

PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2015”
RELAZIONE FINALE

N. identificativo progetto: IZS LT 04/15 RC

Progetto presentato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE

LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”

Area tematica: Sanità animale

Titolo del progetto: Indagini sulla distribuzione di zecche della famiglia Ixodidae, campionate in aree del territorio italiano a differente prevalenza per piroplasmosi equina e verifica dei livelli di infezione per *Babesia caballi* e *Theileria equi*.

“Ricerca finanziata dal Ministero della Salute”

Responsabile Scientifico: Claudio De Liberato

SINTESI

Indagini sulla distribuzione di zecche della famiglia Ixodidae, campionate in aree del territorio italiano a differente prevalenza per piroplasmosi equina e verifica dei livelli di infezione per *Babesia caballi* e *Theileria equi*.

La piroplasmosi equina è un'infezione di cavalli, asini, muli e zebre provocata da due specie di emoprotozoi intra-eritrocitari appartenenti al phylum Apicomplexa, *Babesia caballi* e *Theileria equi*. L'infezione è trasmessa da zecche della famiglia Ixodidae, vettori biologici dei due parassiti. A livello mondiale i principali vettori di questa parassitosi appartengono ai generi *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*, tutti presenti nel nostro Paese. La piroplasmosi equina ha una diffusione mondiale, con particolare riferimento alle aree tropicali e sub-tropicali e può presentarsi in forma acuta, subacuta o cronica. I segni clinici della piroplasmosi equina comprendono: febbre, depressione, anemia, ittero, edema e anoressia. Dal punto di vista clinico generalmente l'infezione da *B. caballi* è meno grave di quella da *T. equi*. I cavalli che sopravvivono alla fase acuta possono rimanere portatori del parassita per tutta la vita. Per quanto riguarda *B. caballi*, le zecche oltre che da vettori agiscono anche da reservoir, essendo stata descritta per questo protozoo la trasmissione verticale (o trans-ovarica). Al contrario in *T. equi* non esiste trasmissione verticale ed una zecca per fungere da vettore deve necessariamente effettuare un pasto di sangue su un equino infetto. Tra i generi della famiglia Ixodidae potenzialmente coinvolti nella trasmissione della piroplasmosi equina, in Italia centrale i cambiamenti climatici previsti nei prossimi decenni potrebbero favorire l'espansione e l'aumento numerico di *Hyalomma* spp. e *Rhipicephalus* spp. Gli equini, a causa del loro utilizzo fondamentalmente all'aperto in aree rurali, sono ad alto rischio di puntura da zecche, soprattutto allo stadio adulto; conseguentemente, sono molto esposti alla trasmissione di agenti patogeni trasmessi da questi artropodi. I cavalli inoltre, soprattutto quelli sportivi, sono frequentemente spostati, anche su lunghe distanze, e possono pertanto avere un ruolo nella diffusione di vettori ed agenti patogeni anche in territori precedentemente indenni. Mentre a livello mondiale sono disponibili studi sulle malattie trasmesse dalle zecche agli equini condotti, il numero di report e pubblicazioni su quest'argomento in Italia è tuttavia abbastanza limitato e interamente costituito da indagini volte a definire la prevalenza dei due parassiti negli equini, cavalli o asini, evidenziando a seconda dei casi livelli di siero-prevalenza nei cavalli tra lo 0.3% ed il 56.0% per *B. caballi* e tra l'8.2% ed il 50.5% per *T. equi*. Del tutto mancanti sono invece studi sulla piroplasmosi equina focalizzati sui vettori.

I siti di campionamento sono stati, quindi, scelti sulla base dei dati in possesso della UO2, in modo da poter consentire un confronto qualitativo e quantitativo tra popolazioni di zecche della famiglia Ixodidae presenti in zone epidemiologicamente differenti. Sono state selezionate aziende presso le quali erano presenti equini, stabulati o allo stato brado, per tutto il periodo previsto per i campionamenti (Maggio-Ottobre). I dati climatici dell'area oggetto di studio sono stati ottenuti dal sito web del servizio meteorologico della Regione Lazio (<http://www.idrografico.roma.it/>). Il campionamento delle zecche è stato effettuato durante il periodo di maggiore attività dei vettori per due stagioni (Maggio-Settembre 2017 e Maggio- Agosto 2018), con una periodicità di cattura settimanale e una durata di circa un'ora per ogni sessione. Le catture sono state effettuate utilizzando il prelievo diretto sugli animali, la tecnica del dragging e del flagging. I transetti su cui è stato condotto il dragging/flagging erano di circa 100 m e si sviluppavano su percorsi non rettilinei al fine di campionare microhabitat diversi per vegetazione e copertura ombrosa. L'identificazione delle zecche a livello di specie è stata effettuata sulla base della loro morfologia seguendo le chiavi identificative di Manilla (1998) e di Iori et al. (2005). Alcuni esemplari del genere *Rhipicephalus* sono stati identificati mediante PCR e successivo sequenziamento. Le analisi statistiche, relative alle Ixodidae catturate, sono state effettuate per il solo sito di Pastena, quello in cui le catture sono state effettuate in modo costante durante tutto il periodo di campionamento (2017 e 2018) al fine di ottenere un

confronto tra i due anni di ricerca. Il tasso minimo d'infezione (MIR) e la massima probabilità di infezione stimata (MLE) sono stati calcolati per ogni categoria di piroplasma e per sesso delle zecche. Nelle due stagioni di campionamento sono state effettuate complessivamente 79 catture (61 nel 2017 e 18 nel 2018). Le zecche catturate in totale sono state 2.454 (2.029 nel 2017 e 425 nel 2018). Il genere più rappresentato è stato *Rhipicephalus* con 3 specie (*R. sanguineus*, *R. turanicus* e *R. bursa*) e 2.415 esemplari. La specie dominante, con 895 esemplari, è risultata *R. turanicus*, seguita da *R. bursa* (851 esemplari) e *R. sanguineus* (400 esemplari). L'andamento stagionale delle specie dominanti mostra due picchi: uno più pronunciato nel mese di Maggio e uno minore nel mese di Luglio. Si osserva una netta flessione degli esemplari catturati a partire da Agosto fino ad arrivare a campionamenti scarsi o nulli nel mese di Settembre. Dei 110 pool di *R. bursa* testati nel 2017 per la ricerca dei piroplasma 59 (53,64%) sono risultati positivi a *T. equi* e 16 (14,55%) a *B. caballi*, con 8 casi di infezioni miste per entrambi i piroplasma (7%). Nessun'altra specie è risultata positiva per i patogeni. *T. equi* mostrava i valori più alti di MIR e MLE, rispettivamente 10,86% e 14,25%, mentre MIR e MLE per *B. caballi* erano 2,95% e 3,09%. Nel 2018 su 58 pool di adulti di *R. bursa* testati 23 (39,66%) sono risultati positivi a *T. equi*, 16 (27,59%) a *B. baballi*, e 7 pool (12,07%) mostravano una infezione mista per entrambi i piroplasma. Nessuna delle altre specie di zecche è risultata positiva per i patogeni. Dei 52 esemplari per i quali la PCR ha dato un quantitativo di DNA sufficiente al sequenziamento, in 30 casi (57,7%) è stata confermata l'identificazione morfologica. Le due specie risultate più difficili da discriminare con il solo esame morfologico sono state *R. sanguineus* e *R. turanicus*.

La riscontrata dominanza di specie del genere *Rhipicephalus* era un risultato atteso, visto che la ricerca è stata effettuata in ambienti caratterizzati per lo più da un clima caldo ed arido. Rispetto ad altri generi della famiglia Ixodidae infatti, il genere *Rhipicephalus* è particolarmente adattato a resistere alla disidratazione. Le numerosità riscontrate sembrerebbero inoltre indicare che le zone oggetto di studio siano particolarmente favorevoli alla sopravvivenza e proliferazione di queste zecche. *R. bursa* è risultata attiva dagli inizi di maggio, con un picco di abbondanza a metà giugno. La presenza e l'abbondanza di individui adulti è risultata correlata a umidità e temperatura. In particolare, basse temperature e precipitazioni elevate riducono la probabilità di incontrare individui adulti in cerca di ospite. Questo effetto negativo sul comportamento di ricerca dell'ospite era atteso per questa specie, più comune in zone caratterizzate da piovosità bassa o moderata e lunghe stagioni secche. In generale, la fenologia degli adulti nell'area di studio ricalca fedelmente la durata della stagione secca. Peraltro la correlazione tra l'abbondanza di *R. bursa* e la temperatura sembrerebbe essere non lineare, con il numero di adulti attivi che diminuisce anche in seguito ad un eccessivo aumento delle temperature. In conclusione, il numero di esemplari di questa specie diminuisce sia alle basse che alle alte temperature. *R. bursa* è una delle zecche che più frequentemente parassita le pecore nel bacino del Mediterraneo, associata alla trasmissione di *Babesia ovis* e *Theileria ovis*, ma anche segnalata come vettore di *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*. Sebbene il suo ruolo di questa specie nella trasmissione di *T. equi* e *B. caballi* sia generalmente riconosciuto, tuttavia pochi sono gli studi in proposito condotti con la ricerca di questi due agenti patogeni in esemplari catturati col dragging mentre erano in cerca di ospite, la maggior parte riferendosi a dati ricavati da esemplari repleti o parzialmente repleti raccolti direttamente dagli animali. In questa ricerca per la prima volta in Italia viene dimostrato il ruolo di questa specie nella trasmissione della piroplasmosi equina. In accordo con precedenti studi, sia i maschi che le femmine sono risultati implicati nella trasmissione dei due agenti patogeni, senza significativa differenza. Tuttavia le femmine hanno presentato MIR e MLE più alte, e hanno comunque un ruolo di maggior rilievo, per la trasmissione transovarica dei patogeni alla prole e perché passano più tempo a nutrirsi sull'ospite. Il genere *Rhipicephalus* comprende alcune specie la cui identificazione a livello morfologico è molto complessa. Il confronto tra le identificazioni morfologiche e biomolecolari effettuate durante la presente ricerca ha evidenziato come effettivamente nell'ambito di questo genere ci sono specie difficilmente discriminabili con il solo studio morfologico, spesso a causa della presenza di esemplari con un misto di caratteri dell'una e dell'altra specie. Come prevedibile, il maggior numero di non corrispondenze

tra identificazione morfologica e molecolare hanno riguardato le due specie *R. sanguineus* e *R. turanicus*. Tuttavia discrepanze si sono avute anche per quanto riguarda l'identificazione *R. turanicus*/*R. bursa*. I nostri risultati confermano quanto ricavato sia dallo studio di sieri equini in Italia sia da analisi di zecche raccolte dalla vegetazione in Spagna riguardo la maggior diffusione di *T. equi* rispetto a *B. caballi*, trend riportato a livello mondiale. Il picco di prevalenza di *T. equi* riscontrato durante la presente ricerca a partire dal mese di Maggio sarebbe una conseguenza dell'attività trofica di larve e ninfe nel primo periodo di attività delle zecche e individuerebbe Giugno e Luglio come i mesi a maggior rischio di infezione per gli equidi. D'altro canto, sebbene *B. caballi* sia stata rilevata con minore prevalenza e non abbia mostrato picchi evidenti, i cavalli possono essere infettati durante tutto l'anno, a causa della coesistenza di trasmissione transovarica e trans-stadiale. I cavalli oggetto del presente studio sono risultati costantemente asintomatici, mostrando un elevato grado di tolleranza e resistenza nei confronti di questi due parassiti. L'alto numero di zecche presenti nell'ambiente e la conseguente alta prevalenza delle due specie di piroplasma potrebbero essere spiegate con numerosi fattori sia biotici che abiotici, come ad esempio le pratiche di allevamento, la copertura vegetale, la quota e la tipologia di suolo. Infatti, cavalli allevati allo stato semibrado, in aree boschive distanti dal mare, comprese tra i 150 e i 600 metri sul livello del mare, caratterizzate da suolo di tipo chromic luvisol, hanno mostrato in altri casi i più alti valori di prevalenza di *B. caballi* e *T. equi*, se paragonati a cavalli allevati in altre condizioni.

E-mail: claudio.deliberato@izslt.it

Key words: Ixodidae, *Rhipicephalus*, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, Piroplasmosi Equina, Italia

Citazione: C. De Liberato, A. Magliano, F. Romiti, G. Manna, A. Cersini: Indagini sulla distribuzione di zecche della famiglia *Ixodidae*, campionate in aree del territorio italiano a differente prevalenza per piroplasmosi equina e verifica dei livelli di infezione per *Babesia caballi* e *Theileria equi*. Ricerca Corrente 2015. Anno Presentazione Relazione: 2019.