

Giornata di aggiornamento sulla
Leishmaniosi 17/01/2020

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO Sperimentale
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
PADOVA (VENETO)

LA NOSTRA
ESPERIENZA,
LA VOSTRA
SICUREZZA.

Biologia ed ecologia dei flebotomi

annalisa.grisendi@izsler.it


Ditteri

→ 2° paio di ali trasformate
in bilancieri

- Molte famiglie di interesse sanitario
- *Culicidae* (zanzare)
- *Muscidae* (mosche), *Sarcophagidae*,
- *Calliphoridae* (mosconi)
- *Tabanidae* (tafani)
- *Simuliidae* (simulidi)
- Inoltre i generi
- *Culicoides* (culicoidi)
- *Phlebotomus* (flebotomi)


Oridne Diptera


- 90000 specie nel mondo (6500 in Italia)
- 2 sottordini
 - Nematoceri** (antenne lunghe)
 - Brachiceri** (antenne corte)
- Apparato boccale succhiante (pungente o lambente)
- Grandi occhi composti
- Larve sempre apode



Flebotomi


- CARATTERI PER L'IDENTIFICAZIONE MACROSCOPICA
- piccoli (2/4mm)
- colore giallo
- ricoperti da fitta peluria
- tipica posizione del torace a V rovesciata





Specie....

- NCBI ne classifica oltre 200 specie nel mondo...





E in Italia?

2 Generi di Flebotomi:

- Sergentomyia minuta* (Animali a sangue freddo) – scarsa importanza sanitaria
- Phlebotomus* (Animali a sangue caldo)
 - P. ariasi*
 - P. neglectus*
 - P. mascittii*
 - P. sergenti*
 - P. papatasi*
 - P. perfiliewi* - ambienti rurali
 - P. perniciosus* - ambienti domestici

Più comuni in ER, soprattutto in zone collinari ma ritrovamenti anche in pianura






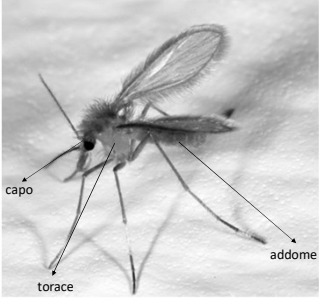
Situazione sempre aggiornata?

<https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/phlebotomine-maps>





Morfologia e identificazione




CARATTERI PER L'IDENTIFICAZIONE

Uso di chiavi per immagini

- armatura faringea
- maschi→ valve copulatrici
- femmine→ spermateche

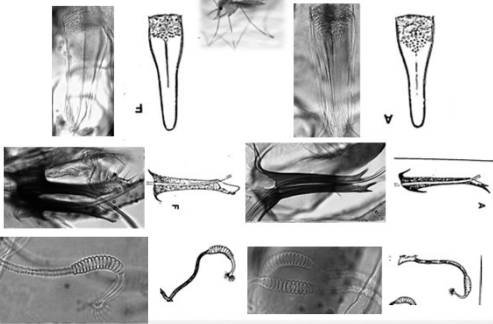
Procedimento:

- chiarificazione in CLF (no prove PCR)
- montaggio dell'insetto su vetrino
- osservazione di caratteri



Identificazione morfologica

P. perfiliewi *P. perniciosus*



Identificazione molecolare

- **Amplificazione sequenze specifiche**
 - ITS2
 - COI
- **Sequenziamento**
- **Utilizzo della sequenza per identificazione di specie (blast in genbank, BOLD)**
 - **Attenzione all'INTERPRETAZIONE:** sequenze depositate (l'esemplare è stato identificato morfologicamente?), alla copertura, alla percentuale di identità

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. [Learn more](#)

A free version of Mega BLAST (3.5.0) is here.
The BLAST tool for mapping target next-generation DNA or RNA sequencing runs against a whole genome or transcriptome.
last, 30 Aug 2019 17:00:00 EDT [More BLAST news](#)

Web BLAST

Nucleotide BLAST
nucleotide → nucleotide

blastx
translated nucleotide → protein

tblastn
protein → translated nucleotide

Protein BLAST
protein → protein

U.S. National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

Job Title: Nucleotide sequence
RID: S001260003 Search expires on 09-24-14 pm Download BLAST

Program: BLASTN
Database: nt
Query ID: S001260003
Description: None
Molecule type: dna
Query length: 400
Other reports: [Download table of results](#) [BLAST viewer](#)

Filter Results

How to read this report? [BLAST help](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Organism: only use 2nd report
Type common name, Genbank, brand or group name
Add organism

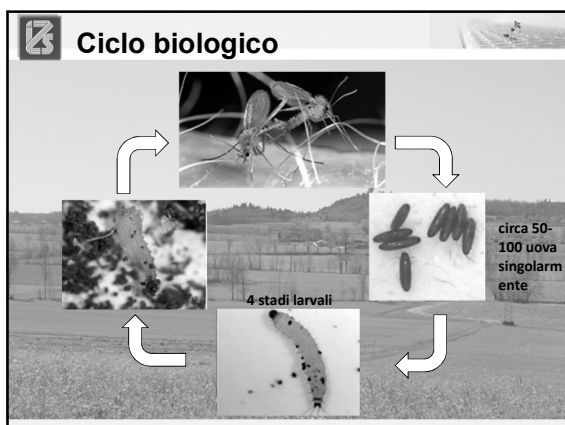
Percent identity: to
E value: to
Filter:

Sequences producing significant alignments

Accession	Description	Score	Expect	Ident	Positives	Score	Expect	Ident	Positives
U000000000	U000000000	1216	1.0e-160	100%	100	1216	1.0e-160	100%	100
U000000000	U000000000	1216	1.0e-160	100%	100	1216	1.0e-160	100%	100
U000000000	U000000000	1216	1.0e-160	100%	100	1216	1.0e-160	100%	100
U000000000	U000000000	1216	1.0e-160	100%	100	1216	1.0e-160	100%	100
U000000000	U000000000	1216	1.0e-160	100%	100	1216	1.0e-160	100%	100
U000000000	U000000000	1216	1.0e-160	100%	100	1216	1.0e-160	100%	100
U000000000	U000000000	1216	1.0e-160	100%	100	1216	1.0e-160	100%	100
U000000000	U000000000	1216	1.0e-160	100%	100	1216	1.0e-160	100%	100
U000000000	U000000000	1216	1.0e-160	100%	100	1216	1.0e-160	100%	100
U000000000	U000000000	1216	1.0e-160	100%	100	1216	1.0e-160	100%	100

Ciclo biologico...in generale

- **OLOMETABOLI** → metamorfosi completa
- **Durata ciclo** → 40-50gg ...dipende dalla condizioni climatiche
- **Cicli annuali** → Giugno / Settembre
- **Svernamento** → larva 4° stadio diapausante



Adulto

- **Alimentazione:** Glicifagi (M+F); Solo F pasto di sangue (circa 100 uova per pasto) - generalista

In condizioni sfavorevoli F AUTOGENICHE (maturazione uova senza pasto di sangue)

- **Vita:** 2/3 settimane. Durante il giorno (nelle ore più calde) si riposano in luoghi umidi e riparati - Massima attività nelle ore notturne

Adulto

- **Habitat:** zone bassa collina (60-800m) ricche di vegetazione e sostanza organica. Necessitano di ambiente umido ma non acquoso per la deposizione della uova (es. crepe nei muri, fratture nel terreno).

Principalmente ESOFILE, ma alcune ENDOFILIE (es. *P. papatasi*)

Adulto

- **Dispersione:** scarsa attitudine al volo → si allontanano poco dal sito larvale (li troveremo quindi in zone ricche di sostanza organica)
Influenzati da correnti d'aria e vento!!

- **Riproduzione:** la femmina dopo l'accoppiamento accumula sperma nelle spermateche. Pasto di sangue e maturazione delle uova. **Deposizione** di circa 50-100 uova.

Larve e Pupe

- **Habitat:** Larve terricole, si sviluppano al buio ed hanno bisogno di un'alta umidità relativa (molto sensibili al disseccamento ma **non acquatiche**).

- Attraversano 4 età, con dimensioni crescenti da 0,5 a 4-6 mm ed uno stadio di pupa. E' difficile individuare i focolai larvali (problema per il contenimento di questi insetti)

- Con l'abbassamento della temperature le larve entrano in diapausa per superare l'inverno, gli adulti sono presenti in estate ed in autunno

- **Pupa:** passaggio attraverso cui la larva metamorfosa ad adulto

Focolai larvali

- Forte difficoltà a identificare i **siti di deposizione** causa
- dimensioni ridotte delle larve
- abbondanza di siti larvali


POCHI studi in EUROPA /ZONA MEDITERRANEA

Specie	Paese	Località	RD	CG	AS	SS	Studi
<i>P. urticae</i>	France	Civonnas	ET (120)	-	-	-	Kilick-Kendrick, 1987
			SD	1/6 (17%)	CG	E	Kilick-Kendrick, 1987
			DS	-	AB	S	Kilick-Kendrick, 1987
			DS	77 kg	SL	S	Kilick-Kendrick, 1987
			SD	129 kg	SL	S	Kilick-Kendrick, 1987
<i>P. profileps</i>	Italy	Tuscany	ET	-	AS	E	Pistoia et al., 1983
	Italy	Sardinia	ET	18/25 (72%)	SS	S	Bertini, 1989
	Italy	Sardinia	ET	18/25 (72%)	AS	S	Bertini, 1989

RD= rifiuti di discarica; CG= ricoveri di capre; AB=tane di animali;
SL=lettieria; AS=ricoveri di animali domestici; SS= ricoveri di pecore

La **distribuzione** è influenzata da molti fattori:

- Disponibilità alimentare
- Temperatura e umidità (microhabitat)
- Interazioni biotiche (competizione interspecifica)



Metodi di campionamento

-Selettiva



+Selettiva

ADULTI

STADI IMMATURI

- Sticky trap
- CDC trap
- CO2 trap

- Trappole ad emersione
- Campionamento del suolo



Sticky trap

- fogli 20x20 cm imbibiti di olio di ricino
- (non attrattive)
- Posizionate 2/3 gg

VANTAGGI


- Economiche
- Usate di giorno
- Se ne possono usare molte contemporaneamente

SVANTAGGI

- Gli insetti raccolti sono morti
- Difficilmente staccabili dalla carta per l'identificazione morfologica (uso di solventi es. Toluene)







CDC trap



- Trappole con attrattivo a luce (attirano tutti gli insetti attratti dalla luce)
- Posizionate dal tramonto all'alba

VANTAGGI

- Può essere standardizzato
- Più selettivo

SVANTAGGI

- Raggio di azione limitato
- Attira molte altre specie



CO2 Trap

- Trappole con attrattivo a ghiaccio secco (attirano tutti gli insetti attratti dalla anidride carbonica-EMATOFAGI)
- Posizionate dal tramonto all'alba

VANTAGGI

- Molto selettiva
- Standardizzabile

SVANTAGGI

- Gestione della trappola: GHIACCIO SECCO





Trappole a emersione

- Tende posizionate su un possibile sito larvale
- Mantenute per molto tempo...settimane


VANTAGGI

- Campionati insetti vivi e giovani- possibilità di allevarli

SVANTAGGI

- Difficile localizzazione del sito





Competenza vettoriale

→ Abilità del vettore di acquisire, mantenere e trasmettere l'agente patogeno (è una caratteristica intrinseca del vettore).


→ **VETTORE**: colui che trasmette il patogeno

MECCANICO: il patogeno viene trasmesso meccanicamente (es: mosche)

BIOLOGICO: il patogeno replica e completa il ciclo attivamente nel vettore (es: zanzare, zecche, flebotomi)

AD OGGI I FLEBOTOMI RISULTANO ESSERE GLI UNICI VETTORI BIOLOGICI DIMOSTRATI DI LEISHMANIA

DIVERSE SPECIE HANNO DIVERSA COMPETENZA VETTORIALE



Competenza vettoriale

DIVERSE SPECIE HANNO DIVERSA COMPETENZA VETTORIALE

PROTOZOI

LEISHMANIA ... *diverse specie*
L. infantum → Leishmaniosi viscerale e cutanea
 Vettori principali: *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus*, *P. sergenti*.
P. mascittii???

ARBOVIRUS (molti)

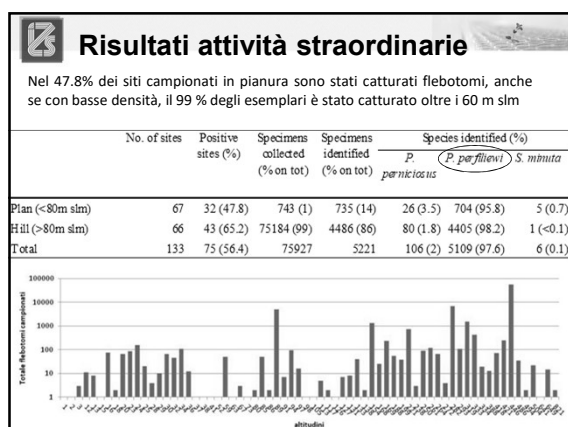
PHLEBOVIRUS → *Toscana virus*, *Sicilia virus*, *Napoli virus* ecc...
 Vettori principali: *P. perniciosus*, *P. perfiliewi*.

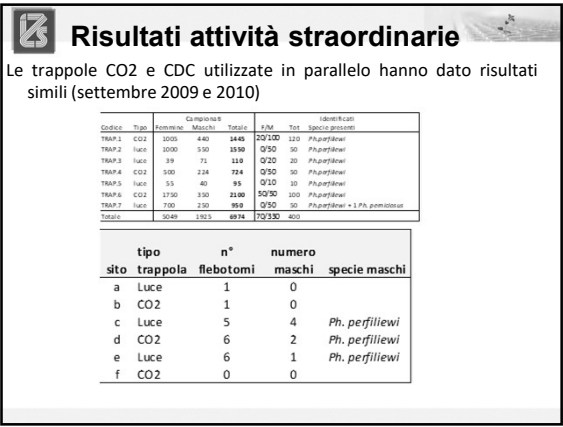
RABDOVIRUS (non trasmissibili all'uomo)

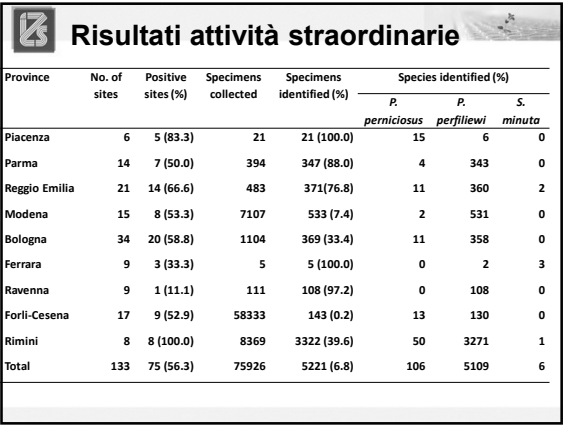


Sorveglianza Flebotomi ER

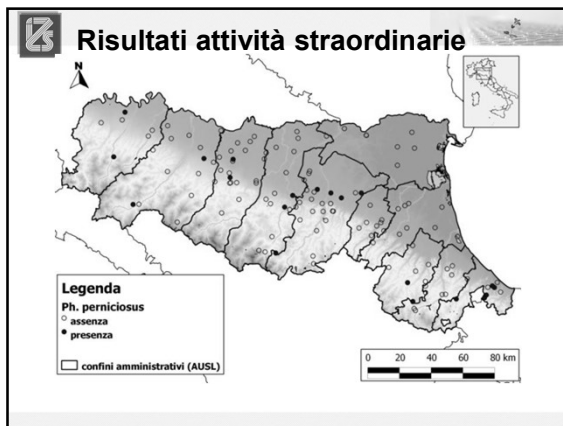
- **Monitoraggio Entomologico**
 - canili dove non sia già provata la presenza del vettore. Periodo Giugno-Ottobre (ogni 15 gg). Trappole CDC.
 - immediate vicinanze di casi di malattie trasmesse da flebotomi (Leishmaniosi e Toscana virus)
- **Attività straordinarie – attività di ricerca**
 - monitoraggio della sensibilità di diversi tipi di trappole e delle zone di preferenza dei flebotomi in ER (2009-2010)
 - monitoraggio di zone dove il patogeno abbia diffusione anomala (in corso)
 - prove di diffusione del vettore nell'ambiente (in corso)











Analisi filogenetica dei virus su flebotomi campionati in Appennino

- Campionamento di Flebotomi in Appennino Emiliano
- Co-correlazione di 8 differenti virus (Ponticelli I, II, III-TOSV, Fermo-like virus, Corfu virus, + 2 sconosciuti)
- ➔ unico patogeno TOSV...il ruolo degli altri non è chiaro

bioRxiv preprint doi: [https://doi.org/10.1101/293801](https://doi.org/10.1101/2019.03.15.293801); this version posted March 15, 2019. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

In conclusione

- In ER le specie più comuni sono *P. perfiliewi* seguita da *P. perniciosus*.
- I flebotomi sono presenti anche a basse altitudini, anche se rilevati a densità minori rispetto alle zone collinari
- La presenza dei flebotomi può essere localizzata e possono avere picchi di popolazione di corta durata. Queste caratteristiche ne rendono più complesso il campionamento rispetto ad altri ematofagi
- L'interazione tra vettore e patogeno non è sempre chiara (difficilmente allevabili in laboratorio che richiedono elevati sistemi di sicurezza)
- Cambiamenti climatici possono modificare l'areale di distribuzione delle specie

➔ Ulteriori studi saranno necessari per approfondire questi aspetti