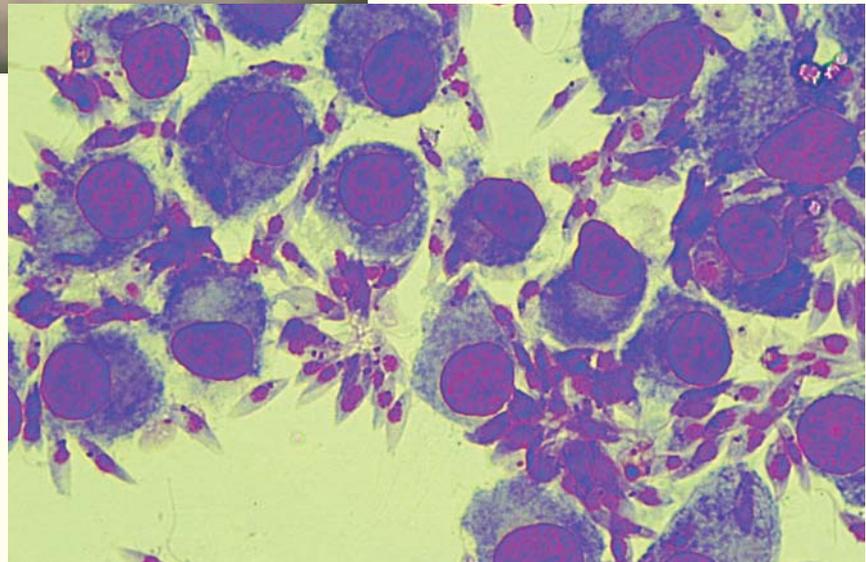




Tavole Rotonde sui maggiori problemi
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia
Sotto gli auspici del MIPAAF

XL.
**UN AGGIORNAMENTO SUI FLEBOTOMI:
BIOLOGIA, RUOLO VETTORIALE,
STRATEGIE DI CONTROLLO**



Estratto da:
ATTI DELLA
ACCADEMIA NAZIONALE
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA
Anno LXIX - 2021



Tavole Rotonde sui maggiori problemi
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia
Sotto gli auspici del MIPAAF

XL.

**UN AGGIORNAMENTO SUI FLEBOTOMI:
BIOLOGIA, RUOLO VETTORIALE,
STRATEGIE DI CONTROLLO**

Estratto da:
ATTI DELLA
ACCADEMIA NAZIONALE
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA
Anno LXIX - 2021

INDICE

Tavola Rotonda su:

UN AGGIORNAMENTO SUI FLEBOTOMI: BIOLOGIA, RUOLO VETTORIALE,
STRATEGIE DI CONTROLLO

CLAUDIO BANDI, SARA EPIS – <i>I flebotomi, insetti ematofagi da più di 100 milioni di anni</i>	Pag.	73
GIULIA MARIA CATTANEO, ILARIA VAROTTO BOCCAZZI, SARA EPIS – <i>I flebotomi: parole chiave</i>	»	75
ALICE MICHELUTTI, FABRIZIO MONTARSI – <i>Biologia, ecologia e importanza sanitaria delle specie di flebotomi presenti in Italia</i>	»	81
GIOVANNI SGROI, DOMENICO OTRANTO – <i>Il controllo della leishmaniosi canina: dal laboratorio al campo</i>	»	87

Pagina bianca

SEDUTA PUBBLICA, FIRENZE 26 FEBBRAIO 2021

Tavola Rotonda su:

UN AGGIORNAMENTO SUI FLEBOTOMI:
BIOLOGIA, RUOLO VETTORIALE, STRATEGIE DI CONTROLLO

Coordinatore:

CLAUDIO BANDI, Accademico

72 - Pagina bianca

I FLEBOTOMI, INSETTI EMATOFAGI DA PIÙ DI 100 MILIONI DI ANNI

CLAUDIO BANDI^a - SARA EPIS^a

^aDepartment of Biosciences and Pediatric Clinical Research Center “Romeo ed Enrica Invernizzi”, University of Milan, Milan, Italy. E-mail: claudio.band@unimi.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “Un aggiornamento sui flebotomi: biologia, ruolo vettoriale, strategie di controllo”. Seduta pubblica dell’Accademia, tenuta da remoto, 26 febbraio 2021

Sand flies, blood-sucking insects since 100 million years ago

Considering the findings of insects belonging to the Phlebotominae sub-family in fossil amber, we can expand our knowledge on the evolutionary history of these small bloodsucking dipterans, already present in the lower Cretaceous, as well as to obtain the first evidence about the ability of these insects to transmit trypanosomatid protozoa (*Paleoleishmania proterus*) during the blood meal, as early as 115-120 million years ago. Sand flies, literally cutters of veins, are typically silent during their flight, therefore not perceived when they approach the host to take the blood meal.

KEY WORDS: sand fly nomenclature; sand fly classification; sand fly evolution

FLEBOTOMO, PAPPATACIO, SAND FLY (ETIMOLOGIA)

Come descritto nel 1907 da Battista Grassi (GRASSI, 1907), “il pappataci venne descritto e figurato la prima volta dallo Scopoli nelle sue “*Deliciae florae e faunae Insubricae*”. Siamo nel 1786, e Scopoli raffigurava in maniera minuziosa il *Bibio papatasi*, evidentemente derivando il nome del piccolo dittero dal termine con cui veniva indicato nell’Italia settentrionale nel ’700: “Apud nos dicitur [Bibio]Papatasi, quod nomen triviale retineo”. Oggi si tende ad affermare che il nome comune di “pappatacio” deriverebbe dal suo volo silenzioso, quindi dal fatto che il pasto di sangue, a differenza da quanto avviene nel caso delle zanzare, non sarebbe preceduto da ronzii o altri rumori percepibili (“pappa e tace”). Circa il nome del genere *Phlebotomus*, proposto da Loew nel 1845, e del nome comune di flebotomo da esso derivato, l’etimologia rimanda alla professione dei flebotomi, ossia a coloro che praticavano il salasso nella medicina galenica (dal greco φλεβο e τόμον, ossia vena e taglio). Attualmente il termine flebotomo viene utilizzato per riferirsi non solo a ditteri appartenenti al genere *Phlebotomus*, ma più in generale per tutti gli insetti ascritti alla sottofamiglia Phlebotominae, nella famiglia Psychodidae. In lingua inglese, gli insetti appartenenti alle Phlebotominae vengono invece indicati come “sand flies” (letteralmente: sabbia mosche), termine che potrebbe derivare dal colore giallo pallido di alcune specie.

AMBRA FOSSILE

Il ritrovamento di esemplari di insetti conservati in ambra ha dato un contributo importante allo studio della storia evolutiva dei ditteri e, più nello specifico, dei flebotomi. I reperti fossili più antichi di esemplari della famiglia Psychodidae risalgono all’epoca del triassico superiore (circa 220 milioni di anni fa) (BLAGODEROV *et al.*, 2007) e i primi esemplari di specie ascrivibili alle Phlebotominae, conservati in ambra, vengono datati al Cretaceo inferiore (PERRICHOT *et al.*, 2007) (DELCLÒS *et al.*, 2007).

Sottolineiamo che lo studio degli insetti conservati in ambra può permettere di documentare sia la presenza di microrganismi al loro interno, sia l’eventuale propensione dell’insetto alla nutrizione ematofaga, attraverso l’osservazione di emazie (POINAR, 2008). Nello specifico, la prima documentazione fossile di protozoi affini al genere *Leishmania* è stata ottenuta attraverso osservazioni microscopiche su un esemplare di flebotomo fossilizzato in ambra cretacea birmana, risalente a 100-110 milioni di anni fa (POINAR e POINAR, 2004a). Questo flebotomo fossile, descritto come *Palaeomyia burmitis* (POINAR, 2004), presentava all’interno del suo apparato digerente, a partire dalla proboscide, cellule flagellate molto ben conservate, interpretabili come promastigoti di trypanosomatidi, a diversi stadi di sviluppo; il protozoo veniva quindi descritto come *Paleoleishmania proterus* (POINAR e POINAR, 2004b). L’osservazione

dei promastigoti all'interno della proboscide dell'insetto forniva una buona evidenza circa il ruolo di *P. burmitis* come vettore della paloleishmania. Inoltre, la presenza di eritrociti nucleati, morfologicamente affini a quelli dei rettili, nell'intestino medio dell'insetto dava una indicazione molto solida circa le abitudini ematofaghe di *P. burmitis*. Degna di nota è anche l'osservazione di corpuscoli intracellulari in alcuni eritrociti, identificabili, secondo gli autori, come amastigoti, con ogni probabilità della medesima paleoleishmania. Questo studio, pur condotto su un singolo esemplare, permette di datare l'origine dell'ematofagia dei flebotomi già al basso Cretaceo, così come di evidenziare la capacità di questi insetti di trasmettere protozoi tripanosomatidi, oltre 110 milioni di anni fa (POINAR e POINAR, 2004a).

RIASSUNTO

Grazie ai ritrovamenti in ambra fossile di esemplari di insetti ascrivibili alla famiglia delle Phlebotominae è stato possibile ampliare la nostra conoscenza sulla storia evolutiva di questi piccoli ditteri ematofagi, presenti già nel Cretaceo inferiore, nonché di ottenere le prime evidenze circa la capacità di questi insetti di trasmettere protozoi tripanosomatidi (*Paleoleishmania proterus*) durante il pasto di sangue, sin da 115-120 milioni di anni fa. I flebotomi, letteralmente tagliatori di vene, noti anche come pappataci, sono tipicamente silenziosi nel volo, quindi non percepiti all'atto del pasto di sangue.

BIBLIOGRAFIA

- BLAGODEROV V., GRIMALDI D. A., FRASER N. C., 2007 - *How time flies for flies: diverse diptera from the triassic of virginia and early radiation of the order.* - American Museum Novitates., 3572: 1–39.
- DELCLÒS X., ARILLO A., PEÑALVER E., BARRÓN E., SORIANO C., LÓPEZ DEL VALLE R., BERNÁRDEZ E., CORRAL C., ORTUÑO V. M., 2007 - *Fossiliferous amber deposits from the Cretaceous (albian) of Spain.* - Comptes Rendus Palevol., 6 (1–2): 135–49.
- GRASSI B., 1907- *Ricerche sui flebotomi.* Tipografia della R. Accademia dei Lincei, 46 pp.
- PERRICHOT V., NÉRAUDEAU D., NEL A., DE PLOËG G., 2007 - *A reassessment of the Cretaceous amber deposits from France and their palaeontological significance.* - African Invertebrates., 48 (1): 213–27.
- POINAR, G.O. Jr., 2004. *Palaeomyia burmitis gen. n., sp. n. (Phlebotomidae: Diptera), a new genus of Cretaceous sand flies with evidence of blood sucking habits.* - Proc. Entomol. Soc. Washington, 2106:598–605.
- POINAR G. 2008 - *Lutzomyia adiketis sp. n. (Diptera: Phlebotomidae), a vector of Paleoleishmania neotropicum sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Dominican amber.* - Parasites & Vectors., 10 (1): 22.
- POINAR G., POINAR R., 2004a. - *Evidence of vector-borne disease of early Cretaceous reptiles.* - Vector Borne and Zoonotic Diseases., 4 (4): 281–84.
- POINAR G., POINAR R., 2004b. - *Paleoleishmania proterus n. Gen., n. Sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous burmese amber.* - Protist., 155 (3): 305–10.

I FLEBOTOMI: PAROLE CHIAVE

GIULIA MARIA CATTANEO^a - ILARIA VAROTTO BOCCAZZI^a - SARA EPIS^a

^aDepartment of Biosciences and Pediatric Clinical Research Center "Romeo ed Enrica Invernizzi", University of Milan, Milan, Italy. E-mail: sara.epis@unimi.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Un aggiornamento sui flebotomi: biologia, ruolo vettoriale, strategie di controllo". Seduta pubblica dell'Accademia, tenuta da remoto, 26 febbraio 2021

Sand flies: key words

Sand flies are insects characterized by a crepuscular and nocturnal activity, with a peak of activity immediately after sunset when a drop in temperature and an increase in humidity are observed. They are slower than other Diptera, such as mosquitoes. They usually remain close to their breeding sites and the maximum observed space covered during their flight is about 2.5 km. During the day they are found in cool and humid areas such as houses, cracks in walls, caves, stables and dense vegetation. Both males and females of sand flies feed on plant saps containing sugar, while only the female takes the blood meal, which provides the nutrients necessary for the laying of the eggs. During the blood meal, females can transmit various pathogens including viruses (Phlebovirus, Vesiculovirus), bacteria such as *Bartonella bacilliformis* and protozoa of the genus *Leishmania*. Considering the vector role of these dipterans, it is important to monitor their distribution. In the northern hemisphere, they can be found up to above the 50th parallel in the south-east of Canada and in the north of France and Mongolia, in the southern hemisphere up to the 40th parallel. Their altitudinal distribution extends from below sea level, in the Dead Sea, up to 3300 m a.s.l. in Afghanistan (*Phlebotomus rupestris*). In the future, due to climate change and rising temperatures, it is expected that many species will be able to expand their range in northern territories and at higher altitudes. Also of great interest is the bacterial and fungal microbiota of sand flies. Symbiotic microorganisms influence different aspects of the biology of sand flies, with beneficial effects regarding nutrition, reproduction, tolerance to environmental stress and homeostasis of the immune system, also playing an important role in the defence against pathogens, also interfering with their transmission.

Key Words: sand flies; vectors; vector-borne diseases

ATTIVITÀ CREPUSCOLARE E NOTTURNA

I flebotomi sono insetti caratterizzati da un'attività crepuscolare e notturna. L'attività notturna sembra essere correlata alla variazione di luminosità e a diversi fattori abiotici, tra cui temperatura, umidità, pioggia e vento (SOUZA *et al.*, 2005). In molte specie è stato infatti osservato un picco di attività subito dopo il tramonto, caratterizzato da un abbassamento della temperatura ed un aumento dell'umidità; ciò fa pensare che questi fattori possano fungere da segnale per l'inizio della loro attività (SOUZA *et al.*, 2005). Si verifica anche una variazione stagionale dell'attività notturna dei flebotomi, con diversi picchi di attività e diversa intensità, correlati parzialmente alla variazione di temperatura e umidità durante le stagioni (GUERNAOUI *et al.*, 2006). Durante il giorno, invece, si rifugiano in luoghi freschi e umidi come abitazioni, tane di animali, stalle, pollai, cantine, foreste, fessure di muri e sotto le rocce (ALEXANDER, 2000).

VOLO E VENTO

I flebotomi sono particolarmente attratti dalla luce debole e sono caratterizzati da un volo silenzioso pro-

tabilmente dovuto alla peluria presente sulle ali e alla loro piccola dimensione. Risultano più lenti delle zanzare, con una velocità stimata di 0,6-1 m/s (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1984). La maggior distanza di volo registrata è di 2,3 km (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1984) anche se solitamente gli adulti si mantengono nelle vicinanze dei siti di sfarfallamento, percorrendo distanze di circa 300 m (MAROLI *et al.*, 2013). In uno studio del 2021 si è dimostrata la capacità dei flebotomi di volare senza pause, enfatizzando la capacità delle femmine di volare per distanze maggiori rispetto ai maschi, come dimostrato dalla maggior percentuale di femmine catturate con trappole utilizzate durante lo studio (TONELLI *et al.*, 2021). Si pensa inoltre che le femmine a digiuno di sangue possano percorrere distanze superiori rispetto ai maschi, durante la ricerca del cibo, raggiungendo distanze massime di circa 2 km (READY, 2013).

DISTRIBUZIONE A MACCHIA DI LEOPARDO

Essendo i flebotomi vettori di diversi patogeni, è importante monitorarne la distribuzione; da una variazione nella distribuzione di questi vettori può infatti conseguire la diffusione di patogeni in nuovi territori,

portando quindi alla diffusione di leishmaniosi, bartonellosi e infezioni da arbovirus (MEDLOCK *et al.*, 2014).

Sono presenti nelle zone calde di Asia, Africa, Australia, Sud Europa e America (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1984). Sono diffusi verso nord fino ad una latitudine di 50° N nel sud-ovest del Canada e nel nord di Francia e Mongolia e si ritrovano fino ad una latitudine di 40° S (MAROLI *et al.*, 2013). Sono però assenti in Nuova Zelanda e nelle isole del Pacifico (LANE, 1993). La loro distribuzione altitudinale si estende da sotto il livello del mare, nel Mar Morto (LANE, 1993), fino a 3300 m s.l.m. in Afghanistan (*P. rupestris*) (ARTEMIEV, 1980).

In Italia il limite massimo di altitudine è stato registrato in Sicilia a 1200 m s.l.m. (ROMI *et al.*, 2012).

Si ritiene che questi insetti non siano in grado di colonizzare aree geografiche distanti mediante trasporto passivo, mentre la loro dispersione può verificarsi in territori adiacenti a seguito di cambiamenti climatici. Studi focalizzati a predire, anche attraverso modelli matematici, la diffusione dei flebotomi risultano fondamentali per analizzare il rischio di trasmissione di patogeni trasmessi da questi vettori. Si ipotizza che il cambiamento climatico genererà in Europa centrale habitat sempre più adatti a supportare lo sviluppo dei flebotomi, con conseguente aumento del rischio di diffusione di malattie trasmesse da essi, come per esempio la leishmaniosi (FISCHER *et al.*, 2011). Infatti, il probabile aumento delle temperature in nord Europa, le piogge estive in aumento in Europa nord-ovest e in diminuzione in sud Europa potrebbero favorire mutamenti importanti negli areali di distribuzione di alcune specie tra cui *P. ariasi*, *P. mascittii*, *P. neglectus*, *P. perfiliewi* e *P. perniciosus*, con colonizzazione di territori più settentrionali e ad alta quota (MEDLOCK *et al.*, 2014).

PASTO DI SANGUE

Sia i maschi che le femmine di flebotomo si nutrono di zuccheri contenuti nella linfa delle piante. Al contrario, solo le femmine sono ematofaghe e si nutrono di sangue che fornisce i nutrienti necessari per la deposizione delle uova (KILLICK-KENDRICK, 1999). A differenza dei culicidi che inseriscono l'apparato pungitore direttamente all'interno di un vaso capillare, i flebotomi sono artropodi ematofagi definibili come "pool feeders"; le femmine utilizzano infatti una sezione dentellata dell'apparato pungitore per lacerare la cute dell'ospite e creare una piccola pozza di sangue dalla quale si nutrono (LANE, 1993).

È stato anche osservato che flebotomi infetti da *Leishmania* compiono numerosi tentativi prima di riuscire a nutrirsi, aumentando così la possibilità di

trasmettere il parassita (MOORE, 1993). La presenza di *Leishmania* sembra indurre questa variazione di comportamento aumentando il contatto con l'ospite vertebrato e, di conseguenza, l'efficienza di trasmissione durante il pasto di sangue. Inoltre, questo cambiamento nel comportamento del flebotomo avviene solamente nel momento in cui i promastigoti di *Leishmania* risultano infettivi per l'ospite vertebrato e quindi allo stadio adatto per la trasmissione (ROGERS & BATES, 2007).

VETTORI

I flebotomi sono vettori di diversi patogeni, tra cui virus, batteri e protozoi. I virus di maggior interesse trasmessi da flebotomi comprendono virus appartenenti al genere *Phlebovirus* (ordine Bunyvirales, famiglia Phenuiviridae), responsabili di diverse infezioni tra cui la meningite estiva (Toscana virus) e la febbre dei tre giorni o febbre dei pappataci (Napoli e Sicilia virus), delle quali non si conosce ancora l'incidenza di infezione (MORICONI *et al.*, 2017). Possono anche essere trasmessi virus del genere *Vesiculovirus* (famiglia Rhabdoviridae), agenti eziologici della stomatite vescicolare in America centrale (FRANCY *et al.*, 1988) e dell'encefalite da virus Chandipura in India (SUDEEP *et al.*, 2014).

I flebotomi sono anche vettori di *Bartonella bacilliformis* (famiglia Bartonellaceae), batterio agente eziologico della malattia di Carrion presente in Perù, Colombia ed Ecuador ad un'altitudine di 200-500 m s.l.m. (ANGKASEKWINAI *et al.*, 2014).

Un altro importante patogeno trasmesso è il protozoo appartenente al genere *Leishmania* (famiglia Trypanosomatidae). Nel bacino del mediterraneo sono presenti quattro specie e due ceppi ibridi patogeni per l'uomo, con un'incidenza annua stimata di 239.500-393.600 casi di leishmaniosi cutanea e 1.200-2.000 casi di leishmaniosi viscerale (MORICONI *et al.*, 2017).

Sono conosciute più di 20 specie di *Leishmania* patogene per l'uomo e oltre 90 specie di flebotomi in grado di trasmettere questi protozoi, stimando tra 700.000 e 1 milione di nuovi casi ogni anno, considerando leishmaniosi cutanea, muco-cutanea e viscerale (WHO, Leishmaniasis). Ricordiamo infine l'importanza della leishmaniosi canina, causata nel bacino del Mediterraneo da *Leishmania infantum* e trasmessa da diverse specie di flebotomo (*Phlebotomus ariasi*, *Phlebotomus balcanicus*, *Phlebotomus kandelakii*, *Phlebotomus langeroni*, *Phlebotomus neglectus*, *Phlebotomus perfiliewi*, *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus tobbi*) (MICHELUTTI, 2021). Fig. 1.

Durante il pasto di sangue il flebotomo trasmette una piccola quantità di saliva contenente componenti



Fig. 1 - Esemplici di *Phlebotomus perniciosus* mantenuti in insettario; al centro dell'immagine è possibile apprezzare una femmina di *P. perniciosus* dopo il pasto di sangue (Foto: Dott.sa Gioia Bongiorno).

farmacologicamente attive chiamate sialogenine con proprietà antiemostatiche, antinfiammatorie ed immunomodulatorie che facilitano l'ingestione di sangue da parte del flebotomo. Le leishmanie che vengono coinoculate con la saliva durante il pasto di sangue traggono beneficio dalla reazione immunitaria indotta dalla presenza della saliva; la saliva del flebotomo è infatti in grado di facilitare l'infezione da parte di *Leishmania*, potenziandone la capacità infettante. Al contrario, gli ospiti ripetutamente esposti a morsi di flebotomi non infetti da *Leishmania* o immunizzati da alcune proteine salivari risultano protetti dall'infezione. Pertanto, antigeni ed altre molecole ad azione immunomodulante contenuti nella saliva dei flebotomi vengono studiati e proposti per lo sviluppo di un vaccino contro la leishmaniosi (LESTINOVA *et al.*, 2017).

MICROBIOTA E MICOBIOTA

I microrganismi simbiotici di insetti vettori influenzano diversi aspetti della biologia di questi ultimi, offrendo benefici per quanto riguarda nutrizione, riproduzione, tolleranza a stress ambientali e omeostasi del sistema immunitario (WEISS & AKSOY, 2011; VAROTTO-BOCCAZZI *et al.*, 2020; EPIS *et al.*, 2020).

Il microbiota di un insetto vettore può anche influenzare la trasmissione di un patogeno. Infatti, uno studio

recente ha dimostrato che alterando la comunità microbica di flebotomi (*Phlebotomus duboscqi*) tramite l'utilizzo di antibiotici si osserva una riduzione della capacità vettoriale dell'insetto nella trasmissione di parassiti del genere *Leishmania*. I batteri intestinali sembrano risultare quindi necessari per un'efficiente trasmissione del protozoo, offrendo condizioni ottimali per la sopravvivenza e la differenziazione dei promastigoti metaciclici, le forme coinvolte nella fase iniziale di infezione del mammifero (LOURADOUR *et al.*, 2017).

Si sottolinea che le diverse tipologie di alimenti possono influenzare il microbiota presente nell'intestino medio in larve e adulti. Pertanto, gli insetti sono esposti nel corso del tempo a diverse comunità microbiche che contribuiranno alla formazione del microbiota. Le larve di flebotomi, per esempio, si nutrono di materiale organico in decomposizione, principalmente di origine vegetale, ma anche derivante da feci, ingerendo anche microrganismi del suolo, alcuni dei quali vengono successivamente rinvenuti nell'intestino degli adulti (PIRES *et al.*, 2017).

È stato osservato in adulti di *P. papatasi* che due giorni dopo il pasto di sangue è presente un picco di microrganismi presenti nell'intestino che successivamente diminuisce a seguito della digestione. Probabilmente il bolo ricco di proteine del sangue causa una rapida proliferazione dei batteri nell'intestino dei flebotomi e una volta completata la digestione (4-5 giorni dopo) una buona parte dei batteri viene eliminata insieme ai resti di sangue (VOLF *et al.*, 2002).

Bisogna considerare anche la presenza di un microbiota, o microbiota fungino, associato a diversi artropodi, in relazione al quale ancora le conoscenze sono limitate. Nonostante i funghi siano meno abbondanti nel microbiota intestinale rispetto ai procarioti, possono rappresentare una porzione importante della biomassa del microbiota, poiché possiedono un volume cellulare anche 100 volte maggiore rispetto a quello tipico dei batteri (GATESOUBE, 2007; MARTIN *et al.*, 2016).

La maggior parte dei lieviti è localizzata a livello del tratto digestivo, dove forniscono nutrienti, facilitano la digestione e proteggono l'insetto vettore da patogeni (MALASSIGNÉ *et al.*, 2021). Sono infatti in grado di interagire con le altre componenti del microbiota, compresi i patogeni, influenzando la capacità vettoriale dell'insetto. Per questo motivo potrebbe risultare importante per lo studio del controllo di malattie trasmesse dai flebotomi (MARTIN *et al.*, 2018).

La gran parte del microbiota viene acquisita dagli insetti a partire dalle fonti di nutrienti (come linfa, fiori e frutti) e a livello dei siti di sviluppo delle larve. L'ambiente e i nutrienti risultano infatti due fattori fondamentali che influenzano la comunità di lieviti associati agli insetti (MALASSIGNÉ *et al.*, 2021).

Un recente studio, per esempio, ha investigato la

comunità fungina intestinale del flebotomo *Phlebotomus perniciosus*, principale vettore della leishmaniosi viscerale e canina nel bacino del Mediterraneo; analizzando larve e adulti di questi flebotomi sono stati ritrovati in totale 14 generi di lievito, di cui quattro generi (*Candida*, *Engyodontium*, *Meyerozyma* e *Simplicillium*) presenti sia in larve che in adulti maschi e femmine. La specie predominante è risultata essere *Meyerozyma guilliermondii*, che potrebbe essere definito come “lievito generalista”, essendo stato rinvenuto in molte altre specie di artropodi. Questo lievito risulta un utile agente di controllo biologico, essendo in grado di competere con diversi patogeni (come virus e *Leishmania*) per habitat e nutrienti (MARTIN *et al.*, 2018).

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano la Dott.ssa Gioia Bongiorno per l'importante scambio di informazioni e per il materiale fotografico.

RIASSUNTO

I flebotomi sono insetti caratterizzati da un'attività crepuscolare e notturna, con un picco di attività subito dopo il tramonto quando si osserva un abbassamento della temperatura e un aumento di umidità. Sono meno veloci rispetto ad altri ditteri, ad esempio le zanzare. Solitamente rimangono in prossimità dei siti di sfarfallamento e il massimo spostamento osservato è di circa 2,5 km. Durante il giorno, invece, si rinvencono in luoghi freschi e umidi come case, fessure nei muri, grotte, stalle e vegetazione fitta. Sia i maschi che le femmine di flebotomo si nutrono di zuccheri contenuti nella linfa delle piante, mentre soltanto la femmina compie il pasto di sangue, che fornisce i nutrimenti necessari per la deposizione delle uova. Durante il pasto ematico le femmine possono trasmettere diversi patogeni tra cui virus (Phlebovirus, Vesiculovirus), batteri come *Bartonella bacilliformis* e protozoi del genere *Leishmania*. Considerando il ruolo vettoriale di questi ditteri, è importante monitorarne la loro distribuzione. Nell'emisfero boreale, si possono riscontrare fin sopra il 50° parallelo nel sud-est del Canada e nel nord di Francia e Mongolia, nell'emisfero australe fino al 40° parallelo. La loro distribuzione altitudinale si estende da sotto il livello del mare, nel Mar Morto, fino a 3300 m s.l.m. in Afghanistan (*Phlebotomus rupestris*). In futuro, a causa del cambiamento climatico e dell'aumento delle temperature, ci si aspetta che molte specie potranno espandere il loro areale in territori più settentrionali e a quote superiori. Di grande interesse è anche il microbiota, batterico e fungino,

dei flebotomi. I microorganismi simbiotici influenzano diversi aspetti della biologia dei flebotomi, con effetti benefici per quanto riguarda nutrizione, riproduzione, tolleranza a stress ambientali e omeostasi del sistema immunitario, svolgendo anche un ruolo importante nella difesa nei confronti dei patogeni e nella loro trasmissione.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER B., 2000 - *Sampling methods for phlebotomine sandflies*. - Medical and Veterinary Entomology, 14 (2): 109-22.
- ANGKASEKWINAI N., ATKINS E.H., JOHNSON R.N., GRIECO J.P., CHING W.M., CHAO C.C., 2014 - *Rapid and Sensitive detection of Bartonella bacilliformis in experimentally infected sand flies by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of the Pap31 gene*. - PLoS Neglected Tropical Diseases., 8 (12): e3342.
- ARTEMIEV M.M., 1980 - *A revision of sandflies of the subgenus Adlerius (Diptera, Phlebotominae, Phlebotomus)*. - Zoologicheskii Zhurnal., 59 (8): 1177-92.
- EPIS S., VAROTTO-BOCCAZZI I., CROTTI E., DAMIANI C., GIOVATI L., MANDRIOLI M., ET AL., 2020 - *Chimeric symbionts expressing a Wolbachia protein stimulate mosquito immunity and inhibit filarial parasite development*. - Commun Biol., 3 (1): 105.
- FISCHER D., MOELLER P., THOMAS S.M., NAUCKE T.J., BEIERKUHNLIN C., 2011 - *Combining climatic projections and dispersal ability: a method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change*. - PLoS Neglected Tropical Diseases., 5 (11): e1407.
- FRANCY D.B., MOORE C.G., SMITH G.C., JAKOB W.L., TAYLOR S.A., CALISHER C.H., 1988 - *Epizootic Vesicular Stomatitis in Colorado, 1982: isolation of virus from insects collected along the northern Colorado Rocky Mountain Front Range*. - Journal of Medical Entomology., 25 (5): 343-47.
- GATESOUE F.J., 2007 - *Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development*. - Aquaculture., 267 (1): 20-30.
- GUERNAOUI S., BOUSSAA S., PESSON B., BOUMEZZOUGH A., 2006 - *Nocturnal activity of Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis focus in Chichaoua, Morocco*. - Parasitology Research., 98 (3): 184-88.
- IBÁÑEZ-BERNAL S., KRAEMER M.S., STEBNER F., WAGNER R., 2014 - *A new fossil species of Phlebotominae sand fly from Miocene amber of Chiapas, Mexico (Diptera: Psychodidae)*. - Paläontologische Zeitschrift., 88 (2): 227-33.
- KILLICK-KENDRICK R., 1999 - *The biology and control of phlebotomine sand flies*. - Clinics in Dermatology., 17 (3): 279-89.
- KILLICK-KENDRICK R., RIOUX J.A., RATIFY M., GUY M.W., WILKES T.J., GUY F. M., DAVIDSON I., ET AL., 1984 - *Ecology of leishmaniasis in the south of France: 20. Dispersal of Phlebotomus ariasi Tonnoir, 1921 as a Factor in the Spread of Visceral Leishmaniasis in the Cévennes**. - Annales de Parasitologie Humaine et Comparée., 59 (6): 555-72.
- LANE R.P., 1993 - *Sandflies (Phlebotominae)*. In: Medical Insects and Arachnids, Lane R. P. & Crosskey R. W., Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 78-119.

- LESTINOVA T., ROHOUSOVA I., SIMA M., DE OLIVEIRA C.I., VOLF P., 2017 - *Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania*. PLoS Negl Trop Dis., 11(7):e0005600.
- WHO, *Leishmaniasis*. Consultato il 19 dicembre 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
- LOURADOUR I., MONTEIRO C.C., INBAR E., GHOSH K., MERKHOFFER R., LAWYER P., PAUN A., SECUNDINO N., ET AL., 2017 - *The midgut microbiota plays an essential role in sand fly vector competence for Leishmania major*. - Cellular microbiology., 19 (10): 10.1111/cmi.12755.
- MALASSIGNÉ S., MINARD G., VALLON L., MARTIN E., VALIENTE MORO C., LUIS P., 2021 - *Diversity and functions of yeast communities associated with insects*. - Microorganisms., 9 (8): 1552.
- MAROLI M., FELICIANGELI M.D., BICHAUD L., CHARREL R.N., GRADONI L., 2013 - *Phlebotomine Sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern*. - Medical and Veterinary Entomology., 27 (2): 123–47.
- MARTIN E., BONGIORNO G., GIOVATI L., MONTAGNA M., CROTTI E., DAMIANI C., GRADONI L., POLONELLI L., RICCI I., FAVIA G., EPIS S., 2016 - *Isolation of a Wickerhamomyces anomalus yeast strain from the sandfly Phlebotomus perniciosus, displaying the killer phenotype*. - Med Vet Entomol., 30 (1):101-106.
- MARTIN E., VAROTTO BOCCAZZI I., DE MARCO L., BONGIORNO G., MONTAGNA M., SACCHI L., MENSAH P., ET AL., 2018 - *The mycobiota of the sand fly Phlebotomus perniciosus: involvement of yeast symbionts in uric acid metabolism*. - Environmental Microbiology., 20 (3): 1064–77.
- MEDLOCK J.M., HANSFORD K.M., VAN BORTEL W., ZELLER H., ALTEN B., 2014 - *A summary of the evidence for the change in European distribution of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of public health importance*. - Journal of Vector Ecology., 39 (1): 72–77.
- MICHELUTTI A., TONIOLO F., BERTOLA M., GRILLINI M., SIMONATO G., RAVAGNAN S., MONTARSI F., 2021 - *Occurrence of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the northeastern plain of Italy*. - Parasit Vectors., 14 (1): 164.
- MOORE J., 1993 - *Parasites and the behavior of biting flies*. - The Journal of Parasitology., 79 (1): 1–16.
- MORICONI M., RUGNA G., CALZOLARI M., BELLINI R., ALBIERI A., ANGELINI P., CAGARELLI R., LANDINI M.P., CHARREL R.N., VARANI S., 2017 - *Phlebotomine sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and Phlebovirus infections*. - PLoS Neglected Tropical Diseases., 11 (8): e0005660.
- PIRES A. C.A. M., VILLEGAS L.E.M., CAMPOLINA T.B., ORFANO A.S., PIMENTA P.F.P., SECUNDINO N.F.C., 2017 - *Bacterial diversity of wild-caught Lutzomyia longipalpis (a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil) under distinct physiological conditions by metagenomics analysis*. - Parasites & Vectors., 10 (1): 627.
- READY P.D., 2013 - *Biology of Phlebotomine sand flies as vectors of disease agents* - Annual Review of Entomology., 58: 227–50.
- ROMI R., KHOURY C., BIANCHI R., SEVERINI F. (Eds.), 2012 - *Artropodi di interesse sanitario in Italia e in Europa*. Rapporti ISTISAN 12/41, Roma, pp 40-56.
- ROGERS M.E., BATES P.A., 2007 - *Leishmania manipulation of Sand fly feeding behavior results in enhanced transmission*. - PLoS Pathogens., 3 (6): e91.
- SOUZA N.A., ANDRADE-COELHO C.U.A., PEIXOTO A.A., RANGEL E.F., 2005 - *Nocturnal activity rhythms of Lutzomyia intermedia and Lutzomyia whitmani (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil*. - Journal of Medical Entomology., 42 (6): 7.
- SUDEEP A.B., BONDRE V.P., GURAV Y.K., GOKHALE M.D., SAPKAL G.N., MAVALE M.S., GEORGE R.P., MISHRA A.C., 2014 - *Isolation of Chandipura virus (Vesiculovirus: Rhabdoviridae) from Sergentomyia species of sandflies from Nagpur, Maharashtra, India*. - The Indian Journal of Medical Research., 139 (5): 769–72.
- TONELLI G.B., BINDER C., MARGONARI C., ANDRADE J.D., 2021 - *Sand fly behavior: much more than weak-flying*. - Memórias do Instituto Oswaldo Cruz., 116: e210230.
- VOLF P., KIEWEGOVÁ A., NEMEC A., 2002 - *Bacterial colonisation in the gut of Phlebotomus duboscqi (Diptera: Psychodidae): transtadial passage and the role of female diet*. - Folia Parasitologica., 49 (1): 73–77.
- WEISS B., AKSOY S., 2011 - *Microbiome influences on insect host vector competence*. - Trends in parasitology., 27 (11): 514–22.

80 - Pagina bianca

BIOLOGIA, ECOLOGIA E IMPORTANZA SANITARIA DELLE SPECIE DI FLEBOTOMI PRESENTI IN ITALIA

ALICE MICHELUTTI^a - FABRIZIO MONTARSI^a

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD). E-mail: fmontarsi@izsvenezie.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “Un aggiornamento sui flebotomi: biologia, ruolo vettoriale, strategie di controllo”. Seduta pubblica dell’Accademia, tenuta da remoto, 26 febbraio 2021

Italian sand flies species: biology, ecology and vector competence

Sand flies (Diptera: Psychodidae) are the vectors of leishmaniasis, parasitic diseases sustained by protozoa of the genus *Leishmania*. These diseases, which have a world-wide distribution, are in most cases zoonoses, affecting both animals and humans. The species capable of transmitting the parasite belong to the genera *Phlebotomus*, in the Old World and *Lutzomyia*, in the New World. In Italy, eight species have been reported: *Phlebotomus perniciosus*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. papatasi*, *P. mascittii* and *Sergentomyia minuta*. Of these, *P. perniciosus* and *P. perfiliewi* are the main vectors of *Leishmania*. *infantum*, while *P. papatasi*, generally refractory to *L. infantum*, is the main vector of *Leishmania major*. Monitoring the presence and abundance of sand flies is essential to update the risk maps of the distribution of these vectors and the spread of the diseases they transmit. In endemic areas, entomological surveillance can be aimed at searching for pathogens in insects and at defining the infection rate of the vector population. The traps used for monitoring sand flies are sticky traps, light traps, CDC light traps with or without the addition of carbon dioxide. The choice of traps to be used to monitor sand fly populations depends on the type of environment, the density of the vector and the objectives of the monitoring.

KEY WORDS: sand flies, vectors, *Phlebotomus*, vector surveillance.

CLASSIFICAZIONE TASSONOMICA E MORFOLOGIA

I flebotomi (o pappataci) appartengono alla Classe Diptera, famiglia Psychodidae. Sono vettori di patogeni di natura parassitaria, batterica e virale, in grado di provocare malattie nell’uomo e negli animali. L’importanza di questi insetti in ambito sanitario è legata al ruolo vettoriale che ricoprono nell’epidemiologia della leishmaniosi, una zoonosi parassitaria sostenuta dai protozoi del genere *Leishmania*. La malattia, diffusa globalmente, colpisce sia gli animali, che l’uomo (MAROLI *et al.*, 2010; DEPAQUIT *et al.*, 2010). Nell’uomo decorre in tre forme cliniche: cutanea (CL), viscerale (VL) e muco-cutanea (MCL), anche nota come malattia di kala-azar. Annualmente, la WHO stima 30 000 nuovi casi di VL e 1 milione di nuovi casi di CL (WHO, 2020)

Le oltre 800 specie di flebotomi, attualmente riconosciute a livello globale, sono classificate in cinque generi: *Phlebotomus* e *Sergentomyia* nel Vecchio Mondo, *Warileya*, *Lutzomyia* e *Brumptomyia* in America Centrale e Meridionale (LEWIS, 1982).

Il corpo, di dimensioni ridotte (2-3 mm), è di colore giallo-sabbia (colorazione dalla quale deriva il nome inglese “sand flies”), interamente coperto, insieme alle ali, da una fitta peluria. La testa forma con il torace un angolo di 45°, mentre il torace e l’addome sono tipicamente disposti a formare un angolo quasi retto (MAGRÌ *et al.*, 2005) (Fig. 1).



Fig. 1 – *Phlebotomus perniciosus* (foto F. Montarsi).

Per l’identificazione morfologica, l’entomologo si avvale delle chiavi dicotomiche basate sull’anatomia dell’ipofaringe (nella femmina) e degli organi genitali, l’ipopigio nel maschio e le spermateche nella femmina. La procedura necessaria affinché i caratteri identificativi siano messi in evidenza per l’osservazione al microscopio ottico, richiede passaggi successivi in soluzioni diverse per la chiarificazione dell’esoscheletro, in

particolare negli esemplari di sesso femminile (ROMI *et al.*, 2012).

A scopo identificativo sono state messe a punto le tecniche molecolari (PCR) e la tecnica di desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice (MALDI-TOF MS). Queste tecniche sono utili per l'identificazione degli esemplari danneggiati, quindi non identificabili dal punto di vista morfologico.

CICLO BIOLOGICO ED ECOLOGIA

La femmina compie il pasto di sangue necessario per completare la maturazione delle uova. Dopo un periodo di tempo variabile da 5 a 8 giorni, necessario per la digestione del pasto, depone da 30 a 60 uova, su terreni molto umidi, riparati dalla luce e ricchi di materiale organico. Le uova di forma allungata, con estremità arrotondate, misurano 0,3-0,4 mm di lunghezza. Il ciclo di sviluppo si svolge con una metamorfosi completa (olometabolia): la fase imaginale è preceduta dallo stadio embrionale di uovo, quattro stadi larvali e uno pupale. Il ciclo si completa in 30-60 giorni, in funzione della temperatura ambientale e del terreno e dell'abbondanza di materiale organico (KILLICK-KENDRICK, 1999; MUNSTERMANN, 2019).

Gli adulti vivono dalle 2 alle 6 settimane. Sono attivi dal crepuscolo all'alba, mentre durante il giorno si riparano in luoghi umidi e freschi, come cantine, stalle, ricoveri per animali, barbacani, grotte, o tane di animali selvatici (FELICIANGELI, 2004).

I flebotomi non sono dei buoni volatori: il loro volo "a saltelli" limita gli spostamenti dai siti di riposo o dai focolai larvali, dai quali non si allontanano più di 200-300 m (ALEXANDER, 2000). I flebotomi si nutrono di sostanze zuccherine di origine vegetale, come la linfa delle piante o le secrezioni degli afidi. Le femmine compiono i pasti di sangue per la maturazione delle uova, pungendo un'ampia varietà di ospiti vertebrati, incluso l'uomo (FELICIANGELI, 2004). In condizioni sfavorevoli, ovvero in assenza di ospiti, sono stati descritti fenomeni di autogenia (EL KAMMAH, 1972). Le femmine della maggior parte delle specie sono esofaghe (attaccano l'ospite all'esterno) ed esofile (digeriscono il pasto di sangue e completano il processo di maturazione delle uova all'esterno).

I flebotomi sono attivi dalla tarda primavera (maggio-giugno) ad inizio autunno (settembre-ottobre), mentre durante la stagione fredda le larve di quarto stadio si affossano nel terreno, riducendo il metabolismo e il movimento. La diapausa invernale può avvenire anche allo stadio di uovo, nei climi temperati.

L'andamento stagionale dei vettori differisce tra le regioni del nord Italia, a clima freddo-temperato, dove si registra un picco di densità del vettore, o due picchi confluenti (generalmente alla fine del mese di luglio)

e le regioni del sud, con clima mediterraneo, dove si registrano due o tre picchi nel corso della stagione (ALTEN *et al.*, 2016).

I flebotomi prediligono le aree collinari con altitudini comprese tra i 200 e gli 800 m. Tuttavia, negli ultimi decenni, studiosi appartenenti a diversi gruppi di ricerca nazionali ed internazionali, hanno osservato un'estensione dell'areale di distribuzione di questi vettori, segnalando la loro presenza in aree tradizionalmente considerate non idonee al loro sviluppo. Sono stati osservati in siti a latitudini ed altitudini maggiori (SEMENZA & SUK, 2018), oltre che in aree pianeggianti, spesso in prossimità dei centri urbani (BALDELLI *et al.*, 2011; MICHELUCCI *et al.*, 2021; DANTAS-TORRES *et al.*, 2014). Le motivazioni portate a spiegazione di queste osservazioni riguardano l'aumento di temperatura e umidità, legato ai cambiamenti climatici e ambientali, oltre alla capacità di questi insetti di adattarsi a nuovi tipi di ambiente (DANTAS-TORRES *et al.*, 2014; BARRIOS *et al.*, 2019).

METODI DI CAMPIONAMENTO E MODELLI PREDITTIVI

Il monitoraggio dei flebotomi è fondamentale per sapere quali specie sono presenti in un territorio e con quale densità. Conoscere la presenza e l'abbondanza dei flebotomi permette di stabilire il rischio di trasmissione di malattie come la leishmaniosi e alcune arbovirosi. Nei casi in cui la malattia sia endemica nell'area di studio, o si sia verificato un focolaio epidemico, gli insetti catturati possono essere analizzati per la ricerca dei patogeni e definire il tasso di infezione nel vettore.

Il monitoraggio si esegue catturando gli insetti adulti, mediante trappole o aspiratori, mentre la raccolta degli stadi pre-imaginale è raramente utilizzata per la sorveglianza entomologica, data la difficoltà a reperire i siti di sviluppo larvale.

Le trappole comunemente utilizzate per la cattura dei flebotomi sono le sticky trap, le light trap, le le CDC light trap con o senza l'aggiunta di anidride carbonica. La scelta delle trappole da utilizzare per monitorare la popolazione di flebotomi è condizionata dal tipo di ambiente, dalla densità del vettore e dagli obiettivi del monitoraggio.

Le sticky trap sono costituite da fogli di carta bianca (20×20 cm) imbevuti di olio di ricino. L'olio conferisce proprietà adesive ai fogli di carta, permettendo la cattura di insetti di piccole dimensioni, intercettando il loro volo. Sono posizionate in prossimità dei siti di riposo dei flebotomi, ad esempio all'ingresso di ricoveri per animali, nelle crepe dei muri e dei muretti a secco, per un periodo minimo di una notte, fino ad una settimana.

Il metodo è semplice, economico e applicabile su

larga scala. Fornisce informazioni di tipo quantitativo, dal momento che il numero complessivo di flebotomi catturati può essere rapportato alla superficie totale dei fogli utilizzati (generalmente il numero di flebotomi catturati è espresso per m²). Non esercitando un'azione attrattiva, i fogli adesivi catturano solo i flebotomi che accidentalmente ne vengono a contatto, possibilità tanto minore quanto più bassa è la densità della popolazione del vettore, oltre che condizionata dalla scelta del sito più adeguato. Un altro aspetto svantaggioso nell'utilizzo di questa trappola è il danneggiamento ad opera di agenti atmosferici, in particolare pioggia e vento.

Le light traps, chiamate anche CDC light trap, sono costituite da una piccola luce, con funzione attrattiva e una ventola, collegate ad una fonte di energia elettrica (batteria o presa elettrica). La ventola spinge gli insetti all'interno di un sacchetto di tessuto, dove sono raccolti. La trappola è posizionata in prossimità dei siti di riposo o dei possibili focolai larvali, come la sticky trap, ma dal momento che attrae i flebotomi nel raggio di 5 m, la scelta del sito di posizionamento è meno determinante ai fini della cattura degli esemplari. La trappola è lasciata in attività dal tramonto all'alba, quando i flebotomi sono attivi. L'azione attrattiva potrebbe favorire la cattura delle specie fototropiche, alterando la composizione delle specie di flebotomi presenti nell'area di studio, a differenza della sticky trap, che cattura indistintamente insetti di piccole dimensioni. Il costo della trappola rende questo metodo di cattura economicamente più dispendioso di quello precedentemente descritto.

La CDC-CO₂ trap è simile alla CDC light trap, ma l'attrattivo luminoso è sostituito da un contenitore per il ghiaccio secco, ovvero anidride carbonica allo stato solido, alla temperatura di - 80 °C circa, che a contatto con l'aria sublima (il processo di sublimazione sarà tanto più veloce quanto maggiore è la differenza di temperatura tra quella del ghiaccio secco e quella ambientale). L'anidride carbonica attira molti insetti ematofagi, in particolare femmine, con un raggio d'azione più ampio della CDC light trap, risentendo in

maniera minore dell'influenza del sito di posizionamento della trappola. Come la CDC light trap gli svantaggi sono il costo della trappola, la necessità dell'energia elettrica per il funzionamento della ventola, a cui si aggiunge la difficoltà a rifornirsi di ghiaccio secco e la complessità della sua gestione.

La CDC-CO₂ light trap unisce l'azione attrattiva della luce a quella dell'anidride carbonica, rappresentando il sistema preferenziale per il monitoraggio di questi vettori. La CDC-CO₂ light trap è spesso utilizzata in associazione alle sticky trap o alle catture per aspirazione, in modo da ottenere informazioni complementari relativamente alle specie presenti e alla loro densità. L'aspirazione dei flebotomi è eseguita mediante aspiratori manuali o elettrici nei siti di riposo. Alcuni dei siti preferenziali per la cattura per aspirazione sono i ricoveri per gli animali domestici o i muretti a secco. Come la sticky trap non esercita un'azione attrattiva e cattura indistintamente molte specie di insetti. Questo metodo coinvolge direttamente l'operatore, che può valutare immediatamente la presenza di flebotomi e la loro densità nel sito di campionamento (Fig. 2).

Diversi gruppi di ricerca hanno definito alcune delle principali caratteristiche climatiche e ambientali che influenzano la presenza e l'abbondanza dei flebotomi. Ne sono un esempio la temperatura ambientale e del suolo (in particolare in inverno, quando temperature del suolo molto basse provocano la morte degli stadi larvali diapausanti), l'umidità, le precipitazioni, l'altitudine, la copertura vegetale (definita dall'indice *Normalized Difference Vegetation Index*, NDVI), la destinazione d'uso del terreno e la presenza di animali domestici allevati con metodi tradizionali.

Questi fattori sono utilizzati per elaborare modelli predittivi della distribuzione dei flebotomi. I modelli forniscono indicazioni utili per indirizzare i campionamenti, che possono confermarne la validità o evidenziare la necessità di modificare o integrare le informazioni sulla base delle quali il modello è stato sviluppato. Forniscono, inoltre, mappe di rischio della diffusione delle malattie trasmesse dai flebotomi, a



Fig. 2 – Trappole usate per la cattura dei flebotomi: a. sticky traps; b. CDC light trap; c. CDC-CO₂ trap; d. aspirazione.

partire dai parametri geografici, climatici e ambientali dell'area di studio, indipendentemente dai campionamenti condotti in quell'area.

I modelli sono costantemente affinati, introducendo un numero elevato di informazioni, al fine di ottenere un'elaborazione dei dati coerente con la distribuzione reale di questi vettori.

IMPORTANZA SANITARIA

L'importanza sanitaria dei flebotomi è determinata dal ruolo di vettore che rivestono nell'epidemiologia della leishmaniosi, malattia causata dai protozoi del genere *Leishmania*. Sono anche vettori di arbovirus dei generi *Phlebovirus* (famiglia Bunyaviridae), *Vesiculovirus* (famiglia Rhabdoviridae) e *Orbivirus* (famiglia Reoviridae).

I virus delle febbri Napoli e Sicilia e il virus Toscana (genere *Phlebovirus*) sono endemici nel bacino del Mediterraneo. Le infezioni dei virus delle febbri Napoli e Sicilia, note anche come febbri "da pappataci" o "dei tre giorni", si manifestano con ipertermia e sintomi simil-influenzali.

L'infezione da virus Toscana decorre in forma asintomatica o paucisintomatica. In rari casi il quadro clinico può complicarsi, coinvolgendo il sistema nervoso centrale, interessato da meningite o meningoencefalite acuta, a causa del neurotropismo del virus.

I flebotomi rivestono il ruolo di vettore e serbatoio dell'infezione da *Phlebovirus*, essendo in grado di trasmettere il virus verticalmente (via transovarica). Il ruolo degli ospiti vertebrati nel mantenimento dell'infezione non è ancora stato chiarito, sebbene siano stati trovati positivi ai *Phlebovirus* diverse specie di mammiferi selvatici e domestici.

In America Latina, infine, è stata dimostrata la capacità vettoriale di alcune specie di flebotomi per *Bartonella bacilliformis*. Non risultano però segnalazioni di *Bartonella* in specie del genere *Phlebotomus* nel Vecchio Mondo (READY, 2013; MAROLI *et al.*, 2013).

SPECIE PRESENTI IN ITALIA

In Italia sono presenti otto specie: *Phlebotomus perniciosus*, *P. perfliewi*, *P. neglectus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. papatasi*, *P. mascittii* e *Sergentomyia minuta*.

Phlebotomus perniciosus è la specie più diffusa in Italia e le densità più elevate si registrano lungo le coste del Tirreno, dello Ionio e nelle isole. Predilige gli ambienti collinari, con areale esteso fino a 1000 m di altitudine. Questa specie possiede una notevole plasticità ecologica, caratteristica che le ha permesso di adattarsi a molteplici ambienti, da quelli domestici e peri-domestici a quelli selvatici. *Phlebotomus per-*

niciosus è il principale vettore di *L. infantum*, agente eziologico della leishmaniosi in Italia, vista la sua competenza vettoriale e la sua abbondanza nel territorio.

Phlebotomus perfliewi è diffuso su tutto il territorio italiano con densità più elevate sul versante adriatico degli Appennini, dall'Emilia-Romagna all'Abruzzo, dove si riscontrano anche molti casi umani di leishmaniosi cutanea causata da *L. infantum*.

Phlebotomus neglectus è meno diffuso delle specie precedentemente descritte. La sua presenza è stata segnalata nelle regioni meridionali (Puglia, Calabria, Sicilia) e negli ultimi decenni i monitoraggi condotti nelle regioni dell'arco alpino (Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli-Venezia Giulia) hanno permesso di osservarlo anche in queste regioni (FERROGLIO *et al.*, 2005; MAROLI *et al.*, 2008; SIGNORINI *et al.*, 2013). Segnalazioni puntiformi sono state riportate anche in Abruzzo. Il suo ruolo come vettore della leishmaniosi è fortemente sospettato.

Phlebotomus ariasi è limitato nella sua distribuzione a poche aree in Liguria e Piemonte, nelle province di Imperia, Savona e Cuneo. La capacità di trasmettere la leishmaniosi non è stata provata ed in ogni caso la sua importanza epidemiologica è limitata, vista la scarsa diffusione nel territorio italiano.

Phlebotomus papatasi si differenzia dalle altre specie perché è fortemente antropofilo ed endofilo. Il pasto di sangue può avvenire anche all'interno di edifici, abitazioni o ricoveri per gli animali domestici (endofagia), oltre che all'esterno (esofagia). La numerosità degli esemplari di questa specie è stata molto ridotta nel corso delle campagne antimalariche della metà del novecento. Negli ultimi anni è stata osservata una nuova crescita, in particolare nelle aree urbane. *Phlebotomus papatasi* non è coinvolto nella trasmissione di *L. infantum*, ma è un vettore di *L. major*, agente della leishmaniosi cutanea in molti Paesi del bacino del Mediterraneo.

RIASSUNTO

I flebotomi (Diptera: Psychodidae) sono il vettore della leishmaniosi, una zoonosi parassitaria sostenuta dai protozoi del genere *Leishmania*. La malattia, diffusa globalmente, colpisce sia gli animali, che l'uomo. Le specie in grado di trasmettere il parassita appartengono ai generi *Phlebotomus*, nel Vecchio Mondo e *Lutzomyia*, nel Nuovo Mondo. In Italia, sono state segnalate otto specie: *Phlebotomus perniciosus*, *P. perfliewi*, *P. neglectus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. papatasi*, *P. mascittii* e *Sergentomyia minuta*. Di queste, *P. perniciosus* e *P. perfliewi* sono i principali vettori di *L. infantum*, considerando la competenza vettoriale di queste specie e la loro abbondanza sul territorio, mentre *P. papatasi*, generalmente refrattario a *L. infantum*, è il principale vettore di *L. major*. Monitorare la presenza e l'abbondanza dei flebotomi è fondamentale per aggiornare le mappe di rischio della distribuzione di questi vettori e della diffusione delle malattie da essi trasmesse. Nelle

aree endemiche la sorveglianza entomologica può essere mirata alla ricerca dei patogeni negli insetti e alla definizione del tasso di infezione della popolazione del vettore. Le trappole utilizzate per il monitoraggio dei flebotomi sono le sticky trap, le light trap, le CDC light trap con o senza l'aggiunta di anidride carbonica. La scelta delle trappole da utilizzare per monitorare la popolazione di flebotomi è condizionata dal tipo di ambiente, dalla densità del vettore e dagli obiettivi del monitoraggio.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER B., 2000 - *Sampling methods for phlebotomine sandflies*. - Medical and Veterinary Entomology, 14 (2): 109-22.
- ALTEN B., MAIA C., AFONSO M., CAMPINO L., JIMÉNEZ M., GONZÁLEZ E., GRADONI L., ET AL., 2016 - *Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean leishmaniasis caused by Leishmania infantum*. - PLoS neglected tropical diseases, 10 (2): e0004458.
- BALDELLI R., PIVA S., SALVATORE D., PARIGI M., MELLONI O., TAMBA M., BELLINI R., POGLAYEN G., 2011. - *Canine leishmaniasis surveillance in a northern Italy kennel*. - Vet. Parasitol., 179 (1-3): 57-61.
- BARRIOS S.P.G., PEREIRA L.E., NAZÁRIO MONACO N.Z., GRACIOLLI G., CASARIL A.E., INFRAN J.O.M., DE OLIVEIRA E.F., FERNANDES W.S., PARANHOS FILHO A.C., OLIVEIRA A.G., 2019 - *Synanthropy and diversity of Phlebotominae in an area of intense transmission of visceral leishmaniasis in the South Pantanal floodplain, Midwest Brazil*. - PLoS One, 14 (5): e0215741.
- DANTAS-TORRES F., TARALLO V.D., LATROFA M.S., FALCHI A., LIA R.P., OTRANTO D., 2014 - *Ecology of phlebotomine sand flies and Leishmania infantum infection in a rural area of southern Italy*. - Acta tropica, 137: 67-73.
- DEPAQUIT J., GRANDADAM M., FOUQUE F., ANDRY P.E., PEYREFITTE C., 2010 - *Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review*. - Euro Surveill., 15 (10): 19507.
- EL KAMMAH K.E., 1972 - *Frequency of autogeny in wild-caught egyptian Phlebotomus papatasi Scopoli (Diptera, Psychodidae)*. - J. Med. Entomol., 9: 294.
- FELICIANGELI M.D., 2004 - *Natural breeding places of phlebotomine sandflies*. - Medical and Veterinary Entomology, 18: 71-80.
- FERROGLIO E., MAROLI M., GASTALDO S., MIGNONE W., ROSSI L., 2005 - *Canine leishmaniasis, Italy*. - Emerging infectious diseases, 11(10):1618-1620.
- KILLICK-KENDRICK R., 1999 - *The biology and control of phlebotomine sand flies*. - Clinics in Dermatology, 17: 279-289.
- LEISHMANIASIS - WHO | World Health Organization <https://www.who.int/health-topics>
- LEWIS D.J., 1982 - *A taxonomic review of the genus Phlebotomus (Diptera: Psychodidae)*. - Bulletin of the British Museum (Natural history), Entomology series, 45, 2: 121-209.
- MAGRÌ G., BAGHINO E., FLORIDIA M., GHIARA F., 2005 - *Caleidoscopio italiano, Leishmaniosi*. - Caleidoscopio, 188 (10): 1-65.
- MAROLI M., FELICIANGELI M.D., BICHAUD L., CHARREL R.N., GRADONI L., 2013 - *Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern*. - Medical and Veterinary Entomology, 27:123-147.
- MAROLI M., ROSSI L., BALDELLI R., CAPELLI G., FERROGLIO E., GENCHI C., GRADONI L. ET AL., 2008 - *The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors*. - Tropical Medicine & International Health, 13 (2): 256-264.
- MICHELUTTI A., TONIOLO F., BERTOLA M., GRILLINI M., SIMONATO G., RAVAGNAN S., MONTARSI F., 2020 - *Occurrence of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the northeastern plain of Italy*. - Parasit Vectors, 14 (1):164.
- MUNSTERMANN L.E., 2019 - *Phlebotomine Sand Flies and Moth Flies (Psychodidae)*. In: Medical and Veterinary Entomology, Mullen G.R. & Durden L.A., Academic Press, pp. 191-211.
- READY P.D., 2013 - *Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents*. - Annu Rev Entomol., 58: 227-50.
- ROMI R., KHOURY C., BIANCHI R., SEVERINI F., 2012 - *Artropodi di interesse sanitario in Italia e in Europa*. - Rapporti ISTISAN, 12/41:172.
- SEMENZA J. C., SUK J. E., 2018. - *Vector-borne diseases and climate change: a European perspective*. - FEMS microbiology letters, 365 (2): fnx244.
- SIGNORINI M., DRIGO M., MARCER F., DI REGALBONO A.F., GASPARINI G., MONTARSI F., 2013. - *Comparative field study to evaluate the performance of three different traps for collecting sand flies in northeastern Italy*. - J Vector Ecol., 38: 374-8.

86 - Pagina bianca

IL CONTROLLO DELLA LEISHMANIOSI CANINA: DAL LABORATORIO AL CAMPO

GIOVANNI SGROI^a - DOMENICO OTRANTO^{a,b}

^aDepartment of Veterinary Medicine, University of Bari Aldo Moro, Valenzano (Bari), Italy.

^bFaculty of Veterinary Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

E-mail: domenico.otranto@uniba.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Un aggiornamento sui flebotomi: biologia, ruolo vettoriale, strategie di controllo". Seduta pubblica dell'Accademia, tenuta da remoto, 26 febbraio 2021

The control of canine leishmaniosis: from the lab to the field

Canine leishmaniasis is a disease of veterinary and public health concern, because of the major clinical lesions it may cause to dogs as well as for its zoonotic potential. In order to prevent sand fly bites on dogs, integrated control approach is needed through the usage of repellent insecticidal pyrethroids coupled with vaccines. Other control actions include the reduction in stray dog population through spaying and release strategy and the correct sanitary management of municipal shelters.

KEY WORDS: control, leishmaniasis, prevention, phlebotomine sand flies

INTRODUZIONE ALLA TEMATICA

La leishmaniosi canina (CanL), causata dal protozoo *Leishmania infantum*, è una tra le più importanti malattie di interesse zoonosico, trasmessa da flebotomi (Famiglia, Psychodidae) all'uomo ed agli animali. Questa malattia, ampiamente diffusa nel bacino del Mediterraneo, è caratterizzata da una moltitudine di forme cliniche, che variano da gravi (finanche mortali) ad asintomatiche in oltre il 50% degli animali (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; DANTAS-TORRES *et al.*, 2006). Il controllo dei flebotomi e la prevenzione dalle punture a carico degli ospiti vertebrati sono alla base delle strategie di profilassi della CanL.

CONTRASTO AL VETTORE

Il contrasto ai flebotomi può essere condotto, sia riducendone la densità attraverso l'eliminazione dei siti di riproduzione in aree urbane e peri-urbane (tramite insetticidi e bonifiche ambientali) (ALEXANDER & MAROLI, 2003), sia proteggendo gli animali dalla puntura mediante trattamenti diretti.

Trattamenti ambientali con insetticidi

L'uso di insetticidi, quali DDT, carbammati, malathion, permetrina e piretroidi, è una misura di controllo efficace (HERTIG & FISHER, 1945; MORSY *et al.*, 1993; KELLY *et al.*, 1997). Tuttavia, i maggiori limiti di questi trattamenti, specialmente in aree rurali, sono la difficoltà

di dosaggio e di impiego nei siti di riproduzione dei flebotomi, l'inquinamento ambientale e la tossicità nei confronti di altri organismi, così come i fenomeni di resistenza ad alcuni principi attivi (es. DDT) (ALEXANDER & MAROLI, 2003). Questa misura è usata soprattutto in focolai attivi di leishmaniosi umana in contesti molto limitati, quali piccoli villaggi.

Trattamenti diretti sugli animali (collari, stamping out, vaccini):

Collari – Negli ultimi anni, collari impregnati di deltametrina e flumetrina sono stati impiegati in diversi studi per il controllo della CanL in aree endemiche. In Italia, numerosi trial clinici hanno evidenziato l'efficacia di questi collari per la prevenzione della CanL, soprattutto durante stagioni ad alta densità di flebotomi (MAROLI *et al.*, 2001; OTRANTO *et al.*, 2013). In Iran, l'utilizzo di collari in popolazioni canine si è dimostrato utile anche nel ridurre l'incidenza di leishmaniosi umana infantile (GAVGANI *et al.*, 2002). L'associazione imidacloprid 10% e permetrina 50% -ImPer- (Advantix®; Bayer AG, Germany) spot-on ha dimostrato un effetto *anti-feeding* (i.e., i flebotomi non compiono il pasto di sangue) del 90% contro *Phlebotomus perniciosus* nelle prime tre settimane dalla somministrazione (MIRÓ *et al.*, 2007) e hanno fornito elevate percentuali di prevenzione nei confronti della CanL in aree endemiche (OTRANTO *et al.*, 2007; OTRANTO *et al.*, 2010).

Stamping out – Lo *stamping out* (i.e., l'eliminazione) dei cani sieropositivi a fini profilattici è una pratica non eticamente sostenibile ed indifendibile

dinanzi all'opinione pubblica in molti Paesi, oltre ad essere inefficace nell'eradicazione di CanL nei paesi a medio o basso reddito (DANTAS-TORRES *et al.*, 2019).

Vaccini – I vaccini testati nei confronti della *L. infantum* si basano su frazioni purificate del protozoo (DUNAN *et al.*, 1989), promastigoti inattivati con o senza adiuvante BCG (MOHEBALI *et al.*, 2004) ed antigeni ricombinanti (GRADONI *et al.*, 2005). Il requisito fondamentale di un vaccino nei confronti della CanL è la capacità di indurre una risposta immunitaria cellulo-mediata stabile e duratura che diminuisce il rischio di comparsa di segni clinici. Ad oggi, nessun vaccino protegge gli animali nei confronti dell'infezione (LAGE *et al.*, 2020). Le difficoltà nella preparazione di vaccini protettivi nei confronti della CanL sono dovute a molteplici fattori legati alla risposta immunitaria degli ospiti, la sua genetica, le dosi di antigene introdotte nell'organismo in associazione ad antigeni del flebotomo che sembra favoriscano l'infezione, il numero e la frequenza di punture infette (SRIVASTAVA *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2020). Per questi motivi, tutti i presidi vaccinali ad oggi disponibili devono essere associati all'impegno di sostanze repellenti nei confronti dei flebotomi.

CONCLUSIONI: LINEE GUIDA E PROSPETTIVE FUTURE PER LA PROFILASSI DI LEISHMANIOSI

Alla luce di quanto sopra enunciato, è indispensabile un approccio integrato che comprenda adeguate politiche ambientali (volte ad evitare la comparsa di siti di riproduzione del vettore), comportamenti atti a ridurre l'esposizione di cani a punture dei flebotomi (es. evitare soggiorni notturni dei cani all'aperto, con impiego di reti protettive a maglie strette), l'utilizzo di sostanze ad attività repellente/*anti-feeding*, la lotta al randagismo, il controllo di *reservoir* di infezione e la corretta gestione sanitaria dei canili. L'insieme delle suddette strategie di profilassi sono rilevanti non soltanto al fine di proteggere la popolazione canina, ma anche per tutelare la salute pubblica, riducendo il rischio di infezione da *L. infantum* nell'uomo.

RIASSUNTO

La leishmaniosi canina è una patologia di grande rilevanza in ambito medico-veterinario e in sanità pubblica, sia per le gravi conseguenze che essa ha sulla salute e il benessere degli animali, in primis il cane, sia per il suo rischio zoonotico. Al fine di prevenire la puntura dei flebotomi vettori, e la conseguente trasmissione della leishmaniosi del cane, è indispensabile adottare un approccio integrato che tenga conto di trattamenti rivolti all'ambiente (insetticidi) ed agli

animali (collari, vaccini), oltre che adeguate strategie di controllo della popolazione canina attraverso la lotta al randagismo e la corretta gestione sanitaria dei canili.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER B., MAROLI M., 2003 - *Control of phlebotomine sandflies*. - Medical and Veterinary Entomology, 17: 1-18.
- DANTAS-TORRES F., FELINTO DE BRITO M.E., BRANDÃO-FILHO S.P., 2006 - *Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil*. - Veterinary Parasitology, 140 (1-2): 54-60.
- DANTAS-TORRES F., MIRÓ G., BOWMAN D.D., GRADONI L., OTRANTO D., 2019 - *Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change*. - Trends in Parasitology, 35 (2): 97-101.
- DUNAN S., FROMMEL D., MONJOUR L., OGUNKOLADE B.W., CRUZ A., QUILICI M., 1989 - *The Phocean veterinary study group on visceral leishmaniasis. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis*. - Parasite Immunology, 11: 397-402.
- GAVGANI A.S., HODJATI M.H., MOHITE H., DAVIES C.R., 2002 - *Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial*. - Lancet, 360 (9330): 374-379.
- GRADONI L., FOGLIA MANZILLO V., PAGANO A., PIANTEDOSI D., DE LUNA R., GRAMICCIA M., SCALONE A., DI MUCCIO T., OLIVA G., 2005 - *Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from Leishmania infantum infection and to prevent disease progression in infected animals*. - Vaccine, 23 (45): 5245-5251.
- HERTIG M., FISHER L.R., 1945 - *Control of sandflies with DDT*. - Bulletin of the US Army Medical Department, 88: 97.
- KELLY D.W., MUSTAFA Z., DYE C., 1997 - *Differential application of lambda-cyhalothrin to control the sandfly Lutzomyia longipalpis*. - Medical and Veterinary Entomology, 11: 13-24.
- LAGE D.P., RIBEIRO P.A.F., DIAS D.S., MENDONÇA D.V.C., RAMOS F.F., CARVALHO L.M., DE OLIVEIRA D., STEINER B.T., MARTINS V.T., PERIN L., MACHADO A.S., SANTOS T.T.O., TAVARES G. S.V., OLIVEIRA-DA-SILVA J.A., OLIVEIRA J.S., ROATT B.M., MACHADO-DE-ÁVILA R.A., TEIXEIRA A.L., HUMBERT M.V., COELHO E.A.F., CHRISTODOULIDES M., 2020 - *A candidate vaccine for human visceral leishmaniasis based on a specific T cell epitope-containing chimeric protein protects mice against Leishmania infantum infection*. - npj Vaccines, 5: 75.
- MAROLI M., MIZZON V., SIRAGUSA C., D'OORAZI A., GRADONI L., 2001 - *Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy*. - Medical and Veterinary Entomology, 15(4): 358-363.
- MIRÓ G., GÁLVEZ R., MATEO M., MONTOYA A., DESCALZO M.A., MOLINA R., 2007 - *Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against Phlebotomus perniciosus in dog*. - Veterinary Parasitology, 143 (3-4): 375-379.
- MOHEBALI M., KHAMESIPOUR A., MOBEDI I., ZAREI Z., FESHARKI R.H., 2004 - *Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved Leishmania major vaccine mixed with BCG against canine visceral*

- leishmaniasis in Meshkin-Shahrdistrict, I.R. Iran.* - Vaccine, 22: 4097-4100.
- MORSY T.A., ABOUL ELA R.G., EL GOZAMY B.M.R., SALAMA M.M. M., RAGHEB D.A., 1993 - *Residual effects of four insecticides applied for indoor control of Phlebotomus papatasi (Scopoli).* - Journal of the Egyptian Society of Parasitology, 23: 485-492.
- OTRANTO D., DANTAS-TORRES F., DE CAPRARIIS D., DI PAOLA G., TARALLO V.D., LATROFA M.S., LIA R.P., ANNOSCIA G., BREITSHWERDT E.B., CANTACESSI C., CAPELLI G., STANNECK D., 2013 - *Prevention of canine leishmaniosis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid/4.5% flumethrin.* - PLoS One*, 8 (2): e56374.
- OTRANTO D., DE CAPRARIIS D., LIA R.P., TARALLO V., LORUSSO V., TESTINI G., DANTAS-TORRES F., LATROFA M.S., DINIZ P.P., MENCKE N., MAGGI R.G., BREITSHWERDT E.B., CAPELLI G., STANNECK D., 2010 - *Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study.* - Veterinary Parasitology, 172(3-4): 323-332.
- OTRANTO D., PARADIES P., LIA R.P., LATROFA M.S., TESTINI G., CANTACESSI C., MENCKE N., GALLI G., CAPELLI G., STANNECK D., 2007 - *Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area.* - Veterinary Parasitology, 144 (3-4): 270-278.
- SOLANO-GALLEGO L., MORELL P., ARBOIX M., ALBEROLA J., FERRER L., 2001 - *Prevalence of Leishmania infantum Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology.* - Journal of Clinical Microbiology, 39(2): 560-563.
- SRIVASTAVA S., SHANKAR P., MISHRA J., SINGH S., 2016 - *Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis.* - Parasites & Vectors, 9(1): 277.

90 - Pagina bianca