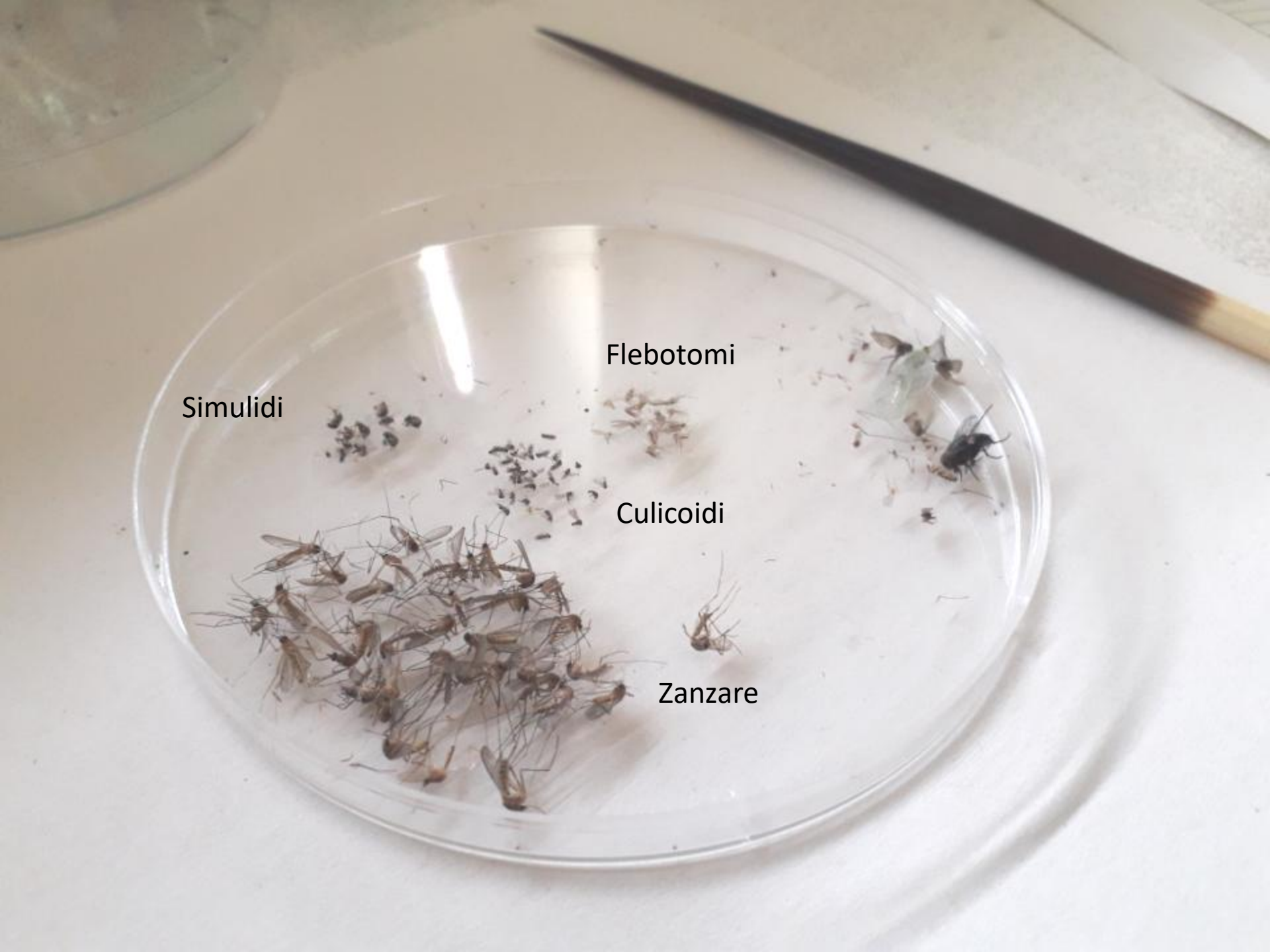
Mattia Calzolari
Sede Territoriale di Reggio Emilia
Laboratorio Entomologia Sanitaria

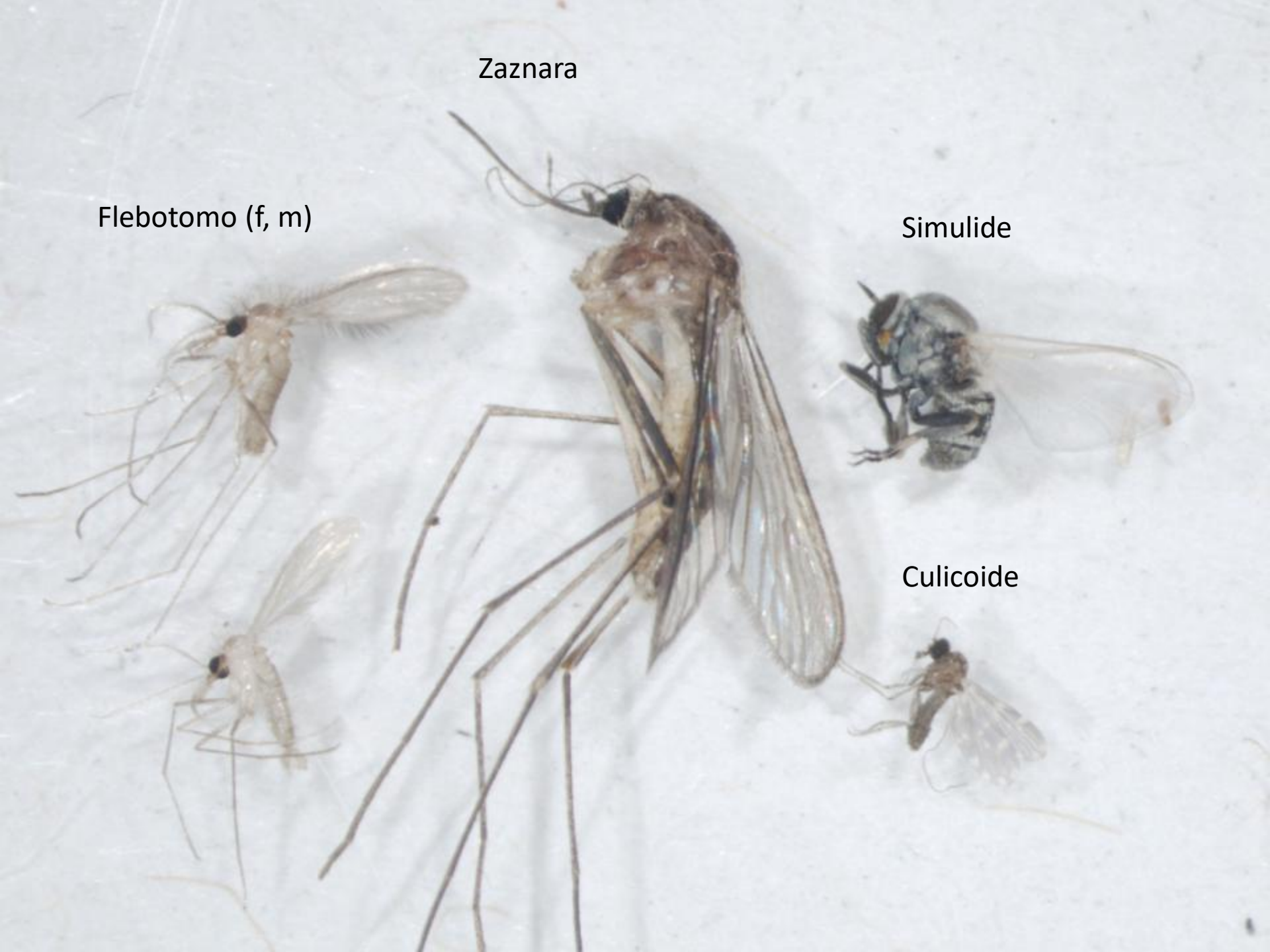
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

LA NOSTRA ESPERIENZA, LA VOSTRA **SICUREZZA**.

Aggiornamenti sulla distribuzione ed ecologia dei flebotomi in aree endemiche dell'Emilia-Romagna

LA LEISHMANIOSI IN OTTICA ONE HEALTH, Bologna, 23/05/2023


Flebotomi
Simulidi
Culicoidi
Zanzare


Zaznara
Flebotomo (f, m)
Simulide
Culicoide

Flebotomi

ORDINE Diptera

FAMIGLIA *Psychodidae*

- 1000 specie stimate (generi *Phlebotomus* Rondani e *Sergentomyia* França, in Europa)
- I flebotomi, o pappataci, sono insetti molto piccoli (2-4 mm) che solo con molta attenzione possono essere scorti ad occhio nudo
- Insetti molto antichi, flebotomi ritrovati in ambra risalente a 120 milioni di anni fa, Cretaceo (c'erano ancora i dinosauri)
- Diffusi nelle zone calde dell'Asia, dell'Africa, dell'Australia, dell'Europa meridionale e delle Americhe. Estremo nord: latitudine 50° N in Canada, nord della Francia, Mongolia; estremo sud latitudine 40° S, assenti dalla Nuova Zelanda e dalle Isole del Pacifico. Possono essere presente da sotto il livello del mare (vicino al Mar Morto) fino ai 3300 metri slm (Afghanistan)

Clogmia albipunctata

https://wwwnc.cdc.gov/travel/diseases/leishmaniasis

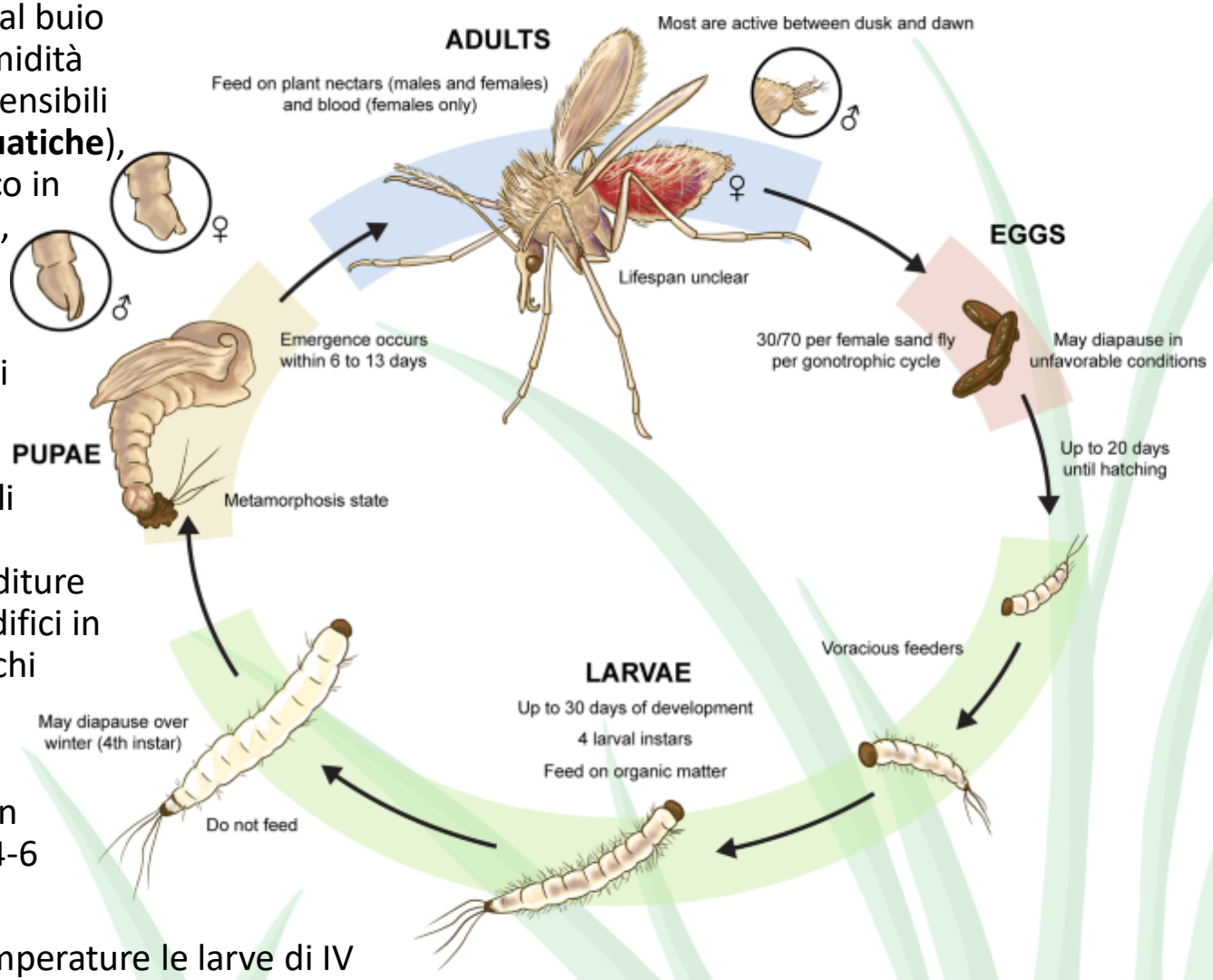
Ciclo vitale

- Larve terricole, si sviluppano al buio ed hanno bisogno di un'alta umidità relativa nell'ambiente (molto sensibili al disseccamento ma **non acquatiche**), si nutrono di materiale organico in decomposizione (foglie secche, spoglie di insetti, feci di animali ecc)

- E' difficile individuare i focolai larvali (problema per il contenimento di questi insetti). Esempi: tane di animali selvatici, ricoveri degli animali domestici, crepe e fenditure del terreno fino a 20-30 cm, edifici in pietra e muratura, cantine, buchi degli alberi, termitai, foglie in decomposizione, letamai…

- Attraversano 4 età larvali , con dimensioni crescenti da 0,5 a 4-6 mm ed uno stadio di pupa

- Con l'abbassamento della temperature le larve di IV età entrano in diapausa per superare l'inverno in questo stadio



Cecílio et al 2022

Tempi di sviluppo

- In Nord-Italia i flebotomi appaiano intorno a giugno fino a settembre-ottobre
- I loro tempi di sviluppo sono fortemente legati alle condizioni ambientali e sono indicativamente di 40-60 giorni (dall'uovo all'adulto), la vita dell'adulto è stimabile in 2-3 settimane. Schiusa uova, 6-17 giorni; 4 età larvali, 16-90 giorni di sviluppo (diapausa).

	Uova				
Specie	Mat.	Schiusura	LARVE(I-IV)	PUPE	Ciclo totale
Ph. perniciosus	9(7-12)	6(4-8)	18(16-20)	9(8-11)	42(42-45)
Ph. perfiliewi	8(5-12)	6(5-8)	22(18-26)	8(6-10)	44(41-48)
Ph. papatasi	8(7-9)	7(6-8)	28(21-36)	8(7-9)	51(43-58)

Fig. 3. *Phlebotomus* sp. (Psicodidi).

Allevamento

Sarebbe molto utile riuscire avere colonie di *Ph. perfiliewi* ma l'allevamento dei flebotomi presenta grosse difficoltà, soprattutto partendo da flebotomi selvatici

- *Ph. perfiliewi* fa diapausa invernale sotto forma di larva al quarto stadio
- Pasto di sangue artificiale
- Densità adeguate di larve e adulti

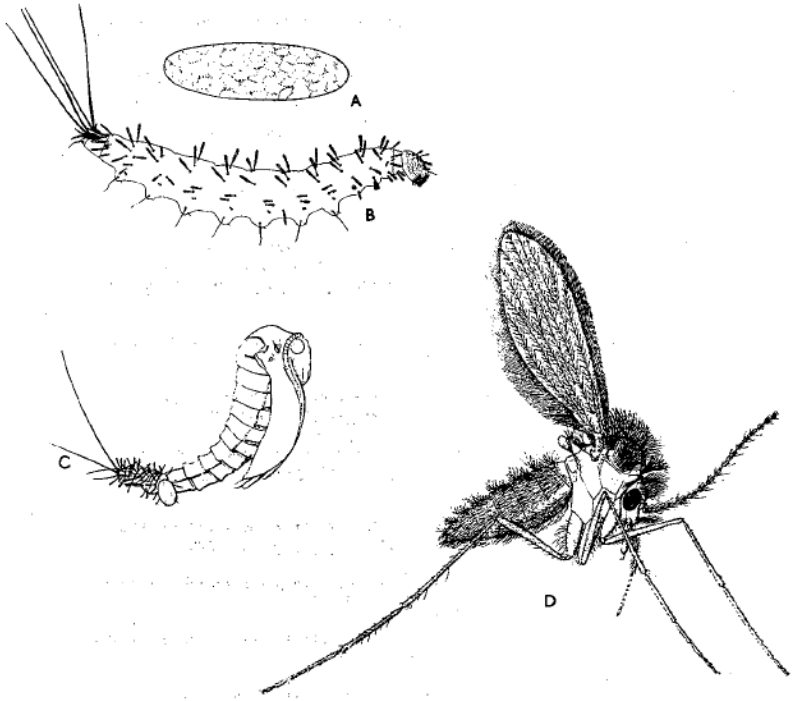


Fig. 1. Life cycle of Phlebotomus

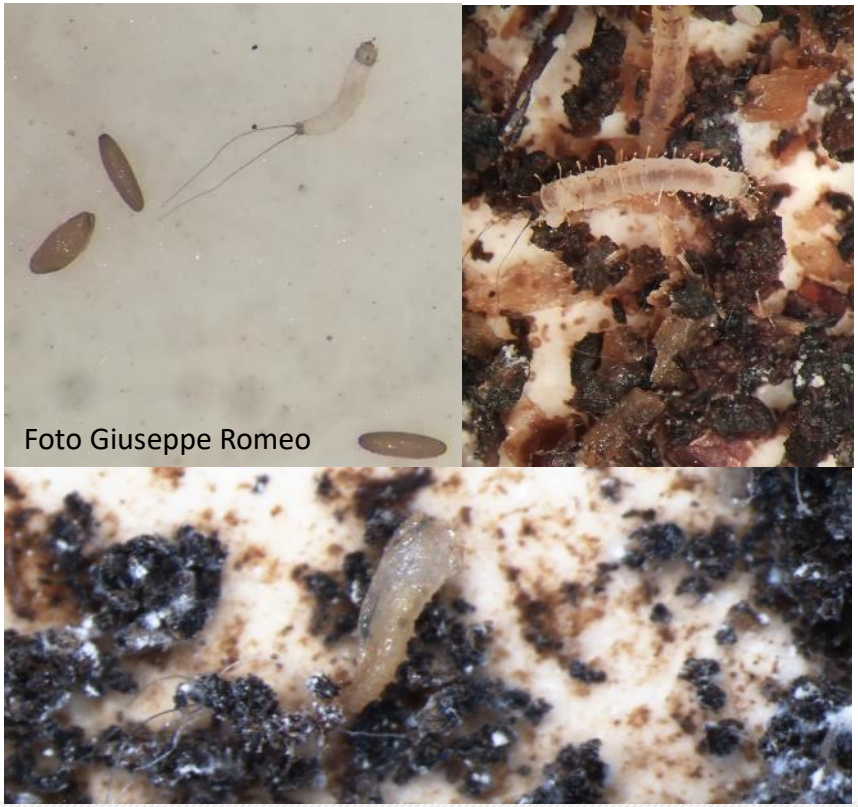
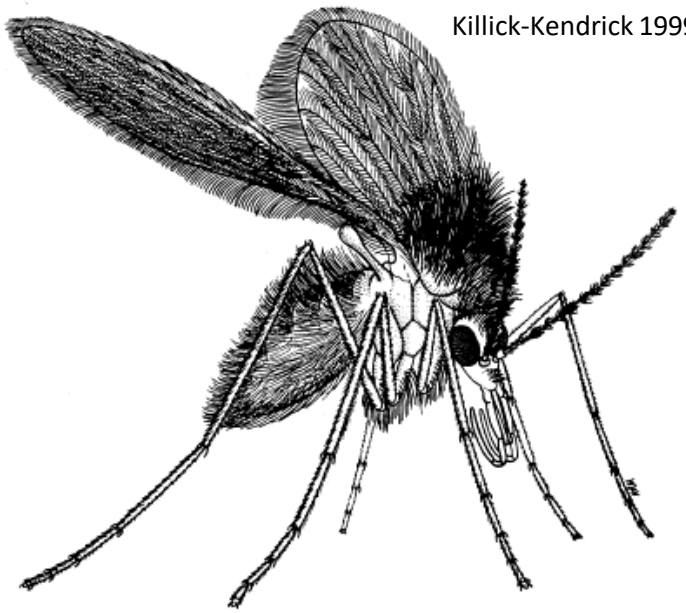


Foto Giuseppe Romeo

Adulti

- Si muovono molto silenziosamente, con corti voli successivi simili a saltelli
- Entrambi i sessi sono glicifagi, solo le femmine effettuano il pasto di sangue, per far maturare le uova
- Sono insetti notturni, durante il giorno si riposano in luoghi freschi, umidi, bui e riparati: fra la vegetazione, in anfratti e crepe naturali, all'interno di costruzioni in pietra o muratura case, latrine, cantine, stalle, grotte, fessure nei muri, rocce, vegetazione fitta, buchi degli alberi, tane di roditori e altri mammiferi, nidi di uccelli, termitai…
- Femmine prevalentemente esofagiche (pungono all'aperto) ed esofile (riposano all'aperto durante la maturazione delle uova); non possono essere controllate efficacemente mediante irrorazione domestica con insetticidi. Alcune specie endofile (che riposano al chiuso durante la maturazione delle uova) possono essere efficacemente controllate in questo modo
- Una volta effettuata la muta gli adulti rimangono nelle vicinanze del sito di emergenza, non si allontanano più di 100-200 m (massimi spostamento registrati 2 km), hanno scarsa attitudine al volo e sono molto sensibili alle condizioni ventose


Killick-Kendrick 1999

RESEARCH ARTICLE | BIOLOGICAL SCIENCES |

Plant-feeding phlebotomine sand flies, vectors of leishmaniasis, prefer *Cannabis sativa*

Ibrahim Abbasi, Artur Trancoso Lopo de Queiroz, Oscar David Kirstein, +12, and Alon Warburg Authors Info & Affiliations

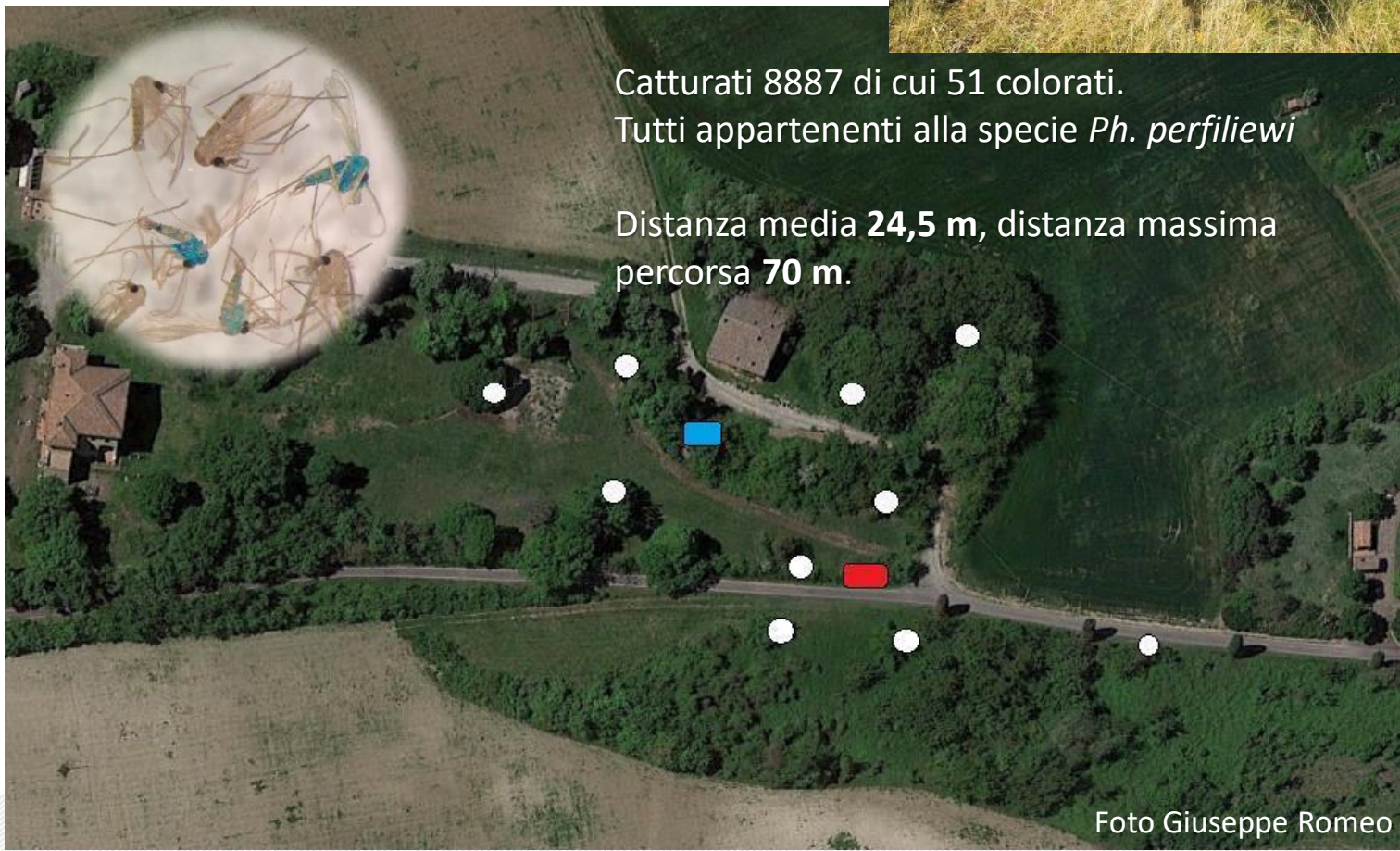
Edited by Nils Chr. Stenseth, University of Oslo, Oslo, Norway, and approved September 25, 2018 (received for review June 17, 2018)

October 29, 2018 | 115 (46) 11790-11795 | https://doi.org/10.1073/pnas.1810435115

Dispersione di *Ph. perfiliewi*

In date 02/08/19, 29/08/19, nel sito di Valsamoggia TOSV36A
Spruzzate 2 aree di 5 x 5 m con - 10 L soluzione di acqua - Zucchero 10% - 0,5% colorante alimentare blu (E133) o rosso (E122) seguendo il protocollo di Orshan et al (2016)

10 trappole a luce e CO_2 entro un raggio di 100 m



Catturati 8887 di cui 51 colorati.
Tutti appartenenti alla specie *Ph. perfiliewi*

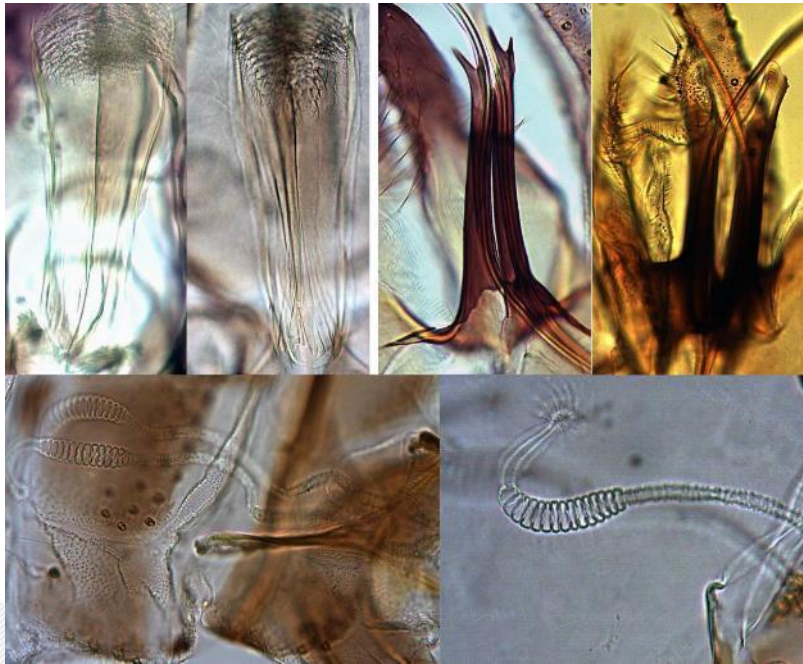
Distanza media **24,5 m**, distanza massima percorsa **70 m**.

Foto Giuseppe Romeo

Riproduzione

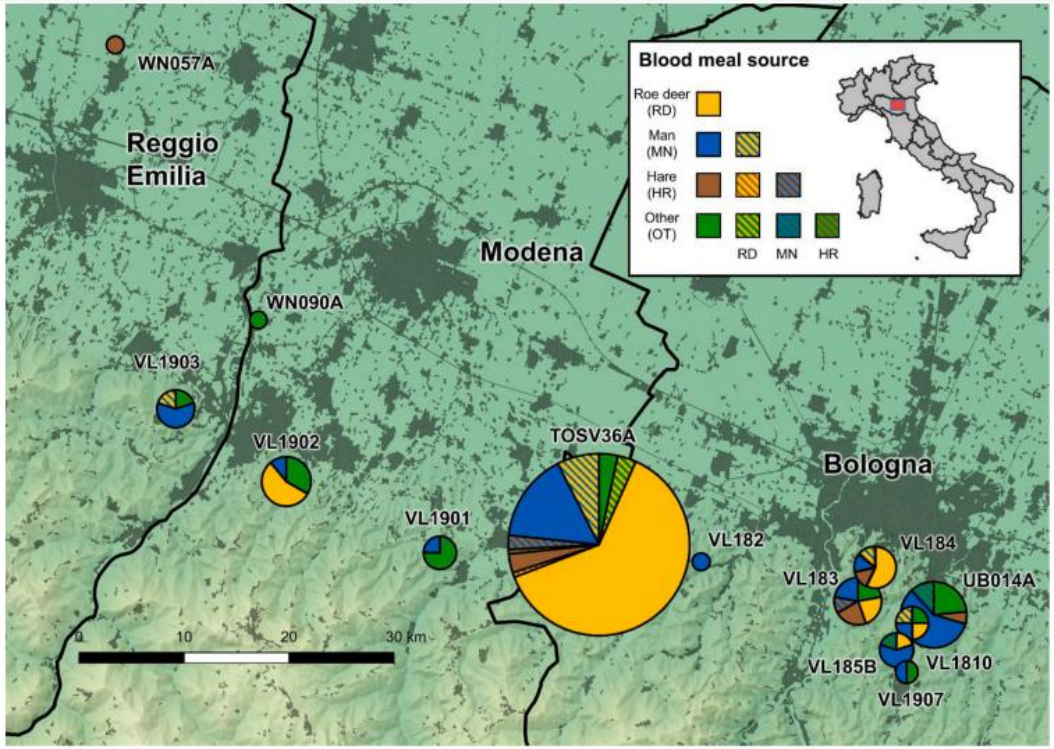
- Il maschio ha un particolare ipopigio utilizzata per la riproduzione (utile per identificazione)
- Alcune specie hanno feromoni di aggregazione sessuale prodotti dai maschi che attirano conspecifici sia maschi che femmine
- Per esempio la specie Sud Americana *Lutzomyia longipalpis* risponde a una varietà di diversi segnali chimici: cairomoni dell'odore dell'ospite, feromoni di ovideposizione e cairomoni ambientali e feromoni di aggregazione sessuale. I maschi formano aggregazioni crepuscolari e notturne (o lek), che persistono per molte ore, su o vicino ospiti vertebrati. Anche maschi sono attratti dagli odori dell'ospite. Le femmine visitano i lek per accoppiarsi e ottenere il pasto di sangue, sono attratte sia dai cairomoni dell'ospite che dal feromone sessuale prodotto dal maschio.

- Non è noto se questo tipo di corteggiamento esiste anche per specie del genere *Phleobotomus*
- Femmine gravide dei flebotomi sono attratte da feci di animali (es. coniglio, bovino) e dai feromoni delle uova e prodotti dagli stadi giovanili



Preferenze d'ospite

- Analisi dei pasti di sangue di 185 flebotomi campionati nel 2018-2019 hanno rilevato preferenza per capriolo (49,5%), uomo (29,2%), lepre (7,1%), vacca (4,7%), cinghiale (1,9%), altre specie sotto 1,4%
- 5 di questi flebotomi positivi per *Leishmania*, uno con Ct in Real Time PCR bassi e quindi alto numero di parassiti, aveva effettuato il pasto di sangue su capriolo



Sources of single-host and double-host blood meals in tested engorged females.

Host		# Sites	Single	Double	Other host	Times recorded	%
Roe deer	RD	7	88	17	MN (12), OT (3), HR (1), WB (1)	105	49.5
Man	MN	11	43	19	RD (12), HR (4), PO (1), WB (1), OT (1)	62	29.2
Hare	HR	5	9*	6	MN (4), RD (1), FX (1)	15	7.1
Cow		4	10			10	4.7
Wild boar	WB	4	1*	3	RD (1), MN (1), OT (1)	4	1.9
Horse		2	3			3	1.4
Donkey	DO	1	2	1	OT (1)	3	1.4
Porcupine	PO	1	1	1	MN (1)	2	0.9
Chicken		1	1			1	0.5
Fox	FX	1		1	HR (1)	1	0.5
Other	OT			6	RD (3), MN (1), WB (1), DO (1)	6	2.8
			158	54		212	

* One specimen is pH. *perniciosus*; OT = other not identified.

Calzolari et al 2022

Altre fonti attrattive

I flebotomi sono inoltre attratti da:

- anidride carbonica, maggiori concentrazioni sono maggiormente attraenti
- dalla luce

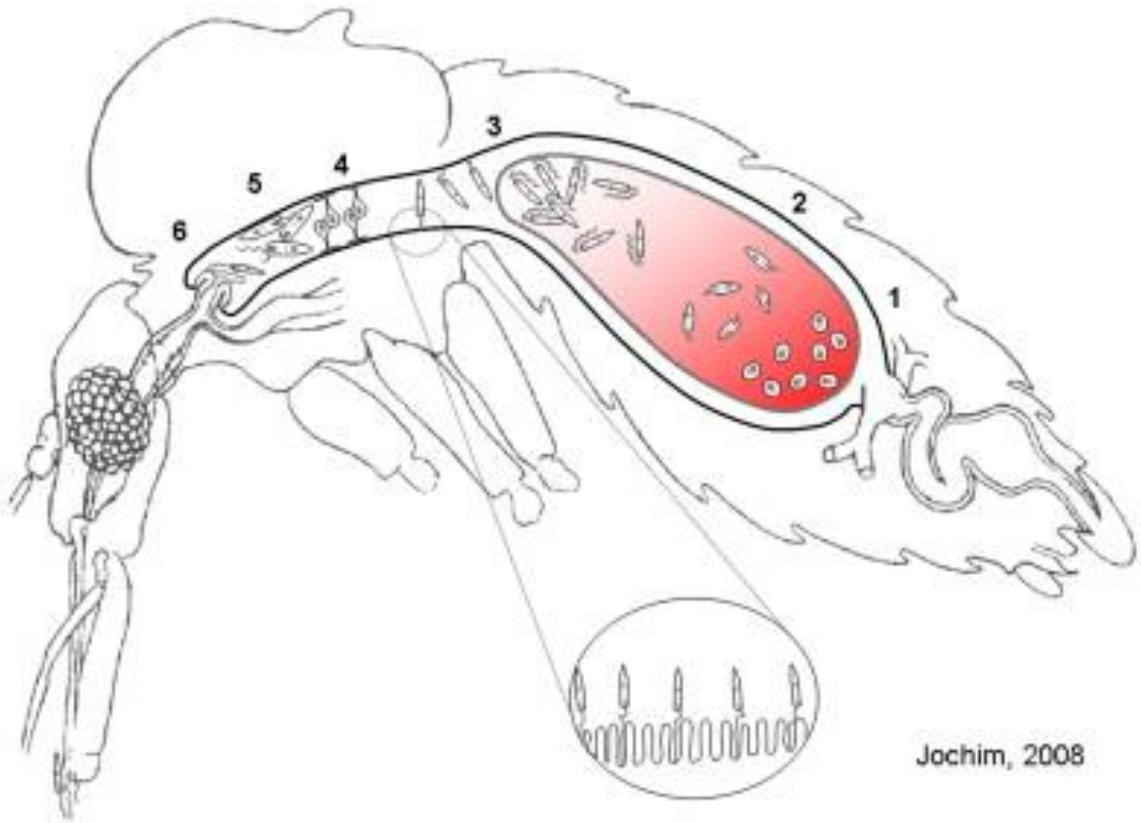
Questi stimoli attrattivi sono utilizzati per la loro cattura con trappole, oltre alle classiche Sticky traps, fogli 20x20 cm imbibiti di olio di ricino, che non sono attrattive

Alcune specie sono più fototropiche di alter, per esempio *Ph. perfiliewi* più abbondante *Ph. perniciosus* nelle trappole a luce (1013/28 in CO2 vs. 1937/7 in CDC, $\chi 2$ $p < 0.01$)

Black Light mod. Onderstepoort

Competenza vettoriale

- Caratteristica intrinseca del vettore in grado di trasmettere il patogeno
- Ciclo della Leishmania nel flebotomo complesso, si ritiene che l'attacco dei promastigoti alla parete dell'intestino sia essenziale affinché il flebotomo si infetti
- Si suppone che il danno arrecato dal parassita alla valvola stomodeale causi il rigurgito del parassita e faccia pungere più volte i pappataci infetti
- Quando una femmina punge, inietta la saliva nella pelle. Si ritiene che il suo ruolo immunosoppressivo (ma anche la presenza di batteri che aumentano la risposta infiammatoria) favorisca nell'instaurarsi della leishmania nel sito della puntura



Ciclo di vita dei parassiti della *Leishmania* all'interno del flebotomo. Forme promastigotiche: 1, amastigote; 2, promastigote prociclico; 3, nectomonade; 4, aptomonade; 5, leptomonade; 6, metaciclico. (da Oliveira et al 2009 adattato da Schlein 1993)

Proven or suspected vector species	Country*	Leishmania species	Most common	Rare
Ph. ariasi	Algeria, France*, Italy, Portugal*, Spain*, Morocco	*L. infantum*	VL	LCL, DCL†
Ph. galileus	Syria			
Ph. halepensis	Azerbaijan, Georgia, Syria			
Ph. kandelakii	Armenia, Azerbaijan, Georgia*, Iran			
Ph. langeroni	Egypt*, Spain, Tunisia*			
Ph. longicuspis	Algeria, Morocco, Tunisia			
Ph. major s.l.	Iran*			
Ph. neglectus	Albania*, Cyprus, Croatia, Greece*, Kosovo, Italy, Republic of Macedonia, Montenegro, Romania, Slovenia, Turkey, Ukraine			
Ph. perfiliewi	Albania, Algeria*, Croatia, Greece, Israel, Italy*, Malta, Morocco, Palestine, Republic of Macedonia, Romania, Tunisia, Turkey			
Ph. perniciosus	Algeria*, France*, Italy*, Malta*, Monaco, Morocco, Portugal*, Spain*, Tunisia			
Ph. syriacus	Greece, Israel, Lebanon, Palestine, Syria, Turkey			
Ph. tobbi	Albania*, Croatia, Cyprus*, Greece, Israel, Syria, Turkey*			
Ph. transcaucasicus	Azerbaijan, Iran*, Turkey			
Ph. arabicus	Israel*, Ethiopia			
Ph. chabaudi	Morocco, Tunisia			
Ph. sergenti	Afghanistan*, Algeria*, Azerbaijan, Ethiopia*, Greece, Iran*, Iraq, Israel*, Jordan, Libya, Morocco*, Pakistan, Palestine, Saudi Arabia*, Syria, Tunisia*, Turkey, Turkmenistan, Uzbekistan, Yemen			
Ph. papatasi	Afghanistan*, Algeria*, Azerbaijan, Egypt*, Iran*, Iraq, Israel*, Jordan*, Kazakhstan, Libya, Morocco*, Oman, Pakistan, Palestine, Saudi Arabia*, Sudan, Syria, Tunisia*, Turkmenistan*, Uzbekistan*, Yemen			

*Countries in which the sandfly species is a proven vector (for criteria, see text). Elsewhere, a sandfly species is suspected to be a vector on the basis of epidemiological evidence or because it is a proven vector elsewhere

†In cases of severe immunosuppression (e.g. HIV co-infection).

DCL, disseminated or diffuse cutaneous leishmaniasis (the two forms are treated together in this review); LCL, localized cutaneous leishmaniasis; LR, leishmaniasis recidivans; PKDL, post-kala-azar dermal leishmaniasis; VL, visceral leishmaniasis.

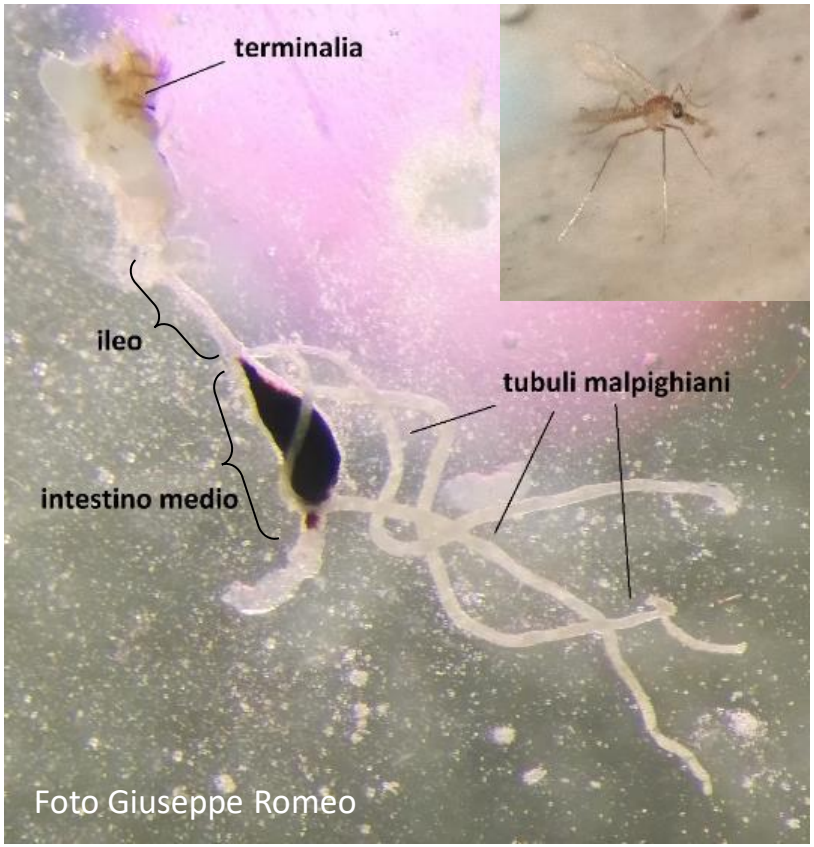
Maroli et al. 2013

Competenza vettoriale

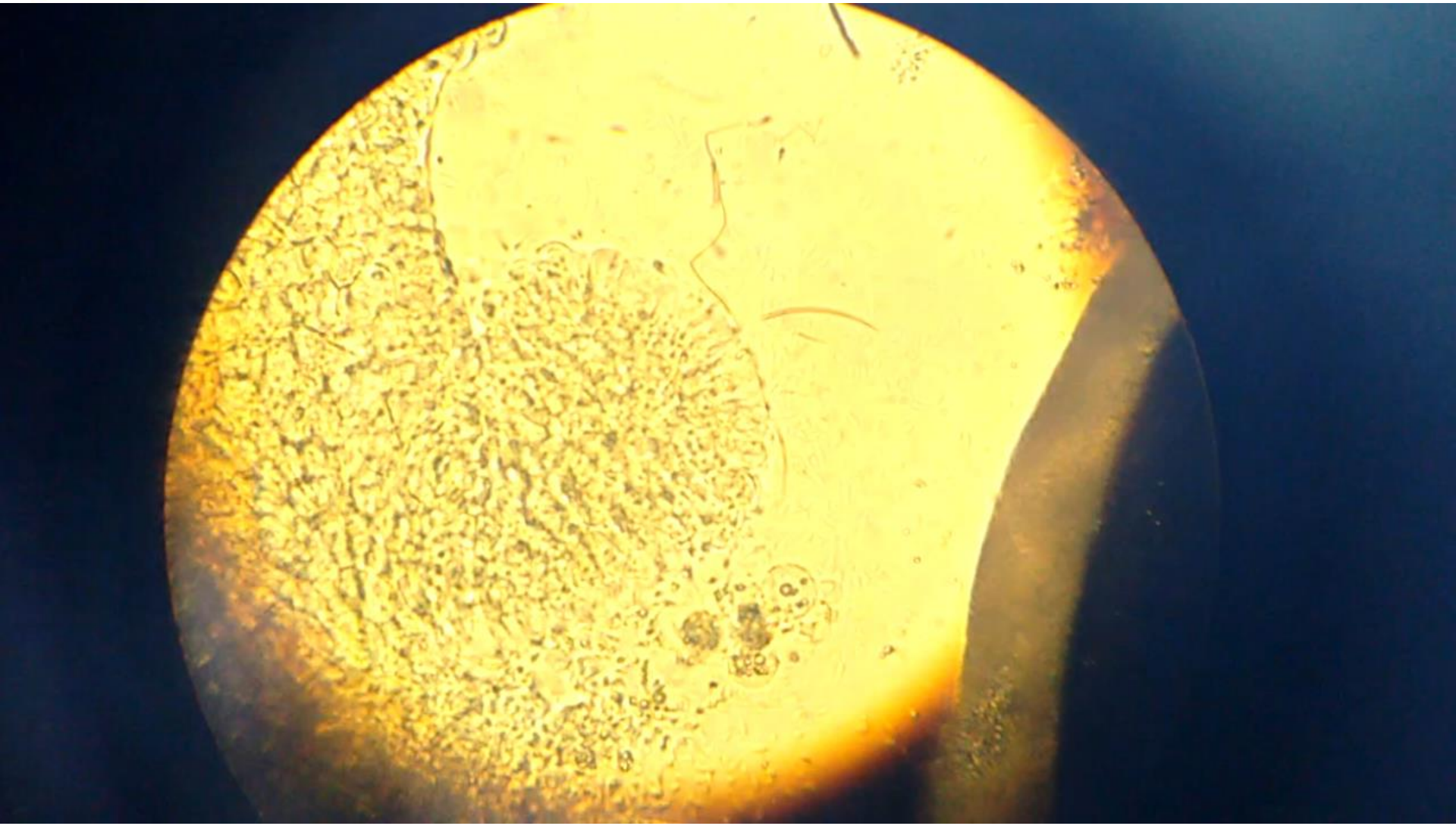
Subgenere	**Specie**	***L. infantum***
Phlebotomus	*Ph. papatasi*	vettore ipotizzato
Larroussius	*Ph. perniciosus*	vettore provato in Italia
	Ph. perfiliewi	vettore provato in Italia
	Ph. neglectus	vettore provato
	Ph. ariasi	vettore provato
Transphlebotomus	*Ph. mascittii*	?
Paraphlebotomus	*Ph. sergenti*	vettore provato

Arbovirus		
Phlebovirus		malattia nell'uomo
Febre da pappatacio (Sicilian virus)	*Phlebotomus* spp.	si
Febre da pappatacio (Napoli virus)	*Ph. papatasi , Ph. perfiliewi*	si
Toscana virus	*Ph. perniciosus, Ph. perfiliewi*	si
Arbia virus	*Ph. perniciosus, Ph. perfiliewi*	no
Corfou virus	*Ph. neglectus* (major)	no
Fermo virus	*Ph. perniciosus, Ph. perfiliewi*	no
Ponticelli virus	*Ph. perniciosus, Ph. perfiliewi*	no
Rabdoviridae		
Radi virus	*Ph. perfiliewi*	no
Yug Bogdanovac virus	*Ph. perfiliewi*	no

Isolamento leishmania da flebotomi

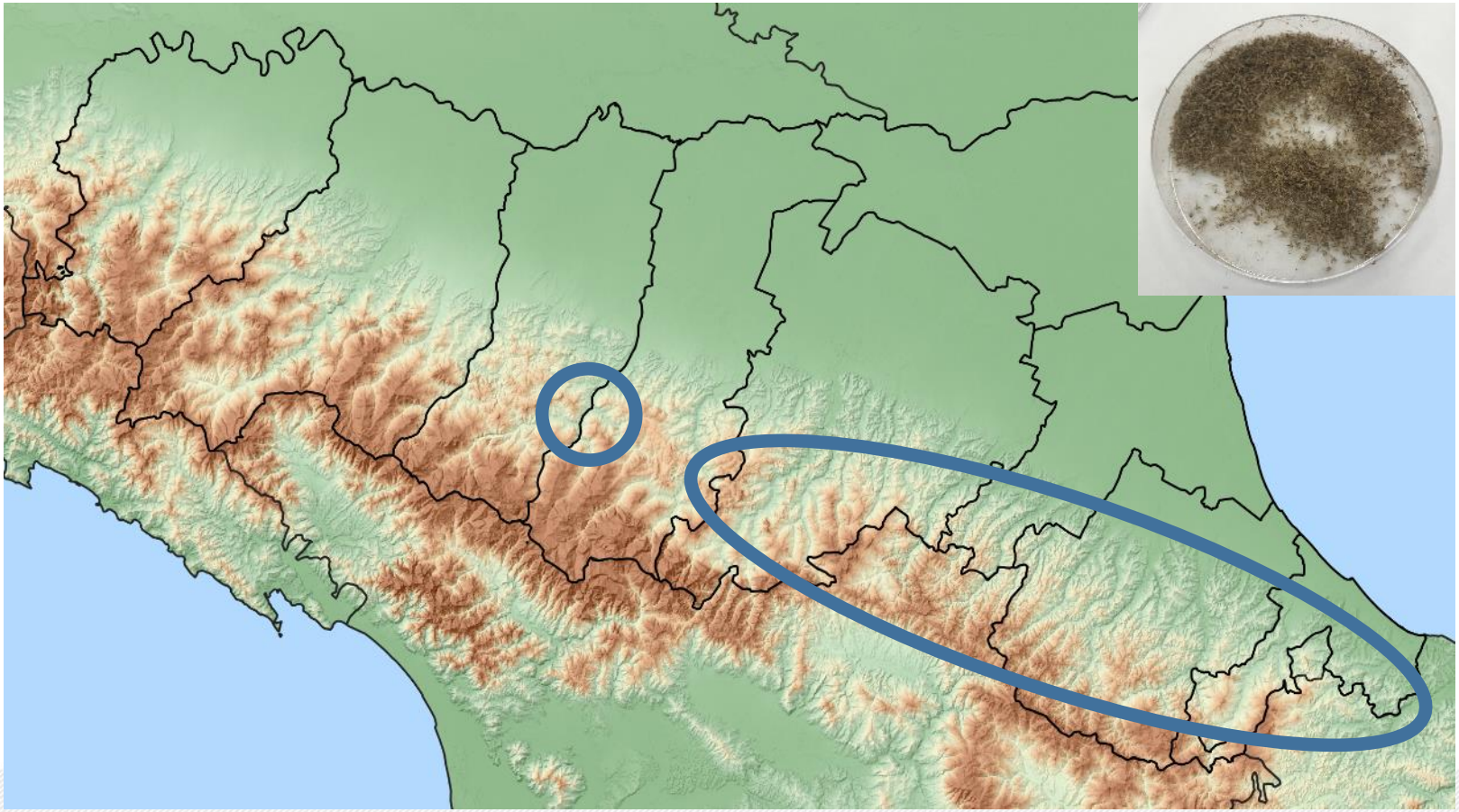


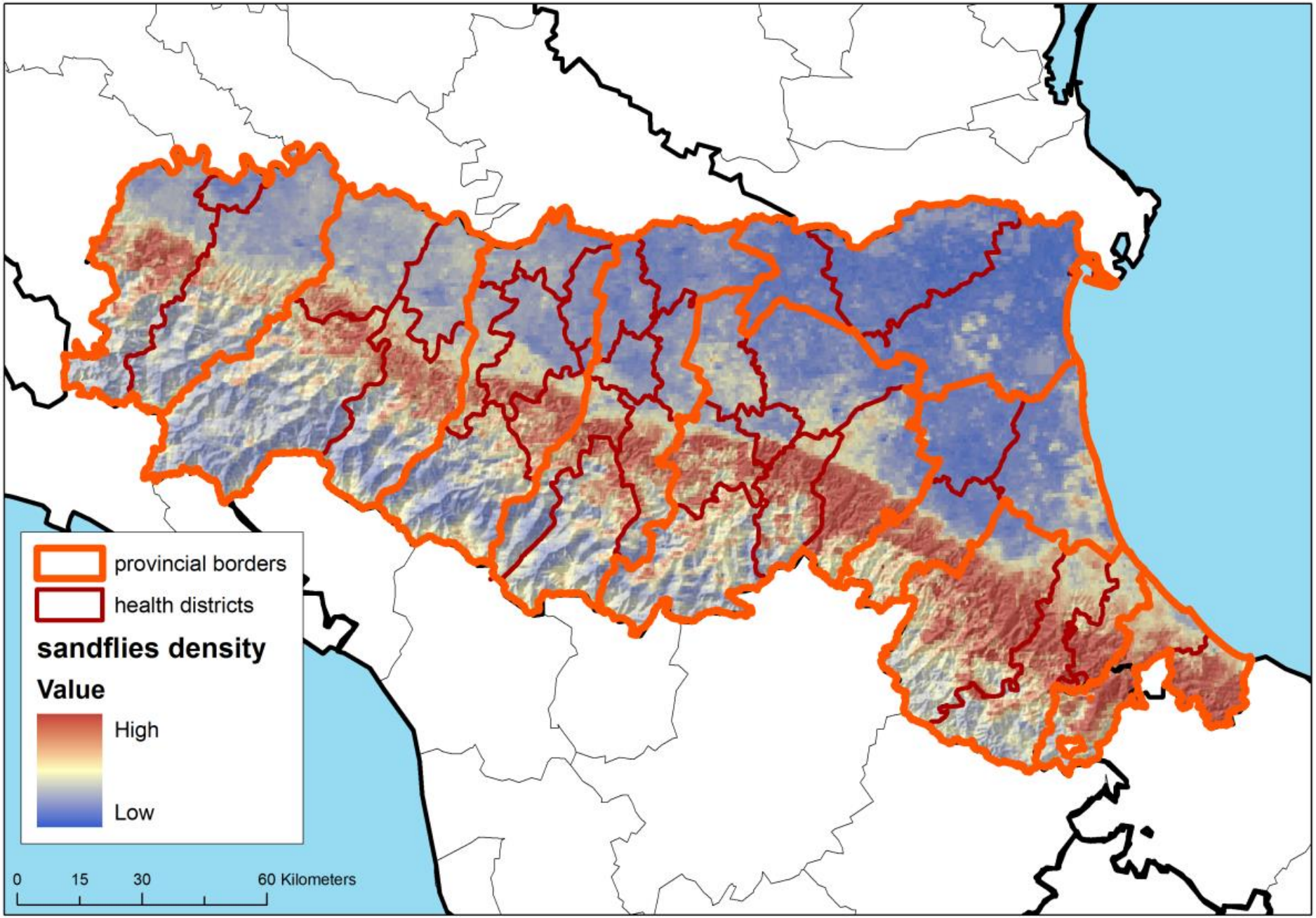
- Scelti due siti con maggiore numero di pool positivi come indice della circolazione di *Leishmania* (inizio settembre)
- Camera fredda, acqua e sapone -> soluzione fisiologica sterile
- Dissezione in stereomicroscopio
- Osservazione a 400X (ottico)
- Un solo riscontro positivo su 102 femmine dissezionate
- Messa in coltura per isolamento e tipizzazione ceppo, in terreno Tobie's modificato (EMTM) con l'aggiunta del 15% di sangue di coniglio defibrinato secondo l'MP codificato IZSLER



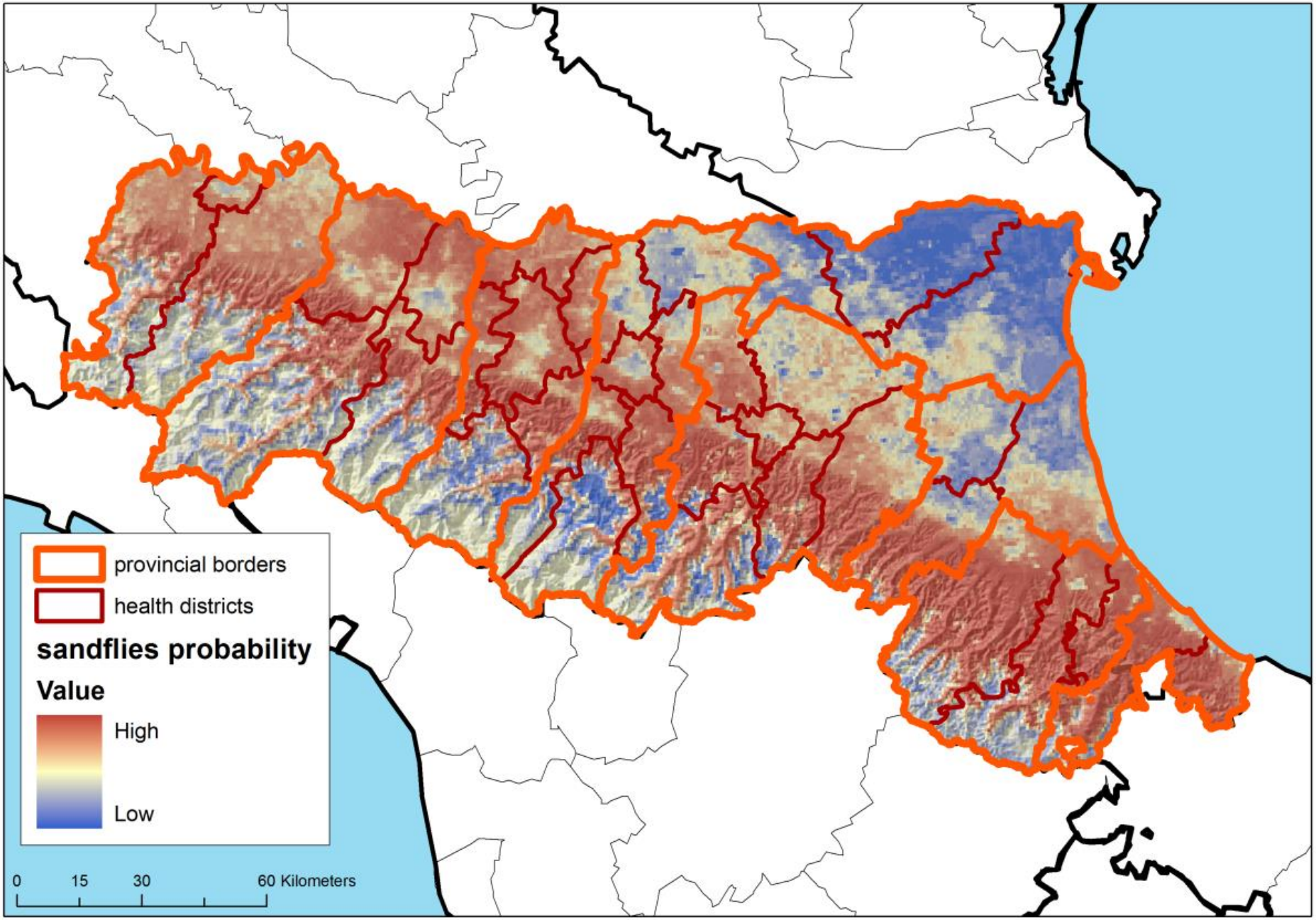
Flebotomi in Emilia-Romagna

- La specie più comune è *Phlebotomus perfiliewi*, seguita da *Phlebotomus perniciosus*. Densità maggiore nelle aree collinari ma, presenti anche in pianura.
- Presenti inoltre:
  - *Sergentomyia minuta*
  - Segnalazione di *Ph. mascittii* (Veronesi et al 2007)
  - *Phlebotomus papatasi* è invece spiccatamente endofilo ed ha preferenza per l'uomo





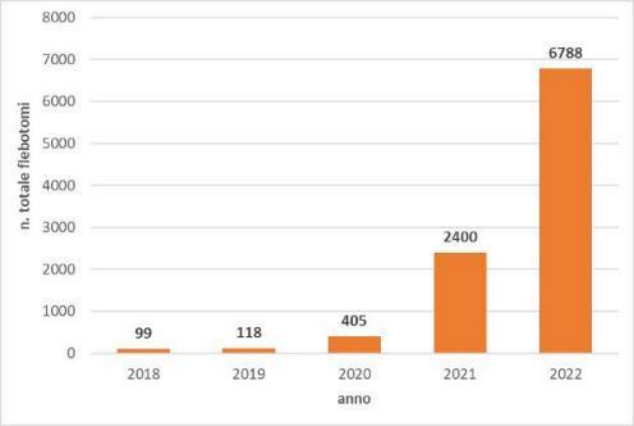
Preliminary distribution maps of sandflies in Emilia-Romagna region, Italy (2003-2013) E-SOVE 2014 (https://www.caa.it/wp content/uploads/2019/04/Calzolari_ESOVE_2014.pdf)

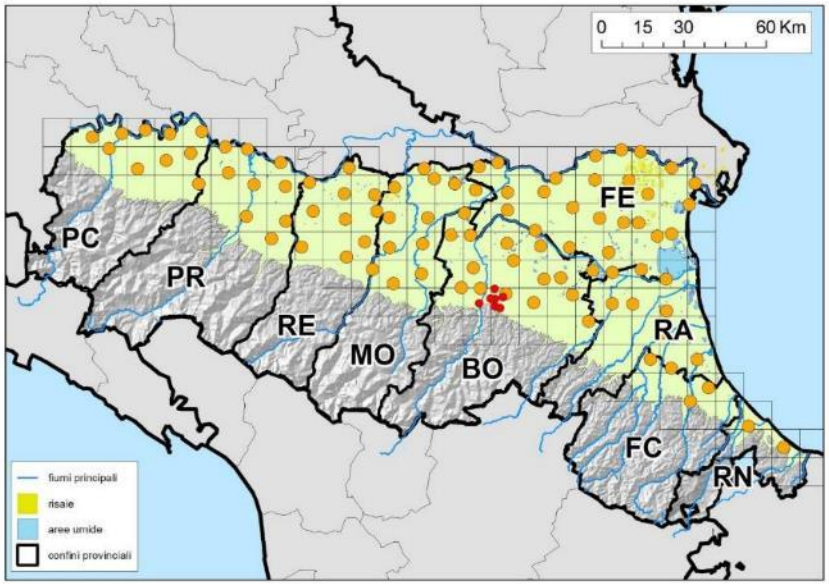


Preliminary distribution maps of sandflies in Emilia-Romagna region, Italy (2003-2013) E-SOVE 2014 (https://www.caa.it/wp content/uploads/2019/04/Calzolari_ESOVE_2014.pdf)

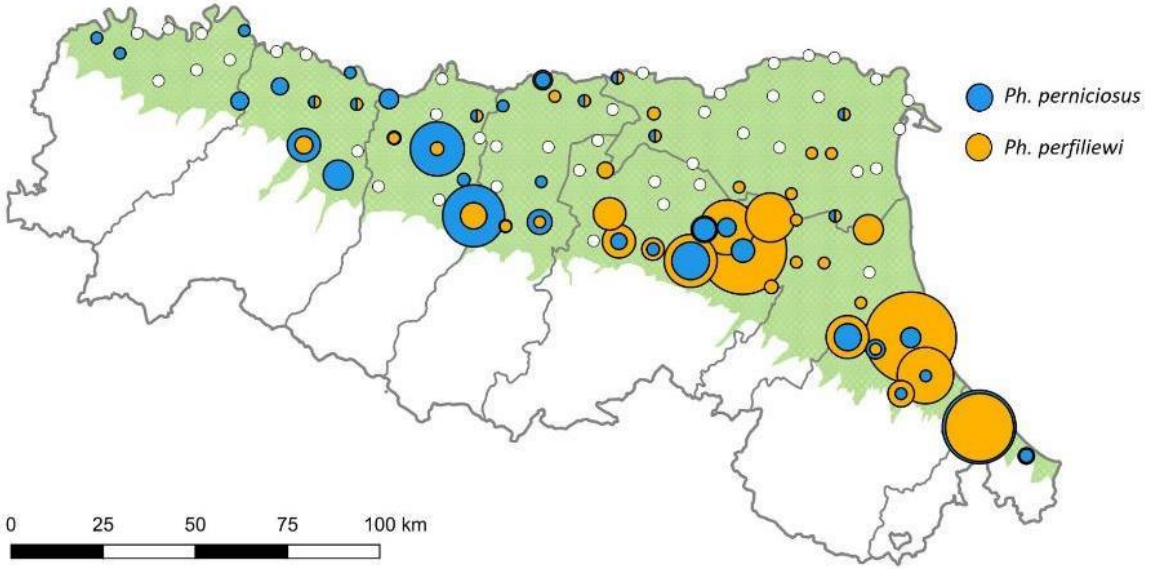
Aumento delle catture in pianura

I flebotomi campionati nell'ambito del piano WNV sono stati recuperati ed analizzati.
Nel 2021 e 2022 abbiamo assistito ad un aumento dei flebotomi in pianura e riscontrato dei pool positivi per *Leishmania*



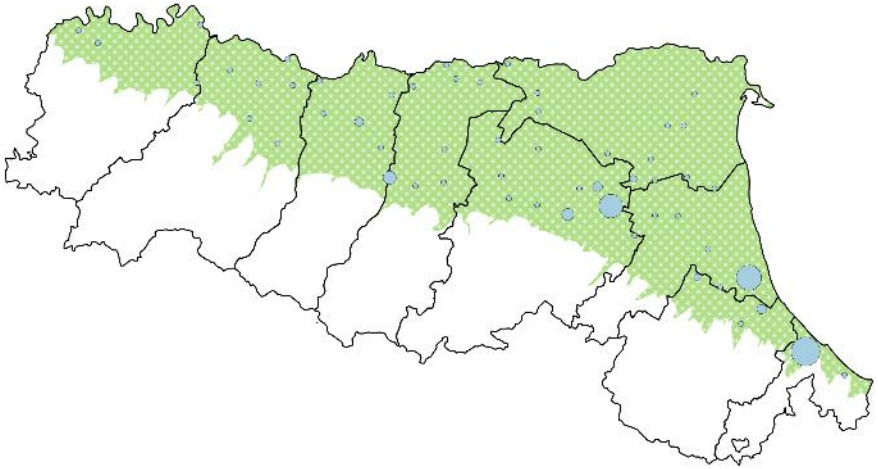


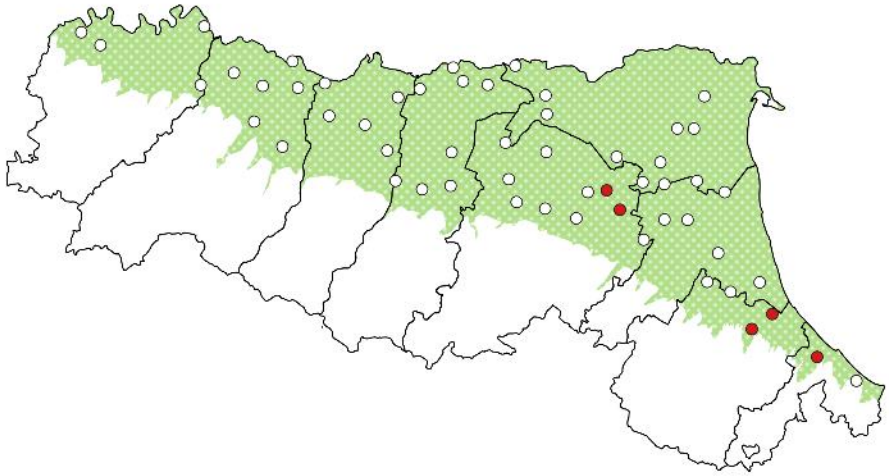
Dati 2021



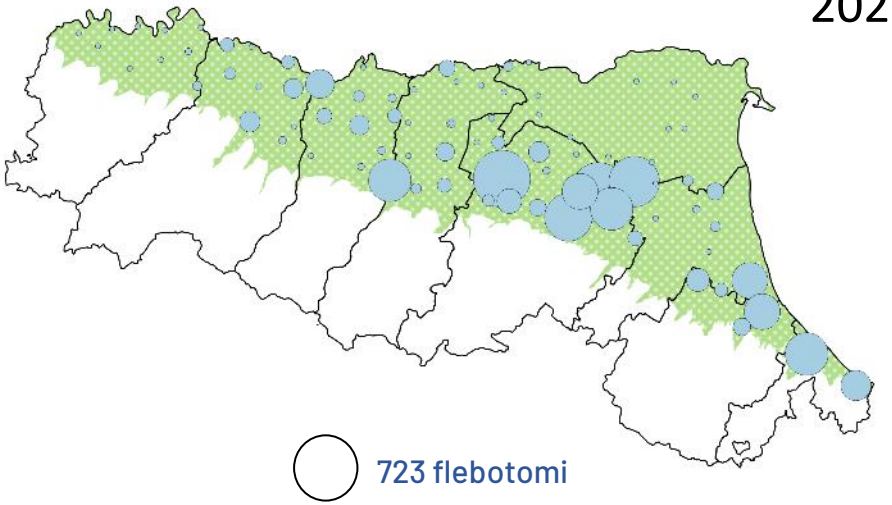
Dati pianura 2021 2022

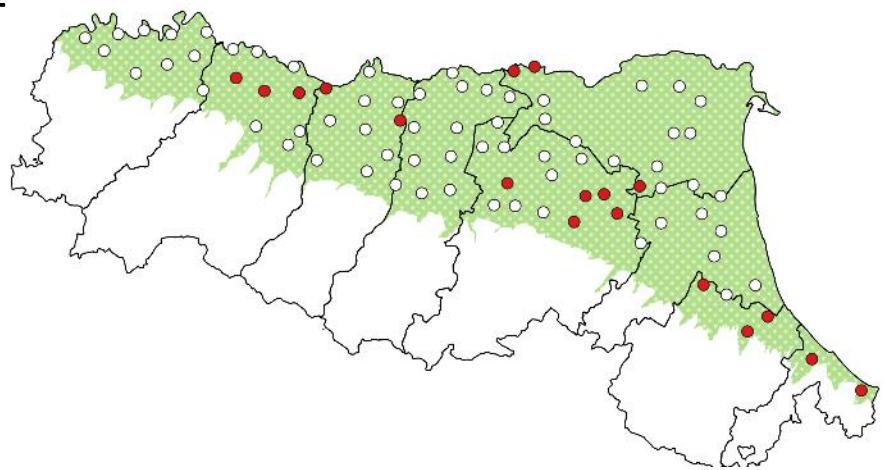
2021



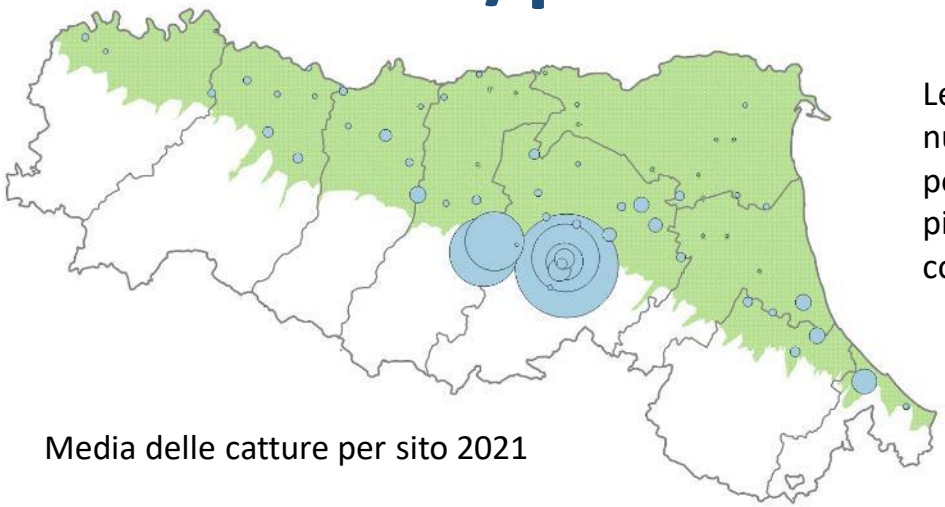


2022



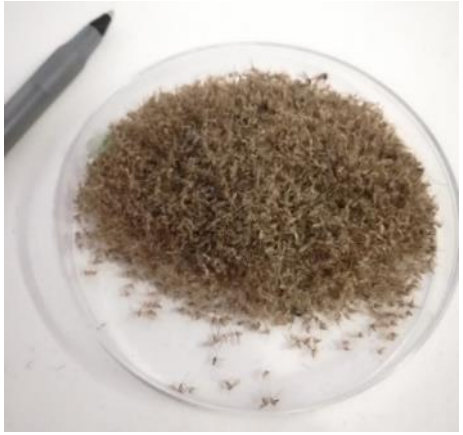


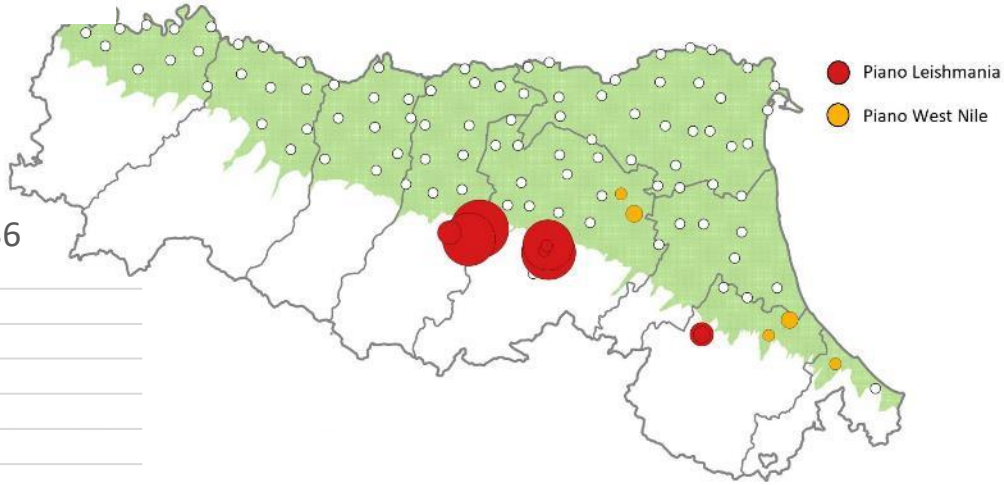
Collina/pianura



Media delle catture per sito 2021

Le abbondanze - e le numerosità dei pool positivi - restano moto più alte in ambiente collinare

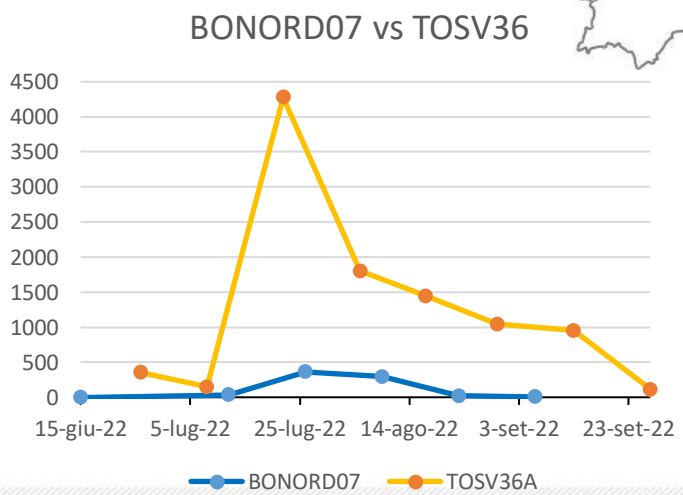




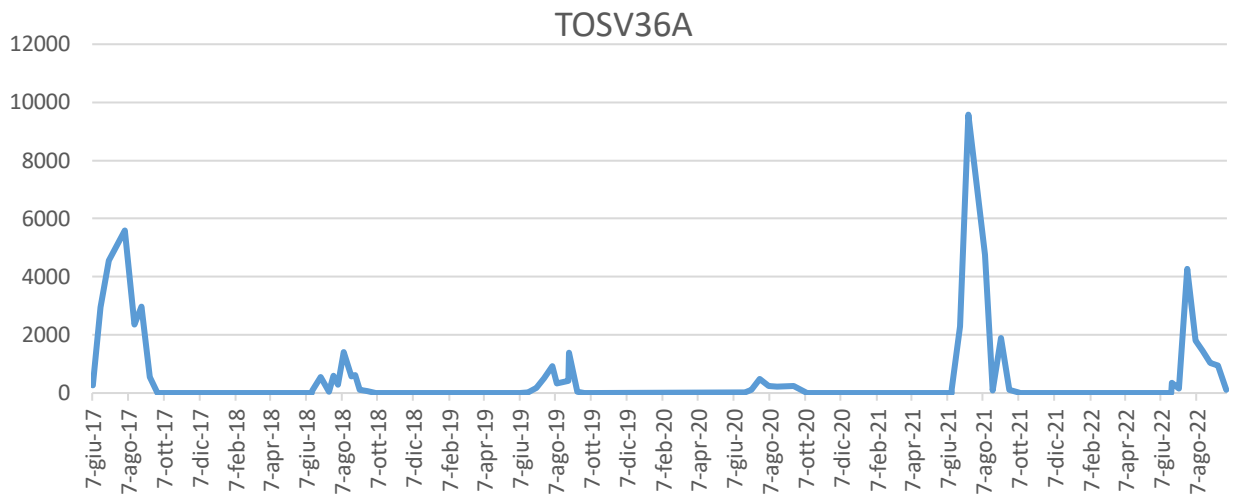
Numero pool positivi Leish 2021

Andamento catture in due siti

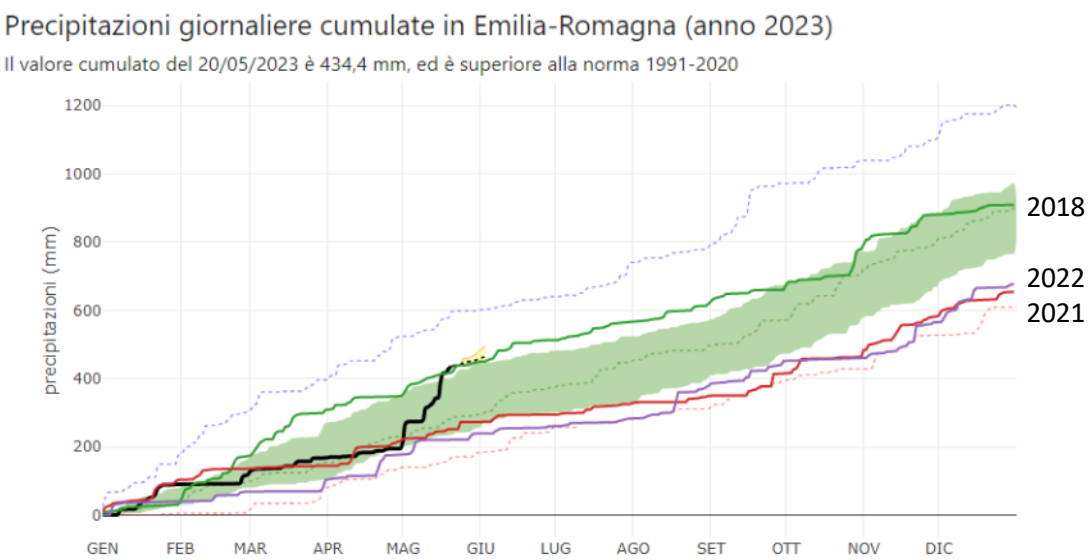
	BONORD07		TOSV36A	
2018	3	0	7696	5
2019	8	0	12559	22
2020	25	0	4279	6
2021	39	0	18579	24
2022	505	4	12224	13

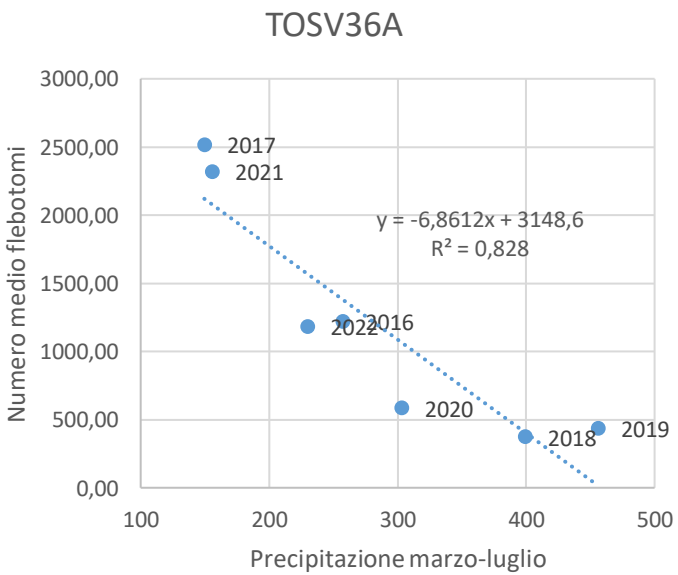


Analisi preliminari precipitazione



https://www.arpae.it/it/temi-ambientali/clima





Grazie per l’attenzione

mattia.calzolari@izsler.it