

**Studio sulle popolazioni di ditteri della famiglia Tabanidae in aree a diversa prevalenza d'infezione del virus dell'Anemia Infettiva Equina (AIE).**

**Responsabile Scientifico: Dr. Claudio De Liberato**

**Durata del progetto: 24 mesi**

**Elenco delle Unità Operative (U.O.) impegnate nel progetto:**

- 1) Dr. Claudio De Liberato - IZSLT Direzione operativa Diagnostica Generale
- 2) Dr. Raffaele Frontoso – IZSLT Direzione operativa Diagnostica delle malattie virali CERME
- 3) Dr. Raniero Lorenzetti – IZSLT Ufficio di staff Biotecnologie
- 4) Dr. Marcello Sala - IZSLT Ufficio di Staff Osservatorio Epidemiologico
- 5) Dr. Walter Mignone – Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte Liguria e Valle D'Aosta

**Razionale del progetto**

**Inquadramento della tematica**

I ditteri ematofagi della famiglia Tabanidae sono vettori meccanici di virus, batteri e protozoi, a loro volta agenti eziologici di importanti malattie degli animali domestici (anemia infettiva equina, leucosi bovina, besnoitiosi, ecc.). La loro capacità di agire come vettori meccanici è legata in particolare alla dolorosità della loro puntura; i tabanidi vengono, infatti, frequentemente scacciati dall'animale su cui si stanno nutrendo e, nel tentativo di terminare il pasto di sangue, attaccano ripetutamente. Esempari con i pezzi boccali contaminati di sangue possono così posarsi su un ospite diverso da quello su cui avevano iniziato il pasto, dando eventualmente luogo alla trasmissione di un agente patogeno. In oltre, a causa delle loro dimensioni relativamente grandi, i pezzi boccali dei tabanidi (mandibole, mascelle e labium) possono essere contaminati da una notevole quantità di sangue, rendendo più probabile la trasmissione.

Il ruolo dei tabanidi come vettori dell'AIE è ampiamente dimostrato in letteratura; tuttavia, trattandosi di vettori meccanici, la loro rilevanza epidemiologica nella circolazione del virus, se paragonata ad altre modalità di trasmissione, è ancora oggetto di dibattito. Numerosi studi sembrerebbero individuare la trasmissione da parte di vettori, e dei tabanidi in particolare, come la principale via di diffusione del virus. Si tratta però per lo più di studi effettuati negli USA, in situazioni ecologicamente molto differenti da quelle riscontrabili nel nostro territorio, in particolare per quanto riguarda presenza, abbondanza e composizione specifica delle popolazioni di potenziali vettori.

**Pertinenza strategica della proposta**

In Italia ad oggi non esistono dati pubblicati sull'argomento. Per quanto sopra riportato, si propone un progetto di ricerca finalizzato ad una prima valutazione della potenziale rilevanza dei tabanidi come vettori dell'AIE in Italia centrale.

**Obiettivi**

- Ottenere dati su composizione specifica, abbondanza e stagionalità delle popolazioni dei ditteri della famiglia Tabanidae presenti in aree a diversa prevalenza d'infezione del virus dell'AIE;

- Individuare le specie di tafani più frequentemente associate alle aree a circolazione virale;
- Quantificare la frequenza di tafani catturati con residui di sangue sui pezzi boccali;
- Correlare dati entomologici e virologici (anche storici) per una valutazione del rischio legata a presenza ed abbondanza dei vettori meccanici del virus;
- Valutare la rilevanza epidemiologica dei tafani come veicolo di diffusione del virus;
- In base alla maggiore o minore concordanza tra dati virologici ed entomologici, ipotizzare altre possibili modalità di trasmissione del virus (es. iatrogena);
- Produrre un'analisi del rischio legato alla loro presenza ed abbondanza;
- Stesura di pubblicazioni scientifiche.

### ***Bibliografia di riferimento essenziale:***

Krinsky W.L. 1976. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *Journal of Medical entomology*, 13 (3): 225-275.

Foil L.D., Adams W.V., Issel C.J., Pierce R. 1984. Tabanid (Diptera) populations associated with an equine infectious anemia outbreak in an inapparently infected herd of horses. *Journal of Medical Entomology*, 21 (1): 28-30.

Issel C.J., Foil L.D. 1984. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *Journal of the America Veterinary Medicine Association*, 184 (3): 293-297.

Foil L.D., Adams W.V., McManus J.M., Issel C.J. 1987. Bloodmeal residues on mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens. *Journal of Medical Entomology* 24 (6): 613-616.

Foil L.D. 1989. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitology Today*, 5 (3): 88-96.

Foil L.D., Issel C.J. 1991. Transmission of retroviruses by arthropods. *Annu. Rev. Entomol*, 36: 355-381.

### **Descrizione complessiva del progetto**

#### **Breve sintesi conoscenze già disponibili sull'argomento**

L'anemia infettiva equina (AIE) è un'infezione virale cosmopolita degli equidi, provocata da un lentivirus della famiglia Retroviridae, sottofamiglia Orthoretrovirinae. Tutti gli equidi sono sensibili all'infezione. Gli animali infetti rimangono viremici per tutta la vita e possono costituire fonte di contagio per altri animali recettivi; in considerazione di questo rischio, gli animali positivi sono soggetti a provvedimenti restrittivi. La trasmissione può avvenire per via iatrogena, ma nei periodi a rischio avviene principalmente attraverso la puntura di insetti, soprattutto tafani, che agiscono come vettori meccanici del virus. La sua diffusione è maggiore nei periodi favorevoli all'attività di questi artropodi ed è di più facile riscontro in regioni a clima caldo umido (da cui il nome di febbre delle paludi). A partire dal 2007, con l'attuazione del Piano di Sorveglianza Nazionale dell'AIE, è stata dimostrata un'ampia diffusione dell'infezione su tutto il territorio nazionale, con un'evidente clusterizzazione nelle regioni dell'Italia Centrale (Abruzzo, Lazio Molise, Umbria). L'analisi del rischio 2007-2011 ha evidenziato in queste Regioni frequenti nuovi casi d'infezione in animali ed allevamenti precedentemente negativi, fornendo l'evidenza di un'attiva circolazione del virus. Mentre nel circuito dei cavalli sportivi l'infezione si può ritenere sporadica, negli equidi detenuti in condizioni rurali l'AIE risulta invece assai diffusa. Proprio l'impiego di animali da lavoro in aree boschive potrebbe determinare una loro maggior esposizione ai tabanidi vettori dell'infezione, infatti il mulo, ancora ampiamente utilizzato per lavoro nelle zone apenniniche, ha mostrato un rischio di infezione da 25 a 60 volte maggior rispetto al cavallo.

I ditteri della famiglia Tabanidae sono vettori meccanici di virus, batteri e protozoi, agenti eziologici di importanti malattie degli animali domestici (es. anemia infettiva equina, leucosi bovina e besnoitiosi). La loro capacità come vettori meccanici è legata a due fattori che li caratterizzano:

- 1) apparato boccale: di tipo pungitore/lambente, caratterizzato da mandibole e mascelle a forma di lama, con cui l'insetto incide la cute dell'ospite provocando una ferita abbastanza grande da causare la fuoriuscita di sangue. A causa del dolore provocato dalla loro puntura, i tabanidi vengono frequentemente scacciati dall'animale su cui si stanno nutrendo e, nel tentativo di terminare il pasto di sangue, effettuano degli attacchi ripetuti. Esemplari con i pezzi boccali ancora contaminati di sangue possono posarsi su un ospite diverso da quello su cui avevano iniziato il pasto, dando eventualmente luogo alla trasmissione di un agente patogeno presente nel residuo di sangue.
- 2) dimensioni: a causa delle loro dimensioni relativamente grandi, i loro pezzi boccali possono essere contaminati da una quantità di sangue (fino a 10 nl), tale da permettere la trasmissione di un agente patogeno, anche presente con un titolo non elevato.

Il ruolo dei tabanidi come vettori dell'AIE è dimostrato in letteratura; tuttavia, trattandosi di vettori meccanici, la loro rilevanza epidemiologica nella circolazione del virus è oggetto di dibattito. Studi condotti negli Stati Uniti hanno dimostrato che aree a differente incidenza e prevalenza del virus erano caratterizzate da popolazioni di tabanidi differenti, per composizione specifica ed abbondanza. Aree ecologicamente più adatte a questi insetti e con popolazioni più abbondanti degli stessi erano interessate da una circolazione virale più intensa rispetto a zone aride meno idonee al questi insetti. La trasmissione meccanica del virus dell'AIE da parte dei tabanidi è stata anche dimostrata in diversi studi sperimentali. In particolare, ricercatori americani hanno dimostrato che la trasmissione si poteva verificare anche in seguito ad un'unica puntura da parte di un tabanide del genere *Tabanus*, genere che comprende le specie di maggiori dimensioni all'interno della famiglia Tabanidae e che conseguentemente possono avere i pezzi boccali contaminati con una quantità di sangue relativamente grande.

### **Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre**

I dati raccolti permetteranno di ottenere una prima indicazione su presenza ed abbondanza delle diverse specie dei ditteri della famiglia Tabanidae in aree a differente prevalenza del virus, eventualmente fornendo una prima indicazione indiretta sulla loro maggiore o minor rilevanza epidemiologica come vettori dell'AIE.

Eliminato:

Inoltre, l'analisi quantitativa e qualitativa sui residui di sangue sui pezzi boccali dei tabanidi, potrà fornire informazioni di ordine:

- 1) quantitativo (% di individui catturati che presentano residui di sangue sui pezzi boccali): potrà fornire un'indicazione sulla percentuale di individui di una popolazione in volo attivo con residui di sangue sui pezzi boccali, i soli potenzialmente in grado di trasmettere un agente patogeno;
- 2) qualitativo (identificazione specifica del sangue presente sui pezzi boccali): consentirà di individuare le specie maggiormente attratte dagli equidi per l'effettuazione del pasto di sangue e fornire quindi un'indicazione indiretta sulla loro potenziale rilevanza come vettori dell'AIE.

### **Metodologia**

Sul territorio di Lazio, Liguria ed eventualmente altre regioni dell'Italia centrale recentemente interessate da positività sierologiche all'AIE nella popolazione equina (es. Abruzzo), saranno individuate le aree in cui si è verificata la circolazione virale, anche utilizzando strumenti GIS che consentono tecniche d'analisi spaziale. All'interno di queste aree, saranno selezionate aziende con positività sierologiche storiche, caratterizzate dalla presenza di equidi stabulati all'aperto nel periodo di massima attività dei vettori (maggio-ottobre). Per permettere il confronto qualitativo e quantitativo tra popolazioni di tabanidi presenti in zone epidemiologicamente differenti, i siti di studio saranno scelti, in base ai dati storici della sorveglianza nazionale, a diversa prevalenza dell'infezione (categorizzata come alta, media e bassa).

Nei siti così selezionati, nel periodo di massima attività dei vettori, saranno effettuate catture di ditteri della famiglia Tabanidae, utilizzando trappole specificamente ideate per la cattura ed il monitoraggio di questi insetti, Horse Pal ed H-Trap. Si tratta in entrambi i casi di versioni moderne della trappola Manitoba, specificamente ideate per la cattura di insetti ematofagi che cacciano a vista (es. tabanidi e mosche tse-tse). Sfruttano infatti la tendenza dei tafani di volare verso oggetti scuri e mobili che spiccano rispetto allo sfondo. Ove possibile, per aumentarne l'efficacia, le trappole saranno innescate anche con la CO<sub>2</sub> (ghiaccio secco) come attrattivo odoroso. Le trappole saranno posizionate all'esterno dei recinti con gli animali, onde evitare il loro danneggiamento da parte degli stessi. La trappola sarà posizionata in modo da "stagliare" rispetto al paesaggio circostante ed eventualmente tenendo conto della presenza di possibili siti di riposo (es. boschi) o sviluppo larvale (es. aree umide) per i tafani. Il numero di siti in cui effettuare le catture e la periodicità delle stesse saranno definiti in corso di studio in base ai risultati ottenuti.

Le catture verranno trasferite per lo smistamento e l'identificazione dei tabanidi al Laboratorio di Parassitologia e Sorveglianza Entomologica dell'IZSLT. L'identificazione a livello di specie dei tabanidi verrà effettuata mediante analisi morfologica allo stereomicroscopio dei caratteri diagnostici, seguendo le chiavi identificative di Chvala e Portillo-Rubio.

Per lo studio dei residui di sangue sui pezzi boccali, saranno effettuate apposite catture, la cui periodicità sarà definita in base ai risultati ottenuti. Per questa specifica attività i campionamenti verranno effettuati in siti, tra quelli utilizzati per lo studio popolazionistico, in cui le catture risultino particolarmente abbondanti. Le trappole opereranno una giornata nelle ore di massima attività dei vettori. I tabanidi catturati verranno rimossi dalla trappola ogni mezz'ora e soppressi mediante ipotermia. Ciascun esemplare sarà dissezionato, asportando il capo dal resto del corpo. Le due parti così ottenute saranno messe in provette appositamente identificate, in modo da mantenere la tracciabilità dell'intero esemplare. Al fine di preservare eventuali residui di sangue sui pezzi boccali, le provette contenenti le teste saranno trasportate a temperatura di refrigerazione e immediatamente congelate all'arrivo in laboratorio.

Nel Laboratorio di Parassitologia e Sorveglianza Entomologica dell'IZSLT si procederà all'identificazione specifica degli esemplari catturati (utilizzando testa e corpo dello stesso esemplare) e, successivamente i pezzi boccali (mandibole, mascelle e labium) asportati dalle teste verranno trasferiti all'UO3 per l'analisi biomolecolare. L'identificazione dei residui di sangue sui pezzi boccali sarà effettuata mediante PCR, sequenziamento di specifici tratti del DNA amplificato e confronto in Genbank delle sequenze ottenute.

I dati raccolti dallo smistamento verranno inseriti nell'apposito data set. L'elaborazione statistica dei dati verrà effettuata usando appositi software informatici.

### **Descrizione dei criteri di trasferibilità e di diffusione dei prodotti e dei risultati da conseguire**

I risultati della ricerca saranno pubblicati su riviste scientifiche, nazionali ed internazionali, nonché presentati nell'ambito di congressi scientifici ed eventi formativi per il personale del SSN e per i professionisti operanti nel settore e resi disponibili agli Uffici competenti del Ministero della Salute, alle Regioni ed ai referenti degli Istituti Zooprofilattici.

Le informazioni acquisite relativamente alla rilevanza dei tabanidi come vettori dell'AIE verranno diffusi tramite l'Osservatorio Epidemiologico con l'eventuale pubblicazione di note informative.

### **Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto**

Le differenti Unità Operative partecipanti sono in grado di apportare specifici contributi per la realizzazione di tutte le attività specialistiche previste dal progetto, garantendo, attraverso il coinvolgimento di entomologi, epidemiologi e virologi, un approccio multidisciplinare integrato ai

fini dello sviluppo di attività di ricerca nei confronti di una virosi di grande rilevanza in medicina veterinaria.

## **Descrizione e spiegazione dell'articolazione del programma in fasi fra le varie UU.OO**

### Fase 1:

UU.OO. 1, 2, 4 e 5: Selezione dei siti: Sul territorio di Lazio, Liguria ed eventualmente altre regioni dell'Italia centrale recentemente interessate da positività sierologiche all'AIE nella popolazione equina (es. Abruzzo), saranno individuate le aree in cui si è verificata la circolazione virale, anche utilizzando strumenti GIS che consentono tecniche d'analisi spaziale. All'interno di queste aree, saranno selezionate aziende con positività sierologiche storiche, caratterizzate dalla presenza di equidi stabulati all'aperto nel periodo di massima attività dei vettori (maggio-ottobre). Per permettere il confronto qualitativo e quantitativo tra popolazioni di tabanidi presenti in zone epidemiologicamente differenti, i siti di studio saranno scelti, in base ai dati storici della sorveglianza nazionale, a diversa prevalenza dell'infezione (categorizzata come alta, media e bassa).

### Fase 2:

UU.OO. 1 e 5: Effettuazione delle catture: Nei siti così selezionati, nel periodo di massima attività dei vettori, saranno effettuate catture di ditteri della famiglia Tabanidae, utilizzando trappole specificamente ideate per la cattura ed il monitoraggio di questi insetti, Horse Pal ed H-Trap. Si tratta in entrambi i casi di versioni moderne della trappola Manitoba, specificamente ideate per la cattura di insetti ematofagi che cacciano a vista (es. tabanidi e mosche tse-tse). Sfruttano infatti la tendenza dei tafani di volare verso oggetti scuri e mobili che spiccano rispetto allo sfondo. Ove possibile, per aumentarne l'efficacia, le trappole saranno innescate anche con la CO<sub>2</sub> (ghiaccio secco) come attrattivo odoroso. Le trappole saranno posizionate all'esterno dei recinti con gli animali, onde evitare il loro danneggiamento da parte degli stessi. La trappola sarà posizionata in modo da "stagliare" rispetto al paesaggio circostante ed eventualmente tenendo conto della presenza di possibili siti di riposo (es. boschi) o sviluppo larvale (es. aree umide) per i tafani.

Per lo studio dei residui di sangue sui pezzi boccali, saranno effettuate apposite catture, la cui periodicità sarà definita in base ai risultati ottenuti. Per questa specifica attività i campionamenti verranno effettuati in siti, tra quelli utilizzati per lo studio popolazionistico, in cui le catture risultino particolarmente abbondanti. Le trappole opereranno una giornata nelle ore di massima attività dei vettori. I tabanidi catturati verranno rimossi dalla trappola ogni mezz'ora e soppressi mediante ipotermia. Ciascun esemplare sarà dissezionato, asportando il capo dal resto del corpo. Le due parti così ottenute saranno messe in provette appositamente identificate, in modo da mantenere la tracciabilità dell'intero esemplare. Al fine di preservare eventuali residui di sangue sui pezzi boccali, le provette contenenti le teste saranno trasportate a temperatura di refrigerazione e immediatamente congelate all'arrivo in laboratorio.

### Fase 3:

U.O. 1: Smistamento delle catture ed identificazione tabanidi: Le catture verranno trasferite per lo smistamento e l'identificazione dei tabanidi al Laboratorio di Parassitologia e Sorveglianza Entomologica dell'IZSLT. L'identificazione a livello di specie dei tabanidi verrà effettuata mediante analisi morfologica allo stereomicroscopio dei caratteri diagnostici, seguendo le chiavi identificative di Chvala e Portillo-Rubio. Nel Laboratorio di Parassitologia e Sorveglianza Entomologica dell'IZSLT si procederà all'identificazione specifica degli esemplari catturati (utilizzando testa e corpo dello stesso esemplare) e, successivamente i pezzi boccali (mandibole, mascelle e labium) asportati dalle teste verranno trasferiti all'UO3 per l'analisi biomolecolari.

### Fase 4:

U.O. 3: Analisi biomolecolare residui di sangue sui pezzi boccali: L'identificazione dei residui di sangue sui pezzi boccali sarà effettuata mediante PCR, sequenziamento di specifici tratti del DNA amplificato e confronto in Genbank delle sequenze ottenute.

Fase 5:

UU.OO. 1 e 4: Registrazione dati: i dati relativi all'identificazione dei tabanidi catturati e alla ricerca sul sangue presente sui pezzi boccali verranno immessi in appositi data set.

Fase 6:

U.O. 4: Elaborazione statistica dei dati ottenuti;

Fase 7:

UU.OO. 1, 2, 3, 4 e 5: Stesura relazione finale.

### **Output del programma**

Comunicazione dei risultati nell'ambito di eventi formativi e convegni scientifici (mese in relazione a periodo di partecipazione). Pubblicazione di lavori scientifici relativi ai risultati ottenuti (mese in relazione ad accettazione e pubblicazione elaborati).

### **Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati raggiunti**

- Obiettivo: ottenere dati su composizione specifica, abbondanza e stagionalità delle popolazioni dei ditteri della famiglia Tabanidae presenti in aree a diversa prevalenza d'infezione del virus dell'AIE – Indicatore: numero di catture effettuate e dati qualitativi e quantitativi ottenuti sulle diverse specie della famiglia Tabanidae
- Obiettivo: individuare le specie della famiglia Tabanidae più frequentemente associate alle aree a circolazione virale – Indicatore: dati riguardanti presenza ed abbondanza delle diverse specie della famiglia Tabanidae nelle aree a diversa prevalenza d'infezione
- Obiettivo: quantificare la frequenza di tafani catturati con residui di sangue sui pezzi boccali – Indicatore: dati quantitativi riguardanti la percentuale di tafani catturati che presentino residui di sangue sui pezzi boccali
- Obiettivo: valutare la rilevanza epidemiologica dei tafani come veicolo di diffusione del virus – Indicatori: analisi statistica dei dati ottenuti con le catture ed i dati relativi alla circolazione del virus nelle aree oggetto di studio
- Obiettivo: In base alla maggiore o minore concordanza tra dati virologici ed entomologici, ipotizzare altre possibili modalità di trasmissione del virus (es. iatrogena) – Indicatori: analisi statistica dei dati ottenuti con le catture ed i dati relativi alla circolazione del virus nelle aree oggetto di studio

Verranno effettuate periodiche riunioni con i coordinatori delle UU.OO. per la verifica degli obiettivi e dei risultati