

STUDIO SULLA PRESENZA DI AGENTI INFETTIVI NELLE ZECHE IN UMBRIA: RISULTATI PRELIMINARI

¹Zema J., ¹Maresca C., ³Principato M., ¹Caporali A., ¹Iscaro C., ¹Marchi S., ²Capelli G., ¹Costarelli S.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

³Scienze Biopatologiche Veterinarie - Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia

Key words: Tick, Tick Borne Encephalitis virus, Umbria Region

SUMMARY

Reported herein are the preliminary results of a study on the presence of infectious agents isolated from ticks in Umbria region. The most frequently identified species were *Ixodes ricinus* (15,4%), *Rhipicephalus sanguineus* (40,9%), *Dermacentor marginatus* (13,5%), *Hyalomma marginatum* (20,8%), *Rhipicephalus bursa* (19,1%) and *Ixodes exagonus* (0,2%). We also report the results of a RT-PCR for the detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) into the ticks and of a serological monitoring for TBEV antibodies by Elisa test in susceptible species (sheep, wild boar and roe deer).

INTRODUZIONE

Le caratteristiche ambientali, ecologiche e climatiche dell'Umbria si prestano a determinare condizioni favorevoli ad una significativa presenza di zecche. Ciò nonostante i rilievi epidemiologici sulla diffusione di tali parassiti, nel nostro territorio, sono scarsi e limitati ad indagini effettuate prevalentemente all'interno di abitazioni. I risultati indicherebbero la presenza ricorrente di due tipi di zecche, *Argas reflexus* e *Rhipicephalus sanguineus* e, in minor misura, di altre specie come *Ixodes ricinus*, *Ornithodoros coniceps*, *Dermacentor marginatus* (5).

Anche i dati scientifici relativi al possibile ruolo di questi vettori nella trasmissione di agenti infettivi trasmissibili all'uomo sono scarsi nella nostra regione.

Invece, il crescente proliferare di popolazioni ospiti naturali, la longevità delle zecche, la loro elevata capacità riproduttiva, la scarsità di nemici naturali, la resistenza ai pesticidi ed alle condizioni ambientali sfavorevoli, potrebbero motivare una diffusione notevole e crescente di questi vettori nei nostri territori con un aumentato rischio di trasmissione di numerosi agenti infettivi.

Di fatto, i casi di malattie trasmesse da vettori sono aumentati notevolmente negli ultimi anni in Europa ed in Italia e parallelamente è cresciuta la sensibilità dei cittadini rispetto a questa problematica.

Sono sempre più frequenti le persone che, colpite da morsi di zecche, usufruiscono delle prestazioni di pronto soccorso per farsi rimuovere il vettore dal punto di inoculo e per sottoporsi a specifici protocolli di profilassi antimicrobica.

Talora si accusano sintomi simil-influenzali e, nei casi più seri, si registrano ospedalizzazioni di pazienti con sintomatologia neurologica vaga, che resta l'unico elemento sulla base del quale emettere il sospetto diagnostico, che tale rimane. Questo fa supporre che esistano, ancora oggi, grosse lacune nella conoscenza territoriale dell'epidemiologia di tali infezioni, circostanza che motiva anche l'assenza di adeguati protocolli diagnostici.

Per tale ragione abbiamo presentato un progetto di ricerca atto ad approfondire le conoscenze sulle specie di zecche più diffuse in Umbria e la loro eventuale positività nei confronti di alcuni importanti agenti infettivi trasmissibili all'uomo. Abbiamo inoltre voluto verificare l'eventuale presenza di anticorpi nei confronti del virus TBE in specie animali domestiche e selvatiche del nostro territorio.

In questo lavoro riportiamo i risultati preliminari di tale progetto.

MATERIALI E METODI

Cattura delle zecche

Siamo ricorsi a due sistemi diversi: il *cloth dragging* e la cattura delle zecche direttamente dalla cute di specie animali diverse. Per il *cloth dragging* si è utilizzata una coperta di flanella bianca delle dimensioni di m1x1, lungo transetti di 100 metri. Per la rimozione dei vettori dalla superficie cutanea degli animali ci si è avvalsi della collaborazione dei nuclei venatori e dei colleghi della sala necropsia del nostro Istituto.

Una volta catturati gli esemplari sono stati conservati in frigorifero per non oltre 24-48 ore, all'interno di falcon contenenti una soluzione di RNA later in quantità adeguata a tenere immersi i parassiti.

L'identificazione di ogni soggetto è stata effettuata presso il dipartimento di Parassitologia della Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia. Gli esemplari sono stati identificati per specie, sesso, stadio di sviluppo e suddivisi in soggetti ingorgati o non ingorgati.

Ricerca di agenti infettivi

L'indagine è stata condotta sui seguenti patogeni:

- Flavivirus della TBE
- Coxiella burnetii
- Rickettsia spp.
- Anaplasma spp.
- Babesia spp.
- Borrelia burgdorferi

Allo scopo i vettori sono stati sottoposti ad estrazione mediante Kit Qiagen "AllPrep DNA/RNA mini kit" per consentire eventuali ulteriori approfondimenti atti a svelare la presenza di diversi agenti patogeni infettanti a RNA e a DNA. L'estrazione degli acidi nucleici è stata effettuata singolarmente nel caso di soggetti adulti ingorgati, in pool di 5/6 nel caso di soggetti di piccole dimensioni, non ingorgati o qualora si trattava di larve/ninfe. In ogni caso i pool sono sempre stati allestiti da esemplari appartenenti alla stessa specie e/o prelevati dalla cute dello stesso animale.

Tutti i campioni di RNA degli esemplari *Ixodes* spp. sono stati sottoposti a una PCR Real Time di screening per virus TBE, che usa anche un controllo di estrazione. In particolare, il protocollo prevede l'utilizzo, alle stesse condizioni termiche ma in 2 mix separate, di una sonda TaqMan TBE (FAM-TAMRA) con i relativi primer TBE-F e TBE-R, per individuare il gene target all'interno della regione 3' non-coding del genoma virale, e di una sonda TaqMan 16s *Ixodes* (FAM-TAMRA) con i relativi primer R-16s *Ixodes* e F-16s *Ixodes*, per monitorare la fase di estrazione del RNA dal campione (6). Il DNA estratto è stato conservato a -20°C per applicare i protocolli biomolecolari atti agli ulteriori approfondimenti previsti dal progetto (*Borrelia burgdorferi*, *Coxiella burnetii*, *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Rickettsia* spp.).

Indagini sierologiche

per valutare la prevalenza dell'infezione TBE in mammiferi di specie diversa sono stati saggiati sierologicamente, mediante ELISA (KIT EIATBEV.Ig – Test Line, Clinical Diagnostic ®),

campioni della popolazione ovicaprina di allevamenti umbri e di specie selvatiche (cinghiali e caprioli).

Nel primo caso si sono utilizzati campioni di sangue pervenuti per i piani di profilassi (Brucellosi). Il campionamento in laboratorio è stato effettuato estraendo, una volta/settimana, 15 campioni in modo del tutto casuale, in giorni della settimana sempre diversi così da annullare eventuali bias di selezione. L'attività di prelievo di tali campioni è durata 26 settimane. Il numero di campioni per valutare la prevalenza è stato stabilito considerando la popolazione da cui estrarre le unità campionarie come estremamente numerosa ed ipotizzando una prevalenza del 50%, una precisione del 5% ed un livello di confidenza del 95% (L.C.95%). E' stata quindi calcolata la sieroprevalenza di TBE e relativi intervalli di confidenza al 95% (I.C.95%)

Sono stati prelevati 390 sieri appartenenti a 693 diversi allevamenti ovi-caprini, distribuiti in 83 Comuni, 52 in provincia di Perugia e 31 in quella di Terni.

Per quanto riguarda le specie selvatiche, sono pervenuti 141 campioni di sangue di cinghiale, appartenenti a 5 diversi distretti di caccia (Perugia, Foligno, Spoleto, Marsciano e Terni), 66 di capriolo e 4 di daino provenienti dai distretti di caccia di Città di Castello – S. Giustino.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Allo stato attuale sono stati prelevati 505 esemplari di zecca di cui 459 individui adulti, 42 ninfe e 4 larve.

Le specie di appartenenza sono così ripartite:

- *Ixodes ricinus* (15,4%)
- *Rhipicephalus sanguineus* (40,9%)
- *Dermacentor marginatus* (13,5%)
- *Hyalomma marginatum* (20,8%)
- *Rhipicephalus bursa* (19,1%)
- *Ixodes hexagonus* (0,2%)

La maggior parte degli esemplari catturati (circa 90,9%) sono adulti, in minima parte ninfe (8,3%) e larve (0,8%).

Complessivamente sono stati allestiti 143 pool.

La PCR è risultata positiva al controllo di estrazione su tutti i pool saggiati e negativa al virus TBE.

Dei 390 sieri ovis saggiati, 3 campioni hanno dato esito dubbio, gli altri sono risultati sieronegativi (siero prevalenza stimata 0,8% e I.C.95% tra 0,2 e 2,4). I tre ovis risultati dubbi appartengono a 3 allevamenti diversi: un allevamento è localizzato nel comune di Bevagna, gli altri due nel comune di Preci.

I sieri di cinghiale e capriolo saggiati in Elisa sono risultati tutti negativi.

Le indagini biomolecolari per *Borrelia burgdorferi*, *Coxiella burnetii*, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., sono ancora in corso. L'encefalite da morso di zecca (TBE) è una zoonosi sostenuta da un virus ad RNA appartenente alla famiglia delle Flaviviridae mantenuto in natura da un ciclo biologico che prevede la zecca (prevalentemente *Ixodes ricinus*) come vettore e un'ampia gamma di ospiti vertebrati, selvatici e domestici.

Nell'uomo la malattia è caratterizzata da sintomi clinici inizialmente simil-influenzali che possono evolvere in una grave forma di encefalite. Fino ad alcuni anni fa la TBE era diffusa prevalentemente in alcuni foci naturali del Nord-Europa e dell'Asia (4) ma sempre più spesso viene diagnosticata in regioni geografiche prima indenni (1). Per tale ragione il 67% dei paesi dell'Unione Europea (20 paesi su 30) ha sviluppato, negli ultimi anni, specifici sistemi di sorveglianza che sono applicati a livello nazionale in 18 di essi, a livello "sub-nazionale" in Romania e a livello regionale in Italia. Nonostante questo, esiste una notevole differenza metodologica tra i sistemi di sorveglianza adottati dai diversi paesi, in termini, ad esempio, di definizione di caso, di

diagnosi clinica, di approccio diagnostico. In definitiva esiste una notevole differenza di sensibilità nella sorveglianza dei piani e quello italiano, attivo solo in alcune regioni, viene ritenuto di scarsa sensibilità (3).

Nel nostro paese la malattia è segnalata prevalentemente nelle regioni del Nord-est mentre poco si conosce sulla presenza del vettore e dell'infezione in altre aree geografiche. Casi umani sono stati riportati a partire dalla fine degli anni '60, con focolai di infezione in provincia di Trento, Belluno, Gorizia, in centro Italia (2) e in Puglia (3).

Come in tutte le infezioni trasmesse da vettori anche per la TBE le condizioni dell'ambiente costituiscono l'elemento chiave ai fini del mantenimento del ciclo virale. Queste condizioni sono date da numerosi elementi e dalla loro modalità di interazione. La densità delle popolazioni animali, la loro suscettibilità all'infezione, il clima e le sue variazioni, il comportamento degli animali, la loro movimentazione sul territorio, lo stato immunitario delle popolazioni target, i comportamenti sociali dell'uomo. La malattia potrebbe costituire pertanto un emergente problema di sanità pubblica anche in ragione del fatto che la variazione delle condizioni climatiche, gli spostamenti umani, l'aumento di alcune popolazioni selvatiche contribuiscono a caratterizzare nuove aree geografiche come foci naturali dell'infezione.

I nostri risultati sulla diffusione della TBE, sia da un punto di vista sierologico che di isolamento, appaiono tranquillizzanti.

Le ragioni sono prevalentemente di due tipi: abbiamo lavorato in una zona geografica ritenuta non endemica (e i nostri risultati sierologici sembrerebbero confermarlo) e su un numero di esemplari di zecca campionato ancora troppo limitato. Riteniamo tuttavia che questi risultati possano costituire un iniziale tassello nella conoscenza dell'infezione TBE nel centro Italia. Trattandosi di una zoonosi, anche dati parziali come questi, sulla presenza o meno dell'infezione in specie selvatiche e domestiche e sulla presenza del virus nei vettori, possono contribuire a chiarire l'entità del rischio per l'uomo e a migliorare una sorveglianza considerata ancora frammentaria e insoddisfacente.

BIBLIOGRAFIA

1. Charrel R.N. et al., "Tick-borne virus diseases of human interest in Europe" - *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 1040-1055.
2. Ciufolini M.G., Verani P., Nicoletti L., Fiorentini C., Bassetti D., Morandini V., Caruso G. (1999). Recent advances in the eco-epidemiology of tick borne encephalitis in Italy. *Alpe Adria J. Microbiology Journal*, 8, 81-83.
3. ECDC technical report – "Epidemiological situation of tick borne encephalitis in the European Union and European free Trade Association Countries, 2012.
4. Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA (2003). Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res*, 57, 129-146.
5. Principato M., Moretti A., Moretta I., Grelloni V., Venditti G., Masini P., Zampetti S. 2007. "Rilievi epidemiologici sulla diffusione, in Umbria, di alcuni Ixodoidea di interesse sanitario in ambienti domestici". Atti Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria – Abano Terme, 13-14 settembre 2007 – pag. 93.3.
6. Schwaiger M., Cassinotti P., 2003. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA. – *Journal of Clinical Virology*, 27: 136- 145.