

PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2021”
RELAZIONE FINALE

N. identificativo progetto: IZS LT 10/21 RC

Progetto presentato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”

Area tematica: Sanità animale

**Titolo del progetto: Modello di sorveglianza sanitaria
integrata per l’infestazione da *Baylisascaris procyonis* in
Provincia di Arezzo**

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

Responsabile Scientifico: Andrea Lombardo

SINTESI

Titolo: Modello di sorveglianza sanitaria integrata per l'infestazione da *Baylisascaris procyonis* in Provincia di Arezzo.

Il procione (*Procyon lotor*) è un mesocarnivoro originario del Nordamerica, introdotto gradualmente in Asia ed Europa come specie aliena invasive; gioca un ruolo epidemiologico critico sia come ospite di numerose specie di endoparassiti, sia come eliminatore di agenti zoonotici. Tra questi, l'ascaride *Baylisascaris procyonis* (Bp) è responsabile di una grave forma di sindrome da *larva migrans* in numerose specie animali, incluso l'uomo. Il procione è storicamente presente in Italia con due popolazioni distinte: la prima è stata descritta nel 2004 in Lombardia, nella valle dell'Adda (attualmente eradicata); la seconda, nota dal 2013 in Toscana, in Provincia di Arezzo. Dal 2017 è in vigore un piano nazionale di eradicazione del procione, affiancato dall'indagine sanitaria delle carcasse. A seguito del primo isolamento di Bp in provincia di Arezzo nel 2021, il Ministero della Salute ha finanziato il presente progetto di ricerca al fine di indagare la prevalenza, la distribuzione ed i fattori di rischio di Bp.

I work package (WPs) del progetto comprendono:

- La creazione di una rete di raccolta campioni e carcasse, in collaborazione con le Autorità Locali.
- Lo sviluppo di strumenti specifici per la diagnosi di laboratorio di Bp nel procione ed in altre specie sensibili (identificazione morfometrica e conta dei parassiti adulti, isolamento ed identificazione degli stadi larvali, tecniche coprologiche per la ricerca di uova infestanti, tecniche molecolari e di sequenziamento)
 - Analisi di laboratorio: 102 carcasse di procione sono state sottoposte ad esame necroscopico, focalizzato principalmente sul recupero dei parassiti adulti e sulle lesioni parassitarie. Campioni di polmone, milza, muscoli scheletrici, intestino, vescica urinaria, feci e lavaggio coanale sono stati raccolti ed esaminati per un'ampia gamma di malattie parassitarie, tra cui capillariosi respiratoria e urinaria (ispezione macroscopica, lavaggio, flottazione e tecniche di Baermann), *Trichinella* spp. (digestione artificiale), elmintiasi gastrointestinale (ispezione macroscopica, flottazione, Flotac®, sedimentazione, istologia intestinale), protozoi intestinali come *Eimeria*, *Giardia*, *Cryptosporidium* (Flotac®, tecniche di immunofluorescenza) e *Leishmania infantum* (PCR). I campioni positivi per Bp sono stati ulteriormente confermati mediante sequenziamento (NGS).
 - 169 carcasse appartenenti a potenziali specie parateniche (mammiferi e uccelli), trovate morte e raccolte all'interno dell'areale stimato della popolazione di procioni. Campioni di polmone, fegato, muscoli scheletrici e cervello sono stati raccolti e sottoposti a istopatologia, digestione artificiale e tecnica Baermann modificata per il rilevamento di larve migranti di Bp, come descritto da Kazacos (2001)
 - Campioni fecali provenienti da 30 carcasse di lupo (*Canis lupus*) e 15 cani domestici (*Canis lupus familiaris*) sono stati analizzati per il rilevamento di uova di Bp utilizzando la tecnica di flottazione.
 - Genotipizzazione degli isolati di procione e Bp, al fine di formulare ipotesi sulla loro origine

- È stato progettato e implementato un sistema di fototrappolaggio del territorio a rischio, per identificare l'ubicazione delle latrine e raccogliere campioni ambientali per il rilevamento e il conteggio delle uova di Bp.
- E' stata applicata l'analisi GIS per identificare una zona ad alto rischio di esposizione a procioni e Bp
- È stata identificata una coorte di pazienti umani potenzialmente esposti. È stata stabilita una collaborazione con il CDC (Purdue University, USA) per eseguire un'indagine sierologica.
- Dati e informazioni sui rischi da Bp sono stati sviluppati e diffusi attraverso siti web, brochure, papers, webinars e seminari.

I risultati hanno confermato la presenza di diversi protozoi e nematodi nella popolazione di procioni dell'Italia centrale: Bp (31/102; 30,4%), Capillariidae (10/102; 9,8%), *Pearsonema* sp. (10/102; 9,8%), *Ancylostomatidae* (10/102; 9,8%), *Eimeria* sp. (2/102; 1,9%), *Cryptosporidium* sp. (2/102; 1,9%), *Strongyloides* spp (1/102; 0,9%). Bp non è stato rilevato negli ospiti paratenici e in altri carnivori portatori dell'infezione intestinale (lupi e cani), suggerendo che nei nostri territori la malattia è ancora limitata all'ospite definitivo. Tutti i procioni campionati appartengono all'aplotipo PLO2a, lo stesso di una popolazione allevata in cattività in un vicino zoo. I procioni ed i loro parassiti hanno probabilmente una comune origine da un evento di fuga, avvenuto all'inizio degli anni 2010. E' stata identificata una *core-zone* di circa 160 Km², nella quale i procioni positivi per Bp sembrano essere più concentrati. Tale zona è caratterizzata prevalentemente da boschi, montagne e campagne; non sono presenti allevamenti di animali o grandi attività produttive antropiche. Non sono state rilevate latrine di procione all'interno della *core-zone*, suggerendo che la popolazione italiana di procioni non produce latrine, o piuttosto, che le latrine si trovano in siti remoti e inaccessibili. Sono state sviluppate linee guida e raccomandazioni sulla presenza della Bp, sul suo ciclo vitale, sui fattori di rischio e sulle buone pratiche; tale materiale è stato diffuso attraverso un sito web, brochures, documenti scientifici ed articoli, webinars e seminari. E' stata individuate e selezionata una popolazione di circa 50 pazienti tra veterinari, cacciatori e tecnici potenzialmente esposti. Tale popolazione si sottoporrà ad un'indagine sierologica conoscitiva, in collaborazione con il CDC, prevista per il 2025. In conclusione, seppure l'infezione sembri limitata alla sola specie procione, l'eradicazione/controllo di questa specie aliena e l'attuazione di programmi di sorveglianza delle malattie correlate sono obbligatori e ancora necessari alla gestione dei rischi da Bp in Casentino.

Parole chiave: *Procyon lotor*, *Baylisascaris procyonis*, larva migrans

SUMMARY

Title: Integrated health surveillance model of *Baylisascaris procyonis* infection in the Arezzo Province

The raccoon (*Procyon lotor*) is a mesocarnivore native to Northern America, gradually introduced into Asia and Europe and referred to as an alien invasive species. The raccoon can play a critical role both as a host to many endoparasites and as environmental shedder of zoonotic agents. Among them, the ascarid *Baylisascaris procyonis* (Bp) causes a severe *larva migrans* syndrome in several animal species, including humans. Raccoons are present in Italy in two separate populations: the first one was reported in 2004 in Lombardy along the southern part of the Adda river, and the second one was reported since 2013 in Tuscany in the Province of Arezzo. Since 2017, an official eradication plan has been implemented along with a sanitary investigation of the carcasses. After the first report of Bp in raccoons from Arezzo in 2021, the Italian Ministry of Health funded the present research program to investigate Bp presence, distribution and risk factors.

The project work packages (WPs) encompass:

- The implementation of a network for samples and carcasses collection, in collaboration with local Authorities
- The development of direct diagnostic tools for Bp detection in raccoon and other hosts were developed (adult parasites morphometric identification and count, larvae isolation and detection, coprologic techniques for eggs detection, molecular techniques and sequencing)
- Laboratory analysis:
 - 102 raccoon carcasses were submitted to necroscopic examination, focusing mainly on adult parasites recovery and parasitic lesions. Samples of lung, spleen, skeletal muscles, gut, urinary bladder, feces and coanal flushing were collected and examined for a broad range of parasitic diseases, including respiratory and urinary capillariosis (macroscopic inspection, flushing, flotation and Baermann techniques), *Trichinella* spp. infection (artificial digestion), gastrointestinal helminthiasis (macroscopic inspection, flotation, Flotac®, sedimentation, gut histology), intestinal protozoa such as *Eimeria*, *Giardia*, *Cryptosporidium* (Flotac®, immunofluorescent techniques), and *Leishmania infantum* (PCR). Bp positive samples were further confirmed by molecular sequencing (NGS).
 - 169 carcasses belonging to potential paratenic host species (mammals and birds), found dead and collected within the estimated raccoon population home range. Lung, liver, skeletal muscles and brain samples were collected and submitted to histopathology, artificial digestion and modified Baermann techniques for detection of Bp migrating larvae, as described by Kazacos (2001).
 - Faecal samples from 30 wolves carcasses (*Canis lupus*) and 15 domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) were analyzed for the detection of Bp eggs using the flotation technique.
 - Raccoon and Bp isolates genotyping, in order to formulate hypothesis about their origin

- A phototrapping network system was designed and implemented in order to identify raccoon latrines and collect environmental samples for Bp eggs detection and count.
- Spatial GIS analysis was applied to identify a high risk zone for raccoon and Bp exposure
- A cohort of potentially-exposed human patients was identified. A collaboration with CDC (Purdue University, USA) was established in order to perform a serologic investigation.
- Data and information about Bp risks were developed by means of websites, brochure, papers, webinars and seminars.

The results showed the presence of different Protozoa and Nematodes in the Central Italy raccoon population was confirmed: Bp (31/102; 30.4%), Capillariidae (10/102; 9.8%), *Pearsonema* sp. (10/102; 9.8%), Ancylostomatidae (10/102; 9.8%), *Eimeria* sp. (2/102; 1.9%), *Cryptosporidium* sp. (2/102; 1.9%), *Strongyloides* spp (1/102; 0.9%). Bp was not detected in paratenic hosts and other carnivores (wolves and dogs), suggesting that Bp infection is still limited to raccoons in our territories. All sampled raccons belongs to aplotype PLO2a, the same of a captive population kept in a near zoo. Raccoon and their parasites probably originate from an escape event in the early 2000's. This study confirms the demonstrated role as a carrier of parasites of concern for human and animal health, foremost Bp. We identified a core-zone of about 160 Km², in which Bp positive raccoon seem to be more concentrated. Such area is characterized mainly by woods, mountans and countryside; no animal farms or large human activities are present. Raccoon latrines were not detected within the core zone, suggesting that the Italian raccoon population do not produce latrines, or rather the latrines are located in remote and inaccessible sites. Guidelines and recommendations about Bp presence, lifecycle, risk factors and good practice have been developed by means of a website, brochure, papers, webinars and seminars. A population of about 50 patients among vets, hunters and technicians has been selected for a serologic investigation, in collaboration with CDC, scheduled for 2025. In conclusion, even though the infection seems to be limited to the raccoon, the eradication/control of this alien species and the implementation of related disease surveillance programs is mandatory and further investigations are still necessary in order to manage Bp risks in Casentino Valley.

Key words: *Procyon lotor*, *Baylisascaris procyonis*, larva migrans