IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Roditori selvatici come serbatoi di alcuni agenti zoonosici: risultati di un'indagine eco- epidemiologica condotta in aree protette del centro Italia (IZSAM0412)

I. Pascucci, M. Di Domenico, G. Angelico, V. Curini, C. Cammà, G. Coseddu, G. Sozio, F. Monaco

I risultati della ricerca condotta dall'IZSA&M

CiFiV Colleatterrato

Teramo 13 giugno- 2017

i.pascucci@izs.it

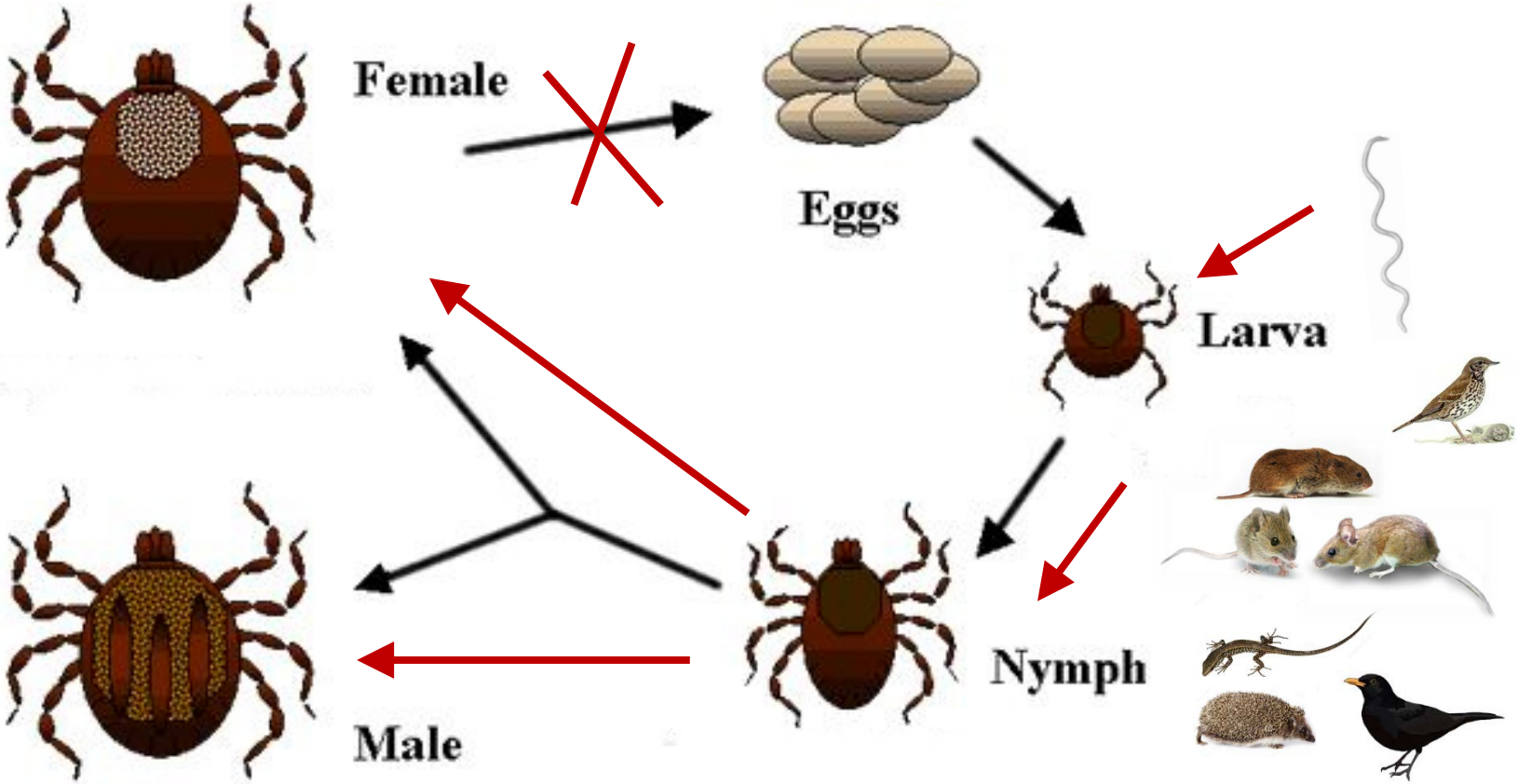
Obiettivo

ottenere informazioni sul ruolo dei roditori selvatici nel mantenimento del ciclo di alcuni agenti patogeni.

- *Borrelia burgdorferi* sensu lato - **Malattia di Lyme**
- Rickettsiae dello spotted fever group (SFG)- **Rickettsiosi**
- *Anaplasma phagocytophilum*-**Anaplasmosi umana granulocitica**
- *Coxiella burnetii*-**Febbre Q**
- **Hantavirus**
- **Flavivirus (WNV e USUV)**

Partner IZS Abruzzo e Molise e IZS Umbria e Marche

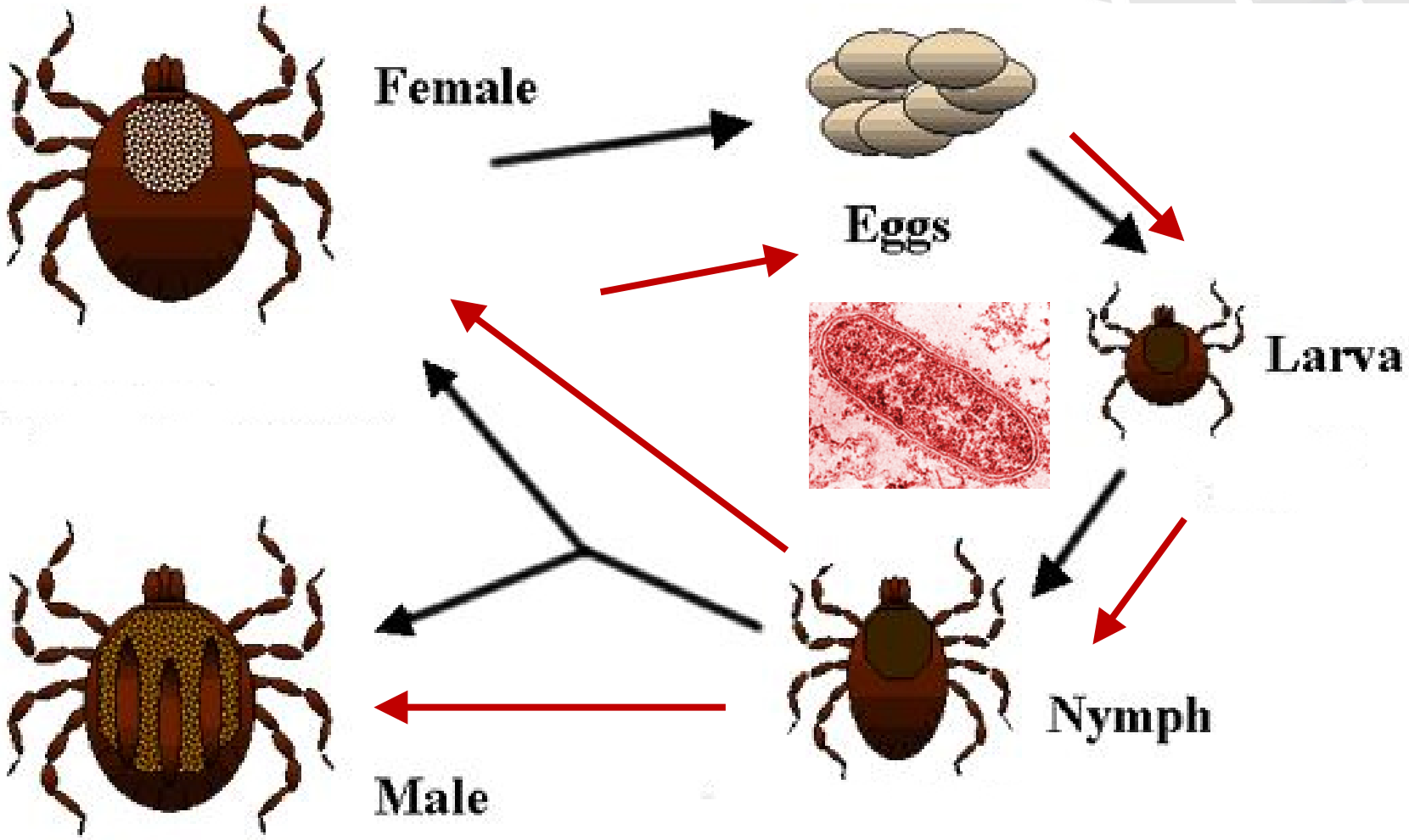
Borrelia burgdorferi s.l.



Trasmissione **trans-stadiale non transovarica**

Roditori ed altri piccoli mammiferi, uccelli , rettili sono i serbatoi riconosciuti delle diverse genospecie di *B. burgdorferi* s.l.

SFG Rickettsiae

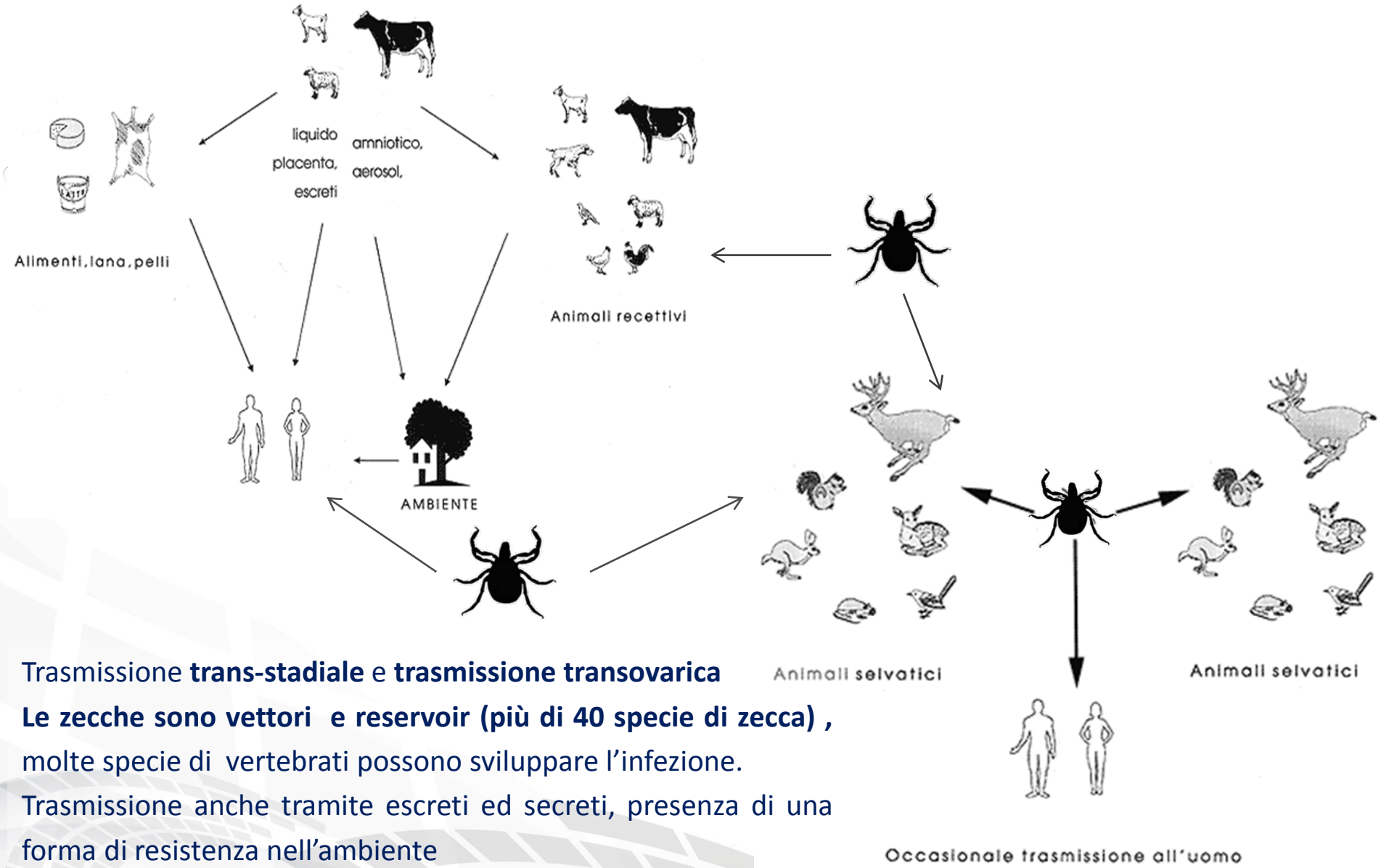


Trasmissione **trans-stadiale**

Trasmissione transovarica

Le zecche sono vettori e reservoir , alcune specie di vertebrati in particolare roditori possono sviluppare la rickettsiemia

Coxiella burnetii



Trasmissione **trans-stadiale** e **trasmissione transovarica**

Le zecche sono vettori e reservoir (più di 40 specie di zecca) , molte specie di vertebrati possono sviluppare l'infezione.

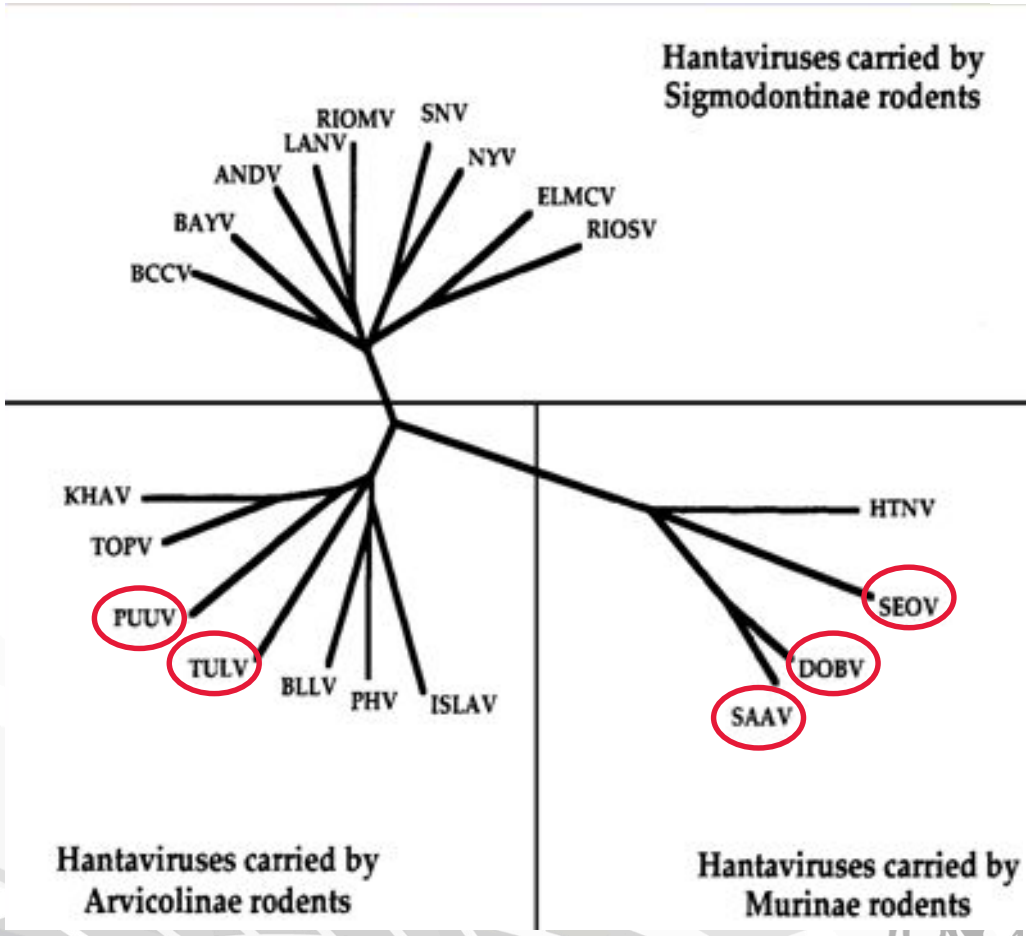
Trasmissione anche tramite escreti ed secreti, presenza di una forma di resistenza nell'ambiente

Hantavirus

Gli Hantavirus (famiglia Bunyaviridae, genere Hantavirus) sono virus a RNA, responsabili di infezioni persistenti e asintomatiche in numerose specie di roditori ed insettivori; sono trasmessi all'uomo principalmente via aerosol attraverso i secreti e gli escreti di ospiti infetti.

SEOV, trasmesso dal ratto grigio (*Rattus norvegicus*) e dal ratto nero (*Rattus rattus)*, causa una forma moderata di HFRS riportata in Asia e in molte città portuali in tutto il mondo.

PUUV è il più diffuso in Europa, trasmesso dall'arvicola rossastra (*M. glareolus*), responsabile di una forma lieve di febbre emorragica con sindrome renale (HFRS)



DOBV è trasmesso dal topo selvatico dal collo giallo (*A. flavicollis*) e causa una forma grave di HFRS

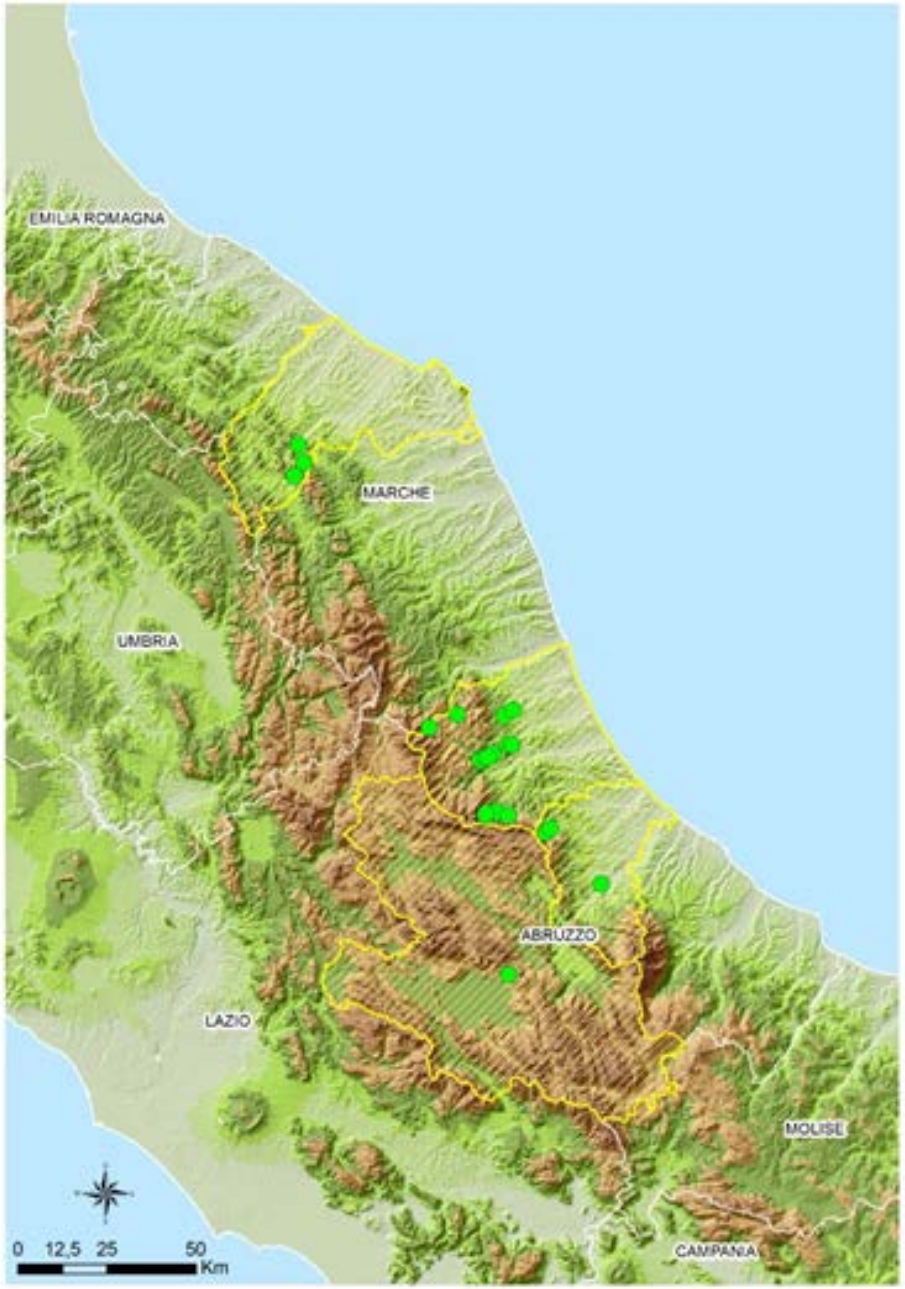
TULV è trasmesso dall'arvicola campestre (*Microtus arvalis*) e dall'arvicola agreste (*Microtus agrestis).*

SAAV è strettamente correlato a DOBV, ma meno patogeno per l'uomo, è associato al topo selvatico a dorso striato (*A. agrarius*).

Flavivirus

- I topi sono sensibili all'infezione con USUV e WNV
- Nel 2010-2011 in particolare c'é stata un'intensa circolazione USUV nell'area di studio.
- Mancano dati sui roditori selvatici
- I roditori selvatici sono riconosciuti essere il serbatoio di Flavivirus trasmessi da zecche come TBEV.

Materiali e Metodi: siti di cattura



I 24 siti di studio sono stati selezionati nella regione Abruzzo sia in aree protette sia in aree limitrofe, nelle Marche tutti i siti ricadevano nel Parco Naturale Regionale della gola della Rossa e di Frasassi.

Tutti erano caratterizzati da altitudini non superiori ai 1000 m e da prevalenza di bosco misto o bosco misto ed aree naturali con aree agricole (Corine Land Cover 2006).

Periodo luglio 2015 – aprile 2016

Le attività sono state autorizzate ai sensi del D.Lgs n°26 2014 (N. autorizzazione 907/2015-PR) previo parere positivo espresso dal CEISA prot 1466 /2014 e dall'ISS con nota 18806/2015.

Materiali e Metodi: trappolamenti

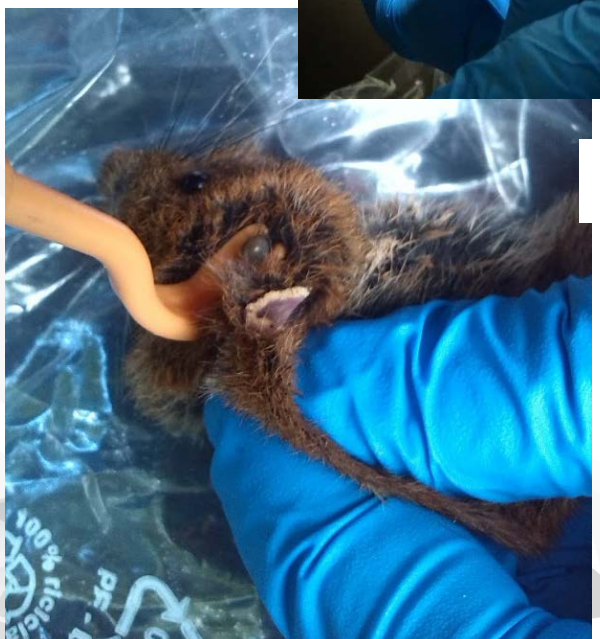
Le catture di roditori sono state effettuate in 24 siti di cattura per almeno due notti consecutive mediante l'utilizzo di trappole Sherman.

Sono state condotte un totale di **3228 notti-trappola**. Le trappole sono state preparate con materiali adatti a garantire alimentazione (semi e burro di arachidi come attrattivo), idratazione (frutta) e isolamento termico degli animali catturati (piccola quantità di canapa da utilizzare come nido temporaneo)

Ogni animale è stato marcato individualmente con una targhetta auricolare metallica con un codice numerico univoco, per poter consentire l'identificazione dell'individuo eventualmente ricatturato a distanza di tempo. Contestualmente sono stati raccolti **i dati biometrici** ed annotati **sesso** e **stato riproduttivo**. Ciascun roditore catturato è stato identificato morfologicamente a livello di specie o di genere per gli Apodemus.

Materiali e Metodi: raccolta campioni

Previa leggera sedazione sono stati raccolti 100-200 µl sangue (mai più dell'1% del peso corporeo, tramite puntura del plesso mandibolare e per gocciolamento in una provetta contenente sodio citrato come anticoagulante,)



Raccolta **zecche "free-living" in 8 siti** (dragging)

Raccolta **zecche** dai roditori

Terminate le operazioni tutti gli animali sono stati rilasciati nei siti di cattura a risveglio avvenuto

Materiali e Metodi: identificazione di specie delle zecche

Identificazione morfologica mediante chiave dicotomica (Ixodida d'Italia, Manilla 1998)

Estrazione del DNA da tutte le zecche

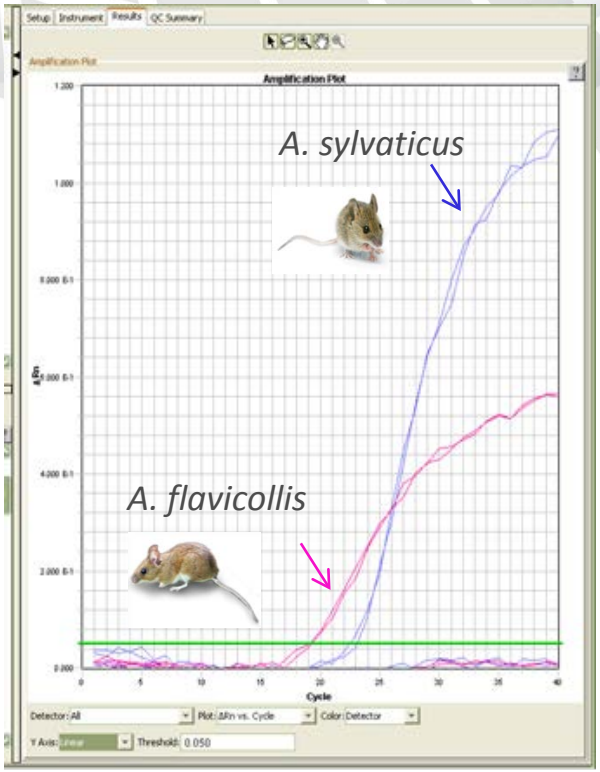
Per le larve: Amplificazione e sequenziamento del gene 12S (*Beati 2001 et al* modificato da *Toma et al 2014*)

Real Time TaqMan specifica per *I. ricinus* target ITS2 *(Michelet et al. 2014)*

1. **Assenza in GenBank di sequenze specifiche per *I. acuminatus***
2. **Sequenziamento del gene 12S da adulti di *I. acuminatus***
3. **Next Generation Sequencing sul gene CytC**
4. **Sviluppo *in house* di Real Time TaqMan specifica per *I.acuminatus* da dati NGS su DNA mitocondriale del CytC**

Validazione di entrambi i metodi su 10 campioni di *I. ricinus* (identificati anche con sequenziamento del 12S) e su adulti *I. acuminatus* e su *I. hexagonus* (risultati negativi)

Materiali e Metodi: identificazione dei roditori del genere *Apodemus*

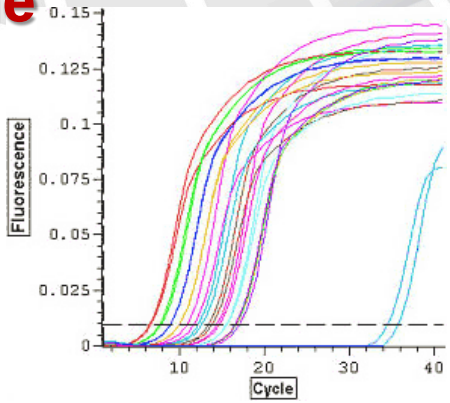


- ✓ *A. sylvaticus* e *A. flavicollis* non sono sempre distinguibili a causa della sovrapposizione di alcuni caratteristiche morfologiche;
- ✓ presentano caratteristiche eco-etologiche differenti (più strettamente legato agli ambienti forestali *A. flavicollis*) talvolta vivono in simpatria soprattutto in aree ecotonali;

Il DNA dei campioni di sangue dei roditori del genere Apodemus è stato testato per l'identificazione di specie mediante una RealTime specifica messa a punto durante il progetto.

- ✓ Il DNA estratto è stato sottoposto a Real Time PCR (strumento 7900HT fast Real Time PCR) con primers e sonde TaqMan specie-specifici Fla_P e Syl_P messi a punto in una fase precedente del progetto per la distinzione delle due specie (Sozio et *al.*, in press).
- ✓ I saggi Real Time PCR amplificano un segmento del gene che codifica **per il citocromo B (CytB).**
- ✓ L'utilizzo di due marcatori fluorescenti (FAM e JOE) differenti sulle sonde ha permesso di rilevare e distinguere **l'amplificazione dell'una o dell'altra specie nello stesso pozzetto di amplificazione (duplex).**

Materiali e Metodi: rilevamento dei patogeni trasmessi da zecche e loro identificazione



Il DNA e estratto dai campioni di sangue e dalle zecche è stato testato tramite Real Time PCR per i seguenti patogeni:

Patogeno	Target	Metodo	Riferimento bibliografico
***Borrelia burgdorferi* s.l.**	23S rRNA	RealTime TaqMan	Michelet et al. 2014
***Rickettsia* sp.**	23S rRNA	RealTime TaqMan	Kato et al. 2013
Coxiella burnetii	IS1111	RealTime TaqMan	Panning et al. 2008
Anaplasma phagoctytophilum	msp2gene	RealTime TaqMan	Courtney et al. 2004

Materiali e Metodi: rilevamento dei patogeni trasmessi da zecche e loro identificazione

In caso di positività si è proceduto alle successive caratterizzazioni genetiche mediante metodi specifici per ciascun patogeno .

Patogeno	Sequenza Target	Riferimento bibliografico
Genospecie di *Borrelia burgdorferi* s.l.	Spaziatore intergenico 23S-5S	Rijpkema *et al* 1995
Specie di *Rickettsia* sp.	Frammento del geni OmpA e gltA	Santibanez *et al* 2013
Coxiella burnetii	Multispacer Sequence Typing (MST)	Di Domenico *et al* 2014
Anaplasma phagoctytophilum	Frammento ipervariabile del gene *groEL* (546 bp)	Di Domenico *et al.* 2016

Materiali e Metodi: rilevamento dei patogeni virali

La diagnosi di Hantavirus è stata effettuata mediante il test rapido per l'identificazione di anticorpi specifici (IgG) per PUUV nei roditori (ReaScan® Ab-Dect Puumala IgG prodotto da Reagena) mentre per DOBV è stato utilizzato un test ELISA Ab-Dect DOBRAVA-HANTAAN IgG EIA prodotto da Reagena. La diagnosi di Flavivirus è stata effettuata mediante saggio ELISA competitivo (INgezim WNV Compac – Ingenasa) che reagisce in presenza di anticorpi contro diversi Flavivirus, i campioni positivi e dubbi sono stati ulteriormente sottoposti ai test di conferma di sieroneutralizzazione (SN) per WNV e USUV .

Risultati: specie di zecche sui roditori

Sono stati prelevati 128 roditori

133 roditori sono stati controllati per la presenza di zecche

Nel 56% erano presenti una o più zecche

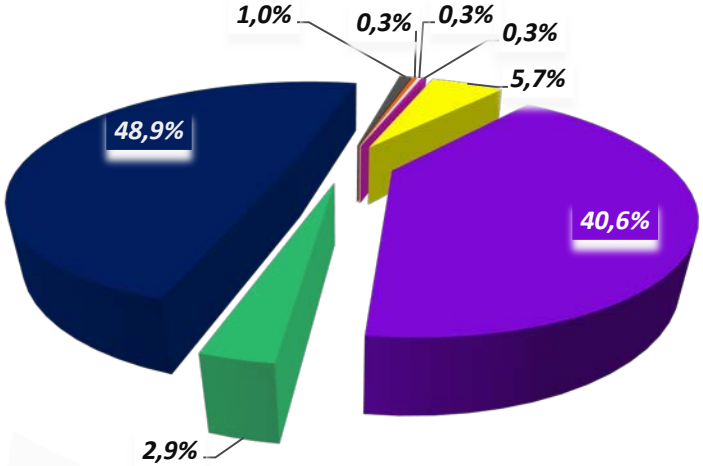
Myodes glareolus
20/25

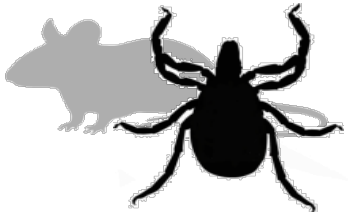
Apodemus flavicollis
48/97

Apodemus sylvaticus
4/8

Eliomys quercinus
2/3

Rodent ticks



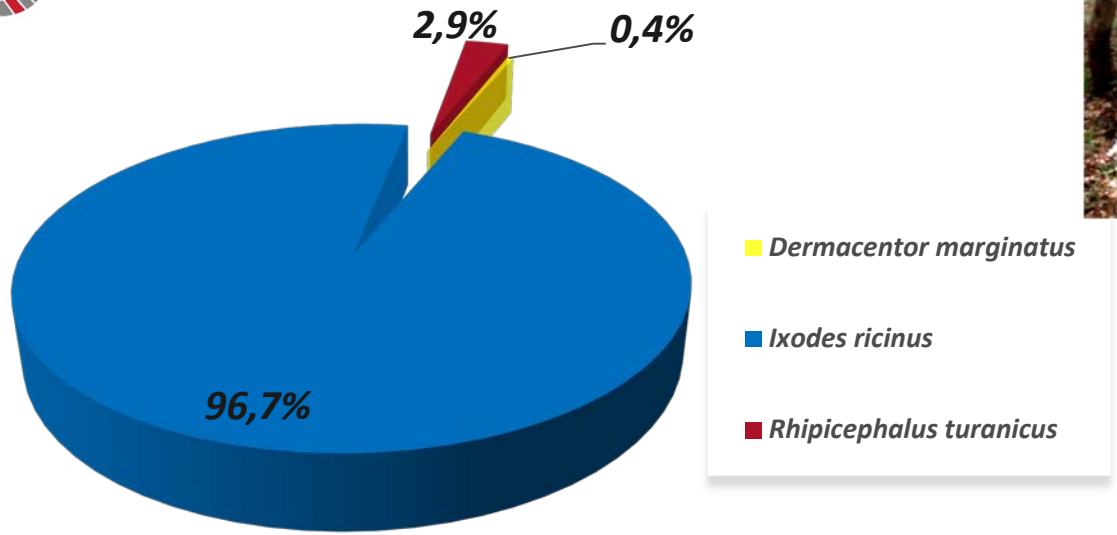


Specie zecca	Adulti	Larve	Not defined	Ninfe	
Dermacentor marginatus	0	16	0	2	18
Ixodes acuminatus	30	59	1	38	128
Ixodes hexagonus	0	9	0	0	9
Ixodes ricinus	0	148	1	5	154
Ixodes trianguliceps	0	0	0	3	3
Rhipicephalus turanicus	0	0	0	1	1
Ixodes sp.	0	1	0	0	1
Hyalomma marginatum	0	0	0	1	1
Totale	30	233	2	50	315

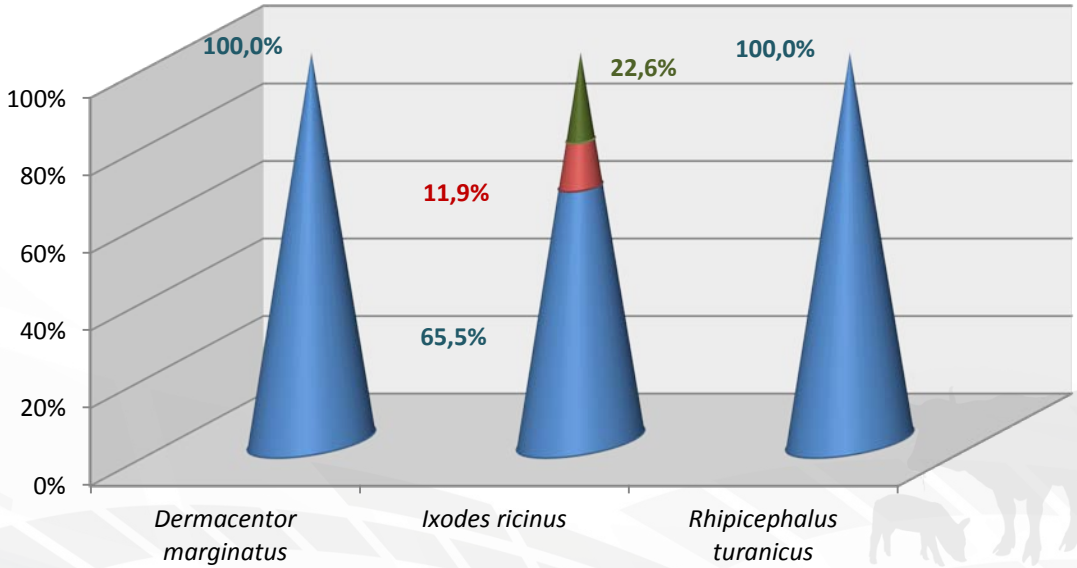
Risultati: specie di zecche «free-living»

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Specie di zecche "free living"



Stadi di sviluppo

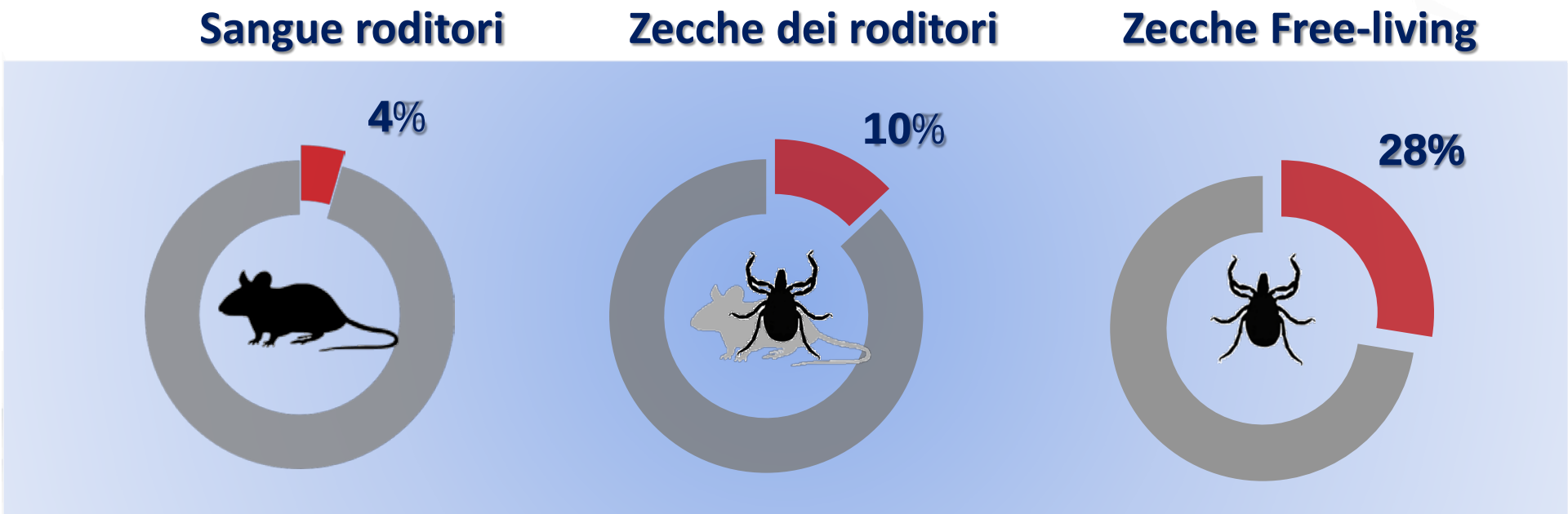


Risultati: patogeni trasmessi da zecche

I campioni di sangue e le larve raccolte dai roditori sono state testate singolarmente. Le ninfe e gli adulti raccolti dai roditori sono stati testati in pool per ciascun singolo animale (2-5 zecche ciascuno) omogenei per stadio di sviluppo e specie. Analogamente sono state testate in pool per ciascun sito le zecche raccolte durante la medesima sessione di dragging. Sono stati testati 288 campioni di zecche raccolte dai roditori e 69 di zecche «free living».

Tutti i campioni sono risultati negativi per *Coxiella burnetii* e per *Anaplasma phagocitophylum.*

Borrelia burgdorferi s.l.



Risultati:
geno-specie di *B. burgdorferi s.l.*

Sangue di roditori e zecche dai roditori

100%

Borrelia afzelii

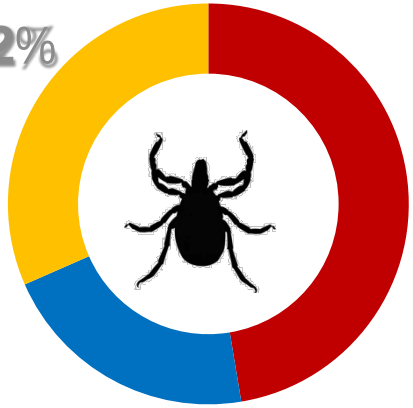
Zecche free-living

Borrelia garinii

32%

Borrelia afzelii

47%



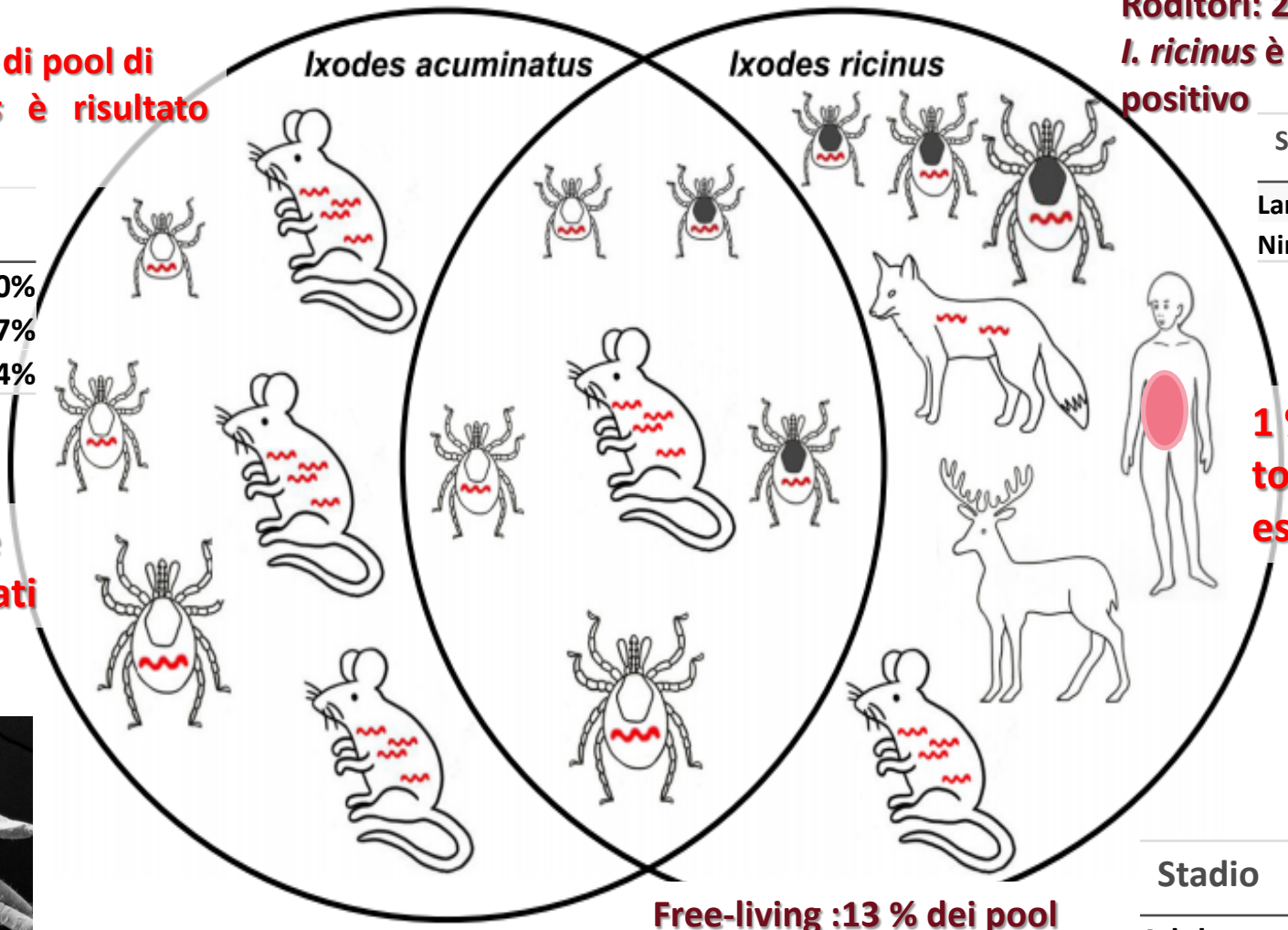
?

21%

Borrelia valaisiana

Risultati: circolazione di *B. afzelii*

Endophilic pathogen cycle | **Exophilic pathogen cycle**



Roditori: 24 % di pool di *I. acuminatus* è risultato positivo

Stadio	%
Adulti	13,0%
Larve	3,7%
Ninfe	7,4%

9 % su totale pool esaminati

Roditori: 2 % di pool di *I. ricinus* è risultato positivo

Stadio	%
Larve	1,3%
Ninfe	0,7%

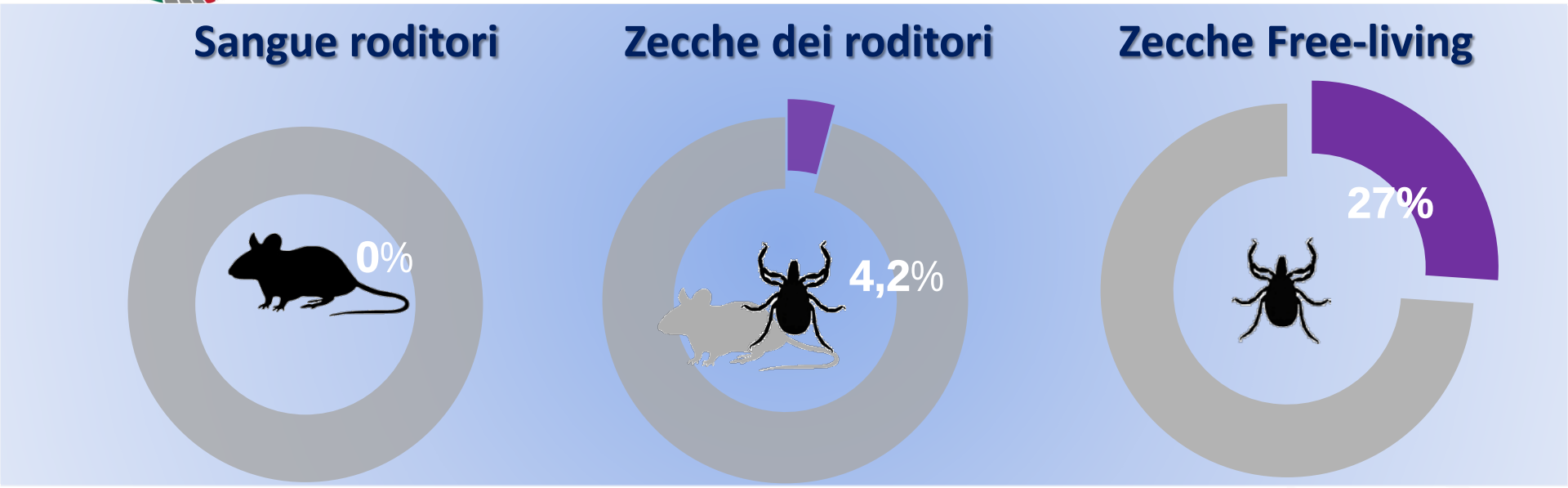
1 % su totale pool esaminati

Free-living :13 % dei pool esaminati tutti *I.ricinus*

Stadio	%
Adults	2,9%
Nymphs	10.1%

Risultati: patogeni trasmessi da zecche

Rickettsia sp.



Specie di Rickettsia da zecche dei roditori	Specie di Rickettsia da zecche «free –living»
R. slovaca /I.acuminatus	*R. monacensis /I.ricinus*
*R. raoultii/slovaca */I.acuminatus*	*R. slovaca /I.ricinus*
R.helvetica/I.ricinus	*R.helvetica/I.ricinus*
R.monacensis/I.ricinus	*R.raoultii/D.marginatus*

*Solo target gltA perché più sensibile poco DNA per utilizzare anche OmpA . Coinfezione con *B.afzelii*

Risultati: patogeni virali

Dai 128 campioni di sangue sono stati ottenuti 90 campioni di siero (60 *A. flavicollis*, 6 *A. sylvaticus*, *22 M. glareolus* e *2 E. quercinus).*

Tutti i campioni sono stati testati per PUUV, di cui è riconosciuto serbatoio *M. glareolus,* e per Flavivirus.

Successivamente i campioni di *Apodemus* sono stati testati per DOBV.

Tutti i campioni testati per PUUV e DOBV sono risultati negativi

	PUUV		DOBV		WNV	
Specie	No tot/pos	% pos	No tot/pos	% pos	No tot/pos	% pos
Apodemus flavicollis	60 (0)	0	43(0)	0	60 (2)	3,3
Apodemus sylvaticus	6 (0)	0	3(0)	0	6 (0)	0
Myodes glareolus	22 (0)	0	0	0	22 (0)	0
Eliomys quercinus	2 (0)	0	0	0	2 (0)	0

Il test di screening per Flavivirus ha permesso di rilevare 4 risultati positivi e 2 dubbi in altrettanti campioni di *A. flavicollis*. Due animali, uno catturato nella provincia di Teramo e uno in provincia di Ancona, sono risultati positivi al test di conferma per WNV con un titolo anticorpale di 1:10 ma nessun campione è risultato reattivo nei confronti dell'USUV.

Conclusioni e prospettive future

Patogeni trasmessi da zecche

I dati raccolti integrano e ampliano le informazioni raccolte in un precedente progetto (IZSAM0306) e riferiti all'area di Farindola in particolare:

✓**Le condizioni ecologiche si sono confermate idonee alla persistenza nell'ambiente delle genospecie di *B. burgdorferi* responsabili della Borreliosi di Lyme.**

✓***B.afzelii***, la genospecie patogena associata ai roditori esclusiva del paleartico, potrebbe essere mantenuta nella popolazione di roditori dalla zecca ad alta specificità parassitaria ***I. acuminatus*** **. Trasmissione trans-ovarica?** …….

✓Necessità di acquisire dati su distribuzione, biologia e ecologia su questa zecca montropa ed endofila **(Southern mouse tick)** per capirne il ruolo svolto nel ciclo della Borreliosi di Lyme.

✓ Il rilievo delle altre geno-specie associate agli uccelli "**ground feeding"** in nelle zecche **"free-living"** conferma la complessità dell'eco-epidemiologia della malattia di Lyme nell'area Mediterranea. I dati sulla prevalenza (28%) sono sovrapponibili a quelli riportati in dove la malattia è sporadica nell'uomo. Mentre nelle aree di endemia fino al 70% delle zecche «free living» può risultare positivo.

Conclusioni e prospettive future

Patogeni trasmessi da zecche

✓Complessità del quadro delle rickettsiosi dello SFG nell'area di studio . La percentuale di positivi nelle zecche "free living" è paragonabile a quanto già segnalato in centro Italia (36% nel Lazio)

✓*R. slovaca* era già stata rilevata nelle zecche dei cinghiali della zona (84%pool positivi).L'area può essere considerata a rischio per linfoadenopatia trasmessa da zecche (TIBoLA). *R. helvetica*, *R. monacensis, R. raoultii* sono una novità per l'area. Tutte le specie siano già state segnalate in Italia ed associate a rickettsiosi nell'uomo.

✓I dati negativi per *A. phagocytophilum* confermano quanto precedentemente descritto per l'area di Farindola. Nell'area alcuni genotipi riconosciuti come patogeni per l'uomo, sono mantenuti dal ciclo tra vettori ed ungulati selvatici (Di Domenico *et al*, 2016).

✓Il dato negativo per *Coxiella burnetii* contrasta con quanto rilevato nel precedente studio dove, per la prima volta in Italia ,veniva evidenziato il patogeno nei roditori selvatici (Pascucci et al 2015). E' ipotizzabile che l'infezione si perpetui nell'area di studio con meccanismi differenti che possono coinvolgere sia fauna selvatica sia gli animali domestici.

Conclusioni e prospettive future

Patogeni virali

Hantavirus

- ✓ Assenza di circolazione dei PUUV e DOBV, e di virus affini, sierologicamente correlati, come TULV, nelle zone interessate dallo studio.
- ✓ Secondo studio condotto in Italia (il primo in Trentino).
- ✓ Presenza in diversi paesi Europei e in tutta l'area balcanica (DOBV) possibile estensione del monitoraggio sui roditori ad aree più ampie del territorio nazionale.

Flavivirus

- ✓ *A. flavicollis* è suscettibile all'infezione con WNV.
- ✓ La positività sierologica nei due roditori potrebbe essere causata da una circolazione virale a bassa intensità e limitata all'ambiente silvestre (sistema sorveglianza mirata non ha svelato la circolazione virale nelle aree oggetto dello studio).
- ✓ Il ruolo dei roditori nel mantenimento del virus nell'ambiente e il loro possibile impiego come indicatori della presenza circolazione di WNV merita di essere approfondito .
- ✓ Non è stato possibile identificare il Flavivirus responsabile delle positività in ELISA non confermate da SN come USUV o WNV (Aspecificità? Altri Flavivirus?).

… grazie per
l’attenzione!