

RELAZIONE FINALE

Sviluppo di un Sistema di Sorveglianza Integrato della Leishmaniosi in Regione Emilia Romagna

Nr. identificativo progetto: IZS LE 011/2016 RC

Codice della Ricerca:

E88C17000110001

Responsabile Scientifico:

Dr.ssa Elena Carra, IZSLER, Sede territoriale di Modena.

e-mail: elena.carra@izsler.it

Tel: 059 4535110

Fax: 059 4535210

U.O. coordinatrice del progetto:

U.O.1IMS, IZSLER, Sede territoriale di Modena.

Data inizio progetto: 31/12/2017

Data fine progetto: 30/05/2021 (prolungato)

Data di stampa della relazione: 21/05/2021

**“Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro,
della Salute e delle Politiche Sociali;
Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e
la Sicurezza degli Alimenti”**

c) Elenco dei collaboratori

NOME	UO/Laboratorio/Sede di	QUALIFICA	ATTIVITA' SVOLTA
Elena Carra	U.O.1IMS: Sede territoriale di Modena	Biologo dirigente	Responsabile Scientifico del Progetto. Coordinamento dell'attività del progetto, predisposizione dei protocolli per le indagini molecolari eseguite, verifica dei risultati ottenuti, discussione critica dei risultati, stesura della relazione.
Gianluca Rugna		Veterinario Dirigente	Responsabile Scientifico della U.O.1 Collaborazione al coordinamento delle attività tra le varie UO, coordinamento della raccolta dei campioni, isolamento di ceppi di Leishmania, discussione critica dei risultati.
Federica Bergamini		Tecnico di laboratorio	Analisi molecolari, Genotipizzazioni.
Patricia Musiu		Tecnico di laboratorio	Analisi molecolari.
Michele Dottori	U.O.2 IMS: Sede territoriale di Reggio Emilia	Veterinario Dirigente	Responsabile Scientifico della U.O.2 Coordinamento delle attività della U.O.2, discussione critica dei risultati.
Mattia Calzolari		Tecnico di laboratorio	Campionamenti in campo, analisi entomologiche, elaborazione critica dei risultati.
Francesco de Filippo		Tecnico di laboratorio biomedico	Analisi entomologiche
Giuseppe Romeo		Borsista Laureato in Scienze Naturali	Campionamenti in campo, analisi entomologiche, elaborazione dei risultati.
Giuseppe Merialdi	U.O.3 IMS: Sede territoriale di Bologna	Veterinario Dirigente	Responsabile Scientifico della U.O.3 Coordinamento delle attività della U.O.3, discussione critica dei risultati.
Mattia Ramini		Tecnico di laboratorio biomedico	Analisi molecolari
Maria Renzi		Veterinario Dirigente	Supervisione analisi sierologiche
Buratti Lucia		Tecnico di laboratorio biomedico	Analisi sierologiche
Stefania Varani	U.O.4 EMS: Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna – Unità di Microbiologia / Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale - Università di Bologna	Universitario/ Medico Dirigente	Responsabile Scientifico della U.O.4 Coordinamento delle attività della U.O.4, discussione critica dei risultati
Giovanna Liguori		Tecnico di laboratorio biomedico	Analisi Diagnostiche dei casi umani e preparazione campioni per U.O.1

d) Sintesi in italiano

“Sviluppo di un Sistema di Sorveglianza Integrato della Leishmaniosi in Regione Emilia Romagna”

La leishmaniosi è una patologia zoonotica trasmessa da insetti vettori, appartenenti al genere *Phlebotomus*, il cui agente eziologico è rappresentato da protozoi del genere *Leishmania*. L'uomo può essere coinvolto nel ciclo zoonotico del parassita e contrarre l'infezione da *Leishmania* che si può manifestare in varie forme cliniche, classificabili in tre principali categorie: leishmaniosi viscerale (LV), cutanea (LC) e muco-cutanea (LMC) (Di Muccio T. et al, 2015). Nel ciclo biologico della *Leishmania* i cani sono riconosciuti come il principale serbatoio domestico per l'infezione dell'uomo (Alvar et al., 2004), ma non si può escludere il coinvolgimento di altre specie di animali domestici o selvatici, come è stato recentemente descritto a Madrid, in Spagna (Molina et al., 2012). Nel bacino del Mediterraneo la leishmaniosi è endemica ed è considerata una malattia riemergente, a causa di diversi fattori di rischio e della diffusione del vettore in aree che in passato non presentavano circolazione di flebotomi (Dujardin JC, 2006, Di Muccio et al., 2015). In Italia la leishmaniosi è causata dalla *Leishmania infantum* ed è spesso una malattia negletta (Di Muccio et al., 2015)

In regione Emilia-Romagna la leishmaniosi è stata ripetutamente descritta sia nei cani, sia nell'uomo. In regione l'alta prevalenza di Leishmaniosi umana sia nella forma viscerale sia nella forma cutanea ha destato molta preoccupazione e attenzione rivolta verso le cause di tale fenomeno. In particolare, sono stati descritti recentemente due focolai di LV umana: uno in provincia di Bologna nel 2012 e uno in provincia di Modena nel 2015 (Varani et al., 2013; Franceschini et al., 2017), inoltre nella stessa area si è osservato nel periodo 2013-2015 un incremento di casi di LC. I risultati di studi preliminari recenti condotti sulle Leishmanie da casi umani di LV in Regione, da CanL ed isolati da flebotomi in Regione hanno messo in evidenza la circolazione prevalente nell'uomo e nel flebotomo di una variante di *Leishmania* distinta da quella circolante nei cani e nei casi umani provenienti da altre regioni d'Italia (Rugna et al. 2017).

I risultati ottenuti dal presente progetto di ricerca sulle indagini nei flebotomi catturati nel 2018-2019 mostrano e confermano che la specie più abbondante nelle aree campionate dell'Emilia-Romagna è quella del *Phlebotomus perfiliewi*, a conferma di quanto precedentemente descritto (Calzolari et al., 2010; Calzolari et al., 2019). Nelle zone prese in esame: zona di Pianoro e della Valsamoggia in provincia di Bologna dove abbonda la popolazione di flebotomi è stata riscontrata in essi la presenza della *Leishmania*, ed il periodo di maggiore circolazione del parassita è risultato fine agosto. Questi siti si trovano in zone di collina tra parchi e ville di campagna, con presenza (o passaggio) di mammiferi selvatici, ungulati compresi. L'utilizzo delle trappole a luce per la ricerca di femmine ingorgate di flebotomi ha permesso la cattura di numerosi esemplari con pasto di sangue. Cinque di queste femmine, 2 catturate a Pianoro e 3 in Valsamoggia sono risultate positive per *Leishmania*. La tipizzazione MLMT del DNA di *Leishmania* da 2 di questi esemplari ha mostrato la presenza in entrambi della variante del parassita nota essere in circolazione nei flebotomi e nell'uomo in Emilia-Romagna, in accordo con quanto già riscontrato in studi recenti (Rugna et al., 2017; Rugna et al., 2018).

Per 181 delle 252 femmine di flebotomo catturate con pasto di sangue, è stato possibile determinare la specie di ospite vertebrato prevalente sul quale hanno compiuto il loro pasto di sangue attraverso il sequenziamento delle regioni PNO e / o Cyt b del DNA estratto dalle stesse. I risultati ottenuti mostrano il capriolo nel 50,0% dei casi, seguito dall'uomo nel 29,2%. Poi in minor misura seguono la lepre (7,1%), il bovino (4,7%) ed altre specie di selvatici e domestici tra i quali cinghiale, cavallo, asino, istrice, volpe, pollo. Alla luce di questi risultati il capriolo potrebbe quindi rappresentare un

possibile serbatoio del parassita, confermando l'uomo come ospite intermedio suscettibile all'infezione.

Questi risultati confermano il comportamento alimentare opportunistico di *Ph. Perfiliewi*, descritto come un debole volatore, che punge gli ospiti disponibili (Rossi et al., 2008; Jiménez et al., 2013; Maia et al., 2015; Bravo-Barriga et al., 2016). Lo studio sulla dispersione dei flebotomi condotto in questa ricerca, pur preliminare, conferma la scarsa attitudine al volo di *Ph. Perfiliewi* nelle aree geografiche campionate.

Sebbene i cani siano stati chiaramente definiti come serbatoi di *L. infantum* nei paesi del Mediterraneo (Alvar et al., 2004), nel nostro studio non è mai stato rilevato sangue di cane nei flebotomi con pasto di sangue, come già riportato da Svobodova et al. (2009) in flebotomi della specie *Ph. Tobby* nell'Anatolia meridionale in Turchia, o in *Ph. Perniciosus* nel Portogallo meridionale (Maia et al., 2015) e nella Spagna occidentale (Bravo-Barriga et al., 2016). Questo risultato è stato giustificato dalla scarsa presenza di questi animali nei siti indagati e ha suggerito l'esistenza di un ciclo di vita silvestre del parassita nell'area di studio.

A conferma di ciò, la ricerca di Leishmania in PCR Real-Time condotta su quasi 900 e 1150 animali selvatici, rispettivamente nel 2018 e nel 2019, ha evidenziato per la prima volta in Emilia-Romagna la positività per Leishmania in animali diversi dal cane, e cioè in 5 caprioli cacciati (2 in Valsamoggia, 2 a Pianoro, 1 a Sassuolo (MO)) e in una volpe morta in provincia di Piacenza, tutte località collinari compatibili con la presenza del flebotomo come vettore. La positività per Leishmania in capriolo è degna di nota, non essendo mai stata segnalata in precedenza in letteratura.

D'altra parte la sorveglianza sierologica dei cani dei canili e di proprietà condotta nel 2018 - 2020 (dati Osservatorio Regionale) conferma la prevalenza di positività intorno al 1,5 - 2,4% in linea con quanto già riscontrato in passato (Santi et al., 2014). La tipizzazione MLMT condotta sulle Leishmanie riscontrate in 8 cani esaminati ha evidenziato la presenza in essi della variante di Leishmania tipica dei cani dell'ER, in accordo a quanto precedentemente descritto (Rugna et al. 2017; Rugna et al., 2018).

L'identificazione di specie dei DNA da casi autoctoni di leishmaniosi umana viscerale, cutanea e mucosale del 2014 - 2019, provenienti dall'Ospedale Sant' Orsola di Bologna, ha portato a identificare tutti come casi di *Leishmania infantum*. Tuttavia, la tipizzazione MLMT di una parte degli stessi DNA da casi di Leishmaniosi viscerale, ha permesso di attribuire questi casi alla variante umana circolante in ER, distinta dalla variante riscontrata fino ad ora nei cani e nei ceppi umani provenienti da casi umani di altre regioni italiane (Rugna et al., 2017). La stessa variante umana dell'ER è stata riscontrata in ceppi di Leishmania isolati da flebotomi e da femmine con pasto di sangue compiuto su capriolo o su uomo, catturate rispettivamente nell'agosto del 2018 in Valsamoggia (BO) e nell'agosto del 2019 a Pianoro (BO). I profili MLMT dei casi umani rientrano tra i dati pubblicati nel lavoro di Rugna et al. 2018.

Lo studio della prevalenza di infezione asintomatica da Leishmania in volontari umani sani residenti in aree ad alta circolazione di Leishmania, individuata all'interno del comune di Pianoro (BO), ha confermato una significativa prevalenza di infezione (17%) in soggetti sani asintomatici, pur essendo bassa la parassitemia per tutti i volontari positivi.

L'identificazione delle specie animali sui quali le femmine di flebotomo hanno compiuto il loro pasto di sangue in ambienti silvestri ha contribuito ad ampliare le ipotesi sul possibile serbatoio di Leishmania in regione Emilia-Romagna, probabilmente diverso dal cane, mettendo in evidenza come le specie capriolo e uomo siano di fatto le principali fonti sui quali i flebotomi della specie *Ph. Perfiliewi* compiono il loro pasto. Questo risultato supporta l'ipotesi che il capriolo possa essere un potenziale serbatoio di leishmania. Le diverse positività in PCR per Leishmania riscontrate sulla cute di caprioli cacciati nelle stesse zone dell' Emilia Romagna confermano ulteriormente questa ipotesi.

I risultati di questo studio hanno fornito importanti indizi per chiarire meglio il ciclo d'infezione della *Leishmania* in questa particolare area geografica, sottolineando la necessità di ulteriori studi per dimostrare l'effettiva esistenza di un serbatoio del parassita alternativo al cane. L'approccio multidisciplinare ed integrato intrapreso nel presente progetto di ricerca tra varie competenze, quali veterinari, medici, biologi molecolari, naturalisti, entomologi, epidemiologi si è confermato vincente per il raggiungimento degli obiettivi prefissati.

Divulgazione dei risultati:

Comunicazione come Poster:

Callegari E., Bonilauri P., Carra E., Rugna G., Dottori M, Calzolari M. Co-circulation of *Leishmania infantum* and phleboviruses from sandflies in the Bologna province, Italy". XI European Congress of Entomology, Naples, Italy, 2 – 6 July 2018. Abstract Book, P0410 (p. 281).

Comunicazione Orale:

Calzolari M., Romeo G., Bergamini F., Rugna G, Dottori M., Carra E. Host preference of the sand fly *Phlebotomus perfiliewi* in northern Italy. ISOPS, 10th International Symposium On Phlebotomine Sandflies, San Cristóbal – Galápagos Ecuador, 15 - 19 julio 2019. Abstract Book, (p.16).

Pubblicazioni su riviste con IF:

- Calzolari M, Romeo G, Bergamini F, Dottori M, Rugna G, Carra E. Host preference and *Leishmania infantum* natural infection of the sand fly *Phlebotomus perfiliewi* in northern Italy. ACTA TROPICA, 2021 accepted 09/11/2021.
- Gaspari V, Zaghi I, Macrì G, Patrizi A, Salfi N, Locatelli F, Carra E, Re MC, Varani S. Autochthonous Cases of Mucosal Leishmaniasis in Northeastern Italy: Clinical Management and Novel Treatment Approaches. *Microorganisms*. 2020 Apr 18;8(4). pii: E588. doi: 10.3390/microorganisms8040588.
- Calzolari M, Carra E, Rugna G, Bonilauri P, Bergamini F, Bellini R, Varani S, Dottori M. Isolation and Molecular Typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus perfiliewi* in a Re-Emerging Focus of Leishmaniasis, Northeastern Italy. *Microorganisms* 2019, 7, 644. doi:10.3390/microorganisms7120644
- Rugna G[✉], Carra E[✉], Bergamini F, Calzolari M, Salvatore D, Corpus F, Gennari W, Baldelli R, Fabbi M, Natalini S, Vitale F, Varani S e Merialdi G. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals host-related population structure in *Leishmania infantum* from northeastern Italy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Jul 5;12(7):e0006595. doi: 10.1371/journal.pntd.0006595. eCollection 2018 Jul.

Parte dei risultati sono stati esposti ad un evento di aggiornamento, organizzato il 17/01/2020, a Bologna, presso il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna-Alma Mater, dal titolo: "GIORNATA DI AGGIORNAMENTO SULLA LEISHMANIOSI".

Responsabile scientifico: Elena Carra

Parole chiave: *Leishmania infantum*, *Phlebotomus perfiliewi*, pasto di sangue, specie serbatoio, MLMT.

Riferimenti

Autori: Mattia Calzolari, Giuseppe Romeo, Federica Bergamini, Stefania Varani, Giuseppe Merialdi, Michele Dottori, Gianluca Rugna, Elena Carra

Email di riferimento: elena.carra@izsler.it

Anno: 2021

Titolo: “Sviluppo di un Sistema di Sorveglianza Integrato della Leishmaniosi in Regione Emilia Romagna”