

## PREVALENZA DELL'INFEZIONE DA EMOPARASSITI IN SPECIE DI AVIFAUNA SELVATICA IN EMILIA ROMAGNA

Fregnani G.<sup>1</sup>, Massi P.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>, Romboli C.<sup>1</sup>, Bocciero R.<sup>1</sup>, Scaravelli D.<sup>1</sup>, Parigi M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Forlì

### Abstract

Although the presence and the effects of Haemoparasites in feral birds are widely studied in various parts of the world, data on their diffusion in Italy are scarce. The aim of this study was to evaluate the prevalence of *Haemoproteus/Plasmodium* and *Leucocytozoon* in feral pigeons (*Columba livia*) and magpies (*Pica pica*) of the Emilia-Romagna region. A total of 215 spleens collected from culled or dead animals were screened using a nested polymerase chain reaction (nPCR) that amplifies a partial segment of the mitochondrial cytochrome *b* gene of these parasites. Magpies resulted significantly more parasitized by *Leucocytozoon* spp than pigeons (70.3% vs 5.1%), whereas both species presented a similar prevalence of *Haemoproteus/Plasmodium* spp. (24.3% vs 23%). A small percentage of animals was infected by both parasites (7.5%), mainly represented by magpies. Among pigeons, the prevalence of the parasites was significantly different in the geographical areas investigated. Further genomic studies are necessary in order to evaluate the parasites species and the lineages circulating among this population of feral birds.

### INTRODUZIONE

Le infezioni parassitarie esercitano una forte pressione di selezione nei confronti dei loro ospiti e sono responsabili delle dinamiche coevolutive dei meccanismi di difesa dell'ospite e dell'adattamento del parassita a questi (Dieckmann 2002).

Numerosi studi, europei e mondiali, riguardanti la ricerca di emoparassiti nell'avifauna selvatica e no (Al-Barwari and Saeed 2012), hanno riportato che oltre il 50% delle diverse specie di uccelli esaminati risulta infetto; gli emoparassiti più frequentemente ricercati e studiati appartengono ai tre generi *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, (Atkinson and van Riper 1991) tutti trasmessi mediante la puntura di insetti ematofagi vettori. Clinicamente, negli uccelli selvatici, tali infezioni possono risultare inapparenti o presentarsi con sintomi blandi quali inappetenza, dimagrimento e debolezza, che possono essere riscontrati più frequentemente negli animali giovani (Ozmen and Haligur 2005; Zhang et al. 2014). Inoltre, è importante tener conto del fatto che molto spesso tali ospiti sono infettati simultaneamente da diverse specie di parassiti e che proprio queste coinfezioni sono tra le maggiori cause dell'evoluzione della virulenza (Arriero and Moller 2008).

Per quanto concerne l'Italia, gli unici dati disponibili sull'argomento sono stati riportati in due recenti lavori dell'Università di Torino che riportano la prevalenza di questi generi di emoparassiti in piccioni e cornacchie grigie abbattuti nella suddetta provincia (Scaglione et al. 2015; Scaglione et al. 2016).

Nel nostro studio, per la prima volta, abbiamo osservato la distribuzione e la prevalenza di *Haemoproteus spp./Plasmodium spp.* e *Leucocytozoon spp.* in columbidi e

corvidi rinvenuti sul territorio della provincia di Forlì- Cesena nell'ambito del Piano di Monitoraggio Sanitario della fauna selvatica in Emilia Romagna.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra febbraio e maggio del 2016 sono state conferite presso la sezione di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) 215 carcasse di columbidi e corvidi raccolti in diverse aree della provincia di Forlì-Cesena (FC) nell'ambito del Piano di Monitoraggio Sanitario della fauna selvatica in Emilia Romagna.

Ai fini della ricerca degli emoparassiti, da ciascuna carcassa è stata prelevata la milza. Precedentemente all'estrazione del DNA, ciascun campione è stato addizionato con 1000µl di Tris-EDTA buffer solution (1X), vortexato fino alla sua completa omogeneizzazione e sottoposto a tre cicli di congelamento /scongelo per ottenere una migliore rottura tissutale. I campioni sono stati, poi, centrifugati a 3000xg per 7 minuti e dal surnatante sono stati prelevati 200µl per l'estrazione semi-automatica degli acidi nucleici mediante estrattore KingFisher Flex (Thermo Scientific) utilizzando il Kit Biosprint ALL IN ONE VET (Qiagen).

L'estratto è stato analizzato mediante una nested PCR (nPCR) in grado di amplificare un segmento parziale del citocromo b mitocondriale dei parassiti del genere *Haemoproteus/Plasmodium* e *Leucocytozoon* (Hellgren et al. 2004).

Con la prima PCR (HaemNFI-5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3'; Haem NF3 5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') è stato amplificato un tratto del DNA mitocondriale comune a tutte e tre le specie di parassiti, mentre nella seconda PCR sono state utilizzate due diverse coppie di primers, una specifica per i generi *Haemoproteus* e *Plasmodium* (HaemF 5'-TGGTGCTTTCGATATATGCATG-3'; HaemR2 5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3') (Bensch et al. 2000) e l'altra specifica per il genere *Leucocytozoon* (HaemFL 5'-ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3'; HaemR2L 5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC-3') (Hellgren et al. 2004).

Nella prima PCR sono stati utilizzati 5µl di templat di estrazione, mentre nella seconda PCR il templat era costituito da 3 µl di amplificato della prima PCR. La reazione di amplificazione ha previsto un'incubazione di 15 minuti a 95°C seguita da 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C e 45 secondi a 72°C per 20 cicli nella prima PCR e 35 nella seconda PCR, con un'elongazione finale a 72°C per 10 minuti. I prodotti della seconda PCR sono stati fatti correre su un gel di agarosio all'1,7% ed i campioni sono stati considerati positivi in presenza di una banda di 480 bp per *Haemoproteus* spp./*Plasmodium* spp. e di 478 bp per *Leucocytozoon* spp.

L'analisi statistica è stata eseguita mediante software SPSS v.20 (SPSS Inc., Chicago, IL). L'associazione tra il sesso, la specie o il luogo di ritrovamento è stata valutata utilizzando il test del chi-quadrato oppure il test esatto di Fisher ed è stato considerato statisticamente significativo un valore di p inferiore o uguale a 0.05.

## RISULTATI

Dei 215 animali conferiti, l'82.8% (178/215) erano piccioni (*Columba livia*) ed il 17,2% (37/215) gazze (*Pica pica*), catturati ed abbattuti in 2 ambiti territoriali di caccia (ATCFO1 e ATCFO2) della Provincia di Forlì-Cesena nell'ambito del Piano di Monitoraggio della Fauna Selvatica della regione Emilia-Romagna (Tabella 1). In particolare, all'interno dell'ATCFO1 gli animali erano stati abbattuti in 7 diverse frazioni di 3

diversi comuni (Forlì, Forlimpopoli e Meldola), mentre tutti gli animali nell'ATCFO2 erano stati abbattuti nella stessa frazione del comune di Cesena (Calisese). Tutte le gazze analizzate (37/215) provenivano unicamente da due località dell'ATCFO1 (Tabella 1), mentre i piccioni provenivano da 6 zone dell'ATCFO1 e dall'unica dell'ATCFO2. Il 32.1% (69/215) dei campioni analizzati è risultato positivo per almeno un emoparassita, con il 62.3% (43/69) rappresentato da piccioni ed il 37.7% (26/69) da gazze (p=0.00). Nello specifico per *Haemoproteus/Plasmodium*, sono risultati positivi il 24.3% (9/37) delle gazze ed il 23% (41/178) dei piccioni (p>0.05), mentre per *Leucocytozoon* sono risultati positivi il 70.3% (26/37) delle gazze ed il 5.1% dei piccioni (9/178) (p=0.00) testati. Il 7.5% (16/215) degli animali è risultato infetto per entrambi i parassiti, in particolare il 24.3% delle gazze (9/37) ed il 3.9% dei piccioni (7/178) (p=0.001). Per entrambe le specie animali non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra la prevalenza di infezione ed il sesso.

Per quanto riguarda la prevalenza di infezione per *Haemoproteus/Plasmodium* e *Leucocytozoon* nelle diverse aree geografiche, nelle gazze non sono state rilevate differenze statisticamente significative (Tabella 1). Al contrario, nei piccioni, la prevalenza di infezione sia per *Haemoproteus/Plasmodium* sia per *Leucocytozoon* è risultata diversa nelle varie zone (p=0.00) con gli animali abbattuti nel comune di Forlimpopoli (frazione Selbagnone) che presentavano i più alti valori di prevalenza 26.8% (11/41) per *Haemoproteus/Plasmodium* e quelli abbattuti nel comune di Meldola, 66.7% (6/9), per *Leucocytozoon*. Al contrario, tutti i piccioni abbattuti nell'ATCFO2 sono risultati negativi per entrambe le ricerche.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo studio è stata ricercata, per la prima volta, la presenza degli emoparassiti aviari *Haemoproteus* spp./*Plasmodium* spp. e *Leucocytozoon* spp. in alcune aree della provincia di Forlì-Cesena. Nonostante il substrato più idoneo per la ricerca di tali parassiti sia rappresentato dal sangue periferico, l'aver a disposizione unicamente animali abbattuti o rinvenuti morti sul territorio ci ha vincolato all'utilizzo della milza; tale organo, come già dimostrato da Scaglione et al. (2015 e 2016), si è rivelato, comunque, un buon substrato di analisi, essendo di facile prelievo ed ampiamente perfuso. La nostra ricerca si è concentrata sulle due specie aviari che maggiormente, nel nostro territorio, sono sottoposte a controllo di popolazione, il piccione (*Columba livia*), il cui stato di infezione viene da tempo studiato in diverse aree geografiche, Italia compresa, e la gazza (*Pica pica*), corvide per il quale, invece, sono disponibili scarse informazioni in letteratura.

Dal confronto dei dati da noi ottenuti con quelli di Scaglione et al., (2015), nei piccioni la prevalenza di infezione è risultata inferiore sia per *Haemoproteus* spp./*Plasmodium* spp. (23% vs 29.4%) sia per *Leucocytozoon* spp., (5.1% vs 15.7%). Per quanto riguarda i dati relativi alla prevalenza degli stessi parassiti nelle gazze, il confronto è stato fatto con un'altra specie di corvide, la cornacchia grigia, analizzata sempre da Scaglione et al. nel 2016. Nonostante la prevalenza di infezione da noi ottenuta sia risultata nuovamente inferiore per entrambe le ricerche parassitarie, 24.3% vs 59.6% per *Haemoproteus* spp./*Plasmodium* spp. e 70.3% vs 97,9 % per *Leucocytozoon* spp, anche nel nostro territorio *Leucocytozoon* spp. è risultato essere maggiormente presente nei corvidi rispetto ai columbidi. Degno di osservazione è anche il riscontro di una bassa presenza di coinfezioni negli animali analizzati (7.5%; 16/215), in quanto la

contemporanea presenza di due o più emosporidi risulta, invece, essere comune nella fauna selvatica (Jarvi et al. 2002). Ad ogni modo, le gazze sono risultate la specie che con più frequenza ha presentato coinfezioni (56.3%; 9/16); considerando che proprio queste coinfezioni sono tra le maggiori cause dell'evoluzione della virulenza di un parassita (Arriero and Moller 2008), è necessario procedere con l'analisi genomica dei campioni positivi così da avere informazioni più precise circa il loro impatto sul sistema immunitario degli animali ospiti.

Valutando le differenze di prevalenza in base al sesso degli animali, diversi gruppi di ricerca sostengono che le femmine siano sottoposte ad una maggiore pressione parassitaria a causa dei loro ridotti spostamenti durante il periodo riproduttivo, indicativamente da marzo a ottobre (Valkiunas G. 2005; Al-Barwari and Saeed 2012). Queste differenze non sono state rilevate nel nostro studio, nonostante il periodo di campionamento coincidesse con la prima parte del periodo riproduttivo di entrambe le specie aviarie analizzate. Questo non stupisce per quanto riguarda i piccioni, in quanto entrambi i sessi partecipano alla cova delle uova; diversamente nelle gazze, dove la cova delle uova viene effettuata unicamente dalle femmine, possiamo ipotizzare un'elevata presenza dei vettori di trasmissione, in particolare di *Leucocytozoon* oppure che i momenti infettivi avvengano durante le fasi di aggregazione quando entrambi i sessi si riuniscono in gruppi numerosi post-riproduttivi.

Per quanto riguarda le differenze in termini di prevalenza nelle diverse aree, gli animali (sia piccioni sia gazze) catturati nella zona pedecollinare del comune di Meldola hanno presentato elevate prevalenze sia per *Leucocytozoon* spp. (66.7% e 61.5% rispettivamente) sia per *Haemoproteus/Plasmodium* (24.4% e 77.8% rispettivamente) facendo ipotizzare una maggior presenza, in quest'area, dei vettori di trasmissione, rappresentati da ditteri della famiglia dei Simuliidae), dei Ceratopogonidae e da zanzare dei generi *Culex*, *Aedes* e *Culiseta* (Zhang et al. 2014). Tale ipotesi viene avvalorata dalle recenti segnalazioni, nella medesima area, di alcuni focolai di leishmaniosi canina ed umana, anch'essa malattia protozoaria trasmessa mediante la puntura di ditteri ematofagi del genere *Phlebotomus*. In futuro, ulteriori indagini di tipo genomico ci potranno delucidare sulle specie di *Haemoproteus/Plasmodium* e *Leucocytozoon* spp. circolanti, sulla eventuale presenza di *lineages* parassitari in grado di infettare contemporaneamente diversi ospiti e sulla loro origine filogenetica.

## BIBLIOGRAFIA

- Al-Barwari, S. and S. Saeed (2012). "The Parasitic Communities of the Rock Pigeon *Columba livia* from Iraq: Component and Importance." *Turkiye Parazitol. Derg.* **36**(232-239).
- Arriero, E. and A. P. Moller (2008). "Host ecology and life-history traits associated with blood parasite species richness in birds." *J Evol Biol* **21**(6): 1504-1513.
- Atkinson, C. T. and C. van Riper III (1991). Pathogenicity and epizootiology of avian ematozoa: Plasmodium, Leucocytozoon and Haemoproteus. *Bird-parasite interactions: Ecology, Evolution and Behaviour*. O. U. Press. Oxford, UK.: 19-48.
- Bensch, S., M. Stjernman, et al. (2000). "Host specificity in avian blood parasites: a study of Plasmodium and Haemoproteus mitochondrial DNA amplified from birds." *Proc Biol Sci* **267**(1452): 1583-1589.

- Dieckmann, U. (2002). Adaptive dynamics of pathogen-host interaction. *Adaptive dynamics of infectious diseases*. C. U. Press. Cambridge, UK.
- Hellgren, O., J. Waldenstrom, et al. (2004). "A new PCR assay for simultaneous studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus from avian blood." *J Parasitol* **90**(4): 797-802.
- Jarvi, S. I., J. J. Schultz, et al. (2002). "PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines." *J Parasitol* **88**(1): 153-158.
- Ozmen, O. and M. Haligur (2005). "A Study on the Presence of Leucocytozoonosis in Wild Birds of Burdur District." *Turk J Vet Anim Sci.* **29**: 1273-1278.
- Scaglione, F. E., F. T. Cannizzo, et al. (2016). "Blood parasites in hooded crows (*Corvus corone cornix*) in Northwest Italy." *Vet Ital* **52**(2): 111-116.
- Scaglione, F. E., P. Pregel, et al. (2015). "Prevalence of new and known species of haemoparasites in feral pigeons in northwest Italy." *Malar J* **14**: 99.
- Valkiunas G. (2005). *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. Boca Raton, CRC Press.
- Zhang, Y., Y. Wu, et al. (2014). "Prevalence patterns of avian Plasmodium and Haemoproteus parasites and the influence of host relative abundance in southern China." *PLoS One* **9**(6): e99501.

Specie	ATCFO	Comune	Frazione	Altitudine	N°positivi in ciascuna area/ totale positivi per H/P (*)	N°positivi in ciascuna area/ totale positivi per Leucocytozoon
GAZZE	1	Forlì	Branzolino	14m s.l.m	22.2% (2/9)	38.5% (10/26)
	1	Meldola	/	58m s.l.m	77.8% (7/9)	61.5% (16/26)
PICCIONI	2	Cesena	Calisese	49m s.l.m	0% (0/41)	0% (0/9)
	1	Forlì	Casemurate	18m s.l.m	9.8% (4/41)	0% (0/9)
	1	Meldola	/	58m s.l.m	24.4% (10/41)	66.7% (6/9)
	1	Forlì	Pievequinta	19m s.l.m	9.8% (4/41)	11.1% (1/9)
	1	Forlì	Ravaldino	150m s.l.m	22% (9/41)	11.1% (1/9)
	1	Forlimpopoli	S. Leonardo	26m s.l.m	7.3% (3/41)	0% (0/9)
	1	Forlimpopoli	Selbagnone	35m s.l.m	26.8% (11/41)	11.1% (1/9)

**Tabella 1:** N° gazze e piccioni positivi per ciascuna specie parassitaria nelle diverse zone geografiche. (\*)H/P: Haemoproteus spp. e Plasmodium spp.