



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE SPERIMENTALI VETERINARIE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: SCIENZE BIOMEDICHE VETERINARIE E COMPARATE

XX CICLO

**ASPETTI EPIDEMIOLOGICI E RISCHI ZONOSICI
DELLE MALATTIE TRASMESSE DA VETTORI:
BABESIOSI E LEISHMANIOSI
IN ITALIA NORD-ORIENTALE**

Direttore della scuola: prof. Marco Martini

Supervisore: prof. Mario Pietrobelli

Dottorando: dott. Rudi Cassini

31 gennaio 2008

SOMMARIO

<i>Sommario</i>	3
<i>Indice delle figure</i>	5
<i>Indice delle tabelle</i>	6
RIASSUNTO.....	7
SUMMARY	10
PARTE INTRODUTTIVA	13
1. LE INFEZIONI TRASMESSE DA VETTORI: MALATTIE EMERGENTI?.....	15
1.1. <i>Introduzione</i>	15
1.1.1. Definizione	15
1.1.2. Cenni storici.....	16
1.2. <i>Le infezioni trasmesse da vettori</i>	17
1.2.1. I vettori	18
1.2.2. Le infezioni trasmesse	24
1.3. <i>Cambiamenti nello spazio e nel tempo</i>	27
1.3.1. Cambiamenti climatici e ambientali.....	27
1.3.2. Cambiamenti demografici, economici e sociali	29
1.4. <i>Il controllo delle infezioni trasmesse da vettori</i>	32
1.4.1. Sistemi di Controllo.....	32
1.5. <i>La situazione in Italia nord-orientale</i>	35
1.5.1. Zecche e malattie trasmesse	35
1.5.2. Flebotomi e leishmaniosi.....	36
1.5.3. Altri vettori	37
PARTE SPERIMENTALE.....	39
1. INTRODUZIONE	41
1.1. <i>Casi studio</i>	41
1.2. <i>Approccio dello studio</i>	42
1.2.1. Dal particolare al generale: le mappe di rischio	42
2. BABESIOSI DEI RUMINANTI DOMESTICI E SELVATICI: RISCHIO ZONOSICO?.....	45
2.1. <i>Introduzione</i>	45
2.1.1. Situazione in Italia	45
2.1.2. Aspetti zoonosici	45
2.1.3. Obiettivi della ricerca	46
2.2. <i>Materiali e Metodi</i>	46
2.2.1. Campionamenti.....	47
2.2.2. Analisi di laboratorio	49
2.2.3. Analisi statistica.....	51
2.3. <i>Risultati</i>	53
2.3.1. Microscopia e sierologia.....	53
2.3.2. Analisi biomolecolari	55
2.3.3. Analisi dei fattori di rischio	56
2.4. <i>Considerazioni</i>	57
2.4.1. Ovini e caprini	58
2.4.2. Bovini	58

2.4.3.	Ruminanti selvatici.....	61
2.4.4.	Aspetti diagnostici.....	62
2.5.	<i>Conclusioni</i>	62
3.	LEISHMANIOSI CANINA IN ITALIA NORD-ORIENTALE: QUALI FATTORI DI RISCHIO?...	65
3.1.	<i>Introduzione</i>	65
3.1.1.	Situazione in Italia.....	65
3.1.2.	Obiettivi della ricerca	66
3.2.	<i>Materiali e Metodi</i>	68
3.2.1.	Campionamento	68
3.2.2.	Analisi di laboratorio.....	75
3.2.3.	Analisi statistica	77
3.3.	<i>Risultati</i>	79
3.3.1.	Indagini sulle popolazioni canine.....	79
3.3.2.	Indagini sul vettore.....	85
3.4.	<i>Considerazioni</i>	92
3.4.1.	Comparazione tra le aree.....	92
3.4.2.	Fattori di rischio	97
3.4.3.	Monitoraggio e controllo.....	99
3.5.	<i>Conclusioni</i>	101
4.	CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....	102
	BIBLIOGRAFIA	105
	RINGRAZIAMENTI.....	116

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1.1: esemplare femmina di <i>Ixodes ricinus</i>	19
Figura 1.2: esemplare di flebotomo (foto F. Montarsi)	21
Figura 1.3: esemplare di pulce	23
Figura 2.1: visita e prelievo da specie domestiche	48
Figura 2.2: strutture per il prelievo da specie selvatiche	48
Figura 2.3: area di provenienza dei campioni di ruminanti selvatici	53
Figura 2.4: esame microscopico del campione PD-254-BV	54
Figura 3.1: distribuzione dei focolai di leishmaniosi (1: VR, 2: TN; 3: TV) e aree considerate (A: Majano; B: Colli Euganei e Berici; C: Caneva; D: Verona)	67
Figura 3.2: scheda raccolta dati per campionamento su popolazioni canine.....	69
Figura 3.3: prelievo di sangue durante giornata di campionamento.....	70
Figura 3.4: giornata di campionamento di Rivadolmo, Comune di Baone (PD).....	71
Figura 3.5: distribuzione geografica dei siti di campionamento dei flebotomi.....	74
Figura 3.6: <i>CDC light trap</i>	74
Figura 3.7: <i>sticky trap</i>	75
Figura 3.8: sieroprevalenza per classi di età (popolazione dei Colli Euganei).....	84
Figura 3.9: apparato genitale maschile di <i>P. neglectus</i> (sn) e di <i>P. perniciosus</i> (dx) ...	86
Figura 3.10: apparato genitale femminile di <i>P. neglectus</i>	87
Figura 3.11: apparato genitale femminile di <i>P. perniciosus</i>	87
Figura 3.12: andamento stagionale dei flebotomi in due siti dei Colli Euganei.....	91
Figura 3.13: distribuzione per titoli dei campioni positivi all'IFI nel 2005 e nel 2006	93

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1.1: infezioni parassitarie trasmesse da vettori.....	24
Tabella 1.2: infezioni batteriche trasmesse da vettori	25
Tabella 1.3: infezioni virali trasmesse da vettori.....	26
Tabella 2.1: ciclo di amplificazione per analisi PCR sui coaguli	50
Tabella 2.2: titoli anticorpali dei campioni positivi sierologicamente.....	54
Tabella 2.3: positività all'analisi biomolecolare per le diverse specie di ospiti.	55
Tabella 2.4: ruminanti selvatici positivi alla PCR divisi per area di provenienza.....	57
Tabella 3.1: caratteristiche dei siti di cattura dei flebotomi.....	73
Tabella 3.2: caratteristiche delle popolazioni canine indagate	79
Tabella 3.3: numero di cani prelevati e numero di positivi per giornata di campionamento.....	80
Tabella 3.4: dati dei cani positivi nei campionamenti dei Colli Euganei	82
Tabella 3.5: confronto tra le densità di flebotomi nelle diverse aree.....	85
Tabella 3.6: densità e specie riscontrate per ogni sito dell'area di Caneva	88
Tabella 3.7: densità e specie riscontrate per ogni sito dell'area di Verona.....	89
Tabella 3.8: densità e specie riscontrate per ogni sito dell'area dei Colli Euganei	90
Tabella 3.9: densità e specie riscontrate per ogni sito dell'area dei Colli Berici.....	91
Tabella 3.10: test IFI eseguiti presso l'IZSVe, divisi per Provincia di provenienza ...	92

RIASSUNTO

Introduzione

Le malattie trasmesse da vettori sono contraddistinte da aspetti epidemiologici peculiari, essendo il risultato di una complessa interazione tra agenti patogeni (virus, batteri, protozoi, elminti), ospiti vertebrati, artropodi vettori e ambiente.

Le infezioni trasmesse da vettori sono recentemente tornate alla ribalta tra le priorità sanitarie internazionali, anche in seguito a improvvise epidemie di larga scala, come per la West Nile Fever negli Stati Uniti o per la Bluetongue in Europa.

In molti casi la comparsa o la ricomparsa di tali malattie viene associata al cambiamento climatico, anche se spesso intervengono anche altri fattori di natura demografica, socio-economica o semplicemente accidentale.

Anche in Italia settentrionale, come più in generale nell'Europa continentale, le malattie trasmesse da vettori stanno ricevendo sempre più attenzione, sia per il riscontro di infezioni precedentemente non presenti, sia per l'aumentata incidenza di infezioni storicamente presenti.

In questa Tesi vengono presentati i risultati di 3 anni di indagini finalizzati allo studio della epidemiologia della babesiosi dei ruminanti e della leishmaniosi canina in Italia nord-orientale.

Babesiosi

Sono stati raccolti campioni ematici da 116 bovini, 83 ovini, 24 caprini e 81 ruminanti selvatici, e le zecche eventualmente presenti sugli animali. Quando possibile, è stato effettuato lo striscio, mentre i sieri prelevati da bovini sono stati analizzati mediante test di immunofluorescenza indiretta (IFI). Sono state condotte analisi biomolecolari (PCR) per la ricerca di *Babesia* spp. sia sui coaguli di sangue che sulle zecche.

Solo un campione prelevato da un bovino è risultato positivo all'esame microscopico. Il 53,4% (62/116) dei bovini sono risultati positivi per *B. bovis* e il 10,3% (12/116) per *B. bigemina*, anche se a bassi titoli. Tutti gli 83 campioni ovini e i 24 caprini sono risultati negativi alle analisi biomolecolari, mentre 21 bovini (19,1%) e 29 ruminanti selvatici (35,8%) sono risultati positivi per "piroplasmosi". L'analisi delle sequenze ha consentito di individuare 15 campioni positivi per *Babesia microti*-like, 1 per *Babesia microti*, 1 per

Babesia divergens e 4 per *Theileria buffeli* tra i bovini; 5 *Theileria* spp., 21 *Babesia divergens*-like, 1 *Babesia* EU1 e 2 *Babesia ovis* tra i ruminanti selvatici. Tra le 166 zecche raccolte la specie predominante era *Ixodes ricinus*; tutte sono risultate negative all'analisi biomolecolare per il genere *Babesia*.

L'indagine ha permesso di rilevare una 'circolazione' inaspettatamente alta di protozoi del genere *Babesia* sia nei bovini che nei ruminanti selvatici, ma particolare interesse riveste soprattutto l'identificazione, in un capriolo della Provincia di Verona, del ceppo *Babesia* EU1. Si tratta infatti dello stesso ceppo segnalato come agente di zoonosi in Italia, in un cacciatore splenectomizzato e residente in un'area rurale dell'Emilia Romagna.

Leishmaniosi

Nel corso dei 3 anni della ricerca sono state prese in considerazione 5 aree: area a nord-est di Verona, Colli Berici (VI), Colli Euganei (PD), Caneva (PN), Majano (UD). Presso le ultime 3 aree citate, sono state organizzate 4 giornate di prelievi gratuiti per i cani della zona, e i sieri raccolti sono stati analizzati con la tecnica IFI. Quando possibile è stata effettuata la ricerca diretta di *Leishmania* mediante puntato linfonodale e tramite analisi PCR per i cani positivi al sierologico. Durante i tre anni dello studio, in parallelo con le indagini sulla popolazione ospite, sono state condotte indagini di tipo entomologico, utilizzando trappole adesive (*sticky trap*) e ad attrazione luminosa (*CDC light trap*). Per tutti i flebotomi raccolti si è proceduto ad una diagnosi di specie.

In totale sono stati analizzati 1.032 sieri di cane e 39 sono risultati positivi (3,8%), con valori di sieroprevalenza che variano dallo 0,8% di Caneva al 10,0% del primo campionamento dei Colli Euganei, valore poi sceso al 5,2% nel 2007. L'analisi dei fattori di rischio, fatta solo per la popolazione dei Colli Euganei, ha indicato come unico fattore il fatto di risiedere in una zona collinare del Comune di Baone. La maggior parte dei positivi è stata trovata infatti nella località collinare di Calaone.

Per quanto riguarda le indagini entomologiche sono state posizionate in tutto 2.915 *sticky trap*, corrispondenti a 116,6 m². In parallelo sono state fatte 52 notti di cattura mediante *CDC light trap*. Le densità annuali complessive si sono mantenute per tutte le aree su valori inferiori ai 2 flebotomi/m² e hanno raggiunto il valore massimo di 3,11 flebotomi/m² (area dei Colli Euganei nell'anno 2007).

Le attività di monitoraggio effettuate in questi ultimi due anni hanno confermato il trend di diffusione dei focolai di leishmaniosi canina in Italia nord-orientale, individuando, per la prima volta, casi autoctoni in Friuli Venezia Giulia. Le aree prese in considerazione hanno mostrato tra loro una certa diversità rispetto all'effettiva presenza e livello di diffusione della leishmaniosi canina, passando da una sostanziale assenza del patogeno (Majano), ad una scarsa circolazione dello stesso con conseguente presenza di un focolaio instabile (Caneva) fino a realtà in cui si è di fronte a focolai ormai stabilizzati (Verona, Colli Euganei).

Conclusioni

I due casi studio presentati testimoniano come le infezioni considerate siano un potenziale rischio per la Sanità Pubblica. I risultati delle indagini condotte in questi tre anni confermano l'importanza di una adeguata sorveglianza delle infezioni trasmesse da vettori anche nel territorio dell'Italia nord-orientale.

Come primo passo i dati di presenza e densità dei vettori raccolti, così come quelli di sieroprevalenza e positività biomolecolare, potranno essere associati a diversi parametri di tipo ambientale, demografico e amministrativo, permettendo l'individuazione dei principali fattori di rischio e la creazione di mappe di rischio.

SUMMARY

Introduction

Vector-Borne Diseases are characterised by peculiar epidemiologic features, as a consequence of a complex interaction among parasites, hosts, vectors and environment.

Vector borne infections are now again a priority worldwide, after huge epidemics, such as West Nile Fever in the United States and Bluetongue in Europe.

Emergence or re-emergence of these diseases are usually associated with climatic change, but also other factors are involved, such as demographic, socio-economic and accidental factors.

Similarly with continental Europe, also in northern Italy researchers are paying more attention to vector borne infections, because of the introduction of new infections or the increasing incidence rate for infections already present.

The results of 3 years epidemiological investigations about ruminants babesiosis and canine leishmaniasis in north-eastern Italy are presented.

Babesiosis

Totally 116 cattle, 83 sheep, 24 goats and 81 wild ruminants were sampled, collecting blood and ticks found on the animals. Whenever possible a smear was prepared and bovine sera were analysed by IFAT. Both blood clot and ticks were investigated for *Babesia* spp. by biomolecular analysis.

Only one sample, collected from a cattle, resulted positive to microscopic examination. Concerning serology, 53,4% (62/116) were positive to *B. bovis* and 10,3% (12/116) to *B. bigemina*, even if with low titres. All 83 sheep and 24 goats were negative to biomolecular assay, while 21 bovines (19,1%) e 29 wild ruminants (35,8%) resulted positives to "piroplasm". Sequence analysis identified 15 positive samples for *Babesia microti*-like, 1 for *Babesia microti*, 1 for *Babesia divergens* and 4 for *Theileria buffeli* among bovines; 5 *Theileria* spp., 21 *Babesia divergens*-like, 1 *Babesia* EU1 e 2 *Babesia ovis* among wild ruminants. Out of the 166 collected ticks (mainly *Ixodes ricinus*) none resulted positive.

The outcomes of the research indicated a *Babesia* circulation among bovines and wild ruminants higher than expected. The identification of a *Babesia* EU1 strain in a roe deer in Verona District is particularly important, since the same strain was previously isolated

from a hunter living in Emilia Romagna, at present the only Italian case of human babesiosis.

Leishmaniosis

During the 3 years researching period, 5 areas were identified: area north-east to Verona, Colli Berici (VI), Colli Euganei (PD), Caneva (PN), Majano (UD). In the latter 3 areas, a total amount of 4 sampling days were organised, targeting dogs from surroundings. Sera collected were analysed by IFAT. Whenever possible sero-positive dogs were controlled by lymphnodal needle aspiration and PCR for *Leishmania*. At the same time, entomological investigation were carried out, using sticky trap and CDC light trap. All sand-flies collected were identified.

Out of the total 1.032 dogs sera analysed, 39 resulted positive (3,8%), with different seroprevalence among areas, ranging from 0,8% in Caneva to 10,0% in Colli Euganei in the 2006, later decreased to 5,2% in 2007. Epidemiological investigation, only performed for Colli Euganei dog population, indicated as the only significant risk factor the provenience from an hilly area of Baone municipality. Most of the positive dogs, in fact, were found in Calaone, a small village on a hill in Baone municipality.

During entomological investigation 2.915 *sticky trap* were used, corresponding to 116,6 m², and 52 sampling nights with *CDC light trap* were performed. Annual densities were always below 2 sand flies/m² for all areas and highest value was 3,11 sand flies/m² (Colli Euganei area in the year 2007).

Monitoring activities confirmed canine leishmaniosis spreading trend in north-eastern Italy, identifying autochthonous cases in Friuli Venezia Giulia for the first time. Areas considered show different epidemiological pictures, ranging from a substantial absence (Majano) to a low (Caneva) or a high circulation (Verona, Colli Euganei) of *Leishmania*. The latter is indicative of stable foci of canine leishmaniosis.

Conclusions

The two case studies presented show that these infections are a potential threat to Public Health. Outcomes of the research confirm the importance of a proper surveillance of vector-borne infections also in north-eastern Italy.

A first step can be represented by the identification of main risk factors through the analysis of the epidemiological and entomological data collected in association with

environmental, demographic and administrative data. The expected output will be the production of risk maps for vectors and transmitted diseases.

PARTE INTRODUTTIVA

1. LE INFEZIONI TRASMESSE DA VETTORI: MALATTIE EMERGENTI?

1.1. INTRODUZIONE

In questa prima parte della tesi si intende inquadrare, da un punto di vista generale, il complesso ‘mondo’ delle infezioni trasmesse da vettori, partendo con una breve descrizione dei più importanti vettori di malattie e delle infezioni trasmesse. Non si ha la pretesa di essere esaustivi, ma si cercherà di evidenziare la notevole quantità di infezioni descritte e la presenza di alcune tra le malattie di maggiore attualità, a causa del loro impatto economico e sociale, verrà inoltre affrontato il tema dei possibili futuri cambiamenti nella diffusione spaziale o nell’incidenza temporale di queste malattie, cercando di analizzarne le probabili cause, prima fra tutte quella più volte invocata del cambiamento climatico (riscaldamento globale). Verranno anche discussi i metodi di indagine e i piani di sorveglianza fino ad ora ipotizzati e, a volte, realizzati nel tentativo di controllare questa particolare tipologia di infezione, focalizzandosi sull’utilizzo ormai comune di strumenti innovativi, tra cui i Sistemi Informativi Territoriale (G.I.S.- Geographical Information Systems) e la Rilevazione Remota (R.S.- Remote Sensing). Infine, passando dal globale al locale, si cercherà di presentare la situazione dell’Italia nord-orientale, area in cui è stato realizzato il lavoro sperimentale della Tesi, riportando i risultati di indagini recenti in materia di vettori e malattie trasmesse.

1.1.1. *Definizione*

Le malattie trasmesse da vettori sono contraddistinte da aspetti epidemiologici peculiari, solo in parte studiati e capiti. Il loro aspetto caratterizzante è sicuramente la via di trasmissione dell’infezione che avviene grazie ad un organismo in grado di veicolare il patogeno da un ospite all’altro (Pampiglione e Canestri Trotti, 1990). Questa entità viene definita ‘vettore’ ed è rappresentata nella maggior parte dei casi da un artropode ematofago.

Le malattie trasmesse da vettori sono dunque il risultato di una complessa interazione tra il patogeno considerato (virus, batteri, protozoi, elminti), gli ospiti vertebrati, gli artropodi vettori e l'ambiente di cui tutti fanno parte.

Nel caso di zone endemiche per malattie sostenute da emoprotozoi trasmessi da artropodi, ci si trova di fronte ad una situazione di cosiddetta 'stabilità enzootica' (Norval *et al.*, 1992). Tale situazione prevede una forte circolazione del patogeno all'interno della popolazione di ospiti vertebrati, grazie ad una adeguata densità del vettore e ad idonee condizioni ambientali. In tali casi la malattia è raramente evidente, perché gli ospiti giovani entrano in contatto precocemente con il patogeno, sviluppando un'immunocompetenza che li protegge dalla manifestazione clinica e non dall'infezione, che così si mantiene presente. Per tale motivo è meglio parlare di infezioni trasmesse da vettori, in quanto, anche se la malattia non è clinicamente evidente in una determinata popolazione, può invece essere presente l'infezione, con il rischio che cambiamenti ambientali di svariata tipologia portino ad una improvvisa 'ricomparsa' della malattia.

Nel presente lavoro verrà usato di preferenza il termine "infezioni trasmesse da vettori", considerando in tal modo tutte quelle situazioni in cui un determinato patogeno circola all'interno di popolazioni di ospiti e vettori, anche se il tutto non è clinicamente evidente. In alcuni casi, come ad esempio nello stesso titolo della presente tesi, si userà il termine 'malattie', in modo sostanzialmente analogo, ma richiamando maggiormente l'attenzione sugli aspetti clinici causati da tali infezioni ed anche in parte cedendo alla maggior notorietà e al maggior utilizzo che gode tale termine, sia nella letteratura nostrana che in quella internazionale, dove addirittura il termine 'Vector-Borne Diseases' può essere sinteticamente reso dall'acronimo VBD.

1.1.2. Cenni storici

La capacità di alcuni artropodi ematofagi di trasmettere malattie viene oggi considerata una ovvietà, ma non deve essere stato semplice questa scoperta. Il primato scientifico sembra spettare a Sir Patrick Manson capace di dimostrare, nel 1878, che l'elefantiasi causata del nematode *Wuchereria bancrofti*, era trasmessa dalla zanzara *Culex quinquefasciatus* (Marquardt, 1996).

Più tardi, alla fine del XIX secolo, un gruppo di scienziati statunitensi (Theobald Smith, Fred Kilbourne e Cooper Curtice), dimostrò la capacità della zecca *Boophilus annulatus* di trasmettere la Texas Cattle Fever (Malone, 1989). Seguirono, nel giro di pochi anni, altre scoperte sulle capacità vettoriali di molti artropodi, spiegando così uno degli aspetti epidemiologici fondamentali di malattie particolarmente diffuse e importanti, come la malaria e la febbre gialla (Marquardt, 1996).

In realtà, qualcuno aveva già intuito questo peculiare sistema di trasmissione delle malattie molto tempo prima, ma non aveva avuto la possibilità, o la necessità, di dimostrarlo scientificamente. Nel 1764, Cosme Bueno riportò, in un libro, le conoscenze etno-veterinarie riguardo alla trasmissione della leishmaniosi cutanea nelle Ande peruviane e annotò che gli abitanti del luogo ritenevano che la malattia originasse dalla puntura di un piccolo insetto chiamato “uta”: si trattava di una specie di flebotomo (Herrer e Christensen, 1975).

Ovviamente si è dovuto attendere ancora un po’ di tempo prima che ci fossero solide evidenze scientifiche della capacità dei flebotomi di trasmettere la leishmaniosi. Nel 1921 un volontario sviluppò la leishmaniosi cutanea dopo essersi fatto inoculare con un triturato di flebotomi raccolti in natura, mentre nel 1941, grazie ad altri volontari, è stato possibile dimostrare la trasmissione di *Leishmania tropica* attraverso la puntura di flebotomi infettati sperimentalmente (Herrer e Christensen, 1975).

1.2. LE INFEZIONI TRASMESSE DA VETTORI

Il comportamento di cibarsi di sangue si è evoluto in modo indipendente in una svariata moltitudine di taxa animali (ad esempio negli insetti, nelle zecche, nelle sanguisughe, nei pipistrelli). Anche all’interno di un singolo gruppo di insetti, come ad esempio i ditteri, è probabile che questa abitudine alimentare si sia sviluppata in modo indipendente in diverse famiglie (Ribeiro, 1996).

Questa peculiare caratteristica, comune a molte specie di artropodi, è stata velocemente sfruttata da una altrettanto svariata moltitudine di parassiti (intendendo in senso lato virus, batteri e parassiti propriamente detti) come sistema di ricerca di un nuovo ospite.

Nei paragrafi seguenti vengono presentati in modo necessariamente succinto i principali artropodi vettori, soffermandosi con più attenzione sui due gruppi che saranno poi oggetto della parte sperimentale: le zecche e i flebotomi.

In modo breve e schematico, saranno inoltre riportate le caratteristiche di alcune delle malattie trasmesse dai vari artropodi vettori, dividendole per tipologia di patogeno.

1.2.1. I vettori

1.2.1.1. Zecche

Le zecche sono artropodi ematofagi (ordine: Acarina, sub-ordine: Ixodida), che compiono generalmente un solo pasto di sangue per ogni stadio evolutivo e sono in grado di colpire sia gli animali che l'uomo. Oltre alle azioni patologiche di tipo diretto (anemizante, traumatica, allergizzante, tossica), diverse specie di zecche sono in grado di fungere da vettori per una ampia gamma di patogeni, dai virus agli elminti. Le zecche sono parassiti obbligati, ma temporanei.

Il gruppo delle zecche, al cui interno esistono più di 900 specie, si dividono in due grandi famiglie: Argasidae (zecche molli), che parassitano principalmente gli uccelli, e Ixodidae (zecche dure), tipicamente riscontrabili nei mammiferi.

L'intero ciclo vitale delle zecche dure si completa in settimane, mesi o anni, con durata dipendente dalla specie in questione e dalle condizioni climatiche (soprattutto temperatura ed umidità). Lo sviluppo si svolge attraverso 4 stadi: dall'uovo che schiude fuoriesce una larva esapode, che muta in ninfa e poi in adulto, entrambi stadi ad otto zampe. Per le mutazioni da larva ad adulto ogni stadio necessita di un pasto di sangue.

Sono organismi relativamente poco mobili, compiono pochi pasti ma abbondanti. Nella femmina, dopo la fecondazione e il pasto di sangue, c'è un periodo di pre-deposizione a cui segue l'ovodeposizione nel terreno di un'unica massa, con numeri molto elevati di uova. Dopo questa unica deposizione, la femmina muore.

Qualche giorno dopo la schiusa, i tegumenti della larva si chitinizzano e inizia la ricerca del suo ospite. Dopo essersi fissata alla cute grazie all'ipostoma, compie il suo pasto di sangue e si trasforma in ninfa. La fissazione avviene, in una prima fase, grazie al movimento degli uncini e quindi alla penetrazione dei cheliceri mentre in una seconda fase si ha la produzione, da parte delle ghiandole salivari, di un secreto in grado di

depolimerizzare la sostanza fondamentale del derma (ialuronidasi simile) creando una sorta di cemento lipoproteico conico attorno all'ipostoma e ai cheliceri che ancorano l'artropode alla cute (Estrada-Pena e Jongejan, 1999). L'azione vettoriale delle zecche è favorita dal fatto che durante il pasto la zecca rilascia secreti salivari contenenti sostanze anticoagulanti, anestetizzanti, antinfiammatorie, in grado di depolimerizzare il collagene ed interferire sulla reazione immunitaria locale; inoltre alla fase di assunzione segue una fase di rigurgito di larga parte della quota liquida (Kaufman, 1989) dovuta alla necessità di mantenere l'equilibrio idrostatico.



Figura 1.1: esemplare femmina di *Ixodes ricinus*

Le zecche molli hanno un ciclo più complesso, con molteplici stadi ninfali. Le femmine compiono pasti di sangue ripetuti e brevi. Spesso depongono le uova tra un pasto e il successivo e l'ovodeposizione può ripetersi numerose volte.

Anche se è stata più volte sospettata, al momento attuale la capacità vettoriale delle zecche molli sembra essere di gran lunga inferiore rispetto a quella delle Ixodidae. Le azioni patologiche maggiori, nel caso degli Argasidae, sono invece legati alla capacità di liberare tossine o di stimolare reazioni allergiche, tipica di alcune specie.

1.2.1.2. Flebotomi

I flebotomi (ordine: Diptera, famiglia: Psychodidae) sono vettori della leishmaniosi, ma possono trasmettere anche alcuni tipi di virus, tra cui phlebovirus, flavivirus, orbivirus e vesiculovirus (Comer e Tesh, 1991), divenendo causa di problemi sanitari per l'uomo e per gli animali domestici.

Il termine diptero deriva dal greco "di-pteros" che significa "a due ali", infatti gli insetti appartenenti all'ordine Diptera sono caratterizzati dall'aver un solo paio di ali (quelle anteriori) poiché quelle posteriori si sono modificate in piccoli organi claviformi detti bilancieri.

Il nome Psychodidae, dal greco "Psyche" (anima) deriva dal fatto che essi, durante i loro brevi e frequenti spostamenti, compaiono e scompaiono come 'ombre', in quanto, essendo pessimi volatori, vengono facilmente trasportati dal vento. La famiglia viene distinta in due sottofamiglie, Psychodinae e Phlebotominae; quest'ultima comprende tutte le specie fino ad ora descritte di flebotomi (oltre 600). Flebotomo letteralmente significa "tagliatore di vene". Attualmente i flebotomi riconosciuti a livello internazionale vengono classificati in cinque generi: *Phlebotomus* e *Sergentomyia* comprendono quelli presenti nel Vecchio Mondo; *Warileya*, *Lutzomyia* e *Brumptomyia* quelli presenti in America Centrale e Meridionale (Lewis, 1982).

I flebotomi sono insetti di piccola taglia (2-3 mm), di colore giallo pallido o giallo ruggine, ad andatura simile a quella delle zanzare. Il corpo e le ali sono ricoperti da una fitta peluria. I maschi sono riconoscibili, per la maggior parte, dai loro segmenti genitali molto sviluppati. In entrambi i sessi il corpo forma con il torace e l'addome un angolo quasi retto, caratteristica questa, che li rende riconoscibili anche ad occhio nudo (fig. 1.2).

L'areale geografico occupato dai flebotomi è vasto e comprende diverse regioni del globo ma qualunque sia la latitudine o longitudine, lo sviluppo delle loro larve terricole esige una temperatura relativamente costante, una oscurità quasi completa, un mezzo nutritivo formato da materiale organico e un grado di umidità relativa pressoché vicino alla saturazione. Il ciclo biologico si svolge con una metamorfosi completa dove la fase preimaginale presenta uno stadio embrionale di uovo, quattro stadi larvali ed uno pupale.

Durante il giorno i flebotomi riposano in luoghi relativamente umidi e freschi quali abitazioni, cantine, stalle, grotte, barbacani, tane di animali selvatici, termitai o anche in crepe nei muri, nella roccia o nel suolo (Felicciangeli, 2004). I flebotomi sono insetti

notturni, anche se qualche specie può pungere di giorno, iniziano la loro attività al calare della notte con picchi di massima operosità dopo il tramonto (Killick-Kendrick, 2002), intorno alla mezzanotte ed un'ora prima del sorgere del sole. Gli adulti appaiono durante la stagione calda nelle zone temperate e in densità variabili sono presenti durante tutto l'anno nelle regioni tropicali. Generalmente non percorrono grosse distanze dai focolai larvali e sono disturbati dal vento e da temperature al di sotto della media estiva, infatti nelle notti in cui si manifestano queste condizioni metereologiche la loro attività è notevolmente ridotta.



Figura 1.2: esemplare di flebotomo (foto F. Montarsi)

Nella ricerca dell'ospite la femmina del flebotomo mostra un comportamento silenzioso ed è per questo conosciuta in Italia anche come “pappatacio” (‘pappare in silenzio’). Il volo di questi insetti è di breve durata ed estensione, generalmente poche centinaia di metri anche se in esperimenti di campo (rilascio e ricattura) la massima distanza registrata è stata di 2,3 km (Killick-Kendrick *et al.*, 1984).

Sia i maschi che le femmine si nutrono su fonti naturali di zucchero, come la linfa delle piante o le secrezioni degli afidi. La femmina di flebotomo ha però bisogno di un ‘pasto’ di sangue per la maturazione delle uova. Sono stati descritti comunque fenomeni di autogenia che possono instaurarsi in condizioni sfavorevoli (El Kammah, 1972). Le femmine della maggior parte delle specie sono esofaghe (attaccano l'ospite all'esterno) e possono essere anche esofile (durante il periodo di digestione del pasto di sangue e maturazione delle uova

sostano all'esterno). Tali specie difficilmente possono essere controllate mediante l'uso di insetticidi all'interno delle abitazioni.

1.2.1.3. Zanzare

Le zanzare (ordine: Diptera; famiglia: Culicidae) costituiscono il gruppo di insetti di maggiore interesse sanitario, sia come semplici ectoparassiti (provocando nell'ospite reazioni cutanee di intensità variabile a seconda della sensibilità individuale) che come vettori biologici di agenti infettivi e parassitari. Ben conosciuto è infatti il loro coinvolgimento nella trasmissione di plasmodi malarici (*Plasmodium* spp.), di arbovirus (delle famiglie Bunyaviridae, Togaviridae e Flaviviridae) e di numerose specie di nematodi (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia* spp., *Dirofilaria* spp. e *Setaria* spp.).

Alla famiglia Culicidae appartengono le sottofamiglie Culicinae e Anophelinae. Grazie al loro elevato grado di adattabilità le zanzare hanno colonizzato qualsiasi tipo di ambiente. Esse sono infatti presenti in tutto il mondo, dove si contano oltre 3000 specie, e vivono in aree dove vi è notevole disponibilità di acqua, necessaria per la riproduzione.

I culicidi sono caratterizzati da simmetria bilaterale e organizzazione metamerica. Il corpo, di lunghezza variabile dai 4 ai 10 mm, è diviso in tre regioni: capo, torace e addome. Presentano tre paia di zampe, lunghe e sottili, articolate al torace e composte da femore, tibia e cinque segmenti tarsali.

Durante il ciclo vitale, le zanzare attraversano gli stadi di sviluppo di uovo, larva (di I, II, III e IV stadio), pupa o ninfa, adulto. Il loro sviluppo è legato all'acqua, infatti i primi tre stadi del ciclo biologico (uovo, larva, pupa), che precedono lo sfarfallamento dell'adulto, sono acquatici. Avvenuto lo sfarfallamento, gli adulti raggiungono la maturità sessuale dopo 1-2 giorni. Mentre il maschio si nutre di succhi vegetali, la femmina è anche ematofaga e presenta un apparato buccale di tipo pungitore-succhiatore.

La maggior parte dei culicidi alterna l'assunzione di sangue all'ovodeposizione, ma fattori ambientali (in particolare le variazioni stagionali di temperatura) possono influire sul numero di pasti necessari per portare a maturazione le uova.

Nelle regioni tropicali le generazioni di zanzare si susseguono per tutto l'anno, mentre in quelle a clima temperato la presenza degli adulti è stagionale e limitata solitamente alla tarda primavera e all'estate. I culicidi sono però in grado di sopravvivere al periodo invernale in vari modi. Alcune specie del genere *Aedes* entrano in diapausa allo stadio di

uovo, altri culicidi superano i periodi freddi allo stadio di larva inattiva, mentre in altre specie le femmine già fecondate cercano in autunno dei luoghi umidi e poco illuminati, adatti per ibernare.

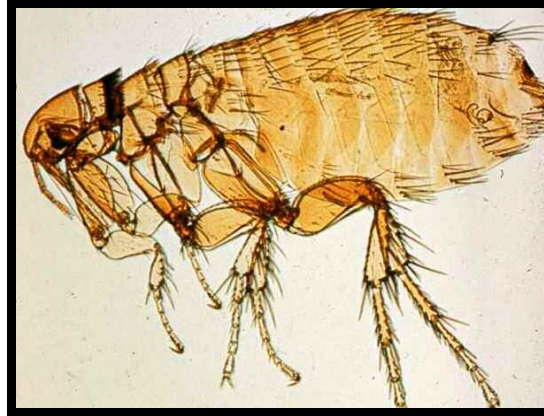


Figura 1.3: esemplare di pulce

1.2.1.4. Altri vettori

Oltre ai tre grossi gruppi di artropodi vettori descritti nei precedenti paragrafi, esistono, all'interno della classe Insecta, molte altre specie con potenzialità vettoriale, la cui importanza varia a seconda dell'area geografica presa in considerazione.

Culicoides (ordine: Diptera; famiglia: Ceratopogonidae) è un piccolo e robusto insetto, lungo fino a 6 mm e simili ai simuliidi (Holbrook, 1996). Noto per il fastidio conseguente alla puntura particolarmente dolorosa e pruriginosa, cui si aggiunge in alcuni soggetti l'azione allergenica. Questi insetti stanno assumendo sempre maggiore importanza, anche in Europa, per la capacità di trasmettere il virus della Bluetongue.

I Simuliidi (ordine: Diptera; famiglia: Simuliidae) sono insetti olometaboli i cui primi 3 stadi di vita (uovo, larva, pupa) si sviluppano nell'acqua corrente. I Simuliidi rappresentano un importante problema di Sanità Pubblica in molte parti del mondo, a causa soprattutto dell'attività ematofaga particolarmente aggressiva delle femmine adulte (Cupp, 1996). Oltre alla capacità di produrre tossine tipica di alcune specie, questi insetti sono vettori di agenti virali (vesciculovirus) e protozoari (*Leucocytozoon* e *Trypanosoma*). La malattia forse più grave di cui sono vettori è però l'oncocercosi, sostenuta da varie specie del genere *Onchocerca*, parassiti sia degli ungulati che dell'uomo.

Le Pulci (ordine: Siphonaptera) sono insetti olometaboli, privi di ali e con il terzo paio di zampe particolarmente adatto al salto. Generalmente il loro ciclo prevede una fase adulta

ematofaga, che vive sull'ospite, mentre le prime fasi di vita (dall'uovo alla pupa) possono vivere sullo stesso ospite o nel suo ambiente di vita abituale. L'importanza vettoriale delle pulci è storicamente legata alla loro capacità di trasmettere la peste (*Yersinia pestis*), anche se molti altri patogeni possono riconoscere le pulci come vettori. Ad esempio sono trasmesse da pulci alcune importanti malattie batteriche, come il tifo murino (*Rickettsia typhi*), la mixomatosi e la tularemia, ma anche un comune parassitosi zoonotica come la parassitosi sostenuta da *Dypilidium caninum*. Più recentemente è stata riconosciuta l'importanza di *Rickettsia felis*, patogeno trasmesso da alcune specie di pulci strettamente legate all'uomo e agli animali da compagnia, come causa di malattia per l'uomo (Parola *et al.*, 2005).

Oltre a questi ulteriori tre gruppi, brevemente descritti per la loro diffusione tendenzialmente ampia e per l'importanza delle malattie trasmesse, esistono ancora altre specie di artropodi in grado di agire da vettori di malattia, la cui importanza è generalmente minore e che, pertanto, non saranno prese in considerazione in questa sede.

1.2.2. *Le infezioni trasmesse*

1.2.2.1. **Infezioni da parassiti**

Nella tab. 1.1 sono riportate le maggiori infezioni da protozoi ed elminti trasmesse da vettori, tra quelle che vedono coinvolto anche l'uomo.

Gruppo	Vettore	Malattia	Agente Eziologico	Diffusione	Serbatoio	Altri Ospiti
Zecche	Varie specie di Ixodidae	Babesiosi, Theileriosi (Piroplasmosi)	<i>Babesia</i> spp. <i>Theileria</i> spp.	Tutto il mondo	Mammiferi	Uomo, bovino, cavallo, cane
Zanzare	<i>Anopheles</i> spp.	Malaria	<i>Plasmodium</i> spp.	Zona tropicale	Roditori, carnivori, erbivori	Uomo
	<i>Culex</i> spp., <i>Aedes</i> spp., Simulidi	Filariosi	<i>Dirofilaria</i> spp.	Tutto il mondo	Carnivori	Uomo, carnivori
	Varie specie	Filariosi linfatica	<i>Wuchereria</i> spp. <i>Brugia</i> spp.	Zone tropicali	Uomo	Uomo
Altri	Simulidi	Oncocercososi	<i>Onchocerca volvulus</i>	Africa, Sud America	Bovini	Uomo
	<i>Phlebotomus</i> spp. <i>Lutzomyia</i> spp.	Leishmaniosi	<i>Leishmania</i> spp.	Tutto il mondo	Cane	Uomo, cane

Tabella 1.1: infezioni parassitarie trasmesse da vettori

1.2.2.2. Infezioni batteriche

Nella seguente tab. 1.2 sono riportate le maggiori infezioni batteriche trasmesse da vettori, tra quelle con risvolti zoonosici.

Gruppo	Vettore	Malattia	Agente eziologico	Diffusione	Serbatoio	Altri ospiti
Zecche	<i>Rhipicephalus</i> spp. <i>Hyalomma</i> spp. <i>Haemaphysalis</i> spp.	Febbre bottonosa del mediterraneo	<i>Rickettsia</i> spp.	Bacino del mediterraneo, Asia, Africa	Cane	Uomo
	<i>Ixodes</i> spp.	Malattia di Lyme	<i>Borrelia</i> spp.	Nord America, Europa, Asia	Roditori, carnivori, erbivori	Uomo
	<i>Boophilus</i> spp. <i>Ixodes</i> spp.	Anaplasmosi	<i>Anaplasma</i> spp.	Europa	Roditori, carnivori, erbivori	Uomo, ruminanti domestici
	<i>Ixodes</i> spp. <i>Amblyomma</i> spp.	Ehrlichiosi	<i>Ehrlichia</i> spp.	Nord America, Europa		Uomo, cane
	<i>Dermacentor</i> spp. <i>Ixodes</i> spp. <i>Amblyomma</i> spp. <i>Hemaphysalis</i> spp.	Tularemia	<i>Francisella tularensis</i>	Nord America, Europa, Asia	Lepri, conigli, roditori, ovini	Uomo, lepre, coniglio
	Varie specie di Ixodidae	Febbre Q	<i>Coxiella burnetii</i>	Tutti i continenti	Mammiferi dom., roditori, uccelli	Uomo
	Varie specie di Argasidae	Febbre ricorrente da zecche	<i>Borrelia</i> spp.	Tutti i continenti eccetto Oceania	Roditori, uccelli	Uomo
	<i>Dermacentor</i> spp. <i>Amblyomma</i> spp.	Febbre maculosa delle Montagne rocciose	<i>R. rickettsii</i>	Americhe	Roditori, cani e altri mammiferi	Uomo
Altri	Flebotomi, pulci, pidocchi	Bartonellosi	<i>Bartonella</i> spp.	Centro-Sud America, Europa, Africa	Uomo	Uomo
	<i>Ctenocephalides felis</i>	Malattia da graffio di gatto	<i>Bartonella</i> spp.	Tutto il mondo	Gatto, cane	Uomo, cane
	<i>Xenopsylla cheopis</i> <i>Ctenocephalides felis</i>	Tifo murino	<i>Rickettsia thiphi</i> <i>R. felis</i>	Tutto il mondo	Ratto, topo, gatto, opossum	Uomo
	<i>Xenopsylla cheopis</i> <i>Pulex irritans</i>	Peste	<i>Yersinia pestis</i>	Africa, Asia, America, Europa orient.	Roditori, Conigli, Carnivori selv. e domestici	Uomo
	<i>Liponyssoides sanguineus</i>	Rickettsiosi vescicolare	<i>Rickettsia</i> spp.	USA, Africa, Asia, Europa	Topo	Uomo
	<i>Pediculus humanus</i>	Tifo esantematico	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Tutto il mondo	Scoiattoli	Uomo

Tabella 1.2: infezioni batteriche trasmesse da vettori

1.2.2.3. Infezioni virali

Nella tab. 1.3 sono riportate le maggiori infezioni virali trasmesse da vettori, tenendo in particolare considerazione quelle con importanti ricadute di sanità pubblica (agenti di zoonosi) e/o con forte impatto socio-economico (malattie gravi per il bestiame o causa di blocchi commerciali). Le infezioni sono state suddivise in base al gruppo di artropodi che

funge da vettore, anche se, in alcuni casi, specie di gruppi diversi possono trasmettere la stessa malattia (ad esempio per la Rift Valley Fever).

Gruppo	Vettore	Malattia	Agente Eziologico	Diffusione	Serbatoio	Altri Ospiti
Zecche	<i>Ixodes persulcatus</i>	Encefalite russa primav.-estiva	Flavivirus	Asia orientale	Roditori, uccelli e altri mammiferi	Uomo
	<i>Ixodes ricinus</i>	Louping Ill	Flavivirus	Europa occ., Gran Bretagna	Ovini, cani	Uomo
	<i>Hyalomma</i> spp. <i>Dermacentor</i> spp. <i>Rhipicephalus</i> spp. <i>Boophilus</i> spp.	Febbre emorragica del Congo-Crimea	Nairovirus	Africa, Asia, Europa orientale	Roditori, insettivori, uccelli	Uomo, ovini, bovini
	<i>Haemaphysalis</i> spp. <i>Ixodes</i> spp.	Malattia della foresta di Kyasanur	Flavivirus	India	Topi e scimmie	Uomo
	<i>Dermacentor</i> spp.	Febbre da zecche del Colorado	Coltivirus	Nord America occidentale	Piccoli mammiferi	Uomo
	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Ixodes</i> spp. <i>Haemaphysalis</i> spp.	Encefalite da virus Powassan	Flavivirus	Nord America, Russia	Roditori, piccoli mammiferi, uccelli	Uomo
	<i>Dermacentor</i> spp.	Febbre emorragica di Omsk	Flavivirus	Siberia	Roditori	Uomo
Zanzare	<i>Culex</i> spp.	West Nile	Flavivirus	Tutti i continenti eccetto Oceania	Uccelli	Uomo, cavallo
	<i>Culex tarsalis</i>	Encefalite equina occidentale	Alphavirus	Americhe	Uccelli, lagomorfi	Uomo, cavallo
	<i>Aedes</i> spp. <i>Coquillettilidia</i> spp. <i>Mansonia</i> spp. <i>Culicoides</i> spp.	Encefalite equina orientale	Alphavirus	Americhe	Uccelli	Uomo, cavallo
	Diverse specie	Encefalomielite equina venezuelana	Alphavirus	Americhe	Roditori, uccelli	Uomo, cavallo
	<i>Culex</i> spp.	Malattia da virus Sindbis e altre	Alphavirus	Asia, Africa, Europa, Australia	Uccelli	Uomo
	<i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes albopictus</i>	Dengue	Flavivirus	Zona tropicale	Scimmie	Uomo
	<i>Aedes</i> spp. <i>Haemagogus</i> spp.	Febbre gialla	Flavivirus	Africa, centro-sud America	Scimmie, marsupiali	Uomo, scimmie
	<i>Aedes aegypti</i> e altre spp.	Malattia da virus Chikungunya	Alphavirus	Africa, Sud-est asiatico, Italia	Primati	Uomo
	<i>Culex</i> spp. <i>Aedes</i> spp.	Febbre del fiume di Ross	Flavivirus	Oceania	Roditori	Uomo
	<i>Culex</i> spp.	Encefalite giapponese	Flavivirus	Asia, Oceania	Uccelli, maiali	Uomo, cavallo
	<i>Culex tarsalis</i> e altre spp.	Encefalite di St. Louis	Flavivirus	Americhe	Diverse specie	Uomo
	<i>Culex annulirostris</i>	Encefalite della Murray Valley	Flavivirus	Australia e Nuova Guinea	Diverse specie di uccelli	Uomo
	<i>Aedes</i> spp. <i>Ochlerotatus</i> spp.	Encefalite californiana	Bunyavirus	USA	Diverse specie	Uomo
	<i>Aedes triseriatus</i>	Virus La Crosse	Bunyavirus	USA	Diverse specie	Uomo
<i>Culex pipiens</i> <i>Aedes mcintoshi</i> <i>Phlebotomus</i> spp. <i>Culicoides</i> spp.	Rift Valley Fever	Phlebovirus	Africa	Ovini, bovini e altri animali	Uomo	
Altri	Flebotomi, culicidi, simuliidi, mosche	Stomatite vescicolare virale	Vesiculovirus	Tutto il mondo	Bovini, cavallo	Cavallo, uomo
	<i>Phlebotomus</i> spp.	Febbre da pappataci	Phlebovirus	Europa, Asia, Africa	Uomo	Uomo
	<i>Culicoides</i> spp.	Oropuche	Bunyavirus	Sud America	Uccelli, roditori	Uomo, scimmie
	<i>Culicoides</i> spp.	Peste equina africana	Orbivirus	Africa	Ovini, bovini, ruminanti selv., cani,	Equidi
	<i>Culicoides</i> spp.	Bluetongue	Orbivirus	Tutto il mondo	Grossi erbivori	Ovini, bovini, ruminanti selv.

Tabella 1.3: infezioni virali trasmesse da vettori

1.3. CAMBIAMENTI NELLO SPAZIO E NEL TEMPO

Negli ultimi tempi, molti Autori hanno focalizzato l'attenzione sulle malattie trasmesse da vettori, richiamando l'attenzione sul loro aspetto 'emergente' (Gubler, 1998; Romi, 2001; Parola *et al.*, 2005) Una malattia può essere definita emergente (o 'ri-emergente') se nel corso degli ultimi anni si è assistito alla sua comparsa per la prima volta, alla sua ricomparsa dopo un periodo di assenza o, infine, ad un aumento della sua incidenza (Morse, 1995). In molti casi la comparsa o la ricomparsa di tali malattie viene associata al cambiamento climatico che molti studiosi di climatologia ormai concordano essere in corso (Luterbacher *et al.*, 2004; European Environment Agency - EEA, 2005).

Altri Autori sono più cauti nell'associare strettamente il riscaldamento globale alla cosiddetta 'emergenza' delle malattie trasmesse da vettori, ricordando come spesso intervengano anche altri fattori (Chevalier *et al.*, 2004; Dujardin, 2006; Pherez, 2007) e come ogni malattia rappresenti un caso a sé, ulteriormente variabile a seconda dell'area geografica considerata. La possibilità di dimostrare in modo chiaro la relazione causa-effetto, infatti, necessita di una solida dimostrazione scientifica ancora non realizzata nella maggior parte dei casi (Rogers e Randolph, 2006).

Nei seguenti paragrafi vengono brevemente descritti alcuni casi significativi di vettori e di infezioni trasmesse per i quali siano stati studiati gli effetti di svariati tipi di cambiamenti, naturali e indotti dall'uomo, partendo ovviamente dai cambiamenti climatici.

1.3.1. Cambiamenti climatici e ambientali

1.3.1.1. Indagini climatologiche

Il fatto che siano in atto cambiamenti globali del clima sembra ormai essere opinione comune della maggioranza della comunità scientifica. Esistono molti lavori sia di tipo scientifico, che tecnico a sostegno di queste ipotesi (Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC, 2001; Climatic Research Unit - CRU, 2003; Luterbacher *et al.*, 2004; Brunetti *et al.*, 2005; EEA, 2005), anche se non sempre vi è accordo sull'identificazione delle cause e sulla descrizione degli scenari futuri.

Un punto su cui molti concordano è l'innalzamento della temperatura, che a partire dall'inizio del XX secolo sembra aver subito una variazione di circa 0,7°C a livello globale

(CRU, 2003). Nello stesso arco di tempo, in Europa, la temperatura è incrementata mediamente in misura maggiore, facendo registrare quindi un valore di aumento di circa 0,95°C (Jones e Moberg, 2003), anche se esistono differenze all'interno dello stesso continente europeo. Le aree che hanno fatto registrare l'incremento maggiore sono quelle meridionali (Spagna, Italia, Grecia) e nord-orientali (Paesi Baltici e Russia occidentale), mentre il riscaldamento si è sentito in misura minore lungo tutta la costa atlantica.

Uno degli aspetti più evidenti è il riscaldamento delle temperature notturne, fattore che può rivestire una certa importanza per molti insetti che volano la notte o, più in generale, per la sopravvivenza degli stessi insetti durante l'inverno.

Un secondo cambiamento climatico che presenta quadri contrastanti è l'aumento delle precipitazioni nel periodo 1900-2000. Mentre il nord Europa sembra essere stato dal 10 al 40% più piovoso, il sud Europa è arrivato ad essere fino al 20% più secco (EEA, 2004). Le previsioni indicano che queste tendenze si manterranno contrastanti anche in futuro.

Un ulteriore cambiamento atteso è l'aumento di eventi estremi ed in particolare di piogge molto intense e inondazioni. Ci si attende che nel XXI secolo tali eventi aumentino (Christensen e Christensen, 2003) e le inondazioni avvenute in Europa centrale (che hanno colpito in modo particolare le città di Dresda e di Praga) nell'estate del 2002 ne sono forse un primo esempio.

1.3.1.2. Effetti dei cambiamenti climatici

Vari Autori hanno cercato di indagare come il rischio di diffusione delle malattie trasmesse da vettori possa essere influenzato dai cambiamenti climatici in atto.

In generale, ad esempio, le zecche sono limitate da temperatura e umidità. Il riscaldamento del clima che sta avvenendo in Europa potrebbe in futuro permettere lo stabilirsi di specie di zecche per le quali precedentemente le basse temperature invernali rappresentavano un fattore limitante. Allo stesso tempo specie di zecche già presenti potrebbero diffondere verso latitudini e altitudini maggiori, come sembra essere già avvenuto per *I. ricinus* in Svezia (Talleklint e Jaenson, 1998). Infine potrebbe aumentare la stagione utile per lo sviluppo e la trasmissione dei patogeni.

In modo analogo, nel caso dei flebotomi, temperature più miti potranno favorire il tasso di sopravvivenza invernale dei flebotomi e allungare la stagione riproduttiva, che nelle aree temperate prevede non più di due generazioni per anno. In generale si può ipotizzare un

aumento delle densità e dei limiti geografici di diffusione, come testimonia la recente prima segnalazione di *Phlebotomus mascittii* in Belgio (Depaquit *et al.*, 2005).

1.3.1.3. Approccio modellistico quantitativo

Inserendosi all'interno del dibattito sulla questione dell'impatto dei cambiamenti climatici sulle malattie trasmesse da vettori, Rogers e Randolph (2006) suggeriscono la necessità di adottare un approccio quantitativo e l'utilizzo di modelli per capire a fondo questi cambiamenti.

Partendo da una equazione che riassume in modo adeguato il modello di trasmissione della malattia in questione e che comprenda importanti parametri come ad esempio il numero di vettori per ospite, il tasso di mortalità dei vettori e il numero di contatti utili, si può stimare, sulla base delle nostre conoscenze biologiche, come i cambiamenti climatici influenzino questi parametri e, di conseguenza, l'epidemiologia della malattia. Questo approccio modellistico e sperimentale, però, è stato fino ad ora raramente seguito, mentre spesso si associano in modo empirico i cambiamenti registrati dalle stazioni meteorologiche con i cambiamenti numerici nella prevalenza o nell'incidenza dei casi di infezione o malattia.

Gli stessi Autori riportano come esemplificativo il caso delle variazioni di incidenza della encefalite da zecche (Tick-Borne Encephalitis - TBE) negli ultimi 30 anni in alcune aree dell'Europa orientale. Basandosi appunto su un approccio di tipo quantitativo si può vedere come i cambiamenti climatici sono, in questo caso, solo uno dei molteplici fattori che entrano in gioco. L'aumento di densità delle popolazioni di vertebrati selvatici, ospiti delle zecche (soprattutto i cervidi su cui si cibano gli stadi adulti), come la mutata gestione delle aree boschive, sono due dei fattori non climatici che pure hanno avuto un proprio ruolo. Considerazioni simili sono state fatte da altri Autori in altre aree del continente europeo (Rizzoli *et al.*, 2002).

1.3.2. Cambiamenti demografici, economici e sociali

Partendo da esempi concreti di eventi epidemici, alcuni recenti lavori hanno evidenziato come siano molti i fattori che possono influenzare i processi epidemiologici delle malattie trasmesse da vettori. In parte questi fattori possono far aumentare o diminuire l'incidenza dell'infezione nel tempo, in parte possono favorirne la diffusione in nuovi territori.

1.3.2.1. Fluttuazioni temporali nelle aree endemiche

Nel caso della Rift Valley Fever (RVF) sembrano entrare in gioco sia fattori ambientali, che demografici (Chevalier *et al.*, 2004). Nella zona del lago Nasser, in Egitto, i focolai epidemici del 1977 e del 1978 sembravano essere associati più alle locali pratiche di irrigazione, che a piovosità eccezionali. In Africa occidentale, invece, i focolai che si sono susseguiti ogni 5-6 anni, a partire da quello della Mauritania del 1987, sembrano dipendere dalla dinamica immunitaria delle popolazioni di ospiti. I periodi inter-epizootici corrispondono infatti al tempo di rinnovamento della mandria.

La febbre emorragica Crimea-Congo (CCHF- Crimean Congo Haemorrhagic Fever) è una virosi trasmessa da zecche, che riconosce nella lepre un importante ospite amplificatore. Durante la seconda guerra mondiale, l'occupazione militare della Crimea comportò l'improvviso arrestarsi delle tradizionali pratiche agricole e, come conseguenza, un notevole aumento sia delle popolazioni di lepri che di quelle di zecche (in particolare *Hyalomma marginatum*). Il ritorno, nel 1944, delle truppe russe, che erano completamente scoperte dal punto di vista immunitario, in un territorio con alta circolazione virale, portò al primo focolaio accertato della malattia.

Nove anni più tardi un secondo focolaio venne registrato nel sud della Russia, dove le popolazioni di zecche e quelle degli ospiti vertebrati venivano normalmente regolate dalle stagionali esondazioni del Volga. All'inizio degli anni '50 il flusso del fiume venne regolato per permettere lo sfruttamento di nuove aree agricole (Hoogstraal, 1979).

Anche il caso della encefalite giapponese (Japanese Encephalitis - JE) è emblematico di come i cambiamenti sociali possano influenzare la dinamica delle malattie. La JE è una malattia virale attualmente endemica in buona parte dell'Asia sud-orientale e responsabile di circa 50.000 casi clinici all'anno (Mackenzie *et al.*, 2001). I campi di riso sono i luoghi ideali per il mantenimento del virus, dal momento che associano la presenza delle zanzare (soprattutto del genere *Culex*) a quella degli ospiti vertebrati (soprattutto suini domestici e uccelli acquatici).

In Giappone e Taiwan, l'esplosione demografica, la crescente urbanizzazione, l'aumento del tenore di vita, la diminuzione dei campi di riso e l'allontanamento degli allevamenti di maiali dalle zone residenziali, insieme con adeguate campagne di vaccinazioni, sono stati in grado di far calare l'incidenza della malattia in modo drammatico negli ultimi 20 anni, fino ad avere attualmente circa 100 casi all'anno (Wu *et al.*, 1999).

In Cina, invece, dove l'allevamento tradizionale del maiale rimane predominante e le case si trovano vicino ai gruppi di animali allevati, nonostante le numerose campagne di vaccinazione, la JE continua a diffondersi, causando circa 10.000 casi l'anno.

1.3.2.2. Cambiamenti nella distribuzione spaziale

Sempre partendo dal caso della RVF si può osservare come tale infezione sia attualmente disseminata in modo non omogeneo, ma particolarmente ampio, nel continente africano e sia recentemente entrata anche in Yemen e Arabia Saudita (Chevalier *et al.*, 2004). Fino alla metà degli anni '70 la malattia sembrava limitata ad alcuni Stati meridionali dell'Africa, ma in seguito si sono sviluppati focolai in molte altre aree dell'Africa occidentale (Mauritania, Senegal) e di quella orientale (Tanzania, Kenya, Somalia), oltre al già citato focolaio in Egitto. La diffusione della RVF sembra essere legata alle migrazioni animali, in parte dovuta al tradizionale sistema di nomadismo pastorale ancora presente in molte aree dell'Africa (spesso coincidenti con aree di focolaio), ed in parte alle movimentazioni commerciali. Quest'ultima sembra essere stata anche la causa dell'introduzione della malattia nella penisola arabica.

L'aumento della movimentazione internazionale sembra essere in effetti uno dei maggiori rischi di introduzione in nuove aree sia delle infezioni, che degli stessi vettori.

Un trasporto commerciale di bestiame tramite nave sembra essere all'origine dell'introduzione della African Tick Bite Fever (*Rickettsia africae*), dall'Africa subsahariana alle Indie occidentali (Pherez, 2007).

La possibilità di introduzione in Europa attraverso uccelli migratori è ritenuta essere una delle vie più probabili per la West Nile Fever, ed è stata riportata per alcuni dei focolai europei (Autorino *et al.*, 2002; Durand *et al.*, 2002). Sembra probabile, invece, che all'origine della devastante introduzione della malattia negli Stati Uniti ci sia stata l'importazione di uccelli esotici da Israele (Campbell *et al.*, 2002). La particolare elasticità di questa malattia, che riconosce molte specie di zanzare e alcune specie di zecche come possibili vettori, oltre che numerosi ospiti serbatoio, la rende poi in grado di diffondersi facilmente anche in un nuovo ambiente.

Un ultimo esempio è quello della “zanzara tigre” (*Aedes albopictus*), introdotta attraverso il commercio internazionale prima negli USA e poi in Europa. In questo caso non si è diffusa un'infezione, ma un potenziale vettore di pericolose malattie.

1.4. IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI TRASMESSE DA VETTORI

Sono passati circa 130 anni da quando è stato dimostrato che alcuni artropodi erano in grado di trasmettere le infezioni. Storicamente, la malaria, la febbre gialla, la dengue, la peste ed altre malattie trasmesse da vettori sono state, fino all'inizio del ventesimo secolo, responsabili di alti livelli di morbilità e mortalità per la popolazione umana. A partire dai primi del '900, importanti programmi di controllo di queste malattie sono stati pianificati e realizzati, concentrandosi soprattutto sul controllo del vettore. La promozione dell'igiene ambientale e l'utilizzo estensivo di prodotti chimici, in effetti, ha permesso di controllare in modo efficace la maggior parte delle infezioni, tanto che, intorno agli anni '60, le malattie trasmesse da vettori non erano più considerate un problema di sanità pubblica prioritario (Gubler, 1998).

Negli ultimi anni, però, alcune di queste infezioni sono ritornate sulla scena delle priorità sanitarie internazionali, anche in seguito a improvvise epidemie di larga scala, come per la West Nile Fever negli Stati Uniti o per la Bluetongue in Europa. Il tutto è stato poi ulteriormente complicato dal fatto che molti artropodi hanno sviluppato forme di resistenza ai più comuni antiparassitari. In questo momento è fondamentale investire nuovamente risorse umane ed economiche nello studio dei processi epidemiologici che stanno alla base della 'riemergenza' delle malattie trasmesse da vettori, e, allo stesso tempo, per la formulazione di appropriate strategie di controllo e sorveglianza.

1.4.1. Sistemi di Controllo

Senza voler entrare troppo in dettaglio in un tema così ampio, sembra opportuno ricordare alcuni concetti riguardanti l'approccio al controllo delle malattie trasmesse da vettori.

A livello globale è senza dubbio essenziale avere un sistema rapido di diffusione delle informazioni e migliorare il coordinamento delle azioni di controllo. Un altro importante canale di comunicazione che necessita di essere rafforzato, sia a livello globale che a livello locale, è quello tra chi lavora nel campo della salute umana e chi lavora in quello della salute animale. Lo studio delle zoonosi (molte malattie trasmesse da vettori lo sono) necessita che le due parti coinvolte lavorino fianco a fianco (Chevalier *et al.*, 2004).

Altro aspetto importante è quello di concentrare gli sforzi dove si ritiene esserci il maggior rischio. A questo fine è sempre più importante avere a disposizione mezzi di valutazione oggettiva del rischio di introduzione/diffusione di una o più infezioni in un determinato territorio.

Nel campo delle malattie trasmesse da vettori, come anche per altre, uno strumento senza dubbio molto interessante per la valutazione del rischio è il GIS, o Sistema Informativo Territoriale, anche per la possibilità di utilizzare lo stesso database di informazioni ambientali, demografiche e amministrative per più infezioni, soprattutto se trasmesse dallo stesso vettore o da specie simili.

Pur non essendo stato utilizzato nella parte sperimentale della tesi, di seguito viene brevemente presentato questo strumento, il cui utilizzo è comunque l'ideale passo successivo nell'analisi dei dati che verranno descritti.

1.4.1.1. GIS e RS

In questi ultimi anni i Geographic Information Systems (GIS) sono emersi come innovativi e importanti strumenti anche per le attività di sorveglianza delle malattie, risultando utili per scopi di ricerca epidemiologica, attività decisionale, pianificazione, gestione e divulgazione delle informazioni.

Un GIS è un sistema computer-assistito di gestione di database e di tecnologie per la creazione di mappe, in grado di organizzare e memorizzare grandi quantità di informazioni di qualsiasi tipo. Caratteristica essenziale di un GIS è quindi quella di integrare le funzioni cartografiche con quelle di gestione dei dati.

Una delle peculiarità di un GIS è l'organizzazione delle informazioni su strati sovrapponibili (ad esempio uno strato che rappresenta i siti di campionamento può essere sovrapposto ad un secondo strato che rappresenta i limiti amministrativi, l'uso del suolo, i fiumi, ecc.) in modo da permettere l'analisi dell'interazione geografica tra entità appartenenti a differenti classi.

Per Remote Sensing (RS) si intende un qualsiasi processo con cui sono ottenute misure e/o informazioni su un oggetto, area o fenomeno, senza esserne in contatto. In ambito geografico ciò equivale al rilevamento, alla misurazione e all'identificazione di caratteristiche del territorio da parte di strumenti distanti, come le foto aeree e le immagini satellitari.

GIS e RS hanno capacità tecnologiche che sono estremamente adatte e utili per la sorveglianza e il controllo delle malattie trasmesse da vettori in cui capire e conoscere la componente ambientale è molto importante.

L'integrazione di GIS, analisi spaziale, e modelli statistici può essere utilizzata per classificare il territorio in relazione al rischio di malattie, tenendo conto dell'effetto di più fattori.

1.4.1.2. Modelli predittivi

Un passo ulteriore nella valutazione del rischio legato alla presenza di infezioni trasmesse da vettori è rappresentato dall'utilizzo di modelli matematici, spesso usati in modo integrato con il GIS. In questi modelli la distribuzione del vettore o della malattia viene correlata, tramite equazioni matematiche, ad alcuni parametri, spesso di tipo ambientale.

Ad esempio, in seguito all'improvvisa ed imprevista introduzione e diffusione della Bluetongue in Italia, si è cercato di prevedere la presenza del vettore *Culicoides imicola* per l'intero territorio italiano (Conte *et al.*, 2003), attraverso un modello in cui venivano prese in considerazione alcune variabili ambientali (altitudine, temperatura, piovosità e presenza di acqua corrente). La presenza del vettore è un indice immediato del potenziale rischio di diffusione della malattia in un territorio, anche se non è ovviamente l'unico fattore necessario.

In un altro esempio, in cui un approccio simile è stato usato per un altro tipo di vettore, l'Autore ha evidenziato come l'utilizzo di informazioni territoriali ottenute tramite il RS può essere applicato in modo efficace al problema di mappare la distribuzione delle varie specie di zecche, sempre con il fine di prevenire eventuali malattie trasmesse, individuando i luoghi e i periodi di maggior rischio (Estrada-Peña, 2001). Un aspetto importante, quando si usano parametri non biologici come quelli delle immagini satellitari, è l'accuratezza statistica con cui si legano tali parametri agli aspetti ecologici dell'artropode vettore in questione.

In un ultimo caso, si è cercato di sviluppare diversi tipi di modelli per stimare il rischio potenziale di leishmaniosi viscerale nello Stato brasiliano di Bahia. Oltre ad usare raffinati parametri ambientali, all'interno dei modelli erano integrati alcuni valori di prevalenza noti. In questo modo, partendo da dati relativi a poche aree, veniva costruita una mappa su base GIS per l'intero Stato (Nieto *et al.*, 2006).

1.5. LA SITUAZIONE IN ITALIA NORD-ORIENTALE

Anche in Italia settentrionale, come più in generale nell'Europa continentale, le malattie trasmesse da vettori stanno ricevendo sempre più attenzione, sia per il riscontro di infezioni precedentemente non presenti, in parte nella forma di focolai di malattia, in parte come risultato di indagini epidemiologiche, sia per l'aumentata incidenza di infezioni storicamente presenti.

Le recenti acquisizioni su diffusione e andamento dei principali artropodi vettori e delle infezioni trasmesse, nel contesto dell'Italia nord-orientale, vengono presentati nei paragrafi seguenti, soffermandosi con maggiore attenzione su zecche e flebotomi, i due vettori che saranno poi oggetto dei casi studio considerati nella parte sperimentale del lavoro.

1.5.1. Zecche e malattie trasmesse

L'importanza delle zecche come vettori di malattie trasmissibili all'uomo, sta gradualmente aumentando negli ultimi anni, in particolare per la presenza sempre più diffusa e consistente di *Ixodes ricinus*, la zecca di più comune riscontro nelle zone boschive delle aree prealpine e collinari (Montarsi *et al.*, 2007). *Ixodes ricinus* è vettore dimostrato di alcune malattie infettive con pesanti implicazioni di sanità pubblica (malattia di Lyme, TBE), ma sembra poter essere implicato anche nella trasmissione di alcuni patogeni potenzialmente zoonosici recentemente segnalati nel territorio dell'Italia nord-orientale.

La malattia di Lyme (borreliosi sostenuta da specie del gruppo *Borrelia burgdorferi* sensu lato), segnalata in Italia per la prima volta nel 1983, è una infezione da tempo endemica nel territorio dell'Italia nord-orientale, così come in quelli circostanti dell'arco alpino (Rizzoli *et al.*, 2002). La malattia si presenta però in modo evidente solo in alcuni 'punti caldi' (*hot spots*) dove particolari condizioni ecologiche del territorio e demografiche delle popolazioni di ungulati selvatici, creano una situazione ideale per il mantenimento dell'infezione. Molti di questi punti caldi sono presenti nelle Province di Trento, Belluno, Pordenone e Udine. La presenza dell'infezione è stata comunque segnalata anche in zone collinari e montuose di altre Province (Montarsi *et al.*, 2006).

L'encefalite da zecche o TBE (malattia sostenuta da un flavivirus) è invece una infezione di più recente introduzione e di minor diffusione, anche se la malattia è ampiamente

diffusa in alcune aree confinanti (Austria, Slovenia). Negli anni '90 è stata segnalata in Trentino-Alto Adige e Veneto, con isolamento del virus nelle zecche e diagnosi di alcune decine di casi umani, mentre le indagini sierologiche su persone a rischio (lavoratori forestali) riportano valori che si aggirano intorno all'1% (Cinco *et al.*, 2004). L'infezione da TBE non è diffusa in modo omogeneo nell'ecosistema forestale, ma si trova solamente in piccole aree dove esistono le condizioni ideali al suo mantenimento. Anche se la manifestazione clinica della malattia è recente, è probabile che il virus circolasse già da tempo in ambito selvatico, ma alcuni cambiamenti, come l'aumento di densità degli ungulati selvatici, l'abbandono delle aree coltivate e il riscaldamento del clima, hanno favorito l'aumento di densità delle zecche e, di conseguenza, il rischio di contatto con l'uomo (Hudson *et al.*, 2001).

In seguito ad indagini appositamente predisposte su zecche (*I. ricinus*) campionate in Provincia di Trento e di Belluno, è stato possibile segnalare la presenza *Rickettsia helvetica*, specie già segnalata in altre parti d'Europa e implicata come causa di malattia nell'uomo (Beninati *et al.*, 2001). Precedentemente in l'Italia era stata segnalata solo *R. conori*, causa della febbre bottonosa del mediterraneo, patologia diffusa soprattutto in centro e sud Italia (Scaffidi, 1981), dove raggiunge, in alcune Regioni, tassi di incidenza di più di 10 casi all'anno su 100.000 persone (Beninati *et al.*, 2001). A causa della cross-reattività delle tecniche diagnostiche normalmente usate nella diagnosi delle rickettsiosi umane, non si può escludere che i pochi casi che vengono segnalati anche nelle Regioni dell'Italia nord-orientale siano dovuti, almeno in parte, ad altre specie di *Rickettsia*.

Infine è stata recentemente dimostrata la circolazione in ruminanti domestici e selvatici di alcune specie di *Babesia* (Cassini *et al.*, 2007), la cui potenzialità zoonosica, per quanto bassa, è da non sottovalutare. Anche in questo caso *I. ricinus* rappresenta il vettore più probabile.

1.5.2. Flebotomi e leishmaniosi

Un esempio di infezione di nuova introduzione nel territorio dell'Italia settentrionale è quello della leishmaniosi. Questa malattia riconosce nel cane il proprio serbatoio domestico, ma, in condizioni di alte prevalenze nella popolazione canina e alte densità di insetti vettori, può rappresentare un rischio anche per l'uomo, come è documentato dalle

centinaia di casi umani che si registrano in centro e sud Italia, dove l'infezione è endemica (Gradoni *et al.*, 2004).

Recentemente sono state condotte diverse indagini sierologiche ed entomologiche in tutto il territorio del nord Italia, dimostrando la presenza di diversi focolai autoctoni in popolazioni canine di aree pedemontane e collinari, ubicate per la maggior parte lungo il perimetro della Pianura Padana (Poglayen *et al.*, 1997; Piccoli *et al.*, 1999; Capelli *et al.*, 2004; Pietrobelli *et al.*, 2004).

La presenza dei flebotomi vettori, in anni precedenti all'introduzione della malattia, è stata storicamente documentata (Biocca *et al.*, 1977), anche se non si può escludere che qualche cambiamento nella distribuzione geografica e nella dinamica di popolazione di questi insetti possa aver favorito il diffondersi della leishmaniosi.

Tutti questi aspetti verranno presentati in modo approfondito nella parte sperimentale.

1.5.3. Altri vettori

Un altro gruppo di artropodi importante dal punto di vista sanitario, sia per il danno diretto che per la capacità vettoriale è quello delle zanzare.

Una specie molto studiata, anche perché di recente introduzione, è la zanzara tigre (*Aedes albopictus*). Questa zanzara, nota per la capacità di pungere durante il giorno, si è adattata particolarmente bene al clima della Pianura Padana, raggiungendo alti livelli di diffusione, soprattutto in ambito urbano. Esistono però altre specie di zanzare (generi *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*) diffuse in Italia nord-orientale, che in determinate aree raggiungono livelli di densità tali da poter assumere un importante ruolo vettoriale.

Ad esempio è stato recentemente dimostrato il ruolo nella trasmissione della filariosi cardio-polmonare del cane di *Aedes albopictus* (Cancrini *et al.*, 2003), così come quello di *Aedes* spp. e *Culex pipiens* nella diffusione della setariosi bovina (Frangipane di Regalbono, 2000).

Appare più preoccupante però il ruolo che le zanzare potrebbero avere nella epidemiologia di alcune infezioni virali che negli ultimi anni sono comparse per la prima volta in Italia centro-settentrionale e nell'Europa continentale, tra cui malattie con risvolti di carattere zoonosico come la Chikungunya (Rezza *et al.*, 2007), e la West Nile Fever (Autorino *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda la West Nile Fever si vuole ricordare che in alcune aree d'Italia (zone umide con forte presenza di uccelli selvatici) è attivo un piano nazionale di monitoraggio, per il quale sono previste, tra le altre, anche attività di tipo entomologico. Un piano simile è in corso, in tutta Italia, per la Bluetongue, con analoghe indagini di tipo entomologico, finalizzate a rilevare la presenza e l'abbondanza dell'insetto vettore, che in questo caso non è una zanzara, ma appartiene al genere *Culicoides* (vedi par. 1.2.1.4).

In definitiva appare chiara la sempre maggiore importanza che gli aspetti entomologici assumeranno, anche in questa parte d'Italia, soprattutto con lo scopo di realizzare un efficace piano di monitoraggio e controllo delle malattie trasmesse da vettori.

PARTE SPERIMENTALE

1. INTRODUZIONE

In questa parte vengono presentati i risultati di 3 anni di indagini finalizzati allo studio di due malattie parassitarie trasmesse da vettori: la babesiosi e la leishmaniosi.

1.1. CASI STUDIO

Babesiosi e leishmaniosi, malattie parassitarie sostenute da diverse specie di emoprotozoi e trasmesse da vettori, sono entrambe ‘malattie emergenti’, per quanto riguarda l’area dell’Italia nord-orientale.

Altro aspetto comune è la potenzialità zoonosica. Se nel caso della leishmaniosi l’incidenza annuale a livello mondiale si calcola nell’ordine delle centinaia di migliaia di casi (Gramiccia e Gradoni, 2005) ed in Italia il numero di casi umani si aggira intorno ai 200 casi all’anno (Gradoni *et al.*, 2003), per quanto riguarda la babesiosi la potenzialità zoonosica è una scoperta relativamente recente e i casi umani fino ad ora segnalati si aggirano sulle poche centinaia in tutto (Gray, 2006), mentre in Italia si è avuto fino ad ora un solo caso (Piccaluga *et al.*, 2004).

Anche se fino ad ora, in Italia nord-orientale, sono stati segnalati pochissimi casi di leishmaniosi e nessun caso di babesiosi nell’uomo, i rispettivi patogeni stanno circolando nelle popolazioni animali. La leishmaniosi, il cui *reservoir* domestico è rappresentato dalle popolazioni di cani, è presente solo in alcune aree dalle caratteristiche orografiche e climatiche idonee, mentre non è ancora ben chiaro quali animali (domestici o selvatici) fungano da serbatoio per le specie di *Babesia* potenzialmente patogene per l’uomo e, di conseguenza, quale sia la loro distribuzione geografica.

Sulla base di queste premesse, ci è sembrato che queste due infezioni rappresentassero casi studio ideali per testare il corretto approccio allo studio e, se possibile, al controllo delle malattie trasmesse da vettori, nell’area di nostro interesse e competenza, verificando direttamente sul campo quale fosse il livello di diffusione dei due patogeni, ad oggi poco conosciuti nell’area di studio, e quali fossero i fattori di rischio per gli animali e per l’uomo.

1.2. APPROCCIO DELLO STUDIO

Un aspetto sicuramente comune a tutte le infezioni trasmesse da vettori è appunto la via di trasmissione. Tradotto in termini operativi, lo studio di queste malattie necessita uno spostamento di attenzione rispetto ad altre malattie trasmissibili. In questo caso è fondamentale, infatti, associare allo studio dell'infezione nell'ospite, lo studio degli aspetti ecologici del vettore e di come questi possano influenzare la trasmissibilità del patogeno e, di conseguenza, la velocità di propagazione dell'infezione nello spazio e nel tempo.

In tutte le indagini che verranno presentate nei prossimi due capitoli si è operato utilizzando parallelamente un approccio di tipo epidemiologico per gli ospiti vertebrati e di tipo entomologico per gli artropodi vettori.

1.2.1. Dal particolare al generale: le mappe di rischio

Le indagini hanno cercato di mantenere un ampio respiro territoriale, anche se per necessità operative e per le caratteristiche stesse delle infezioni (in particolare per la leishmaniosi), si è concentrato lo sforzo di indagine solo in alcune aree. Il fatto però di aver individuato più aree sparse nell'intero territorio dell'Italia nord-orientale, ha permesso di analizzare un insieme di situazioni tra loro differenti e pertanto rappresentative della variabilità dell'intera area di studio. Le indicazioni che escono dalle aree campione sono pertanto di carattere generale e facilmente ampliabili anche alle zone non indagate.

Uno degli strumenti attualmente a disposizione per fare questo tipo di passaggio 'dal particolare al generale' è il GIS. L'utilizzo di questo sistema di gestione delle informazioni su base geografica, associato all'utilizzo di dati ambientali e demografici già predisposti su base cartografica, permette di applicare all'intero territorio per cui si dispone di tali dati, le indicazioni fornite dallo studio di una o più aree campione.

Lo scopo finale è quello di definire quali siano i fattori maggiormente implicati nel favorire il diffondersi delle infezioni e arrivare a creare delle mappe in cui determinate caratteristiche delle popolazioni animali e del territorio in cui vivono possano essere associate con un maggior o minor rischio di contrarre l'infezione considerata.

Per fare un esempio concreto, partendo dallo studio di alcune aree campione, è possibile individuare quali siano le specie di flebotomi e/o di zecche presenti nel territorio dell'Italia nord-orientale e definire quali siano le caratteristiche ambientali favorevoli alla

esplicazione della loro capacità vettoriale, legando il tutto ad alcune caratteristiche demografiche delle popolazioni ospiti. I valori ottimali ricavati in questo modo (ad es. intervallo di temperature, umidità, piovosità, densità popolazione ospiti) possono essere applicati ad una mappa tematica su base GIS, permettendo di stimare per l'intero territorio quali siano le aree a rischio di presenza dell'infezione.

Questo passo, che non sarà sviluppato nel presente lavoro, rappresenta uno dei possibili sviluppi futuri dell'indagine.

2. BABESIOSI DEI RUMINANTI DOMESTICI E SELVATICI: RISCHIO ZONOSICO?

2.1. INTRODUZIONE

2.1.1. *Situazione in Italia*

Le babesiosi sono malattie parassitarie sostenute da emoprotozoi intraeritrocitari appartenenti al genere *Babesia*, la cui trasmissione è assicurata da artropodi ematofagi rappresentati da zecche dure (Ixodidae) appartenenti a diversi generi. Le diverse specie di *Babesia* possono interessare numerosi animali domestici e selvatici.

Nonostante in Italia le babesiosi siano relativamente diffuse negli animali da reddito e da compagnia, particolarmente nelle Regioni del centro e del sud, sono disponibili pochi dati relativi alla presenza e alla diffusione della malattia in altre zone, considerate tradizionalmente non infette.

Le caratteristiche epidemiologiche delle malattie sostenute dalle diverse specie di *Babesia* (specie animali che fungono da ospiti vertebrati, specie di zecche che fungono da vettori, diffusione geografica, potenzialità zoonosica) possono variare molto a seconda della specie in questione. Nel presente lavoro vengono prese in considerazione le babesiosi dei ruminanti domestici e selvatici (*B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. ovis*, *B. motasi*, *B. capreoli* ed altre). All'interno di questo gruppo sembra esserci la specie o le specie potenzialmente trasmissibili all'uomo, dal momento che fino ad ora i casi di babesiosi umana accertati in Europa sono stati riferiti a *B. divergens* o quantomeno al gruppo *B. divergens*-like.

2.1.2. *Aspetti zoonosici*

Le babesiosi sono un problema 'emergente' in sanità pubblica. A partire dalla metà del secolo scorso infatti sono stati segnalati più di 300 casi di babesiosi umana negli USA e circa una trentina in Europa (Kjemtrup e Conrad, 2000). La precisa eziologia della

babesiosi umana è ancora oggetto di indagini. Negli USA la maggior parte dei casi (soprattutto lungo la costa orientale) è imputabile a *B. microti*, mentre in Europa la maggior parte dei casi è stato ricondotto a *B. divergens*, anche se spesso solamente sulla base di una identificazione morfologica all'esame microscopico (Gray, 2006). Recentemente è stato segnalato un caso umano in Italia (Emilia-Romagna) sostenuto da una variante denominata "European Union 1" (EU1). L'isolato, infatti, all'analisi filogenetica risultava essere una specie correlata, ma diversa da *B. divergens* (Herwaldt *et al.*, 2003) Analogamente, altri casi umani in Europa possono essere ricondotti ad isolati appartenenti ad un gruppo definibile come *divergens-like*, non totalmente corrispondente alla specie *B. divergens*, tipica del bovino, ma forse ad una nuova specie, probabilmente circolante tra i ruminanti selvatici. Recentemente, in Slovenia, campioni di milza di alcuni caprioli abbattuti durante la caccia di selezione sono stati trovati positivi per *Babesia* EU1 (Duh *et al.*, 2005a)

2.1.3. Obiettivi della ricerca

Si è ritenuto pertanto estremamente interessante verificare la diffusione delle babesiosi in diverse specie di ruminanti, sia domestici che selvatici, nelle aree dell'Italia nord-orientale al fine di valutare il rischio di trasmissione della malattia all'uomo.

Più in dettaglio, gli obiettivi della ricerca sono stati quelli di identificare eventuali serbatoi selvatici del parassita, identificare e tipizzare le specie di *Babesia* isolate nei diversi ospiti mediante tecniche biomolecolari e infine verificare presenza, abbondanza ed eventuale capacità vettoriale rispetto a *Babesia* delle specie di zecche riscontrabili sugli animali e nell'ambiente.

2.2. MATERIALI E METODI

L'indagine che viene presentata è parte di uno studio più ampio condotto a livello nazionale (Progetto di Ricerca di Interesse Nazionale - PRIN 2004), finanziato dal MUR e riguardante la diffusione delle babesiosi in animali domestici e selvatici, il cui scopo era

quello di descrivere l'epidemiologia di questa parassitosi in alcune aree del territorio italiano e di valutare il livello di rischio per la salute pubblica (Pietrobelli *et al.*, 2007).

Lo studio è stato condotto da quattro Unità Operative (UU.OO.) in stretta collaborazione (Padova, Bologna, Perugia, Roma). Ciascuna U.O. ha provveduto alla raccolta di campioni di sangue da animali domestici (cani, equini, bovini, ovini e caprini) e da ungulati selvatici (caprioli, daini, cervi, camosci, mufloni e cinghiali) presenti nelle diverse aree di competenza.

Nel presente lavoro vengono presentati e discussi i risultati riguardanti le analisi condotte su campioni di ruminanti domestici e selvatici prelevati dall'U.O. di Padova.

2.2.1. Campionamenti

Nel periodo Giugno 2005 - Marzo 2006, grazie alla collaborazione di Veterinari liberi professionisti, dipendenti delle Aziende Sanitarie Locali e operatori del settore, sono stati raccolti campioni ematici da 116 bovini, 83 ovini, 24 caprini e 81 ruminanti selvatici di diverse specie (49 caprioli, 15 daini, 9 camosci, 5 cervi, 3 mufloni) provenienti dalle Province di Belluno, Padova, Verona e Vicenza della Regione Veneto e in quelle di Gorizia, Pordenone, Trieste e Udine della Regione Friuli Venezia Giulia (figg. 2.1, 2.2). Sono stati individuati allevamenti di piccole dimensioni con animali mantenuti al pascolo e presenti in Azienda da almeno alcuni mesi. Fatta eccezione per un gruppo di daini, che provenivano da un allevamento, per gli altri ruminanti selvatici, i campioni sono stati raccolti durante le stagionali attività venatorie.

Al momento del prelievo è stato effettuato un esame clinico sugli animali al fine di evidenziare la presenza di zecche. Tutte le zecche eventualmente presenti sono state raccolte e portate in laboratorio, dove sono state mantenute in vita (in condizioni di temperatura e umidità controllate) per almeno 20 giorni, per consentire lo sviluppo di eventuali protozoi ingeriti. Infine, le zecche raccolte sono state soppresse, conservate in alcool 70% e inviate all'U.O. di Roma per l'identificazione e l'analisi mediante PCR.

Tutti i campioni (sangue intero, sieri, coaguli e zecche) sono stati catalogati mediante codici di riferimento riportati su una scheda appositamente predisposta e compilata per ogni singolo animale riportando i principali dati anamnestici (specie, razza, età, sesso, provenienza, pascolo).

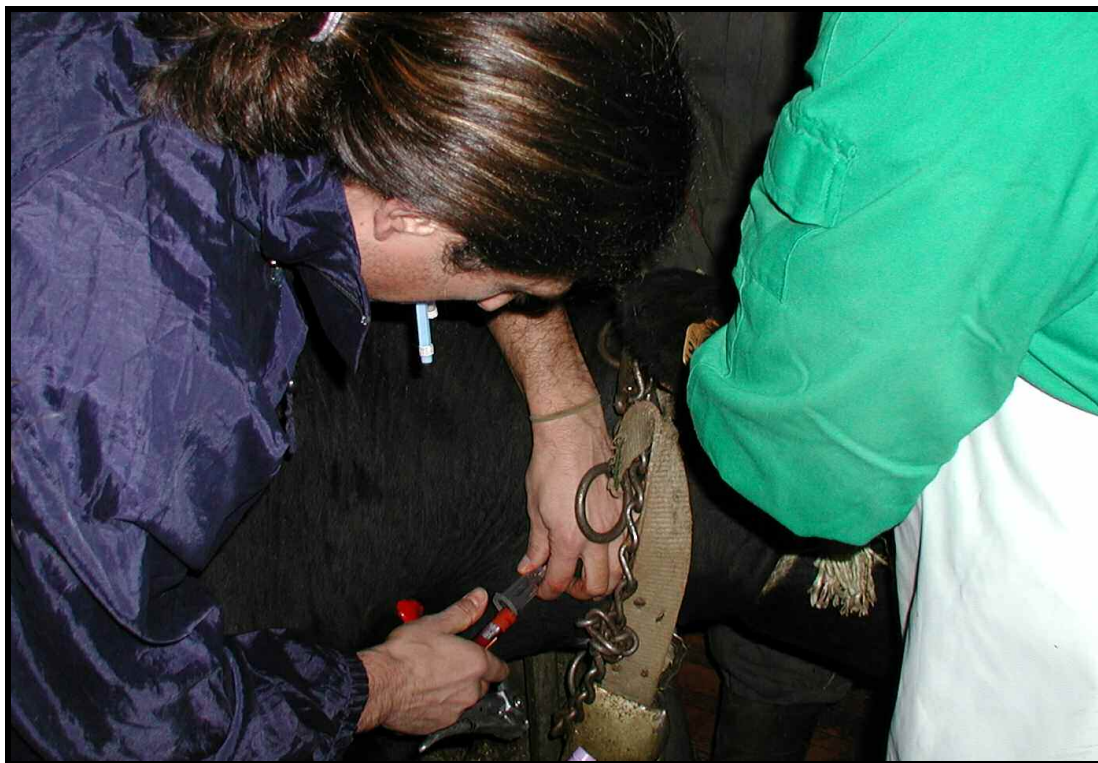


Figura 2.1: visita e prelievo da specie domestiche



Figura 2.2: strutture per il prelievo da specie selvatiche

2.2.2. *Analisi di laboratorio*

2.2.2.1. *Microscopia e sierologia*

Quando possibile, è stato effettuato lo striscio, usando il kit Hemacolor® (Merck, Darmstadt, Germany) per la colorazione.

I sieri prelevati da bovini, conservati a -20°C, sono stati analizzati mediante test di immunofluorescenza indiretta (IFI), utilizzando i kit per ricerca di anticorpi anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* (Fuller Laboratories, California, USA), che consentono l'individuazione e la semi-quantificazione di anticorpi della classe IgG, secondo il protocollo fornito dalla ditta.

La reazione positiva appare come distinti corpi inclusi color verde-mela sovrapposti agli eritrociti. Ogni reazione deve essere valutata in funzione dei rispettivi controlli. I sieri positivi sono stati successivamente testati a diluizioni scalari sino a definirne il titolo finale. I due test si differenziano per il titolo soglia che corrisponde a 1:40 per *B. bovis* e 1:80 per *B. bigemina*.

Non è stato possibile eseguire test sierologici per altre specie potenzialmente presenti (*B. divergens* nel bovino, *B. motasi* e *B. ovis* negli ovini e nei caprini), perché non sono stati reperiti kit del commercio per tali specie.

2.2.2.2. *Analisi biomolecolari sui coaguli*

Sono state condotte analisi biomolecolari (PCR) per la ricerca di *Babesia* spp. sia sui coaguli di sangue che sulle zecche.

Per quanto riguarda i coaguli, ciascun campione è stato sottoposto all'estrazione del DNA utilizzando il kit QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook® (QIAGEN), secondo il protocollo fornito dalla ditta.

Sono state selezionate due coppie di primers: la prima (CRYPTO F e CRYPTO R) generica per il Phylum Apicomplexa, amplifica un segmento di circa 1700 bp del gene 18S rRNA (Herwaldt *et al.*, 2003). La seconda coppia di primers (RLB-F2 e RLB-R2), invece, è più specifica per *Babesia* spp. e amplifica un segmento di 460-520 bp del 18S rRNA (Centero-Lima *et al.*, 2003).

Sono quindi stati scelti per queste analisi il primer CRYPTO F (5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3') come forward e il primer RLB-R2 (5'-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT-3') come reverse: questa coppia di primers permette di amplificare il segmento di circa 800 bp del 18S rRNA.

È stata allestita una PCR in un volume di reazione di 50 µl contenente: 10 µl di Buffer 10X (PROMEGA), 2U (0,4 µl) di Taq (Promega, USA), 200 µM di ogni nucleotide (dNTP Mix, Promega, USA), 20 pmol di ogni primer (MWG-BIOTECH) e 5 µl di DNA.

Il ciclo di amplificazione è stato condotto in un termociclatore WHATMAN BIOMETRA (Germany) secondo il protocollo riportato in tabella 2.1.

Fase Iniziale	DENATURAZIONE	94° X 2 min.
40 cicli	DENATURAZIONE ANNEALING ESTENSIONE	94° X 30 sec 60° X 30 sec 72° X 1 min.
Fase Finale	ESTENSIONE FINALE	72° X 7 min.

Tabella 2.1: ciclo di amplificazione per analisi PCR sui coaguli

La corsa elettroforetica è stata realizzata su gel di agarosio al 2% contenente Bromuro di Etidio (5 µl/50 ml). La lettura è stata eseguita utilizzando l'analizzatore d'immagine Fluor S (BioRad, USA) e il programma Quantity One.

2.2.2.3. Analisi biomolecolari sulle zecche

Prima di eseguire le PCR, tutte le zecche sono state osservate allo stereomicroscopio e identificate su base morfologica seguendo le chiavi di identificazione riportate in Iori *et al.* (2005).

Presso l'U.O. di Roma è stata messa a punto una metodica di biologia molecolare (PCR) atta a rilevare la presenza dei geni di *Babesia* nei campioni di zecche (larve, ninfe e adulti) provenienti dalle varie UU.OO.

Il protocollo di estrazione del DNA prevedeva l'omogenizzazione di ogni campione e il successivo trattamento con 20 µl di Proteinasi K (Quiogen). Effettuata l'incubazione a 65°C per circa 30', sono stati aggiunti 14 µl di K Acetato (8M) ponendo il composto in ghiaccio per 30'. Dopo centrifugazione a 13.000 rpm per 10', il surnatante è stato prelevato aggiungendo un eguale volume di fenolo-cloroformio (1:1) ed effettuando un'ulteriore

centrifugazione a 13.000 rpm per 2'. Il surnatante è stato nuovamente prelevato e addizionato con un doppio volume di etanolo assoluto. Refrigerato a -20°C per almeno 10', il campione è stato poi centrifugato (13.000 rpm per 20') per far precipitare il DNA. Al pellet di DNA sono stati aggiunti 100 µl di etanolo 70% e, dopo un'ulteriore centrifugazione (13.000 rpm per 5'), è stato eliminato il surnatante. Per eliminare completamente l'etanolo, si è proceduto liofilizzando i campioni con una pompa a vuoto per non più di 5' e risospendendo il pellet in 50 µl di acqua distillata sterile.

La PCR è stata eseguita usando i primer CRYPTO F (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') e RLB-R2 (5'-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT-3'), che amplificano un frammento di 800 pb del gene 18S rRNA (Herwaldt *et al.*, 2003). Il ciclo di PCR prevedeva 10' a 94°C, 30" a 94°C, 45" a 60°C, 1' a 72°C per 35 volte, seguito da un passaggio finale di 7' a 72°C.

2.2.2.4. Analisi delle sequenze

I campioni risultati positivi alla PCR, sono stati purificati utilizzando il kit Nucleo Spin Extract® (MacherNagel, Germany), seguendo le indicazioni della ditta produttrice, ed inviati per il sequenziamento al laboratorio del CRIBI, Università degli Studi di Padova.

Il sequenziamento è stato eseguito in entrambe le direzioni (senso e antisenso) utilizzando gli stessi primers impiegati nella PCR. Le sequenze di circa 800 bp sono state corrette mediante analisi visuale degli elettroferogrammi utilizzando Bioedit v 7.0.2 (Hall, 1999) e sono state testate verso le sequenze di 18S rRNA di *Babesia* spp. e *Theileria* spp. presenti nei database GenBank, EMBL e DDBJ utilizzando BLAST (Altshul *et al.*, 1990).

2.2.3. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita per i bovini (sia rispetto alla positività sierologia, che alla positività all'analisi biomolecolare) e per i ruminanti selvatici (solo rispetto all'analisi biomolecolare), dal momento che in entrambi i casi erano state riscontrate prevalenze sufficientemente alte.

Il software utilizzato per tutte le analisi è stato SPSS per Windows, versione 13.

2.2.3.1. Bovini

Le differenze di prevalenza (sierologia verso *B. bovis*, sierologia verso *B. bigemina*, esame PCR) in relazione ad alcuni dati epidemiologici (razza, età, provenienza) sono state analizzate con il test univariato del chi-quadro (χ^2).

Per quanto riguarda la razza, i soggetti sono stati suddivisi in due gruppi, ritenendo significativo differenziare le razze considerate rustiche (bruna, grigia alpina, rendena) e i soggetti meticci, da quelle ad alta genealogia (frisona, pezzata rossa, limousine).

Per l'età i soggetti sono stati suddivisi in 4 classi (fino ai 18 mesi, da 19 a 24 mesi, da 25 a 48 mesi e con più di 48 mesi), individuate sulla base di una divisione in quartili.

Per quanto riguarda l'area di provenienza, i campioni sono stati suddivisi in relazione alle Province di provenienza (Vicenza, Verona, Belluno, Udine), escludendo la Provincia di Padova in quanto caratterizzata da una numerosità campionaria eccessivamente bassa.

L'esistenza di eventuali fattori di rischio è stata valutata anche attraverso un'analisi di tipo multivariato (modello di regressione logistica binaria).

Il modello di regressione logistica è stato ripetuto per le 3 variabili dipendenti considerate anche per l'analisi univariata (sierologia verso *B. bovis*, sierologia verso *B. bigemina*, esame PCR) ed ha sempre utilizzato, come variabili indipendenti, i seguenti dati epidemiologici: razza, età, provenienza.

Il metodo utilizzato nell'analisi di regressione logistica è stato dapprima per blocchi e poi per passi all'indietro; la bontà di adattamento dei dati al modello è stata valutata tramite il test di Hosmer-Lemeshow.

2.2.3.2. Ruminanti selvatici

Nel caso dei ruminanti selvatici, invece, sono state valutate unicamente le differenze di prevalenza all'esame PCR in relazione ad alcuni dati epidemiologici (sesso, età, area di provenienza), sempre attraverso il test univariato del chi-quadro (χ^2).

Per l'età i soggetti sono stati suddivisi in 4 classi (fino ai 6 mesi, da 7 a 12 mesi, da 13 a 24 mesi e con più di 24 mesi) individuate sulla base di una divisione in quartili.

Per quanto riguarda l'area di provenienza, i campioni sono stati suddivisi in 3 grandi aree individuate sulla base delle caratteristiche geografiche del territorio, ritenendo questa suddivisione maggiormente utile di quella fatta semplicemente sulla base di una divisione di tipo amministrativo (fig. 2.3). In particolare:

- Area 1: zona delle Prealpi venete (Verona e Vicenza)
- Area 2: zona delle Dolomiti (Belluno) e della Carnia (Udine)
- Area 3: zona dal Carso triestino (Trieste e Gorizia)

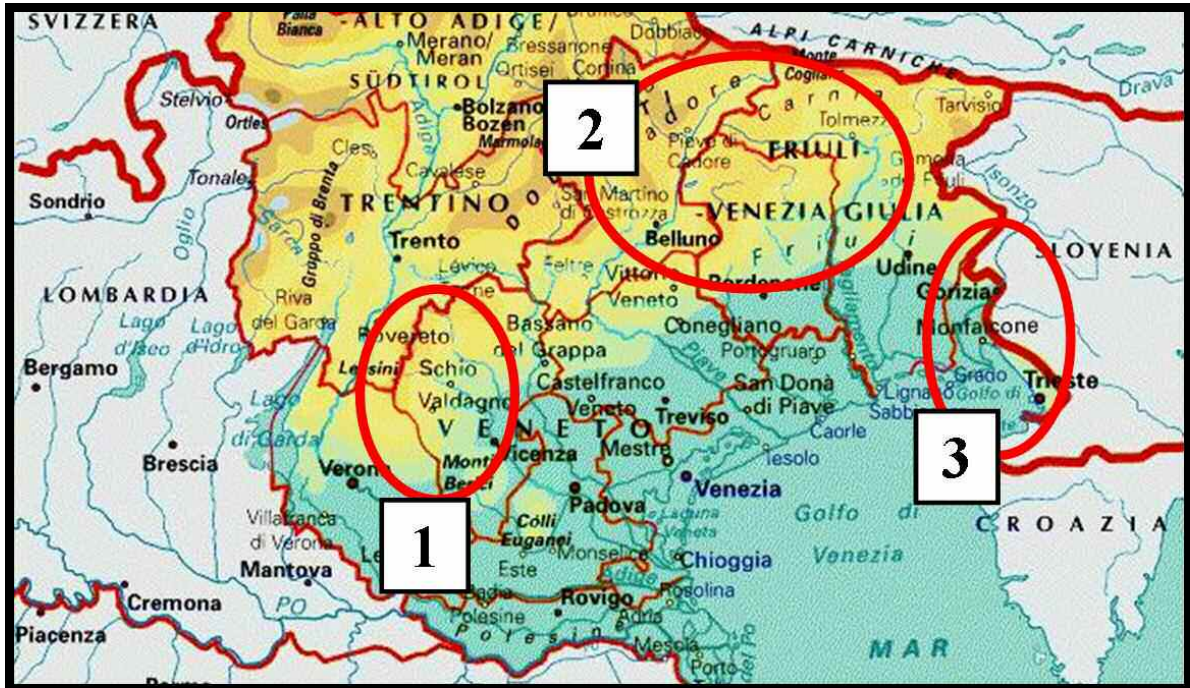


Figura 2.3: area di provenienza dei campioni di ruminanti selvatici

Per i selvatici non è stata eseguita alcuna analisi di tipo multivariato.

2.3. RISULTATI

2.3.1. *Microscopia e sierologia*

Su un totale di 116 bovini, 83 ovini, 24 caprini e 15 ruminanti selvatici (daini) per i quali è stato possibile eseguire l'esame microscopico, solo un campione prelevato da un bovino femmina, di razza Limousine e 18 mesi di età, proveniente da un allevamento della zona orientale della Provincia di Udine, è risultato positivo. Le caratteristiche morfologiche (fig. 2.4) dello striscio potevano far sospettare una eziologia riconducibile a *B. divergens*, diagnosi poi confermata dall'analisi biomolecolare.

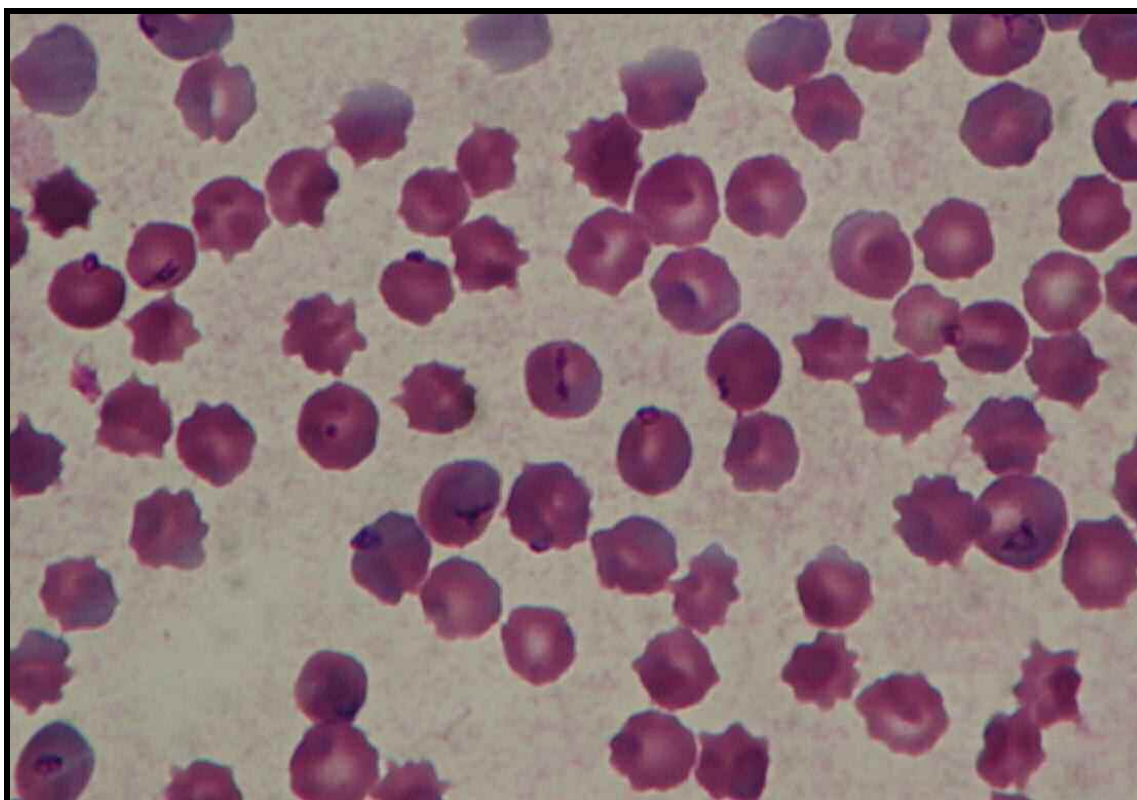


Figura 2.4: esame microscopico del campione PD-254-BV

Per quanto riguarda le analisi sierologiche, sono stati condotti test IFI su 116 bovini, provenienti da 14 diverse Aziende. Sul totale dei 116 sieri analizzati, 64 (pari al 55,2%) sono risultati positivi per presenza di anticorpi anti-*Babesia*, con valori del 53,4% (62/116) per *B. bovis* e del 10,3% (12/116) per *B. bigemina*. Positività nei confronti di entrambe le specie protozoarie sono state evidenziate in 10 (8,6%) campioni.

Per entrambe le specie protozoarie sono stati riscontrati titoli anticorpali che si sono mantenuti a livelli piuttosto bassi e non superiori al valore di 1:320. La maggior parte dei campioni ha evidenziato titoli non superiori a 1:80, sia per *B. bovis*, che per *B. bigemina* (tab. 2.2).

Titoli test IFI	1:40	1:80	1:160	1:320	Totale positivi
<i>B. bovis</i>	25	29	4	4	62
<i>B. bigemina</i>	-	8	3	1	12

Tabella 2.2: titoli anticorpali dei campioni positivi sierologicamente

2.3.2. *Analisi biomolecolari*

2.3.2.1. *Analisi su ospiti vertebrati*

Tutti gli 83 campioni ovini e i 24 caprini sono risultati negativi alle analisi biomolecolari. Per quanto riguarda i bovini sono stati analizzati mediante PCR solo 110 campioni (su 116 raccolti), 21 dei quali (19,1%) sono risultati positivi per “piroplasmi”. L’analisi delle sequenze ha consentito di individuare 15 campioni positivi per *Babesia microti*-like (ceppo *spanish dog*), 1 per *Babesia microti*, 1 per *Babesia divergens* e 4 per *Theileria buffeli*. L’unico campione positivo allo striscio di sangue è risultato essere anche l’unico nel quale, all’analisi filogenetica, è stata riscontrata *B. divergens*, specie tipica del bovino. È stato possibile condurre la PCR su 81 degli 83 campioni provenienti da ruminanti selvatici, individuando una positività per “piroplasmii” nel 35,8% (29/81) dei campioni. Il successivo sequenziamento, effettuato sui 29 campioni positivi, ha permesso di tipizzare *Theileria* spp. (in 4 daini e 1 capriolo), *Babesia divergens* - like (in 20 caprioli e 1 camoscio), *Babesia* EU1 (in 1 capriolo) e *Babesia ovis* (in 1 camoscio e in 1 cervo).

	campioni analizzati (N)	<i>Babesia microti</i>	<i>Babesia microti-like</i>	<i>Babesia divergens</i>	<i>Babesia divergens-like</i>	<i>Babesia EU1</i>	<i>Babesia ovis</i>	<i>Theileria</i> spp.	TOT	prevalenza
		N POS	N POS	N POS	N POS	N POS	N POS	N POS	POS	%
BOVINI	110	1	15	1				4	21	19,1
CAPRIOLI	49				20	1		1	22	44,9
DAINI	15							4	4	26,7
CAMOSCI	9				1		1		2	22,2
CERVI	5						1		1	20,0
MUFLONI	3								0	0,0
TOT	191	1	15	1	21	1	2	9	50	26,2

Tabella 2.3: positività all’analisi biomolecolare per le diverse specie di ospiti.

Nella tab. 2.3 sono riportate le positività all’analisi biomolecolare e relativo esito delle analisi delle sequenze, divisi per specie ospite (considerando separatamente i diversi ruminanti selvatici).

2.3.2.2. Analisi su artropodi vettori

In totale sono state raccolte 166 zecche, ciascuna delle quali è stata identificata e analizzata mediante PCR e successivo sequenziamento per la ricerca di *Babesia* spp. Per quanto riguarda i bovini, sono state raccolte 7 zecche (da 6 soggetti), tutte appartenenti alla specie *Ixodes ricinus* e risultate negative per “piroplasmii” all’analisi biomolecolare. Solamente una pecora è risultata positiva alla ricerca di ectoparassiti, presentando una sola zecca, identificata come *Rhipicephalus bursa* e negativa per “piroplasmii” alla PCR.

La fauna ectoparassitaria è risultata più abbondante nel caso dei ruminanti selvatici. Sul totale degli 83 soggetti campionati, 33 sono risultati positivi per presenza di zecche, per un totale di 158 artropodi raccolti e un’intensità di infestazione di circa 4 zecche/soggetto.

In particolare sono state rinvenute 3 *Ixodes ricinus* in 1 camoscio; 5 *Ixodes ricinus* in 1 daino; 9 *Ixodes ricinus* in 2 cervi; 141 *Ixodes ricinus*, 3 *Haemaphysalis concinna* e 3 *Dermacentor marginatus* in 33 caprioli.

Tutte le zecche raccolte sono risultate negative per *Babesia* spp., mentre due esemplari di *Ixodes ricinus*, prelevati da una femmina di capriolo di 6 mesi della provincia di Trieste, sono risultati positivi per *Theileria* spp., anche se lo stesso soggetto è risultato negativo alle analisi di PCR condotte sul coagulo di sangue.

2.3.3. Analisi dei fattori di rischio

2.3.3.1. Bovini

Per quanto riguarda la razza, il test del χ^2 non ha consentito di evidenziare differenze statisticamente significative di prevalenza ($p > 0,05$) rispetto a nessuno dei 3 test diagnostici considerati (sierologia *B. bovis*, sierologia *B. bigemina*, analisi biomolecolare).

Per quanto riguarda, invece, l’età, sono state riscontrate differenze leggermente significative ($\chi^2 = 8,000$; $p = 0,046$) solo rispetto all’esame PCR. I valori di sieroprevalenza più elevati sono stati rilevati nelle classi di età 0-18 mesi e 25-48 mesi.

Anche per quanto riguarda la Provincia di provenienza sono state riscontrate differenze significative rispetto a tutti gli esami considerati ($p < 0,05$). La Provincia di Belluno risulta essere quella per la quale sono state registrate positività costantemente basse, mentre per le altre Province le positività sono risultate variare sensibilmente a seconda del test preso in considerazione

L'analisi multivariata, invece, non ha messo in evidenza alcun fattore di rischio, fatta eccezione per la sieropositività verso *B. bovis*, risultate significativamente più elevate nelle classi di età 0-18 mesi e 25-48 mesi.

2.3.3.2. Ruminanti selvatici

Il test del χ^2 non ha consentito di evidenziare alcuna differenza statisticamente significativa di prevalenza ($p < 0,05$) rispetto alla positività all'esame PCR. Il fattore che ha fatto registrare il valore di significatività maggiore è quello relativo all'area di provenienza. Nella tabella 2.4 vengono riportati i valori per le 3 aree.

area di provenienza	PCR		
	totali (N)	positivi (N)	prevalenza (%)
1. Prealpi venete	18	3	16,7
2. Dolomiti e Carnia	29	10	34,5
3. Carso triestino	34	16	47,1
totale	81	29	35,8

Tabella 2.4: ruminanti selvatici positivi alla PCR divisi per area di provenienza

2.4. CONSIDERAZIONI

L'indagine ha permesso di rilevare una 'circolazione' inaspettatamente alta di protozoi del genere *Babesia* sia nei bovini che nei ruminanti selvatici, con positività alla ricerca diretta del parassita rispettivamente del 15,5% (17/110) e del 29,6% (24/81), e di segnalare la presenza di protozoi del genere *Theileria*, con positività del 3,6% (4/110) nei bovini e del 4,9% (4/81) nei ruminanti selvatici. I campioni prelevati da ovini e caprini, invece, sono risultati tutti negativi, anche se non è possibile fare considerazioni perchè, soprattutto per la specie caprina, le numerosità campionarie erano piuttosto basse.

2.4.1. Ovini e caprini

Anche se nessuno degli ovini (83) e dei caprini (24) provenienti dall'Italia nord-orientale (area di competenza dell'U.O. di Padova) è risultato positivo agli accertamenti diagnostici (microscopia e PCR), alcune positività sono state riscontrate negli ovini, in soggetti allevati in altre Regioni indagate all'interno dello stesso PRIN 2004 (Emilia Romagna, Toscana, Umbria e Lazio) per un valore medio di positività pari al 5,9% (18/306) all'analisi biomolecolare (Pietrobelli *et al.*, 2007). Analogamente a quanto riscontrato dall'U.O. di Padova, invece, i campioni caprini (133 in totale) sono sempre risultati negativi per *Babesia* spp., il che fa ipotizzare una loro refrattarietà o, comunque, una maggiore resistenza della specie caprina all'infezione.

In letteratura esistono poche indagini in Italia sulle babesiosi dei piccoli ruminanti, con segnalazioni sporadiche di focolai e con valori di prevalenza nelle pecore tendenzialmente inferiori al 10% (Savini *et al.*, 1999). In Europa il problema sembra essere particolarmente presente nelle aree mediterranee (Grecia, Spagna, Turchia), dove ci si trova di fronte a situazioni di babesiosi enzootica con alti valori di sieroprevalenza tra gli ovini (Çiçek *et al.*, 2004; Papadopoulos *et al.*, 1996; Ferrer *et al.*, 1998). La malattia sembra essere meno diffusa e meno grave nei caprini, anche se in questa specie sono stati riscontrati alti valori di sieroprevalenza (Papadopoulos *et al.*, 1996).

2.4.2. Bovini

2.4.2.1. Indagine sierologica

I risultati delle analisi sierologiche mostrano un valore di sieroprevalenza alto (53,4%) per quanto riguarda *B. bovis*, confermato dai risultati ottenuti dalle altre UU.OO. che in tutte le aree sono superiori al 30% (Pietrobelli *et al.*, 2007). Questi valori non consentono di descrivere un chiaro trend geografico di variazione della sieroprevalenza, anche se sembra essere tendenzialmente maggiore nelle aree più settentrionali.

Al contrario, la sieroprevalenza evidenziata per *B. bigemina* (10,3%), comparata con quelle ottenute dalle altre UU.OO (Pietrobelli *et al.*, 2007), sembrano descrivere un andamento tendenzialmente opposto, con valori inferiori nelle aree settentrionali dell'Italia.

I risultati descritti sono abbastanza sorprendenti per la realtà italiana. Non esiste infatti un quadro completo e generale della diffusione delle babesiosi dei bovini nel nostro Paese, ma precedenti indagini sembrano descrivere una situazione di endemicità per *B. bigemina* nell'area centro-meridionale (De Vico *et al.*, 1999; Carelli *et al.*, 2000; Cringoli *et al.*, 2002) e una situazione generale di presenza sporadica per *B. bovis*, legata a segnalazioni di focolai circoscritti (Rosignoli *et al.*, 2000; Badan *et al.*, 2007) o comunque segnalata con prevalenze decisamente basse nel caso di indagini epidemiologiche (Savini *et al.*, 1999). Per quanto riguarda *B. divergens*, sono stati riportati bassi valori di sieroprevalenza nella Provincia di Bologna ed in quella di Macerata in una indagine degli anni '80 (Prosperi *et al.*, 1990). In Italia non esistono molti altri dati a riguardo, anche se la malattia è ben nota in aree confinanti con la zona oggetto della presente indagine, come ad esempio l'Austria (Edelhofer e Baumgartner, 1996). Recentemente è stato segnalato un focolaio in una stalla di vacche da latte, con animali tenuti confinati, in una zona della Provincia di Vicenza. Anche se all'esame biomolecolare sono state trovate diverse specie di *Babesia*, la maggior parte dei positivi era dovuta a *B. divergens*. Il focolaio ha coinvolto diversi animali, a seguito di una trasmissione di tipo iatrogeno, ma sembra essere stato causato inizialmente dalla introduzione di alcuni soggetti provenienti dall'Austria (Badan *et al.*, 2007).

Nel tentativo di interpretare i dati ottenuti dalle analisi sierologiche della presente indagine, è possibile ipotizzare che diverse specie di *Babesia* siano presenti in diverse aree del Paese, possibilità peraltro giustificata dalle differenze climatiche e ambientali tra l'Italia centro-settentrionale e quella centro-meridionale. Gli artropodi riconosciuti come vettori delle varie specie di *Babesia* sono molti e hanno preferenze ecologiche diverse. La diffusione di *I. ricinus* (vettore di *B. divergens*) è ampiamente documentata per l'Italia centro-settentrionale e trova riscontro anche nella presente ricerca, mentre *Rhipicephalus bursa* è stato recentemente identificato come la specie predominante in allevamenti bovini di una ampia area dell'Italia centro-meridionale (Cringoli *et al.*, 2002). Nella stessa indagine non era stato riscontrato alcun esemplare di *B. annulatus*, riconosciuto vettore sia di *B. bigemina* che di *B. bovis*, e l'indagine sierologica (condotta utilizzando un test ELISA) aveva evidenziato una alta siero-prevalenza verso *B. bigemina* e nessun positivo verso *B. bovis*. Rimane dunque da chiarire l'effettiva distribuzione geografica delle varie specie di *Babesia* tipiche del bovino e da identificare quali sono, nel contesto italiano, le zecche con effettiva capacità vettoriale per ogni singola specie.

I dati del presente studio aggiungono alcuni indizi nella costruzione della mappa delle babesiosi bovine, anche se non bisogna dimenticare che le positività sierologiche riscontrate sono state, per entrambe le specie di *Babesia*, a bassi titoli, e, considerando la tendenza alla cross-reattività del test IFI, non è possibile escludere che alcune positività siano dovute alla presenza di altre specie, e tra queste soprattutto *B. divergens*, per la quale non si è potuto testare sierologicamente alcun campione.

2.4.2.2. Indagine biomolecolare

I dubbi sulla scarsa specificità del test sierologico sono stati in qualche modo confermati dall'analisi biomolecolare, in quanto il sequenziamento dei prodotti di amplificazione dei campioni bovini ha permesso di identificare in 15 campioni un ceppo filogeneticamente vicino a *B. microti* e definito come *B. microti-like*, e in altri due bovini rispettivamente *B. microti* e *B. divergens*. Sembra pertanto strano che siero-prevalenze così alte non siano legate ad un pur minimo riscontro diretto di *B. bovis*.

Il campione positivo per *B. divergens* corrispondeva all'unico campione risultato positivo allo striscio, rappresentando dunque un caso di infezione allo stato iniziale. Dal punto di vista della sanità pubblica, invece, desta ben più preoccupazione il riscontro di un campione positivo per *B. microti* e di ben 15 campioni positivi per *B. microti-like*. Come detto nella introduzione, *B. microti* è causa riconosciuta di babesiosi umana negli USA. In Europa, pur essendo stata più volte segnalata in vari ospiti vertebrati, soprattutto micro-mammiferi (Karbowiak, 2004), e in artropodi vettori (Duh *et al.*, 2001; Foppa *et al.*, 2002), non è mai stata dimostrata come causa di babesiosi nell'uomo. Nel tentativo di spiegare la mancanza di babesiosi clinica umana in Europa da *B. microti*, stata anche ipotizzata l'esistenza di diversi ceppi (Gray, 2006), caratterizzati da maggiore o minore potenzialità zoonotica. A quanto ci risulta questa è la prima segnalazione di *B. microti* nel bovino.

2.4.2.3. Fattori di rischio

Per quanto riguarda l'analisi dei fattori di rischio, non si è riusciti a stabilire in modo chiaro alcun tipo di fattore. Alcune classi di età (gli animali più giovani e quelli tra il secondo ed il quarto anno di età) sembrano essere maggiormente a rischio di presentare "piroplasmii" circolanti, ma questo risultato non mostra una tendenza chiara della positività rispetto all'età ed è difficilmente interpretabile dal punto di vista biologico. Il non riscontro di alcun fattore di rischio significativo è imputabile anche alle basse numerosità

campionarie e alla difficoltà di raccogliere con precisione e costanza tutti i dati anamnestici.

2.4.3. Ruminanti selvatici

Nei ruminanti selvatici è stata accertata la presenza di *B. divergens-like* (21), *B. ovis* (2) e *Babesia* EU1 (1). Particolare interesse riveste l'identificazione, in un capriolo della Provincia di Verona, del ceppo *Babesia* EU1. Si tratta infatti dello stesso ceppo segnalato come agente di zoonosi in Italia, in un cacciatore splenectomizzato e residente in un'area rurale dell'Emilia Romagna (Herwaldt *et al.*, 2003) e viene segnalato per la prima volta in un ruminante selvatico in Italia. Precedentemente, campioni positivi a *Babesia* EU1 erano stati segnalati in caprioli (Duh *et al.*, 2005a) e zecche (*I. ricinus*) della Slovenia (Duh *et al.*, 2005b), e in zecche della Svizzera (Hilpertshauser *et al.*, 2006).

Occorre inoltre considerare come in molti selvatici esaminati, in particolare caprioli, sia stata osservata la presenza di ceppi inseriti nel cluster *Babesia divergens-like*, a cui sono correlati ceppi segnalati come agenti di babesiosi umana in Europa e il ceppo zoonotico MO1 riscontrato in Missouri (Herwaldt *et al.*, 1997).

Anche per i ruminanti selvatici non è stato possibile individuare alcun fattore di rischio significativo, anche perché ancor di più valgono in questo caso i problemi legati alle basse numerosità campionarie e alla difficoltà di raccolta dei dati anamnestici. La specie capriolo è senza dubbio quella che presenta le maggiori positività (tab. 2.3), ma, a causa del campionamento fortemente sbilanciato, non è possibile fare confronti statisticamente significativi con le altre specie. L'unico aspetto per il quale è possibile individuare una tendenza è la provenienza. Come si vede dalla tabella 2.4 una tendenza all'aumento delle positività andando, lungo l'arco alpino del Triveneto, da occidente verso oriente. L'area con prevalenza maggiore risulta essere quella al confine con la Slovenia, Paese in cui, in effetti, sono stati riportati valori di prevalenza ancora più alti (Duh *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda le zecche, infine, viene confermata la presenza di varie specie, anche se *I. ricinus* tende ad essere specie altamente predominante.

2.4.4. *Aspetti diagnostici*

Da un punto di vista diagnostico è stato osservato come, in soggetti apparentemente sani, l'esame microscopico su striscio di sangue rappresenti una metodica diretta poco affidabile, diversamente dalla PCR che si è dimostrata molto più sensibile.

Nel corso dell'indagine ci sono state notevoli difficoltà nel reperimento dei kit diagnostici e degli antigeni per alcune specie protozoarie, quali *B. divergens*, *B. motasi* e *B. ovis*, rendendo impossibile l'esecuzione di esami sierologici per gli ovini e i caprini. Nei bovini, inoltre, è stato possibile effettuare la ricerca di anticorpi solamente nei confronti di alcune specie (*B. bovis* e *B. bigemina*). Anche la ricerca di contatti a livello internazionale non ha consentito, per il momento, di risolvere questo problema.

Nello studio della babesiosi in animali selvatici, un'ulteriore difficoltà consiste nel fatto che le specie di *Babesia* fino ad ora descritte sono state differenziate prevalentemente su base morfologica. L'introduzione delle tecniche biomolecolari sta rivoluzionando la tassonomia dei 'piroplasmii' e potrà fornire in futuro utili indizi per la corretta identificazione eziologica (Allsopp e Allsopp, 2006). Non va tuttavia dimenticato che solo integrando le analisi molecolari con lo studio degli aspetti ecologici, epidemiologici e sierologici, si potrà arrivare ad avere un quadro chiaro e completo delle babesiosi circolanti tra i ruminanti, sia selvatici che domestici.

Fino a quando questo obiettivo non sarà raggiunto, la PCR da sola non sarà in grado di stabilire la specie di *Babesia* in questione e, per quanto siano in corso studi riguardanti l'applicazione di metodiche di digestione con enzimi di restrizione sui prodotti amplificati, al momento, il sequenziamento e la successiva analisi filogenetica rappresenta l'unico sistema che permette di tipizzare eventuali piroplasmii evidenziati con la PCR (Bonoli, 2006).

2.5. CONCLUSIONI

In conclusione, le babesiosi dei ruminanti sono presenti anche in aree del nord considerate fino ad oggi scarsamente interessate dalla malattia. Particolarmente importante, dal punto di vista della sanità pubblica, il riscontro di un campione positivo a *Babesia* EU1, ceppo con accertate capacità di causare malattia nell'uomo, e di ben 21 campioni positivi a *B.*

divergens-like in ruminanti selvatici e 15 campioni positivi a *B. microti*-like tra i bovini, ceppi correlati ad isolati responsabili di babesiosi umana.

In futuro, la raccolta di zecche adulte direttamente dagli animali potrebbe essere integrata dalla ricerca dei vari stadi (larva, ninfa, adulto) e di patogeni eventualmente presenti al loro interno, attraverso campionamenti ambientali in aree di pascolo frequentate degli animali stessi, come già viene regolarmente fatto per altre malattie trasmesse da zecche.

Nel caso specifico della realtà dell'Italia nord-orientale, sarà importante arrivare a definire le caratteristiche epidemiologiche e la potenzialità zoonosica dei ceppi riscontrati, attraverso un monitoraggio attivo delle aree maggiormente a rischio.

Più in generale, saranno senza dubbio necessari ulteriori studi per chiarire gli aspetti tassonomici ed epidemiologici delle babesiosi umane nel contesto europeo. L'obiettivo è quello di poter individuare in modo chiaro quale o quali specie di *Babesia* siano responsabili di malattia nell'uomo e soprattutto quali ospiti vertebrati fungano da serbatoio e quali specie di zecche da vettori. Il tutto permetterà di valutare in modo più appropriato i fattori di rischio legati a questa malattia emergente.

3. LEISHMANIOSI CANINA IN ITALIA NORD-ORIENTALE: QUALI FATTORI DI RISCHIO?

3.1. INTRODUZIONE

3.1.1. *Situazione in Italia*

La leishmaniosi è una zoonosi protozoaria presente con diverse forme cliniche e altrettanto differenti caratteristiche epidemiologiche in molte aree dell'Europa, dell'Asia, dell'Africa e dell'America Latina. In Italia l'unica specie di *Leishmania* segnalata è *L. infantum*, agente della leishmaniosi canina (Lcan) e della leishmaniosi viscerale (LV) e cutanea (LC) nell'uomo. L'unico serbatoio riconosciuto della malattia è il cane e i vettori responsabili della trasmissione sono alcune specie di insetti ematofagi del genere *Phlebotomus*, chiamati comunemente flebotomi o pappataci.

In alcune Regioni del centro e del sud Italia la malattia è conosciuta da tempo, sia nel cane che nell'uomo, mentre le prime segnalazioni di focolai autoctoni in nord Italia risalgono alla metà degli anni '90 (Poglayen *et al.*, 1997; Ferroglio *et al.*, 2000). Negli ultimi anni anche in questa parte d'Italia la malattia sta assumendo sempre maggiore importanza (Genchi e Pietrobelli, 2006).

L'Italia nord-orientale non è rimasta indenne da questa tendenza e negli ultimi anni si sono susseguite varie segnalazioni nel cane, che, grazie ad indagini appositamente predisposte, hanno portato alla luce l'esistenza di veri e propri focolai autoctoni della malattia con circolazione del protozoo all'interno della popolazione canina locale. A partire dal primo focolaio segnalato nella zona della Valpolicella a Verona nel 1994 (Poglayen *et al.*, 1997), una sorveglianza sierologica ed entomologica delle aree limitrofe ha dimostrato che il focolaio originale era ancora attivo e che l'infezione si stava espandendo a nord-ovest, verso il lago di Garda (Piccoli *et al.*, 1999). Inoltre sono stati individuati focolai nell'area a nord-est di Verona (Pietrobelli *et al.*, 2004), nella zona di Arco di Trento (Capelli *et al.*, 2004) e nella zona di Vittorio Veneto (Vascellari *et al.*, 2005).

In Italia, nelle zone tradizionalmente endemiche, dove i valori di siero-prevalenza nella popolazione canina e quelli di densità del vettore sono elevati, si sono registrati nell'uomo, a partire dal 2000, circa 200 nuovi casi complessivi di LV e LC (Gradoni *et al.*, 2004). Al contrario, la situazione epidemiologica di questi nuovi focolai è ben meno allarmante e il rischio di trasmissione all'uomo minore, anche se iniziano ad essere segnalati alcuni casi umani, a partire dalle zone del primo focolaio veronese (Gabrielli *et al.*, 2001).

3.1.2. Obiettivi della ricerca

Considerando la limitata conoscenza della situazione epidemiologica in aree potenzialmente adatte al diffondersi della malattia, nel corso del triennio 2005-2007 si è cercato di monitorare l'evolversi dell'infezione nell'Italia nord-orientale attraverso indagini sierologiche ed entomologiche realizzate in alcune aree, opportunamente individuate. Basandosi sulla segnalazione di sospetti casi autoctoni di Lcan e sulle caratteristiche climatiche ed orografiche del territorio adatte alla presenza dei flebotomi vettori, sono state prese in considerazione 5 aree, 3 in Veneto (area delle colline orientali del veronese, area dei Colli Euganei e area dei Colli Berici) e 2 in Friuli Venezia Giulia (area intorno al Comune di Majano e area intorno al Comune di Caneva).

La zona collinare del veronese è da tempo oggetto di studio, per quanto riguarda la Lcan. A partire dal primo focolaio della Valpolicella, l'infezione si è diffusa sia in direzione nord-ovest, verso il lago di Garda, sia in direzione orientale, interessando progressivamente la Valpantena, la Val Squaranto e infine la Val d'Illasi. L'infezione ormai copre una vasta area, anche se è distribuita a macchia di leopardo. La presenza della malattia è ormai nota anche tra i Medici Veterinari liberi professionisti dell'area. L'uso di repellenti antiparassitari e la sorveglianza sierologica dei cani residenti nelle zone a rischio sono pratiche sicuramente più comuni di quanto lo siano in altre aree dell'Italia nord-orientale, anche se non vi sono dati certi sull'efficacia delle attività di controllo. I dati riportati nel presente studio rappresentano la parte conclusiva delle attività di monitoraggio entomologico, messe in atto in modo organico a partire dalla fine del 2002. L'area considerata in modo specifico è quella della zona collinare a nord-est della città di Verona e compresa nei Comuni di Lavagno, di Grezzana e della stessa Verona.

Per quanto riguarda l'area dei Colli Euganei, erano già state condotte indagini entomologiche negli anni 2002 e 2003 nella zona settentrionale (Natale, 2004). Forse anche a causa delle condizioni climatiche avverse, erano stati trovati solo 4 flebotomi (3 *P. perniciosus* e 1 *Sergentomya minuta*) nel 2002 e nessuno nel 2003.

L'area dei Colli Berici, limitrofa alla precedente anche se separata da un breve tratto di territorio pianeggiante, aveva fatto pure registrare la presenza di alcuni flebotomi durante indagini condotte nel 1998 e nel 1999 (Furnari, 2005). Questa presenza, anche se minima, confermava il sospetto che le aree in questione fossero idonee dal punto di vista climatico e ambientale allo sviluppo dei vettori della leishmaniosi. Nel corso della ricerca è stata realizzata una indagine sia di tipo sierologico, che entomologico per i Colli Euganei, mentre per i Colli Berici si è partiti nel 2007 solo con una indagine entomologica.

Per quanto riguarda invece il Friuli Venezia Giulia, non risultava essere mai stato segnalato alcun focolaio autoctono di leishmaniosi, anche se la presenza di possibili vettori (*P. perniciosus*) era stata segnalata ancora a metà degli anni '70 (Biocca *et al.*, 1977). In entrambe le aree identificate in questa Regione sono state condotte delle indagini sierologiche, mentre solo nell'area di Caneva è stato possibile realizzare una indagine di tipo entomologico.

Nella fig. 3.1 viene visualizzata la distribuzione geografica dei focolai già precedentemente descritti e quella delle aree considerate nel presente studio.

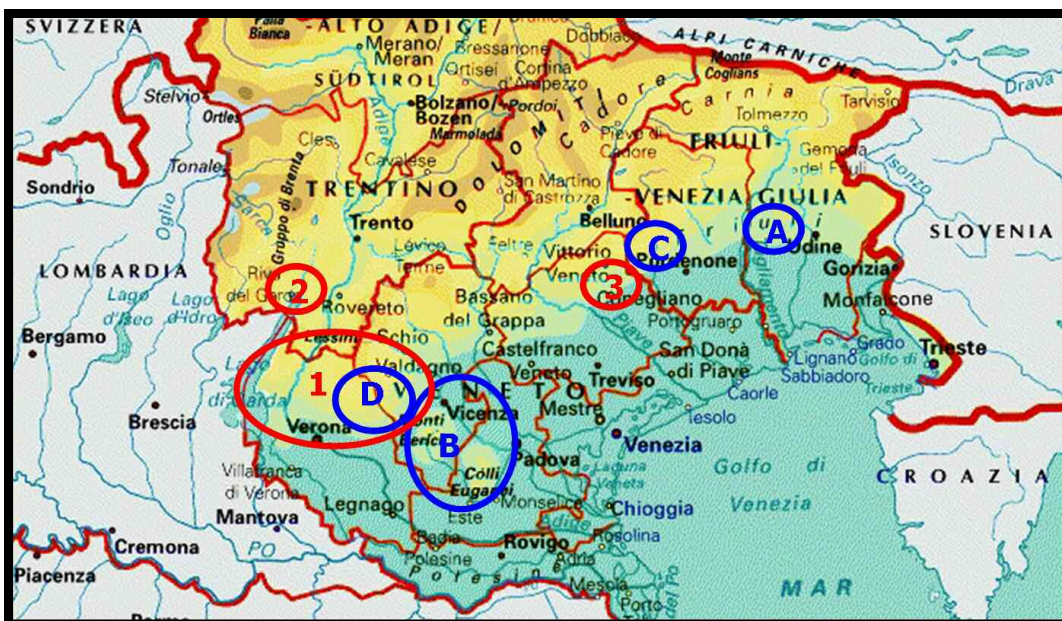


Figura 3.1: distribuzione dei focolai di leishmaniosi (1: VR, 2: TN; 3: TV) e aree considerate (A: Majano; B: Colli Euganei e Berici; C: Caneva; D: Verona)

3.2. MATERIALI E METODI

Le indagini epidemiologiche ed entomologiche del triennio 2005-2007, che vengono di seguito presentate, sono state frutto della collaborazione tra l'area di Parassitologia e Malattie Parassitarie del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie dell'Università degli Studi di Padova e il Laboratorio di Parassitologia ed Eco-patologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE).

La ricerca è stata realizzata grazie ai finanziamenti garantiti da fondi ministeriali e dell'industria farmaceutica (network scientifico *Leish Map*), per i primi due anni, e dalla Regione Veneto per il 2007, ma grazie soprattutto all'impegno umano e professionale del personale delle due Istituzioni coinvolte. Alcune fasi della ricerca (giornate di campionamento) hanno visto impegnate numerose persone in contemporanea. Oltre al personale delle Istituzioni stesse e a quello delle Aziende Sanitarie Locali (ASL) interessate, sono stati coinvolti alcuni Medici Veterinari liberi professionisti operanti nelle aree di studio e studenti della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Padova.

3.2.1. *Campionamento*

3.2.1.1. Indagini sulle popolazioni canine

Nel corso dei 3 anni della ricerca sono state organizzate 4 giornate di prelievi gratuiti per i cani di alcune aree opportunamente individuate. In tutti i casi la giornata è stata pubblicizzata mediante volantini e cartelloni informativi. Inoltre, grazie alla collaborazione delle ASL e a quella dei Comuni interessati, tutti i proprietari di cani registrati all'anagrafe sono stati avvisati ed invitati attraverso una breve lettera informativa.

Allo scopo di raccogliere in modo organico e standardizzato il maggior numero possibile di informazioni anamnestiche, ci si è avvalsi di una apposita scheda, da compilare prima che venisse effettuato il prelievo (fig. 3.2). Nella scheda sono state raccolte le informazioni relative al soggetto (razza, sesso, età, attitudine), all'ambiente di vita (Comune e zona altimetrica di provenienza, ricovero notturno), alla sua eventuale permanenza in aree endemiche per Lcan e alla presenza o meno di sintomi clinici riferibili alla malattia.



COORDINAMENTO SCIENTIFICO
 Istituto Superiore di Sanità, Roma - L. Gradoni (M.G. Amici, M. Maroli)
UNITÀ OPERATIVE
 - Università di Bari - Dipartimento SVPA - R. Baldo II
 - Università di Bologna - Dipartimento PAISPV-C. Geacchi, M. Montanaro
 - Università di Padova - Dipartimento SV-M. Petrotto, G. Capei II
 - Università di Palermo - Dipartimento PAEE - L. Rossi, E. Ferroglio

SCHEDA RACCOLTA DATI LEISHMANIOSI CANINA

D

Tipodiscampione:
 Siero
 Sangueperiferico
 Aspirato linfonodale
 Aspirato midollare

Tipodiesame:

Microscopia
 Coltura
 IFAT
 WB
 PCR

ESITOESAME:

Datidelsoggetto: (nome)

Maschio Femmina Etá..... Razza.....

Provenienza: nazione..... regione.....

Habitatabitualedivita:
 urbano pianura
 peri-urbano collina
 rurale montagna

Luogooabitualedivita:
 in appartamento all'aperto incanile

Ricoveronotturno: all'aperto al chiuso

Conviveconaltricanini: NO SI (quanti).....

Spostamenti /Maggi: NO SI sesi, Luogo.....
 Periodo: anno.....
 Stagione.....

Sintomatologiariferibilealeishmaniosi:
 NO
 SI: linfoadenomegalia(poplitei prescapolari retroscapolari sistemica)
 dermatitefurfuracea alopecia ulcere onicogrifosi epistassi
 mucosepallide lesionioculari splenomegalia perdita dipeso
 altro.....

Attitudine:
 compagnia
 guardia
 caccia

Proprietariodelcane
 Nome/Cognome.....
 Indirizzo:..... Città.....
 Provincia..... CAP..... Telefono.....

Veterinario
 Nome/Cognome.....
 Indirizzo:..... Città.....
 Provincia..... CAP..... Telefono.....

In caso di dubbi contattare
 alaprelievo:..... No.SCHEDA.....

Figura 3.2: scheda raccolta dati per campionamento su popolazioni canine



Figura 3.3: prelievo di sangue durante giornata di campionamento

Il campione di sangue è stato prelevato dalla vena cefalica brachiale (fig.3.3) o dalla vena safena di ciascun cane, ed il siero ottenuto è stato analizzato con la tecnica dell'Immunofluorescenza Indiretta (IFI) presso il Laboratorio di Immunologia dell'IZSVE di Legnaro, secondo quanto descritto nel par. 3.2.2.1.

Quando possibile, i cani risultati positivi al test sierologico sono stati prelevati nuovamente, a distanza di circa un mese, per confermare la positività sierologica ed effettuare la ricerca diretta di *Leishmania* mediante puntato linfonodale e tramite analisi PCR.

Nel luglio 2005, sulla base della segnalazione di un probabile caso autoctono è stata organizzata una giornata di campionamento su cani del Comune di Majano (UD) ed eventuali Comuni limitrofi. In tutto sono stati raccolti e analizzati 193 campioni. In questa area non è stato possibile procedere alla ricerca entomologica.

Nel 2006 sono state organizzate due giornate di campionamento. In entrambi i casi, durante l'anno precedente, era stato segnalato un sospetto caso positivo autoctono e si era proceduto ad effettuare una ricerca entomologica presso la residenza dei proprietari del

cane positivo e presso luoghi idonei nelle vicinanze, che aveva dato esito positivo rispetto alla presenza di flebotomi possibili vettori di leishmaniosi.

Una giornata è stata organizzata, nel mese di maggio, presso la località di Rivadolmo (fig. 3.4) in Comune di Baone (PD), nella zona meridionale dei Colli Euganei. Il caso positivo era stato segnalato in località Calaone, nel territorio del medesimo Comune. Sono stati raccolti ed analizzati 201 campioni. Sempre durante il mese di maggio, veterinari liberi professionisti del territorio hanno raccolto 44 campioni di siero provenienti da cani residenti in diversi Comuni della zona sud dei Colli Euganei.

L'altro Comune nel quale si è proceduto all'indagine sierologica, nel mese di giugno, è quello di Caneva (PN), sul cui territorio, in località Stevenà, era stato trovato il caso positivo. Forse anche per il fatto che volantini e cartelloni informativi erano stati disseminati in aree esterne al Comune stesso, la partecipazione è stata notevole e sono stati raccolti ed analizzati 365 campioni.

Nel corso del 2007, in seguito ai risultati dell'anno precedente, si è deciso di approfondire la situazione dell'area dei Colli Euganei, allargando l'indagine ad altri due Comuni (Cinto Euganeo ed Arquà Petrarca) della zona meridionale degli stessi Colli, individuando nei campi sportivi di Valle San Giorgio un sito di campionamento di comodo accesso per la popolazione dei 3 Comuni. In tutto sono stati raccolti 229 campioni, tra cui 25 da cani che erano stati prelevati anche l'anno precedente a Rivadolmo.



Figura 3.4: giornata di campionamento di Rivadolmo, Comune di Baone (PD)

3.2.1.2. Indagini sul vettore

Durante i tre anni dello studio, in parallelo con le indagini sulla popolazione ospite, sono state condotte indagini di tipo entomologico, finalizzate alla cattura e alla successiva identificazione di flebotomi. La decisione di organizzare una indagine entomologica in una determinata zona è partita dalla segnalazione di sospetti casi autoctoni di Lcan, tenendo comunque in considerazione l'effettiva esistenza di una situazione climatica e ambientale idonea alla presenza degli insetti.

Quando possibile le indagini entomologiche hanno sempre preceduto quelle sierologiche, in considerazione del minor sforzo organizzativo e del minor costo. L'organizzazione della giornata di campionamento sui cani poteva dunque essere effettuata dopo che il caso sospetto autoctono fosse stato avvalorato dall'esito positivo della ricerca dei flebotomi vettori, rendendo più plausibile l'ipotesi che il patogeno stesse davvero circolando all'interno della popolazione canina.

Per le indagini entomologiche sono state utilizzate, in prossimità dei luoghi di riposo degli animali presenti nell'area del sito di cattura, trappole adesive (fogli di carta per fotocopie delle dimensioni di 20 x 20 cm, imbevuti in olio di ricino, detti *sticky trap*) e trappole ad attrazione luminosa, modello CDC (*CDC light trap*) che sfruttano il fototropismo positivo di molte specie di flebotomi e che offrono la possibilità di catturare insetti vivi e di raccogliere campioni più consistenti. Per ogni sito di cattura sono stati registrati l'altitudine, le specie di animali vertebrati presenti ('animali esca'), il tipo di sito (fattoria, giardino, canile) e le coordinate geografiche. Quando possibile le catture sono state fatte con cadenza settimanale, a partire da fine giugno e fino ad inizio di ottobre, lasciando le *sticky trap* per due notti e la *CDC light trap* per una sola notte.

Nel 2005, come detto precedentemente, sono state organizzate indagini entomologiche sui Colli Euganei (PD) ed in Comune di Caneva (PN), individuando 4 siti per i Colli e 3 siti a Caneva. Nel caso dei Colli sono state effettuate catture mediante *sticky trap* in località Calaone, mentre in altri due siti di cattura (Ponte della Torre, Comune di Este e Teolo Alto, Comune di Teolo), individuati sempre all'interno del territorio dei Colli Euganei, ma distanti dalla località in cui era stato segnalato il caso autoctono di Lcan, si è deciso di utilizzare la *CDC light trap*, a garanzia di una maggiore capacità di cattura. Nel caso di Caneva, invece, i 3 siti monitorati erano in località Stevenà.

Nella tabella 3.1 sono riportate la localizzazione e le caratteristiche di ogni singolo sito (N=37) e il tipo di trappola utilizzato e nella fig. 3.5 la distribuzione geografica.

ID sito	Provincia	Comune	località	altitudine (m)	animali esca	tipo sito	tipo trappola *
PD/00	PD	Baone	Calaone	215	cani	giardino	S
PD/01	PD	Baone	Casette	17	cani	giardino	S
PD/02	PD	Baone	Calaone	215	cani	giardino	S
PD/03	PD	Baone	Calaone	220	cani	giardino	S, CDC
PD/04	PD	Baone	Calaone	178	cani cavalli maiali	fattoria	S
PD/05	PD	Baone	Piomba'	30	cani uccelli	giardino	S
PD/06	PD	Baone	Calaone	235	cani uccelli	fattoria	S
PD/07	PD	Baone	Calaone	226	cani	giardino	S
PD/08	PD	Baone	Calaone	151	bovini	fattoria	S
PD/09	PD	Este	Este	20	cani uccelli	giardino	CDC
PD/10	PD	Rovolon	Carbonara di Rovolon	28	cani	giardino	S
PD/11	PD	Cinto Euganeo	Fontanafredda	35	cani	giardino	S, CDC
PD/12	PD	Cinto Euganeo	Faedo	184	cani	giardino	S
PD/14	PD	Teolo	Teolo Alto	257	cani uccelli conigli	giardino	CDC
PN/01	PN	Caneva	Stevena'	60	cani conigli	giardino	S, CDC
PN/02	PN	Caneva	Stevena'	83	cani conigli	fattoria	S, CDC
PN/03	PN	Caneva	Stevena'	65	cani conigli uccelli	giardino	S
PN/04	PN	Caneva	Borgo Fontana	66	cani	giardino	S, M
PN/05	PN	Polcenigo	Santissima	72	cani	giardino	S
PN/06	PN	Caneva	Stevena'	80	bovini	fattoria	S
PN/07	PN	Caneva	Borgo Fontana	60	-	-	S
PN/08	PN	Caneva	Borgo Fontana	60	cani uccelli	giardino	S
PN/09	PN	Caneva	Borgo Fontana	64	cani uccelli	giardino	S
VI/01	VI	Vicenza	Vicenza	30	cani	canile	S
VI/02	VI	Noventa Vicentina	Noventa Vicentina	19	cani	canile	S, CDC
VI/03	VI	Costabissara	Ongaresca	77	cavalli uccelli	fattoria	S
VI/04	VI	Barbarano Vic.	S. Giovanni in Monte	347	cani	canile	S
VI/05	VI	Noventa Vicentina	Noventa Vicentina	25	cani	canile	S
VI/06	VI	Arcugnano	Arcugnano	-	cani uccelli	giardino	S, CDC
VR/01	VR	Verona	Novaglie	270	conigli bovini cani	fattoria	S
VR/02	VR	Verona	Contrada Maroni	270	conigli bovini cani	fattoria	S
VR/03	VR	Lavagno	Barco	270	conigli bovini cani	fattoria	S, CDC
VR/04	VR	Grezzana	Vaio dei Mulini	300	uccelli conigli	fattoria	S
VR/05	VR	Grezzana	Spredin	300	bovini	fattoria	S
VR/06	VR	Grezzana	Zerbaro	600	cani maiali	fattoria	S
VR/07	VR	Grezzana	Ca' Nova	-	cani	giardino	S
VR/08	VR	Grezzana	Ca' Nova	-	capre	fattoria	S

* S=Sticky trap; CDC=CDC light trap; M=manuale

Tabella 3.1: caratteristiche dei siti di cattura dei flebotomi



Figura 3.5: distribuzione geografica dei siti di campionamento dei flebotomi

Nell'area del veronese sono stati monitorati in totale 8 siti, anche se per la maggior parte dei siti non si è riusciti a garantire una buona copertura di tutto il periodo di presenza dei flebotomi. Solo in un sito è stata utilizzata la *CDC light trap* (fig. 3.6), oltre alle trappole adesive (fig. 3.7).



Figura 3.6: CDC light trap

Nel 2006 le indagini hanno riguardato le stesse zone prese in considerazione nel 2005, ma aumentando il numero di siti e l'intensità del campionamento. Nel 2007, infine, la zona di Caneva non è più stata monitorata, mentre le catture sono continuate sui Colli Euganei, allargandosi al Comune di Cinto Euganeo, ma diminuendo leggermente in intensità. Sempre nel 2007, vista la contiguità geografica con i Colli Euganei e la segnalazioni di alcuni casi di Lcan, si è voluto iniziare una indagine entomologica anche in alcune aree dei Colli Berici.



Figura 3.7: *sticky trap*

3.2.2. *Analisi di laboratorio*

3.2.2.1. *Indagini sulle popolazioni canine*

I sieri di cane sono stati analizzati con la tecnica dell'IFI. La metodica d'analisi si basa su quanto descritto da Gradoni e Gramiccia (2000) nel capitolo sulla leishmaniosi della 4° edizione del Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines.

L'IFI permette di evidenziare la presenza di anticorpi anti-*Leishmania* mediante una reazione del sistema rivelatore (anticorpi anti-immunoglobuline di specie, marcati con isotiocianato di fluoresceina) con gli immunocomplessi presenti nel siero degli animali infetti. Tale complesso si manifesta con l'emissione di una luce verde-gialla fluorescente durante l'osservazione al microscopio a fluorescenza.

La procedura per l'applicazione di questa metodica prevede la coltivazione del ceppo, la preparazione dell'antigene e, nel momento dell'arrivo dei campioni, il vero e proprio test di IFI indiretta per la ricerca degli anticorpi. Una descrizione dettagliata delle varie fasi si può trovare in Natale (2004).

La soglia di positività è stata posta a 1:40, alla luce della notevole specificità del test e dello svolgimento dello studio in un'area precedentemente considerata indenne dall'infezione.

Per quanto riguarda le analisi per la ricerca diretta del parassita, si è proceduto, quando possibile, all'osservazione citologica del puntato linfonodale (colorazione con Hemacolor®, Merck, Darmstadt, Germany) e all'analisi biomolecolare presso strutture esterne a quelle coinvolte nell'indagine. Nel 2005 è stata eseguita la nested PCR (n-PCR) presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità a Roma, utilizzando i primers del gene SSU rRNA (Gramiccia *et al.*, 2003), mentre nel 2006 è stata eseguita la PCR presso il Dipartimento di Produzione Animale, Epidemiologia ed Ecologia Animale dell'Università di Torino, secondo il protocollo descritto in Ferroglio *et al.* (2006).

3.2.2.2. Indagini sul vettore

Per tutti i flebotomi raccolti si è proceduto ad una diagnosi di specie. Ai fini dell'identificazione, i flebotomi, precedentemente fissati in alcol al 70%, sono stati chiarificati in clorallattofenolo (Maroli e Bettini, 1977) per 72 ore a 40°C e montati su vetrino allestendo preparati permanenti a base di Fenolo Balsamo.

I ditteri maschi sono stati montati integri su vetrino, avendo cura di distendere bene il corpo, le ali e le zampe in modo da evidenziare l'ipopigio, fondamentale per l'indicazione tassonomica, mentre i ditteri femmine sono stati sezionati in modo da ben orientare e separare la testa dalle ali e dal tratto distale dell'addome. L'identificazione della specie si basa infatti sullo studio di alcuni caratteri morfologici distinti secondo il sesso, e si basa sulle differenze morfologiche delle armature genitali, delle armature faringee e delle spermatiche come descritto nella comparazione schematica di Romi *et al.* (1994).

3.2.3. *Analisi statistica*

3.2.3.1. *Indagini sulle popolazioni canine*

I dati sulle caratteristiche delle popolazioni canine indagate, raccolti in occasione delle 4 giornate di campionamento, sono stati analizzati tramite una semplice statistica descrittiva, utilizzando anche le schede di soggetti che non è poi stato possibile testare sierologicamente. In tutto sono state utilizzate 193 schede a Majano e 267 a Caneva, mentre per i campionamenti dei Colli Euganei si è proceduto come di seguito descritto per l'analisi dei fattori di rischio.

La valutazione di eventuali fattori di rischio legati alla sieropositività è stata realizzata solo nel caso dei campionamenti dei Colli Euganei, dal momento che in entrambe le altre due aree campionate la sieroprevalenza è risultata eccessivamente bassa per poter fornire risultati significativi.

I soggetti campionati durante le due giornate di Rivadolmo (N=201) e di Valle San Giorgio (N=229), ed i cani visitati da liberi professionisti della zona (N=44) sono stati analizzati come un unico campione. Sono stati considerati positivi tutti i soggetti che lo erano risultati ad almeno uno dei due campionamenti. Sono stati infine esclusi dall'analisi i cani residenti in Comuni completamente esterni all'area collinare, arrivando ad un campione totale di 436 cani, anche se, per alcuni parametri, la numerosità campionaria è ulteriormente calata, a causa della mancanza di alcuni dati.

Tra i vari dati anamnestici raccolti al momento del campionamento sono stati presi in considerazione i parametri età (4 classi di età: 0-3 anni; da 3 a 5 anni; da 5 a 8,5 anni; sopra gli 8,5 anni), sesso, razza (di razza, meticcio), Comune di provenienza (Baone, altri Comuni dell'area collinare), zona altimetrica di provenienza (pianura, pedecollina, collina), attitudine (guardia, caccia, compagnia) e luogo di riposo durante la notte (interno, esterno). Le differenze di sieroprevalenza in relazione ai parametri considerati sono state analizzate con il test univariato del chi-quadro (χ^2).

3.2.3.2. Indagini sul vettore

Le raccolte effettuate con l'ausilio delle *sticky traps* hanno permesso la stima della densità di flebotomi/m² di superficie. La valutazione in bassa, media e alta densità, è stata fatta sulla base degli indici suggeriti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, 1979).

Gli indici sono:

Densità bassa: < 8 flebotomi/m²;

Densità media: tra 8 e 32 flebotomi/m²;

Densità alta: > 32 flebotomi/m².

Eventuali differenze tra le diverse aree di cattura sono state stimate prendendo in considerazione l'insieme delle densità di ogni singola cattura effettuata.

Per verificare la normalità della distribuzione delle densità tal quali e trasformate in log su base naturale è stato utilizzato il test di Kolmogorov-Smirnov.

Dal momento che la distribuzione è risultata non normale, la comparazione è stata quindi valutata tramite test non parametrici. In primo luogo è stato usato il test K di kruskal-wallis (comparazione di più campioni indipendenti), seguito, in caso di significatività, dal test U di Mann-Whitney per confronti a due a due.

3.3. RISULTATI

3.3.1. Indagini sulle popolazioni canine

3.3.1.1. Aspetti generali

In totale, grazie alle 4 giornate di campionamento e ai liberi professionisti che hanno collaborato nella zona dei Colli Euganei, il campione di cani indagato per quanto riguarda i dati anamnestici corrisponde a 996 soggetti, che vengono presentati di seguito, divisi nelle 3 aree di provenienza (Majano, Caneva, Colli Euganei).

Nella tabella 3.2 sono comparate le caratteristiche delle popolazioni campionate, per quanto concerne alcuni fattori che si ritiene possano rappresentare un rischio rispetto alla possibilità di diffusione della Lcan.

caratteristiche popolazione canina		Majano		Caneva		Colli Euganei		TOTALE	
		N	%	N	%	N	%	N	%
attitudine	compagnia	138	71,5	236	64,3	261	59,9	635	63,8
	guardia	24	12,4	16	4,4	54	12,4	94	9,4
	caccia	30	15,5	59	16,1	39	8,9	128	12,9
	n. d.	1	0,5	56	15,3	82	18,8	139	14,0
luogo di riposo notturno	esterno	111	57,5	264	71,9	313	71,8	688	69,1
	interno	76	39,4	102	27,8	121	27,8	299	30,0
	n. d.	6	3,1	1	0,3	2	0,5	9	0,9
viaggi fuori dall'area di residenza	sì	32	16,6	51	13,9	55	12,6	138	13,9
	no	155	80,3	316	86,1	375	86,0	846	84,9
	n. d.	6	3,1	0	0,0	6	1,4	12	1,2
segni clinici riferibili a Lcan	sì	5	2,6	5	1,4	22	5,0	32	3,2
	no	181	93,8	361	98,4	353	81,0	895	89,9
	n. d.	7	3,6	1	0,3	61	14,0	69	6,9
Totale	Totale	193		367		436		996	

Tabella 3.2: caratteristiche delle popolazioni canine indagate

In totale sono stati analizzati 1.032 sieri di cane, secondo la suddivisione riportata in tabella 3.3, e 39 sono risultati positivi (3,8%), anche se bisogna considerare che 25 soggetti sono stati prelevati due volte, di cui 3 sono risultati positivi ad entrambi i prelievi.

I valori di sieroprevalenza dei singoli campionamenti variano considerevolmente, passando dal 0,8% di Caneva al 10,0% del primo campionamento dei Colli Euganei, valore poi sceso al 5,2% nel 2007, quando l'area di interesse è stata estesa anche esternamente al Comune di Baone.

anno	data	area	N	positivi 1° prelievo	sieroprevalenza (%)	intervallo di confidenza (95%)
2005	2 luglio	Majano (UD)	193	2	1,0	0 - 2,3
2006	27 maggio	Baone (PD)	201	20	10,0	6,3 - 13,7
	maggio	Colli Euganei	44	2	4,5	0 - 10,5
	10 giugno	Caneva (PN)	365	3	0,8	0 - 1,7
2007	30 giugno	Baone, Cinto Euganeo, Arquà Petrarca (PD)	229	12	5,2	2,4 - 8,0
TOTALE			1.032	39	3,8	2,6 - 5,0

Tabella 3.3: numero di cani prelevati e numero di positivi per giornata di campionamento

Nei seguenti paragrafi, divisi per area di provenienza, vengono descritte le popolazioni canine sottoposte a controllo, rispetto alle anamnesi individuali e alle caratteristiche dell'ambiente di vita. Parallelamente saranno riportate alcune informazioni aggiuntive sui soggetti risultati positivi al test sierologico e l'esito degli eventuali ulteriori accertamenti.

3.3.1.2. Area di Majano (UD)

La popolazione campionata a Majano era composta in prevalenza da animali da compagnia (71%); quasi equamente distribuiti tra maschi (46%) e femmine (54%); appartenenti a molteplici razze (52%), ma in buona parte meticci (48%). La maggior parte dei cani proveniva da aree peri-urbane (69%) e collinari (55%) e circa il 9% ha effettuato viaggi sia in Italia che all'estero, comprese anche alcune aree a rischio (Croazia, Sicilia).

Sul totale dei 193 campioni raccolti a Majano nel 2005, sono risultati positivi 2 soggetti (1,0%), entrambi al limite soglia (1:40). I due cani positivi, che dai dati anamnestici risultavano non essere mai stati in aree a rischio, sono stati in seguito prelevati nuovamente a distanza di circa 1 mese. Solo un soggetto è risultato nuovamente positivo al titolo soglia di 1:40, ma negativo all'esame PCR.

3.3.1.3. Area di Caneva (PN)

La popolazione campionata durante la giornata di Caneva era composta in prevalenza da animali da compagnia (64%), equamente distribuiti tra maschi (50%) e femmine (50%). Anche in questo caso molti cani erano di razza (39%), ma la maggior parte meticci (61%). La maggior parte dei cani proveniva da aree peri-urbane (72%) e collinari (76%) e il 13% aveva effettuato viaggi sia in Italia che all'estero comprese anche alcune aree a rischio (Calabria, Sicilia, Sardegna).

A Caneva sono risultati positivi 2 cani conviventi in località Borgo Fontana, Comune di Caneva (entrambi 1:2560 al primo prelievo e 1:640 al secondo) ed un cane residente in Comune di Polcenigo (1:40 ad entrambi i prelievi). Tutti avevano presumibilmente contratto l'infezione in loco dal momento che non risultava dalla anamnesi alcun viaggio in zone a rischio. Due campioni su 3 sono risultati positivi all'analisi PCR.

3.3.1.4. Area dei Colli Euganei (PD)

Per quanto concerne il campionamento del 2006, effettuato solo per il Comune di Baone, sul totale dei 20 cani positivi, ben 18 non riportavano esperienze di viaggio in aree a rischio. Altro aspetto importante riguardava il luogo di residenza degli animali: 15 soggetti positivi su 20 vivevano in località Calaone, in una area collinare situata tra i 150 e i 250 metri sul livello del mare. Gli altri 5 soggetti risiedevano tutti in Comune di Baone, ma in altre località generalmente in zona pedecollinare, e per la maggior parte sono risultati positivi a bassi titoli (vedi tabella 3.4). Tra i 44 cani prelevati da liberi professionisti della zona, 2 sono risultati positivi al valore soglia (1:40), provenienti rispettivamente da Calaone e da Monselice.

Nel 2007 sono risultati positivi 12 soggetti, di cui 3 erano già risultati positivi al campionamento dell'anno precedente. L'area di indagine è stata allargata ad altri due Comuni della zona sud dei Colli Euganei. Sui 229 cani totali, 102 provenivano da Cinto Euganeo, 58 da Baone, 46 da Arquà Petrarca e 23 da altri Comuni. Nonostante questa diversa provenienza del campione, ben 11 soggetti positivi su 12 risiedevano in Comune di Baone e più precisamente in località Calaone.

Il dettaglio degli accertamenti indiretti tramite test sierologico IFI (con rispettivo titolo) e gli accertamenti diretti tramite PCR per i soggetti risultati positivi (N=31), tra quelli dei Colli Euganei, vengono presentati nella tabella 3.4.

N° ID	luogo e anno di prelievo	Comune	località	sexso	età (anni)	segni clinici	titolo 1° IFI	titolo 2° IFI	PCR	note
1	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	M	13	NO	1:80	1:40	neg	1:40 nel 2007
15	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	F	2	NO	1:320	1:640	POS	
23	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	F	7	NO	1:80	1:80	neg	
25	Rivadolmo 2006	Baone	Casette	F	10	NO	1:40	neg	neg	
33	Rivadolmo 2006	Baone	Rivadolmo	M	6	NO	1:80	neg	neg	
36	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	M	9	NO	1:5120			in terapia
50	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	F	6	SI	1:1280	1:1280	neg	
51	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	F	6	NO	1:2560	1:640	POS	1:1280 nel 2007
63	Rivadolmo 2006	Baone	Rivadolmo	F	3	SI	1:2560			in terapia
64	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	F	4		1:160	1:320		
65	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	M	2		1:320	1:320		morto
72	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	F	4	NO	1:320	1:640		
115	Rivadolmo 2006	Baone	Baone	F	5	NO	1:40	1:40	neg	
138	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	F	6		1:80	1:80		neg nel 2007
148	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	M	4	NO	1:80	1:40		
164	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	M	6	SI	1:1280			in terapia
177	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	M	5	NO	1:1280	1:1280	neg	1:1280 nel 2007
178	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	M	14	NO	1:2560			soppresso
186	Rivadolmo 2006	Baone	Piomba	F	11	NO	1:320	1:640	neg	
190	Rivadolmo 2006	Baone	Calaone	F	7	NO	1:160	1:80	neg	
13	Colli 2006	Monselice	Monselice	M	1	NO	1:40			
17	Colli 2006	Baone	Calaone	M	10	NO	1:40	neg		
54	Valle S.Giorgio 2007	Baone	Calaone	M	4	SI	1:1280			
101	Valle S.Giorgio 2007	Cinto E.	Faedo	M	3		1:40	neg		
111	Valle S.Giorgio 2007	Baone	Calaone	M	2		1:40			
113	Valle S.Giorgio 2007	Baone	Calaone	F	2		1:1280			in terapia
128	Valle S.Giorgio 2007	Baone	Calaone	F	6	SI	1:2560			
161	Valle S.Giorgio 2007	Baone	Calaone	M	5		1:640			
182	Valle S.Giorgio 2007	Baone	Calaone	M	4		1:5120			soppresso
196	Valle S.Giorgio 2007	Baone	Calaone	M	10	SI	1:5120			neg nel 2006
200	Valle S.Giorgio 2007	Baone	Calaone	M	15	SI	1:2560			morto

Tabella 3.4: dati dei cani positivi nei campionamenti dei Colli Euganei

In località Calaone è stato possibile calcolare una sieroprevalenza totale pari al 35,3% (26,9-43,7; C.I.=95%), considerando i soggetti positivi in almeno uno dei due campionamenti (N=24), sul totale dei prelevati per cui era specificata Calaone come località di provenienza (N=68).

Su 21 soggetti risultati negativi al prelievo del 2006 e prelevati anche nel 2007, solo 1 si è sierconvertito, indicando un valore di incidenza del 4,8% (0-13,3; C.I.=95%). La numerosità molto bassa rende comunque approssimativo il valore calcolato.

Solo per alcuni soggetti è stato possibile eseguire il secondo test sierologico e l'esame PCR. In particolare nel 2007 si è cercato di monitorare attivamente con un secondo prelievo solo i cani risultati positivi a bassi titoli al primo test, mentre i proprietari dei cani altamente positivi sono stati indirizzati verso i liberi professionisti per un adeguato monitoraggio sierologico e clinico del cane, oltre che per iniziare quanto prima una cura terapeutica.

3.3.1.5. Analisi fattori di rischio

L'analisi dei fattori di rischio rispetto alla sieropositività verso la Lcan è stata fatta solo per la popolazione dei Colli Euganei, considerata come un unico campione (N=436).

Per la maggior parte dei parametri non sono state dimostrate differenze significative tra le varie categorie considerate, fatta eccezione per il luogo di provenienza, sia come area (Comune di provenienza), che come altitudine. Infatti la sieroprevalenza dei cani provenienti dal Comune di Baone è significativamente più alta ($\chi^2=16,8$; $p<0,001$) di quelli provenienti da altri Comuni dell'area dei Colli Euganei. Parallelamente la sieroprevalenza dei cani provenienti da zone di collina è più alta ($\chi^2=22,0$; $p<0,001$) di quelli provenienti da aree pedecollinari o di pianura. Questi due fattori sono comunque in qualche modo interdipendenti e legati al fatto che Calaone (la località dove è presente la maggior parte dei positivi) si trova in una zona collinare del Comune di Baone.

Un aspetto interessante dell'analisi dei fattori di rischio riguarda le classi di età, dal momento che il fatto di non aver riscontrato sieroprevalenze maggiori nelle classi con i soggetti più anziani testimonia la natura recente del focolaio di Calaone, in cui probabilmente tutti i cani residenti hanno avuto solo gli ultimi anni per entrare in contatto con il parassita, a prescindere dalla lunghezza di vita alle spalle.

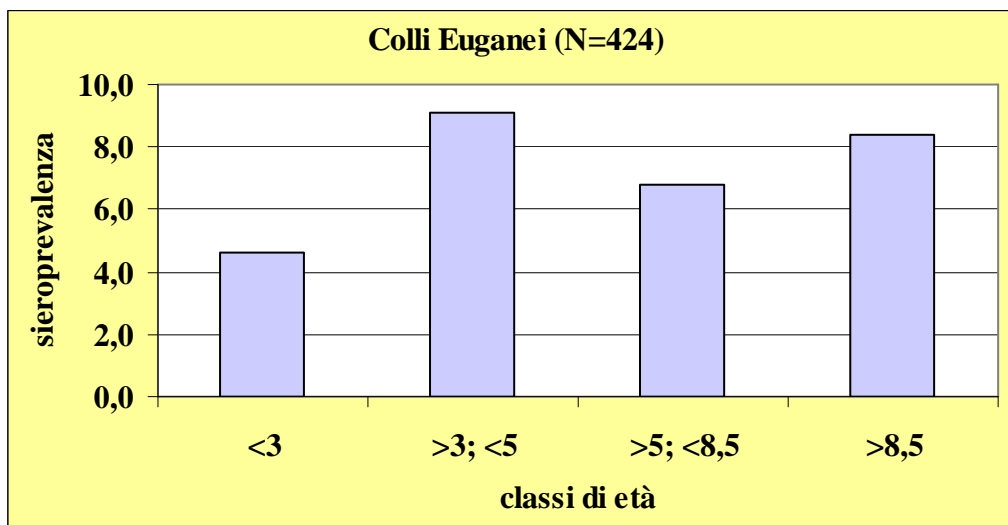


Figura 3.8: sieroprevalenza per classi di età (popolazione dei Colli Euganei)

In fig. 3.8 viene mostrata la sostanziale omogeneità tra le 4 classi, individuate sulla base dei quartili, con una sieroprevalenza leggermente minore solo nei soggetti molto giovani.

3.3.2. *Indagini sul vettore*

3.3.2.1. *Aspetti generali e confronto tra aree*

Nella tabella 3.5 viene evidenziato il confronto tra le densità riscontrate nei diversi anni e nelle diverse aree di cattura. Viene riportata anche la presenza delle diverse specie di flebotomi, basandosi sul ritrovamento in almeno uno dei siti di cattura di ciascuna area, con almeno uno dei due tipi di trappole. In totale sono state identificate 3 specie di flebotomi: *Phlebotomus perniciosus*, *P. neglectus* (figg. 3.9; 3.10; 3.11) e *Sergentomya minuta*. A parte *S. minuta*, flebotomo erpetofilo privo di significato vettoriale, *P. perniciosus* e *P. neglectus* sono entrambe specie con importanza epidemiologica e rappresentano, numericamente, la maggior parte dei flebotomi catturati. *P. perniciosus* è l'unica specie presente in tutte le aree ed è generalmente anche la specie più abbondante.

anno	area	intensità di cattura (m ²)	N fogli (1=0,04m ²)	N flebotomi	Densità (N/m ²)	specie*		
						Pp	Pn	Sm
2005	Colli veronesi	5,3	132	11	2,08			
	Caneva	15,9	397	7	0,44	x		
	Colli Euganei	12,4	309	17	1,38	x		x
	totale 2005	33,5	838	35	1,04			
2006	Caneva	28,8	720	24	0,83	x	x	
	Colli Euganei	21,0	524	60	2,86	x	x	x
	totale 2006	49,8	1244	84	1,69			
2007	Colli Euganei	17,7	442	55	3,11	x	x	x
	Monti Berici	15,6	391	7	0,45	x		x
	totale 2007	33,3	833	62	1,86			
Totale 2005-2007		116,6	2.915	181	1,55			

* Pp=*P. perniciosus*; Pn=*P. neglectus*; Sm=*S. minuta*

Tabella 3.5: confronto tra le densità di flebotomi nelle diverse aree

Lo sforzo di cattura è stato notevole: sono state posizionate in tutto 2915 *sticky trap*, corrispondenti a 116,6 m². In parallelo sono state fatte 52 notti di cattura mediante *CDC light trap* (vedi tab. 3.6, 3.7, 3.8, 3.9).

Le densità annuali complessive si mantengono su valori inferiori ai 2 flebotomi/m² (densità bassa secondo il WHO, 1979) e raggiungono il valore massimo di 3,11 flebotomi/m² (area dei Colli Euganei nell'anno 2007).

Per quanto riguarda le differenze tra aree, calcolate all'interno dello stesso anno, l'area di Caneva presenta densità più basse rispetto sia ai Colli Euganei ($p=0,022$) che a quelli veronesi ($p=0,027$) nel 2005, ma non più rispetto agli Euganei nel 2006 ($p>0,05$). Le densità riscontrate nell'area in Provincia di Verona e in quella di Padova nel 2005 non presentano differenze significative. Nel 2007, infine, le densità trovate sui Colli Euganei sono risultate maggiori a quelle dei Colli Berici in modo significativo ($p<0,001$).

Le densità annuali dell'area dei Colli Euganei (unica area monitorata tutti i tre anni) mostrano una tendenza all'aumento, anche se non è possibile un confronto statisticamente corretto, dal momento che i siti sono cambiati nel corso degli anni. L'unico sito monitorato tutti gli anni (PD/04; vedi tab. 3.8) ha fatto registrare la densità massima nel 2006.

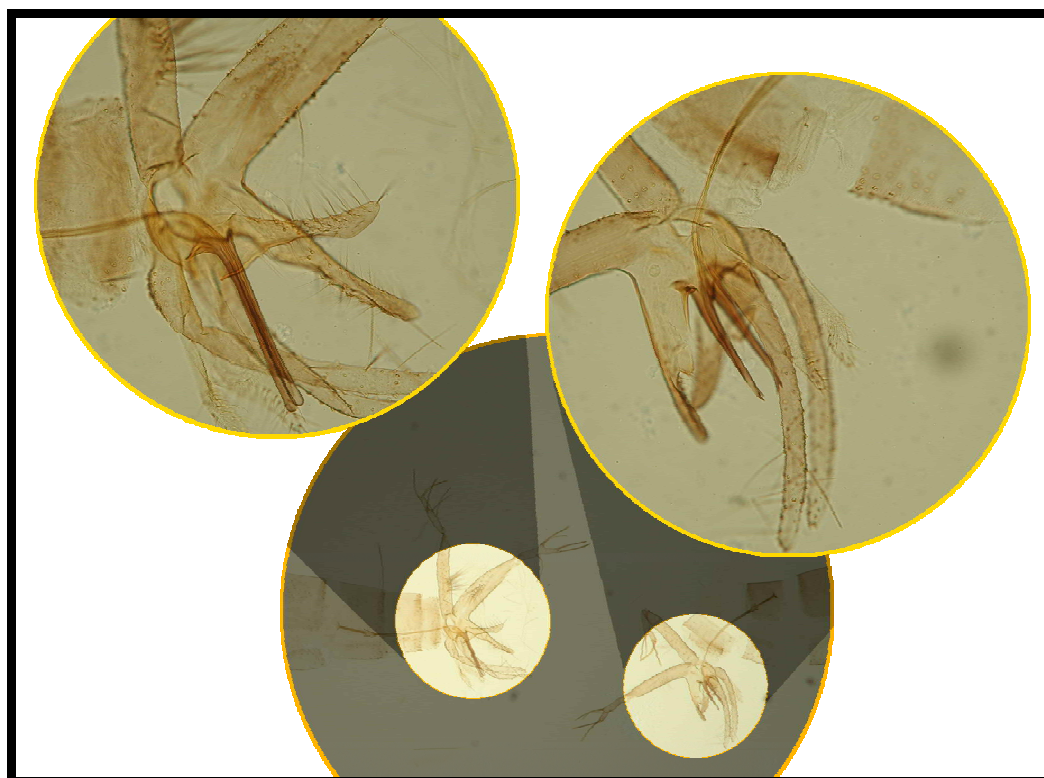


Figura 3.9: apparato genitale maschile di *P. neglectus* (sn) e di *P. perniciosus* (dx)



Figura 3.10: apparato genitale femminile di *P. neglectus*



Figura 3.11: apparato genitale femminile di *P. perniciosus*

I risultati delle singole indagini entomologiche vengono descritti con maggior dettaglio nei seguenti paragrafi.

3.3.2.2. Area di Caneva

Nella tab. 3.6 sono riportati il numero di flebotomi trovati per ogni sito di cattura e la densità stimata sulla base del numero di *sticky traps* posizionate, per la zona di Caneva.

anno	ID sito	altitudine (m)	tipo trappola	N catture	N fogli (1=0,4 m ²)	catture positive	N flebotomi	Densità (N/m ²)	specie*				
									Pp	Pn	Sm	n.i.	
2005	PN/01	60	sticky	12	130	1	2	0,38	2				
	PN/02	83	sticky	12	140	3	5	0,89	5				
	PN/03	65	sticky	12	127	0	0	0,00					
	totale 2005				36	397	4	7	0,44				
	PN/01	60	CDC		4		2	2		2			
totale 2005							9		9	0	0	0	
2006	PN/01	60	sticky	14	143	1	1	0,17	1				
	PN/02	83	sticky	14	199	7	13	1,63	13				
	PN/04	66	sticky	11	106	4	5	1,18	4			1	
	PN/05	72	sticky	6	68	0	0	0,00					
	PN/06	80	sticky	9	37	2	3	2,03	3				
	PN/07	60	sticky	6	18	0	0	0,00					
	PN/08	60	sticky	7	92	2	2	0,54	2				
	PN/09	64	sticky	4	57	0	0	0,00					
	totale 2006				71	720	16	24	0,83				
	PN/01	60	CDC		9		5	7		6	1		
PN/02	83	CDC		3		1	1			1			
PN/04	66	manuale					16		13	2		1	
totale 2006							48		42	4	0	2	
Totale flebotomi 2005-2006							57		51	4	0	2	

* Pp=*P. perniciosus*; Pn=*P. neglectus*; Sm=*S. minuta*, n.i.=non identificato

Tabella 3.6: densità e specie riscontrate per ogni sito dell'area di Caneva

Le specie identificate sono *P. perniciosus* (89% sul totale dei catturati) e *P. neglectus* (7%). Le densità annuali variano da 0 (siti negativi) a 2,03 flebotomi/m² nel sito PN/06. Nel sito PN/04 sono stati inoltre raccolti 16 flebotomi in casa, grazie ad una tecnica manuale escogitata dalla proprietaria.

3.3.2.3. Area delle colline orientali del veronese

Nella tab. 3.7 sono riportati il numero di flebotomi trovati per ogni sito di cattura e la densità stimata sulla base del numero di *sticky traps* posizionate, per la zona collinare a nord-est della città di Verona.

anno	ID sito	altitudine (m)	tipo trappola	N catture	N fogli (1=0,4 m ²)	catture positive	N flebotomi	Densità (N/m ²)	specie*			
									Pp	Pn	Sm	n.i.
2005	VR/01	270	sticky	1	10	1	7	17,50	7			
	VR/02	270	sticky	2	14	2	2	3,57	2			
	VR/03	270	sticky	1	10	0	0	0,00				
	VR/04	300	sticky	2	20	1	1	1,25	1			
	VR/05	300	sticky	2	20	1	1	1,25	1			
	VR/06	600	sticky	2	26	0	0	0,00				
	VR/07		sticky	2	22	0	0	0,00				
	VR/08		sticky	1	10	0	0	0,00				
	totale 2005				13	132	5	11	2,08			
	VR/03	270	CDC	5		5	237		80	134		23
totale 2005							248		91	134	0	23

* Pp=*P. perniciosus*; Pn=*P. neglectus*; Sm=*S. minuta*, n.i.=non identificato

Tabella 3.7: densità e specie riscontrate per ogni sito dell'area di Verona

Le specie riscontrate sono *P. perniciosus* (37% sul totale) e *P. neglectus* (54%). Le densità annuali variano da 0 a 17,5 flebotomi/m², anche se in realtà sono calcolate su numerosità basse di flebotomi. La maggior parte dei 248 flebotomi raccolti sono dovuti alle catture mediante *CDC light trap* effettuate presso il sito VR/03.

3.3.2.4. Area dei Colli Euganei

Nella tab. 3.8 sono riportati il numero di flebotomi trovati per ogni sito di cattura e la densità stimata sulla base del numero di *sticky traps* posizionate, per la zona dei Colli Euganei.

Le specie riscontrate sono *P. perniciosus* (70%), *P. neglectus* (22%) e *S. minuta* (3%). A parte alcuni rari esemplari di *S. minuta*, le due specie con importanza epidemiologica (*P. perniciosus* e *P. neglectus*) rappresentano la quasi totalità degli identificati per i siti dei Colli Euganei. Le densità annuali per sito variano da 0 a 14,06 flebotomi/m² nel sito PD/08. In questo caso è interessante notare come, anche in siti in cui la densità annuale

rimane bassa (PD/03; PD/04), vi sono comunque alcuni brevi periodi dell'estate in cui si arriva a valori di densità medi (WHO, 1979).

anno	ID sito	altitudine (m)	tipo trappola	N catture	N fogli (1=0,4 m ²)	catture positive	N flebotomi	Densità (N/m ²)	specie*				
									Pp	Pn	Sm	n.i.	
2005	PD/00	215	sticky	13	136	1	1	0,18				1	
	PD/04	178	sticky	14	173	8	16	2,31	8		1	7	
	totale 2005				27	309	9	17	1,38				
	PD/09	20	CDC	4		0	0						
	PD/14	257	CDC	7		6	28		23	3	1	1	
	totale 2005							45		31	3	2	9
2006	PD/01	17	sticky	3	35	0	0	0,00					
	PD/02	215	sticky	10	76	1	1	0,33				1	
	PD/03	220	sticky	12	114	10	31	6,80	27	3	1		
	PD/04	178	sticky	12	145	8	23	3,97	22	1			
	PD/05	30	sticky	4	20	0	0	0,00					
	PD/06	235	sticky	10	104	3	5	1,20	2	1	2		
	PD/07	226	sticky	4	30	0	0	0,00					
	totale 2006				55	524	22	60	2,86				
	PD/03	220	CDC	5		4	31		22	7	1	1	
	PD/14	257	CDC	4		3	16		12	3	1		
totale 2006							107		85	15	6	1	
2007	PD/03	220	sticky	13	117	10	23	4,91	18	3	1	1	
	PD/04	178	sticky	14	119	9	12	2,52	10	1	0	1	
	PD/06	235	sticky	12	119	2	2	0,42	1	1			
	PD/08	151	sticky	9	32	7	18	14,06	16	2			
	PD/10	28	sticky	1	8	0	0	0,00					
	PD/11	35	sticky	2	8	0	0	0,00					
	PD/12	184	sticky	4	39	0	0	0,00					
	totale 2007				55	442	28	55	3,11				
	PD/03	220	CDC	4		4	56		23	33			
	PD/12	184	CDC	3		2	2		2				
totale 2007							113		70	40	1	2	
Totale flebotomi 2005-2007							265		186	58	9	12	

* Pp=*P. perniciosus*; Pn=*P. neglectus*; Sm=*S. minuta*, n.i.=non identificato

Tabella 3.8: densità e specie riscontrate per ogni sito dell'area dei Colli Euganei

Nella figura 3.12 vengono mostrati gli andamenti stagionali della densità dei flebotomi per due siti mediamente produttivi dei Colli Euganei, nell'arco dei 3 anni di campionamento. Il valore soglia tra bassa e media densità (8 flebotomi/m²) è evidenziato dalla linea rossa orizzontale.

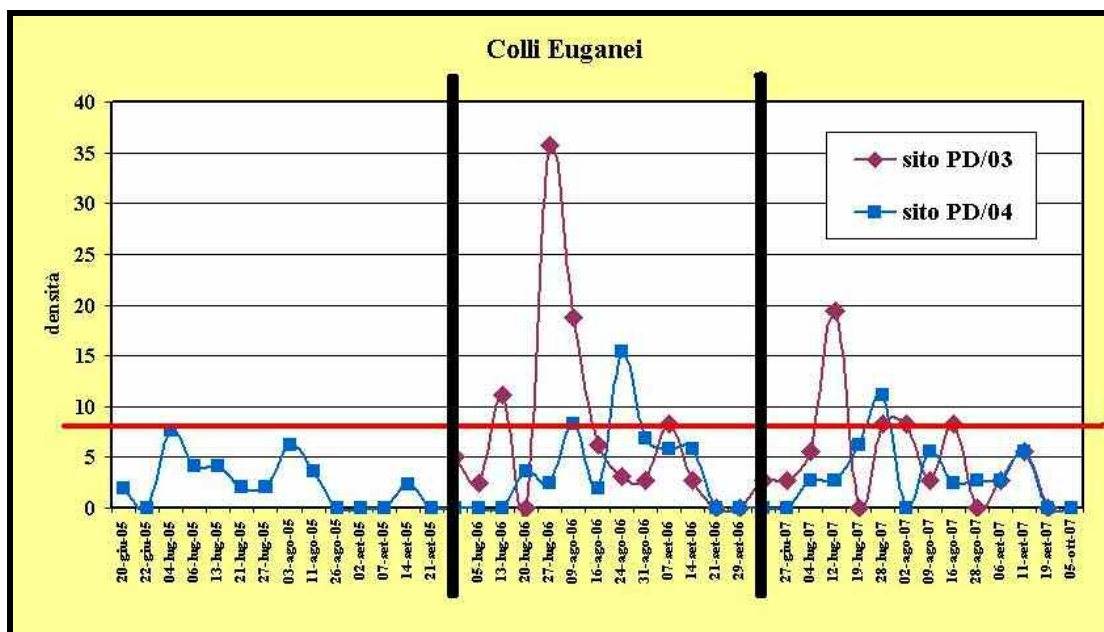


Figura 3.12: andamento stagionale dei flebotomi in due siti dei Colli Euganei

3.3.2.5. Area dei Colli Berici

Nella tab. 3.9 sono riportati il numero di flebotomi trovati per ogni sito di cattura e la densità stimata sulla base del numero di *sticky traps* posizionate, per la zona dei Colli Berici.

anno	ID sito	altitudine (m)	tipo trappola	N catture	N fogli (1=0,4 m ²)	catture positive	N flebotomi	Densità (N/m ²)	specie*				
									Pp	Pn	Sm	n.i.	
2007	VI/01	30	sticky	4	43	0	0	0,00					
	VI/02	19	sticky	6	73	1	1	0,34	1				
	VI/03	77	sticky	7	70	0	0	0,00					
	VI/04	347	sticky	10	127	2	6	1,18	4		2		
	VI/05	25	sticky	3	24	0	0	0,00					
	VI/06	>50	sticky	6	54	0	0	0,00					
	totale 2007				36	391	3	7	0,45				
	VI/02	19	CDC	1		0	0						
VI/06	>50	CDC	3		1	1			1				
totale 2007							8			6	0	2	0

* Pp=*P. perniciosus*; Pn=*P. neglectus*; Sm=*S. minuta*, n.i.=non identificato

Tabella 3.9: densità e specie riscontrate per ogni sito dell'area dei Colli Berici

Le specie riscontrate sono *P. perniciosus* e *S. minuta*. Le numerosità sono troppo basse per calcolare la abbondanze relative per le varie specie ed anche i dati relativi alle densità, che variano da 0 a 1,18 flebotomi/m² nel sito VI/04, devono essere considerati preliminari.

3.4. CONSIDERAZIONI

3.4.1. *Comparazione tra le aree*

Le aree prese in considerazione hanno mostrato tra loro una certa diversità rispetto all'effettiva presenza e livello di diffusione della Lcan. In qualche modo possono rappresentare la varietà dell'intero territorio dell'Italia nord-orientale, per il quale molte aree non sono ancora state studiate. Riteniamo probabile che alcune zone attualmente considerate non infette possano in realtà nascondere una circolazione del patogeno non ancora evidente per mancanza di casi clinici, per il mancato riconoscimento della loro natura autoctona o infine per la mancata segnalazione degli stessi agli organi competenti. Nella tab. 3.10 vengono riportati il numero di test IFI per Lcan eseguiti presso le strutture dell'IZSVe negli ultimi 3 anni (IZSVe, dati non pubblicati) e il numero di quelli risultati positivi, escludendo i campioni analizzati all'interno della presente ricerca.

Provincia	2005		2006		2007		TOTALE		
	testati	pos	testati	pos	testati	pos	testati	pos	%
VR	314	34	581	53	804	130	1.699	217	12,8
PD	55	15	77	9	99	21	231	45	19,5
VI	155	10	46	13	145	6	346	29	8,4
TN	16	12	11	5	14	3	41	20	48,8
PN	15	4	6	4	4	2	25	10	40,0
VE	10	1	3	0	13	3	26	4	15,4
TV	10	3	3	1	6	0	19	4	21,1
UD	57	2	7	0	6	1	70	3	4,3
BZ	14	2	11	1	20	0	45	3	6,7
RO	8	2	0	0	4	0	12	2	16,7
GO	0	0	1	1	0	0	1	1	100,0
tot	654	85	746	87	1.115	166	2.515	338	13,4

Tabella 3.10: test IFI eseguiti presso l'IZSVe, divisi per Provincia di provenienza

Non sono riportati in tabella i titoli di positività divisi per anno e provenienza, ma per avere una idea del livello medio di titolo anticorpale, la distribuzione degli stessi è stata calcolata sul totale dei positivi del 2005 e 2006 (N=203; sono inclusi anche i campioni raccolti nei campionamenti di Majano, Caneva e Rivadolmo).

In fig. 3.7 si può osservare come la maggior parte dei campioni (75%) abbia un titolo superiore o uguale a 1:160, valore per il quale si sospetta che l'infezione sia effettivamente in corso, tanto da raccomandare il trattamento del cane (Gradoni *et al.*, 2004).

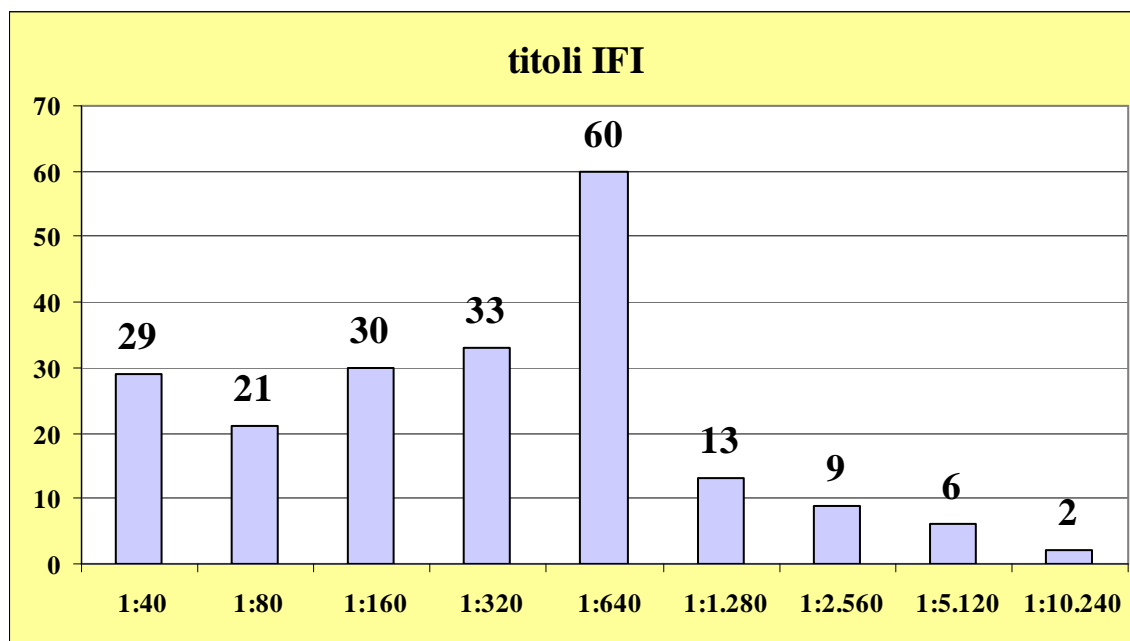


Figura 3.13: distribuzione per titoli dei campioni positivi all'IFI nel 2005 e nel 2006

I dati riportati in tab. 3.10 hanno alcuni limiti. Innanzitutto non è possibile distinguere gli infetti autoctoni da quelli che hanno contratto una infezione andando in zone a rischio. I valori di sieroprevalenza (%) riportati sono fuorvianti, perché calcolati su un campione non casuale e perché risentono, soprattutto per alcune Province, delle basse numerosità campionarie.

Anche considerando tutti questi limiti, la tab. 3.10 mostra chiaramente come le Province di Verona Padova, Vicenza, Trento e Pordenone siano quelle maggiormente interessate dal problema della leishmaniosi. L'aspetto interessante e, per altri versi preoccupante, è il numero di positivi, che risulta essere dell'ordine delle centinaia, se calcolato per l'intero territorio e sui 3 anni. Anche considerando che solo una parte di questi (presumibilmente intorno al 75%) sia positivo a titoli sufficientemente alti da essere indici di infezione veramente in atto, siamo comunque di fronte ad un alto numero di cani potenzialmente diffusori di *Leishmania*. Si tratta in questo caso di animali che saranno probabilmente sottoposti a trattamento e per i quali verranno usati appropriati presidi antiparassitari, ma si

tratta anche della punta di un *iceberg*, la cui parte nascosta è rappresentata da tutti i cani che non sono stati controllati e che, molto probabilmente, non saranno neanche opportunamente gestiti.

L'ultimo aspetto che ci sembra comunque indicativo della tab. 3.10 è la chiara tendenza alla crescita del numero di controlli sierologici effettuati dal 2005 al 2007, soprattutto per la Provincia di Verona, indice, se non dell'aumentata diffusione dell'infezione, quantomeno del maggiore livello di attenzione che la malattia sta destando.

Nei paragrafi seguenti viene brevemente descritta la situazione per ogni singola area, sulla base dei dati appena presentati e sulla base dei risultati della ricerca.

3.4.1.1. Area del veronese

Come detto nel paragrafo 3.1.2, la Lcan si sta diffondendo in buona parte della zona collinare della Provincia di Verona. Il quadro globale della situazione non è al momento ben conosciuto, anche se in molte aree sono state condotte indagini approfondite (Capelli *et al.*, 2004; Natale 2004; Marchi, 2005), rilevando spesso una situazione preoccupante. Le sieroprevalenze passano dal 20% della zona del primo focolaio (calcolati però su un campione non casuale) a valori variabili tra il 2,5% e il 5% nella zona a nord-ovest di Verona (Pietrobelli *et al.*, 2004) e, spostandosi verso est, si aggirano sul 3% nella zona di Lavagno e Mezzane, fino a calare all'1% nella Val d'Illasi e allo 0% nella Valle di Soave (Marchi, 2005).

Per quanto riguarda le densità di flebotomi, passiamo da valori sintetici di densità media annuale di circa 13 flebotomi/m² nelle zone più occidentali (Maroli *et al.*, 1995) a valori simili di circa 11 flebotomi/m², per l'area Lavagno, Mezzane e Illasi, con punte stagionali, nel mese di agosto, fino ai 70 flebotomi/m² nei siti maggiormente produttivi (Marchi, 2005).

I risultati delle indagini entomologiche condotte in questo lavoro non apportano novità interessanti, ma confermano la presenza di entrambe le specie di flebotomi (*P. perniciosus* e *P. neglectus*) a densità particolarmente alte per un'area del nord Italia e con punte stagionali che rientrano nella categoria 'alta densità' del WHO.

Ne consegue una conferma del forte rischio di stabilizzazione dei focolai esistenti e di diffusione geografica dell'infezione. La sempre maggior attenzione destata dalla malattia è

dimostrata anche dalla crescita del numero di esami sierologici richiesti all'IZS^{Ve}, che, per quanto riguarda la Provincia di Verona (tab. 3.10), sono più che raddoppiati dal 2005 al 2007.

3.4.1.2. Area di Majano

Nell'area del Comune di Majano, su 193 campioni testati, solo 1 è risultato positivo sia al primo test che a quello di conferma, risultando comunque negativo alla ricerca diretta del parassita. Ne consegue che al momento sembra non essere una zona interessata da questa malattia. La numerosità campionaria, infatti, era tale da poter rilevare con un livello di confidenza del 95% la presenza della infezione, anche nel caso in cui la prevalenza attesa non superasse il 2%, prevalenza sotto la quale è difficile immaginare che un focolaio di Lcan possa mantenersi (Favati *et al.*, 2000). Si vuole segnalare inoltre come non sia stato possibile confermare con certezza la natura autoctona del caso di Lcan da cui è partita l'intera indagine.

Nel caso di Majano non è stato possibile condurre delle indagini entomologiche e dunque confermare o meno la presenza delle specie di flebotomi coinvolte nella trasmissione della leishmaniosi, anche se la zona non presentava le caratteristiche orografiche e climatiche più adatte agli insetti in questione.

3.4.1.3. Area di Caneva

Nella zona di Caneva, non sembra che in questo momento si stia sviluppando un vero e proprio focolaio autoctono, ma il riscontro di anche solo due soggetti positivi ad alto titolo e senza storie di viaggi in zone a rischio rappresenta comunque un campanello d'allarme. Il patogeno, infatti, probabilmente sta circolando anche se con una velocità ed una diffusione limitata. Questa ipotesi è supportata anche dal riscontro, in questa area, di densità di flebotomi più basse rispetto alle altre aree interessate da veri e propri focolai.

In definitiva la situazione può essere paragonata a quella osservata nella limitrofa area di Vittorio Veneto (Vascellari *et al.*, 2005) e sarebbe opportuno valutare con maggiore attenzione la distribuzione dei soggetti positivi, magari conducendo indagini approfondite nelle località di Stevenà ed in quella limitrofa di Borgo Fontana dove sono stati trovati 3 casi sicuramente autoctoni. La bassa sieroprevalenza generale (0,8% per 365 soggetti) potrebbe nascondere valori più alti in alcuni foci ristretti, possibilità oltretutto spesso riscontrata per la leishmaniosi, malattia dalla classica distribuzione a macchia di leopardo.

3.4.1.4. Colli Euganei

Nell'area dei Colli Euganei, il riscontro di sieroprevalenze decisamente alte per un'area fino ad oggi considerata indenne e la presenza dei vettori con densità che in alcuni periodi riescono a raggiungere valori di 'densità media' (WHO, 1979), fa presupporre che si sia stabilito in località di Calaone un focolaio autoctono. La circolazione del patogeno è stata confermata anche dalle positività riscontrate all'esame del puntato linfonodale e alla PCR. L'ipotesi che l'infezione si possa diffondere anche ad altre aree dei Colli Euganei è stata per ora smentita dal campionamento 2007, in cui si era appositamente allargato il campo di indagine a due Comuni limitrofi e con il territorio adatto al diffondersi della malattia. I risultati del secondo campionamento hanno infatti indicato in modo chiaro che, per ora, la grande maggioranza degli animali infetti e la quasi totalità dei malati sono cani residenti nella località collinare di Calaone.

Sarà comunque sicuramente necessario mantenere la situazione monitorata, formare il personale sanitario di base e informare adeguatamente la popolazione residente. Come primo passo, nel 2006, a seguito dei risultati del primo campionamento, sono stati realizzati nel Comune di Baone degli incontri di sensibilizzazione rivolti alla popolazione e si è cercato di promuovere un uso diffuso di mezzi di profilassi, in particolare i presidi antiparassitari attivi nei confronti dei flebotomi.

3.4.1.5. Colli Berici

L'area dei Colli Berici, oltre ad esserne vicina geograficamente, presenta caratteristiche climatiche simili a quelle dei Colli Euganei, al punto che, come in quest'ultimi, si evidenziano zone di vegetazione di tipo mediterraneo.

In aggiunta a un ambiente adatto alla presenza dei flebotomi, sono stati segnalati, nel corso degli ultimi anni, vari casi di Lcan di origine sospetta, anche se non è stato possibile verificarne la natura autoctona.

La presente ricerca conferma la presenza in più punti di cattura di *P. perniciosus*, anche se le densità registrate si mantengono generalmente basse. Sarebbe opportuno continuare nel prossimo anno le indagini entomologiche, possibilmente aumentando lo sforzo di cattura. D'altro lato sarebbe consigliabile capire meglio la situazione della popolazione canina residente sui Colli Berici, raccogliendo maggiori informazioni sui casi sospetti ed eventualmente organizzando indagini sierologiche mirate.

3.4.2. Fattori di rischio

L'analisi statistica dei fattori di rischio è stata possibile solo nel caso della popolazione dei Colli Euganei, dal momento che nelle altre indagini il numero di soggetti sieropositivi era eccessivamente basso per permettere di ottenere dei risultati significativi.

Anche nel caso dei Colli l'analisi non ha fornito indicazioni particolarmente interessanti, a parte confermare che siamo di fronte ad un focolaio recente, sostanzialmente circoscritto alla località collinare di Calaone. Nessuna delle tre categorie di attitudine prese in considerazione è risultata maggiormente a rischio, così come, inaspettatamente, non è risultato essere un comportamento a rischio quello di tenere il cane all'aperto durante la notte.

Nonostante questo l'indagine ha permesso di confermare alcune caratteristiche della diffusione della leishmaniosi già precedentemente riscontrate e di indagare le caratteristiche di alcune aree e di alcune popolazioni campione, rispetto a fattori che notoriamente possono aumentare il rischio di introduzione e di diffusione dell'infezione in un territorio.

Di seguito verranno presi in considerazione gli aspetti ecologici, di maggiore pertinenza dei vettori, e quelli socio-economici, maggiormente legati alle popolazioni canine.

3.4.2.1. Aspetti ecologici

La presenza dei vettori, condizione necessaria per la presenza stabile dell'infezione, sembra essere strettamente legata ad condizioni orografiche e climatiche precise. Le aree di recente introduzione della malattia sono tutte accomunate da un clima particolarmente dolce, rispetto al restante territorio, tanto da presentare vegetazione dai tipici tratti mediterranei (presenza di ulivi, viti, ...). Nel territorio dell'Italia nord-orientale queste condizioni normalmente coincidono con ambienti collinari di altitudine limitata e possibilmente esposti a sud.

La ricerca dei flebotomi in aree pianeggianti della provincia di Padova (Natale, 2004) e Venezia (Capelli, 2004) ha fino ad ora dato esito negativo. In questo studio, nelle aree dei Colli Euganei e Berici, sono stati individuati siti di cattura sia in zona pianeggiante o pedecollinare (sotto i 50m; N=8), che in zona collinare (sopra i 50m; N=11). Solo 1 sito

sugli 8 di pianura è risultato positivo (con 1 solo flebotomo raccolto in tutto), mentre 9 siti collinari sugli 11 campionati sono risultati positivi (con 272 flebotomi raccolti).

Prese in generale, le aree considerate dalla ricerca mostrano tutte caratteristiche adatte alla presenza dei flebotomi e in effetti sono tutte risultate positive, anche se a diverse densità. Avendo a disposizione i dati meteorologici per ciascuna area sarebbe possibile verificare se le diverse densità riscontrate corrispondono a differenze in alcuni importanti parametri ambientali (temperatura, precipitazioni, vento), e, per alcuni di questi parametri (altitudine), si potrebbero confrontare anche i singoli siti.

L'obiettivo finale, come detto nell'introduzione, è definire, tramite indagini di campo, gli intervalli di variazione di questi parametri che risultano ottimali per i flebotomi. Sulla base di questi intervalli e grazie a strumenti quali il GIS e il RS, si potrà poi stimare la probabilità di presenza/assenza, o addirittura il livello di densità dei flebotomi, anche in aree non coperte dalla ricerca.

3.4.2.2. Aspetti socio-economici

La presenza dei flebotomi nel territorio dell'Italia nord-orientale è nota da tempo (Biocca *et al.*, 1977), anche se non si hanno a disposizione dati di lungo periodo sulla densità degli stessi nelle diverse aree del territorio considerato, essendo probabile, ma non dimostrata, una tendenza all'aumento, in seguito agli effetti del riscaldamento globale.

Esistono però sicuramente altri fattori, di tipo socio-economico, che possono contribuire a spiegare l'improvvisa insorgenza e la diffusione della leishmaniosi nell'Italia nord-orientale.

Sicuramente l'abitudine sempre più diffusa di viaggiare con il proprio cane al seguito durante le vacanze estive, ha avuto un ruolo fondamentale nell'introduzione dell'infezione in nord Italia. Il tutto è stato aggravato probabilmente da una scarsa conoscenza della malattia da parte dei proprietari che risiedevano in zone indenni da leishmaniosi e che, pertanto, non hanno preso le adeguate misure di protezione, né hanno fatto controllare il cane al rientro.

Le popolazioni prese in considerazione nello studio testimoniano questa abitudine. In totale circa il 14% dei proprietari ha dichiarato di aver portato il cane con sé in viaggio, e, in più di qualche caso, in aree e durante periodi a rischio. Le aree maggiormente frequentate sono le Regioni meridionali e insulari italiane, ma è stata spesso citata la Croazia, per la quale

bisognerebbe però avere informazioni più precise, in quanto solo le Province più meridionali di questo Stato risultano essere endemiche per Lcan (Živičnjak, 2005)

Anche se attualmente esiste sicuramente maggiore attenzione da parte sia dei Medici Veterinari liberi professionisti, che da parte dei proprietari di cani, rispetto al problema degli spostamenti in aree a rischio, il mettere in pratica semplici misure preventive (uso di presidi anti-parassitari durante il viaggio, controllo sierologico del cane 6-9 mesi dopo il rientro) rimane un importante punto della strategia di controllo della Lcan in nord Italia.

Un altro aspetto probabilmente implicato nella diffusione della Lcan è il cambiamento delle condizioni economico-sociali dei piccoli centri rurali. Il flebotomo punge su tutti gli animali domestici, senza particolari preferenze. I cambiamenti economico sociali degli ultimi decenni hanno però influenzato la tipologia di animali domestici, presenti alivello di piccoli centri rurali. Se da un lato gli animali da produzione (bovini, suini, avicoli) sono stati concentrati e confinati in poche aziende e sono pertanto diminuiti in prossimità delle case, dall'altro lato i cani sono invece aumentati. In Italia si stimano circa 7 milioni di cani padronali e quasi un milione di cani randagi (Zanutto, 2007). I cani di proprietà vivono soprattutto in città o nei piccoli centri, dove rappresentano uno dei pochi animali domestici. In definitiva, nei piccoli centri rurali come ad esempio Calaone, il cane rappresenta uno dei pochi animali su cui il flebotomo può effettuare il pasto di sangue, mentre precedentemente gli altri animali domestici, non essendo recettivi, fungevano da diluitori della malattia, ridimensionando la prevalenza della Lcan.

3.4.3. *Monitoraggio e controllo*

Le attività di monitoraggio realizzate in questi anni si sono sempre basate su ricerche entomologiche e su indagini sierologiche mirate a specifiche aree, scelte sulla base di segnalazioni di casi positivi autoctoni. Si vuole perciò rammentare quanto sia importante la segnalazione da parte dei liberi professionisti dei casi di Lcan, ed in particolare di quei casi in cui non risulti dalla anamnesi uno spostamento in area a rischio. Tale segnalazione è peraltro prevista dal Regolamento di Polizia Veterinaria (D.P.R. 320/1954) e rappresenta il primo fondamentale passo per poter iniziare un monitoraggio attivo del territorio e di conseguenza una efficace attività di controllo.

L'approccio da seguire nel caso di focolaio accertato, come nelle zone collinari del veronese o nel caso di Calaone, necessita il coinvolgimento di più attori in grado di agire in modo coordinato.

Da un lato infatti deve muoversi l'autorità sanitaria (ASL e Comune), ma al tempo stesso alcune attività (terapia, profilassi, controllo sierologico) possono o devono essere fatte dai Medici Veterinari liberi professionisti del territorio o garantite dalla disponibilità di adeguati presidi sanitari a livello locale. La popolazione, ed in particolare i proprietari di cani, devono essere informati correttamente sulla malattia e sulle possibili attività di profilassi da mettere in atto, ma resta a discrezione del singolo realizzare quanto consigliato. Dal momento però che attuare o meno determinate azioni profilattiche (registrazione all'anagrafe della popolazione canina, monitoraggio sierologico dei cani e trattamento tempestivo dei positivi, uso di presidi anti-parassitari durante il periodo di rischio) ha conseguenze di interesse generale, il Comune potrebbe decidere di rendere obbligatori alcuni di questi interventi.

La mancanza in Italia di un vaccino efficace nei confronti della Lcan, rende la prevenzione del contatto tra il flebotomo e il cane uno dei mezzi migliori nel controllo della Lcan. Molti Autori concordano nel sostenere che l'utilizzo di presidi antiparassitari sia un mezzo che può ridurre notevolmente il rischio di trasmissione del parassita, grazie all'utilizzo di collari impregnati con deltametrina (Halbig *et al.*, 2000; Maroli *et al.*, 2001; Reithinger *et al.*, 2004) o ad altre combinazioni farmacologiche somministrabili come spot-on (Otranto *et al.*, 2007).

Altro punto cardine è il trattamento tempestivo dei cani positivi. A questo risultato si può arrivare solo mantenendo regolarmente monitorati i cani che vivono in zone potenzialmente a rischio. Sarebbe consigliabile proporre ai proprietari un controllo sierologico annuale dei cani da effettuarsi nel periodo primaverile, in modo da poter individuare anche quei soggetti infetti che però non hanno ancora manifestato alcun sintomo.

3.5. CONCLUSIONI

Le attività di monitoraggio effettuate in questi ultimi due anni hanno confermato il trend di diffusione dei focolai di Lcan in Italia nord-orientale, individuando, per la prima volta, casi autoctoni in Friuli Venezia Giulia.

Le aree indagate presentano situazioni tra loro molto diverse, passando da una sostanziale assenza del patogeno (Majano), ad una scarsa circolazione dello stesso con conseguente presenza di un focolaio instabile (Caneva) fino a realtà in cui si è di fronte a focolai ormai stabilizzati (Verona, Colli Euganei).

Le zone a maggior rischio di presenza dei flebotomi e, conseguentemente, di introduzione e diffusione della Lcan sono quelle caratterizzate da un ambiente collinare con clima mite, in certi casi testimoniato dalla presenza di vegetazione di tipo mediterraneo.

Non è stato possibile individuare precisi fattori di rischio, legati a caratteristiche delle popolazioni canine o a quelle del territorio, anche se sono stati confermati alcuni aspetti che si ritiene possano favorire il diffondersi della leishmaniosi (ad es.: viaggi in zone a rischio).

Uno dei prossimi passi della ricerca è certamente rappresentato dalla necessità di analizzare i dati raccolti, correlandoli a dati ambientali e demografici attualmente ancora non disponibili, tramite l'utilizzo di un GIS.

Anche le attività di monitoraggio in futuro potrebbero trarre vantaggio da un approccio maggiormente integrato e basato sull'utilizzo di moderni sistemi di visualizzazione geografica ed analisi spaziale dei dati. Tale approccio è già stato suggerito per altre zone d'Italia dove il problema leishmaniosi è sicuramente più sentito (Brianti *et al.*, 2006).

Rimane però prioritario il tempestivo intervento degli organi competenti con l'impiego di adeguate risorse umane e finanziarie. Guardando la questione dal punto di vista della Sanità Pubblica, infatti, sembra particolarmente calzante il vecchio adagio "meglio prevenire, che curare".

4. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Le infezioni trasmesse da vettori stanno nuovamente acquistando una certa importanza a livello globale, dopo che per alcuni decenni si era pensato di averle tenute efficacemente sotto controllo (Gubler, 1998). Il verificarsi di importanti epidemie come quella della West Nile Fever negli Stati Uniti e quella di Bluetongue in Europa, ha evidenziato che anche Paesi provvisti di un sistema di Sanità Pubblica all'avanguardia sono a rischio (Chevalier *et al.*, 2004).

Anche nel nostro Paese e, più in particolare, nel nord Italia, esistono importanti esempi che confermano che le malattie trasmesse da vettori stanno 'emergendo'. Il progressivo espandersi della leishmaniosi canina, il riscontro di nuovi patogeni potenzialmente zoonosici trasmessi da zecche (*Rickettsia helvetica*; *Babesia* EU1), oltre all'aumentata incidenza di quelli 'tradizionalmente' presenti (TBE, malattia di Lyme) e il recente focolaio di Chikungunya in Provincia di Ravenna (Rezza *et al.*, 2007) sono tutti esempi che fanno capire quanto sia importante essere preparati ad affrontare il problema dei vettori e delle infezioni trasmesse.

Lo studio di queste malattie necessita uno spostamento di attenzione verso argomenti, come l'entomologia e l'ecologia, che non fanno sempre parte del bagaglio culturale del personale sanitario, sia medico umano che veterinario.

Nel presente lavoro si è dunque cercato di affrontare lo studio di due malattie parassitarie (leishmaniosi e babesiosi), entrambe sostenute da emoprotozoi potenzialmente zoonosici, attraverso indagini epidemiologiche sulle popolazioni ospiti e contemporanee indagini entomologiche sugli artropodi vettori (rispettivamente flebotomi e zecche).

I due casi studio presentati testimoniano come le infezioni considerate siano un potenziale rischio per la Sanità Pubblica.

Nel caso della leishmaniosi, in alcune aree dalle caratteristiche ambientali idonee, la malattia si è ormai stabilmente radicata nelle popolazioni di animali che fungono da serbatoio (cani). Il rischio per l'uomo rimane per ora basso, anche se in futuro potrebbe aumentare, soprattutto in assenza di adeguate azioni di controllo e profilassi.

La situazione per la babesiosi è più complessa, anche perché non è ancora del tutto chiaro quali specie di *Babesia* siano responsabili di malattia nell'uomo e soprattutto quali ospiti vertebrati fungano da serbatoio e quali specie di zecche da vettori.

Il rischio per l'uomo sembra essere per ora decisamente basso, anche se non si può escludere una circolazione in ambito selvatico che possa in futuro diventare evidente anche nell'uomo, come sembra essere successo per la TBE (Hudson *et al.*, 2001).

Un possibile sviluppo futuro della ricerca consisterà nell'analisi dei dati raccolti, tramite l'utilizzo di metodiche GIS. I dati di presenza e densità dei vettori, così come quelli di sieroprevalenza e positività biomolecolare, potranno essere associati a diversi parametri di tipo ambientale, demografico e amministrativo, permettendo l'individuazione dei principali fattori di rischio. La prospettiva ultima è la creazione di mappe di rischio per le principali infezioni e per i principali artropodi vettori.

Ci sembra in definitiva di poter affermare che i risultati delle indagini condotte in questi tre anni confermino l'importanza di una adeguata sorveglianza delle infezioni trasmesse da vettori anche nel territorio dell'Italia nord-orientale. Le attività di monitoraggio potrebbero, in futuro, trarre vantaggio da un approccio maggiormente integrato, soprattutto nel caso di infezioni che condividono lo stesso tipo di vettore.

BIBLIOGRAFIA

1. Allsopp M.T., Allsopp B.A. (2006) Molecular sequence evidence for the reclassification of some Babesia species. *Ann N Y Acad Sci.*, **1081**: 509-517.
2. Altshul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**: 403-410
3. Autorino G.L., Battisti A., Deubel V., Ferrari G., Forletta R., Giovannini A., Lelli R., Murri S. & Scicluna M.T. (2002) West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg. Infect. Dis.*, **8** (12): 1372-1378.
4. Badan M., Danesi P., Cassini R., Tessarin C., Barberio A., Bonato O., Torina A., Agnone A., Capelli G. (2007) Iatrogenic transmission of multiple babesiosis in a confined dairy cattle herd in Veneto region. *Parassitologia* **49** (Suppl. 1): 75
5. Beninati T., Lo N., Noda H., Esposito F., Rizzoli A., Favia G., Genchi C. (2001) First Detection of Spotted Fever Group Rickettsiae in Ixodes ricinus from Italy. *Emerging Infectious Diseases*, **8** (9): 983-986.
6. Biocca E., Coluzzi A., Costantini R. (1977) Osservazioni sulla attuale distribuzione dei flebotomi italiani e su alcuni caratteri morfologici differenziabili tra le specie del sottogenere Phlebotomus (Larrousius). *Parassitologia*, **19** (1-2): 19-32
7. Bonoli C. (2006) Babesiosi negli Ungulati selvatici: zoonosi emergente? Tesi di Dottorato di Ricerca in "Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi" XVIII ciclo – Università degli Studi di Bologna.
8. Brianti E., Drigo M., Birilli V.B., Forino D., Poglayen G., Giannetto S. (2006). Proposal of Health Information System (HIS) as tool for the epidemiological surveillance of leishmaniasis in urban areas. *Parassitologia*, **48**: 111-113.
9. Brunetti M., Maugeri M., Monti F., Nanni T. (2006) Temperature and precipitation variability in Italy in the last two centuries from homogenised instrumental time series. *International Journal of Climatology*, **26**: 345-381
10. Campbell G.L., Marfin A.A., Lanciotti R.S. & Gubler D.J. (2002) West Nile virus. *The Lancet Infectious Diseases*, **2** (9): 519-529.
11. Cancrini G., Frangipane di Regalbono A., Ricci I., Tessarin C., Gabrielli S., Pietrobelli M. (2003) Aedes albopictus is a natural vector of Dirofilaria immitis in Italy. *Veterinary Parasitology*, **118** (3-4): 195-202.
12. Capelli G., Baldelli R., Ferroglio E., Genchi C., Gradoni L., Gramiccia M., Maroli M., Mortarino M., Pietrobelli M., Rossi L., Ruggiero M. (2004). Monitoring the spread of Canine Leishmaniasis: an update from a scientific network. *Parassitologia*, **46**: 193-197.
13. Cassini R., Galuppi R., Bonoli C., Vanzetto A., Cestaro F., Frangipane di Regalbono A. (2007) Babesiosi dei ruminanti domestici e selvatici in Italia nord-

- orientale: rischio zoonosico? Atti del 3° Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria. Abano Terme, 13-14 settembre 2007. *ISTISAN 07/C5*: 38.
14. Ceci L., Carelli G., Di Giulio G., Tassi P., Greco B. (1999) Aspetti epidemiologici e clinici di un focolaio di babesiosi bovina da *Babesia bigemina* verificatosi in inverno. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, **31**: 311-318.
 15. Centeno-Lima S., do Rosário V., Parreira R.,J. Maia A., Freudenthal A.M., Nijhof A.M., Jongejan F. (2003) A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis. *Tropical Medicine and International Health*, **8** (8): 760–764
 16. Chevalier V., de la Rocque S., Baldet T., Vial L., Roger F. (2004) Epidemiological processes involved in the emergence of vector-borne diseases: West Nile fever, Rift Valley fever, Japanese encephalitis and Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **23** (2): 535-555
 17. Christensen J.H., Christensen O.B. (2003) Severe summertime flooding in Europe. *Nature*, **421**: 805-806
 18. Çiçek H., Düzgün A., Emre Z., Karaer Z. (2004) Seroprevalence of *Babesia ovis* in sheep around Afyon. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **28**: 683-686
 19. Comer J.A., Tesh R.B. (1991) Phlebotomine sand flies as vectors of vesiculoviruses: a review. *Parassitologia*, **33** (suppl. 1): 143-150
 20. Conte A., Giovannini A., Savini L., Goffredo M., Calistri P., Meiswinkel R. (2003) The Effect of Climate on the Presence of *Culicoides imicola* in Italy. *J. Vet. Med. B*, **50**: 139–147.
 21. Cringoli G., Otranto D., Testini G., Buono V., Di Giulio G., Traversa D., Lia R., Rinaldi L., Veneziano V., Puccini V. (2002) Epidemiology of bovine tick-borne diseases in southern Italy. *Vet. Res.*, **33**: 421-426
 22. CRU (2003) Global average temperature change 1856–2003. Climatic Research Unit, School of Environmental Sciences, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, UK (www.cru.uea.ac.uk/cru/data/temperature)
 23. Cupp E.W. (1996) Black flies and the agents they transmit. In: *The Biology of Disease Vectors* (Beaty B.J. e Marquardt W.C. eds). University Press of Colorado, Niwot, Colorado, USA: 98-109.
 24. De Vico G., Macrì V., Sammartino C., Loria G.R. (1999) Bovine babesiosis in Sicily: preliminary study on pathology. *Parassitologia*, **41** (Suppl. 1): 37-38
 25. Depaquit J., Naucke T.J., Schmitt C., Ferté H., Léger N. (2005) A molecular analysis of the subgenus *Transphlebotomus* Artemiev, 1984 (*Phlebotomus*, Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA with new northern records of *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908. *Parasitol Res.*, **95** (2):113-116

26. Duh D., Petrovec M., Avsic-Zupanc T. (2001) Diversity of Babesia Infecting European Sheep Ticks (*Ixodes ricinus*). *Journal of Clinical Microbiology*, **39** (9): 3395-3397
27. Duh D., Petrovec M., Avsic-Zupanc T. (2005b) Molecular Characterization of Human Pathogen Babesia EU1 in *Ixodes ricinus* Ticks From Slovenia. *Journal of Parasitology*, **91** (2): 463-465
28. Duh D., Petrovec M., Bidovec A., Avsic-Zupanc T. (2005a) Cervids as Babesia Hosts, Slovenia. *Emerging Infectious Diseases*, **11** (7): 1121-1123
29. Dujardin J. (2006) Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends in Parasitology*, **22** (1): 4-6
30. Durand B., Chevalier V., Pouillot R., Labie J., Marendat I., Murgue B., Zeller H. & Zientara S. (2002) West Nile virus outbreak in horses, Southern France, 2000: results of a serosurvey. *Emerg. Infect. Dis.*, **8** (8): 777-782.
31. Edelhofer R., Baumgartner W. (1996) Seroepidemiological studies of bovine *Anaplasma marginale* and *Babesia divergens* in Austria, involving autochthonous infections. Proceedings of the World Association of Buiatrics Congress, Edinburgh, vol 2: 472-476
32. EEA (2004) Impacts of Europe's changing climate: an indicator-based assessment. European Environment Agency, Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities ISBN 92-9167-692-6
33. EEA (2005) Vulnerability and adaptation to climate change in Europe. European Environment Agency, Technical report (N° 7/2005) ISSN 1725-2237
34. El Kammah K.E. (1972) Frequency of autogeny in wild-caught Egyptian *Phlebotomus papatasi* Scopoli (Diptera, Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, **9**: 294
35. Estrada-Peña A. (2001) Forecasting habitat suitability for ticks and prevention of tick-borne diseases. *Veterinary Parasitology*, **98**: 111-132.
36. Estrada-Peña A., Jongejan F., (1999) Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Ex. And App. Acarology*, **23**: 685-715
37. Favati V., Macchione F., Mancianti F. (2000). Epidemiologia della leishmaniosi in Toscana. *Il Progresso Veterinario*, **23**: 1092-1096
38. Feliciangeli M.D. (2004) Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**: 71-80
39. Ferrer D., Castellà J., Gutiérrez J.F. (1998) Seroprevalence of *Babesia ovis* in sheep in Catalonia, northeastern Spain. *Veterinary Parasitology*, **79**: 275-281

40. Ferroglio E., Romano A., Trisciuglio A., Poggi M., Ghiggi E., Sacchi P., Biglino A. (2006) Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **100**: 636-641
41. Ferroglio E., Rossi L., Mignone W., Maroli M. (2000). Sandfly vectors investigation at an unstable focus of canine leishmaniasis in Italy (Piedmont) and the risk of permanent infection transmission. *Parassitologia*, **42** (Suppl. 1): 114
42. Foppa I.M., Krause P.J., Spielman A., Goethert H., Gern L., Brand B., Telford III S.R. (2002) Entomologic and Serologic Evidence of Zoonotic Transmission of *Babesia microti*, Eastern Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, **8** (7): 722-726
43. Frangipane di Regalbono A. (2000) Epidemiologia della setariosi bovina da *Setaria labiatopapillosa* in Friuli-Venezia Giulia. Tesi di Dottorato di Ricerca in “Epizootologia, Epidemiologia e Chemioterapia delle Malattie Parassitarie” XII ciclo - Università degli Studi di Torino
44. Furnari C. (2005) Risk analysis of leishmaniasis diffusion in the Veneto Region area. Final thesis of the “European Master in Risk Assessment and Risk Analysis”. Università degli Studi di Milano
45. Gabrielli G.B., Zaia B., Stanzial A.M., Corrocher R. (2001) Leishmaniosi viscerale: una malattia raramente diagnosticata nel nord Italia. Descrizione di un caso. *Annali Italiani di Medicina Interna*, **16** (3): 185-191
46. Genchi C., Pietrobelli M. (2006). Canine Leishmaniosis: An Italian Emergency. *Veterinary Research Communications*, **30** (Suppl. 1): 29-30.
47. Gradoni L., Gramiccia M, Scalone A. (2003) Visceral Leishmaniasis Treatment, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, **9** (12): 1617-1620
48. Gradoni L., Gramiccia M. (2000) Leishmaniasis, In OIE (ed.), Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. *Office International des epizooties (OIE)*, Paris, France, 803-812.
49. Gradoni L., Gramiccia M., Khoury C., Maroli M. (2004) Linee guida per il controllo del serbatoio canino della leishmaniosi viscerale zoonotica in Italia. *Rapporti ISTISAN* **04/12**: 1-16
50. Gramiccia M., Gradoni L. (2005) The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, **35**: 1169–1180
51. Gramiccia M., Ludovisi A., Nardoni S., Di Muccio T., Mancianti F. (2003) PCR and Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood from dogs living in endemic areas of Italy. *J. Euk. Microbiol.*, **50**: 36.

52. Gray J.S. (2006) Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe. *International Journal of Medical Microbiology*, **296** (Suppl. 1): 131–136
53. Gubler D.J. (1998) Resurgent Vector-Borne Diseases as a Global Health Problem. *Emerging Infectious Diseases*, **4** (3): 442-450
54. Halbig P., Hodjati M. H., Mazloumi-gavvani A. S., Morite H., Davies R. C. (2000). Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites. *Medical and veterinary entomology*, **14**: 223-226.
55. Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, **41**: 95-98
56. Herrer A., Christensen H.A. (1975) Implication of Phlebotomus sand flies as vectors of bartonellosis and leishmaniasis as early as 1764. *Science*, **190** (4210): 154-155
57. Herwaldt B.L., Cacciò S., Gherlinzoni F., Aspöck H., Slemenda S.B., Piccaluga P., Martinelli G., Edelhofer R., Hollenstein U., Poletti G., Pampiglione S., Löschenberger K., Tura S., Pieniazek N.J. (2003) Molecular Characterization of a Non-Babesia divergens Organism Causing Zoonotic Babesiosis in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, **9** (8): 942-948
58. Herwaldt B.L., Kjemtrump A.M., Conrad P.A., Barnes R.C., Wilson M., McCarthy M.G., Sayers M.H., Eberhard M.L. (1997) Trasfusion-transmitted babesiosis in Washington State: first reported case caused by a WA-1 type parasite. *J. Infect Dis.* **175** (5): 1259-1262
59. Hilpertshauer H., Deplazes P., Schnyder M., Gern L., Mathis A. (2006) Babesia spp. Identified by PCR in Ticks Collected from Domestic and Wild Ruminants in Southern Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (10): 6503–6507
60. Holbrook F.R. (1996) Biting midges and the agents they transmit. In: *The Biology of Disease Vectors* (Beaty B.J. e Marquardt W.C. eds). University Press of Colorado, Niwot, Colorado, USA: 110-116.
61. Hoogstraal H. (1979) The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo haemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J. med. Entomol.*, **15** (4), 307-417.
62. Hudson P.J., Rizzoli A., Rosà R., Chemini C., Jones L.D., Gould E.A. (2001) Tick-borne encephalitis virus in northern Italy: molecular analysis, relationships with density and seasonal dynamics of Ixodes ricinus. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**: 304-313
63. Iori A., Di Giulio A., De Felici S. (2005) Zecche d'Italia. In: Cringoli G.– *Mappe parassitologiche*, Rolando Editore, Napoli, Italy. Vol. 6 (Zecche): 3-199

64. IPCC (2001). Climate change 2001: The scientific basis. Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, UK
65. Jones P.D., Moberg D. (2003) Hemispheric and large-scale surface air temperature variations: An extensive revision and an update to 2001. *Journal of Climate*, **16**: 206-223
66. Karbowski G. (2004) Natural Reservoirs of *Babesia microti* in Poland. *Polish Journal of Microbiology*, **53**: 61-65.
67. Kaufman W.R. (1989) Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. *Parasitology Today*, **5**: 47-56
68. Killick-Kendrick R. (2002) Phlebotomine sand flies: biology and control. In *World Class Parasites: Leishmania* (ed. Jay P. Farrel), 4: 33-43
69. Killick-Kendrick R., Lainson J.A., Rioux J.A., Saf'janova V.M. (1984) The taxonomy of Leishmania-like parasite of reptiles. In: Coll. int. CNRS/INSERM, Leishmania. Taxonomie et Phylogènèse. Applications eco-epidemiologiques. IMEEE, Montpellier, 143-148.
70. Kjemtrup A.M., Conrad P.A. (2006) Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1323-1337
71. Lewis D.J. (1982). A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull. Br. Mus. Nat.Hist. (Ent.)*, **45**: 121-209
72. Luterbacher J., Dietrich D., Xoplaki E., Grosjean M., Wanner H. (2004) European Seasonal and Annual Temperature Variability, Trends, and Extremes Since 1500. *Science*, **303**:1499-1503
73. Mackenzie J., Chua K.B., Daniels P.W., Eaton B.T., Field H.E., Hall R.A., Halpin K., Johansen C.A., Kirkland P.D., Lam S.K., McMinn P., Nisbet D.J., Paru R., Pyke A.T., Ritchie S.A., Siba P., Smith D.W., Smith G.A., Van Den Hurk A.F., Wang L.F. & Williams D.T. (2001) Emerging viral diseases of Southwest Asia and the Western Pacific. *Emerging Infectious Diseases*, **7** (3 Supp. 1): 497-504.
74. Malone J.B. (1989) Texas Fever, Two-headed Calves and the Hatch Act – 100 Years and Counting for Veterinary Parasitology in the United States. *Veterinary Parasitology*, **33**: 3-29
75. Marchi M. (2005) Definizione di un nuovo focolaio di leishmaniosi canina (Lcan) in Provincia di Verona. Tesi di Laurea, A.A. 2004-2005, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova
76. Maroli M., Bettini S. (1977). Leishmaniasis in Tuscany (Italy). I. An investigation on phlebotomine sandflies in Grosseto province. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **71**: 315-321.

77. Maroli M., Sansoni L., Bigliocchi F., Khoury C., Valsecchi M. (1995) Reperimento di *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 (= *P. major* s.l.) in un focolaio di leishmaniosi del nord-Italia (Provincia di Verona). *Parassitologia*, **37**: 241-244
78. Maroli M., Tizzoni V., Siragusa C., D’Orazi A., Gradoni L. (2001). Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Medical and veterinary entomology*, **15**: 358-363.
79. Marquardt W.C. (1996) Introduction to Arthropods and vectors. In: The Biology of Disease Vectors (Beatty B.J. e Marquardt W.C. eds). University Press of Colorado, Niwot, Colorado, USA: 1-24.
80. Montarsi F., Cassini R., Squecco G., Benini N., Mondin A., Corrain M., Ferro Milone N., Capelli G. (2006) *Ixodes ricinus* and vector-borne diseases in north-eastern Italy. *Parassitologia*, **48** (1-2): 311.
81. Montarsi F., Maioli G., Cassini R., Danesi P., Corrain R., Mazzolini E., Benini N., Capelli G. (2007) Verso la mappatura dei vettori nel triveneto: le zecche. Atti del 3° Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria. Abano Terme, 13-14 settembre 2007. *ISTISAN 07/C5*: 86
82. Morse S.S. (1995) Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, **1** (1): 7-15.
83. Natale A. (2004). Vecchi e nuovi focolai di leishmaniosi canina nelle Venezie: indagine epidemiologica. Tesi di Dottorato di Ricerca in “Sanità Pubblica, Igiene Veterinaria e delle Produzioni Animali” XVI ciclo – Università degli Studi di Padova.
84. Nieto P., Malone J.B., Bavia M.E. (2006) Ecological niche modeling for visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, using genetic algorithm for rule-set prediction and growing degree day-water budget analysis. *Geospatial Health*, **1** (2): 115-126.
85. Norval R.A.I., Perry B.D., Young A.S., (1992) The epidemiology of Theileriosis in Africa. Accademy Press, London, UK.
86. Otranto D., Paradies P., Lia R.P., Latrofa M.S., Testini G. Cantacessi C. Mencke N., Galli G., Capelli G., Stanneck D. (2007) Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology*, **144**: 270–278
87. Pampiglione S., Canestri Trotti G. (1990) Guida allo studio della Parassitologia. Esculapio Editore, Bologna, Italy.
88. Papadopoulos B., Perié N.M., Uilenberg G. (1996) Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece. 3. Piroplasms of small ruminants. *Veterinary Parasitology*, **63**: 41-56

89. Parola P., Davoust B., Raoult D. (2005) Tick- and flea-borne rickettsial emergine zoonoses. *Veterinary Research*, **36**: 469-492
90. Pherez F.M. (2007) Factors affecting the emergence and prevalence of vector borne infections (VBI) and the role of vertical trasmission (VT). *Journal of Vector Borne Diseases*, **44**: 157-163
91. Piccaluga P.P., Poletti G., Martinelli G., Gherlinzoni F. (2004) Babesia infection in Italy. *The Lancet Infectious Diseases*, **4**: 212
92. Piccoli L., Ceretti G., Capelli G., Manca G., Poglayan G. (1999) Leishmaniosi canina: la situazione in Veneto. *Il Progresso Veterinario*, **19**: 991-996.
93. Pietrobelli M., Cancrini G., Moretti A., Tampieri M.P. (2007) Animal babesiosis: an emerging zoonosis also in Italy? *Parassitologia*, **49** (Suppl. 1): 33-38
94. Pietrobelli M., Frangipane di Regalbono A., Natale A., Butteri E., Lerco C., Furnari C., Capelli G. (2004). Sorveglianza sierologica della leishmaniosi canina nell'Italia nord-orientale. *Atti SISVet*, vol. **LVIII**: 124.
95. Poglayan G., Marangon S., Manca MG., Capelli G., Dalla Pozza M., Casati D., Vantini E., Bresa G., Passarini G. (1997). A new Outbreak of Canine Leishmaniosis in the North-East of Italy. *Acta Parasitologica Turcica*, **21** (Suppl. 1): 143.
96. Prosperi S., Baldelli R., Fioravanti M.L., Roda R., Galoppi R., Nichelini S. (1990) Pascolo e rischi sanitari per il bovino. Nota II indagine sierologia per brucellosi, febbre Q, clamidiosi e babesiosi. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, **7/8**: 59-61.
97. Reithinger R., Coleman P. G., Alexander B., Vieira E. P., Assis G., Davies C. R. (2004) Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *International Journal for Parasitology*, **34**: 55-62.
98. Rezza G., Nicoletti L., Angelini R., Romi R., Finarelli A., Panning M., Cordioli P., Fortuna C., Boros S., Maturano F. (2007) Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet*, **370** (9602): 1840-1846.
99. Ribeiro J.M.C. (1996) Common problems of Arthropod vectors of disease. In: *The Biology of Disease Vectors* (Beaty B.J. e Marquardt W.C. eds). University Press of Colorado, Niwot, Colorado, USA: 25-33.
100. Rizzoli A., Merler S., Furlanello C., Genchi C. (2002) Geographical Information Systems and Bootstrap Aggregation (Bagging) of Tree-Based Classifiers for Lyme Disease Risk Prediction in Trentino, Italian Alps. *J. Med. Entomol.*, **39** (3): 485-492
101. Rogers D.J., Randolph S.E. (2006) Climate Change and Vector-Borne Diseases. *Advances in Parasitology*, **62**: 345-381

102. Romi R. (2001) Malattie trasmesse da vettori e cambiamenti climatici: analisi della situazione in Italia. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale*, **6** (1-2): 131-140
103. Romi R., Khoury C., Bigliocchi F., Maroli M. (1994) Schede guida su acari e insetti di interesse sanitario. *Rapporti ISTISAN* **94/8**: 33-42.
104. Rosignoli C., Nigrelli A.D., Savini G., Semproni G., Benaglia F., Franzini G. (2000) Episodio di babesiosi (*Babesia bovis*) in un allevamento di bovini da carne. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, **21** (3): 65-70
105. Savini G., Conte A., Semproni G., Scaramozzino P. (1999) Tick-borne diseases in ruminants of Central and Southern Italy: epidemiology and case reports. *Parassitologia*, **41** (suppl. 1): 95-100
106. Scaffidi V. (1981) Current endemic expansion of boutonneuse fever in Italy. *Minerva Med*, **72**: 2063-2070.
107. Talleklint L., Jaenson T.G. (1998) Increasing geographical distribution and density of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in central and northern Sweden. *J. Med. Entomol.*, **35**: 521-526
108. Vascellari M., Natale A., Schievenin E., Miatto A., Brino A., Frangipane Di Regalbono A., Pietrobelli M. (2005). Descrizione di un nuovo focolaio di leishmaniosi canina nella Regione Veneto. *Veterinaria*, **3**: 25-29
109. WHO (1979). Control of leishmaniasis. *Report of a WHO Expert Committee. Technical Report*, **793**: 158.
110. Wu Y.C., Huang Y.S., Chien L.J., Lin T.L., Yueh Y.Y., Tseng W.L., Chang K.J. & Wang G.R. (1999) The epidemiology of Japanese encephalitis on Taiwan during 1966-1997. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, **61** (1): 78-84.
111. Zanutto S. (2007) Indagine epidemiologica sulla babesiosi canina in alcune Regioni italiane. Tesi di Laurea, AA 2006-2007. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova
112. Živičnjak T., Martinković F., Marinculić A., Mrljak V., Kučer N., Matijatko V., Mihaljević Ž., Barić-Rafaj R. (2005) A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. *Veterinary Parasitology*, **131**: 35-43

RINGRAZIAMENTI

Uno scritto è anche un modo di chiudere un periodo. Nel mio caso il periodo è iniziato proprio tre anni fa, quando sono entrato in questo nuovo gruppo di lavoro e, per fortuna, il periodo non finirà qui...

Ringrazio quindi Mario, il 'capo', perché senza di lui non ci sarebbe il 'gruppo'; Tony, il 'ricercatore anziano' per 'esserci' sempre; la Fede detta 'fulmine', perché sa come farci ridere; la Cinzia, perché non ci si potrebbe pensare senza di lei; la Silvietta, per l'entusiasmo che conserva (a volte troppo..!); l'Anto, la Silvia, la Giada, Andrea, la Mara, la Claudia e gli altri studenti, tesisti o meno, che sono passati e un po' hanno preso, ma un po' hanno sempre anche dato; Marco e Michele, perché il tutto era iniziato un po' prima con loro e per l'aiuto fondamentale nelle ore tragiche delle battute finali della Tesi.

Ringrazio anche l'altro gruppo di lavoro, la Para1 e gli altri 'zooprofilattici', per cui Gioia, Fabrizio e Patrizia (ovviamente insieme), l'Alda, la Giulia e tutte le altre persone dei laboratori che ho saltuariamente frequentato in questi anni. Molto del lavoro presentato è anche loro. Ringrazio insieme anche gli esterni, ma vicini, che in un modo o nell'altro hanno contribuito a tutto ciò: la Dania, Fabrizio e Nicola, la Paola, e quelli di cui, in questa ora tarda della notte, non mi sovviene il nome.

Ringrazio José, Fernando e Patricia, Evelise, Marcelo, Adriano, Mauricio e gli altri giovani colleghi che ho incrociato durante la breve permanenza *brasileira*.

Ringrazio i nonni, non i miei, ma quelli del mio figliolo, per avermi aiutato e, a modo loro, spronato per arrivare fino a questo punto. Che non è un punto di arrivo, ma pur sempre un bel traguardo.

Infine, certo non sarei sopravvissuto a questi ultimi giorni di lavoro intenso, senza la presenza amorevole e tenace di chi sta condividendo con me la casa, il figlio, la vita e la costruzione quotidiana di una famiglia. Alla fin fine anche le piccole soddisfazioni come questa tesi sono un qualcosa di comune...

Infine, davvero:

Grazie a Francesco, che senza dire nulla, mi fa capire che comunque...

...c'è qualcosa di più importante.