



RELAZIONE FINALE

Studio delle prevalenze di *Babesia spp* e *Leishmania spp* in Valle d'Aosta con tipizzazione delle specie di *Babesia* presenti sul territorio attraverso l'elaborazione di nuovi primers biomolecolari.

Borsista

Alice Centelli

Responsabile scientifico

Prof. Ezio Ferroglio

Responsabile di struttura

Dr. Marco Ragionieri

INTRODUZIONE

La Leishmaniosi e la Babesiosi sono due malattie parassitarie, sostenute da un protozoo, entrambe considerate come patologie emergenti a livello mondiale.

Sono ambedue delle zoonosi, ovvero malattie che possono colpire sia l'essere umano che animale. La loro esistenza è strettamente legata alla presenza di un vettore biologico, un flebotomo per la *Leishmania* e una zecca per la *Babesia*, che tramite il pasto di sangue è in grado di infettare l'ospite.

Queste due malattie sono diffuse oggi in buona parte del globo e rappresentano sempre più un problema di salute pubblica.

In Italia la loro diffusione non è più soltanto confinata a quelle zone considerate tradizionalmente endemiche, come l'Italia meridionale, centrale ed insulare, ma la loro presenza è stata osservata in zone che erano state classificate come "free".

Il significato dei casi di leishmaniosi e babesiosi in queste aree si può ricondurre alla sempre maggiore movimentazione di animali, in particolare di cani, da zone classicamente considerate endemiche e ai cambiamenti climatici che hanno permesso l'adattamento e la sopravvivenza del vettore in zone un tempo considerate "troppo fredde".

La decisione di intraprendere questo studio deriva dalla sempre maggiore importanza che stanno acquisendo queste patologie nel Nord Italia e nel mondo, sia per quanto riguarda la salute animale che quella umana.

Lo scopo del lavoro è stato quello di verificare la presenza di *Babesia spp* e *Leishmania spp* sull'intero territorio valdostano attraverso il campionamento di numerosi soggetti, autoctoni e non, facenti parte sia della specie canina che bovina.

LEISHMANIA

MATERIALI E METODI

La presenza della leishmaniosi nella regione Valle d'Aosta era già stata dimostrata grazie ai monitoraggi effettuati fra il 2000 e il 2004; all'epoca si registrava un solo focolaio autoctono nella zona di Sarre.

Prima dell'inizio di questa attività di ricerca si ipotizzava che, a causa dei continui cambiamenti climatici, i focolai esistenti sei anni fa potessero essersi estesi ad altre aree del territorio.

La ricerca ha coinvolto 325 cani di diverse razze, con un'età compresa fra 1 e 19 anni, sia maschi che femmine. Il campionamento è stato effettuato su tutto il territorio valdostano con una maggiore frequenza in quei comuni localizzati nei pressi del focolaio già censito negli anni passati.

I soggetti sono stati scelti e campionati in 4 contesti diversi:

- ✓ Ambulatori veterinari privati
- ✓ Canile Regionale A.V.A.P.A
- ✓ Ambulatori dell'AUSL durante la pratica di inserimento dei microchip
- ✓ Stalle durante i prelievi per Brucellosi

Tutti i proprietari, previamente edotti sugli argomenti della ricerca, hanno compilato la cartella contenente i dati segnaletici ed epidemiologici del proprio animale.

Fac-simile cartella di campo:

Data _____	Caso n° _____		
Nome _____	Età _____		
Razza _____	Sesso ♂ ♀		
Proprietario _____			
Indirizzo _____			
Telefono _____			
Pelo	RASO	RUVIDO	LUNGO
Vive in	CASA	GIARDINO	CANILE
Dorme in	CASA	GIARDINO	CANILE
Spostamenti animale fuori dalla Valle d'Aosta			

Presenza di altri animali	SI	NO	
Quali?	_____		
Profilassi Zecche	SI	NO	
Nome prodotto	_____		
Data ultimo trattamento	_____		
Profilassi flebotomi	SI	NO	
Nome prodotto	_____		
Data ultimo trattamento	_____		

A tutti i soggetti sono stati prelevati, dopo accurata tricotomia, circa 5ml di sangue dalla vena cefalica.

Il sangue prelevato è stato equamente suddiviso in due provette: la prima contenete EDTA K3 (tappo violetto) e la seconda un attivatore della coagulazione e gel separatore (tappo rosso mattone).

Il sangue riposto nelle provette con tappo rosso mattone è stato fatto centrifugare per 15 minuti. Il siero è stato poi prelevato e riposto in provette eppendorf da 1,5 ml.

Entrambe le provette sono state congelate.

I campioni sono stati, in seguito, trasportati presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Settore di Parassitologia Veterinaria, facendo attenzione a mantenere la catena del freddo.

Sui campioni prelevati sono stati eseguite due differenti analisi: PCR (analisi diretta) e Western Blotting (analisi indiretta).

Comune	n° soggetti campionati
Aosta	49
Saint Christophe	35
Sarre	31
Gressan	25
Roisan	18
Charvensod	17
La Salle	17
Quart	14
Pollein	10
Verres	8
Saint Vincent	8
Fenis	7
Brissogne	6
Saint Pierre	6
Issogne	6
Gignod	6
Perloz	6
Morgex	5
Saint Nicolas	5
Pontey	5
Saint Marcel	4
Donnas	4
Arnad	4
Saint Denis	3
Pont Saint Martin	3
Ollomont	3
Jovencan	2
Etroubles	2
La Thuile	2
Nus	2
Aymavilles	2
Bionaz	2
Champdepraz	1
Saint Rhemy en Bosses	1
Issime	1
Chatillon	1
Cogne	1
Courmayeur	1
Pré Saint Didier	1
Avise	1

RISULTATI

Le aree individuate come endemiche dall'ultimo monitoraggio del 2004 (Comuni di Aosta e Sarre) risultano confermate, tuttavia molte altre zone risultano interessate dalla presenza della malattia.

Grazie alla scheda compilata in sede di campionamento si sono potuti distinguere, fra i soggetti positivi, quelli autoctoni, cioè mai usciti dalla Valle d'Aosta, da quelli alloctoni.

In totale i soggetti positivi a PCR per *Leishmania* risultano 57 di cui 39 autoctoni e 18 alloctoni, per una percentuale di soggetti autoctoni positivi pari al 12%.

I cani positivi a Western Blotting per *Leishmania*, invece, ammontano a 64 di cui 35 autoctoni e 29 alloctoni, per una percentuale di soggetti autoctoni positivi pari al 10,8%. Fra questi 64, 10 soggetti presentavano un risultato compatibile con un'eventuale terapia farmacologica e in 7 soggetti, due dei quali deceduti, era già presente una sintomatologia clinica compatibile con la leishmaniosi.

I comuni con presenza di soggetti positivi ad almeno uno dei due test (PCR e Western Blotting) risultano i seguenti:

Sarre, Aosta, Charvensod, Gressan, Gignod, Perloz, Pollein, Saint Marcel, Saint Vincent, Champdepraz, Saint Denis, Vèrres, Quart, La Salle, Fènis, Brissogne, Saint Christophe, Ollomont, Morgex, Saint Pierre, Issime, Roisan, Jovençon, Cogne, Nus, Aymavilles, Bionaz, Pontey e Saint Nicolas.

I comuni con presenza di soggetti autoctoni positivi ad almeno uno dei due test (PCR e Western Blotting) risultano i seguenti:

Aosta, Saint Christophe, Sarre, Gressan, Roisan, Charvensod, La Salle, Quart, Pollein, Vèrres, Saint Vincent, Fènis, Brissogne, Gignod, Perloz, Morgex, Saint Nicolas, Pontey, Saint Marcel, Saint Denis, Nus, Ollomont, Champdepraz e Pré Saint Didier.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti permettono di affermare che la popolazione canina della regione Valle d'Aosta è fortemente a rischio di contrarre la Leishmaniosi.

I campionamenti di flebotomi effettuati nell'estate 2011, quando analizzati alla luce dei risultati inerenti la positività dei soggetti, permettono l'elaborazione di un elenco dei comuni nei quali siano presenti sia il vettore (*Phlebotomus*) che il serbatoio (cane positivo) della malattia, elementi essenziali e sufficienti a garantirne la persistenza sul territorio.

Comuni	Presenza di flebotomi	Soggetti positivi
AOSTA	si	Si
SARRE	si	Si
SAINT CHRISTOPHE	si	Si
GRESSAN	si	si
CHARVENSOD	si	si
QUART	si	si
POLLEIN	si	si
VERRES	si	si
SAINT VINCENT	si	si
FENIS	si	si
PONTEY	si	si
SAINT MARCEL	si	si
NUS	si	si
SAINT PIERRE	Si	si
AYMAVILLES	Si	si
CHATILLON	Si	no
PONT SAINT MARTIN	Si	no

L'assenza di soggetti positivi in luoghi in cui è stata rilevata la presenza di flebotomi, o il rinvenimento di positività nei cani in comune ove non sono stati rinvenuti flebotomi, sono facilmente spiegabili per problemi del campionamento su campo dei flebotomi (impossibilità a campionare aree idonee, condizioni sfavorevoli al momento delle catture) oppure alla modalità di campionamento che, essendo per ovvi motivi a campione, comprende solo una parte della popolazione canina presente sul territorio. L'estate 2011 è stata infatti caratterizzata da un periodo durante il quale le temperature sono scese molto al di sotto della norma, abbattendo quindi il numero di flebotomi presenti; non essendo possibile escludere la presenza di vettori e/o soggetti positivi nei comuni della regione esclusi dai campionamenti, si consiglia quindi l'adozione di misure preventive su larga scala, al fine di contrastare la diffusione della patologia nella regione. L'unica misura ad oggi applicabile per la profilassi della leishmaniosi consiste nella lotta ai vettori (flebotomi), in quanto la mancata disponibilità di un vaccino impedisce un intervento efficace sull'ospite vertebrato.

Importante è ricordare che la presenza di anticorpi non garantisce l'immunità nei confronti della patologia, essendo essa causata proprio da una esagerata risposta immunitaria umorale, tipica di ogni singolo individuo affetto. L'infezione, inoltre, per quanto riguarda *Leishmania*, non è sintomo di malattia. Come già visto, sono il tipo di risposta immunitaria e il profilo di interleuchine prodotta dal soggetto a determinarne la resistenza/sensibilità all'infezione. I risultati degli esami sierologici e biomolecolari vanno, dunque, sempre e comunque interpretati alla luce della presentazione clinica della malattia.

La lotta ai flebotomi si articola su due tipi di intervento: la protezione contro le punture del vettore e la riduzione della densità dei flebotomi nell'ambiente, tramite l'uso di antiparassitari esterni ad uso veterinario ed insetticidi ad azione residua negli ambienti domestici.

I proprietari di cani possono proteggere i loro animali applicando zanzariere a maglie fitte, o, meglio ancora attraverso l'uso di repellenti, a base di permetrina o deltametrina, applicati direttamente sul pelo dell'animale in formulazioni spot-on (Advantix®, Exspot®), o di appositi collari (Scalibor®) reperibili in commercio.

Ideale sarebbe, anche, ricoverare i cani in ambienti chiusi durante le ore notturne (dal tramonto all'alba) in modo da diminuire ulteriormente il rischio di puntura da parte dei flebotomi.

Nella regione Valle d'Aosta, per ottenere un buon livello di protezione, sarebbe sufficiente adottare queste precauzioni da giugno fino ai primi giorni di ottobre, in modo da coprire tutta la stagione dei flebotomi.

La rapida colonizzazione di nuovi territori da parte dei flebotomi, oltre al reperimento di un sempre maggior numero di soggetti autoctoni positivi, lascia intendere come nella nostra regione, così come nel resto d'Europa, si siano verificati negli ultimi anni dei mutamenti climatici di una certa importanza.

La Leishmaniosi, dunque, non risulta più come una malattia endemica solo della zona di Aosta e Sarre, ma come una malattia che si sta lentamente diffondendo in tutto il territorio regionale.

BABESIA nel cane

MATERIALI E METODI

La presenza della babesiosi nella regione Valle d'Aosta non era mai stata dimostrata prima.

Prima dell'inizio di questa attività di ricerca, visti i continui cambiamenti climatici, e la presenza sul territorio di altre parassitosi tipiche delle aree mediterranee più che delle zone alpine, si era comunque ipotizzato un suo probabile arrivo nella regione.

La ricerca ha coinvolto 325 cani di diverse razze, con un'età compresa fra 1 e 19 anni, sia maschi che femmine. Il campionamento è stato effettuato su tutto il territorio valdostano con una maggiore frequenza in quei comuni localizzati nei pressi del focolaio di leishmania censito negli anni passati.

I soggetti sono stati scelti e campionati in 4 contesti diversi:

- ✓ Ambulatori veterinari privati
- ✓ Canile Regionale A.V.A.P.A
- ✓ Ambulatori dell'AUSL durante la pratica di inserimento dei microchip
- ✓ Stalle durante i prelievi per Brucellosi

Tutti i proprietari, previamente edotti sugli argomenti della ricerca, hanno compilato la cartella contenente i dati segnaletici ed epidemiologici del proprio animale.

Comune	n° soggetti campionati
Aosta	49
Saint Christophe	35
Sarre	31
Gressan	25
Roisan	18
Charvensod	17
La Salle	17
Quart	14
Pollein	10
Verres	8
Saint Vincent	8
Fenis	7
Brissogne	6
Saint Pierre	6
Issogne	6
Gignod	6
Perloz	6
Morgex	5
Saint Nicolas	5
Pontey	5
Saint Marcel	4
Donnas	4
Arnad	4
Saint Denis	3
Pont Saint Martin	3
Ollomont	3
Jovencan	2
Etroubles	2
La Thuile	2
Nus	2
Aymavilles	2
Bionaz	2
Champdepraz	1
Saint Rhemy en Bosses	1
Issime	1
Chatillon	1
Cogne	1
Courmayeur	1
Pré Saint Didier	1
Avise	1

Fac-simile cartella di campo:

Data _____	Caso n° _____
Nome _____	Età _____
Razza _____	Sesso ♂ ♀
Proprietario _____	
Indirizzo _____	
Telefono _____	
Pelo RASO RUVIDO LUNGO	
Vive in CASA GIARDINO CANILE	
Dorme in CASA GIARDINO CANILE	
Spostamenti animale fuori dalla Valle d'Aosta	

Presenza di altri animali	SI NO
Quali? _____	
Profilassi Zecche	SI NO
Nome prodotto _____	
Data ultimo trattamento _____	
Profilassi flebotomi	SI NO
Nome prodotto _____	
Data ultimo trattamento _____	

A tutti i soggetti sono stati prelevati, dopo accurata tricotomia, circa 5ml di sangue dalla vena cefalica.

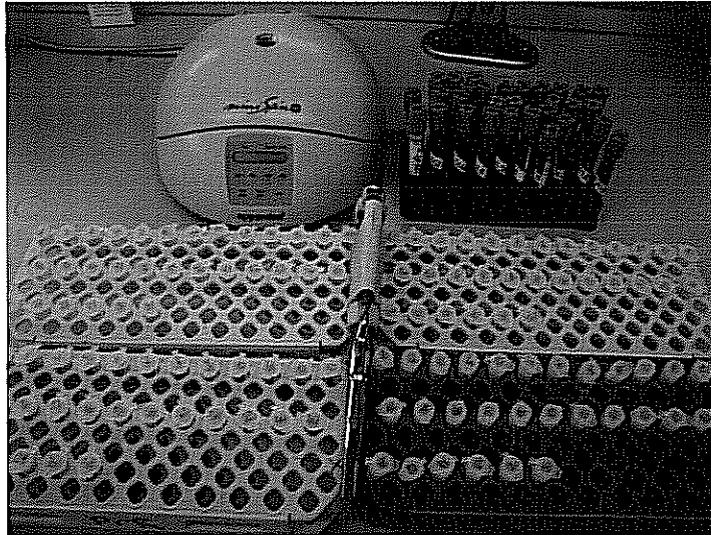
Il sangue prelevato è stato equamente suddiviso in due provette: la prima contenete EDTA K3 (tappo violetto) e la seconda un attivatore della coagulazione e gel separatore (tappo rosso mattone).

Il sangue riposto nelle provette con tappo rosso mattone è stato fatto centrifugare per 15 minuti. Il siero è stato poi prelevato e riposto in provette eppendorf da 1,5 ml.

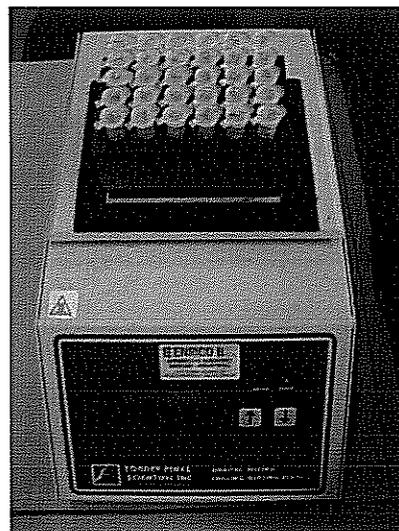
Entrambe le provette sono state congelate.

I campioni sono stati, in seguito, trasportati presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Settore di Parassitologia Veterinaria, facendo attenzione a mantenere la catena del freddo.

Nei laboratori della Facoltà i campioni, una volta scongelati, sono stati estratti con il Kit GenomeElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep prodotto dalla Sigma-Aldrich secondo il protocollo di estrazione che segue.



Estrazione del DNA



Campioni nel termoblock

PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DNA DA SANGUE INTERO

1. Disporre tante eppendorf quanti sono i campioni da estrarre e numerarle.
2. Mettere 20 μ l di Proteinasi k in ogni eppendorf. La Proteinasi k si trova sotto forma di polvere e deve essere ricostituita utilizzando acqua sterile nella proporzione di 0,5ml per 10mg in polvere.
3. Aggiungere 200 μ l di campione (sangue intero).
4. Aggiungere 200 μ l di Lysis Solution C e vortexare per 15 secondi.
5. Incubare i campioni a 55°C per 10 minuti in bagnetto termostatico.
6. Mentre i campioni sono nel bagnetto, prendere le eppendorf con anello rosso, numerarle e mettervi 500 μ l di Column Preparation Solution.
7. Centrifugare le eppendorf con anello rosso a 12000 rpm; finita la centrifugazione svuotare le eppendorf alzando l'anello rosso.
8. Finita l'incubazione dei campioni, toglierli dal bagnetto e aggiungervi 200 μ l di etanolo; poi vortexare per 5 secondi.
9. Trasferire i campioni nelle eppendorf con anello rosso preparate in precedenza e centrifugare a 6500 rpm per 1 minuto.
10. Togliere le eppendorf dalla centrifuga e disporre gli anelli rossi dentro a nuove eppendorf numerate.
11. Aggiungere 500 μ l di Washing Solution attivata con etanolo e centrifugare a 6500 rpm per 1 minuto.
12. Svuotare le eppendorf alzando l'anello rosso e aggiungere 500 μ l di Washing Solution attivata con etanolo.
13. Centrifugare alla massima velocità per 3 minuti.
14. Porre gli anelli rossi dentro a nuove eppendorf numerate e aggiungervi 200 μ l di Elution Solution.
15. Incubare i campioni a temperatura ambiente per 5 minuti.
16. Centrifugare a 6500 rpm per 1 minuto
17. Conservare le eppendorf e buttare l'anello rosso.

Su tutti gli estratti è stata, poi, eseguita la PCR catch-all, in grado di amplificare un frammento denominato regione V4 del gene 18S. La PCR sfrutta l'alta conservazione, anche fra specie diverse di Babesia, delle regioni esterne di questo gene per poter amplificare tutti gli eventuali piroplasmii presenti nel campione.

Il protocollo si articola di due reazioni PCR. Nella prima reazione viene usato il set di primers RLB-F2 (5'-GACACAGGGAGGTAGTGACAAG-3') e RLB-R2 (5'-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT-3'), mentre nella seconda il primer RLB-R2 viene sostituito con un primer più interno denominato RLB-Fint (5'-GACAAGAAATAACAATACRGGGC-3').

I cicli della reazione della prima PCR prevedono 3 stadi:

- Stadio 1 → 95°C per 10'
- Stadio 2 (ripetuto 10 volte) → 95°C per 30''
50°C per 45''
72°C per 1'
- Stadio 3 → 72°C per 10'
4°C

I cicli della reazione della seconda PCR prevedono altri 3 stadi:

- Stadio 1 → 95°C per 10'
- Stadio 2 (ripetuto 40 volte) → 95°C per 30''
55°C per 45''
72°C per 45''
- Stadio 3 → 72°C per 10'
4°C

Il prodotto della PCR viene poi separato mediante una corsa elettroforetica su gel di agar al 2% contenente GelRed™ (VWR) per la rilevazione selettiva del DNA tramite lampada ad UV.

RISULTATI

Non essendoci dati antecedenti a questo studio, riguardanti la presenza o meno di *Babesia spp* in Valle d'Aosta, la diffusione del patogeno non poteva essere prevista in maniera attendibile.

Grazie alla scheda compilata in sede di campionamento si sono potuti distinguere, fra i soggetti positivi, quelli autoctoni, cioè mai usciti dalla Valle d'Aosta, da quelli alloctoni.

In totale i soggetti positivi a PCR per *Babesia* risultano 29 di cui 21 autoctoni e 8 alloctoni, per una percentuale di soggetti autoctoni positivi pari al 6,5%.

Nessuno dei soggetti risultati positivi presentava sintomatologia clinica ascrivibile a infezione da *Babesia spp*.

I comuni con presenza di soggetti positivi a PCR risultano i seguenti:

Sarre, Aosta, Charvensod, Gressan, Pollein, Saint Marcel, Saint Vincent, Vèrres, La Salle, Fènis, Brissogne, Saint Christophe, Morgex, Saint Pierre e Donnas.

I comuni con presenza di soggetti autoctoni positivi a PCR risultano i seguenti:

Aosta, Saint Christophe, Pollein, Vèrres, Saint Vincent, Fènis, Brissogne, Morgex e Saint Marcel.

Dato interessante risulta la positività al test di 7 cani del Canile Regionale A.V.A.P.A, con una percentuale di positivi sul totale dei soggetti campionati nella struttura (30 soggetti) pari al 23,3%.

Comune	n° soggetti campionati	Positivi PCR	Autoctoni	% positivi	%positivi autoctoni
Aosta	49	1	1	2	2
Saint Christophe	35	7	7	20	20
Sarre	31	2	0	6,5	0
Gressan	25	1	0	4	0
Roisan	18	0	0	0	0
Charvensod	17	1	0	5,9	0
La Salle	17	1	0	5,9	0
Quart	14	0	0	0	0
Pollein	10	4	4	40	40
Verres	8	2	2	25	25
Saint Vincent	8	1	1	12,5	12,5
Fenis	7	1	1	14,3	14,3
Brissogne	6	3	3	50	50
Saint Pierre	6	1	0	16,7	0
Issogne	6	0	0	0	0
Gignod	6	0	0	0	0
Perloz	6	0	0	0	0
Morgex	5	2	1	40	20
Saint Nicolas	5	0	0	0	0
Pontey	5	0	0	0	0
Saint Marcel	4	1	1	25	25
Donnas	4	1	0	25	0
Arnad	4	0	0	0	0
Saint Denis	3	0	0	0	0
Pont Saint Martin	3	0	0	0	0
Ollomont	3	0	0	0	0
Jovencan	2	0	0	0	0
Etroubles	2	0	0	0	0
La Thuile	2	0	0	0	0
Nus	2	0	0	0	0
Aymavilles	2	0	0	0	0
Bionaz	2	0	0	0	0
Champdepraz	1	0	0	0	0
Saint Rhemy en Bosses	1	0	0	0	0
Issime	1	0	0	0	0
Chatillon	1	0	0	0	0
Cogne	1	0	0	0	0
Courmayeur	1	0	0	0	0
Pré Saint Didier	1	0	0	0	0
Avise	1	0	0	0	0

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano come la Valle d'Aosta non possa più considerarsi una regione indenne da *Babesia spp.*

Le percentuali di positività nella popolazione canina risultano paragonabili ai dati relativi a *Leishmania spp* degli anni 2000; il fenomeno, dunque, risulta recente ma non per questo va sottovalutato. L'alto numero di soggetti positivi in luoghi come il Canile A.V.A.P.A. dimostra come questa malattia sia facilmente e velocemente trasmissibile in ambienti in cui convivano più soggetti. Il mancato campionamento dei vettori della malattia, le zecche, non ci permette di elaborare, diversamente da quanto avvenuto per *Leishmania*, una lista dei comuni nei quali siano presenti sia il vettore zecca che il serbatoio (cane positivo) della malattia, elementi essenziali e sufficienti a garantirne la persistenza sul territorio.

Non essendo possibile escludere la presenza di vettori e/o soggetti positivi nei comuni della regione esclusi dai campionamenti, si consiglia quindi l'adozione di misure preventive, al fine di contrastare la diffusione della patologia nella regione.

In commercio esistono dei vaccini per la profilassi indiretta, ma nessuno di essi garantisce una copertura per tutte le specie di *Babesia* esistenti. Al momento è, dunque, preferibile orientarsi verso metodi di profilassi diretta nei confronti del vettore. La lotta alle zecche si articola su due tipi di intervento: la protezione contro il morso del vettore e la riduzione della densità delle zecche nell'ambiente, tramite l'uso di antiparassitari esterni ad uso veterinario ed insetticidi ad azione residua negli ambienti domestici.

I proprietari di cani possono proteggere i loro animali applicando dei repellenti, a base di permetrina, fioprotil, deltametrina o sostanze analoghe direttamente sul pelo dell'animale in formulazioni spot-on, o di appositi collari reperibili in commercio.

Nella regione Valle d'Aosta, per ottenere un buon livello di protezione, sarebbe sufficiente adottare queste precauzioni da marzo fino ai primi giorni di ottobre, in modo da coprire tutta la stagione delle zecche e anche dei flebotomi.

BABESIA nel bovino

MATERIALI E METODI

La presenza della babesiosi nella regione Valle d'Aosta non era mai stata dimostrata prima.

Prima dell'inizio di questa attività di ricerca, visti i continui cambiamenti climatici, e la presenza sul territorio di altre parassitosi tipiche delle aree mediterranee più che delle zone alpine, si era comunque ipotizzato un suo probabile arrivo nella regione.

La ricerca ha coinvolto 280 bovini di razza valdostana o frisona, di età superiore all'anno, in maggioranza di sesso femminile. Il campionamento è stato effettuato in 28 stalle differenti, localizzate in altrettanti comuni dislocati sul territorio valdostano. I bovini oggetto del campionamento sono tutti animali autoctoni tranne 3 soggetti provenienti dal Piemonte, ma appartenenti a stalle situate nei comuni di Charvensod, Nus e Fènis. Tutti i capi sono allevati in maniera semi-intensiva con largo ricorso al pascolamento in particolar modo nella stagione estiva. In ogni stalla sono stati scelti, in maniera del tutto casuale, 10 soggetti di età superiore all'anno. Prima di effettuare il campionamento tutti i proprietari, dopo essere stati informati sugli argomenti della ricerca, hanno compilato la cartella contenente i dati segnaletici ed epidemiologici dei propri animali.



Fac-simile cartella di campo:

Data _____

Caso n° _____

Nome _____

Auricolare _____

Bolo _____

Razza _____

Sesso ♂ ♀

Veterinario USL _____

Proprietario _____

Indirizzo _____

Telefono _____

Spostamenti animale fuori dalla Valle d'Aosta

Profilassi ambientale _____

Presenza di altri animali SI NO

Quali? _____

Tutti gli animali erano in buona salute e nessuna delle 28 stalle visitate era solita attuare una profilassi ambientale per il controllo delle zecche.

A tutti i soggetti sono stati prelevati circa 5ml di sangue dalla vena coccigea.

Il sangue prelevato è stato versato in provette contenenti EDTA K3 (tappo violetto) poi subito congelate.

I campioni sono stati, in seguito, trasportati presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Settore di Parassitologia Veterinaria, facendo attenzione a mantenere la catena del freddo.

Nei laboratori della Facoltà i campioni, una volta scongelati, sono stati estratti con il Kit GenomeElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep prodotto dalla Sigma-Aldrich secondo il medesimo protocollo di estrazione utilizzato per l'estrazione da sangue di cane.

Su tutti gli estratti è stata poi eseguita la PCR catch-all sfruttando il medesimo protocollo usato per i campioni ematici di cane.

Comune	N° soggetti campionati	N° soggetti autoctoni
Gressan	10	10
Charvensod	10	9
Vèrres	10	10
Issogne	10	10
Arvier	10	10
Saint Vincent	10	10
Saint Pierre	10	10
Roisan	10	10
Aosta	10	10
Champdepraz	10	10
Fènis	10	9
Brissogne	10	10
Aymavilles	10	10
Jovençan	10	10
Sarre	10	10
Pollein	10	10
Verrayes	10	10
Chambave	10	10
Nus	10	9
Saint Marcel	10	10
Saint Christophe	10	10
Quart	10	10
Pré Saint Didier	10	10
Avise	10	10

La Salle	10	10
Morgex	10	10
Pont Saint Martin	10	10
Donnas	10	10

RISULTATI

Vista la mancanza di dati precedenti questo studio, riguardanti la presenza o meno di *Babesia spp* in Valle d'Aosta; la diffusione, così come la presenza del patogeno non poteva essere prevista in maniera attendibile.

Grazie alla scheda compilata in sede di campionamento si sono potuti distinguere, fra i soggetti positivi, quelli autoctoni, cioè nati e allevati in Valle d'Aosta, da quelli alloctoni, cioè nati in Piemonte per poi essere acquistati in seguito da allevatori valdostani.

In totale i soggetti positivi a PCR per *Babesia* risultano 8 di cui 7 autoctoni e 1 alloctono, per una percentuale di soggetti autoctoni positivi pari al 2,5%.

Nessuno dei soggetti risultati positivi presentava sintomatologia clinica ascrivibile a infezione da *Babesia spp*.

I comuni con presenza di soggetti positivi a PCR risultano i seguenti:

Nus, Saint Christophe e Saint Marcel.

Dato interessante risulta la positività al test di 5 bovini provenienti tutti dallo stesso allevamento localizzato nel comune di Nus.

Comune	N° soggetti campionati	N° soggetti autoctoni	Positivi PCR	Positivi autoctoni
Gressan	10	10		
Charvensod	10	9		
Vèrres	10	10		
Issogne	10	10		
Arvier	10	10		
Saint Vincent	10	10		
Saint Pierre	10	10		
Roisan	10	10		
Aosta	10	10		
Champdepraz	10	10		
Fènis	10	9		
Brissogne	10	10		
Aymavilles	10	10		
Jovençon	10	10		
Sarre	10	10		
Pollein	10	10		
Verrayes	10	10		
Chambave	10	10		
Nus	10	9	5	4
Saint Marcel	10	10	1	1
Saint Christophe	10	10	2	2
Quart	10	10		
Pré Saint Didier	10	10		
Avise	10	10		
La Salle	10	10		

Morgex	10	10		
Pont Saint Martin	10	10		
Donnas	10	10		

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano come la Valle d'Aosta non possa più considerarsi una regione indenne da *Babesia spp.*

Le percentuali di positività nella popolazione bovina risultano molto basse, la presenza di soggetti positivi può dunque essere ascrivibile sia al largo ricorso al pascolamento adottato nell'allevamento in Valle d'Aosta, sia alla mancata profilassi a livello ambientale.

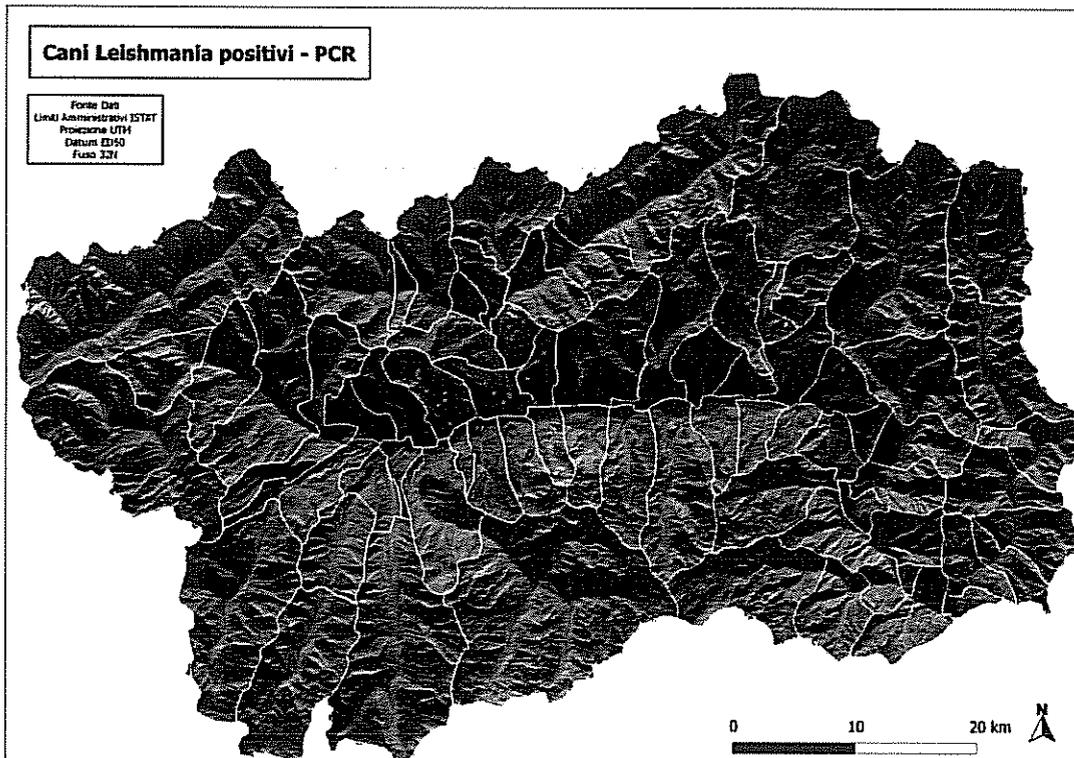
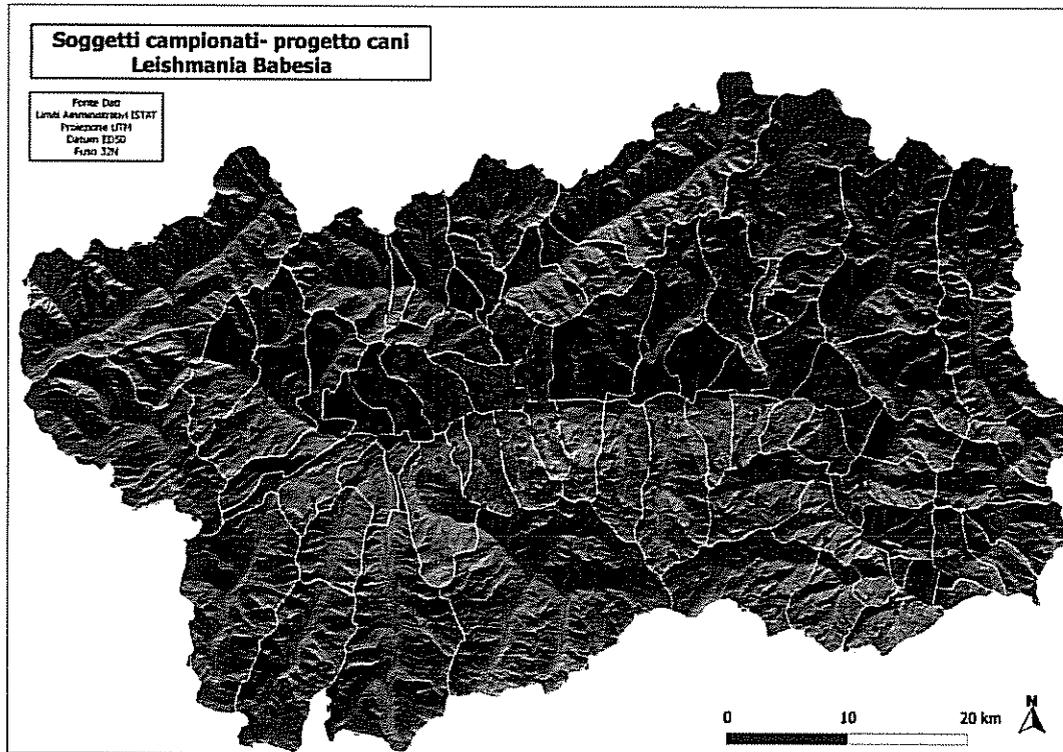
Nonostante la specie bovina, al contrario di quella canina, non sia solita manifestare, in seguito all'infezione di *Babesia spp.*, sintomi clinici gravi (anemia, ittero, febbre e trombocitopenia e morte), non è da sottovalutare un coinvolgimento di questo patogeno in episodi di calo di rendimento nelle produzioni alimentari sia per quanto riguarda la filiera del latte che quella delle carni.

Non essendo possibile nel bovino l'uso di antiparassitari esterni, in quanto essi residuerebbero nelle carni e nelle secrezioni come il latte, si consiglia semplicemente l'utilizzo di insetticidi ad azione residua nelle stalle.

Il reperimento di soggetti autoctoni positivi, dimostra come anche la nostra regione, nel corso degli anni, sia stata oggetto di cambiamenti climatici importanti tali da determinare la presenza di un patogeno tipico di altre regioni più a sud; gli spostamenti di animali (compravendite, fiere ... ecc) al di fuori del territorio regionale aumentano, inoltre, il rischio di contrazione e diffusione di nuove patologie.

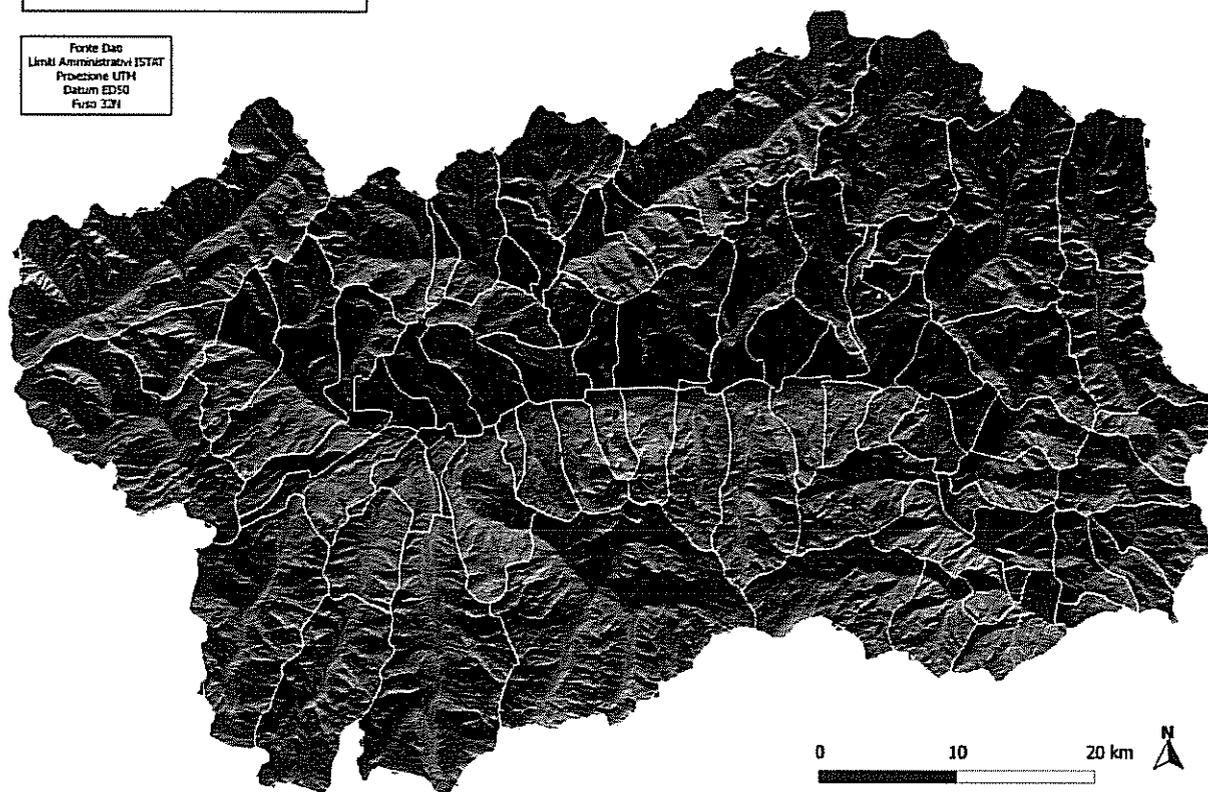
La Babesiosi, dunque, non risulta più come una malattia assente in Valle d'Aosta, ma come una patologia, per ora, emergente e destinata lentamente a diffondersi.

Mappe di distribuzione



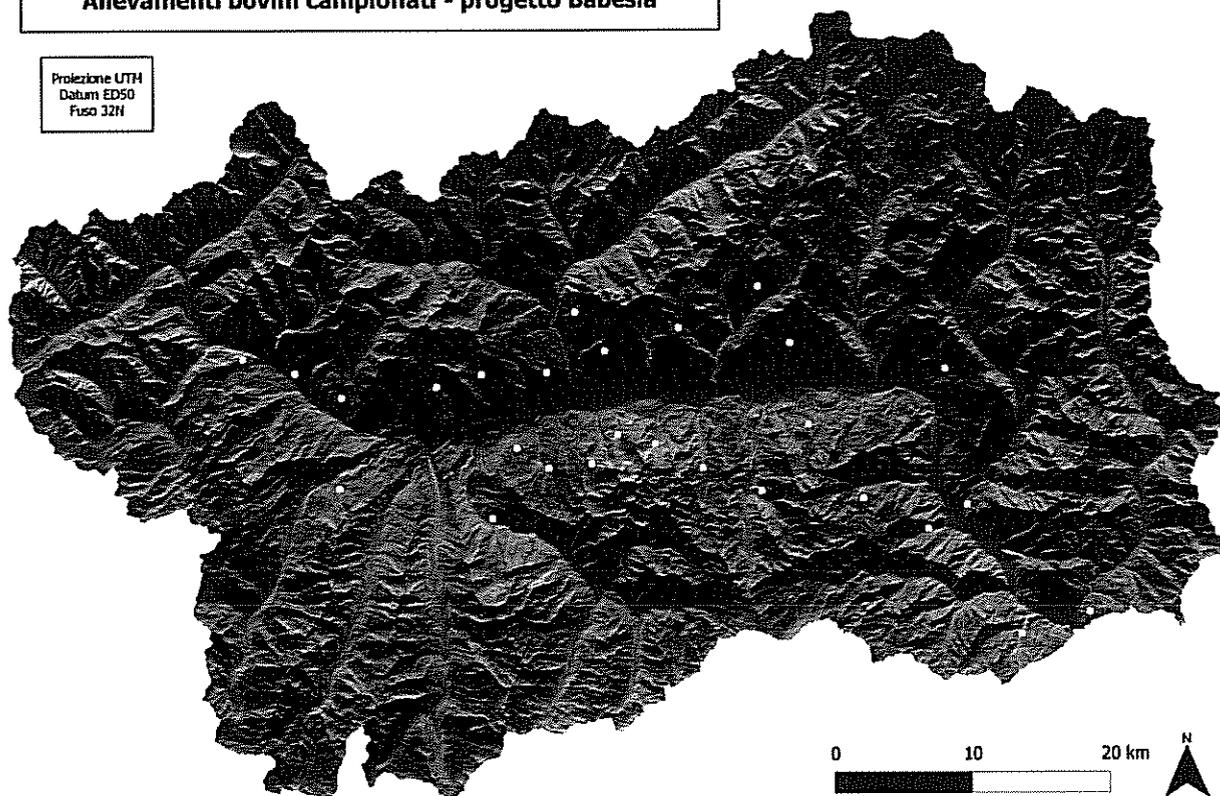
Cani Babesia positivi - PCR

Fonte Dati
Limiti Amministrativi ISTAT
Proiezione UTM
Datum ED50
Fuso 33N



Allevamenti bovini campionati - progetto Babesia

Proiezione UTM
Datum ED50
Fuso 32N



Allevamenti Bovini Babesia- PCR positivi

Fonte Dati
Limiti Amministrativi ISTAT
Proiezione UTM
Datum ED50
Fuso 32N

