

MARIO PRINCIPATO, PIERO BONI, MARTA PROIETTI BERTOLINI,  
MANUELA D'ANDREA

*Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Università di Perugia*

## **Possibile isolamento di *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), in Umbria, in zanzare naturalmente infestate**

*Possible isolation of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in naturally infested mosquitoes from Umbria* - Filariases due to *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* are frequent parasitoses in Italy, with important health care aspects because of the possible transmission to man of the canine microfilariiae by mosquitoes. The present study started with the report of 30 cases of cardiac filariasis in dogs in the province of Perugia (Castelnuovo di Assisi, Cannara, Bevagna, Trevi, Foligno). In these areas a specific search for the vectors was also begun, both where new cases of filariasis in dogs were recorded and around the nearest marshes that could be the breeding grounds of these insects. Samples were taken by the use of shiny suction traps with a separating net at the entrance to catch mosquitoes infested by microfilariiae, and the search for larvae of these insects in basins of stagnant water in those areas to find the breeding grounds. Through the shiny traps in the areas at risk a total number of 96 mosquitoes belonging to genera *Culex* and *Aedes*, were captured and more than 2000 larvae of the same genera were removed from basins of stagnant water found in abandoned greenhouses. The arthropods caught were brought to our laboratory to be dissected; some of the larvae were put in bowls covered with a net to let them develop and some of them were kept in 80° alcohol. The dissection of the samples enabled us to isolate *Dirofilaria immitis* microfilariiae from the proboscis of two mosquitoes of genus *Aedes* (*A. vexans*) at the level of their labrum and of their Malpighian tubes/hemocoel. The first mosquito revealed 8 specimens of microfilariiae in the proboscis and two in the hemocoel among the broken Malpighian tubes from which they had come; three specimens in the second mosquito were noted in the food canal of labrum along the mandibles and the maxillae and in the anterior part of prementum between the labellae and the laciniae. This report could be of great epidemiological interest due to the easiness of finding these parasites in a very small number of mosquitoes examined.

*Key words:* *Aedes*, dog, proboscis, microfilaria.

*Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) è un nematode parassita dei cani che si può rinvenire anche nelle volpi, nei lupi, nei gatti e nell'uomo (BOCH, 1980). Da adulto vive nel cuore destro e nell'arteria polmonare. La femmina, ovovivipara, rilascia nel torrente circolatorio le microfilarie, che possono permanere vitali circa due anni e, durante questo periodo, essere assunte dalle zanzare attraverso il pasto di sangue. Il passaggio nel vettore invertebrato è condizione assolutamente indispensabile per l'evoluzione del parassita fino ad L3 e per il suo successivo sviluppo fino a nematode adulto. Le microfilarie assunte dalle zanzare con il pasto di sangue permangono circa 24 ore nell'intestino medio dell'insetto, prima di invadere le cellule della porzione distale dei tubuli di Malpighi. Qui, nelle 96 ore successive, i parassiti sviluppano all'interno di tali cellule, mutando in larve di primo stadio, definite "a salsiccia" per la loro caratteristica forma tozza e rigonfia. Verso l'8°-10° giorno si trasformano in larve di II stadio (L2) nel lume dei tubuli di Malpighi e poco dopo (al 10°-12° giorno) in larve di III stadio (L3) che ne perforano la parete portandosi, attraverso l'emocele dell'insetto, a livello degli spazi cefalici e poi del *labium*. Le loro dimensioni sono quasi quadruplicate (circa 1.100 micron) rispetto alle microfilarie. La L3 infettante, protetta da una goccia di emolinfa emerge dal *labium* e viene adagiata sulla cute del nuovo ospite vertebrato, penetrando poi attivamente nel derma attraverso la soluzione di continuo prodotta dalla puntura della zanzara (EUZÈBY, 1973). Qui muta, in 3-6-gg, ad L4, migra lungo le radici dei vasi, muta ad L5 e dopo 80-120gg raggiunge la sede elettiva. Gli adulti

hanno dimensioni di 12-17cm il maschio e di circa 30 cm la femmina (GENCHI *et al.*, 1998).

Anche se il ciclo biologico di *D.immitis* è ben noto e numerosi sono gli studi effettuati su questo parassita e sui fattori che ne condizionano lo sviluppo, la patogenicità e la distribuzione, ci è sembrato comunque interessante segnalare il reperto in zanzare dell'Umbria, regione solo recentemente interessata da un significativo incremento della filariosi cardio-polmonare canina.

#### MATERIALI E METODI

E' stata effettuata una ricerca sulle zanzare presenti in alcune aree della provincia di Perugia (Castelnuovo di Assisi, Cannara, Bevagna, Trevi, Foligno) dove erano stati precedentemente diagnosticati 30 casi di filariosi cardio-polmonare nei cani, alcuni dei quali mortali. I culicidi adulti sono stati raccolti manualmente accanto ai box dove erano tenuti i cani parassitati da *D. immitis*, sia mediante trappole luminose aspiranti con rete filtrante posizionate vicino agli animali. Gli artropodi, comunque catturati, venivano subito portati in laboratorio per effettuarne la dissezione (2-24 ore dopo).

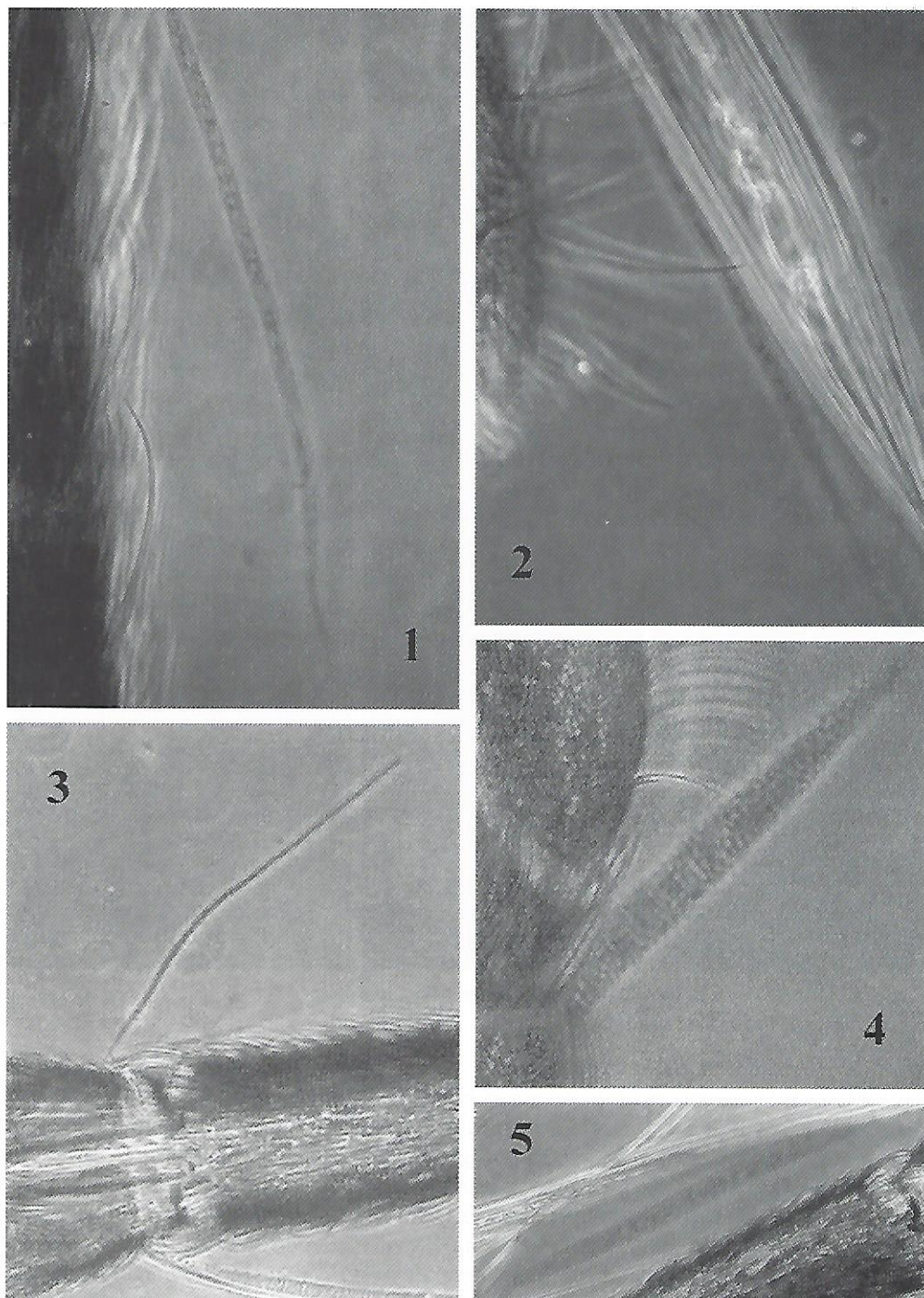
#### RISULTATI

La nostra raccolta, sia pure lenta e faticosa, ha portato all'ottenimento di 96 esemplari adulti di zanzare appartenenti ai generi *Culex* e *Aedes*. Solo 15 di questi sono stati raccolti manualmente e i restanti mediante trappole luminose. Durante la campionatura delle larve (circa 2000) sono stati messi in evidenza alcuni focolai di sviluppo presenti nella zona; tra questi una grande raccolta d'acqua stagnante formatasi in vecchie serre ormai in disuso. La dissezione degli artropodi catturati ha portato all'isolamento, in due esemplari identificati come *Aedes vexans*, di due differenti tipologie di nematodi filariformi: 1) larve di 310-335 micron in tutto simili a quelle presenti nel sangue periferico dei cani parassitati in un campione raccolto manualmente. Qui sono state rinvenute 3 larve riferibili a microfilarie di *D.immitis* nella scanalatura del *labium*, (fig. 1) tra le mascelle e le mandibole (fig. 2) e nella parte anteriore del premento tra i labelli e le lacinie (fig. 3), 2) larve di 920-1050 micron (probabilmente L3 di *D. immitis*) in un campione raccolto con trappola luminosa. Di queste larve, 8 erano localizzate nella tromba (figg 4, 5) e 2 nell'emocele, tra i tubuli di Malpighi che si erano rotti e da cui probabilmente erano fuoriuscite.

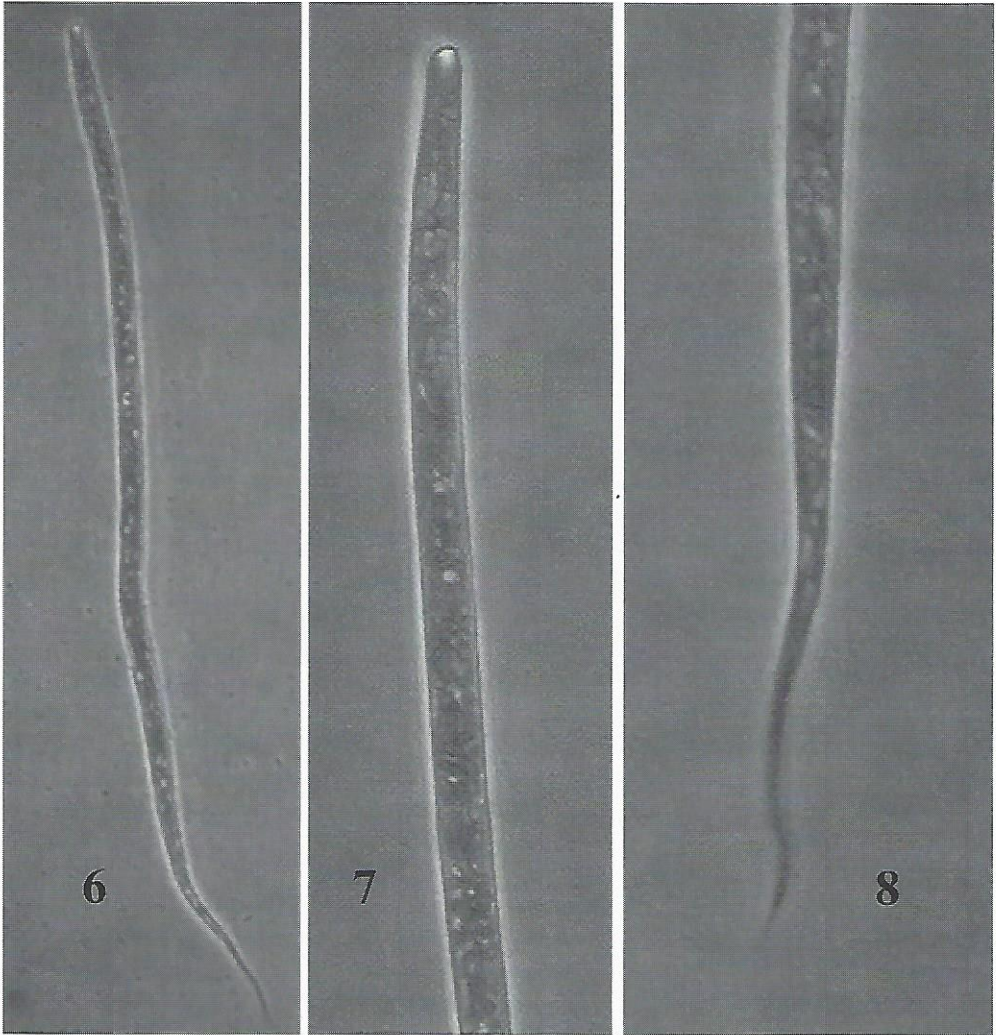
L'esame del sangue dei cani presenti nell'areale di cattura ha evidenziato esclusivamente la presenza di *D. immitis* (figg 6,7,8).

#### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La principale difficoltà del presente lavoro è stata quella di identificare le larve reperite in due dei 96 culicidi sottoposti a dissezione. Come è noto, è pressoché impossibile riuscire ad emettere una diagnosi di certezza basandosi sull'esame morfologico dei parassiti reperiti nelle zanzare (CANCRINI *et al.*, 1989; FAVIA *et al.*, 1996). In realtà, per giungere alla diagnosi di probabile infestazione di *D. immitis* si è tenuto presente quanto segue: 1) nel piccolo areale dove abbiamo catturato le zanzare positive, la dirofilariosi canina è sostenuta da *D.immitis*; 2) una delle zanzare positive è stata catturata direttamente nei box dei cani parassitati da *D. immitis*; 3) su questa zanzara, subito dissezionata, abbiamo isolato



Figg 1-5 – *Dirofilaria immitis*: 1- Microfilaria nel *labium* di *Ae.vexans*; 2 - Microfilaria tra mascelle e mandibole; 3 - Microfilaria appena fuoriuscita dai labelli; 4 - Probabile larva infettante (L3) che fuoriesce dai labelli; 5 - Probabile larva infettante (L3) nel *labium*, tra mascelle e mandibole.



Figg.6-8 - Microfilarie di *D. immitis* da sangue di cane (test di Knott).

microfilarie di *D. immitis* morfologicamente ben distinguibili rispetto a quelle di *D. repens*, presente in areali vicini; 4) le due zanzare positive sono state catturate nel medesimo luogo. Dunque è verosimile che anche le L3 possano appartenere alla specie *immitis*.

Sebbene la presenza di dirofilarie in insetti catturati in natura sia già stata più volte segnalata (NELSON, 1962; COUTNEY *et al.*, 1983; SAUERMAN, 1985; RODHAIN, 1995) anche in *A. vexans* (ROBERTS, 1985; ERNST *et al.*, 1984), riteniamo che il nostro reperto, sia pur modesto, possa essere comunque di stimolo per ulteriori ricerche. Inoltre non ci risulta sia mai stato segnalato in Umbria l'isolamento di filarie in culicidi raccolti in natura. Anche per questo riteniamo che la presente segnalazione, pur discutibile sotto il profilo dell'identificazione di specie, meriti comunque di essere annotata.

## RIASSUNTO

In Italia la filariosi canina provocata da *Dirofilaria immitis* e *D. repens* è una parassitosi frequente e con importanti risvolti sanitari a causa della possibile trasmissione all'uomo tramite le zanzare. Il presente studio ha origine dal rilevamento di n. 30 casi di filariosi cardiaca in cani della provincia di Perugia (Castelnuovo di Assisi, Cannara, Bevagna, Trevi, Foligno). In tali zone è stata iniziata una ricerca mirata dei vettori, sia laddove si evidenziavano nuovi episodi di filariosi nei cani, sia intorno agli acquitrini più vicini che potevano costituire la sede di sviluppo di questi insetti. Il prelievo dei campioni è stato effettuato attraverso una duplice modalità: l'utilizzo di trappole luminose aspiranti, munite di rete separatrice all'interno, con lo scopo di catturare eventuali zanzare parassitate dalle microfilarie e la ricerca delle larve di questi insetti nelle raccolte d'acqua stagnante della zona, al fine di rilevarne i principali focolai di sviluppo. Attraverso le trappole luminose sono state catturate nelle aree a rischio n. 96 zanzare appartenenti ai generi *Culex* e *Aedes* ed oltre 2000 larve degli stessi generi in una raccolta d'acqua stagnante formatasi in serre ormai in disuso. Gli artropodi catturati venivano subito portati in laboratorio per effettuarne la dissezione, mentre le larve venivano in parte poste in recipienti con rete per consentirne lo sviluppo e in parte conservate in alcool a 80%. La dissezione degli esemplari ha portato all'isolamento di microfilarie di *Dirofilaria immitis* dalla tromba di due esemplari di zanzare del gen. *Aedes* (*Aedes vexans*) a livello del *labium* e di L3 dai tubuli di Malpighi/ emocele degli insetti. Il numero di microfilarie osservato nella prima zanzara è stato di n. 8 esemplari nella tromba e n.2 L3 nell'emocele, tra i tubuli di Malpighi che si erano rotti e da cui probabilmente erano fuoriuscite e di n. 3 microfilarie nella seconda zanzara, nella scanalatura del *labium*, tra le mascelle e le mandibole e nella parte anteriore del premento tra i labelli e le lacinie. Le microfilarie isolate sono state identificate come *Dirofilaria immitis*.

## BIBLIOGRAFIA

- BOCH J., SUPPERER R., 1980 - *Parassitologia Clinica Veterinaria*. Ed. Essegivi, Piacenza, 392-394 pp.
- CANCRINI G., MATTIUCCI S., D'AMELIO S., GENCHI C., COLUZZI M., 1989 - *Genetic characterization of *Dirofilaria repens* and *D. immitis* by electrophoretic analysis of gene-enzyme systems*. - *Parassitologia*, 31: 189-196.
- COUTNEY C. C., CHRISTENSEN B. M., 1983 - *Field isolation of filarial worm presumed to be *Dirofilaria immitis* from mosquitoes in Kentucky*. - *Mosquito News*, 43: 366-368.
- ERNST J. P., SLOCOMBE J. O. D., 1984 - *Mosquito vector of *D. immitis* in South western Ontario*. - *Can. J. Zool.*, 62: 212-216.
- EUZEBY J., 1973 - *Cardio-Vasculopathie parasitaire: la dirofilariose cardi-pulmonaire*. - *Revue Méd.Vet.*, 124 (7): 969-990.
- FAVIA G., LANFRANCOTTI A., DELLA TORRE A., CANCRINI G., COLUZZI M., 1996 - *A PCR-based method to identify *Dirofilaria repens* and *D. immitis**. - *Parasitol.*, 113: 567-571.
- GENCHI C., VENCO L., VEZZONI A., 1998 - *La Filariosi cardiopolmonare del cane e del gatto*. Ed. SCIVAC, Cremona, pp. 198.
- NELSON G. S., HEISH R. B., FURLONG M., 1962 - *Studies in filariasis in East Africa. II. Filarial infections in man, animals and mosquitoes on the Kenya Coast*. - *Trans.Roy.Soc. trop. Med. Hyg.*, 56: 202-217.
- ROBERTS E. P., 1985 - *A study of dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) in the Baltimore - Washington area*. Dissert. Abstr. Int., 45: 3418.
- RODHAIN F., 1995 - *Aedes albopictus: a potential problem in France*. - *Parassitologia*, 37: 115-119.
- SAUERMAN D. M. JR., 1985: *A survey for natural potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Vero beach*. - *Mosq. News*, 43: 222-225.

**Autore referente:** Mario Principato, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Via S. Costanzo 4, 06121 Perugia; e-mail: drprincipato@email.it