2$ = 0.8, P = 0.40		$\chi2$ = 0.09, P = 0.37	$\chi2$ = 1.1, P = 0.15	$\chi2$ = 3.7, P = 0.02	$\chi2$ = 3.8, P = 0.03
Homo sapiens	$\chi2$ = 5.8, P = 0.008	$\chi2$ = 0.8, P = 0.19	$\chi2$ = 0.36, P = 0.27	$\chi2$ = 0.09, P = 0.37		$\chi2$ = 2.7, P = 0.04	$\chi2$ = 2.7, P = 0.04	$\chi2$ = 2.8, P = 0.04
Gallus gallus	$\chi2$ = 9.1, P = 0.001	$\chi2$ = 2.5, P = 0.06	$\chi2$ = 1.7, P = 0.09	$\chi2$ = 1.1, P = 0.15	$\chi2$ = 0.5, P = 0.2		$\chi2$ = 1.3, P = 0.15	$\chi2$ = 1.0, P = 0.15
Bos taurus	$\chi2$ = 13.8, P <0.001	$\chi2$ = 5.8, P = 0.008	$\chi2$ = 4.7, P = 0.01	$\chi2$ = 3.7, P = 0.02	$\chi2$ = 2.7, P = 0.04	$\chi2$ = 1.3, P = 0.15		$\chi2$ = 0.9, P = 0.50

***Sergentomyia minuta* blood meal sources**				
	Equus asinus	*Equus caballus*	*Homo sapiens*	*Sus scrofa*
Oryctolagus cuniculus	$\chi2$ = 0.9, P = 0.5	$\chi2$ = 0.4, P = 0.3	$\chi2$ = 8.3, P = 0.02	$\chi2$ = 0.9, P = 0.5
Equus asinus		$\chi2$ = 0.4, P = 0.3	$\chi2$ = 8.3, P = 0.02	$\chi2$ = 0.9, P = 0.5
Equus caballus	$\chi2$ = 0.4, P = 0.3		$\chi2$ = 5.9, P = 0.007	$\chi2$ = 0.4, P = 0.3
Homo sapiens	$\chi2$ = 8.3, P = 0.02	$\chi2$ = 5.9, P = 0.007		$\chi2$ = 8.3, P = 0.02

Bibliografia

1. Maroli M., Feliciangeli M.D., Bichaud L., Charrel R.N., Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. Med Vet Entomol. 2013; 27(2):123–47. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x PMID: 22924419

2. Alten B., Maia C., Afonso M.O., Campino L., Jime´nez M., Gonza´lez E. et al. Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(2):e0004458. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004458 PMID: 26900688

3. Antoniou M., Gramiccia M., Molina R., Dvorak V., Volf P. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. Eurosurveillance. 2013; 18(30):20540. https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20540 PMID: 23929183

4. Maia C., Parreira R., Cristo´vão J.M., Freitas F.B., Afonso M.O., Campino L. Molecular detection of Leishmania DNA and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: *Psychodidae*) from southern Portugal. Parasit Vectors. 2015; 8:173. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0787-4 PMID: 25889732

5. Gonza´lez E., Alvares A., Ruiz S., Molina R., Jime´nez M. Detection of high *Leishmania infantum* loads in *Phlebotomus perniciosus* captured in the leishmaniasis focus of southwestern Madrid region (Spain) by real time PCR. Acta Trop. 2017; 171:68–73. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.03.023 PMID: 28356232

6. Dujardin J.C., Campino L., Cañavate C., Dedet J.P., Gradoni L., Soteriadou K. et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. Emerg Infect Dis. 2008; 14(7):1013–8. https://doi.org/ 10.3201/eid1407.071589 PMID: 18598618

7. Di Muccio T., Scalone A., Bruno A., Marangi M., Grande R., Armignacco O. et al. Epidemiology of imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European endemic country. PLoS One. 2015; 10(7): e0134885. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134885 PMID: 26230719

8. Gramiccia M., Scalone A., Di Muccio T., Orsini S., Fiorentino E., Gradoni L. The burden of visceral leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: a retrospective analysis of the multi-annual epidemic that occurred from 1989 to 2009. Euro Surveill. 2013; 18(29):20535. PMID: 23929120

9. Vaselek S., Volf P. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus tobbi* with different *Leishmania tropica* strains. Int J Parasitol. 2019; 49(11):831–5. https://doi.org/10.1016/j.ijpara. 2019.05.009 PMID: 31401063

10. Otranto D., Napoli E., Latrofa M.S., Annoscia G., Tarallo V.D., Greco G. et al. Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: Pathogen and vector circulation in a confined environment. Vet Parasitol. 2017; 236:144–51. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.01.019 PMID: 28288759

11. Brianti E., Napoli E., Gaglio G., Falsone L., Giannetto S., Solari Basano F. et al. Field Evaluation of Two Different Treatment Approaches and Their Ability to Control Fleas and Prevent Canine Leishmaniosis in a Highly Endemic Area. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(9):e0004987. https://doi.org/10.1371/journal. pntd.0004987 PMID: 27632527

12. Gaglio G., Brianti E., Napoli E., Falsone L., Dantas-Torres F., Tarallo V.D. et al. Effect of night time-intervals, height of traps and lunar phases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis. Acta Trop. 2014; 133:73–7. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.02.008 PMID: 24561074

13. Lisi O., D'Urso V., Vaccalluzzo V., Bongiorno G., Khoury C., Severini F. et al. Persistence of phlebotomine Leishmania vectors in urban sites of Catania (Sicily, Italy). Parasit Vectors. 2014; 7:560. https://doi.org/ 10.1186/s13071-014-0560-0 PMID: 25487039

14. D'Urso V., Ruta F., Khoury C., Bianchi R., Depaquit J., Maroli M. About the presence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: *Psychodidae*) in Eastern Sicily, Italy. Parasite. 2004; 1(3):279–83.

15. El Alem M.M.M., Hakkour M., Hmamouch A., Halhali M., Delouane B., Habbari K. et al. Risk factors and prediction analysis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica* in Southwestern Morocco. Infect Genet Evol. 2018; 61:84–91. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.017 PMID: 29578084

16. Antinori S., Gianelli E., Calattini S., Longhi E., Gramiccia M., Corbellino M. Cutaneous leishmaniasis: an increasing threat for travellers. Clin Microbiol Infect. 2005; 11(5):343–6. https://doi.org/10.1111/j.1469- 0691.2004.01046.x PMID: 15819858

17. Gramiccia M., Di Muccio T., Marinucci M. Parasite identification in the surveillance of imported leishmaniasis cases in Italy. Parassitologia. 2004; 46: 207–10. PMID: 15305718

18. Latrofa M.S., Iatta R., Dantas-Torres F., Annoscia G., Gabrielli S., Pombi M. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA in phlebotomine sand flies from an area where canine leishmaniosis is endemic in southern Italy. Vet Parasitol. 2018; 253:39–42. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.006 PMID: 29605001

19. Rossi E., Bongiorno G., Ciolli E., Di Muccio T., Scalone A., Gramiccia M. et al. Seasonal phenology, hostblood feeding preferences and natural Leishmania infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, *Psychodidae*) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome

province, Italy. Acta Trop. 2008; 105(2):158–65. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.10.005 PMID: 18035329

20. Gonza´lez E., Jime´nez M., Herna´ndez S., Martı´n-Martı´n I., Molina R. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. Parasit Vectors. 2017; 10:368. https://doi.org/10.1186/s13071- 017-2309-z PMID: 28764772

21. Gonza´lez E., Ga´llego M., Molina R., Abras A., Alcover M.M., Ballart C. et al. Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome b gene. Acta Trop. 2015; 152:96–102. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.020 PMID: 26342793

22. Jime´nez M., Gonza´lez E., Martı´n-Martı´n I., Herna´ndez S., Molina R. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? Vet Parasitol. 2014; 202(3– 4):296–300. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.027 PMID: 24774435

23. Carrillo E., Moreno J., Cruz I. What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid? Trends Parasitol. 2013; 29(12):579–80. https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.10.007 PMID: 24275160

24. Jime´nez M., Gonza´lez E., Iriso A., Marco E., Alegret A., Fu´ster F. et al. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. Parasitol Res. 2013; 112(7):2453–9. https://doi.org/10.1007/s00436-013-3406-3 PMID: 23535889

25. Molina R., Jime´nez M.I., Cruz I., Iriso A., Martı´n-Martı´n I., Sevillano O. et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. Vet Parasitol. 2012; 190(1–2):268–71. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.006 PMID: 22677135

26. Gaglio G., Napoli E., Arfuso F., Abbate J.M., Giannetto S., Brianti E. Do Different LED Colours Influence Sand Fly Collection by Light Trap in the Mediterranean? Biomed Res Int. 2018; 2018:6432637. https:// doi.org/10.1155/2018/6432637 PMID: 30050940

27. Dantas-Torres F., Tarallo V.D., Otranto D. Morphological keys for the identification of Italian phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Parasit Vectors. 2014; 7:479. https://doi.org/10. 1186/s13071-014-0479-5 PMID: 25323537

28. El Tai N.O., Osman O.F., El Fari M., Presber W., Scho¨nian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (sscp) and sequencing. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 2000; 94:1–5. 29.

29.Pereira A., Parreira R., Cristo´vão J.M., Castelli G., Bruno F., Vitale F. et al. Phylogenetic insights on Leishmania detected in cats as revealed by nucleotide sequence analysis of multiple

genetic markers. Infect Genet Evol. 2020; 77:104069. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104069 PMID: 31670155

30. Kato H., Gomez E.A., Ca´ceres A.G., Vargas F., Mimori T., Yamamoto K. et al. Natural infections of man-biting sand flies by Leishmania and Trypanosoma species in the northern Peruvian Andes. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011; 11(5):515–21. https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0138 PMID: 20954867

31. Svobodova´ M., Alten B., Zı´dkova´ L., Dvora´k V., Hlavackova´ J., Myskova´ J. et al. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. Int J Parasitol. 2009; 39(2):251–6. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.016 PMID: 18761342

32. Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol Evol. 2013; 30(4):772–80. https://doi.org/10.1093/molbev/mst010 PMID: 23329690

33. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Mol Biol Evol. 2000; 17(4): 540–52. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334 PMID: 10742046

34. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol. 2013; 30(12):2725–9. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197 PMID: 24132122

35. Lin R.H., Lai D.H., Zheng L.L., Wu J., Lukesˇ J., Hide G. et al. Analysis of the mitochondrial maxicircle of *Trypanosoma lewisi*, a neglected human pathogen. Parasit Vectors. 2015; 8:665. https://doi.org/10.1186/ s13071-015-1281-8 PMID: 26715306

36. Hamilton P.B., Stevens J.R., Gaunt M.W., Gidley J., Gibson W.C. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. Int J Parasitol. 2004; 34(12):1393–404. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.08.011 PMID: 15542100

37. Foglia Manzillo V., Gizzarelli M., Vitale F., Montagnaro S., Torina A., Sotera S. et al. Serological and entomological survey of canine leishmaniasis in Lampedusa island, Italy. BMC Vet Res. 2018; 14(1):286. https://doi.org/10.1186/s12917-018-1606-x PMID: 30231901

38. Pereira S., Pita-Pereira D., Araujo-Pereira T., Britto C., Costa-Rego T., Ferrolho J. et al. First molecular detection of *Leishmania infantum* in *Sergentomyia minuta* (Diptera, *Psychodidae*) in Alentejo, southern Portugal. Acta Trop. 2017; 174:45–8 https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.020 PMID: 28647427

39. Maia C., Depaquit J. Can *Sergentomyia* (Diptera, *Psychodidae*) play a role in the transmission of mammal-infecting Leishmania? Parasite. 2016; 23:55. https://doi.org/10.1051/parasite/2016062 PMID: 27921993

40. Sadlova J., Dvorak V., Seblova V., Warburg A., Votypka J., Volf P. *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other Leishmania species pathogenic to humans. Parasit Vectors. 2013; 6:186. https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-186 PMID: 23786805

41. Pozio E., Gramiccia M., Gradoni L., Maroli M. Hemoflagellates in *Cyrtodactylus kotschyi* (Steindachner, 1870) (Reptilia, *Gekkonidae*) in Italy. Acta Trop. 1983; 40(4):399–400. PMID: 6142639

42. Gramiccia M., Gradoni L., Maroli M. Caracte´risation enzymatique de *Trypanosoma platydactyli* CATOUlLLARD, 1909 isole´ de *Sergentomyia minuta* minuta RONDANI, 1843 en Italie. Ann Parasitol Hum Comp. 1989; 64(2):154–6. French

43. Calzolari M., Rugna G., Clementi E., Carra E., Pinna M., Bergamini F. et al. Isolation of a Trypanosome Related to *Trypanosoma theileri* (Kinetoplastea: *Trypanosomatidae*) from *Phlebotomus perfiliewi* (Diptera: *Psychodidae*). Biomed Res Int. 2018; 2597074. https://doi.org/10.1155/2018/2597074 PMID: 30112369

44. Gonza´lez E., Molina R., Jime´nez M. Rabbit trypanosome detection in *Phlebotomus perniciosus* sand flies from the leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain. Acta Trop. 2018; 187: 201–6. https://doi.org/10. 1016/j.actatropica.2018.08.011 PMID: 30107150

45. Srisuton P., Phumee A., Sunantaraporn S., Boonserm R., Sor-Suwan S., Brownell N. et al. Detection of Leishmania and Trypanosoma DNA in Field-Caught sand flies from endemic and non-endemic areas of Leishmaniasis in southern Thailand. Insects. 2019; 10(8):238.

46. Phumee A., Tawatsin A., Thavara U., Pengsakul T., Thammapalo S., Depaquit J. et al. Detection of an unknown Trypanosoma DNA in a *Phlebotomus stantoni* (Diptera: *Psychodidae*) collected from southern Thailand and records of new sand flies with reinstatement of *Sergentomyia hivernus* Raynal & Gaschen, 1935 (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 2017; 54(2):429–34. https://doi.org/10.1093/ jme/tjw161 PMID: 27744363

47. Ferreira T.S., Minuzzi-Souza T.T.C., Andrade A.J., de Coehlo T.O., de Rocha D.A., Obara M.T. et al. Molecular detection of Trypanosoma sp. and Blastocrithidia sp. (Trypanosomatidae) in phlebotomine sand flies (Psychodidae) in the Federal District of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2015; 48(6):776–9. https://doi. org/10.1590/0037-8682-0076-2015 PMID: 26676507

48. Kato H., Uezato H., Sato H., Bhutto A.M., Soomro F.R., Baloch J.H. et al. Natural infection of sand fly *Phlebotomus kazeruni* by Trypanosoma species in Pakistan. Parasit Vectors. 2010; 3:10. https://doi.org/10. 1186/1756-3305-3-10 PMID: 20184773

49. Hamilton P.B., Gibson W.C., Stevens J.R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomial RNA and protein-coding gene phylogenies. Mol Phylogenet Evol. 2007; 44 (1):15–25. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.023 PMID: 17513135

50. Desser S.S. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. J Parsitol. 2001; 87(1):152–60.

51. Bastrenta B., Mita N., Buitrago R., Vargas F., Flores M., Machane M. et al. Human mixed infections of Leishmania spp. and Leishmania-*Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(2):255–64. https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000200015 PMID: 12764443

52. De Arau´jo V.A.L., Boite´ M.C., Cupolillo E., Jansen A.M., Roque A.L.R. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: *Pilosa*) from Para´ State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. Parasitology. 2013; 140(4): 455–60. https://doi.org/10.1017/S0031182012001886 PMID: 23253893

53. Dı´az-Sa´ez V., Merino-Espinosa G., Morales-Yuste M., Corpas-Lo´pez V., Pratlong F., Morillas-Ma´rquez F. et al. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: epidemiological consequences. Vet Parasitol. 2014; 202(3–4):119–27. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03. 029 PMID: 24774436

54. Martı´n-Martı´n I., Molina R., Rohousˇova´ I., Drahota J., Volf P., Jime´nez M. High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniosis focus in Madrid, Spain. Vet Parasitol. 2014; 202(3–4):207–16. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.045 PMID: 24629428

Capitolo 3

Presenza, dinamica e ricerca dei patogeni nell'ixodido-fauna della Riserva Naturale Orientata Bosco della *Ficuzza* (Sicilia Occidentale)

Riassunto

Gli ixodidi rivestono un importante ruolo come vettori nella trasmissione di patologie ad eziologia batterica, protozoaria e virale, le così dette "vector borne diseases (VBDs)"; queste patologie rappresentano un problema di Sanità Pubblica, in quanto spesso possono essere trasmesse all'uomo. Un costante monitoraggio degli artropodi vettori è importante sia per conoscere le dinamiche della ixodido-fauna ma soprattutto per indagare la presenza di patogeni al loro interno e per valutare il rischio di trasmissione delle VBDs agli animali e all'uomo. Scopo del presente elaborato è stato quello di condurre un piano di monitoraggio in tre differenti ecotipi nella Riserva Naturale Orientata (R.N.O.) del Bosco della Ficuzza, un'area boschiva che si espande per circa 7000 ettari in provincia di Palermo) mettere in correlazione la presenza e l'abbondanza degli ixodidi campionati con le principali variabili metereologiche) le metodiche di campionamento utilizzate. Inoltre, gli esemplari campionati sono stati analizzati con metodica PCR per la ricerca di patogeni.

Nel periodo compreso tra gennaio 2020 e luglio 2020 sono stati condotti 6 campionamenti e sono stati raccolti un totale di 5058 esemplari (4261 larve, 692 ninfe, 105 adulti, di cui 47 maschi e 58 femmine); di questi 1264 sono stati campionati tramite metodica dragging e 3794 tramite metodica flagging; le differenze tra le due metodiche non sono statisticamente significative (P=0.3308). Sono stati classificati 5 diversi generi di ixodidi e 7 specie. La specie più comunemente riscontrata è *Ixodes ricinus* (52 adulti, 636 ninfe e 3428 larve), seguita da *Haemophisalis puntacta* (5 adulti, 28 ninfe e 808 larve); inoltre sono stati campionati esemplari appartenenti alle specie *Rhipicephalus bursa* (99 adulti e 57 larve), *Hyalomma lusitanicum* (20 larve), *Ixodes frontalis* (3 larve), *Dermacentor marginatus* (4 adulti) e *Rhipicephalus turanicus* (1 adulto). Sono stati esaminati per la ricerca di patogeni 84 adulti (51 *I. ricinus*, 23 *R. bursa*, 5 *Hae. Punctata*, 4 *D. marginatus* e 1 R. *turanicus*): di questi 10 sono risultati positivi (11,9%); in particolare, 8 esemplari di *I. ricinus, R. monacensis, R. helvetica* e *Candidatus;* dei 5 esemplari di *Hae. punctata* uno è risultato positivo ad *A. bovis;* mentre dei 4 *D. marginatus* analizzati uno è risultato positivo per il complesso *Rickettsia heilongjiangensis/raoultii/slovaca*.

Nell'area investigata è stata riscontrata una consistente presenza di ixodidi, sia quantitativamente che in termini di diversità di specie. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza la presenza costante di ixodidi sia nei mesi estivi che in quelli invernali, rappresentando un pericolo sia per la fauna

selvatica che per gli animali di interesse zootecnico presenti nella Riserva, così come per le persone che accedono all'area naturalistica. Nel presente elaborato viene descritta per la prima volta la presenza di una popolazione stabile di *I. ricinus* in Sicilia. Inoltre degni di nota sono i risultati delle indagini PCR, in quanto è stata descritta la presenza di *Candidatus Cryptoplasma* in Italia, sebbene ulteriori studi siano nessari per comprendere meglio la sua distribuzione.

1.Introduzione

Gli Ixodida, sono Chelicerati appartenetti alla sottoclasse Acari (Nitzsch, 1818), attualmente sono riconosciute più di 896 specie (Manilla, 1998) le quali iniziarono verosimilmente a differenziarsi da un unico ceppo ancestrale associato ai rettili durante il periodo caldo-umido del tardo Paleozoico del primo Mesozoico. Gli ixodida sono suddivisi in tre famiglie: Argasidae, Nuttalliellidae e Ixodidae, differenziate sia per la loro anatomia che per il loro ciclo biologico.

I membri della famiglia Argasidae si caratterizzano per corpo coriaceo, con una superficie dalla fitta tramatura, cuticola costituita da pieghe e ondulazioni, particolarmente evidenti quando non sono ingorgate. Sono caratterizzate da un apparato buccale ventrale e dall'assenza completa dello scudo dorsale, da questo appunto il denominativo di zecche molli; in questa famiglia sono state inserite oltre 190 specie. All'interno della Famiglia Nuttalliellidae è presente un unico esemplare, parassita del suricato dalle quattro dita, *Nuttalliella namaqua,* questa specie possiede uno pseudo scudo sclerotico e un capitolo in posizione apicale (Bedford, 1931).

La famiglia più numerosa è quella Ixodidae, di cui sono state descritte oltre 680 specie e sono caratterizzate da corpo ovolare o piriforme (Figura 1). Gli ixodidi si differenziano dagli altri ordini compresi in questa sottoclasse per avere la regione corrispondente alla parte anteriore del prosoma trasformata in un particolare *tagma*; infatti negli altri ordini della sottoclasse Acari questa non è mobile ed è detta *gnatosoma*, mentre nelle zecche è flessibile ed è chiamato *capitulum.*

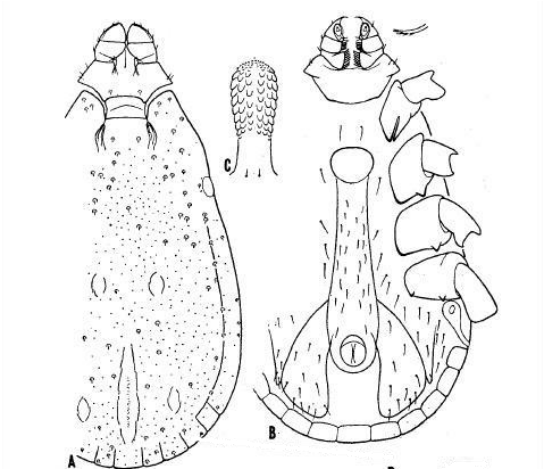


Figura 1. Rappresentazione schematica di ixodidi. A) Superficie dorsale. B) Superficie ventrale. C) Ipostoma. (Da Manilla, 1998).

Il *capitulum* o rostro ha forma e lunghezza variabile ed ospita l'apparato buccale, costituito dai palpi, dai cheliceri e dall'ipostoma (Figura 2); in generale, è disposto anteriormente in tutte le specie della famiglia Ixodidae e nelle larve di argasidi, mentre nelle ninfe e negli adulti appartenenti

alla famiglia Argasidae è accolto in una depressione ventrale del tegumento, nota come camerostoma.

I palpi sono delle strutture simmetriche costituite da quattro arti con funzione sensoriale. Questi ventralmente sono caratterizzati dalla presenza dell'ipostoma e da due cheliceri dorsali. I cheliceri sono composti da corpo e dita dotate di artigli che permettono alle zecche di tagliare la superficie della pelle dell'ospite, mentre l'iposostoma è l'organo di ancoraggio alla cute. L'ipostoma è impari ed è provvisto di spine retrocurve sulla superficie ventrale, mentre su quella dorsale mostra una doccia per il passaggio degli enzimi digestivi e del sangue. In alcune specie sono presenti fitte setole per la pulizia degli spazi interspine tra un pasto di sangue e quello successivo. Quando la zecca effettua il pasto di sangue, l'iposostoma e i cheliceri penetrano la cute dell'ospite, mentre i palpi rimangono in superficie. Per un migliore ancoraggio, secernono un liquido, chiamato cemento, che sigilla l'iposostoma e i cheliceri sull'epidermide (Estrada-Peña, 2015). Queste ultime due strutture formano un foro nel derma rompendo i capillari più superficiali; nell'area interessata si accumulano sangue e linfa che verranno assorbiti dalle zecche tramite l'ipostoma (Walker et al., 2003). È importante sottolineare che, durante il pasto di sangue le zecche rigurgitano nella ferita i liquidi di scarto del pasto precedente, permettendo il passaggio di agenti eziologici nell'ospite e fungendo così da vettori di malattie batteriche e protozoarie (Urquhart et al., 1998).

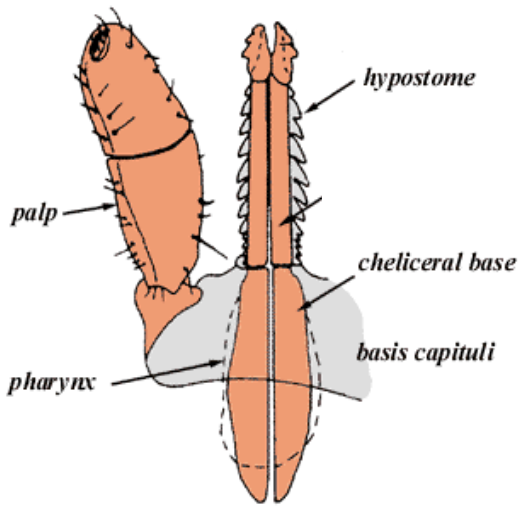


Figura 2. Rappresentazione schematica del capitulum.

Gli ixodidi presentano un corpo, l'*idiosoma*, non suddiviso in *propodosoma* e *metapodosoma* come invece è negli altri acari. Nella superficie ventrale dell'*idiosoma* troviamo anteriormente l'apertura genitale e l'attaccatura degli arti, posteriormente (figura 1B) l'ano e gli orifizi respiratori (*stigmi*) dove sboccano le trachee (Manilla, 1998).

Sulla superficie dorsale dell'*idiosoma* nella parte superiore è caratterizzata da una piastra chitinosa detta scudo dorsale che ricopre tutta la superficie dorsale dei maschi, mentre soltanto parzialmente quella di larve, ninfe e femmine adulte. Lo scudo dorsale può essere più o meno punteggiato o cosparso di setae. Inoltre, sullo scudo si possono evidenziare i solchi laterali, i solchi paramediani e il solco postero mediano (Manilla, 1998).

Gli arti sono formati da sei segmenti, chiamati coxa o anca, trocantere, tibia, femore, pre-tarso e tarso. Inseriti, infine, sull'estremità distale dei tarsi si evidenziano due grosse unghie che presentano alla base un cuscinetto membranoso, detto pulvillo ambulacrale.

Ne tarsi è presente un organo sensoriale, "l'organo di Haller", che permette alla zecca di rilevare i feromoni individuando l'ospite (figura 3).

Figura 3. SEM. Estremità distale del primo paio di arti. Organo di Haller costituito da una cavità piena di peli sensoriali (freccia). (Immagine SEM Prof. Salvatore Giannetto).

Questo organo, che caratterizza esclusivamente gli ixodidi, è formato da una capsula e da una depressione circondata da una piega cuticolare che ospita piccoli ciuffi di peli. Proprio grazie a questi, le zecche rilevano alcune molecole escrete dai vertebrati durante la respirazione o rilasciate

con le secrezioni cutanee come: anidride carbonica, acido ialuronico, lattico e pelargonico, permettendo così loro di orientarsi e posizionarsi ad angolo retto sull'ospite (Estrada-Peña, 2015).

Il ciclo biologico degli Ixodidi prevede quattro stadi evolutivi: uovo, larva esapode che misura circa 1 mm, ninfa con quattro arti che misura da 2 a 4 mm e infine adulto; per passare da uno stadio all'altro necessitano di pasti di sangue, utili anche per l'ovogenesi. Le zecche hanno sessi separati (gli adulti); la copula degli adulti inizia con l'introduzione dell'apparato buccale del maschio nel tratto genitale della femmina e la deposizione di spermatofore che matureranno nell'apparto genitale della femmina. Le femmine adulte di alcune specie depongono circa 100 uova alla volta, altre da 3000 a 6000 per schiusa. Lo sviluppo delle uova dura da 14 a 50 giorni secondo le condizioni microambientali. Per evitare la disidratazione delle uova queste sono ricoperte con una sostanza formata in parte dalla secrezione di ghiandole porose e dall'organo di Gené (Mehlhorn, 2008).

La durata del ciclo evolutivo dipende da fattori intrinseci alla specie e a fattori legati all'habitat come per esempio le condizioni climatiche e la disponibilità di ospiti su cui effettuare il pasto di sangue.

La maggior parte delle zecche dure piuttosto che cercare attivamente i propri ospiti, adotta una particolare strategia secondo la quale esse si dispongono sulla sommità dell'erba o all'estremità delle foglie (*questing tick*) in attesa che un ospite appropriato transiti da lì. Avvenuto il contatto con l'ospite, la zecca si trasferisce sulla superficie corporea alla ricerca del sito preferenziale di attacco, che, nel caso di alcune specie è altamente specifico come ad esempio per *Ripicephalus sanguineus* (orecchie, cavo ascellare, zona perianale, mammelle, zone interdigitali) (Lorusso et al., 2010).

Dopo essersi posizionate sull'ospite le zecche iniziano il pasto di sangue. L'alimentazione nelle ixodidae procede in maniera graduata poiché lo scudo rigido esterno deve aumentare di dimensioni prima che la zecca possa espandersi per l'ingestione di sangue. Le zecche sono considerate "*long-feeders*" poiché quando hanno infisso le loro appendici buccali nei tessuti dell'ospite ne assumono il sangue alternando le suzioni a secrezioni salivari, che svolgono un'importante funzione anticoagulante e vasodilatatrice (Manilla, 1998) e rimangono saldamente adese al proprio ospite sino alla completa replezione. Le larve completano il pasto di sangue in 3-5 giorni, le ninfe in 4-8 giorni e le femmine adulte impiegano da 5 a 20 giorni; trascorso questo periodo, le zecche cadono al suolo dove o mutano allo stadio biologico successivo oppure, nel caso di femmine fecondate, depongono le uova (Walker et al., 2003). A questo punto le zecche devono individuare un nuovo ospite su cui trasferirsi per effettuare un nuovo pasto di sangue. Nelle zone dal clima temperato, i pasti di sangue e il susseguirsi delle generazioni di zecche sono strettamente sincronizzati con i periodi favorevoli per temperatura e umidità. Queste zecche, e in particolare modo i loro stadi

immaturi, sono molto sensibili al clima secco, specialmente quando sono metabolicamente attive. Per ridurre la perdita di umidità corporea, esse cominciano la ricerca dell'ospite quando sono completamente sature d'acqua, mentre ritornano sul terreno umido quando iniziano a disidratarsi.

A seconda che gli ospiti appartengano alla stessa specie o a specie diverse di animali, le zecche sono definite monotrope (ad una specie), ditrope (a due o più specie diverse). In relazione al numero di ospiti necessari per lo svolgimento dell'intero ciclo biologico gli ixodidi sono distinti in: zecche ad un ospite (monofasiche), a due ospiti (difasiche), a tre ospiti (trifasiche). Le zecche che si nutrono in tutti gli stadi sullo stesso ospite risultano meno esposte a fattoti abiotici estrinseci ed il loro ciclo tende a completarsi in un minor lasso di tempo rispetto a zecche a tre ospiti.

Le abitudini alimentari e biologiche influenzano la capacità delle zecche di agire come vettori, infatti, le specie difasiche e trifasiche possono veicolare un maggior numero di patogeni differentemente delle monofasiche, che presentano una specificità d'ospite in tutti gli stadi.

Nelle difasiche e trifasiche il passaggio di un agente patogeno da uno stadio ad un altro è conosciuto come trasmissione trans-stadiale (Anderson e Magnarelli, 2008); mentre nelle zecche monofasiche tale passaggio, avviene tramite un processo conosciuto come trasmissione trans-ovarica, che permette alle femmine adulte di trasferire alla loro progenie il microrganismo. In queste ultime, grazie alla loro specificità d'ospite, si ha una maggiore possibilità di controllo della trasmissione di malattie.

La presenza e l'attività delle zecche è regolata principalmente dai cambiamenti del microclima dell'ambiente; in particolare, sembra che gli ixodidi siano maggiormente influenzati dalla temperatura e dall'umidità del suolo e dalla vegetazione piuttosto che dalle variazioni climatiche di una regione geografica (Otranto e Dantas-Torres, 2013). Tuttavia, non va trascurato che esiste una relazione tra le condizioni meteorologiche e l'attività delle zecche (Corson et al., 2004; Bisanzio et al., 2008; Estrada-Peña e de la Fuente, 2014). Durante la stagione estiva, caratterizzata da temperature elevate e bassa umidità, si ha un aumento del tasso di mortalità delle zecche, specialmente quelle localizzate in ambienti con vegetazione alta o che stanno subendo un processo di muta. Al contrario, in inverno, le temperature rigide incidono negativamente sulla vitalità delle zecche poste a terra, anche se, a volte, la neve può avere un effetto protettivo sulla popolazione delle zecche a fronte delle basse temperature (Estrada-Peña y de la Fuente, 2014; Alonso-Carné et al., 2016). Per questi motivi, ci sono due momenti critici nella vita di una zecca, dove il loro sviluppo può essere fortemente influenzato dalle variabili metereologiche, ovvero la muta o l'ovodeposizione e la ricerca di un ospite. Le variabili che più influenzano questi processi sono temperatura, umidità relativa, deficit di saturazione e fotoperiodo (Rudolph et al., 1974; Kahl et al., 1988; Perret et al, 2000; Estrada-Peña y de la Fuente, 2014). A questo proposito, Estrada-Peña e de

la Fuente (2014) hanno studiato il possibile rapporto tra diverse combinazioni di temperatura e umidità relativa durante le fasi di sviluppo della zecca, anche se non ancora è stato determinato come ciascuna di queste variabili influenzerebbe il loro ciclo di vita. Secondo questi autori, la temperatura è legata allo sviluppo delle diverse fasi, poiché agisce sulla regolazione del ciclo di vita della zecca. Le basse temperature dell'inverno riducono lo sviluppo delle zecche, mentre l'aumento delle temperature in primavera determina il completamento della muta.

La distribuzione delle zecche è dinamica, varia in relazione a diversi fattori, la presenza e lo spostamento di ospiti, l'utilizzo di sostanze ad azione acaricida nelle procedure di controllo, e la conseguente capacità di resistenza ad essi e alle variazioni climatiche legate alla stagionalità delle piogge (Tønnesen et al., 2004). Inoltre, il numero di zecche che infesta un animale dipende anche dalla carica ambientale.

La presenza e l'abbondanza delle zecche in un determinato habitat, come detto in precedenza, può subire delle fluttuazioni di stagione in stagione o di anno in anno, a causa di fattori climatici quali la piovosità (Wesonga et al., 2006). Così anche la natura della vegetazione e in particolare le caratteristiche del suolo influenzano le fasi libere del ciclo vitale; tant'è vero che si ha una maggiore densità di zecche nelle aree con vegetazione in prossimità di fonti d'acqua permanenti (Wesonga et al., 2006). È stato osservato, infatti, che la vegetazione rigogliosa e densa è generalmente favorevole sia per la sopravvivenza della zecca ma è anche un fattore positivo per lo sviluppo delle specie ospiti, come cervidi, roditori e uccelli (Gray, 2008). Inoltre, la presenza di zecche in un particolare ambiente è influenzata da fattori come la disponibilità di ospiti per le fasi intermedie e loro suscettibilità e resistenza all'infestazione.

Gli ixodidi che vivono in ambienti riparati quali nidi o tane o in particolari habitat nel contesto di biotipi aperti sono detti endofili. Gli Ixodidae endofili sono solifughi, per cui nelle ore diurne restano inattive nei loro anfratti ed aggrediscono l'ospite al buio o, comunque, al riparo dalla luce diretta spesso mentre gli ospiti dormono o covano o sono in letargo, al contrario le specie esofile, es. *Ixodes ricinus* e *Hyalomma marginatum*, si inerpicano sugli steli erbosi, cespugli o varia vegetazione frondosa fino a raggiungere una certa altezza dal suolo dove, come detto in precedenza, assumono una posizione di attacco

Le zecche esofile si dispongono a diversa altezza nella vegetazione in dipendenza da vari fattori. Gli adulti, infatti, tendono a salire sulla sommità della vegetazione aumentando in questo modo la probabilità di incontrare grossi mammiferi quali cervi, carnivori e uomo su cui attaccarsi. Anche l'equilibrio idrico è un importante fattore che influenza, come detto in precedenza, l'attività delle zecche; questi parassiti infatti al fine di proteggersi dai raggi solari diretti rimangono sulla pagina inferiore delle foglie. Possono rimanere in tale posizione anche per molte ore fino a quando

un’eccessiva disidratazione non le costringe alla discesa verso il terreno umido dove possono recuperare l’acqua persa (Sonenshine, 2005).

Le larve, che in molte specie, sono più sensibili alla disidratazione (Manilla, 1998), rimangono più in prossimità del terreno, avendo così maggiori probabilità di incontrare piccoli mammiferi, uccelli terricoli e altri piccoli ospiti vertebrati (Sonenshine, 2005). Le larve permangono in tale posizione finché non percepiscono sensorialmente un qualsiasi corpo, dunque si distaccano bruscamente dai loro supporti, sui quali tornano ad inerpicarsi se il tentativo di aggressione risulta infruttuoso. La zecca risponde a una grande varietà di stimoli sensoriali come ombre (forme scure sullo sfondo luminoso del cielo), vibrazioni, odori, stimoli tattili e altri stimoli che possono indicarle la presenza dell’ospite. In seguito alla percezione dello stimolo, le zecche estendono antero-lateralmente gli arti anteriori così da aggrapparsi all’ospite (Sonenshine, 2005). Queste caratteristiche sono sfruttate per la cattura degli artropodi; tra queste si distinguono tecniche passiva o per contatto diretto con la vegetazione (questo metodo sfrutta la capacità delle zecche di essere attratte dalle vibrazioni e di aggrapparsi al tessuto non distinguendolo da un ospite vivente), tecniche per attrazione a distanza (trappole attrattive a base di CO_2) e raccolta di zecche direttamente attaccate sugli ospiti (Barandika, 2010).

Questi metodi sono utilizzati negli studi di sorveglianza epidemiologica in una determinata zona o su un animale o un ospite specifico; vengono utilizzati anche quando si desidera conoscere la distribuzione delle diverse specie di zecche in una posizione o in una particolare area e per determinare l'attività e la loro abbondanza.

L’acquisizione delle zecche direttamente dagli ospiti prevede la rimozione di questi ectoparassiti durante il processo di alimentazione; è necessario che la rimozione venga eseguita correttamente per garantire l’integrità dello gnatosoma, in modo da non compromettere la successiva classificazione. Nell’eseguire correttamente tale tecnica, la punta della pinzetta deve essere posizionata il più vicino possibile alla pelle dell'animale, trattenendo la zecca per l’apparato buccale e tirandola fino a quando non viene rimossa. L’utilizzo di questa metodica non risulta molto vantaggioso se si vogliono ricercare patogeni all’interno delle zecche; infatti lo status parassitario degli animali da cui vengono campionati potrebbero influenzarne gli esiti.

La metodica di cattura passivo o per contatto diretto con la vegetazione, è senza dubbio quella più utilizzata e consente di campionare gli stadi liberi di zecche presenti in una determina area geografica. Sono state descritte due differenti modalità di campionamento, il così detto metodo della bandiera o “flagging” e quello della coperta o “dragging” (Dantas-Torres et al., 2013).

Nel primo metodo il campionamento è effettuato tramite un pezzo di stoffa di materiale soffice attaccato ad un bastone, come se fosse una bandiera, da cui appunto prende il nome. La stoffa è

ondeggiata avanti e indietro attorno e la vegetazione. Questa tecnica consente di campionare principalmente gli adulti, che sono sulla superficie della vegetazione.

Il dragging o metodo del trascinamento è effettuato con un pezzo di tessuto che viene strisciato nell'area da esaminare. Il tessuto deve essere di materiale soffice tipo flanella o mussola ed è usualmente lungo e largo circa 1 m. Sul bordo anteriore del tessuto è fissato un supporto rigido e ai due estremi del bordo una corda; ciò permette di mantenere aperto il tessuto quando è strisciato sulla vegetazione e di poterlo trainare con facilità. Questa tecnica consente di campionare principalmente gli stadi giovanili delle zecche che come detto sono più frequentemente localizzati nella parte bassa della vegetazione.

Dantas-Torres et al. (2013) hanno rilevato che si raccolgono le stesse specie di zecche con entrambe le tecniche, ad eccezione di *R. bursa* e *Haemafysalis concinna* che sono state catturate rispettivamente con il "dragging" e il "flagging".

Questi sistemi di campionamento sono più appropriati nelle aree con una vegetazione bassa e uniforme, ma esistono varianti di questi metodi quando il terreno lo richiede. Ad esempio, per il campionamento in aree con vegetazione molto alta e densa si può utilizzare un lenzuolo tagliato a strisce rettangolari.

In questo modo si può ottenere una stima dell'attività delle zecche e quindi essere in grado di confrontarle con i dati ottenuti in altri studi effettuati in diversi luoghi e periodi di tempo. Inoltre, permettono anche di mettere in relazione i risultati ottenuti con le diverse caratteristiche abiotiche dell'ambiente (EstradaPeña et al., 2013).

Tra le tecniche attrattive a distanza la più utilizzata è fuor di dubbio la trappola a CO_2 costituita da un contenitore termico con alcuni fori nella parte inferiore dove è posta una piattaforma con un nastro adesivo. La neve carbonica (o ghiaccio secco) è posizionata all'interno del contenitore, questa sublimando libera CO_2 che si diffonde attraverso le aperture; questo gas, simulando l'espirato dei mammiferi, attira le zecche che rimangono attaccate al nastro adesivo posto sulla base della trappola. La metodica è consigliata per la cattura di una specie di zecche, infatti risulta essere inefficiente per specie come *Dermacentor variabilis* o l'adulto *Ixodes dammini* (Ginsberg e Ewing, 1989; Sonenshine, 1993). Risulta essere una tecnica macchinosa e dispendiosa a causa della sua produzione, il suo trasporto e la disponibilità della neve carbonica.

Le zecche, come detto in precedenza, per completare il loro ciclo biologico necessitano di fare un pasto di sangue su un ospite; nell'effettuare il pasto di sangue questi artropodi possono danneggiare il loro ospite sia in maniera diretta, infatti spesso sullo stesso animale possono essere presenti anche diverse centinaia di zecche causando una grave azione anemizzante, ma anche, e forse soprattutto, in maniera indiretta, a causa del loro ruolo di vettori di un numero svariato di virus (ad esempio un

Flavivirus responsabile della Tick Born Encephalitis – TBE), batteri (ad esempio *Rickettsia* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l. e *Anaplasma* spp *Francisella tularensis*) e protozoi (ad esempio *Babesia* spp.; *Hepatozoon canis*; *Theileria annae*).

Il genere Anaplasma, appartenente alla Famiglia *Anaplasmataceae* Ordine *Rickettsiales*, comprende sei specie: *A. bovis, A. centrale, A. marginale, A. phagocytophilum, A. platys e A. ovis.*
Anaplasma marginale e *A. phagocytophilum* sono le specie di maggiore importanza epidemiologica (Atif, 2015; Kocan et al., 2015) e sono trasmesse da zecche appartenenti ai generi *Rhipicephalus* spp. e *Ixodes*, rispettivamente. *Anaplasma marginale* causa l'anaplasmosi nei ruminanti (Stuen 2007), mentre *A. phagocytophilum* presenta una vasta gamma di ospiti, tra cui carnivori, ruminanti, roditori, insettivori, uccelli, rettili e persone (Zeman e Pecha, 2008; Stuen et al., 2013) ed è l'agente eziologico di diverse patologie Tick Borne Fever (TBF) e l'anaplasmosi granulocitaria nell'uomo (HGA) (Dugat et al., 2015). Il ciclo biologico di *A. phagocytophilum* è costituito da due fasi riproduttive, di cui una si svolge nei vettori, zecche Ixodidae, e l'altra negli ospiti vertebrati (Rikihisa, 1991).
Durante il pasto di sangue su un ospite infetto, *A. phagocytophilum* raggiunge l'intestino della zecca dove penetra nelle cellule intestinali per replicarsi, quindi per via ascendente si localizza nelle ghiandole salivari da cui raggiunge un nuovo ospite durante il successivo pasto di sangue (Hajdusek et al., 2013). L'interazione *A. phagocytophilum* con il sistema immunitario dell'ospite sembra scatenare un'infezione con produzione di un gran numero di cellule infette sia a livello sistemico che locale (Chen et al., 2012). Una volta raggiunto il circolo ematico il patogeno invade gli eritrociti all'interno dei quali replica.
Nelle zecche è stata messa in evidenza la trasmissione trans-stadiale da larve a ninfe e da ninfe ad adulti; attraverso il pasto di sangue, le zecche si infettano e, nello stadio successivo, possono trasmettere il patogeno ad un altro mammifero (Paddock e Childs, 2003).
Negli ospiti, bovini e ovini, è stata descritta sia una trasmissione transplacentare di *A. phagocytophilum* (Henniger et al, 2013; Reppert et al., 2013), o per contatto diretto e indiretto di liquidi organici come sangue (Annen et al., 2012; Townsend et al., 2014) e secrezioni respiratorie (Zhang et al., 2008).
I segni clinici negli animali adulti variano da abbattimento del sensorio, ipertermia, anoressia, aborti spontanei con possibilità anche di decorso acuto e alta mortalità (Stuen et al., 2013).
Nel cane l'infezione da *A. phagocytophilum* rimane spesso silente, come indicato dall'elevata prevalenza in assenza di segni clinici in aree endemiche (Beall et al., 2008; Foley et al, 2001); la

sintomatologia può essere rappresentata da letargia e febbre, inappetenza o anoressia (Greig et al., 1996; Poitout et al 2005; Kohn et al., 2008).
Nell'uomo la malattia si manifesta con sintomatologia simil influenzale. Si possono riscontrare anche sintomi quali congiuntivite e linfadenopatia (Lotric-Furlan et al 1998; Arnez et al 2001; Bakken e Dumler, 2000; Karlsson et al 2001; Laferl et al 1999), e nei casi più eclatanti si evidenziano polmoniti con presenza di infiltrati a livello polmonare e possibile sintomatologia respiratoria (Karlsson et al 2001). Talvolta, è possibile riscontrare sintomatologia gastroenterica caratterizzata da dissenteria, emesi e dolore addominale (Lotric-Furlan et al 1998; Arnez et al 2001; Petrovec et al., 1997; van Dobbenburgh et al 1999; Oteo et al 2000). Occasionalmente sono segnalate anche epatomegalia e splenomegalia (TylewskaWierzbanowska et al., 2001; Laferl et al 1999).

Borrelia burgdorferi è una spirocheta gram-negativa, agente causale della borreliosi di Lyme (LB), trasmessa all'uomo e agli animali da zecche del genere *Ixodes* spp. (Tälleklint e Jaenson, 1996; Gern e Humair, 2002; Mead, 2015), in particolare *I. pacificus* e *I. scapularis* nel Nord America rispettivamente occidentale e orientale, *I. persulcatus* in Eurasia e *I. ricinus* in Europa. Nelle zecche del genere *Ixodes* è stata dimostrata la trasmissione trans-stadiale, al contrario non ci sono evidenze scientifiche della trasmissione trans-ovarica. Le ninfe assumono un ruolo rilevante nella trasmissione della patologia nell'uomo (Mead, 2015). Al contrario, le zecche adulte non hanno un ruolo importante nel mantenimento dell'infezione in natura, in quanto, normalmente si nutrono principalmente di animali come i cervidi che non sono ospiti competenti di *B. burgodeferi* (Radolf et al, 2012).
Il tempo di incubazione della malattia è variabile, con diagnosi fino a 2 mesi dopo il morso della zecca (Vázquez-López et al, 2015; Vázquez-López et al., 2016). Il rischio di contrarre la malattia, sia per i cani che per l'uomo, è direttamente correlato alla presenza di zecche infette nell'ambiente.
Alcuni animali selvatici, come ad esempio piccoli roditori, uccelli migratori, caprioli, cervi, volpi e ricci (Tilly et al., 2008) assumono grande importanza epidemiologica poiché fungono da serbatoio, garantendo la sopravvivenza di *B. burgdorferi*; al contrario animali domestici come cani, cavalli, ovini e bovini possono essere considerati ospiti occasionali, presentando sintomatologie riconducibili a quelle umane (Littman, 2003).
Borreli burgdorferi penetra attraverso la cute nel sito di puntura della zecca; dopo un periodo di incubazione, che può variare da 3 a 32 giorni, il batterio migra localmente nella cute circostante e si diffonde per via linfatica e produce adenopatia regionale, oppure dissemina per via ematica agli organi.

La malattia di Lyme può manifestarsi in forma acuta o cronica. Nell'uomo clinicamente si possono descrivere 3 stadi, caratterizzati da una differente localizzazione del batterio nei tessuti dell'ospite e con conseguente sviluppo di un diverso tipo di sintomatologia (Bhate e Schwartz, 2011).
Il primo stadio o forma precoce è caratterizzato da un eritema migrante (EM), nel sito in cui la zecca ha inoculato il patogeno (Steere, 2001); inizialmente si ha una macula eritematosa o una papula che può evolvere con formazione di un alone centrale. Solo il 50% degli adulti e il 90% dei bambini presenta il classico EM con alone centrale, rendendolo un rilievo importante ma non fondamentale (Steere, 2001). L'eritema può anche manifestarsi senza la formazione di un alone centrale o può manifestarsi con petecchie (Smith e coll., 2002).
Nel secondo stadio, o forma tardiva, la malattia evolve verso una forma disseminata, caratterizzata da eritemi migranti multipli e coinvolgimento di molti organi, in particolare sistema cardiocircolatorio e nervoso (Kaiser, 1998; Pinto, 2002; Müllegger, 2004). L'eritema può persistere come una placca o un nodulo, che coincide con lo sviluppo di un linfocitoma cutaneo (LCC) (Chodynicka et al., 2000).
Il terzo stadio è caratterizzato unicamente da manifestazioni dermatologiche.
Negli animali, in particolare nei cani, i sintomi clinici riscontrati sono di carattere sistemico tra cui febbre alta, zoppia itinerante, dolore articolare, linfoadenomegalia, anoressia e malessere generale. Tutti i sintomi rispondono alla terapia antibiotica e si riscontrano frequentemente nei cani infetti (May et al., 1990; Levy et al, 1993).

La babesiosi, anche chiamata piroplasmosi, è una patologia che colpisce prevalentemente animali di interesse zootecnico (bovini, ovini, caprini), ma anche animali da compagnia, inoltre è un'importante zoonosi. È una malattia parassitaria sostenuta da emoprotozoi intraeritrocitari del genere *Babesia.*
La famiglia di *Babesiidae* è stata suddivisa in base alle dimensioni in due gruppi: piccole babesie (1-2,5 µm) che comprendono le specie *B. gibsoni*, *B. microti* e *B. rodhaini* e grandi babesie (2.5–5.0 µm) che includono *B. bovis*, *B. caballi*, *B. canis*. Questa classificazione morfologica coincide con la caratterizzazione filogenetica basata sulla comparazione delle sequenze di DNA codificanti per la subunità ribosomiale 18S (Homer et al., 2000). *Babesia* si distingue per la forma variabile, tipicamente piriforme ma che può anche essere rotonda, allungata o a sigaro. Il termine Apicomplexa deriva dal fatto che questi protozoi si caratterizzano per la presenza di un complesso apicale, ovvero un apparato con funzione secretrice localizzato all'estremità anteriore; è costituito dall'anello polare formato dalle roptrie, organelli sacciformi con un lungo collo che si estendono nell'apertura dell'anello polare, e dai micronemi ossia piccole strutture sparse intorno alle roptrie. A

questo livello avviene il riconoscimento dei recettori cellulari dell'ospite. La morfologia di *Babesia* varia anche a seconda dell'ospite che il parassita infetta (Kakoma et al., 1993).

Le infezioni, più frequenti negli animali selvatici, sono considerate una zoonosi emergente (Homer et al., 2000). Al contrario, *Theileria* spp. non è una zoonosi e infetta esclusivamente animali selvatici e domestici, in particolare ruminanti (Homer et al., 2000; Tampieri et al., 2008; Zanet et al, 2014). Attualmente sono state descritte più di 100 specie di *Babesia* che infettano una grande varietà di vertebrati.

Tranne *Babesia meri*, la maggior parte delle specie di *Babesia* sono trasmesse dalle zecche della Famiglia *Ixodidae*.

La trasmissione di questi protozoi è strettamente correlata alla presenza dei vettori specifici, che vivono liberi nell'ambiente e che compiono il proprio ciclo biologico e nutrizionale coinvolgendo un ampio ventaglio di ospiti.

Il ciclo è in larga parte intracellulare e si distingue una fase di sviluppo sessuata (gamogonica) che avviene nel vettore (Homer et al., 2000), ed una asessuata (sporogonica) che si osserva nell'ospite vertebrato.

Il parassita utilizza il globulo rosso come mezzo per passare dall'ospite vertebrato al vettore ematofago (Homer et al., 2000). Gli eritrociti parassitati vengono ingeriti dalla zecca nel momento in cui questa effettua il pasto di sangue e all'interno di questi si iniziano a formare dei nuovi organelli, detti *Strahlenkorper*, che si ritiene siano coinvolti nella fusione dei gameti (Kakoma et al.,1993; Rudzinska et al., 1983); quindi si origina lo zigote, che attraversa la parete intestinale invadendo gli altri tessuti, giunge tramite l'emolinfa nelle ghiandole salivari; si ha quindi la fase di sporogonia con lo sviluppo degli sporozoiti che vengono inoculati durante il successivo morso (Kakoma et al., 1998; Karakashian et al., 1983). Gli sporozoiti si localizzano direttamente nelle emazie in cui avviene la riproduzione asessuata (merogonia) con formazione di merozoiti, cioè, nel globulo rosso avviene la trasformazione in trofozoiti, che si dividono per scissione binaria dando origine alla formazione di merozoiti che possono assumere varie forme (Homer et al., 2000). La differenziazione in merozoiti può portare alla lisi dell'eritrocita. Alcuni trofozoiti, invece, aumentano di dimensioni e dopo essere stati ingeriti da una nuova zecca, nel suo intestino danno origine a gametofiti che, una volta usciti dai globuli rossi, si sviluppano formando dei gameti (Homer et al., 2000).

Il ciclo di *Theileria* spp. è caratterizzato dall'inoculazione di sporozoiti nell'ospite definitivo durante il pasto di sangue. Questi invadono rapidamente i leucociti, dove replicano per schizogonia con produzione di cellule multinucleate. Queste cellule, dette schizonti, si moltiplicano fino alla

differenziazione in merozoiti. Durante la fase intraleucocitaria, il parassita può causare l'attivazione e la proliferazione di leucociti infetti e potendo dividersi contemporaneamente alle cellule infette, può rendere anche le cellule figlie tali (Morrison, 2015). I merozoiti, una volta rilasciati dalle cellule infette invadono gli eritrociti, iniziando così la fase intra-eritrocitaria. Quando un vettore si nutre di globuli rossi infetti, si ha la riproduzione sessuata nell'intestino della zecca (gametogonia) con formazione dello zigote, il quale è in grado di invadere le cellule epiteliali dell'intestino della zecca e differenziarsi in uno zigote mobile che raggiunge le ghiandole salivari, dove esegue diverse moltiplicazioni asessuate (sporogonia) con conseguente formazione di sporozoiti.

Le piroplasmosi rivestono particolare interesse per la gravità delle forme cliniche che possono indurre.

Nell'uomo la babesiosi ha una sintomatologia non specifica. Il paziente può avere febbre, malessere, stanchezza e mioclonie, sudorazione, cefalea, nausea, ecc. (Joseph et al., 2011). Nei cani i principali agenti sono *B. canis* e *B. gibsoni* e gli animali infetti mostrano anoressia, debolezza, piressia e dimagrimento. A volte l'infezione decorre in forma acuta, causando anemia emolitica, ittero, splenomegalia e linfoadenopatia (Sykes, 2014).

Le principali specie di *Babesia* che interessano il bestiame sono *B. bovis*, *B. bigemina* e *B. divergens*; in questi animali si ha anoressia, febbre e pallore delle mucose e in breve tempo finiscono per sviluppare l'anemia; se la malattia si manifesta in una fase subacuta può presentare insufficienza respiratoria; a seconda della specie di *Babesia* coinvolte, la malattia può presentarsi con aborti e manifestazione clinico-neurologiche (Bock et al., 2004).

I cavalli con piroplasmosi manifestano segni clinici come: debolezza, anemia, itterizia e febbre ed occasionalmente aborto (Zobba et al., 2008).

Le *Rickettsie* sono piccoli batteri, coccobacilli, gram negativi, parassiti intracellulari obbligati appartenenti alla classe delle *Alphaproteobacteria* (Gillespie et al., 2008). Appartengono all'ordine *Rickettsiales* che comprende tre famiglie: *Holosporaceae*, *Anaplasmataceae* e *Rickettsiaceae*, di cui *Rickettsia* fa parte (Gillespie et al., 2008).

In Europa, le rickettsiosi sono malattie trasmesse da zecche, che fungono da vettori, ma anche in molte occasioni possono fungere da serbatoio. Le malattie più diffuse sono la febbre bottonosa del Mediterraneo (la così detta "Mediterranean Spotted Fever", FBM) causata da *Rickettsia conorii* e la linfoadenopatia causata principalmente da *Rickettsia slovacca* (Raoult et al., 1986). Recentemente è stato dimostrato che, sebbene *R. conorii* sia considerata il principale agente causale della FBM, ci sono altre specie di *Rickettsia* come *R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. massiliae* e *R. aeschlimannii* che causano una malattia con una sintomatologia ascrivible (Portillo et al., 2009).

Sebbene le rickettsie siano diffuse in tutto il mondo (Raoult and Roux, 1997), alcune specie presentano una localizzazione geografica ben definita, come *R. rickettsii* che è presente in Nord e Sud America (Sexton and Kaje, 2002; Angerami et al., 2006), *R. sibirica* in Eurasia e Asia (Brouqui et al., 2007), *R. australis* in Australia (Graves et al., 2006), *R. japonica* in Giappone (Mahara, 2006). In Europa sono presenti anche le specie patogene *R. helvetica* and *R. slovaca* trasmesse dalle zecche *I. ricinus* e *Dermacentor marginatus*, rispettivamente (Parola and Raoult 2001a; Beninati et al. 2002; Lakos 2002, Sanogo et al. 2003; Beninati et al. 2005). *Rickettsia conorii* è la rickettsiosi più diffusa nell'area del Mediterraneo e l'unica rickettsiosi endemica in Italia.

Vettori di *Rickettsia*, oltre le zecche, sono pulci, pidocchi, mosche bianche, zanzare, pidocchi del libro e acari (Merhej et al., 2014); tuttavia, le *Rickettsie* appartenenti al gruppo della FBM sono associate principalmente alle zecche e quelle del gruppo dei tifoidi alle pulci e pidocchi (Parola et al., 2013). In Europa, è stata confermata la presenza di *Ixodidi* come vettori e serbatoi per la maggior parte delle principali *Rickettsie* patogene (Parola et al., 2013; Portillo et al., 2015). L'infezione della zecca avviene tramite alimentazione (Socolovschi et al., 2009) e la trasmissione può essere interstadiale o transovarica (Parola e Raoult, 2001).

Affinché la zecca si infetti è necessario che nel sangue di un vertebrato, che funga da *reservoir*, siano presenti un sufficiente numero di rickettsie.

Rickettsia rickettsi è stata isolata da diverse specie di piccoli mammiferi come: *Microtus pennsylvanicus, Pitymys pinetorum, Peromyscus leucopus, Sigmodon hispidus, Sylvilagus floridanus, Didelphis marsupialis virginiana, Eutamias amoenus, Lepus americanus e Spermophilus lateralis tescorum* (Socolovschi et al., 2009).

L'uomo è un ospite accidentale e non interviene nella diffusione di questi microrganismi in natura, tranne nel caso del tifo esantematico o epidemico (ET) causato da *R. prowazekii* e trasmesso dal pidocchio *Pediculus humanus corporis*¸ che presenta come principale serbatoio l'uomo (Saah, 2002). Per quanto riguarda i carnivori, i cani sono considerati sentinelle di *R. rickettsii* e *R. conorii* (Nicholson et al., 2010; Eremeeva et al, 2015) mostrando, talvolta, anche una sintomatologia clinica; l'infezione dei cani con altre specie di *Rickettsia* decorre in forma subclinica (Kelly e Mason, 1991; Kelly et al., 1992). Nei gatti invece il loro ruolo nella trasmissione/mantenimento di *Rickettsia* è meno studiato (Reif e Macaluso., 2009).

I vettori di *Rickettsia* si infettano durante i pasti di sangue su ospiti vertebrati positivi, tuttavia le rickettsie, così come le babesie, si diffondono e moltiplicano in tutti gli organi della zecca, compreso le ghiandole salivari e le ovaie permettendo così la trasmissione sia trans-stadiale che trans-ovarica del batterio; pertanto gli artropodi possono essere considerati sia un vettore che serbatoi di *Rickettsia*.

Dopo l'inoculazione in un ospite vertebrato da vettore infetto, le rickettsiae si propagano attraverso il sistema linfatico dell'ospite giungendo fino ai linfonodi, quindi per via ematica giunge tutti gli organi.
La loro patogenesi è caratterizzata da moltiplicazione intracellulare con conseguente lisi (Walker et al., 2003). Il processo fagocitico è caratterizzato dall'adesione di rickettsiae sulla superficie esterna della cellula.
La sintomatologia clinica ha un andamento differente che dipende sia dalla virulenza della specie infettante sia da fattori legati all'ospite (età, sesso, alcolismo e altre malattie preesistenti). Le specie di *Rickettsia* più virulente sono *R. rickettsii* e *R. prowazekii*, che portano ad un tasso di mortalità significativo, a meno che la malattia non venga trattata precocemente nel corso dell'infezione con un efficace antibiotico, in genere la doxiciclina (Parola et al., 2005).
Pertanto, tali organismi svolgano un ruolo fondamentale nella trasmissione e perpetuazione di importanti patologie non solo all' interno di popolazioni di animali della stessa specie, ma anche tra animali di specie differenti e, avvolte, anche all'uomo.

Di fondamentale importanza è la conoscenza non solo dei parassiti in se ma anche del loro ciclo biologico, dell'ambiente e condizioni climatiche ideali per il loro sviluppo, delle diverse specie parassitate, siano esse selvatiche o domestiche, e delle loro possibili interazioni e delle potenziali patologie che potrebbero essere trasmesse. Vista la severità delle VBDs di cui gli ixodidi rappresentano i principali se non gli unici vettori, il consistente numero di casi di malattia riscontrati nel territorio europeo e i continui cambiamenti climatici e antropici è facile intuire quanto sia importante condurre costantemente piani di monitoraggio di questi artropodi vettori e dei patogeni da essi trasmessi. Da questi presupposti nascono gli scopi del presente lavoro che sono stati quelli di condurre un piano di monitoraggio all'interno di tre differenti ecotipi nella Riserva Naturale Orientata (R.N.O.) del Bosco della Ficuzza, un'area boschiva che si espande per circa 7000 ettari in provincia di Palermo, mettere in correlazione la presenza e l'abbondanza degli ixodidi campionati con le principali variabili metereologiche, le metodiche di campionamento utilizzate. Inoltre, gli esemplari campionati sono stati analizzati con metodica PCR per la ricerca di patogeni.

2. Materiali e metodi

Il monitoraggio ambientale degli ixodidi è stato condotto all'interno della R.N.O. del Bosco della Ficuzza (37°52'47" N – 13°22'54" E, 703; 800 m s.l.m.), un'area naturale protetta situata nei

comuni di Corleone, Godrano, Marineo, Mezzojuso e Monreale, nella città metropolitana di Palermo che è stata istituita nel luglio del 2000.

La Riserva copre un territorio complessivo di circa 7.398 ha (circa 5334 ha di riserva vera e propria e 2064 ha di pre-riserva). L'area è dominata dal massiccio della Rocca Busambra (1613 m s.l.m.) che delimita a sud il territorio della riserva, a nord del quale sorge il Bosco della Ficuzza e il contiguo Bosco del Cappelliere, due estese aree di foresta mediterranea sempreverde. La riserva è ricca di corsi d'acqua a carattere torrentizio, che formano diversi laghetti naturali, i cosiddetti gorghi. Sul confine nord-occidentale della riserva si trova infine il Lago Scanzano un bacino artificiale ottenuto per sbarramento del torrente Eleuterio.

La riserva tutela l'area boschiva più vasta della Sicilia occidentale; ospita numerose specie di *Quercus*, tra cui il leccio (*Quercus ilex*), la sughera (*Quercus suber*), la roverella (*Quercus pubescens*) e l'endemico cerro di Gussone (*Quercus gussonei*). Altre specie arboree presenti sono il frassino (*Fraxinus excelsior*) e il castagno (*Castanea sativa*). La vegetazione arbustiva è rappresentata dal biancospino (*Crataegus monogyna*), dal pungitopo (*Ruscus aculeatus*), dall'asparago spinoso (*Asparagus acutifolius*), dalla rosa di San Giovanni (*Rosa sempervirens*), e dalla ginestra spinosa (*Calicotome spinosa*). Dal punto di vista faunistico è molto ricco, infatti la riserva ospita l'80% delle specie animali, tra uccelli e fauna selvatica, dell'intera regione. Tra i grandi mammiferi oggi si ritrovano il daino ed il cinghiale (*Sus scrofa*), inoltre è ampiamente documentata la presenza di volpi (*Vulpes vulpes*), lepri (*Lepus corsicanus*), conigli selvatici (*Oryctolagus cuniculus*), martore (*Martes martes*), istrici (*Hystrix cristata*) e ricci (*Erinaceus europaeus*).

Per la realizzazione dello studio sono stati selezionati tre siti all’interno R.N.O. (Figura 4); i siti prescelti rappresentavano per le caratteristiche ambientali e faunistici dei microhabitat differenti tra di loro. La scelta dei siti è stata fatta in modo da rappresentare tutte le tipologie florofaunistiche presenti nell’R.N.O. del Bosco di Ficuzza.

Figura 4. Aree di studio in cui è stato condotto il monitoraggio dell'ixodido-fauna.

Il sito 1 mostrava principalmente le caratteristiche dell'ambiente sottoboschivo in particolare era caratterizzato da leccio, roverelle e rare macchie di pungitopo (Figura5A); in quest'area era comune era evidente la presenza di tracce di volpi, lagomorfi e micromammiferi, inoltre erano presenti traccie di cinghiali.

Il sito 2 al contrario era caratterizzato dalla presenza di numerosi alberi di sughero e un'abbondante vegetazione arbustiva costituita principalmente da biancospini, agrifogli e ginestre spinose; in quest'area era possibile osserva la presenza di daini e volpi (Figura5B). Inoltre, nell'area antistante il sito di campionamento è presente un invaso idrico per l'irrigazione, lo stesso veniva utilizzato da molti animali come abbeveratoio (Figura 4).

Il sito terzo sito era quello più prossimo alla strada carrabile, costituito da un prato pascolativo con la presenza di pochi alberi di sughero. Nel sito normalmente era presente una cospicua mandria di bovini che vi pascolavano e vi bivaccavano durante le ore diurne (Figura5C).

Figura 5. A) Sito 1; ambiente sottoboschivo B) sito 2, sughereta; C) sito 3 pascolativo per bovini.

Il campionamento è stato condotto ogni 28 giorni (±2 giorni) a partire dal mese di gennaio fino a luglio 2020 per un totale di 6 campionamenti (il mese di marzo non è stato possibile effettuare il campionamento a causa del Lockdown dovuto alla pandemia COVID-19). I differenti siti sono stati campionati durante i diversi mesi dello studio sempre negli stessi orari e seguendo il medesimo ordine.

In ciascun sito, una squadra costituita da tre operatori, due forniti di bandiere (tecnica del flagging, Figura 6A) ed un di una coperta (tecnica del dragging, Figura 6B) percorrevano per 30 minuti (±2 minuti) consecutivi in maniera casuale l'area di campionamento; unica premura di ciascun operatore era quella di mantenere una distanza di almeno 5 metri dall'altro.

Figura 6. A) Tecnica del flagging o della bandiera; B) Tecnica del dragging o della coperta; C) Zecca imbrigliata nel tessuto della bandiera.

Le bandiere, delle dimensioni di 100X100 cm, e la coperta, della misura di 100X150 cm, erano costituite da un tessuto bianco resistente ma morbido tale da rendere difficoltoso l'allontanamento delle zecche dopo che queste vi erano salite (Figura 6C).

Le zecche ritrovate sulle bandiere o sulla coperta venivano prelevate con delle pinzette e conservate in provette contenenti etanolo 70% divise per metodica e sito di campionamento (Figura 7A).

Per non creare *bias* nella durata della sessione di 30 minuti di campionamento per esempio nel caso in cui fossero stati rinvenuti numerosissimi stadi giovanili (nello specifico larve Figura 7B), per non ridurre eccessivamente il tempo di campionamento, gli artropodi venivano lasciati sulla bandiera/dragging e rimossi solamente alla fine della sessione.

Figura 7. A) Provetta contente diversi stadi giovanili di zecche; B) Numerose larve di ixodidi attaccate alla bandiera.

Dopo ciascun campionamento le zecche sono state trasportate presso il laboratorio di parassitologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie, contate divise per sesso e stadio di sviluppo e classificate a livello di genere e specie attraverso l'utilizzo di chiavi morfologiche (Manilla 1998; Pérez-Eid, 2007; Dantas-Torres et al., 2013).

Dopo la classificazione gli adulti mantenuti in eppendorf in base al sesso, giorno e al sito di campionamento, sono stati inviati presso i laboratori di parassitologia del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Bari. In questa sede, le zecche adulte sono state analizzate con metodica PCR per confermare la classificazione morfologica effettuata, inoltre gli stessi esemplari sono stati analizzaiti come descritto da Gubbeles et al., 1999 per la ricerca di patogeni quali:

Per il rilevamento dei dati meteo è stato richiesto l'accesso ai dati raccolti dalle stazioni del Servizio Informativo Agrometeorologico Siciliano (SIAS) poste delle pertinenze della R.N.O. del Bosco della Ficuzza, in particolare sono stati presi in considerazione i dati della stazione di Monrale Bifarera che come si può osserva in figura 8 era nelle dirette vicinanze dei siti di campionamento.

Figura 8. Posizione della stazione del Servizio Informativo Agrometeorologico Siciliano di Monreale Bifarera.

Le variabili meteo prese in considerazione nel presente elaborato erano riferite al giorno di campionamento e in particolare erano la temperatura giornaliera media (°C), l'umidità relativa media (%), il *dew point* o punto di rugiada (°C) e *sunlight duration*, inteso come il periodo di irraggiamento solare giornaliero ed espresso in minuti.

Per ciascun sito è stato calcolato il numero totale delle zecche campionate e il numero totale di specie. Per individuare eventuali differenze statisticamente significative tra le metodiche di campionamento è stato utilizzate il *t*-test. Per verificare eventuali differenze statisticamente significative negli stadi di sviluppo campionati (larve, ninfe ed adulti) nei vari mesi e siti di campionamento è stata utilizzata l'analisi della varianza ad una via (ANOVA). Le potenziali correlazioni tra le variabili meteorologiche considerate, il numero totale di zecche campionate, le differenti specie campionate e i differenti stadi di sviluppo osservati, sono state studiate tramite il coefficiente di correlazione lineare di Person (R). Le analisi statistiche sono state condotte mediante l'ausilio del software GraphPad Prism v. 8.00 per mac os (GraphPad Software Ltd., CA, USA), le differenze sono state considerate significative per valori di $P<0,05$.

3. Risultati

Sono stati condotti 6 campionamenti nel periodo compreso tra gennaio e luglio 2020, per un totale di 9 ore di campionamento, 3 ore per ciascun sito, con lo sforzo di cattura di 3 operatori (27 ore di campionamento totali, 9 per sito). Sono state raccolte 5058 zecche (4261 larve, 692 ninfe, 105 adulti, di cui 47 maschi e 58 femmine), di queste 1264 sono state campionate tramite metodica

dragging (1141 larve, 108 ninfe, 15 adulti, di cui 3 maschi e 12 femmine) e 3794 tramite metodica flagging (3148 larve, 556 ninfe, 90 adulti, di cui 44 maschi e 46 femmine), in tal modo le differenze nell'efficia di campinamento delle due metodiche risulta essere statisticamente significative(P<0,0001). Tuttavia, va ricordato che lo sforzo di cattura con la metodica flagging era doppio, pertanto, assumendo che le due bandiere abbiano campionato lo stesso numero di soggetti e quindi confrontando una sola badiera al dragging le differenze tra le due metodiche non sono statisticamente significative (P=0.3308). Inoltre, non sono presenti differenze statisticamente sigificative tra le due metodiche di campionamento per quanto riguarda i diversi stadi di sviuppo campionati (P=0.2881).

Il grafico 1 rappresenta le catture nei vari mesi di campionamento nei tre siti di studio. In tabella 1 vengono ripirtate le catture nei vari mesi di campionamento nei diversi percorsi e i rispettivi stadi di sviluppo identificati.

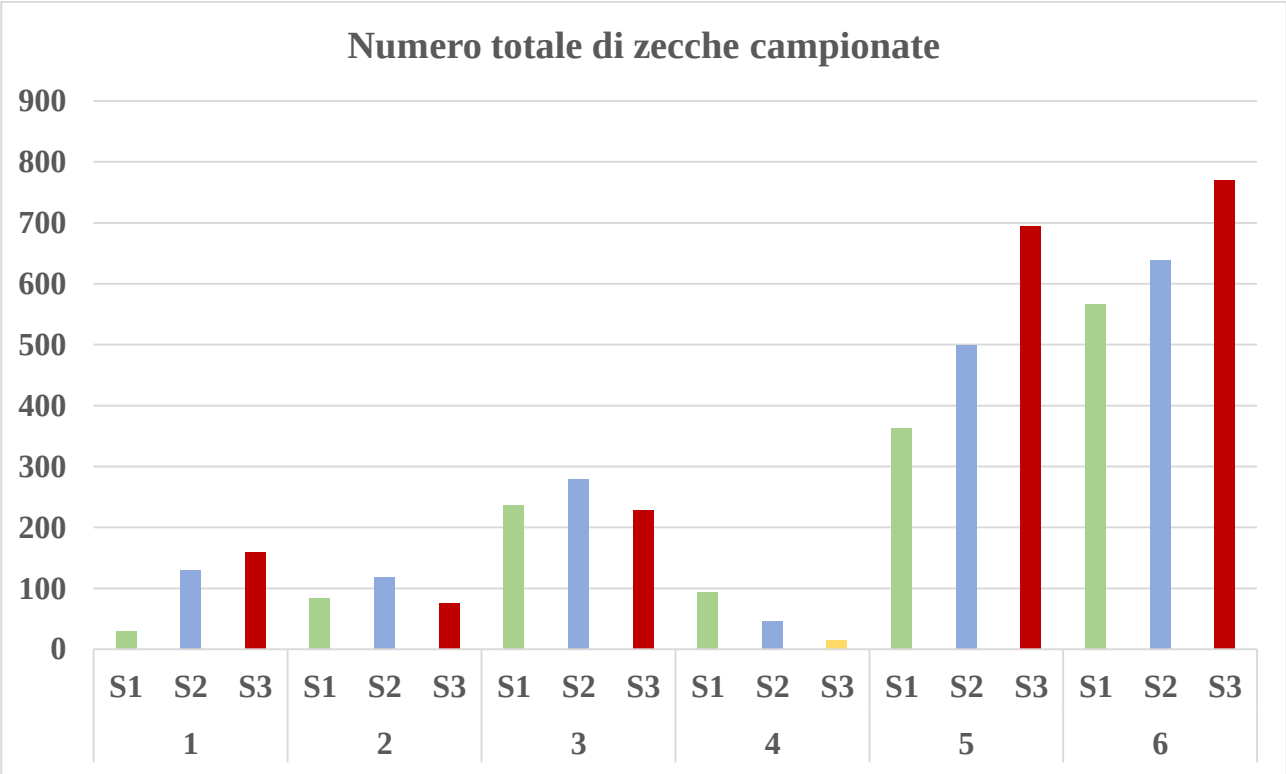


Grafico 1. Numero di zecche campionate nei sei mesi di durata dello studio con metodica dragging e flagging nei tre siti.

Campionamento	Sito	N°zecche totale	Adulti	Ninfe	Larve
1	S1	29	4	23	2
	S2	129	10	96	23
	S3	159	17	138	5
2	S1	84	1	73	10
	S2	119	11	86	22
	S3	75	4	36	35
3	S1	236	7	55	174
	S2	234	2	49	183
	S3	228	1	40	187
4	S1	93	2	13	78
	S2	47	3	10	34
	S3	14	1	5	8
5	S1	363	10	15	338
	S2	579	1	10	568
	S3	694	9	8	677
6	S1	567	9	2	556
	S2	639	2	0	637
	S3	769	11	1	757

Tabella 1. Numero di zecche e diversi stadi di sviluppo campionati nei sei mesi di durata dello studio con metodica dragging e flagging nei tre siti.

Il 97,92% (4953/5058) dei soggetti campionati erano stadi giovanili, in particolare 4261erano larve (84,24%) e 692 erano ninfe (13,68%); mentre gli adulti costituivano 2,08% (105/5058) della popolazione (Grafico 2A). Questo proporizione tra i diversi stadi di sviluppo si osserva in tutti i percorsi e durante tutto l'arco dello studio (Grafico 2B).

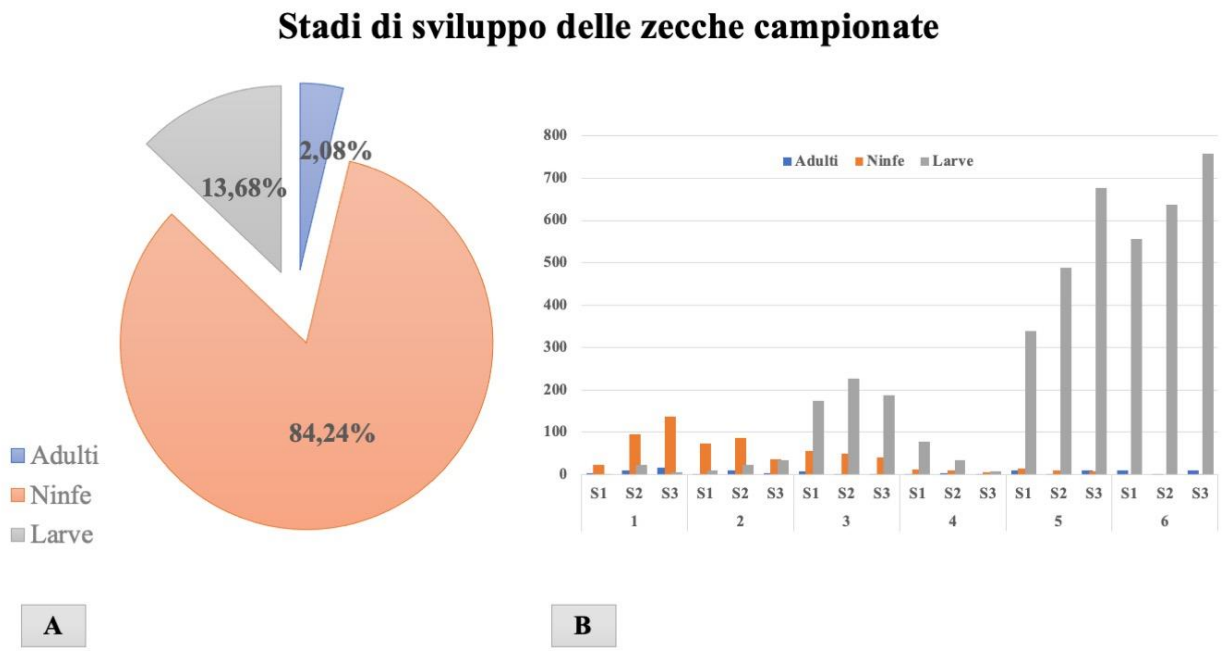


Grafico 2. A) Composizione della popolazione di ixodidi campionati per quanto concerne gli stadi di sviluppo e B) in relazione ai mesi di campinamento e ai diversi siti di studio.

In tutti i campionamenti sono stati raccolti degli ixodidi, ed un elevato numero di esemplari è stato campionato durante tutto il periodo di studio con l'eccezione del mese di maggio (campionamento numero 4), sebbene nei mesi estivi il numero delle zecche sia stato significativamente maggiore. In tutti i campionamenti sono stati prelevati sia adulti e in maggior misura, come si osserva dal grafico 2A, stadi giovanili. L'abbondanza di adulti è stata costante in tutti e sei i campionamenti; la presenza delle ninfe invece decresce lungo il periodo di studio (Grafio 3); in particolare nei primi due campionamenti, i mesi di gennaio e febbraio, il numero delle ninfe è maggiore di quello degli adulti e delle larve, per poi decrescere constantemente. L'abbondanza delle larve ha fatto registrare un primo picco nel campionameto 3, decresce notevolmente nel camponamento 4 e risale nei campionamenti 5 e 6 (Grafico 3).

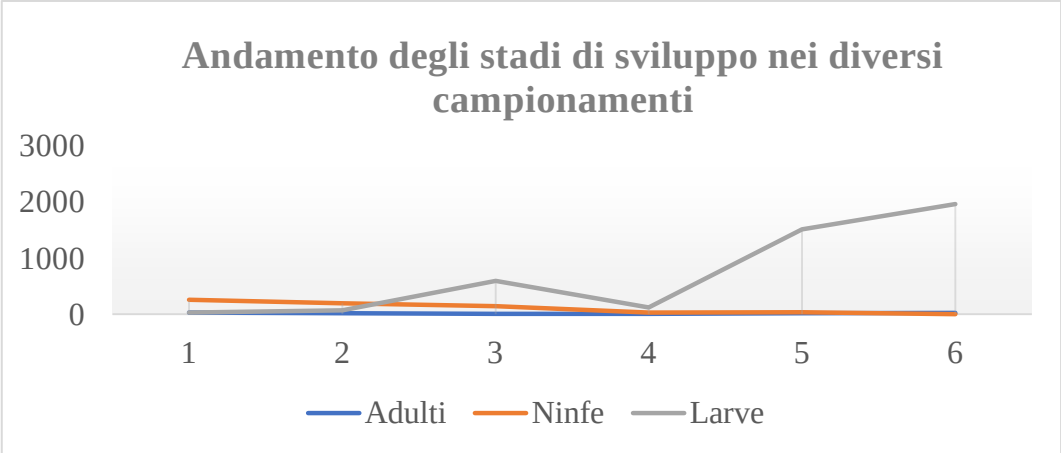


Grafico 3. Andamento degli stadi di sviluppo nei diversi campionamenti

Sono state classificati 5 diversi generi di ixodidi e 7 specie. La specie più comunemente riscontrata è stata *I. ricinus,* seguita da *Haemophisalis puntacta*. Inoltre, sono stati campionati, in ordine decrescente, esemplari appartenti alle specie *Rhipicephalus bursa* (n=99; 42 adulti, 21 femmine e 21 maschi, e 57 larve), *Hyalomma lusitanicum* (20 larve nel mese di luglio), *I. frontalis* (3 larve nel mese di gennaio), *Dermacentor marginatus* (2 femmine a gennaio e 2 maschi a febbraio) e *R. turanicus* (1 adulto femmina nel mese di giugno). Tuttavia, queste specie messe insieme costituiscono il 2% della popolazione campionata e pertanto non si è ritenuto opportuno condurre analisi statistiche su esse.

In figura 8 è riportata la presenza delle diverse specie di zecche (e i relativi stadi di sviluppo) nei vari mesi di campionamento. Come si può vedere tutti gli stadi di *I. ricinus* sono presenti in tutti i mesi di campionamento, mentre *I. frontalis* ed in particolare le larve sono state ritrovate solamente nel mese di gennaio. Inoltre, nei primi due campionamenti sono stati osservati individui adulti di *D. marginatus* e *Hae. Puntacta*; larve di quest'ultima specie sono state osservate nei campionameti 4, 5 e 6. Per quanto riguarda le riphicephalinae, è stato osservato un solo adulto di *R. turanicus* nel mese di giugno; larve di *R. bursa* sono state osservate nei primi 3 campionamenti, mentre individui adulti sono stati campionati nei mesi di giugno e luglio.

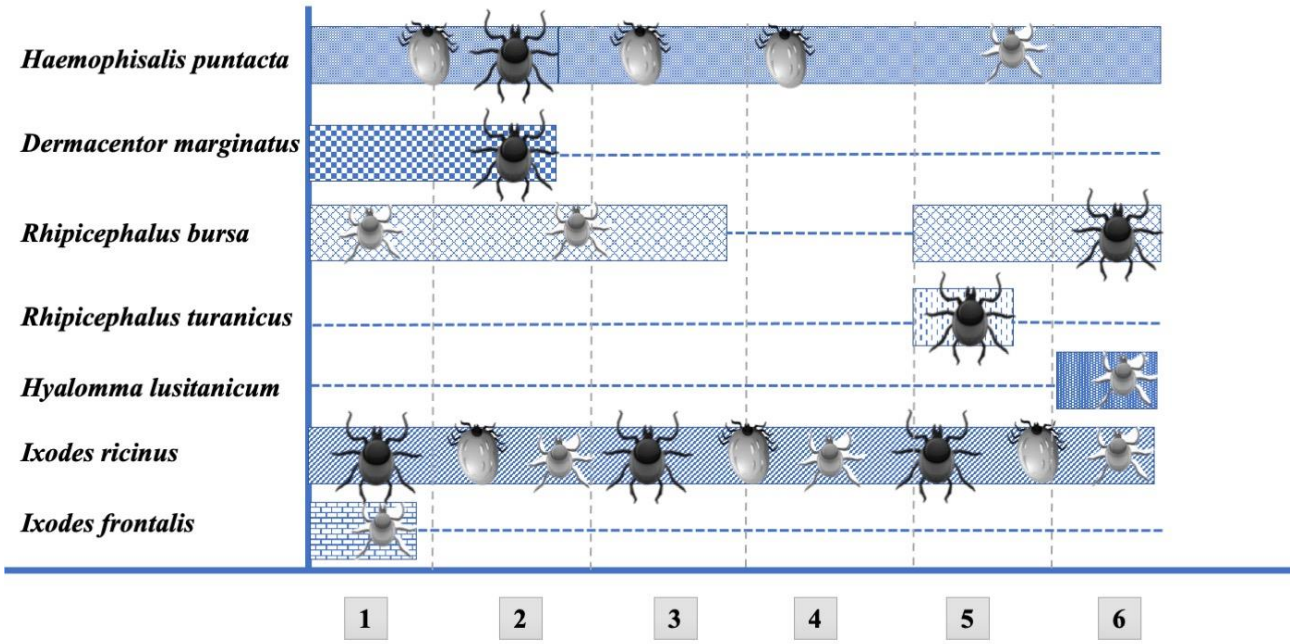
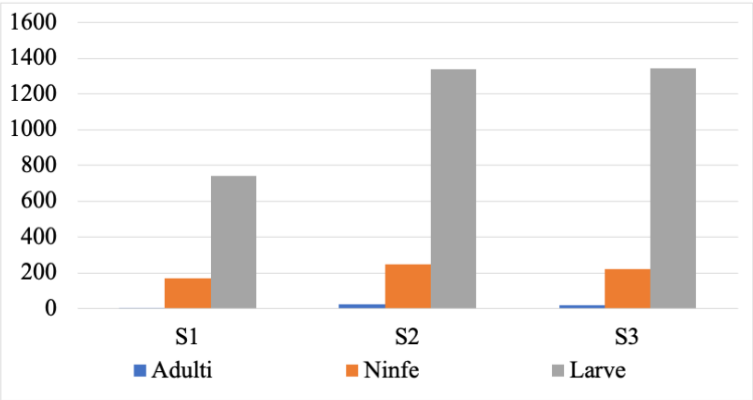


Figura 8. Presenza delle diverse specie di zecche (e i relativi stati di sviluppo) nei vari mesi di campionamento.

Per quanto riguarda la specie più rappresentata in questo studio, *I. ricinus*, sono stati identificati 4116 (52 adulti, 23 femmine e 29 maschi, 636 ninfe e 3428 larve) su 5058 zecche campionate rappresentando così lo 81,38% della popolazione di studio. Non è stata osservata nessuna differenza statisticamente significativa tra metodi di cattura impiegati. Questa specie è stata campionata durante tutto il periodo di studio, ed il numero di larve campionate è stata significativamente maggiore rispetto a quello degli adulti e delle ninfe (P<0,0001). La presenza di *I. ricinus* è stata osserva in tutti e tre i siti di studio (Grafico 5), non sono state osservate differenze statisticamente significative (P=0.88).



	Adulti	Ninfe	Larve
S1	7	169	743
S2	24	247	1339
S3	21	224	1346

Grafico 5. Numero e stadi di sviluppo di *Ixodes ricinus* nei tre siti di studio.

Lo studio delle variabili meteorologiche ha consentito di mettere in evidenza che la presenza di *I. ricinus* nell'area di studio era in correlazione con queste; in particolare, è stato notato che fattori limitanti per la presenza degli adulti e delle ninfe sono le temperature elevate (*P*=0,0095), la riduzione dell'umidità relativa media (*P*<0,0001), valori di dew point maggiori di 10°C (*P*=0,0022) e l'aumento delle ore di irradiazione solare (*sun-light* duration, *P*=0,0035).

Al contrario l'aumento delle ore di luce è positivamente correlato con la presenza delle larve (*P*=0,0068), infatti al crescere della durata della giornata aumenta il numero di larve.

In totale sono stati campionati 841 (16,63%) zecche classificate come *Hae. punctata;* nello specifico sono stati campionati: 5 adulti (2 femmine e 3 maschi) nei mesi di gennaio e febbraio, 28 ninfe, uniformente suddivise nei vari mesi di campionamento e 808 larve campionate esclusivamente nei mesi di giugno (n=16) e di luglio (n=792). Non sono state osservate differenze statisticamente signifcative tra il dragging e il flagging, con l'eccezione delle ninfe di *Hae. Punctata*, per cui quest'ultima metodica si è dimostrata significativamente più efficace (*P*= 0,0014).

È stata osservata una forte associazione tra la presenza di quest'ultima specie e le variabili metereologiche considerate; in particolare la presenza di adulti e di ninfe è correlata con l'umidità relativa media, valori inferiori al 80% limitano la cattura di questo stadio (r= 0,9468; *P<0,0001*) e con il dew point, valori inferiori ai 10°C ne limitano la presenza (r= 0,94635; *P<0,0001*). Al contrario la presenza delle larve è correlata con diminuzione dell'umidità relativa e l'aumento della temperatura, infatti sono maggiormente presenti nel mese più caldo (luglio).

La PCR effetuata sugli adulti campionati ha confermato l'identificazione morfologica, in particolare sono stati osservati *I. ricinus* (GeneBank Accession: MN947213.1; Identity 100%), *Hae. Punctata* (GeneBank Accession: MG021187.1; Identity 100%), *D. marginatus* (GeneBank Accession: MN907446.1; Identity 99.65%), *R. bursa* (GeneBank Accession: MT302761.1; Identity 100%) e *R. turanicus* (GeneBank Accession: KY583080.1; Identity 100%).

Sono stati testati per la ricerca di patogeni 84 adulti (51 *I. ricinus*, 23 *R. bursa*, 5 *Hae. Punctata*, 4 *D. marginatus* e 1 R. *turanicus*). Di questi 10 sono risultati positivi (Tabella 2), 11,9%. In particolare, 8 esemplari di *I. ricinus* su 51 analizzati (15,68%) sono risultati positivi: 4 a *R. monacensis* (GeneBank Accession: KU586332.1; Identity 100%), 3 a *R. helvetica* (GeneBank Accession: KU310588.1; Identity 99.72%) e 1 a *Candidatus Cryptoplasma* (GeneBank Accession: MG924904.1; Identity 100%). Dei 5 esemplari di *Hae. punctata* uno è risultato positivo ad *A. bovis* (GeneBank Accession: MK028574.1; Identity 100%). Dei 4 *D. marginatus* analizzati, in fine, uno è risultato positivo per il complesso *Rickettsia heilongjiangensis/raoultii/slovaca* (GeneBank Accession: MF002529.1; Identity 98,75%). *Rickettsia heilongjiangensis/raoultii/slovaca* è stata osservata nel S2, *R. helvetica* in S2 e S3, mentre *R. monacensis* in tutti i siti. *Anaplasma bovis* è stato osservato in S1. Degno di nota è il ritrovamento di *Candidatus Cryptoplasma*.

Inoltre, il protobatterio *Midichloria mitochondrii* è stato osservato in 4 *I. ricinus* campionati nel mese di gennaio nei siti 2 e 3.

Tick ID	Camp.	Sito	Specie	Identificatione	GenBank Accession	Identity
TF0014	1	S2	*D. marginatus*	*R. heilongjiangensis/raoultii/slovaca*	MF002529.1	100,00%
TF0018	1	S3	*I. ricinus*	*R. monacensis*	KU586332.1	100,00%
TF0019	1	S3	*I. ricinus*	*R. helvetica*	KU310588.1	99,72%
TF0021	1	S3	*I. ricinus*	*R. monacensis*	KU586332.1	100,00%
TF0030	1	S3	*I. ricinus*	*R. helvetica*	KU310588.1	99,72%
TF0034	2	S2	*I. ricinus*	*R. monacensis*	KU586332.1	100,00%
TF0037	2	S2	*I. ricinus*	*R. helvetica*	KU310588.1	99,72%
TF0051	3	S1	*I. ricinus*	*R. monacensis*	KU586332.1	100,00%
TF0036	1	S2	*I. ricinus*	*Candidatus Cryptoplasma*	MG924904.1	100,00%
TF0053	3	S1	*Hae. punctata*	*A. bovis*	MK028574.1	100,00%

Tabella 2. Ixodidi adulti risulati positivi alla PCR per la ricerca di patogeni nei diversi siti di studio.

4. Discussione

Nel presente studio è stata investigata la presenza, l'abbondanza e la bio-diversità delle specie di zecche e dei loro stadi in 3 habitat che rappresentano la R.N.O del Bosco della Ficuzza, creando una correlazione tra esse con le principali variabili meteorologiche.

È stata riscontrata nell'area di studio una consistente presenza di ixodidi, sia quantitativamente che in termini di diversità di specie. I risultati di questo studio hanno messo in evidenza come la presenza di zecche nella riserva è costante sia nei mesi estivi che in quelli invernali, rappresentando un pericolo sia per la fauna selvatica che per gli animali di interesse zootecnico che sono presenti nella Riserva, così come per le persone che accedono nell'area naturalistica (i.e., guardacaccia, escursionisti, pastori, forestali o personale della R.N.O.).

Come già detto è stata osservata una variegata diversità di specie; nello specifico sono stati osservati cinque differenti generi e sette specie di ixodidi. Tuttavia, tale biodiversità non è correlata con il numero di esemplari campionati. Infatti, sebbene buona parte delle zecche sia stata raccolta nei mesi estivi, lo stesso numero di specie è stato osservato (sebbene con combinazioni di specie differenti) durante i campionamenti condotti nei mesi invernali.

In uno studio condotto in Basilicata è stata riscontrata una diversità di specie similare (Dantas-Torres e Otranto 2013), in particolatre sono stati riscontrati unicamente tre generi, *Dermacentor spp.*, *I. ricinus* e *Rhipicephalus spp*. In altri studi simili condotti in Sicilia (Napoli et al., 2011) la diversità parassitaria è stata notevolmente inferiore. Le specie campionate erano significativamente differenti e principalemente rappresentate da *Hyalomma lusitanicum* seguita da *Haemophysalis inermis e R. sanguineus*.

In altri monitoraggi ambientali, condotti in regioni del centro e del nord Italia, è emersa una diversità di specie inferiore: in due monitoraggi condotti in Emilia-Romagna e Toscana sono state catturate esculisivamente *I. ricinus e Hae. puntacta* (Curioni et al., 2004; Maioli et al., 2012).

È importante notare che, in studi condotti nell'Europa continentale o in centro-nord Italia (Manelli et al., 1997; Hudson et al., 2001) la presenza di ixodidi era osserva maggiomente, se non unicamente, nei mesi primaverili o estivi, contrariamente, nel presente studio, così come in altri studi condotti nel sud Italia, la presenza di zecche nell'ambiente è costante durante tutto il corso dell'anno (Dantans-Torres e Otranto, 2013). Nel presente elaborato, le medesime specie sono state trovate in tutti i siti, sebbene con intensità differenti. Va ricordato che le variabili pedoclimatiche dei siti esaminati erano tra di loro molto simili e la costante presenza di animali selvatici li accomunava.

È degno di nota il ritrovamento di *I. ricinus*, perché ad oggi era stata riscontrata occasionalmente su animali da reddito (Blanda et al., 2017; Torina et al., 2010) o in gatti (Pennisi et al., 2015), mentre

questo elaborato rappresenta il primo report sull'ecologia di *I. ricinus* in Sicilia. Ciò è testimoniato dalla presenza di tutti i suoi stadi di sviluppo nei campionamenti, confermando la presenza di una popolazione stabile. Inoltre, a differenza di altre regioni del centro (Curioni et al., 2004; Maioli et al., 2012) e del sud Italia (Basilicata, Dantas-Torres e Otranto 2013) la presenza di tutti gli stadi di sviluppo di *I. ricinus* è stata descritta sia nel periodo invernale che estivo.

La presenza di grassi mammiferi selvatici, come i daini e i cinghiali, ha significativamente influenzato la diversità di specie; infatti, sia *I. ricinus* sia *Hae. Punctata*, le specie più rappresentate in questo studio, sono associate alla presenza di questi animali (Rizzoli et al., 2009; Carpi et al., 2008; Jensen et al., 2000). Anche la presenza delle altre specie ritrovate, è legata alla presenza di animali selvatici. Infatti, la presenza e l'abondaza di *R. bursa* correlata alla presenza di volpi o martore, così come quella di *D. marginatus* (Lorusso et al., 2011).

Pertanto, si può dedurre che lo sviluppo di ixodidi è fortemente influenzato dalla disponibilità di ospiti, come ampiamente dimostrato in leteratura (Overzier et al, 2013), tuttavia i risultati ottenuti nel presente studio confermano che per una piena comprensione della distribuzione degli ixodidi anche le meteorologiche devono essere considerate.

Infatti, si è notato come le elevate temperature, la riduzione di umidità, valori di dew point maggiori di 10°C e l'aumento della sun-light duration, hanno influenzato negativamente la presenza di stadi adulti e di ninfe di *I. ricinus*, come d'altronde osservato da altri (Dantas-Torres e Otranto 2013).

Ogni specie di ixodide e, anche ogni suo stadio in un determinato habitat, può trovare una "nicchia climatica" preferenziale (Estrada-Pena˜ et al., 2012) durante una stagione specifica, con una combinazione di fattori (ad esempio, condizioni meteoreologiche e ambientali adeguate) associati alla presenza di ospiti idonei che faciliteranno l'attività, lo sviluppo e la riproduzione (Dantas-Torres et al. 2013). Nell'area oggetto di studio sembra che *I. ricinus*, specie fino ad ora descritta nel territorio siciliano solamente occasionalmente, si sia ampiamente adattata all'ecotipo studiato in questo elaborato; tuttavia ulteriori studi sono necessari per chiarire al meglio l'ecologia di questa specie.

Infine, è importante ricordare che le stime della diversità e dell'abbondanza delle specie di zecche potrebbero essere influenzate in funzione dei metodi di raccolta (Schulze et al., 1997), anche se nel nostro studio questa variabile non ha influito, se non per quanto concerne le ninfe di *Hae. puntacta.*

Certamente, il successo della raccolta di diverse specie di zecche e fasi di sviluppo, dipende anche dalla loro disponibilità in base alla vegetazione, anche se durante la raccolta dei dati le zecche attive sono state trovate durante tutto l'anno.

È importante notare che la presenza di zecche attive in tutte le stagioni può avere implicazioni in termini di trasmissione di agenti patogeni agli animali e anche agli esseri umani. (Dantes- Torres et

al. 2013). Di notevole interesse sono i risultati ottenuti dalla ricerca dei patogeni, infatti, una rilevante percentuale di zecche adulte (i.e., 11, 9%) è risultata positiva alla presenza di patogeni. Tale positività è significativamente più elevata rispetto a quella riscontrata in uno studio precedentemente svolto nella stessa regione (Napoli et al., 2011) o in altri studi simili condotti su zecche campionate (Barandika et al., 2008). Tuttavia, la percentuale di *I. ricinus* positive a Rickettisia è similare a quella osservata nella stessa specie in Germania (Overzier et al., 2013) e in Spagna in *Hyalomma lusitanicum* (Toledo et al. 2009).

Nelle zecche analizzate in questo studio sono state riscontrate due differenti specie di Rickettisie appartenti al Rickettisie spotted fever group (SFG), in particolere*: R. helvetica* comunemente associata a *I. ricinus* (Parola et al., 2005) e già descritta in Italia (Beninati et al., 2002); *R. monacensis,* anche essa associata ad *I. ricinus* (Simser et al., 2002; Sréter-Lancz et al., 2005; Dobler et al., 2009), e recentemente descritta in Italia (Madeddu et al., 2012). Per le nosre migliori conoscenze il presente è da considerarsi il primo report di *R. monacensis* in Sicilia. Infine, di notevole interesse è il ritrovamento di *Candidatus Cryptoplasma*, batterio parassita della lucertola verde, *Lacerta viridis* (Kočíková et al., 2018), trasmesso da *I. ricinus*; mai stato descritto nel territorio nazionale, pertanto questa rappresenta la sua prima segnalazione in Italia e una delle poche al mondo (Kočíková et al., 2018).

5. Bibliografia

1.Annen, K., Friedman, K., Eshoa, C., Horowitz, M., Gottschall, J., Straus, T. (2012). Two cases of transfusion-transmitted Anaplasma phagocytophilum. American Journal of Clinical Pathology, 137(4), 562- 565.

2.Angerami RN, Resende MR, Feltrin AF, Katz G, Nascimento EM, Stucchi RS, Silva LJ (2006) Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil: clinical aspects.. Ann N Y Acad Sci. 1078:252-4

3.Alonso-Carné, J., Garcia-Martin, A., Estrada-Peña, A. (2016). Modelling the phenological relationships of questing immature Ixodes ricinus (Ixodidae) using temperature and NDVI data. Zoonoses and Public Health, 63(1), 40-52.

4.Anderson J. F., Magnarelli L.A. (2008): Biology of Ticks. Infect Dis Clin North Am, 22: 195-215.

5.Arnez M, Petrovec M, Lotric-Furlan S, Zupanc TA, Strle F. (2001): First European pediatric case of human granulocytic ehrlichiosis. J Clin Microbiol; 39: 4591–4592.

6.Atif, F. A. (2015). Anaplasma marginale and Anaplasma phagocytophilum: rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. Parasitology Research, 114(11), 3941-3957

7.Bakken J.S., Dumler J.S. (2000): Human granulocytic ehrlichiosis. Clin. Infect. Dis., 31(2): 554-560

8.Barandika J. F., Hurtado A., Garcia-Sanmartrin J., Juste R. A., Anda P., Garcia-Perez A. L. (2008). Prevalence of tickborne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. Vector Borne Zoonotic Dis. 8, 829–83510.1089/vbz.2008.0023

9.Barandika, J. F. (2010). Las garrapatas exófilas como vectores de agentes zoonóticos: Estudio sobre la abundancia y actividad de las garrapatas en la vegetación, e investigación de la presencia de agentes patógenos en garrapatas y micromamíferos. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de León. Universidad de León.

10.Beall M. J., Chandrashekar R., Eberts M. D., Cyr K. E., Diniz P. P., Mainville C., Hegarty B. C., Crawford J. M., Breitschwerdt E. B. (2008): Serological and molecular prevalence of Borrelia burgdorferi, Anaplasma phagocytophilum, and Ehrlichia species in dogs from Minnesota. Vector Borne Zoonotic Dis., 8: 455–464.

11.Bedford, G. A. H. (1931). Nuttalliella namaqua, a new genus and species of tick. Parasitology, 23(02), 230-232.

12.Beninati T, Lo N, Noda H, Esposito F, et al. (2002) First detection of spotted fever group rickettsiae in Ixodes ricinus from Italy. Emerg Infect Dis 8:983-986.

13.Beninati T, Genchi, C Torina A, Caracappa S, at al. (2005) Rickettsiae in ixodid ticks, Sicily. Emerg Infect Dis 11:509-511.

14.Bhate C., Schwartz R. A. (2011): Lyme disease Part I. Advances and perspectives. J. Am. Acad. Dermatol., 4: 619-636

15.Bhide, M. R., Travnicek, M., Levkutova, M., Curlik, J., Revajova, V., Levkut, M. (2005). Sensitivity of Borrelia genospecies to serum complement from different animals and human: a host-pathogen relationship. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 43(2), 165-172.

16.Bisanzio, D., Amore, G., Ragagli, C., Tomassone, L., Bertolotti, L., Mannelli, A. (2008). Temporal variations in the usefulness of normalized difference vegetation index as a predictor for Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in a Borrelia lusitaniae focus in Tuscany, central Italy. Journal of Medical Entomology, 45(3), 547-555.

17.Blanda V., Torina V., La Russa F., D'Agostino R., Randazzo K., Scimeca S., Giudice E., Caracappa S., Cascio A., de la Fuentede J., A retrospective study of the characterization ofRickettsiaspecies in tickscollected from humans https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.005

18.Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. Parasitology, 129, S247-69.

19.Brouqui P, Parola P, Fournier PE, Raoult D (2007) Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. FEMS Immunol Med Microbiol. 49(1):2-12

20.Carpi, G, Cagnacci, F, Neteler, M, Rizzoli, A. Tick infestation on roe deer in relation to geographic and remotely sensed climatic variables in a tick-borne encephalitis endemic area. Epidemiol Infect 2008;136:1416–1424. Available from: http://dx. doi.org/10.1017\%2FS0950268807000039

21.Chen, G., Severo, M. S., Sohail, M., Sakhon, O. S., Wikel, S. K., Kotsyfakis, M., Pedra, J. H. F. (2012). Ixodes scapularis saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during Anaplasma phagocytophilum stimulation of immune cells. Parasites and Vectors, 5.

22.Chodynicka B., Flisiak I., Okrasinska K, Andrzejewska A., Schwartz R. A. (2000): Lymphocytoma cutis: cases linked with Lyme disease. Cutis, 66: 243-246.

23.Corson, M. S., Teel, P. D., Grant, W. E. (2004). Microclimate influence in a physiological model of cattle-fever tick (Boophilus spp.) population dynamics. Ecological Modelling, 180, 487–514.

24.Curioni V, Cerquetella S, Scuppa P, Pasqualini L, Beninati T, Favia G (2004) Lyme disease and babesiosis: preliminary findings on the transmission risk in highly frequented areas of the Monti Sibillini National Park (Central Italy). Vector Borne Zoonotic Dis 4(3):214–20

25.Dantas-Torres, F., Lia, R. P., Capelli, G., Otranto, D. (2013). Efficiency of flagging and dragging for tick collection. Experimental Applied Acarology, 61(1), 119- 27.

26.Dobler G., Essbauer S., Wolfel R., Isolation and preliminary characterization of Rickettsia monacensis in south – eastern Germany DOI:https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02227.x

27.Dugat, T., Lagree, A. C., Maillard, R., Boulouis, H. J., Haddad, N. (2015). Opening the black box of Anaplasma phagocytophilum diversity: current situation and future perspectives. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 5.

28.Eremeeva, M. E., Oliveira, A., Robinson, J. B., Ribakova, N., Tokarevich, N. K., Dasch, G. A. (2006). Prevalence of bacterial agents in Ixodes persulcatus ticks from the Vo-logda Province of Russia. Annals of the New York Academy of Sciences, 1078, 291- 298

29.Estrada-Peña, A. (2015). Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties, 34(1), 53-65.

30.Estrada-Peña, A., de la Fuente, J. (2014). The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. Antiviral Research, 108, 104-128.

31.Estrada-Peña, A., Estrada-Sánchez, A., Estrada-Sánchez, D., de la Fuente, J. (2013). Assessing the effects of variables and background selection on the capture of the tick climate niche. International Journal of Health Geographics, 12.

32.Estrada-Peña A., Sánchez N., Estrada-Sánchez A. (2012). An assessment of the distribution and spread of *Hyalomma marginatum* in the western Palearctic under different climate scenarios. Vector Borne Zoonotic Dis.

33.Foley J. E., Foley P., Madigan J. E. (2001): Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. Am J Vet Res., 62: 1599– 1605.

34.Gern, L., Humair, P. F. (2002). Ecology of Borrelia burgdorferi sensu lato in Europe, p. 149–174. In J. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, and G. Stanek (ed.), Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom.

35.Gillespie J. J.,Williams K.,Shukla M.,Snyder E.E., Nordberg E.E.,Ceraul S.M.,Dharmanolla C.,Rainey D.,Soneja J.,Shallom J.M.,Vishnubhat N.D.,Wattam R.,Purkayastha A.,Czar M.,Crasta O., Setubal J.C., Azad A.F., Sobral B.S. Rickettsia Phylogenomics: Unwinding the Intricacies of Obligate Intracellular Life – Plos One April 16, 2008 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002018

36.Ginsberg, H. S., Ewing, C. P. (1989). Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, Ixodes dammini, and lone-star ticks, Amblyommaamericanum (Acari, Ixodidae). Experimental Applied Acarology, 7(4), 313-322.

37.Graves S, Unsworth N, Stenos J (2006) Rickettsioses in Australia. : Ann N Y Acad Sci. 1078:74-9.

38.Gray J. S. (2008): Ixodes ricinus seasonal activity: implications of global warming indicated by revisiting tick and weather data," Int. J. Med. Microbiol., 298, supplement 1: 19–24,

39.Greig B., Asanovich K. M., Armstrong P. J., Dumler J. S. (1996): Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. J Clin Microbiol., 34: 44–48.

40.Hajdušek, O., Sima, R., Ayllon, N., Jalovecka, M., Perner, J., de la Fuente, J., Kopacek, P. (2013). Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 3

41.Henniger, T., Henniger, P., Grossmann, T., Distl, O., Ganter, M., von Loewenich, F. D. (2013). Congenital infection with Anaplasma phagocytophilum in a calf in northern Germany. Acta Veterinaria Scandinavica, 55(1), 38-38.

42.Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J., Persing, D. H. (2000). Babesiosis. Clinical Microbiology Reviews, 13(3), 451-469

43.Jensen, P.M., Hansen, H., Frandsen, F., (2000). Spatial risk assessment for Lyme borreliosis in Denmark. Scand. J. Infect. Dis. 32, 545–550.

44.Joseph, J. T., Roy, S. S., Shams, N., Visintainer, P., Nadelman, R. B., Hosur, S., Nelson, J., Wormser, G. P. (2011). Babesiosis in Lower Hudson Valley, New York, USA. Emerging Infectious Diseases, 17(5), 843-847.

45.Kahl, O., Knülle, W. (1988). Water vapour uptake from subsaturated atmospheres by engorged immature ixodid ticks. Experimental Applied Acarology, 4(1), 73- 83

46.Kaiser R. (1998): Neuroborreliosis. J. Neurol., 245: 247-255

47.Kakoma I, Mehlhorn H. (1993) *Babesia* of domestic animals. In: Kreier J P, editor. Parasitic protozoa. 2nd ed. Vol. 7. San Diego, Calif: Academic Press;. pp. 141–216

48.Karakashian S. J., Rudzinska M. A., Spielman A., Lewengrub S., Piesman J., Shoukrey N. (1983): Ultrastructural studies on sporogony of Babesia microti in salivary gland cells of the tick Ixodes dammini. Cell. Tissue Res., 231: 275-287.

49.Karlsson U., Bjoersdorff A., Massung R. F., Christtensson B. (2001): Human granulocytic ehrlichiosis—a case in Scandinavia. Scand. J. Infect. Dis., 33: 805–806.

50.Kelly P.J., Mason P.R. Transmission of a spotted fever group rickettsia by Amblyomma hebraeum (Acari: Ixodidae) PMID: 1941925 DOI: 10.1093/jmedent/28.5.598

51.Kocan, K. M., de la Fuente, J., Coburn, L. A. (2015). Insights into the development of Ixodes scapularis: a resource for research on a medically important tick species. Parasites Vectors, 8.

52.Kočíková B., Majláth I., Víchová B., Maliničová L., Pristaš P., Connors V.A., Majláthová V. , Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovakia (B. Kočíková, B. Víchová, P. Pristaš, V. Majláthová); Pavol Jozef Šafárik 53.University in Košice, Košice (I. Majláth, L. Maliničová, P.

Pristaš, V. Majláthová); University of South Carolina Upstate, Spartanburg, South Carolina, USA (V.A. Connors)

54.Kohn B., Galke D., Beelitz P., Pfister K. (2008): Clinical features of canine granulocytic ehrlichiosis in 18 naturally infected dogs. J Vet Intern Med., 22:1289–1295.

55.Laferl H, Hogrefe W, Kock T, Pichler H. (1999): A further case of acute human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 18: 385–386.

56.Levy S. A., Dombach D. M., Barthold S. W., et al. (1993): Canine Lyme Borreliosis. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. Small. Anim., 15: 833-846.

57.Littman MP. Canine borreliosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract. (2003); 33: 827– 862. [EBM-D]

58.Lorusso V., Lia R.P., Dantas-Torres F., Mallia E., Ravagnan S., Capelli G., Otranto D., (2011) Ixodid ticks of road-killed wildlife species in southern Italy: new tick-host associations and locality records Exp Appl Acarol (2011) Springer Science+Business Media B.V. 201155:293–300 DOI 10.1007/s10493-011-9470-4

59.Lorusso V., Dantas-Torres F., Lia R.P., Tarallo V.D., Mencke N., Capelli G., Otranto D., (2010) Seasonal dynamics of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus, on a confined dog population in Italy Pages 309-315 https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00885.x

60.Lotric-Furlan S., Petrovec M., Zupanc T. A., Nicholson W. L., Sumner J. W., Childs J. E., Strle F. (1998): Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia. Clin. Infect. Dis., 27: 424–428

61.Madeddu G., Mancini F., Caddeo A., Ciervo A., Babudieri S., Maida I.,Fiori M.L.,Rezza G., Mura M.S. Rickettsia monacensis as cause of Mediterranean spotted fever-like illness, Italy PMID: 22469314 PMCID: PMC3309684 DOI: 10.3201/eid1804.111583

62.Mahara F (2006) Rickettsioses in Japan and the far East.. Ann N Y Acad Sci. 1078:60-73.

63.Maioli G., Pistone D., Bonilauri P., Pajoro M., Barbieri I., Patrizia M., Vicari N., Dottori M., Ethiological agents of rickettsiosis and anaplasmosis in ticks collected in Emilia-Romagna region (Italy) during 2008 and 2009 Exp Appl Acarol DOI 10.1007/s10493-012-9535-z

64.Manilla G. (1998): Fauna d'Italia. Acari.: Ixodida. Ed calderini, Bologna.

65.Mannelli, A., F. Tolari, P. Pedri, and S. Stefanelli. 1997. Spatial distribution and seasonality of ticks (Acarina: Ixodidae) in a protected area in the northern Apennines. Parassitologia 39: 41Ð 45.

66.May C., Bennett D., Carter S. D. (1990): Lyme disease in the dog. Vet. Rec., 126: 293

67.Mead, P. S. (2015). Epidemiology of Lyme Disease. Infectious Disease Clinics of North America, 29(2), 187

68.Mehlhorn, H., Scheunemann, R. (2008). Infections danger in ticks increases in autumn. Tieraerztliche Praxis Ausgabe Kleintiere Heimtiere, 36(5), 381-381

69.Merhej, V., Angelakis, E., Socolovschi, C., Raoult, D. (2014). Genotyping, evolution and epidemiological findings of Rickettsia species. Infection Genetics and Evolution, 25, 122-137.

70.Morrison, W. I. (2015). The aetiology, pathogenesis and control of theileriosis in domestic animals. Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties, 34(2), 599-611.

71.Müllegger R. R. (2004): Dermatological manifestations of Lyme borreliosis. Eur. J. Dermatol., 14: 296-309

72.Napoli, E., Brianti, E., Brucato, G., Gaglio, G., Virga, A., Torina, A., Alongi, A., Giannetto, S. Ixodidae monitoring and their vectorial role in the Zingaro natural oriented reserve. LXV Congresso Nazionale Sisvet Tropea 7-11 Settembre 2011.

73.Oteo J. A., Blanco J. R., de Artola V., Ibarra V. (2000): First report of human granulocytic ehrlichiosis in southern Europe (Spain). Emerg. Infect. Dis., 6: 430–431

74.Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2010). Canine and feline vector-borne diseases in Italy : current situation and perspectives. Parasites & Vectors 2010 3 : 2

75.Otranto, D., Capelli, G., Genchi, C. (2009). Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. Par-asit Vectors. 2009;2 Suppl 1:S2

76.Overzier E. Pfister K. Herb I. Mahling M, et al. Detection of tick-borne pathogens in roe deer (Capreolus capreolus), questing ticks (Ixodes ricinus) and ticks infesting roe deer in southern Germany. Ticks Tick Borne Dis. 2013b;4:320–328.

77.Paddock C. D., Childs J. E. (2003): Ehrlichia chaffeensis: a Prototypical Emerging Pathogen. Clin. Microbiol. Rev., 16: 37–64.

78.Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M. Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P. E., Raoult, D. (2013). Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. Clinical Microbiology Reviews, 26(4), 657-702.

79.Parola, P., Raoult, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. (vol 32, pg 897, 2001). Clinical Infectious Diseases, 33(5), 749-749

80.Pennisi M.G. , Persichetti M.F. , Serrano L. , Altet L. , Reale S. , Gulotta L. and Solano-Gallego L. Ticks and associated pathogens collected from cats in Sicily and Calabria (Italy) DOI 10.1186/s13071-015-1128-3

81.Perret, J. L., Guigoz, E., Rais, O., Gern, L. (2000). Influence of saturation deficit and temperature on Ixodes ricinus tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). Parasitology Research, 86(7), 554-557.

82.Petrovec M., Lotric-Furlan S., Zupanc T. A., Strle F., Brouqui P., Roux V., Dumler J. S. (1997): Human disease in Europe caused by a granulocytic Ehrlichia species. J. Clin. Microbiol., 35: 1556–1559.

83.Pinto D. S. (2002): Cardiac manifestations of Lyme disease. Med. Clin. North. Am., 86: 285-296.

84.Poitout F. M., Shinozaki J. K., Stockwell P. J., Holland C. J., Shukla S. K. (2005): Genetic variants of Anaplasma phagocytophilum infecting dogs in western Washington State. J Clin Microbiol., 43: 796–801.

85.Portillo, A., Ibarra, V., Santibáñez, S., Pérez-Martínez, L., Blanco, J. R., Oteo, J. A. (2009). Genetic characterisation of ompA, ompB and gltA genes from Candidatus Rickettsia rioja. Clinical Microbiology and Infection, 15, Supplement 2, 307-308.

86.Radolf, J. D., Caimano, M. J., Stevenson, B., Hu, L. T. (2012). Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. Nature Reviews Microbiology, 10(2), 87-99.

87.Raoult and Roux (1997) Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases PMID: 9336669 PMCID: PMC172941 DOI: 10.1128/CMR.10.4.694-719.1997

88.Raoult, D., Weiller, P. J., Chagnon, A., Chaudet, H., Gallais, H., Casanova, P. (1986). Mediterranean spotted fever: clinical, laboratory and epidemiological features of 199 cases. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 35(4), 845- 850.

89.Reif e Macaluso., (2009) Ecology of Rickettsia felis: a review ID: 19645274DOI: 10.1603/033.046.0402

90.Reppert, E., Galindo, R. C., Breshears, M. A., Kocan, K. M., Blouin, E. F., de la Fuente, J. (2013). Demonstration of transplacental transmission of a human isolate of Anaplasma phagocytophilum in an experimentally infected sheep. Transboundary and Emerging Diseases, 60, 93-96

91.Rikihisa Y. (1991): The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. Clin. Microbiol. Rev., 4: 286–308.

92.Rizzoli, A., Hauffe, H.C., Tagliapietra, V., Neteler, M., Rosà, R. (2009): Forest structure and roe deer abundance predict tick-borne encephalitis risk in Italy. Plos One 4: e4336.

93.Rudolph, D., Knulle, W. (1974). Site and mechanism of water-vapor uptake from atmosphere in Ixodid ticks. Nature, 249(5452), 84-85.

94.Rudzinska M. A., Spielman A., Lewengrub S., Trager W., Piesman J. (1983): Sexuality in piroplasms as revealed by electron microscopy in Babesia microti. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2966–2970.

95.Saah, A.J. (2002). Introducción a las rickettsiosis y las erliquisis. En: Mandell G. L., Bennett J. E., Dollin, R., eds. Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades Infecciosas principios y práctica. 5ºed. Madrid; Panamericana. 2469-71.

96.Sanogo, YO, Davoust, B, Parola, P, Camicas, JL, et al. (2003)Prevalence of Rickettsia spp. in Dermacentor marginatus ticks removed from game pigs (Sus scrofa) in Southern France. Ann NY Acad Sci 990:191-195.

97.Sexton DJ, Kaye KS (2002) Rocky mountain spotted fever. Med Clin North Am. 86(2):351-60.

98.Simser, JA, Palmer, AT, Fingerle, V, Wilske, B, et al. (2002) Rickettsia monacensis sp. nov., a spotted fever group Rickettsia, from ticks (Ixodes ricinus) collected in a European city park. Appl Environ Microbiol 68:4559-4566. Sinagra G. (2004)

99.Smith R. P., Schoen R. T., Rahn D. W., Sikand V. K., Nowakowski J., Parenti D. L., Holman M. S., Persing D. H., Steere A. C. (2002): Clinical characteristics and treatment outcome of early Lyme disease in patients with microbiologically confirmed erythema migrans. Ann. Intern. Med., 136: 421-428.

100.Socolovschi, C., Matsumoto, K., Phong, H. T., Davoust, B., Raoult, D., Parola, P. (2009). Transmission of Rickettsia sp. DmS1 in the tick, Dermacentor marginatus. Clinical Microbiology and Infection, 15, 322–323.

101.Sonenshine D. E. (2005): The biology of tick vectors of human disease. In: Goodman J.L., Dennis D.T., Sonenshine D.E. (Eds.) Tick-Borne Diseases of Humans. ASM Press, Washington , 2005.

102.Sonenshine, D. E. (1993). Biology of ticks. Oxford University Press

103.Sréter-Lancz Z, Sréter T, Széll Z, Egyed L (2005) Molecular evidence of Rickettsia helvetica and R. monacensis infections in Ixodes ricinus from Hungary. Ann Trop Med Parasitol. 99(3):325-30.

104.Steere A. C. (2001): Lyme disease. N. Engl. J. Med. 345: 115–125

105.Sykes, E. (2014). Canine and feline infectious diseases. Elsevier, Saunders, Missouri

106.Stuen, S. (2007). Anaplasma phagocytophilum - the most widespread tickborne infection in animals in Europe. Veterinary Research Communications, 31, 79-84.

107.Stuen, S., Granquist, E. G., Silaghi, C. (2013). Anaplasma phagocytophilum—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 3, 31

108.Tälleklint, L., Jaenson, T. G. T. (1996). Relationship between Ixodes ricinus density and prevalence of infection with Borrelialike spirochetes and density of infected ticks. Journal of Medical Entomology, 33(5), 805- 811.

109.Tampieri, M.P., Galuppi, R., Bonoli, C., Cancrini, G., Moretti, A., Pietrobelli, M. (2008). Wild ungulates as Babesia hosts in northern and central Italy. Vector Borne and Zoonotic Diseases, 8, 667-674.

110.Torina, A., Alongi, A., Scimeca, S., Vicente, J., Caracappa, S., de la Fuente, J., 2010.Prevalence of tick-borne pathogens in ticks in Sicily. Transbound. Emerg. Dis. 57,46–48

111.Tilly, K., Rosa, P., Stewart, P. E. (2008). Biology of infection with Borrelia burgdorferi. Infectious Disease Clinics of North America, 22(2), 217-34

112.Toledo A., Olmeda A.S., Escudero R., Jado I., Valcárcel F., Casado-Nistal M.A., Rodríguez-Vargas M. ,Gil H., and Anda P. Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Ticks Collected from Central Spain Am. J. Trop. Med. Hyg., 81(1), 2009, pp. 67–74 Copyright © 2009 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

113.Tønnesen, M.H., Penzhorn, B.L., Bryson, N.R., Stoltsz, W.H., Masibigiri, T., 2004. Displacement of Boophilus decoloratus by Boophilus microplus in the Soutpansberg region, Limpopo Province, South Africa. Exp. Appl. Acarol. 32, 199–208.

114.Townsend, R. L., Moritz, E. D., Fialkow, L. B., Berardi, V., Stramer, S. L. (2014). Probable transfusion-transmission of Anaplasma phagocytophilum by leukoreduced platelets. Transfusion, 54(11), 2828-2832.

115.Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T., Kondrusik M., Hermanowska- Szpakowicz T., Sawicki W., Sulek K. (2001): First case of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 20: 196–198.

116.Urquhart G.M., Armour J., Ducan J.L., Dunn A.M. e Jennings F.W., (1998). Parassitologia Veterinaria. Torino: UTET, 1998; 214-221; 287-294

117.Van Dobbenburgh A., van Dam A. P., Fikrig E. (1999): Human granulocytic ehrlichiosis in Western Europe. N. Engl. J. Med., 340: 1214–1216.

118.Vázquez-López, M. E., Díez-Morrondo, C., Sánchez-Andrade, A., Pego-Reigosa, R., Díaz, P., Castro-Gago, M. (2016). Manifestaciones articulares en enfermos de Lyme. Reumatologia Clínica. 12(6), 327– 330

119.Vázquez-López, M., Pego-Reigosa, R., Díez-Morrondo, C., Castro-Gago, M., Díaz, P., Fernández, G., Morrondo, P. (2015). Epidemiology of Lyme disease in a healthcare area in north-west Spain. Gaceta Sanitaria, 29(3), 213-216.

120.Walker, D. H., Valbuena, G. A., Olano, J. P. (2003). Pathogenic mechanisms of diseases caused by Rickettsia. Annals of the New York Academy of Sciences, 990(1), 1- 11

121.Wesonga F.D., Orinda G.O., Ngae G.N. e Grootenhuis J., (2006). Comparative tick counts on game, cattle and sheep on a working game ranch in Kenya. Tropical Animal Health and Production, 38(1), 35–42.

122.Zanet, S., Trisciuoglio, A., Bottero, E., de Mera, I. G. F., Gortazar, C., Carpignano, M. G., Ferroglio, E. (2014). Piroplasmosis in wildlife: Babesia and Theileria affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. Parasites Vectors, 7

123.Zeman, P., Pecha, M. (2008). Segregation of genetic variants of Anaplasma phagocytophilum circulating among wild ruminants within a Bohemian forest (Czech Republic). International Journal of Medical Microbiology, 298, 203-210.

124.Zhang, L., Liu, Y., Ni, D., Li, Q., Yu, Y., Yu, X., Wan, K., Li, D., Liang, G., Jiang, X., Jing, H., Run, J., Luan, M., Fu, X., Zhang, J., Yang, W., Wang, Y., Dumler, J. S., Feng, Z., Ren, J., Xu, J. (2008). Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. JAMAJournal of the American Medical Association, 300(19), 2263-2270

125.Zobba, R., Ardu, M., Niccolini, S., Chessa, B., Manna, L., Cocco, R., Parpagliae, M. L. P. (2008). Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. Journal of Equine Veterinary Science, 28, 301-8.

Discussione generale e conclusioni

Questa tesi di dottorato fornisce informazioni sui vettori e sugli agenti patogeni da loro trasmessi, mettendo in evidenza l'importanza del ruolo svolto dagli ospiti, serbatoio dell'infezione.

Nel primo capitolo viene evidenziato come la spettrometria di massa MALDI – TOF è una metodica utilizzata per l'identificazione e la classificazione di agenti patogeni, in particolare per lo studio di flebotomi, che consente una preparazione rapida del campione con un breve tempo di elaborazione [1]. Nello studio il database di riferimento interno generato per le specie di flebotomi ha mostrato risultati coerenti con l'identificazione morfologica degli stessi, mettendo in risalto il potenziale dello strumento e l'efficacia delle analisi ad alto rendimento, sensibili, specifiche e con un ottimo rapporto costo-efficacia. [2] Il suo impiego faciliterebbe le indagini entomologiche migliorando le conoscenze sulla distribuzione geografica e sulla diffusione di questi vettori che assumono un'importanza rilevante in campo medico e veterinario.

Nel secondo capitolo viene riportato il rilevamento di infezione naturale da *Leishmania* in flebotomi catturati, per valutare il livello di contagio e identificarne le specie circolanti nei vettori [3], al fine di analizzare la distribuzione e, soprattutto, l'introduzione di specie non endemiche, monitorandone il rischio di trasmissione. [4-5] Un altro aspetto emerso dall'elaborato è stata l'identificazione delle fonti dei pasti di sangue in femmine ingorgate, così da ottenere informazioni sulle abitudini alimentari dei vettori e conoscere i potenziali serbatoi di *Leishmania*. [3] Dallo studio dei dati è emersa una nota di notevole importanza, ovvero la presenza del DNA di *Trypanosoma* in *S. minuta*. Non esistono dati in bibliografia che documentino negli animali domestici e selvatici una trasmissione di *Trypanosoma* spp dal vettore *S. minuta*.
È importante sottolineare, che quando nella stessa area geografica vi è una coesistenza delle specie *Trypanosoma* e *Leishmania*, la diagnosi differenziale in uno stesso ospite risulta difficoltosa e indaginosa. [6 -7] Dallo studio si è notato che, nonostante l'atteggiamento opportunistico nella scelta dell'ospite, i flebotomi catturati nei siti dello studio (rifugi con alta disponibilità di cani) ed esaminati, mostravano una predilizione d'ospite differente rispetto le aspettative; ovvero si è notato come *P. pernicoisus* prediligga il coniglio selvatico e non il cane e *S. minuta* l'uomo. Questo dato concorda con quanto dimostrato in uno studio svolto in Spagna [8 - 9]. La maggiore frequenza dei pasti di sangue sui conigli suggerisce, almeno per *P. perniciosus,* una preferenza per i conigli avanzando il suo coinvolgimento nell'epidemiologia della leishmaniosi come serbatoio silvestre.

Nel terzo capitolo sono state analizzate le zecche, vettori di malattie che colpiscono sia l'uomo che gli animali zootecnici e d'affezione, presenti durante tutto il periodo dell'anno, con capacità di trasmettere gli agenti eziologici.

Sono state campionate differenti specie (*I. ricinus, I. frontalis, D. marginatus, Hae. punctata, R. bursa, R. turanicus e Hyalomma*), con una netta predominanza di *I. ricinus*, differentemente dalle aspettative. I risultati indicano che le condizioni meteorologiche possono dettare, insieme a molti altri fattori ambientali, la presenza/assenza e l'abbondanza di molte zecche e dei loro stadi nei diversi periodi dell'anno. In particolare si è notato che *I. ricinus* è la popolazione più rappresentativa con più dell'81% della popolazione di studio, essendo stata campionata nell'intero periodo e in tutti e tre siti.

Le larve rappresentano lo stadio maggiormente riscontrato rispetto ad adulti e ninfe. Si è notato come fattori meteorologici, ovvero temperature elevate, riduzione di umidità, valori di dew point maggiori di 10°C e l'aumento della sun-light duration, influenzano negativamente gli stadi adulti e ninfe, mentre quest'ultima variabile influenza positivamente l'aumento della disponobilità ambientale di larve.

Merita notevole considerazione, ricordare che le stime della diversità e dell'abbondanza delle specie di zecche potrebbe variare in funzione dei metodi di raccolta [10], anche se nel nostro studio questa variabile non ha influito statisticamente. Certamente, il successo della raccolta di una varietà differente di specie di zecche in diversi stadi di sviluppo dipende anche dalla loro disponibilità in base alla vegetazione e alla reazione al panno delle bandiere e della coperta. Tale ricerca mostra come i boschi di quercia, tra cui il leccio (*Quercus ilex*), la sughera (*Quercus suber*), la roverella (*Quercus pubescens*) e il cerro di Gussone (*Quercus gussonei*), costituiscano un habitat adatto a molte specie di zecche. È importante valutare che la presenza di zecche attive in tutte le stagioni può avere implicazioni in termini di trasmissione di agenti patogeni agli animali e anche agli esseri umani. [11]

Certamente, sarebbe interessante valutare più in profondità il rapporto tra microclima e comportamento dei vettori in questa area, poiché il microclima è influenzato da macroclima e da molti altri fattori come il paesaggio e la vegetazione [11]

I dati presentatai in questa tesi di dottorato evidenziano che il contesto epidemiologico delle aree di intervento dovrebbe essere costantemente monitorato perché estremamente dinamico, in quanto potrebbero essere trovati nuovi organismi e altri, precedentemente riconosciuti, potrebbero essere rinominati [12]. Attualmente in Italia alcune malattie trasmesse da vettori come Anaplasmosi, Ehrlichiosi, Babesiosi e Leishmaniosi mostrano una prevalenza piuttosto elevata e ormai è stata confermata la diffusione dei patogeni e dei loro vettori in aree geografiche precedentemente assenti;

infatti negli ultimi anni sono stati identificati casi di Leishmaniosi canina nel Nord del paese, malattia che, fino alla fine del secolo scorso, veniva considerata esclusivamente importata dalle aree endemiche del Sud [13 – 14 – 15 - 16]

Bibliografia

1. Muller, P., Pfluger, V., Wittwer, M., Ziegler, D., Chandre, F., Simard, F., Lengeler, C.,2013. Identification of cryptic Anopheles mosquito species by molecular proteinprofiling. PLoS One 8, e57486.

2. Dvorak, V., Halada, P., lavackova, K., Dokianakis, E., Antoniou, M., Volf, P., 2014. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Parasit. Vectors 7, 21

3. Abbate J. M., Maia C., Pereira A., Arfuso F.,Gaglio G.,Rizzo M., Caracappa G., Marino G., Pollmeier M., Giannetto S., Brianti E. "Identification of trypanosomatids and blood feeding preferences of phlebotomine sand fly species common in Sicily, Southern Italy"- Plos One – March 10;15(3):e0229536. /doi.org/ 10,1371/journal.pone,0229536

4. Alten B, Maia C, Afonso MO, Campino L, Jime´nez M, Gonza´lez E, et al. Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by Leishmania infantum. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(2):e0004458. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004458 PMID: 26900688

5. Antoniou M, Gramiccia M, Molina R, Dvorak V, Volf P. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. Eurosurveillance. 2013; 18(30):20540. https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20540 PMID: 23929183

6. Bastrenta B, Mita N, Buitrago R, Vargas F, Flores M, Machane M, et al. Human mixed infections of Leishmania spp. and Leishmania-Trypanosoma cruzi in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(2):255–64. https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000200015 PMID: 12764443

7. De Arau´jo VAL, Boite´ MC, Cupolillo E, Jansen AM, Roque ALR. Mixed infection in the anteater Tamandua tetradactyla (Mammalia: Pilosa) from Para´ State, Brazil: Trypanosoma cruzi, T. rangeli and Leishmania infantum. Parasitology. 2013; 140(4): 455–60. https://doi.org/10.1017/S0031182012001886 PMID: 23253893

8. Gonza´lez E, Jime´nez M, Herna´ndez S, Martı´n-Martı´n I, Molina R. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): seasonal dynamics, Leishmania infantum infection rates and blood meal preferences. Parasit Vectors. 2017; 10:368. https://doi.org/10.1186/s13071- 017-2309-z PMID: 28764772

9. Gonza´lez E, Ga´llego M, Molina R, Abras A, Alcover MM, Ballart C, et al. Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome b gene. Acta Trop. 2015; 152:96–102. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.020 PMID: 26342793

10. Schulze, T. L., R. A. Jordan, and R. W. Hung. 1997. Biases associated with several methods used to estimate the abundance of Ixodes scapularis and Amblyomma americanum (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 34: 615Ð 623

11. Dantas-Torres, F., Lia, R. P., Capelli, G., Otranto, D. (2013). Efficiency of flagging and dragging for tick collection. Experimental Applied Acarology, 61(1), 119- 27.

12. Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2010). Canine and feline vector-borne diseases in Italy : current situation and perspectives. Parasites & Vectors 2010 3 : 2

13. Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., et al. (2008). The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. Trop Med Int Health. 2008;13(2):256–64.

14. Otranto, D., Capelli, G., Genchi, C. (2009). Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. Par-asit Vectors. 2009;2 Suppl 1:S2

15. Testini, G., Otranto, D., Dantas-Torres F., et al. (2010). Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. Journal of Clin-ical Microbiology, 48(9), 3316–24.

16. Vascellari, M., Ravagnan, S., Carminato,A., et al. (2016). Exposure to vec-tor-borne pathogens in candidate blood donor and free-roaming dogs of northeast Italy. Parasites & Vectors (2016) 9:369