



RAPPORTI ISTISAN 22|22

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Sorveglianza delle zanzare in Italia

A cura di
M. Di Luca



EPIDEMIOLOGIA
E SANITÀ PUBBLICA

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Sorveglianza delle zanzare in Italia

A cura di
Marco Di Luca

Dipartimento Malattie Infettive

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
22/22

Negli ultimi anni l'Italia è stata colpita da epidemie riconducibili alle Malattie Trasmesse da Vettori (MTV), quali febbre del West Nile, chikungunya e dengue. Le MTV, fortemente influenzate da clima e ambiente, possono presentare cicli di trasmissione complessi. Per migliorare la *preparedness* e le capacità di risposta, è necessario adottare un approccio di intervento integrato (*One Health*), di cui la sorveglianza entomologica è parte essenziale. La raccolta del dato entomologico permette di valutare il rischio di diffusione di una MTV, ma risulta altrettanto cruciale per indirizzare interventi di controllo e valutarne l'efficacia. Per questo motivo è nata l'idea di condividere conoscenze ed esperienze relative alla sorveglianza entomologica, in particolare delle zanzare. Viene presentato lo stato dell'arte, sia di quei sistemi di sorveglianza attualmente operativi sul territorio, sia di quelle esperienze, limitate nel tempo, frutto di specifici progetti-pilota.

Parole chiave: Sorveglianza in sanità pubblica; Zanzare; Arbovirus

In recent years, Italy has been affected by epidemics attributable to Vector-Borne Diseases (VBDs), such as West Nile Disease, chikungunya and dengue. VBDs, heavily influenced by climate and environment, can exhibit complex transmission cycles. To improve preparedness and responsiveness, it is necessary to adopt an integrated intervention approach (*One Health*), of which entomological surveillance is a pivotal part. The collection of entomological data makes it possible to assess the risk of VBD spreading, but it is equally crucial for directing control interventions and assessing their effectiveness. For this reason, the idea of sharing knowledge and experience relating to entomological surveillance, in particular of mosquitoes, was implemented. The state of the art is presented, both of those surveillance systems currently operating in the country, and of those experiences, limited in time, resulting from specific pilot-projects.

Key words: Public health surveillance; Mosquito vectors; Arboviruses

Questo rapporto è stato prodotto nell'ambito del Progetto "Rafforzare la formazione in entomologia di sanità pubblica degli operatori del SSN: identificazione, metodiche di sorveglianza e di controllo" realizzato con il supporto tecnico e finanziario del Ministero della Salute – Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria (2018).

Si ringraziano la Dott.ssa Sandra Salinetti del Servizio Comunicazione Scientifica per la sua preziosissima e puntuale collaborazione nella revisione editoriale del documento e il Dott. Francesco Severini del Dipartimento Malattie Infettive per il suo valido supporto tecnico-scientifico.

Per informazioni su questo documento scrivere a: marco.diluca@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Di Luca M (Ed.). *Sorveglianza delle zanzare in Italia*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2022. (Rapporti ISTISAN 22/22).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Silvio Brusaferro*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.

INDICE

Introduzione

<i>Marco Di Luca</i>	1
----------------------------	---

Piano nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle arbovirosi 2020-2025

<i>Patrizia Parodi</i>	5
------------------------------	---

PRIMA SEZIONE

Sorveglianza entomologica nei sistemi regionali di sorveglianza e risposta ai virus West Nile e Usutu

Sorveglianza dei vettori dei virus West Nile e Usutu in Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

<i>Rosanna Desiato, Alessandra Pautasso, Andrea Mosca, Federica Verna, Maria Cristina Radaelli, Serena Canola, Walter Mignone, Roberto Moschi, Enrica Berio, Riccardo Orusa, Tania Audino, Veronica Bellavia, Maria Caramelli, Paolo Roberto, Laura Chiavacci, Cristina Casalone</i>	15
--	----

Sorveglianza dei vettori dei virus West Nile e Usutu in Lombardia

<i>Francesco Defilippo, Monica Cerioli, Mario Chiari, Marco Farioli, Francesca Faccin, Sabrina Canziani, Tiziana Trogu, Marco Tironi, Enrica Sozzi, Ana Moreno, Antonio Lavazza, Davide Lelli</i>	28
---	----

Sorveglianza dei vettori dei virus West Nile e Usutu in Veneto e Friuli Venezia Giulia

<i>Michela Bertola, Fabrizio Montarsi</i>	40
---	----

Sorveglianza dei vettori dei virus West Nile e Usutu in Emilia-Romagna

<i>Mattia Calzolari, Paolo Bonilauri, Annalisa Grisendi, Giorgio Galletti, Romeo Bellini, Michele Dottori, Paola Angelini, Marco Tamba</i>	46
--	----

Sorveglianza dei vettori dei virus West Nile e Usutu nel Lazio e Toscana

<i>Adele Magliano, Arianna Ermenegildi, Irene Del Lesto, Federico Romiti, Claudio De Liberato</i>	57
---	----

Sorveglianza dei vettori dei virus West Nile e Usutu in Abruzzo e Molise

<i>Matteo De Ascentis, Michela Quaglia, Silvio Gerardo d'Alessio, Federica Iapaolo, Daniela Cioci, Carla Ippoliti, Annamaria Conte, Federica Monaco, Daniela Morelli, Giovanni Savini, Maria Goffredo</i>	63
---	----

Sorveglianza dei vettori dei virus West Nile e Usutu in Puglia e Basilicata

<i>Donato Antonio Raele, Ilaria Vasco, Leonardo Marino, Maria Assunta Cafiero</i>	72
---	----

Sorveglianza dei vettori dei virus West Nile e Usutu in Sardegna

<i>Cipriano Foxi, Stefano Cappai, Luigi Vento, Salvatore Ledda, Giuseppe Satta</i>	81
--	----

Sorveglianza dei vettori dei virus West Nile e Usutu in Sicilia

<i>Francesco La Russa, Valeria Blanda, Sara Mariolina Villari, Alessandra Torina</i>	87
--	----

SECONDA SEZIONE

Sorveglianza entomologica nei sistemi regionali di sorveglianza e risposta alle arbovirosi trasmesse da zanzare del genere *Aedes*

Monitoraggio della zanzara tigre in Piemonte

<i>Andrea Mosca, Cristina Grieco, Mirko Francesco Perna, Paolo Roberto</i>	101
--	-----

Monitoraggio della zanzara tigre in Veneto <i>Michela Bertola, Alice Michelutti, Fabrizio Montarsi</i>	110
Monitoraggio della zanzara tigre in Emilia-Romagna <i>Marco Carrieri, Alessandro Albieri, Paola Angelini, Claudio Venturelli, Carmela Matrangolo, Romeo Bellini</i>	116
Monitoraggio della zanzara tigre nel Lazio e in Toscana <i>Adele Magliano, Arianna Ermenegildi, Irene Del Lesto, Federico Romiti, Claudio De Liberato</i>	131

TERZA SEZIONE

Sorveglianza entomologica per prevenire l'introduzione e la diffusione di nuove specie di zanzare invasive

Prevenzione dell'introduzione e diffusione di specie esotiche invasive in Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta <i>Alessandra Pautasso, Rosanna Desiato, Andrea Mosca, Annalisa Accorsi, Valeria Listorti, Maria Cristina Radaelli, Serena Canola, Valerio Carta, Alessio Ferrari, Marco Ballardini, Enrica Berio, Mirko Francesco Perna, Cristina Grieco, Matteo Giovannozzi, Paolo Roberto, Walter Mignone, Roberto Moschi, Laura Chiavacci, Cristina Casalone</i>	139
Prevenzione dell'introduzione e diffusione di specie esotiche invasive in Lombardia <i>Francesco Defilippo, Sabrina Canziani, Cristina Malucelli, Tiziana Trogu, Mattia Calzolari, Giovanni Sala, Irene Bertoletti, Enrica Sozzi, Ana Moreno, Davide Lelli, Antonio Lavazza</i>	153
Prevenzione dell'introduzione e diffusione di specie esotiche invasive in Veneto, Trentino e Friuli Venezia Giulia <i>Alice Michelutti, Fabrizio Montarsi</i>	164
Prevenzione dell'introduzione e diffusione di specie esotiche invasive nel Lazio <i>Adele Magliano, Arianna Ermenegildi, Irene Del Lesto, Federico Romiti, Claudio De Liberato</i>	170
Prevenzione dell'introduzione e diffusione di specie esotiche invasive in Campania <i>Luciano Toma, Gianluca Miletto, Mario Santoro, Marco Paone, Giovanna Fusco, Maurizio Viscardi, Claudia Fortuna, Giorgio Galiero, Antonio Salzano, Rosa Maria Russo, Giovanni Battista Cuciniello, Monica Manzo, Esterina de Carlo</i>	173
Prevenzione dell'introduzione e diffusione di specie esotiche invasive in Puglia <i>Maria Assunta Cafiero, Giuseppe Mancini, Donato Antonio Raele</i>	180
Prevenzione dell'introduzione e diffusione di specie esotiche invasive in Sardegna <i>Cipriano Foxi, Stefano Cappai, Luigi Vento, Salvatore Ledda, Giuseppe Satta</i>	194

QUARTA SEZIONE

Nuove frontiere della sorveglianza entomologica

Citizen science per il monitoraggio delle zanzare: il progetto Mosquito Alert <i>Beniamino Caputo, Eleonora Longo, Alice Michelutti, Fabrizio Montarsi, Maria Vittoria Zucchelli, Valeria Lencioni, Daniel Remondini, Marco Di Luca, Francesco Severini, Alessandra della Torre</i>	203
Identificazione morfologica e classificazione di insetti adulti per sorveglianza entomologica: il contributo del <i>deep-learning</i> <i>Noemi Sarleti, Francesco Silvestrini, Guido Gigante, Andrea Ciardiello, Pietro Alano</i>	221

INTRODUZIONE

Marco Di Luca*

Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Con l'80% della popolazione mondiale a rischio di contrarre una o più malattie, come malaria, febbre gialla o dengue, e oltre 700.000 morti ogni anno, le Malattie Trasmesse da Vettori (MTV) rappresentano un problema rilevante per la sanità pubblica, soprattutto in aree tropicali e subtropicali (1). Recentemente queste malattie stanno comparando o riemergendo anche in molti paesi delle regioni temperate, favorite dai cambiamenti climatici e dall'aumento degli spostamenti di uomini, animali e merci a livello globale; anche altri fattori, quali l'urbanizzazione e la cattiva gestione del territorio, possono avere la loro influenza (2). L'aumentato rischio di diffusione delle MTV in questi paesi è legato anche all'introduzione di nuove specie invasive o all'espansione geografica di alcuni vettori autoctoni. Ne è prova l'introduzione e la rapida espansione in Europa della zanzara tigre o *Aedes albopictus*, vettore di chikungunya e dengue o il radicamento ormai stabile lungo le coste del Mar Nero di popolazioni di *Aedes aegypti*, vettore di dengue e febbre gialla oppure l'ampliamento degli areali di molte specie di flebotomi (3-6). Negli ultimi decenni molti paesi dell'Europa centro-meridionale sono stati colpiti da frequenti eventi epidemici, spesso anche molto estesi, come nel caso di *West Nile Disease* (WND) e chikungunya (7-8), o da focolai più circoscritti, come quelli di dengue (9). Anche in Italia si è assistito alla circolazione di queste malattie, alcune delle quali ormai endemiche, come la WND presente ininterrottamente dal 2008 (10) e che ha avuto un picco di casi anomalo e inatteso nel 2018 (11). Altre arbovirosi, come Zika, chikungunya e dengue, possono essere introdotte da persone infette che, rientrando da aree endemiche, possono innescare eventi epidemici autoctoni, più o meno estesi, in presenza di condizioni favorevoli e vettori competenti. Questo è quanto accaduto in Italia con chikungunya nel 2007, in Emilia-Romagna (12), e nel 2017, nel Lazio e in Calabria (13-14), con centinaia di casi o con il circoscritto focolaio di dengue, in provincia di Vicenza, nel 2020 (15). In questi casi il vettore accertato è stato *Ae. albopictus*.

Le MTV mostrano complicati cicli di trasmissione che coinvolgono patogeno, vettore e ospite vertebrato e sono fortemente influenzati dalle condizioni ambientali. Per prevenire e gestire le MTV, è necessario quindi adottare un approccio integrato o *One Health*, di cui la sorveglianza entomologica è certamente parte integrante (16). La raccolta di dati entomologici, quali abbondanza e composizione di specie, è infatti fondamentale per valutare il rischio di diffusione e circolazione di una MTV, in una certa area, ma risulta altrettanto cruciale anche per indirizzare eventuali operazioni di contrasto al vettore e valutarne l'efficacia (17-19).

Per delineare sistemi di sorveglianza entomologica efficaci e sostenibili, in grado di migliorare la *preparedness* e le capacità di rispondere a queste minacce, è importante identificare ruoli, responsabilità e attività da implementare, ottimizzando risorse umane ed economiche. Da qui l'esigenza di avere a disposizione personale formato, in grado di riconoscere il rischio legato ad una MTV, di avviare sistemi di sorveglianza entomologica, di organizzare strategie di contrasto e, quando necessario, di applicare misure di emergenza (1).

Seguendo tali orientamenti delle autorità sanitarie internazionali e anticipando quanto poi stabilito nel Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA) 2020-2025 (20), il Ministero della Salute – Centro Nazionale per la prevenzione e il controllo delle

* Responsabile Scientifico del Progetto "Rafforzare la formazione in entomologia di sanità pubblica degli operatori del SSN: identificazione, metodiche di sorveglianza e di controllo"

malattie (CCM) – ha deciso di investire risorse sul Progetto “Rafforzare la formazione in entomologia di sanità pubblica degli operatori del SSN: identificazione, metodiche di sorveglianza e di controllo”, partito nel febbraio 2019 e concluso nel dicembre 2021. Il progetto, rivolto agli operatori del Servizio Sanitario Nazionale (SSN) o di altri enti coinvolti nella gestione del rischio legato alle MTV, aveva l’obiettivo di diffondere e consolidare a livello nazionale conoscenze e competenze in ambito entomologico. Sono stati realizzati percorsi formativi modulari, di carattere teorico-pratico, coordinati dall’Istituto Superiore di Sanità (ISS), in collaborazione con l’Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo e Molise (IZSAM), la Regione Emilia-Romagna e l’Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia-Romagna (IZSLER), a cui si è aggiunta anche la consulenza dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE). Diverse edizioni, in sedi differenti, hanno agevolato un’ampia adesione: per le Regioni del Nord-Est, i partecipanti hanno seguito il corso a Padova o a Piacenza; quelli delle Regioni del Centro, a Teramo; mentre l’ultimo corso, diretto alle Regioni del Nord-Ovest e Sud, si è svolto in modalità webinar, a causa dell’emergenza sanitaria da COVID-19. Al termine del progetto, ben 119 professionisti, distribuiti in tutta Italia, hanno ricevuto una formazione su temi di entomologia medica e veterinaria.

Da questo progetto e grazie alla collaborazione di molti esperti del settore, è nata l’idea di riunire e condividere in un unico rapporto tecnico, conoscenze ed esperienze relative alla sorveglianza entomologica, in particolare delle zanzare. In esso è presentato lo stato dell’arte, sia di quei sistemi di sorveglianza attualmente operativi sul territorio, ma anche di quelle esperienze, limitate nel tempo, frutto di specifici progetti-pilota.

Nella parte iniziale, viene descritto l’impianto dell’attuale PNA 2020-2025, ripercorrendo le fasi della sua elaborazione, a cui hanno preso parte esperti e istituzioni diverse, per la prima volta riuniti intorno ad un tavolo.

Il rapporto si articola poi in quattro sezioni, che rappresentano un compendio di esperienze sulla sorveglianza entomologica, realizzate sia nell’ambito di sistemi regionali più ampi, che di iniziative progettuali specifiche e che riguardano:

- sorveglianza e risposta ai virus West Nile e Usutu;
- sorveglianza e risposta agli arbovirus trasmessi da *Aedes*;
- sorveglianza e risposta all’introduzione e diffusione di nuove specie invasive;
- nuove frontiere della sorveglianza entomologica.

Malgrado esistano tra alcuni Istituti Zooprofilattici delle differenze operative nelle procedure di sorveglianza, le attività entomologiche dei vettori di West Nile e Usutu sono da considerarsi comunque organiche e ben strutturate su gran parte del territorio nazionale.

Al contrario, nonostante la presenza diffusa e abbondante della zanzara tigre e ben tre epidemie imputabili a questa zanzara, solo poche Regioni hanno investito finora risorse adeguate e si sono attrezzate per monitorare e contrastare questo vettore.

Ancora più critica è la situazione che riguarda l’implementazione di sistemi di rilevamento precoce dell’ingresso e diffusione di nuove zanzare esotiche, come dimostrato dall’insediamento stabile di *Aedes koreicus* e *Aedes japonicus*. Qualche esperienza condotta da Regioni virtuose, sono comunque da considerarsi iniziative sporadiche e isolate, benché sin dal 2007, con l’adozione del nuovo Regolamento Sanitario Internazionale da parte dell’Assemblea Mondiale della Sanità, gli stati membri avrebbero dovuto attuare programmi di sorveglianza sistematica e di controllo integrato dei vettori, presso i punti di ingresso o *Point of Entry* (PoE), quali porti e aeroporti (21).

Degna di nota, è l’iniziativa di *citizen science*, presentata di recente da alcuni istituti di ricerca italiani, in cui la cittadinanza viene coinvolta attivamente nella lotta alle zanzare, incoraggiando l’uso di una App, disponibile per smartphone. Questa forma di arruolamento e partecipazione della società civile in attività scientifiche, oltre ad aumentare la sensibilità e il senso civico su

certe tematiche, permetterà nella pratica di aumentare considerevolmente il numero delle persone che raccolgono dati sul campo, la quantità dei dati stessi, ma anche il numero dei luoghi visitati, che spesso non sono sempre accessibili, in quanto ricadono in ambiti privati.

Infine viene presentata una nuova frontiera della sorveglianza in ambito entomologico, che prevede la possibilità di implementare e gestire sistemi di riconoscimento degli artropodi, e in particolare di quelli di interesse medico-veterinario, attraverso approcci di imaging, machine learning e intelligenza artificiale.

Per concludere, questo rapporto non vuole essere una mera rassegna di attività entomologiche, svolte in maniera più o meno sistematica nelle varie Regioni, ma offrire modelli concreti, anche se non esaustivi, di buone pratiche per quelle autorità sanitarie incaricate di realizzare o rafforzare sul proprio territorio un idoneo sistema di sorveglianza e controllo delle MTV.

Nota bene

In questo lavoro si è lasciata libertà agli Autori di indicare il nome scientifico delle specie di zanzare seguendo la propria tassonomia di riferimento. Nella maggior parte dei casi molti di loro hanno fatto propria la classificazione tradizionale che suddivide le zanzare italiane in sette generi, indicati come segue: *Anopheles* (An.), *Aedes* (Ae.), *Culex* (Cx.), *Coquillettidia* (Cq.), *Culiseta* (Cs.), *Orthopodomyia* (Or.), *Uranotaenia* (Ur.). Altri Autori hanno preferito invece adottare le indicazioni di Reinert *et al.* (22), che nel suo riesame morfologico, eleva a rango superiore il sottogenere *Ochlerotatus* (Oc.), tradizionalmente incluso nel genere *Aedes*, portando di fatto a 8 i generi delle zanzare presenti in Italia. In questo rapporto, quindi, le specie appartenenti al genere *Ochlerotatus* sono da intendersi come *Aedes* (es. *Ochlerotatus caspius* sinonimo di *Aedes caspius*; *Ochlerotatus detritus* sinonimo di *Aedes detritus*, ecc.).

Bibliografia

1. WHO. *Global vector control response 2017-2030*. Geneva: World Health Organization; 2017.
2. Gould EA, Higgs S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. 2009. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103:109-21.
3. Oliveira S, Rocha J, Sousa CA, Capinha C. Wide and increasing suitability for *Aedes albopictus* in Europe is congruent across distribution models. *Scientific Reports* 2021;11(1):9916. doi:10.1038/s41598-021-89096-5
4. Ganushkina LA, Patraman IV, Rezza G, Migliorini L, Litvinov SK, Sergiev VP. Detection of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Aedes koreicus* in the Area of Sochi, Russia. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 2016;16(1):58-60. doi: 10.1089/vbz.2014.1761.
5. Medlock JM, Hansford KM, Van Bortel W, Zeller H, Alten B. 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*. 2014;39(1):72-7.
6. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology* 2013;27(2):123-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
7. Camp JV, Nowotny N. The knowns and unknowns of West Nile virus in Europe: what did we learn from the 2018 outbreak? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2020;18(2):145-54. doi: 10.1080/14787210.2020.1713751.
8. Tjaden NB, Cheng Y, Beierkuhnlein C, Thomas SM. chikungunya beyond the Tropics: where and when do we expect disease transmission in Europe? *Viruses* 2021;13(6):1024. <https://doi.org/10.3390/v13061024>

9. European Centre for Disease Prevention and Control. *Autochthonous transmission of dengue virus in mainland EU/EEA, 2010-present*. Stockholm: ECDC; 2022. Disponibile all'indirizzo: www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/dengue/surveillance-and-disease-data/autochthonous-transmission-dengue-virus-eueea; ultima consultazione 24/01/2022.
10. Savini G, Monaco F, Calistri P, Lelli R. Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008. *Euro Surveillance* 2008;13(48):19048.
11. Riccardo F, Monaco F, Bella A, Savini G, Russo F, Cagarelli R, Dottori M, Rizzo C, Venturi G, Di Luca M, Pupella S, Lombardini L, Pezzotti P, Parodi P, Maraglino F, Costa AN, Liumbruno GM, Rezza G, the Working Group. An early start of West Nile virus seasonal transmission: the added value of One Health surveillance in detecting early circulation and triggering timely response in Italy, June to July 2018. *Euro Surveillance* 2018;23(32):1800427. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.32.1800427.
12. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A. CHIKV study group, 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370:1840-6.
13. Venturi G, Di Luca M, Fortuna C, Remoli MA, Riccardo F, Severini F, Toma L, Del Manso M, Benedetti E, Amendola A, Fiorentini C, De Liberato C, Giammatei R, Romi R, Pettotti P, Rezza G, Rizzo C. Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy, August to September 2017. *Euro Surveillance* 22(39):pii=17-00646.
14. Giovanni R. Chikungunya is back in Italy: 2007-2017. *Journal of Travel Medicine* 2018;25(1), tay004, <https://doi.org/10.1093/jtm/tay004>
15. Lazzarini L, Barzon L, Foglia F, Manfrin V, Pacenti M, Pavan G, Rattu M, Capelli G, Montarsi F, Martini S, Zanella F, Padovan MT, Russo F, Gobbi F. First autochthonous dengue outbreak in Italy, August 2020. *Euro Surveillance* 2020;25(36):2001606. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.36.2001606.
16. Jourdain F, Samy AM, Hamidi A, Bouattour A, Alten B, Faraj C, Roiz D, Petric D, Pérez-Ramírez E, Velo E, Günay F, Bosevska G, Salem I, Pajovic I, Marić J, Kanani K, Paronyan L, Dente MG, Picard M, Zgomba M, Sarih M, Haddad N, Gaidash O, Sukhiasvili R, Declich S, Shaibi T, Sulesco T, Harrat Z, Robert V. Towards harmonisation of entomological surveillance in the Mediterranean area. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2019;13(6):e0007314. doi: 10.1371/journal.pntd.0007314.
17. European Centre for Disease Prevention and Control. *Guidelines for the surveillance of native mosquitoes in Europe*. Stockholm: ECDC; 2014.
18. European Centre for Disease Prevention and Control. *Environmental risk mapping: Aedes albopictus in Europe*. Stockholm: ECDC; 2013.
19. Takken W, van den Berg H. *Manual on prevention of establishment and control of mosquitoes of public health importance in the WHO European Region (with special reference to invasive mosquitoes)*. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe; 2019. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/343056>
20. Ministero della Salute - Direzione generale della Prevenzione sanitaria. *Piano nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA) 2020-2025*. Roma: Ministero della Salute; 2019.
21. WHO. *Vector surveillance and control of ports, airports and ground crossing*. Geneva: World Health Organization; 2017.
22. Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal of the Linnean Society* 2004;142(3):289-368. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2004.00144.x>

PIANO NAZIONALE DI PREVENZIONE, SORVEGLIANZA E RISPOSTA ALLE ARBOVIROSI 2020-2025

Patrizia Parodi

Già Direzione Generale della Prevenzione sanitaria, Ministero della Salute, Roma

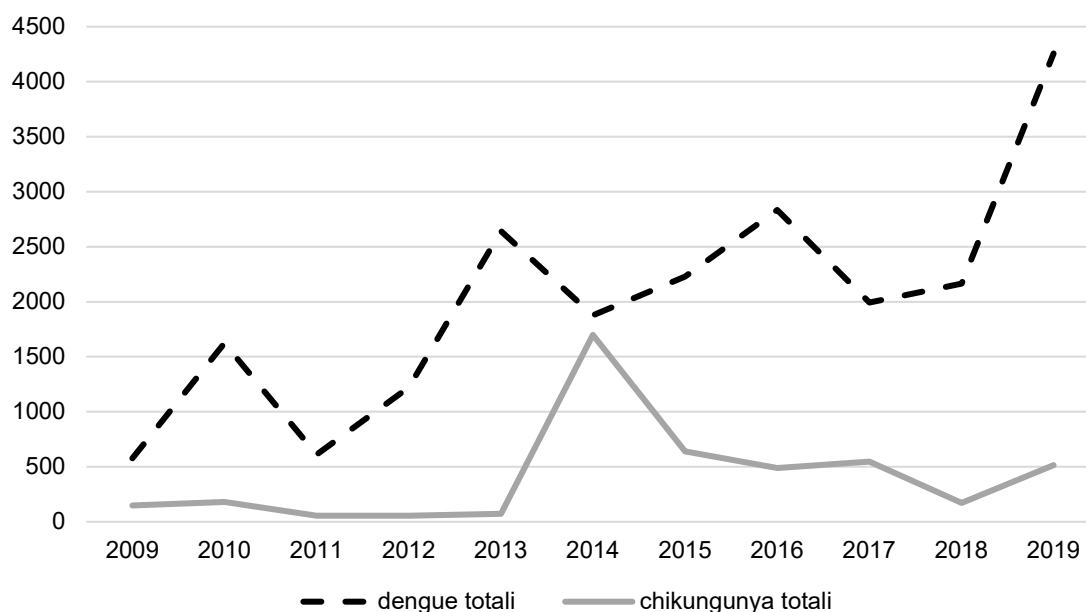
Cenni epidemiologici e impatto di sanità pubblica

Nel mondo le malattie trasmesse da vettori costituiscono uno dei principali rischi per la salute, rappresentando, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), circa il 17% dei casi di malattie trasmissibili e causando oltre 1 miliardo di casi umani e 1 milione di morti all'anno.

Nell'Unione Europea, nell'ultimo decennio si sta assistendo ad un aumento dei casi notificati, sia autoctoni che importati. Nel 2019, ad esempio, sono stati registrati dal sistema di sorveglianza europeo 4257 casi di dengue in totale, contro i 577 nel 2009; negli stessi anni sono stati notificati rispettivamente 516 e 49 casi di chikungunya; 3211 e 2142 (2012) casi di encefalite trasmessa da zecche; 443 e 30 casi di infezione da virus West Nile (*West Nile Virus*, WNV).

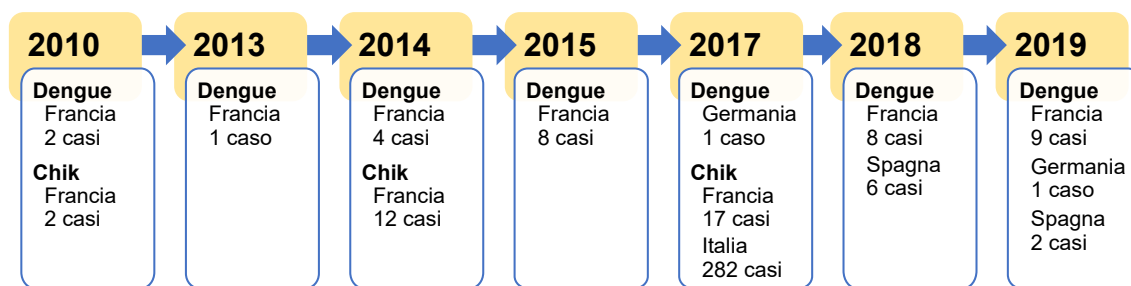
Si verificano inoltre con maggiore frequenza focolai epidemici e si sta assistendo ad un ampliamento degli areali in cui vengono segnalati casi di arbovirosi, anche come conseguenza della diffusione degli artropodi vettori.

La Figura 1 mostra l'andamento dei casi totali di chikungunya e dengue in Unione Europea dal 2009 al 2019, mentre la Figura 2 illustra la cronologia dei focolai epidemici autoctoni verificatisi in Unione Europea nello stesso periodo.



Fonte: ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases

Figura 1. Andamento dei casi totali di chikungunya e dengue in Unione Europea (2009-2019)



Fonte: ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases

Figura 2. Focolai autoctoni di chikungunya e dengue in Unione Europea (2009-2019)

In anni recenti sono comparse nuove minacce, come ad esempio la malattia da virus Zika, che nel 2016 è stata classificata dall'OMS come un'emergenza di sanità pubblica di rilevanza internazionale (1), causando oltre 700.000 casi totali nel mondo e provocando, fra l'altro diverse patologie associate, la più grave delle quali, denominata sindrome congenita da virus Zika, si manifesta nei neonati ed è caratterizzata da microcefalia e altre malformazioni congenite.

In Italia, nel 2007, si è verificata la prima epidemia di chikungunya registrata in tutta l'Unione Europea, in Emilia-Romagna (2). Dieci anni dopo, lo stesso agente eziologico ha causato un'epidemia nel Lazio (3) e in Calabria con un impatto transfrontaliero dovuto all'esportazione di alcuni casi. Nel 2018 l'Italia e altri Paesi europei sono stati interessati da un'epidemia di WNV che ha provocato 577 casi e 42 decessi nel nostro Paese (4). Nel 2020, durante la pandemia da COVID-19, l'Italia ha registrato il primo focolaio autoctono di dengue da virus DENV-1 con 11 casi autoctoni oltre al caso indice in Veneto (5).

Dal punto di vista di sanità pubblica, le misure di controllo sono limitate anche a causa della difficoltà di agire sull'ambiente e di interrompere cicli biologici complessi, che possono includere ospiti sia umani che animali e vettori la cui sopravvivenza e diffusione è influenzata, fra l'altro, da caratteristiche ambientali quali temperatura, umidità e vegetazione.

Come riportato da Petersen *et al.* (6), il controllo delle arbovirosi in ambito urbano risulta largamente inefficace, per un'applicazione tardiva o inadeguata delle misure di sanità pubblica. Questa situazione è aggravata dalla comparsa delle prime resistenze ai prodotti utilizzati nella lotta ai vettori, sinora scarsamente monitorizzata, dalla cross-reattività di alcuni test diagnostici e dall'assenza di terapie specifiche e vaccini.

L'impatto di sanità pubblica è legato non solo alla gestione delle attività a livello locale/nazionale, ma anche a possibili restrizioni ai viaggi e al commercio a livello internazionale. La prevenzione assume pertanto un ruolo di primaria importanza, così come la ricerca applicata e l'innovazione.

L'impatto economico di queste infezioni è notevole sia per i servizi di sanità pubblica e ospedalieri, che per le famiglie. Nell'ambito del progetto "Prevenzione delle malattie a trasmissione vettoriale: sviluppo e implementazione pilota di strumenti di supporto operativo", finanziato dal Centro nazionale per la prevenzione e il Controllo delle Malattie (CCM), è stata condotta un'analisi dei costi sostenuti dal servizio sanitario e/o dagli Enti Locali per la sorveglianza e gestione degli interventi di disinfestazione attivati in emergenza per motivi sanitari a seguito della segnalazione di casi umani importati di chikungunya, dengue e Zika. In Emilia-Romagna e in Piemonte, con un costo medio per intervento di lotta al vettore variabile da circa 1.800 a 2.800 euro. In Emilia-Romagna inoltre sono state calcolate le spese per disinfestazioni straordinarie per motivi sanitari sostenute negli anni 2015, 2016 e 2017, ammontanti rispettivamente a 121.245, 139.626 e 106.867 euro. Inoltre non vanno dimenticati gli effetti causati da alcune arbovirosi sulla disponibilità di sostanze biologiche di origine umana (sangue, emocomponenti, cellule, tessuti, organi).

Evoluzione dei provvedimenti normativi

Il Regolamento Sanitario Internazionale (RSI 2005) dell'OMS, nell'allegato 2, definisce eventi che potrebbero costituire un'emergenza di sanità pubblica di rilevanza internazionale anche quelli relativi alla segnalazione di malattie che hanno dimostrato la capacità di causare un grave impatto sanitario e diffondersi rapidamente a livello internazionale: tra queste malattie rientrano diverse arbovirosi, come febbre gialla, *West Nile Disease*, dengue, *Rift Valley Fever*.

Nel 2017 l'Assemblea Mondiale della Sanità ha approvato la risoluzione 70.16 *Global vector control response: an integrated approach for the control of vector-borne diseases* (7) che approva la nuova strategia globale dell'OMS 2017-2030 (8) basata su un approccio integrato ed esorta gli Stati membri ad adottare strategie nazionali di controllo dei vettori e piani operativi in linea con la strategia dell'OMS. L'Ufficio regionale dell'OMS per l'Europa, considerando il crescente numero di epidemie causate dalle arbovirosi in Europa, ha prodotto la *Regional framework for surveillance and control of invasive mosquito vectors and re-emerging vector-borne diseases, 2014-2020* (9) e un manuale operativo (10) che favorisca la sua applicazione.

La Commissione europea, con Decisione n. 1082/2013/UE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 ottobre 2013 relativa alle gravi minacce per la salute a carattere transfrontaliero (11), ha stabilito norme in materia di sorveglianza epidemiologica, monitoraggio, allarme rapido e lotta contro le gravi minacce per la salute a carattere transfrontaliero, istituendo un sistema di allerta rapido e di reazione, il Comitato europeo per la sicurezza sanitaria e stabilendo, fra l'altro i criteri di selezione di malattie trasmissibili e problemi sanitari speciali connessi da incorporare nella sorveglianza epidemiologica nell'ambito della rete europea. Attualmente tali disposizioni sono in via di completa revisione.

La Decisione di esecuzione (UE) 2018/945 della Commissione del 22 giugno 2018 (12) ha aggiornato l'elenco delle malattie trasmissibili e problemi sanitari speciali da incorporare nella sorveglianza epidemiologica, includendo, fra l'altro, chikungunya, dengue, Zika e neuroborreliosi di Lyme, poiché pongono una minaccia per la sanità pubblica e sono emerse o riemerse recentemente, anche per la presenza diffusa di vettori competenti.

In Italia, la segnalazione dei casi umani di arbovirosi, inizialmente prevista dal Decreto Ministeriale 15 dicembre 1990, è stata successivamente aggiornata ai requisiti europei con circolari ministeriale e col Piano nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi 2020-2025 descritto successivamente. Il Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri (DPCM) 3 marzo 2017 ha identificato il sistema di segnalazione delle malattie infettive (PREMAL) istituito presso il Ministero della Salute quale sistema di rilevanza nazionale per la segnalazione dei casi umani di tutte le malattie infettive, mentre ha demandato a circolari ministeriali l'attivazione del sistema di sorveglianza delle malattie trasmesse da vettori istituito presso l'Istituto Superiore di Sanità. All'entrata in vigore del Decreto del Presidente della Repubblica (DPR) che regolerà il sistema PREMAL, le malattie trasmesse da vettori dovranno essere segnalate al predetto sistema.

Nuova strategia nazionale integrata

Nel 2018, il Ministero della Salute ha istituito il Tavolo tecnico intersettoriale sulle malattie trasmesse da vettori, per tradurre concretamente gli orientamenti internazionali e le nuove evidenze scientifiche in una nuova strategia nazionale integrata che tenga conto delle criticità riscontrate e dei mutati scenari epidemiologico-ambientali.

L'applicazione delle circolari ministeriali annuali ha messo in evidenza la necessità di una maggiore coerenza dei provvedimenti e di un orizzonte temporale più ampio per permettere un'applicazione graduale delle misure in base alle differenti realtà locali.

L'elaborazione della nuova strategia è durata circa un anno ed ha visto un impegno assiduo dei gruppi di lavoro costituitisi nell'ambito del Tavolo per apportare contributi tecnico-scientifici sui temi di rispettiva competenza. La collaborazione con altri Ministeri e istituzioni, ha permesso di predisporre una strategia più olistica, che tenga anche conto degli aspetti ambientali e sociali, favorendo la partecipazione attiva della popolazione.

Il Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi 2020-2025 (di seguito PNA) è stato approvato dalla Conferenza per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e Province Autonome di Trento e Bolzano nella seduta del 15 gennaio 2020.

Il PNA si articola su un orizzonte temporale di cinque anni, per permettere azioni strategiche di più lungo respiro, e individua attività che devono essere attuate immediatamente e attività per la cui implementazione può essere necessario un più lungo lasso di tempo.

Mira inoltre a creare e rafforzare la rete di referenti regionali per disporre di una *governance* più efficace e le reti di laboratori di riferimento, introducendo ruoli e requisiti minimi.

Elementi caratterizzanti la nuova strategia sono l'approccio *One Health*, già applicato nei piani annuali di controllo delle arbovirosi (13), l'integrazione con altre politiche, sia del Ministero della Salute (es. Piano Nazionale della Prevenzione, Piano Nazionale di Difesa – settore sanitario, e Livelli Essenziali di Assistenza) che di altri Dicasteri (es. Strategia Nazionale di Adattamento ai Cambiamenti Climatici del Ministero della Transizione Ecologica) e la collaborazione col Ministero dell'istruzione, dell'Università e della Ricerca per valorizzare e sistematizzare le iniziative formative pilota già implementate in alcune realtà locali e con la Rete Città Sane dell'OMS per dare più spazio alla partecipazione a livello locale e della cittadinanza, favorendo l'equità e l'integrazione delle politiche.

Ampio spazio è stato dato alle attività di prevenzione, che per la prima volta integra le attività di sorveglianza e risposta alle arbovirosi. Relativamente alla comunicazione del rischio, anche tenendo conto di precedenti esperienze (14), vengono descritti i principi guida per una corretta comunicazione, e sono state inserite indicazioni sia sugli strumenti che sui destinatari degli interventi accludendo anche un esempio concreto di progettazione di una campagna di comunicazione specifica sull'argomento.

Anche alla formazione viene dedicato ampio spazio, descrivendo possibili destinatari e contenuti minimi degli strumenti formativi.

Nella prevenzione rientrano inoltre le misure di contrasto ai vettori e ambientali, descritte sia per quanto riguarda le zanzare che i flebotomi e le zecche e comprendenti sia la corretta gestione del territorio e degli ambienti di vita che, limitatamente alle zanzare, la mappatura dei siti di possibile focolaio di sviluppo larvale e il monitoraggio entomologico volto ad acquisire dati sulla presenza e le fluttuazioni stagionali delle specie presenti e di nuova introduzione. Le attività di monitoraggio entomologico possono essere affiancate da esperienze di *citizen science* o scienza dei cittadini che, tramite l'uso di tecnologie digitali, permette ai cittadini di diventare parte integrante del processo, raccogliendo informazioni sulla presenza e diffusione di vettori, e favorisce una migliore gestione dei focolai di zanzare in aree private, con una più tempestiva applicazione dei trattamenti.

Un sotto-capitolo è dedicato alla disinfestazione di aeromobili e merci sensibili, particolarmente importante nell'ambito della salute globale e dell'applicazione del Regolamento Sanitario Internazionale. La sorveglianza di siti a rischio di introduzione di nuove zanzare invasive viene trattata in uno specifico capitolo corredato da linee guida e costituisce un'altra importante novità della nuova strategia di contrasto alle arbovirosi.

Seguono alcuni capitoli dedicati alla sorveglianza e risposta a specifici arbovirus. Nel predisporre questi contenuti, si è tenuto conto delle circolari ministeriali i cui provvedimenti sono stati rivisti in base alle esperienze regionali e locali e alla valutazione del rischio, che, per quanto riguarda il virus West Nile ha portato ad una riclassificazione delle aree secondo il rischio di trasmissione alto, basso o minimo e a una conseguente differenziazione delle attività da implementare. È stata inoltre introdotta a livello nazionale la sorveglianza del virus Toscana, considerato come uno di principali agenti eziologici delle meningiti e delle meningo-encefaliti estive.

Non va dimenticato l'obbligo di notifica immediata dei casi di arbovirosi attualmente non segnalate in Italia, come la febbre emorragica di Crimea Congo, la febbre gialla, l'encefalite giapponese e la febbre della Valle del Rift, che potrebbero costituire serie minacce di sanità pubblica.

Questi capitoli sono corredati da numerosi allegati, che descrivono, fra l'altro, le procedure operative per le catture entomologiche di esemplari adulti e di larve, e per la gestione dei campioni, e le specifiche degli interventi per le singole specie di vettori.

Nel PNA è stato inserito un tema molto importante e molto attuale, riguardante il monitoraggio della resistenza agli insetticidi. In Italia sono stati descritti i primi fenomeni di resistenza che, considerando l'esiguo numero di biocidi disponibili, deve essere attentamente monitorato per consentire l'attivazione di congrue politiche di gestione del problema. Sul tema è presente un approfondimento legislativo che include anche la descrizione delle deroghe che possono essere richieste.

Per permettere la valutazione dell'implementazione del PNA ed evidenziare eventuali criticità, sono stati inseriti alcuni indicatori che permettono una sinergia col Piano Nazionale della Prevenzione 2020-2025 essendo stati introdotti anche in quest'ultimo come indicatori degli obiettivi strategici.

In base ai dati preliminari sinora raccolti, provenienti da 9 Regioni/Province Autonome (42,8%), il PNA è stato recepito od è in corso di recepimento a livello regionale, sono stati individuati uno o più referenti regionali, esiste almeno un laboratorio regionale di riferimento e la sorveglianza delle principali arbovirosi viene implementata. Anche la sorveglianza dell'introduzione di nuove specie invasive è generalmente iniziata, mentre la sorveglianza della resistenza agli insetticidi è in fase più embrionale. La comunicazione del rischio non è ancora molto diffusa, mentre le attività formative sono il più delle volte iniziate.

Progetti e attività di supporto al PNA 2020-2025

L'impegno italiano per sostenere la nuova strategia di contrasto delle arbovirosi ha previsto altre iniziative. A supporto del PNA, il Ministero della Salute ha approvato due progetti di ricerca applicata e formazione CCM. Il primo, intitolato "Rafforzare la formazione in entomologia di sanità pubblica degli operatori del SSN: identificazione, metodiche di sorveglianza e di controllo", si prefigge di rafforzare le competenze entomologiche di sanità pubblica del Servizio Sanitario Nazionale (SSN) e degli altri enti coinvolti nella gestione del rischio, attraverso la realizzazione di percorsi formativi modulari e la produzione di documenti tecnici e linee guida che possano garantire una maggiore uniformità di conoscenze e di capacità d'intervento. Il secondo, "Definizione della strategia integrata di gestione dei vettori e sua applicazione nei Piani Comunali arbovirosi in collaborazione con la Rete Città sane", è volto a migliorare la capacità a livello locale e regionale di gestire il rischio arbovirosi, tramite la formazione teorica e pratica degli operatori comunali responsabili delle azioni di prevenzione e lotta alle zanzare; ad acquisire

dati sulla presenza, distribuzione e dinamica stagionale dei vettori, e all'applicazione pilota di attività innovative di lotta integrata e/o biologica alle zanzare.

Il Ministero della Salute ha inoltre sviluppato una serie di materiali informativi sulle arbovirosi destinati sia al personale sanitario (opuscolo: *Zika: informazioni per il personale sanitario*) che alla popolazione in generale (pieghevole: *Scelta e corretto utilizzo dei repellenti cutanei per zanzare*; locandina: *Cosa puoi fare per difenderti dalle zanzare*; opuscolo: *Virus West Nile: come prevenire l'infezione*; pieghevole: *Raccomandazioni per la tua salute e per quella del figlio che verrà*) e ai viaggiatori internazionali (locandina in italiano e in inglese: *Malattie trasmesse dalle zanzare. Consigli ai viaggiatori internazionali*). Tutti i materiali sono pubblicati sul portale dell'amministrazione, sono utilizzabili liberamente e in alcuni casi possono essere personalizzati col logo dell'amministrazione che li adotta.

Bibliografia

1. World Health Organization. *WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations*. Geneva: WHO; 2016.
2. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A. CHIKV study group. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 2007;370:1840-6.
3. Vairo F, Mammone A, Lanini S, Nicastrì E, Castilletti C, Carletti F, Puro V, Di Lallo D, Panella V, Varrenti D, Scaramozzino P, di Caro A, Scognamiglio P, Capobianchi MR, Ippolito G; chikungunya Lazio Outbreak Group. Local transmission of chikungunya in Rome and the Lazio region, Italy. *PLoS One* 2018 21;13(12):e0208896. doi: 10.1371/journal.pone.0208896. eCollection 2018.
4. Riccardo F, Monaco F, Bella A, Savini G, Russo F, Cagarelli R, Angelini P, Rizzo C, Venturi G, Di Luca M, Pupella S, Lombardini L, Pezzotti P, Parodi P, Maraglino F, Nanni Costa A, Liumbruno GM, Rezza G, the working group. An early start of West Nile virus seasonal transmission: the added value of One Health surveillance in detecting early circulation and triggering timely response in Italy, June to July 2018. *Euro Surveill* 2018;23(32):1800427
5. Lazzarini L, Barzon L, Foglia F, Manfrin V, Pacenti M, Pavan G, Rattu M, Capelli G, Montarsi F, Martini S, Zanella F, Padovan MT, Russo F, Gobbi F. First autochthonous dengue outbreak in Italy, August 2020. *Euro Surveill* 2020;25(36):2001606. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.36.2001606.
6. Petersen LR, Beard CB, and Visser SN. Combatting the increasing threat of vector-borne disease in the United States with a national vector-borne disease prevention and control system. *Am J Trop Med Hyg* 2019;100(2):242-5.
7. World Health Assembly, 70. *Global vector control response: an integrated approach for the control of vector-borne diseases*. Geneva: World Health Organization. 2017 (WHA70.16) <https://apps.who.int/iris/handle/10665/275708>
8. World Health Organization. *Global vector control response 2017-2030*. Geneva: WHO; 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259205/9789241512978-eng.pdf?sequence=1>
9. World Health Organization Regional Office for Europe. *Regional Framework for surveillance and control of invasive mosquito vectors and re-emerging vector-borne diseases 2014-2020*. Copenhagen: WHO/Europe; 2021. https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/197158/Regional-framework-for-surveillance-and-control-of-invasive-mosquito-vectors-and-re-emerging-vector-borne-diseases-20142020.pdf
10. World Health Organization Regional Office for Europe. *Manual on prevention of establishment and control of mosquitoes of public health importance in the WHO European Region (with special*

- reference to invasive mosquitoes*). Copenhagen Copenhagen: WHO/Europe; 2021. https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/392998/mosquito-manual-eng.pdf
11. Europa. Decisione n. 1082/2013/UE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 ottobre 2013 relativa alle gravi minacce per la salute a carattere transfrontaliero e che abroga la decisione n. 2119/98/CE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 293, 5/11/2013
 12. Europa. Decisione di esecuzione (UE) 2018/945 del 22 giugno 2018 relativa alle malattie trasmissibili e ai problemi sanitari speciali connessi da incorporare nella sorveglianza epidemiologica, nonché alle pertinenti definizioni di caso. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 170, 6/7/2018.
 13. Parodi P, Rizzo C, Albonico M, Calzolari M, Chiari M, Capelli G, Casalone C, Angelini P, Monaco F, Maraglino F. West Nile surveillance and response in Italy: A one health approach. In: *10th European Congress on Tropical Medicine and International Health*; Antwerpen, Belgium 16-20 October 2017, short communication.
 14. Parodi P, Bellino S, Albonico M, Maraglino F, Rizzo C. Evaluation of risk communication on Zika virus transmission in Italy. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2019;113:S121-2 .

PRIMA SEZIONE
Sorveglianza entomologica
nei sistemi regionali di sorveglianza
e risposta ai virus West Nile e Usutu

SORVEGLIANZA DEI VETTORI DEI VIRUS WEST NILE E USUTU IN PIEMONTE, LIGURIA E VALLE D'AOSTA

Rosanna Desiato (a), Alessandra Pautasso (b), Andrea Mosca (c), Federica Verna (a), Maria Cristina Radaelli (a), Serena Canola (a), Walter Mignone (a), Roberto Moschi (a), Enrica Berio (a), Riccardo Orusa (a), Tania Audino (a), Veronica Bellavia (a), Maria Caramelli (a), Paolo Roberto (c), Laura Chiavacci (a), Cristina Casalone (a)

(a) *Unità Operativa Malattie Emergenti, Struttura Semplice Neuropatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

(b) *Struttura Complessa Sanità Animale, Dipartimento di Prevenzione, Azienda Sanitaria Locale 1 Imperiese, Imperia*

(c) *Area Tecnica Territorio e Agricoltura, Istituto per le Piante da Legno e l'Ambiente SpA, Torino*

Scopo della sorveglianza entomologica

La sorveglianza entomologica rappresenta uno degli strumenti più efficaci per individuare e controllare precocemente, attraverso programmi mirati, l'introduzione e la circolazione sul territorio dei virus West Nile (*West Nile Virus*, WNV) e Usutu (*Usutu Virus*, USUV) negli insetti vettori, in modo da mettere in atto tutte le misure disponibili per prevenire la trasmissione all'uomo attraverso il controllo sulle donazioni di sangue ed emocomponenti.

In particolare, la sorveglianza entomologica si configura come un fondamentale strumento di prevenzione e persegue i seguenti obiettivi:

- rilevare la presenza, la densità e la diffusione sul territorio di specie di zanzare a comprovata capacità vettoriale;
- definire le dinamiche territoriali e stagionali delle popolazioni dei vettori;
- identificare precocemente la circolazione dei potenziali patogeni albergati nelle zanzare.

Il WNV, il cui vettore preferenziale è rappresentato da zanzare del genere *Culex*, risulta presente sul territorio nazionale dal 1998, quando fece la sua comparsa interessando alcuni cavalli con sintomatologia neurologica (Padule del Fucecchio, Toscana). Nel 2008, dopo 10 anni di assenza, il WNV è comparso nelle Regioni che circondano il delta del fiume Po, dove è stato identificato nelle zanzare, uccelli, cavalli ed esseri umani. In Piemonte il WNV risulta presente dal 2014. e, da quel momento, si è rapidamente diffuso con crescente intensità fino a interessare tutta la Regione, che rappresenta ad oggi un territorio endemico (1).

Un primo piano di sorveglianza, istituito nel 2001 con l'obiettivo di rilevare nuovi casi di WNV, prevedeva il coordinamento del Ministero della Salute italiano e del Centro di Referenza Nazionale per lo studio e l'accertamento delle malattie esotiche degli animali (CESME), istituito presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (IZSAM).

Successivamente, nel 2007 è stato approvato un Piano di Sorveglianza Nazionale, aggiornato annualmente, che contempla le procedure da mettere in atto sul territorio al fine di rilevare precocemente la malattia (sorveglianza sugli equidi, sugli uccelli e sui vettori), con azioni diversificate in funzione della situazione epidemiologica del territorio in base al decreto del Ministero della Salute 29 novembre 2007: "Approvazione del piano di sorveglianza nazionale per la encefalomyelitis di tipo West Nile (*West Nile Disease*)" e modifiche successive.

Il CESME rappresenta il centro di eccellenza e riferimento nazionale per la diagnosi di WNV in ambito animale, coordinando l'attività dei laboratori di tutti gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS).

Nelle Regioni italiane, per la varietà climatica/ambientale e per le differenti situazioni epidemiologiche relative alle infezioni trasmesse da zanzare, i diversi piani di sorveglianza entomologica si sono sviluppati in tempi e modalità diverse a seconda delle "priorità sanitarie" territoriali.

Dal 2016 il piano di sorveglianza è stato fortemente modificato ed è entrato a far parte di un piano integrato (veterinario-entomologico-umano), con l'obiettivo di gestire in maniera coordinata le eventuali emergenze epidemiche secondo l'approccio *One Health*, ovvero con la collaborazione intersettoriale delle istituzioni sanitarie pubbliche e veterinarie (Piano Nazionale integrato di sorveglianza e risposta al virus della West Nile). In accordo con il Centro Nazionale Sangue e il Ministero della Salute, infatti, è stato modificato il criterio da applicare ai controlli sulle donazioni di sangue, includendo come evento trigger anche le positività riscontrate su avifauna, equidi e zanzare. Si è deciso, quindi, di adottare un approccio basato sulle evidenze, già applicato da alcune Regioni italiane (Piemonte, Lombardia, Friuli Venezia Giulia, Veneto ed Emilia-Romagna) per la gestione del rischio da WNV. In questo modo, non solo la notifica di casi umani, ma anche il rilevamento di WNV in zanzare e uccelli selvatici o il rilevamento di anticorpi WNV-IgM nei cavalli sono stati introdotti come nuovi criteri di attivazione per l'implementazione del *Nucleic Acid Test* (NAT) per WNV nel controllo dei donatori di sangue.

Il piano integrato è stato aggiornato nel 2017, includendo le attività di controllo e valutazione del rischio del virus Usutu, in quanto negli ultimi anni in Europa e nel nord Italia, la circolazione di WNV e USUV è stata ampiamente dimostrata (2, 3).

Infine, dal 2020, il piano di sorveglianza della *West Nile Disease* (WND) è entrato a far parte di un contesto più ampio, che riguarda in generale le principali arbovirosi di interesse medico, con l'emanazione del Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi 2020-2025 (PNA) a valenza pluriennale.

Area oggetto della sorveglianza

L'area di studio è rappresentata dai territori delle Regioni Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta. Il Piemonte ha una superficie di 25.401,56 km² con una popolazione di 4.311.217 abitanti. Il suo territorio, suddiviso in otto province (Alessandria; Asti; Biella; Cuneo; Novara; Torino; Verbano-Cusio-Ossola; Vercelli), è costituito per circa la metà della superficie da aree montuose (43,3%), mentre coesistono anche vaste aree di collina (30,3%) e pianura (26,4%).

La Valle d'Aosta è la Regione più piccola d'Italia con 3.263 km² di superficie ed è anche quella meno popolata con 125.034 abitanti, situata sulle Alpi occidentali nel nord-ovest dell'Italia, al confine con Francia e Svizzera. Essa presenta un territorio completamente montano, dove la stagione estiva è piuttosto breve e le temperature sono mediamente basse e quindi meno idonee all'instaurarsi della circolazione virale di arbovirus.

Con i suoi 5.416,21 km² la Liguria è una delle Regioni più piccole d'Italia, dopo Valle d'Aosta e Molise, ma è una delle più densamente popolate in quanto ospita 1.552.545 abitanti con una densità media di 287 ab/km², molto al di sopra della media nazionale. Il suo territorio, in gran parte montuoso (62,6%) è caratterizzato da un clima mite con elevata umidità e temperature che scendono raramente al di sotto degli zero gradi centigradi, grazie alla presenza del Mar Ligure che lo percorre per la sua intera estensione. Se da un lato la Regione è isolata dall'arco alpino principale, dall'altro è aperta ad intenso traffico marittimo e autostradale anche internazionale che

la espone al rischio di introduzione di specie di zanzare esotiche che possono trovare condizioni ambientali favorevoli per il loro insediamento.

In base agli obiettivi del piano di sorveglianza, sul territorio delle tre Regioni si è proceduto all'individuazione delle aree a maggior rischio di circolazione virale di West Nile e Usutu, sulla base delle caratteristiche climatiche e ambientali favorevoli all'instaurarsi del ciclo virale.

Evoluzione nel tempo del sistema di sorveglianza

Il sistema di sorveglianza entomologica e diagnostica ha avuto un decorso differente nelle tre Regioni, sviluppandosi dal 2011 a partire da iniziative già in atto (come nel caso del Piemonte in cui è andata ad integrare il Piano di lotta alle zanzare della Regione attivo dal 1997, gestito dall'IPLA, Istituto per le Piante da Legno e Ambiente) o dall'assenza di dati storici e dalla conseguente necessità di effettuare dapprima un censimento delle specie di zanzare presenti (come nel caso di Liguria e Valle d'Aosta). Nelle aree in cui le zanzare non erano censite, l'IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZSPLVA) ha iniziato a strutturare – grazie a progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute, fondazioni private e fondi europei – un sistema di sorveglianza entomologico attraverso un approccio multidisciplinare, coinvolgendo tutte le professionalità ed Enti territorialmente competenti e successivamente confrontandosi con le altre Regioni, soprattutto del Bacino Padano, per una standardizzazione dell'approccio.

Tra le tre Regioni in studio, il Piemonte ha cominciato ad avere riscontri della presenza di WNV nel 2014: nonostante la sua contiguità a Regioni a ridosso del bacino padano (Veneto, Emilia-Romagna e Lombardia) che avevano subito pesantemente la circolazione del virus negli anni precedenti, il Piemonte è stato considerato dal Ministero della Salute come un'area non endemica o in cui solo una piccola porzione del territorio era considerata a rischio (Garzaia di Marengo, AL) fino al 2016, quando è stato classificato tra le “aree endemiche” nel “Piano Nazionale integrato di sorveglianza e risposta al virus della West Nile”. La sorveglianza risulta in atto e tuttora cogente, in quanto la Regione rientra ora nelle aree ad alto rischio previste dal nuovo PNA.

In Liguria la sorveglianza entomologica è iniziata nel 2011 grazie alle attività previste da progetti di ricerca dell'IZSPLVA. Durante i primi tre anni gli sforzi erano indirizzati esclusivamente al censimento della popolazione di zanzare e all'individuazione delle zone a maggiore rischio. Dal 2014, sempre nell'ambito di progetti di ricerca, si è cominciato ad analizzare *pool* di zanzare per WNV e USUV (attività non ancora prevista nell'ambito del piano di sorveglianza nazionale nella Regione), con il riscontro di un'unica positività per WNV nel 2014 a Genova e l'individuazione di *pool* positivo per USUV dal 2014 nelle Province di Genova e La Spezia, indice di attiva circolazione virale. Solo nel 2019, il Piano di Sorveglianza Nazionale si è posto l'obbligo di effettuare la sorveglianza entomologica in Liguria, nonostante sia classificata come “area a basso rischio”, attività garantita grazie la collaborazione con Enti e Istituzioni locali. La Valle d'Aosta, infine, rappresentando un'area a rischio minimo di trasmissione, ha effettuato la sorveglianza su base volontaria nell'ambito di specifici progetti di ricerca lungo un periodo temporale limitato (2013-2017).

La sorveglianza entomologica ha permesso di svelare l'ingresso del WNV nel territorio piemontese nel 2014 e di monitorare con grande tempestività la sua diffusione nel 2015, ha registrato quella che sembrerebbe tuttora una limitata e fugace comparsa di WNV nel 2014 in Liguria presso l'aeroporto di Genova alla fine della stagione di rischio, e ha consentito di escludere per ora l'introduzione di WNV in Valle d'Aosta, almeno relativamente ai siti monitorati dalla rete di sorveglianza.

È stata rilevata anche la circolazione in Piemonte e Liguria di USUV, che ha ormai assunto caratteri di endemicità.

Metodologia e strumenti impiegati nell'attività

Il territorio regionale del Piemonte e della Liguria è stato suddiviso in aree regolari tramite applicazione di una griglia costituita da celle quadrate di superficie di 400 km² (lato 20 x 20 km) oppure di 225 km² (lato 15 x 15 km). In ogni cella di altitudine media inferiore ai 600 m s.l.m. è stata posizionata almeno una trappola attrattiva per zanzare adulte delle seguenti tipologie: CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) *light trap*, innescata ad anidride carbonica solida (ghiaccio secco), BG-Sentinel® (*Biogents' mosquito trap*), innescata con BG lure e ghiaccio secco, oppure *gravid trap*, che attraggono le zanzare pronte a deporre le uova. In Piemonte tale griglia è stata modificata nel 2019, utilizzando maglie più strette con quadranti di 15 x 15 km di lato, in modo da aumentare la sensibilità del sistema.

In Valle d'Aosta, considerando la peculiarità territoriale che vede un lungo e stretto fondovalle circondato da montagne con altitudini medie elevate, si è scelto di coprire l'area pianeggiante del fondovalle sempre rispettando criteri di rischio. Sono stati infatti selezionati i siti sulla base delle caratteristiche di inurbamento e di attività antropiche e commerciali, e del posizionamento delle principali vie di comunicazione.

Le trappole sono state distribuite all'interno di ogni cella tenendo conto della presenza di fattori di rischio che condizionano la diffusione delle zanzare e l'attivazione del ciclo infettivo di WNV: precedenti positività rilevate nel corso della sorveglianza (sia regionali che extra-regionali di province confinanti), focolai larvali di *Culex pipiens* (piccoli specchi d'acqua, microfocolai, risaie ecc.), areali di passaggio e/o sosta riconosciuta di avifauna migratoria, rappresentatività di aree urbane e rurali, aree di snodo turistico-commerciale (porti, aeroporti, autoporti, interporti, aree di sosta) nell'ipotesi di movimentazione di zanzare infette al seguito di merci, animali o persone (4).

L'inizio della stagione di rischio di ogni anno è stato stabilito per convenienza a partire dal primo giugno e fino alla fine di ottobre, modificabile in funzione di particolari condizioni meteorologiche o normative.

Le trappole sono state attivate a frequenza quindicinale secondo le specifiche di ciascuna tipologia: per una notte (da prima del tramonto alla mattina successiva) nel caso delle CDC-CO₂, oppure per un giorno intero (da mattina a mattina) nel caso delle BG-Sentinel e delle *gravid trap*.

All'interno del gruppo di lavoro delle "Regioni del bacino Padano", e di comune accordo con le Regioni confinanti, per aumentare la sensibilità del sistema di sorveglianza entomologica e ovviare alle limitazioni territoriali di carattere amministrativo e burocratico, si è proceduto all'identificazione di trappole, all'interno della rete, che per la loro ubicazione avessero valenza informativa sovra territoriale. In questo modo sono state selezionate le cosiddette "trappole parlanti", cioè trappole che per la loro ubicazione a ridosso di confini provinciali e/o regionali, in caso di rilevazione di una positività virologica per WNV fossero informative dal punto di vista dell'avvio dei test sulle donazioni in entrambe le province contermini. Il criterio spaziale è stato individuato nella distanza minore o uguale ai 5 km.

La gestione delle trappole e l'identificazione morfologica degli insetti in Piemonte è affidata all'IPLA. In Liguria, invece, la gestione delle trappole è affidata ai Servizi Veterinari delle Aziende Sanitarie Locali (ASL) competenti per il territorio, al Comune di Genova – Ufficio Animali, e alla Struttura Complessa di Igiene e Sanità Pubblica dell'ASL3 Genovese, mentre l'identificazione di specie viene effettuata da personale della sezione di Imperia e della sezione di Genova dell'IZSPLVA, utilizzando chiavi di classificazione morfologiche (5, 6).

Tutti gli esemplari di sesso femminile sono stati identificati e suddivisi in *pool* in base a specie, sito e data di cattura (*pool* con un massimo di 100 individui) da IPLA e sottoposti nei laboratori dell'IZSPLVA a metodiche biomolecolari specifiche per la ricerca di WNV, utilizzando il protocollo di Del Amo *et al.* del 2013 (7) – *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcription* -

Polymerase Chain Reaction) distintiva per i lineage 1 e 2 – e per la ricerca di USUV con la metodica di Cavrini *et al.* del 2010 (8).

I campioni positivi sono stati spediti al Centro di Referenza per Malattie Esotiche, che ha effettuato i test di conferma sui campioni risultati positivi.

I siti di cattura individuati sono stati via via implementati lungo il tempo: nelle diverse Regioni sono stati individuati in totale 43 siti di cattura nell'anno 2013 e 86 siti nell'anno 2014 (72 in Piemonte, 14 in Liguria).

Nelle stagioni di sorveglianza 2016, 2017 e 2018 l'impianto della rete entomologica attiva nell'area di studio (Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta), è stato determinato condividendo l'esperienza con le Regioni che avevano affrontato già da tempo le problematiche connesse alla circolazione di WNV (Emilia-Romagna, Veneto, Lombardia). Si è deciso quindi di individuare dei criteri oggettivi e condivisi nella stesura delle fasi del campionamento entomologico su zanzare e delle successive analisi virologiche per garantire la messa in atto di un sistema di sorveglianza che garantisse la sensibilità adeguata in termini di precocità di rilevazione della circolazione sul territorio.

Per questi motivi nel 2017 e 2018 la rete delle trappole è stata rafforzata, con il monitoraggio, nel solo Piemonte, di 46 siti tramite 37 CDC-CO₂ e 9 BG-Sentinel.

In Liguria sono stati selezionati 21 siti, monitorati mediante trappole BG-Sentinel (12 siti), *gravid trap* (9 siti). Nel 2019, con l'introduzione della sorveglianza entomologica nelle aree a basso rischio, i siti presenti in Regione Liguria sono stati modificati, con l'introduzione di trappole BG-Sentinel addizionate con ghiaccio secco e *gravid trap* in aree idonee all'instaurarsi del ciclo di WND (aree prossime a foci di torrenti di particolare interesse avi-faunistico). Sono stati selezionati 21 siti monitorati mediante trappole BG-Sentinel (15 siti), *gravid trap* (5 siti), CDC-CO₂ (1 sito).

Nel 2019 la rete di sorveglianza entomologica in Piemonte è stata ulteriormente implementata utilizzando una griglia più fitta (di 15 x 15 km di lato), e arrivando a 67 siti monitorati mediante trappole CDC-CO₂ (in 59 siti) e BG-Sentinel (in 8 siti).

Tali sistemi sono stati mantenuti anche nel corso del 2020.

Risultati

L'attività di sorveglianza entomologica ha permesso di ottenere importanti risultati, come il rilevamento precoce di WNV in Regione Piemonte e USUV sia in Piemonte che in Liguria (9).

L'impiego di trappole dal differente target attrattivo sugli adulti, come le CDC-CO₂ per le specie prevalentemente notturne e le BG-Sentinel per le specie ad attività diurna, ha consentito di descrivere in maniera esaustiva la distribuzione delle zanzare sui territori oggetto di studio. Si è così dimostrato che *Cx. pipiens* è largamente diffusa e rappresenta la prima specie in Piemonte, dove, in accordo con la letteratura scientifica disponibile relativa alla diffusione di WND nel bacino mediterraneo, si è resa responsabile della trasmissione di WNV, mentre *Aedes albopictus* è presente soprattutto in Liguria, in associazione con la concentrazione costiera degli insediamenti abitativi.

Le *gravid trap*, sempre per la cattura di esemplari adulti e più specifiche per zanzare che hanno già effettuato il pasto di sangue, quindi con una maggiore probabilità di essere infette, hanno aumentato l'efficienza del monitoraggio permettendo la rilevazione di 2 positività rispettivamente per WNV a Genova e USUV a La Spezia nel 2014. USUV è stato rilevato in *pool* di zanzare a Genova e a La Spezia anche negli anni successivi. Purtroppo, la minor efficienza e la più complicata gestione di questa tipologia di trappole hanno obbligato ad escludere questi dispositivi dalla rosa di trappole impiegate in sede di sorveglianza e anche di focolaio, sebbene sia ipotizzabile prevederne in futuro la reintroduzione.

In linea generale, nel periodo compreso tra il 2014, anno in cui sono state riscontrate le prime positività, e il 2020, sono state catturate e identificate un totale complessivo di oltre 200.000 zanzare appartenenti a 6 generi ed 8 specie diverse, con alcune differenze tra le Regioni.

Sono stati identificati 5 generi di zanzare in Piemonte (*Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp., *Ochlerotatus* spp., *Anopheles* spp.), 6 generi in Liguria (*Aedes* spp., *Culex* spp., *Culiseta* spp., *Ochlerotatus* spp., *Anopheles* spp. e *Coquilletidia* spp.) e due soli generi in Valle d'Aosta (*Aedes* spp., *Culex* spp.).

La specie maggiormente rappresentata in tutte tre le Regioni è *Cx. pipiens*, seguita in Piemonte da *Ochlerotatus caspius* e da *Anopheles maculipennis* s.l.; in Liguria la seconda specie più frequente è *Ae. albopictus* (Figure 1 e 2).

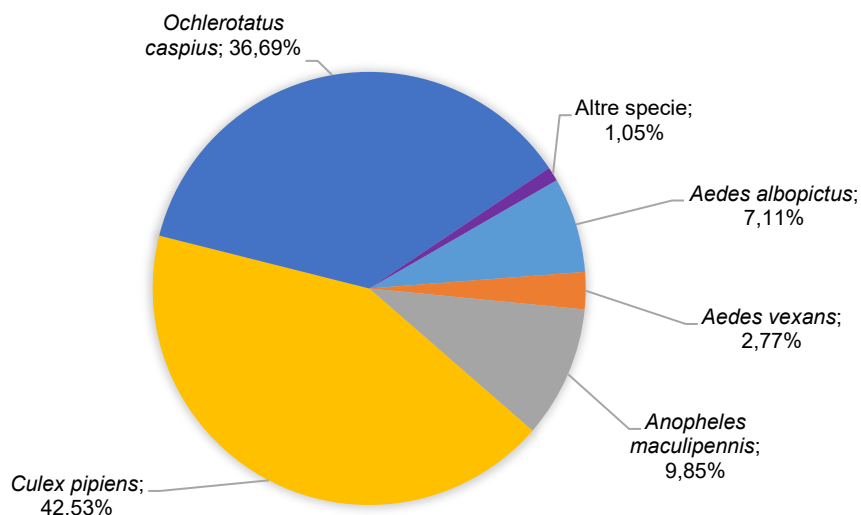


Figura 1. Specie di zanzare catturate in Piemonte, nel periodo 2014-2020

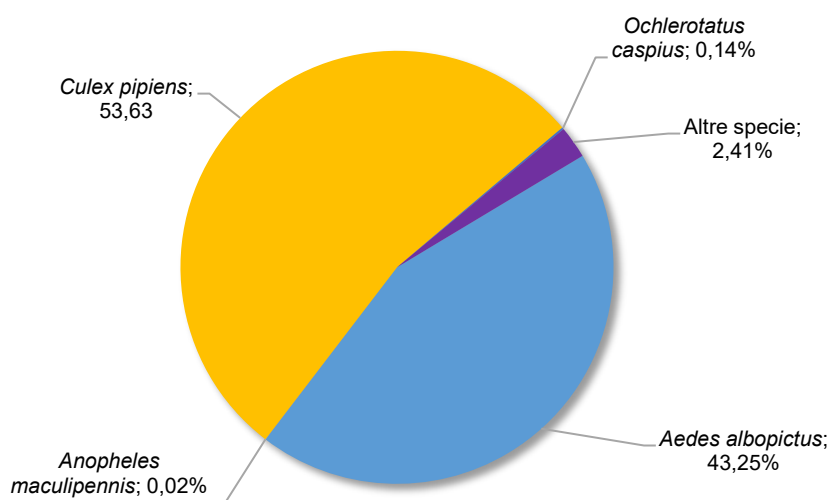


Figura 2. Specie di zanzare catturate in Liguria nel periodo 2014-2020

Queste specie manifestano un andamento sovrapponibile che rivela una presenza cospicua da luglio per poi diminuire progressivamente da agosto in poi. *Anopheles maculipennis* ha un andamento simile, ma in quantità molto più modeste.

In Liguria il rapporto è più equivalente, sebbene si noti soprattutto all'inizio della stagione di sorveglianza che *Ae. albopictus* è molto poco rappresentata (30-40 catture a settimana), mentre *Cx. pipiens* già a giugno raggiunge i 300-400 esemplari a settimana, per poi diminuire nel corso della stagione.

In Valle d'Aosta, oltre alla specie *Cx. pipiens* è stato catturato un solo esemplare di *Aedes vexans*.

Inoltre, il sistema di sorveglianza ha permesso di confermare la presenza della zanzara tigre in Valle d'Aosta nel 2014, territorio considerato fino ad allora l'unico indenne in tutta Italia; oltre a ciò uova di *Ae. albopictus* sono state trovate in un'ovitrappola collocata in alta valle, ad un'altitudine di 950 m.s.l.m., reperto che ha avvalorato la presenza della specie al di sopra dei 600 m. s.l.m. (10). Questa presenza sembrerebbe tuttora una limitata e fugace comparsa, almeno relativamente ai siti monitorati dalla rete di sorveglianza (11).

Nelle stagioni successive, in Valle d'Aosta non è stata rilevata dal sistema di sorveglianza la presenza di *Ae. albopictus*.

La scarsità di individui catturati dipende probabilmente dalle temperature minime notturne e dal fatto che la Regione è comunque ancora poco colonizzata dalle zanzare.

Circolazione virale di WNV e USUV nelle zanzare

Nell'arco temporale 2011-2020 sono risultati positivi alla ricerca del genoma del WNV e del USUV rispettivamente 32 (comprendenti complessivamente 1.748 zanzare) e 29 (comprendenti complessivamente 1.124 zanzare) *pool*. Due *pool* prelevati nel 2015 e nel 2018 sono risultati co-infettati. Il 96,88% dei *pool* positivi per WNV e il 96,55% di quelli positivi per il USUV erano costituiti da *Cx. pipiens*, che si conferma essere il principale vettore di questi patogeni.

Altre specie risultate positive a WNV sono state *Oc. caspius* (4 *pool*) e *Culex modestus* (2 *pool*). A questi si devono aggiungere 2 *pool* di *Culex* spp., in quanto identificate solo a livello di genere. L'USUV, invece, è stato rilevato in *Ae. albopictus* (12 *pool*), *Oc. caspius* (5 *pool*), *Culex* spp. (2 *pool*), *An. maculipennis* s.l. (1 *pool*), *Culiseta annulata* (1 *pool*) e *Oc. detritus* (1 *pool*).

Nel 2014 il WNV ha fatto la sua comparsa per la prima volta in Piemonte in un *pool* di zanzare *Cx. pipiens* prelevato il 27 agosto in provincia di Alessandria, a Valenza; a questa positività ne è seguita un'altra in un *pool* prelevato il 10 settembre nel sito di San Salvatore Monferrato (AL). Le analisi condotte, e confermate dal Centro di Referenza Nazionale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (CdR), hanno dimostrato l'appartenenza del ceppo virale al WNV-lineage 2. Inoltre, una trappola posizionata presso l'aeroporto di Genova ha catturato a fine stagione (il 23 settembre) un *pool* costituito da 100 *Culex pipiens* positivo per WNV. A La Spezia, invece, è stata rilevata nello stesso periodo una positività per USUV in un *pool* di *Cx. pipiens* catturato nei pressi del porto.

L'anno successivo, nel 2015, le positività su *pool* di zanzare si sono diffuse anche ad altre province del Piemonte, interessando il comune di Novara (2 *pool* positivi WNV) e il comune di Salasco (VC) (1 *pool* positivo WNV), il comune di Verolengo (TO) (1 *pool* positivo WNV) e interessando nuovamente la provincia di Alessandria (1 *pool* positivo USUV nel comune di Alessandria, frazione di Villa del Foro; 1 *pool* positivo WNV-lineage 2 nel comune di Ticineto) e la provincia di Vercelli (1 *pool* positivo per USUV ad Arborio e 1 *pool* co-infettato a Trino).

Tutti i *pool* positivi appartenevano alla specie *Cx. pipiens*, ad eccezione di 1 *pool* di *An. maculipennis* s.l. catturato nei pressi del comune di Arborio (VC). Tutte le positività (76 *pool* in

totale) sono state imputate a WNV-lineage 2. La Regione Liguria ha nuovamente registrato una positività per USUV in 2 *pool* di *Cx. pipiens* catturate rispettivamente a La Spezia e a Genova.

Nel 2016 è stata rilevata una positività per USUV in un *pool* di 67 *Cx. pipiens* catturate i primi di luglio presso l'autoporto Pescarito di San Mauro Torinese (TO), mentre una positività per WNV lineage 2 è stata riscontrata in un *pool* di 23 *Cx. pipiens* catturate la prima settimana di settembre lungo l'asse del fiume Po, nel comune di Ticineto (AL).

Non si sono registrate positività in Liguria.

Per quanto riguarda il 2017 le positività per USUV sono state numerose; sono state riscontrate 7 positività in *Cx. pipiens* (6 in Piemonte e 1 in Liguria) rispettivamente:

- a fine luglio a Cameri (NO), Villa del Foro e Viguzzolo (Alessandria);
- all'inizio di agosto a Ticineto (Alessandria);
- all'inizio di settembre a Trino (Vercelli) e presso l'autoporto Pescarito di San Mauro Torinese (Torino);
- a fine settembre a Genova.

Durante la stagione vettoriale 2017 è risultato positivo per WNV lineage 2 un solo *pool* costituito da 100 *Cx. pipiens* prelevato nel comune di Novara a fine luglio.

Nel 2018 sono risultati positivi per WNV lineage 2, 17 *pool* di *Cx. pipiens* prelevati a:

- Trino (VC) l'11/7/2018;
- Albano (VC) il 25/7/2018;
- Savigliano (CN) il 30/7/2018;
- Novara Olengo (NO) il 31/7/2018;
- Novara Centro (NO) il 31/7/2018 e il 6/9/2018;
- Ticineto (AL) il 2/8/2018, il 23/8/2018 e il 20/9/2018 (co-infetto con WNV);
- Candia Canavese (TO) l'8/8/2018;
- Valenza (AL) il 22/8/2018 (2 *pool*);
- Verolengo (TO) il 29/8/2018;
- Agliano (AT) il 29/8/2018;
- Tortona (AL) il 5/9/2018 e il 3/10/2018;
- Carignano (TO) il 19/9/2018.

Sono risultati positivi per USUV 5 *pool* di *Cx. pipiens* prelevati a:

- Novara (2 *pool*: Centro e interporto) il 23/8/2018;
- Valenza (AL) il 5/9/2018;
- Alessandria Villa del Foro (AL) il 19/9/2018;
- Ticineto (AL) il 20/9/2018 (co-infetto con WNV).

In Liguria, è risultato positivo per USUV un *pool* di *Cx. pipiens* prelevato a Genova.

Nei successivi 2 anni le positività riscontrate hanno riguardato *pool* di *Cx. pipiens* e di *Cx. modestus* in cui è stato rilevato il WNV-lineage 2 e USUV. In particolare, nel 2019 si sono verificate 2 positività per WNV in 2 *pool* di *Cx. pipiens* catturate a fine agosto in provincia di Alessandria e di Vercelli. Nel 2020, a fine luglio, è stata rilevata la presenza di WNV-lineage 2 in 1 *pool* di *Cx. pipiens* e 1 *pool* di *Cx. modestus* catturate rispettivamente a Borgo d'Ale (VC) e Cerano (NO). Infine, sempre nel 2020, 3 *pool* di *Cx. pipiens* sono risultati positivi per virus Usutu a Valenza (AL), Alessandria e Vespolate (NO).

A seguito della conferma da parte del Centro di Referenza di Teramo, sono state prontamente messe in atto le misure di controllo sulle donazioni di sangue ed emocomponenti in tutto il territorio della Regione.

Sorveglianza entomologica durante la stagione 2018

In tutta Europa, nel 2018 si è assistito ad una drastica impennata dei casi umani e veterinari di malattia sostenuta da WNV, nonché delle positività rinvenute nei *pool* di zanzare. Durante la stagione di sorveglianza sono stati catturati: 25.990 esemplari zanzare in Piemonte e 9.121 in Liguria, con sessioni di cattura da inizio giugno a fine ottobre.

In Piemonte sono state effettuate 390 sessioni di cattura, di cui 71 “vuote”, cioè senza zanzare.

In Liguria sono state effettuate 169 sessioni di cattura, con 11 sessioni vuote.

Le analisi virologiche sono state effettuate su un totale di 1273 *pool*:

- 350 provenienti dalla Liguria (per un totale di 7.029 esemplari testati), appartenenti complessivamente a 9 specie;
- 923 provenienti dal Piemonte (per un totale di 22.553 esemplari testati), appartenenti complessivamente a 14 specie.

Le positività riscontrate nel corso dell’anno sono state eccezionalmente numerose e in linea con quanto avvenuto nel resto d’Italia e d’Europa.

Nel 2018 in tutta Europa, la stagione di trasmissione del WNV si è caratterizzata non solo per l’inizio precoce, ma anche per il marcato aumento del numero di casi umani autoctoni rispetto agli anni precedenti. In particolare, l’aumento dei casi nel 2018 è stato pari a 7,2 volte rispetto all’anno precedente.

Dei 1.503 casi umani complessivamente segnalati nel 2018 in Europa, 577 sono stati notificati in Italia, dove ormai la malattia è endemica su tutto il territorio e la circolazione virale è segnalata in tutti gli attori del ciclo di trasmissione.

Il WNV segue di solito un pattern stagionale: i casi si distribuiscono tra luglio e ottobre (ovvero tra la 26^a e la 44^a settimana dell’anno), con un picco di incidenza tra metà agosto e metà settembre. Nei due anni precedenti (2016 e 2017), i primi casi sono stati notificati dalla settimana 28 (dal 9 al 15 luglio). Nel 2018, invece, i primi casi di WNV sono stati notificati in Grecia nella settimana 26 (dal 25 giugno al 1° luglio), ma l’insorgenza del primo caso risaliva addirittura al 31 maggio (settimana 22) (12). In Italia si è riproposto lo stesso quadro, con la notifica del primo caso confermato da WNV il 16 giugno nella provincia di Rovigo. Anche la sorveglianza veterinaria ha rilevato le medesime peculiarità: i dati dell’*Animal Disease Notification System* (ADNS) della Commissione Europea hanno messo in evidenza una precoce circolazione virale tra gli equidi, con sei focolai notificati tra la settimana 26 e la settimana 31, rispettivamente in Ungheria (3), Grecia (2) e Italia (1). Secondo i riepiloghi mensili dei Copernicus Climate Change Services, il sistema europeo che monitora i cambiamenti climatici al fine di sostenere le politiche europee di mitigazione e adattamento ai cambiamenti climatici, le precipitazioni medie osservate nel marzo 2018 sono state superiori alla media del periodo 1981-2010 in molte parti dell’Europa, in particolare nelle aree colpite dal WNV. Anche nell’aprile 2018 le temperature hanno superato la media stagionale, mentre le precipitazioni sono state nella norma. Le temperature si sono mantenute sopra la media stagionale anche nel maggio 2018 e in più, anche le precipitazioni in Italia e nei paesi lungo la costa adriatica sono state molto sopra la media. Il giugno 2018 ha visto precipitazioni molto al di sopra della media nella maggior parte dell’Europa meridionale, e in particolare nei paesi lungo la costa adriatica, con inondazioni in diversi Paesi, tra cui Grecia e Romania (<https://climate.copernicus.eu/monthly-summaries-precipitation-relative-humidity-and-soil-moisture>). L’andamento meteorologico descritto è indicativo di un anticipo della stagione primaverile nella parte sud-orientale dell’Europa e potrebbe aver sostenuto condizioni ambientali favorevoli a un rapido aumento della popolazione di vettori. Diversi studi hanno dimostrato che alcuni fattori ambientali, come le variazioni della temperatura e delle precipitazioni, possono essere fattori predittivi per la trasmissione del WNV (13-15).

In particolare, le temperature estive sopra la media sono state associate ad un incremento dei casi nell'uomo e negli equidi sia in Europa, sia in Italia (16-18). L'aumento delle temperature primaverili può contribuire all'amplificazione della trasmissione di WNV all'inizio della stagione, con conseguente notevole incremento della prevalenza di infezione nelle zanzare e nella popolazione di uccelli selvatici durante l'estate ed elevato rischio di trasmissione nell'uomo.

Confrontando i dati meteorologici del periodo aprile – ottobre per il Piemonte (qui, per semplicità, ci si è limitati ad utilizzare le medie giornaliere dei dati raccolti in 4 stazioni meteo di altrettante province, ossia Alessandria, Asti, Cuneo e Novara), si può notare come nel 2018 rispetto all'anno precedente vi sia stato un periodo piuttosto piovoso verso metà aprile, seguito da un picco di calore durato circa un mese (Figura 3, ellissi rosse). Poi, tutta la stagione è stata caratterizzata da vari fenomeni piovosi (Figura 4, frecce), con temperature simili a quelle del 2017, eccezion fatta per il mese di settembre molto caldo (Figura 4, cerchio blu).

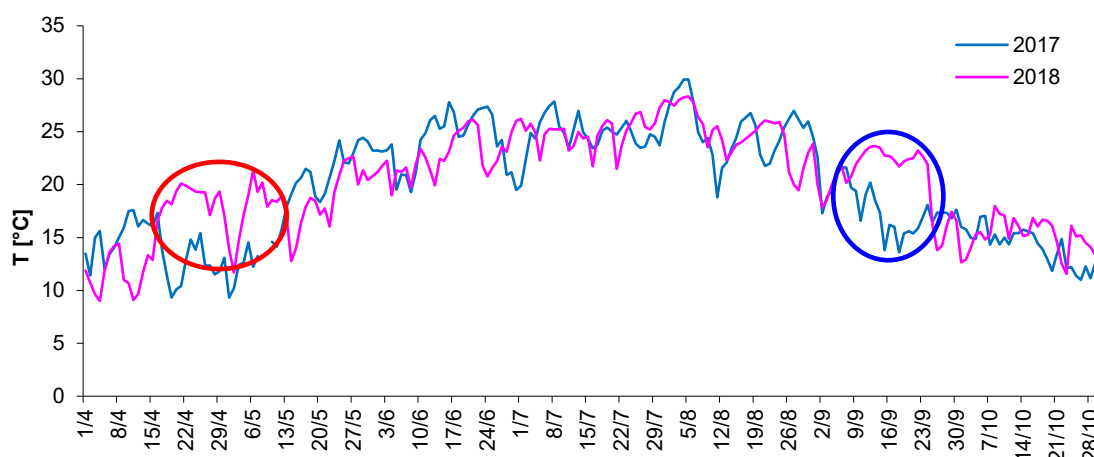


Figura 3. Confronto tra le temperature medie giornaliere 2017 e 2018 nel periodo aprile-ottobre (media tra i dati delle stazioni di Nizza Monferrato, Casale Monferrato, Alba e Cerano). Nelle ellissi sono evidenziati i periodi significativamente più caldi registrati nel 2018

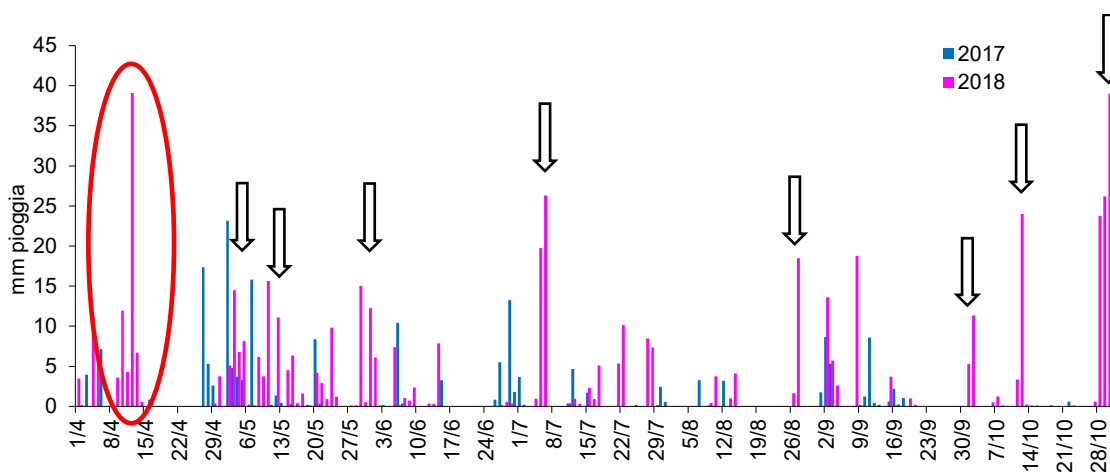


Figura 4. Confronto tra le precipitazioni giornaliere 2017 e 2018 nel periodo aprile-ottobre (media tra i dati delle stazioni di Nizza Monferrato, Casale Monferrato, Alba e Cerano). Nell'ellisse il periodo molto piovoso (aprile 2018); le frecce indicano gli altri fenomeni piovosi significativi del 2018

L'andamento climatico particolare di aprile (molta pioggia, quindi molti focolai di sviluppo larvale, seguita da elevate temperature, quindi cicli di sviluppo più rapidi), quando la popolazione del vettore principale (*Cx. pipiens*) si sta rinforzando dopo la diapausa invernale, potrebbe essere la principale causa dell'elevata densità iniziale del vettore che è stata in effetti registrata in maggio e che potrebbe aver contribuito alla circolazione del virus nella popolazione ornitica (serbatoio e amplificatore), che poi è stato diffuso anche tra gli ospiti a fondo cieco (uomo e cavalli).

Le numerose piogge che hanno interessato tutta la stagione riproduttiva delle zanzare e il picco di calore di settembre potrebbero aver ulteriormente favorito la capillare diffusione e la longevità del vettore. Quest'ultimo fattore, favorito dall'umidità, contribuisce notevolmente alla diffusione di malattie da vettore in quanto permette più cicli gonotrofici per singola femmina.

Discussione e conclusione

La sorveglianza veterinaria sui vettori ha il principale obiettivo di rilevare precocemente la circolazione virale sul territorio allo scopo di attivare le misure atte a prevenire la trasmissione umana attraverso trapianti e trasfusioni, come il NAT su donatori residenti nella provincia interessata e la sospensione delle donazioni per 28 giorni per coloro che hanno soggiornato nella provincia interessata anche solo per una notte. Dal 2015, infatti, in accordo con il Centro Nazionale Sangue e il Ministero della Salute, si è deciso di adottare un approccio basato sulle evidenze per la gestione del rischio da WNV attraverso sangue e organi, in contrasto con la vecchia normativa che imponeva il controllo random delle sacche di sangue nelle province interessate negli anni precedenti da casi umani di WNV. Il sistema è dotato di una comprovata efficacia, tanto che, ad esempio, nel 2018 la sorveglianza integrata ha permesso di intercettare donatori positivi in ben tre province del Piemonte in cui la sorveglianza veterinaria aveva rilevato la circolazione virale, ma che seguendo la vecchia normativa non sarebbero state sottoposte a controlli.

Il Capitolo 3 del PNA 2020-2025 prevede la possibilità per le Regioni di decidere la sospensione della sorveglianza entomologica nel momento in cui si verifica una positività nell'unità geografica di riferimento, ad eccezione delle "trappole parlanti" poste ai confini di aree non ancora interessate da circolazione virale. La Regione Piemonte ha previsto negli ultimi due anni l'applicazione di detta possibilità, interrompendo la sorveglianza entomologica alla prima positività per WNV e mantenendo attive solamente le trappole che rientravano nei programmi di disinfezione dei comuni.

La scelta di mantenere attiva questa sorveglianza non è da escludere per gli anni a venire, in quanto permette di conoscere meglio la circolazione virale sul territorio e di comprendere la dinamica del virus a livello spaziale e temporale.

Infine, il piano di sorveglianza nazionale prevedeva fino al 2016 per la Regione Liguria solo una sorveglianza attiva su equidi (oltre a quella passiva su avifauna ed equidi), attraverso esami sierologici a campione e con unico prelievo, in quanto area non endemica come il resto del territorio nazionale. Tuttavia, nell'ambito di progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute, è stata attivata, già a partire dal 2014, una sorveglianza integrativa sulle zanzare che ha permesso di constatare l'assenza di circolazione virale di WNV sul territorio. È doveroso sottolineare che, nonostante ciò, il territorio ligure presenta caratteristiche idonee alla circolazione di WNV, data la presenza degli insetti vettori (zanzare della specie *Culex pipiens*), avifauna selvatica e riscontro anche in anni precedenti di USUV, che condivide con WNV numerosi aspetti del ciclo di trasmissione.

Bibliografia

1. Pautasso A, Radaelli MC, Ballardini M, Francese DR, Verna F, Modesto P, Grattarola C, Desiato R, Bertolini S, Vitale N, Ferrari A, Rossini I, Accorsi A, Mosca A, Monaco F, Savini G, Prearo M, Mignone W, Chiavacci L, Casalone C. Detection of West Nile and Usutu viruses in Italian free areas: entomological surveillance in the Piedmont and Liguria regions. *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 2016;16(4): 292-4. doi: 10.1089/vbz.2015.1851.
2. Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Albieri A, Defilippo F, Maioli G, Galletti G, Gelati A, Barbieri I, Tamba M, Lelli D, Carra E, Cordioli P, Angelini P, Dottori M. Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2009. *PLoS One* 2010;5(12):e14324. doi: 0.1371/journal.pone.0014324.
3. Nikolay B. A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: How much do transmission cycles overlap? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2015;109(10):609-618. doi: 10.1093/trstmh/trv066.
4. Romi R, Toma L, Severini F, Di Luca M, Boccolini D, Ciufolini MG, Nicoletti L, Majori G. *Guidelines for control of potential arbovirus mosquito vectors in Italy*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009 (Rapporti ISTISAN 9/11).
5. Stojanovich CJ, Scott HG (Ed.). *Mosquitoes of Italy: Mosquitoes of the Italian biogeographical area which includes the Republic of Malta, the French Island of Corsica and all of Italy except the far Northern Provinces*. Portland, OR: Chester J. Stojanovich - Metairie, LA: Harold George Scott; 1997.
6. Severini F, Toma L, Di Luca M, Romi R. Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti. *Fragmenta entomologica* 2009;41 (2):213-372.
7. Del Amo J, Sotelo E, Fernández-Pinero J, Gallardo C, Llorente F, Agüero M, Jiménez-Clavero MA. A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. *Journal of Virological Methods* 2013;189:321-7.
8. Cavrini F, Della Pepa ME, Gaibani P, Pierro AM, Rossini G, Landini MP, Sambri V. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Virology* 2011;50:221-3.
9. Verna F, Modesto P, Radaelli MC, Francese DR, Monaci E, Desiato R, Grattarola C, Peletto S, Mosca A, Savini G, Chianese R, Demicheli V, Prearo M, Chiavacci L, Pautasso A, Casalone C. Control of mosquito-borne diseases in Northwestern Italy: preparedness from one season to the next. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2017;17(5):331-9.
10. ECDC. *Development of Aedes albopictus risk maps*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2009.
11. Verna F, Ballardini M, Pautasso A, Radaelli MC, Francese DR, Mosca A, Savini G, Orusa R, Chiavacci L, Casalone C. The entomological surveillance as a tool for the early detection of mosquito-borne diseases: the experience of Piedmont, Liguria and Valle d'Aosta (Northwestern Italy). *International Journal of Infectious Diseases* 2016;53:162-3. doi: 10.1016/j.ijid.2016.11.397.
12. Haussig JM, Young JJ, Gossner CM, Mezei E, Bella A, Sirbu A, Pervanidou D, Drakulovic MB, Sudre B. Early start of the West Nile fever transmission season 2018 in Europe. *Euro Surveillance* 2018;23(32):pii=1800428. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.32.1800428>
13. Groen TA, L'Ambert G, Bellini R, Chaskopoulou A, Petric D, Zgomba M, Marrama L, Bicout DJ. Ecology of West Nile virus across four European countries: empirical modelling of the *Culex pipiens* abundance dynamics as a function of weather. *Parasites & Vectors* 2017. doi 10.1186/s13071-017-2484-y2017.
14. Vogels CBF, Göertz GP, Pijlman GP, Koenraadt CJM. Vector competence of northern and southern European *Culex pipiens pipiens* mosquitoes for West Nile virus across a gradient of temperatures. *Medical and Veterinary Entomology* 2017;31(4):358-64.

15. Marini G, Manica M, Delucchi L, Pugliese A, Rosà R. Spring temperature shapes West Nile virus transmission in Europe. *Acta Tropica* 2021;215:105796. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105796.
16. Paz S, Malkinson D, Green MS, Tsioni G, Papa A, Danis K, Sirbu A, Ceianu C, Katalin K, Ferenczi E, Zeller H, Semenza JC. Permissive summer temperatures of the 2010 European West Nile Fever upsurge. *Plos One* 2013;8(2):e56398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056398>.
17. Tran A, Sudre B, Paz S, Rossi M, Desbrosse A, Chevalier V, Semenza JC. Environmental predictors of West Nile fever risk in Europe. *International Journal of Health Geographics* 2014;13:26.
18. Moirano G, Gasparrini A, Acquaotta F, Fratianni S, Merletti M, Maule M, Richiardi L. West Nile Virus infection in Northern Italy: Case-crossover study on the short-term effect of climatic parameters. *Environmental Research* 2018;167:544-9. doi: 10.1016/j.envres.2018.08.016.

SORVEGLIANZA DEI VETTORI DEI VIRUS WEST NILE E USUTU IN LOMBARDIA

Francesco Defilippo (a), Monica Cerioli (a), Mario Chiari (b), Marco Farioli (b), Francesca Faccin (a), Sabrina Canziani (a), Tiziana Trogu (a), Marco Tironi (a), Enrica Sozzi (a), Ana Moreno (a), Antonio Lavazza (a), Davide Lelli (a)

(a) *Reparto di Virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia-Romagna, Brescia*

(b) *Direzione Generale Welfare, Regione Lombardia, Milano*

Piano di sorveglianza regionale dei virus West Nile e Usutu

La circolazione del virus West Nile (*West Nile Virus*, WNV) è caratterizzata da un ciclo biologico altamente complesso che prevede il passaggio dell'agente patogeno da un elevato numero di specie di uccelli selvatici alle zanzare che agiscono da vettori facilitando la diffusione virale. Il virus può infettare diverse specie, oltre agli uccelli che sono gli ospiti reservoir, tra cui mammiferi, e rettili (1). L'uomo e il cavallo sono ospiti a fondo cieco, ovvero si infettano e possono ammalarsi quando il virus viene introdotto nel torrente circolatorio con la saliva di zanzare infette. Il cavallo e l'uomo condividono la possibilità (nell'1% dei casi) di patologie del sistema nervoso, anche di estrema gravità. (2).

Questo negli anni ha reso necessario attivare una sorveglianza integrata entomologica, veterinaria e umana. Il piano nazionale di sorveglianza per la *West Nile Disease* (WND) prevede quindi un approccio multidisciplinare volto a verificare la presenza del virus nell'ambiente (sorveglianza ornitologica, entomologica e sui cavalli) e alla determinazione del rischio attraverso donatori (di sangue e organi) potenzialmente infetti. Essa ha lo scopo di guidare e ottimizzare la risposta degli enti sanitari e operatori sanitari focalizzando interventi in aree e in periodi target, rappresentando la prima linea di difesa contro questa malattia infettiva in Italia.

L'esperienza di sorveglianza integrata attivata nelle Regioni del bacino padano (Friuli Venezia Giulia, Veneto, Lombardia, Piemonte ed Emilia-Romagna) si è dimostrata funzionale al rilevamento precoce della circolazione di WNV e del virus Usutu (*Usutu Virus*, USUV) e alla stima del rischio sanitario associato, mediante la cattura di zanzare e uccelli e il loro screening di laboratorio per la ricerca del patogeno (3)

In Lombardia l'attività di sorveglianza della WND è svolta dai Dipartimenti di Igiene e Sanità Pubblica e dai Dipartimenti Veterinari e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale delle Agenzie Tutela Salute ATS, dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER), dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (ISZAM), dai laboratori di riferimento dei casi umani presso Fondazione Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) Policlinico San Matteo di Pavia e Azienda Ospedaliera (AO) Sacco e dal Centro Regionale Sangue, con lo scopo principale di fornire informazioni utili al fine di attivare la sorveglianza sanitaria ritenuta più appropriata.

Sorveglianza entomologica

Monitoraggio e sorveglianza sono due termini che vengono spesso confusi o usati indistintamente ma che possiedono in realtà un significato ben distinto. Il monitoraggio consiste in procedure adottate per l'osservazione temporanea o permanente (ad esempio una dinamica di specie) e non è seguita da attività aggiuntive. Un monitoraggio si basa su una raccolta e analisi di dati effettuata allo scopo di quantificare cambiamenti nelle condizioni o valutare l'efficacia di azioni nel conseguire un obiettivo di gestione. Il monitoraggio prevede protocolli standardizzati, una certa periodicità dell'operato e un elevato e adeguato numero di stazioni di raccolta dati.

Il *monitoraggio entomologico* permette di ottenere dati misurabili, oggettivi e confrontabili sulla popolazione di un insetto. Serve infatti a determinarne la densità e la distribuzione in un dato momento e permette di valutare le eventuali variazioni nel tempo, l'efficacia delle azioni di lotta e a preparare appropriate e rapide risposte in caso di necessità.

La *sorveglianza* riguarda invece la raccolta, l'analisi e l'interpretazione sistematica e continua dei dati sanitari essenziali per la pianificazione, l'implementazione e la valutazione della pratica sanitaria pubblica (4). Nella *sorveglianza entomologica*, questi dati riguardano gli insetti vettori di malattie e permettono di calcolare, ad esempio, il tasso di positività ad un determinato arbovirus nelle zanzare e di conseguenza il livello di rischio per l'uomo (5).

A partire dal 2013 è attivo in Regione Lombardia un piano di sorveglianza per la WND che trae origine dalle disposizioni in vigore su tutto il territorio nazionale (*Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 311 del 10 settembre 2012 e DGR DDUO18138_2018), basato sulla sorveglianza entomologica e integrato con un'intensa attività di sorveglianza sull'avifauna selvatica. In realtà, l'aspetto entomologico di questo Piano di sorveglianza ha subito una tendenza evolutiva: nel corso degli anni, infatti, entomologi specializzati hanno cercato di sviluppare programmi e metodologie di indagine sempre più approfondite e accurate.

Il sistema sviluppato e oggi comunemente utilizzato si basa su trappole attrattive innescate ad anidride carbonica (CO₂) senza fonte luminosa. Le trappole sono disposte su una griglia con maglie 20x20km a coprire prevalentemente l'area pianeggiante considerata a maggior rischio di circolazione del vettore, con alcune eccezioni rappresentate dalle trappole posizionate in provincia di Sondrio. All'interno di ogni quadrante è stata scelta da un entomologo esperto una stazione di cattura fissa idonea per ottimizzare le catture di *Culex pipiens* e *Culex modestus* (6). Nell'ultimo anno di esecuzione (2020) la rete di monitoraggio ha previsto l'attivazione di 44 trappole dall'inizio giugno a fine settembre; la configurazione della rete è osservabile in Tabella 1 e Figura 1.

Tabella 1. Numero di trappole impiegate nella sorveglianza WNV nel territorio delle diverse ATS della Regione Lombardia (2020)

ATS	Area territoriale di competenza (ex ASL)	N. trappole
Bergamo	Bergamo	4
Brescia	Brescia	7
Valpadana	Cremona	3
Valpadana	Mantova	8
Città Metropolitana	Lodi	3
Città Metropolitana	Milano 1	3
Città Metropolitana	Milano 2	2
Pavia	Pavia	7
Brianza	Lecco	1
Insubria	Como	1
Insubria	Varese	1
Montagna	Sondrio	3

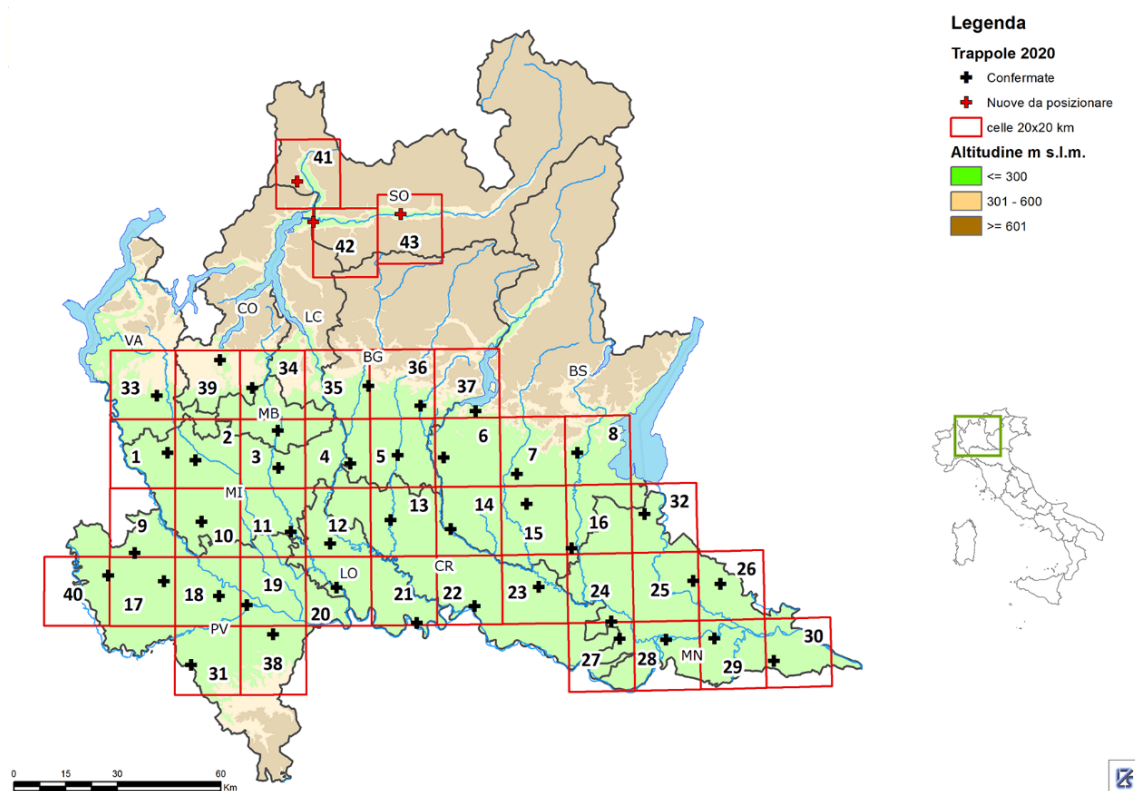


Figura 1. Distribuzione delle trappole CO₂ per la sorveglianza di WNV sul territorio lombardo nel 2020

L'attività di campionamento in campo viene affidata a personale strutturato afferente alle diverse ATS presenti sul territorio. Tutte le trappole sono fornite e gestite dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) che si fa carico dell'identificazione di specie degli insetti catturati, costituzione dei *pool* e loro analisi virologica.

Le specie *Cx. pipiens* e *Cx. modestus* catturate vengono suddivise in *pool* da un minimo di 1 esemplare a un massimo di 100 individui per specie-sito-data specifici. Dopo conteggio e identificazione, le zanzare vengono sottoposte a *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) per la ricerca di WNV e USUV. Le positività al test molecolare vengono confermate successivamente dal Centro Nazionale di Referenza sulle Malattie Esotiche (CESME) presso l'IZSAM, mentre presso IZSLER si cerca di isolare in vitro su colture cellulari i ceppi dai campioni positivi ai fini di una successiva genotipizzazione.

Dalla data della cattura alla notifica di positività per WNV passa al massimo una settimana (la media degli ultimi anni è di 4 giorni). Tutti i campioni vengono conservati in provette da crioconservazione codificate. Le zanzare delle altre specie non sono suddivise in *pool*, ma ugualmente conservate in provette singole per specie-sito-data. Le positività per WNV nelle zanzare vengono trasmesse via e-mail contemporaneamente alla Direzione Welfare di Regione Lombardia, ai direttori dei servizi delle ATS interessate, al laboratorio regionale di riferimento per le malattie trasmesse da vettori, al centro trasfusionale regionale, alle Regioni confinanti in caso di trappole "parlanti", ovvero poste lungo i confini regionali. Utilizzando questo sistema prevalentemente per la prevenzione delle infezioni trasfusionali – ovvero in caso di positività viene avviato il controllo

sistematico NAT (*Nucleic Acid Test*) delle sacche di soggetti donatori –, seguendo quanto indicato nel piano arboviroso nazionale (7), la Regione Lombardia prevede che sia possibile sospendere la sorveglianza nelle province ove è stata già dimostrata la circolazione virale.

Caratteristiche dell'area di studio

La Lombardia ha una struttura morfologica relativamente semplice. La parte settentrionale è essenzialmente montuosa (più del 40% del territorio regionale è occupato da montagne), mentre la restante metà meridionale della Regione è pianeggiante (oltre il 47% del territorio regionale è occupato dalla pianura), e si estende nel tratto centrale della pianura Padana, a eccezione della parte sudoccidentale, cioè l'Oltrepò Pavese, dove si spingono i rilievi dell'Appennino emiliano.

Da un punto di vista climatico, la Lombardia è classificabile come continentale, mentre le zone montuose sopra i 1500 m presentano caratteristiche tipiche dell'alta montagna Alpina. Tuttavia, così come si verifica per altre Regioni, le caratteristiche climatiche della Lombardia possono variare sensibilmente, anche tra zone non molto distanti, a causa della presenza dei rilievi, dell'esposizione rispetto ai venti dominanti e della presenza di grandi bacini lacustri, capaci di conferire caratteri mediterranei al clima delle aree immediatamente adiacenti. Le temperature variano in base all'esposizione e alla quota del territorio. Le estati sono calde con valori che superano facilmente i 30°C e che, in corrispondenza delle ondate di caldo, possono superare i 35°C nelle conche interne e in Pianura Padana.

L'attività di sorveglianza si concentra soprattutto nella parte di territorio occupato da pianure (Figura 1). Negli anni queste aree sono state soggette a modifiche ambientali, sostituendo ormai da secoli l'originaria foresta di latifoglie con specie coltivate; nell'alta pianura, invece, vaste aree sono tuttora ricoperte da brughiere, con robinie, pini silvestri e varie specie erbacee e arbustive.

Evidenze entomologiche

Nella stagione 2014-2019 sono state catturate in totale 418.788 culicidi di 14 specie diverse, rappresentate per il 65% dalla specie *Culex pipiens* (Tabella 2). L'osservazione dei dati per provincia mostra lo stesso risultato, indicando per quasi tutte le provincie una presenza di *Culex pipiens* superiore al 60% rispetto alle altre specie campionate (Tabella 3).

Tabella 2. Specie di zanzare campionate negli anni 2014-2019 in Lombardia

Specie	2014	2015	2016	2017	2018	2019	Totale
<i>Aedes albopictus</i>	337	662	960	765	858	977	4559
<i>Aedes caspius</i>	2967	10012	7642	22880	46163	22465	112129
<i>Aedes geniculatus</i>			1			7	8
<i>Aedes koreicus</i>		7	2		6	26	41
<i>Aedes rusticus</i>		1	5				6
<i>Aedes vexans</i>	386	1154	2026	394	1063	1172	6195
<i>Anopheles maculipennis</i> complex	1777	3820	4153	3452	7001	1525	21728
<i>Anopheles plumbeus</i>	3	1	12		1		17
<i>Coquillettidia richiardii</i>	14	3	320	54	23	113	527
<i>Culiseta annulata</i>	19	9	52	32	31	12	155
<i>Culiseta longiareolata</i>			7				7
<i>Culex modestus</i>	183	72					255
<i>Culex pipiens</i>	42274	43182	62942	41179	49628	33956	273161
Totale complessivo	47960	58923	78122	68756	104774	60253	418788

Tabella 3. Numero di esemplari per specie campionati nei 6 anni di osservazione (2014-2019) in Lombardia

Prov.	<i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes caspius</i>	<i>Aedes geniculatus</i>	<i>Aedes koreicus</i>	<i>Aedes rusticus</i>	<i>Aedes vexans</i>	<i>Anopheles maculipennis complex</i>	<i>Anopheles plumbeus</i>	<i>Coquillettidia richiardii</i>	<i>Culiseta annulata</i>	<i>Culiseta longiareolata</i>	<i>Culex modestus</i>	<i>Culex pipiens</i>	Totale
BG	221	36		1		105	127	3	4	8		5	10760 ^a	11270
BS	436	163				1466	62	1	360	58			50034 ^a	52689
CO	136	19		15		10	5		2	3			410	600
CR	889	249	6			881	19		2			4	31088 ^a	33138
LC	71	64		5		665	5		19	22			2887	3738
LO	317	5448				353	273					135	20939	27465
MI	360	13825		1	5	84	1331		1	5		3	22646	38261
MN	641	3984				1143	2314	6	20	31	5	39	76543 ^a	84727
PV	1303	83249	1		1	1440	17564	7	5	27	2	69	57380	161048
SO	12					35	4						133	184
VA	105	5029		19		9	24						201	5390

^a province in cui il numero di *Culex pipiens* supera il 90% del totale degli esemplari di culicidae campionati

L'osservazione del numero di *Cx. pipiens* campionato negli anni mostra un aumento per gli anni 2016 e 2018 (Figura 3).

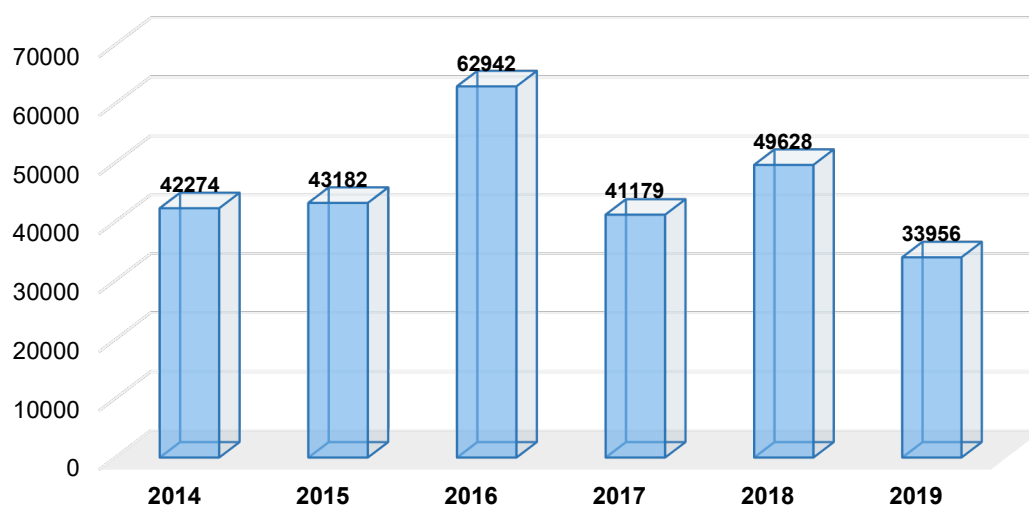


Figura 3. Numero di esemplari di *Culex pipiens* campionati nei 6 anni di osservazione

Al fine di una migliore valutazione del dato e per meglio valutare la diversità ecologica della popolazione di culicidae viene proposto l'andamento delle abbondanze relative (AR) nei 6 anni di campionamento (Figura 4); questo permette di osservare come il numero maggiore di *Cx. pipiens* rispetto alle altre specie è maggiore per gli anni 2014-2016.

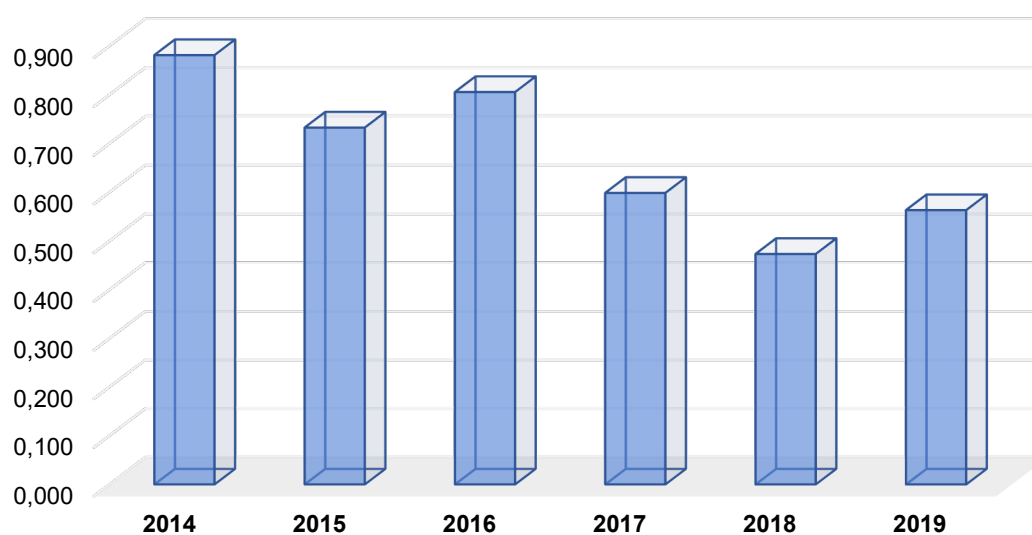


Figura 4. Abbondanza Relativa (AR) di *Culex pipiens* nei diversi anni di campionamento

Una maggiore completezza del dato relativo alla diversità ecologica della popolazione culicidica in Lombardia deve comunque fare riferimento a un contesto provinciale, prevedendo l'uso di specifici indici ecologici calcolati sul numero totale di esemplari campionati per ogni singola stagione osservata. Gli indici di diversità che maggiormente vengono utilizzati sono:

- *indice di dominanza di Simpson* ($\lambda = 1/\sum p_i^2$), dove $p_i = n_i/N$ [n_i =numero individui del taxon “i” e N =numero totale di individui] (8), che definisce il grado di dominanza (Dominanza = $1 - \text{Simpson index}$) e il suo valore può variare da 0 a 1 (0=tutti i taxa sono ugualmente presenti; 1= un taxon domina completamente la comunità);
- *indice di diversità di Shannon* ($H' = - [\sum (p_i \ln p_i)]$), comunemente usato per caratterizzare la diversità delle specie in una comunità, tenendo conto sia dell'abbondanza che dell'uniformità delle specie presenti (8,9). L'indice misura l'uniformità con cui gli individui sono suddivisi tra i taxa presenti.

Gli indici di diversità in media per le province variavano da 0,01 a 0,912 per l'indice di Simpson e da 0,044 a 0,368 per indice di Shannon. L'indice di Simpson per Bergamo, Brescia, Cremona e Mantova è il più alto, indicando una forte dominanza di *Cx. pipiens* sugli altri taxa campionati (Figura 5 e vedi Tabella 3). L'indice di Shannon è stato il più alto per le provincie di Como, Milano e Pavia, mentre il valore più basso si è registrato per Bergamo, Brescia, Cremona e Mantova (Figura 6).

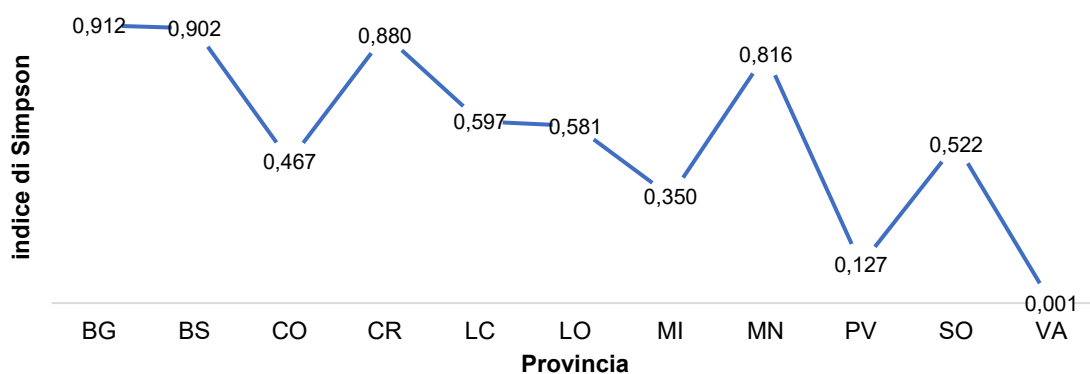


Figura 5. Andamento medio dell'indice di dominanza di Simpson nelle diverse province sottoposte a monitoraggio (2014-2019)

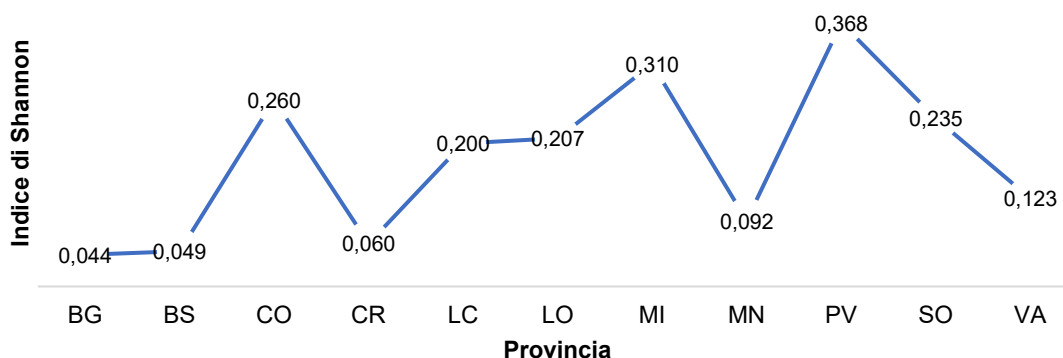


Figura 6. Andamento medio dell'indice di diversità di Shannon nelle diverse province sottoposte a monitoraggio (2014-2019)

Circolazione virale di West Nile e Usutu virus nelle zanzare

Dal 2014 al 2019 sono state testate 3805 *pool* di *Cx. pipiens*, con 128 *pool* positivi per WNV e 93 *pool* positivi per Usutu virus (Figura 7).

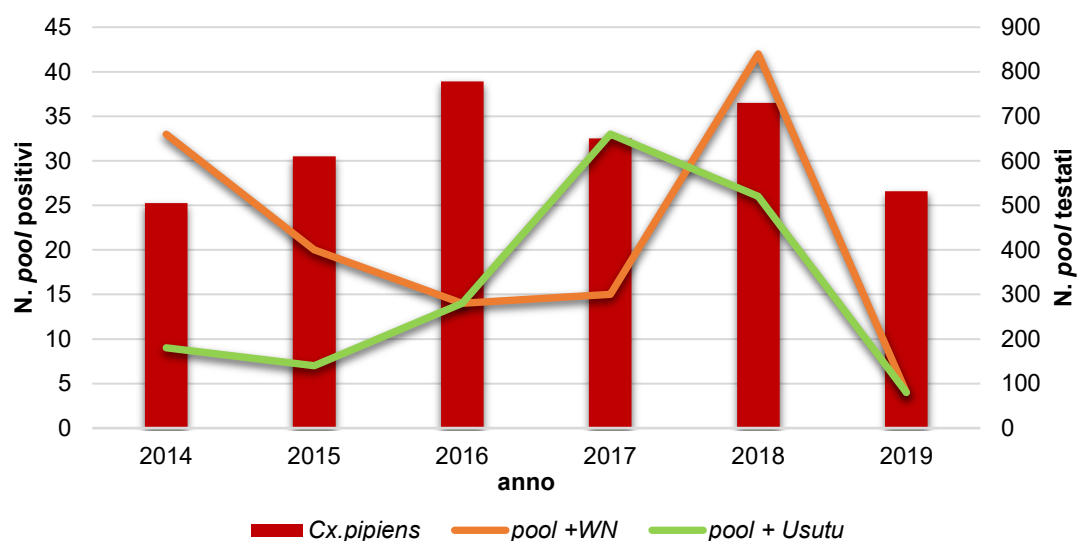


Figura 7. Numero di *pool* di *Culex pipiens* analizzati per anno di campionamento e numero di *pool* positivi per WNV e USUV in Lombardia

Il principio su cui si basa la sorveglianza finalizzata alla prevenzione dell'infezione mediante trasfusioni e trapianti, è che il virus compare molto prima nei volatili e nelle zanzare vettori rispetto ai casi clinici nel cavallo e nell'uomo. Gli anni 2014 e il 2018 sono stati gli anni in cui si è registrata una maggiore circolazione virale (Figure 7 e 8) sia in termini di numero di *pool* di zanzare positive che di presenza del virus negli uccelli.

I primi *pool* stagionali positivi per WNV sono stati campionati, per la maggior parte delle stagioni, nella prima quindicina di luglio (dal 2014 al 2019 rispettivamente: 16/7/2014, 7/7/2015, 5/7/2016, 12/7/2017, 3/7/2018, 30/7/2019). La rilevazione della circolazione di WNV nei *pool* di zanzare ha preceduto in tutte le stagioni la comparsa di casi umani, di fatto confermando la validità dei presupposti di partenza su cui si basa il piano (Tabella 4).

Tabella 4. Data di prima rilevazione della circolazione di WND nei diversi ospiti per ciascun anno di esecuzione del piano di sorveglianza in Lombardia

Data prima positività	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Zanzare	16-lug	07-lug	05-lug	12-lug	03-lug	30-lug
Uccelli	21-lug	20-mag	18-ago	05-ago	06-lug	2-ago
Equini	18-lug	06-ago	05-ago	05-ago	31-lug	12-sett
Donatori	12-nov	06-lug	09-ago	10-ago	09-ago	23-ott
1° caso umano	13-ago	28-lug	1° sett-ago	1° sett-ago	1° sett-ago	4° sett-sett

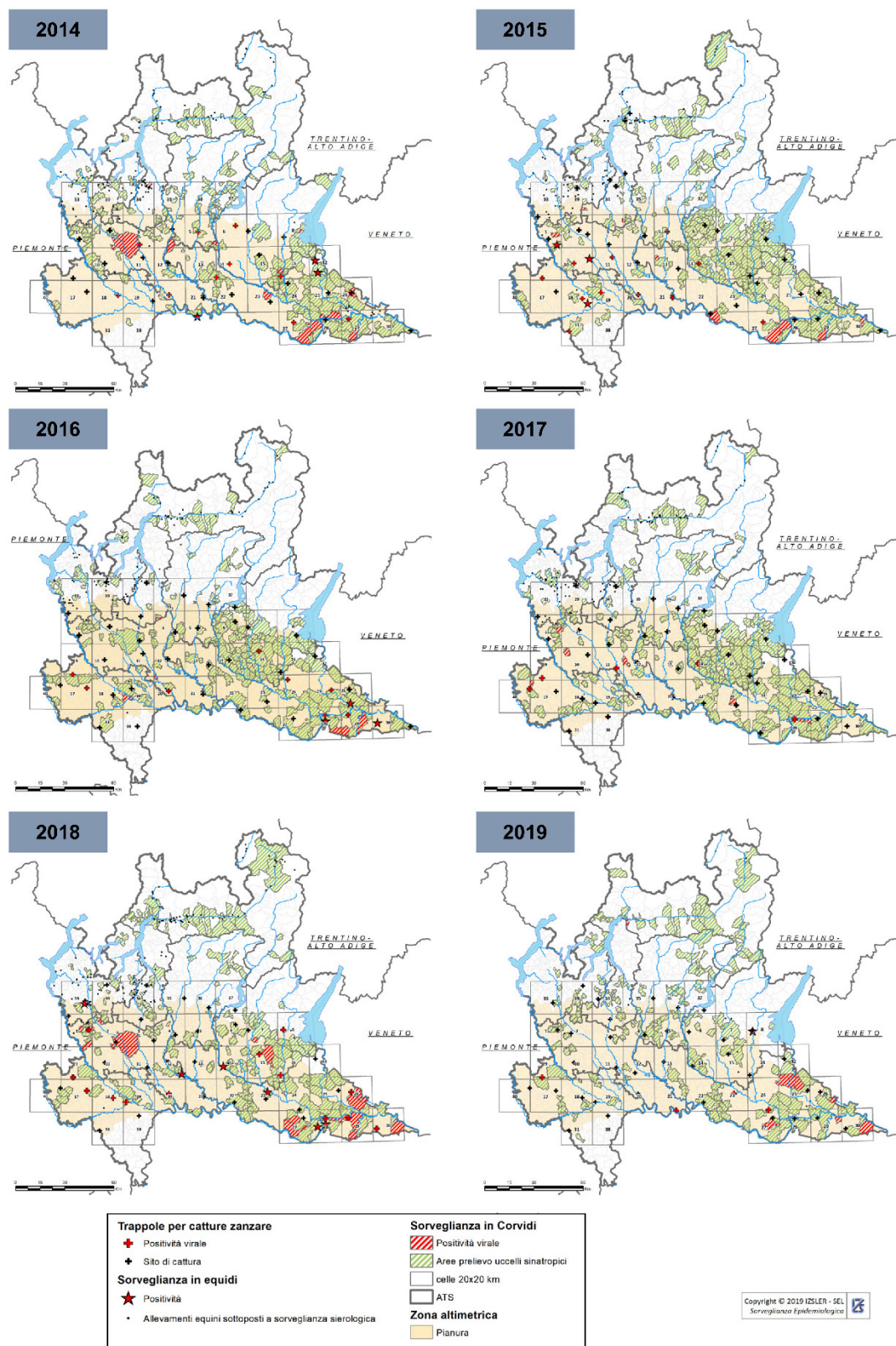


Figura 8. Mappa delle positività per il virus West Nile negli anni 2014-2019 in Lombardia

Come si può notare la sorveglianza entomologica ha sempre anticipato di almeno quasi un mese il primo caso umano e in donatore, tranne nel 2015, anno in cui comunque si è avuta la prima positività in una cornacchia il 20 maggio. La vicinanza temporale di positività nei campioni provenienti dalla sorveglianza entomologica, sorveglianza ornitologica e sorveglianza equini, negli anni 2014 e 2018, potrebbe essere dovuto ad una maggiore circolazione del virus in quegli anni che avrebbe dato luogo a maggior numero di casi umani.

Nel 2018 si è assistito a una anticipazione della circolazione con il primo *pool* positivo per WNV campionato il 03/07/2018. Questo anticipo è stato probabilmente associato ad una precoce comparsa e circolazione delle zanzare che ha coinciso a sua volta con aumentate densità di uccelli (e forse con la nascita delle nuove nidiate), entrambe favorite da una primavera caratterizzata da frequenti eventi piovosi e da temperature superiori alla media.

Discussione

Molti sono gli obiettivi che la sorveglianza entomologica persegue. Essi possono essere così riassunti:

- conoscenza delle specie di insetti vettori presenti nel territorio;
- densità assolute e relative;
- presenza di reali e potenziali vettori di agenti patogeni e tasso d'infezione;
- introduzione di specie nuove di vettori;
- diagnosi precoce di circolazione virale per virus noti (WNV e USUV), ma anche eventuale identificazione di patogeni di nuova introduzione

Pochi sono i dati presenti in letteratura sulla biodiversità nelle popolazioni di zanzare. Dalla nostra analisi, il valore massimo dell'indice di Shannon è pari a 0,368. Secondo uno studio in Brasile, l'indice massimo di Shannon è stato pari a 2,16 (10). In studi svolti in Iran, il valore massimo è stato di 1,7 (11). Normalmente, l'indice di Shannon varia tra 1,5 e 3,5. Un valore inferiore rende quindi difficile interpretare la diversità delle specie (12). Si ritiene che le differenze da noi riscontrate nella letteratura disponibile possano essere dovute alle differenze climatiche, alle dimensioni del campione (interruzione del campionamento a seguito di positività e numero di trappole attive per province) o al metodo di analisi dei dati. D'altro canto, è opportuno ricordare che gli indici di diversità possono differire negli anni e quindi dovrebbero essere confrontati per più stagioni di campionamento (10). In questo contesto, le nostre osservazioni possono rappresentare un valore aggiunto nella stima delle comunità di Culicidae nell'area di sorveglianza alla WND, dato che il confronto è stato eseguito su sei anni di monitoraggio.

Questi dati rafforzano la comprensione della diversità delle zanzare in Lombardia al di là dello studio delle specie di interesse epidemiologico, compresa la descrizione di specie invasive. La Lombardia è prima Regione italiana per popolazione residente e nel corso dei 6 anni di sorveglianza è stata soggetta a continui mutamenti paesaggistici che possono aver causato cambiamenti nella composizione delle comunità di zanzare; ecco quindi che un'analisi di questo tipo potrebbe contribuire all'elaborazione di piani di emergenza per malattie emergenti a seguito di alterazioni antropogeniche.

Studi futuri dovrebbero quindi affrontare la questione delle possibili relazioni tra ricchezza e diversità delle popolazioni di vettori di malattie e il rischio di infezione umana, poiché la maggior parte degli studi si sono finora concentrati sulla diversità degli ospiti vertebrati (sia reservoir che ospiti a fondo cieco).

A tal proposito, sarebbe necessario chiarire anche il ruolo svolto dalle differenze nella struttura delle comunità di zanzare nella determinazione del rischio di trasmissione di malattie infettive in

ecosistemi specifici (es. zone rurali, zone antropizzati, o zone a diverse altitudini). Similarmente bisognerebbe indagare il ruolo svolto dagli uccelli nel favorire o meno la circolazione virale in una determinata area, andando a individuare le specie più propensi all'infezione (capacità dell'ospite). Essa può dipendere sia dalla carica virale che questi riescono a maturare (trasmissione da uccello a zanzara) che dalle preferenze di puntura delle zanzare (trasmissione da zanzara a uccello) (13).

Un esempio in tal senso può essere rappresentato da *Aedes caspius* specie mammofila, che occasionalmente si ritrova ingorgata di sangue aviario. Questa specie non è considerata un vettore molto competente per WNV.

Balenghien *et al.* (14), al fine di identificare le specie di zanzare in grado di sostenere la trasmissione di WNV nel sud della Francia, ha valutato tra le altre specie la competenza vettoriale di *Ae. caspius*. Come è stato dimostrato, il suo ruolo nella trasmissione WNV può essere minore. Tuttavia, le densità di *Ae. caspius* possono raggiungere tassi elevati (vedi Tabella 3, province Milano e Pavia), che potrebbero compensare il basso livello di competenza per WNV della specie.

Una valutazione quindi accurata della comunità di zanzare, anche su piccola scala, potrebbe fornire dati preziosi da usare in caso di emergenza epidemica, nonché dare importanti informazioni sulle modalità di gestione e organizzazione dei piani di monitoraggio entomologico.

Se l'intensità del monitoraggio entomologico e la ricerca virale sono adeguati, si avrà la possibilità di intercettare specie di vettori e/o patogeni di nuova introduzione, così come dimostrato nel caso del ritrovamento di adulti di *Aedes koreicus* (vedi Tabella 3). Tra l'altro il pericolo di introduzione di nuovi vector-borne virus è da non sottovalutare in considerazione anche dei flussi migratori e turistici che potrebbero facilitare la introduzione di patogeni oggi endemici in altri parti del mondo, come gli agenti della dengue, della *Rift Valley Fever*, Zika ecc.

Il monitoraggio entomologico, associato a quello ornitologico, negli anni ha dimostrato, di essere in grado di rilevare in modo precoce la circolazione virale prima dell'insorgenza dei casi umani. Dal 2015 l'evidenza di circolazione di WNV in ambito entomologico e veterinario costituisce un importante strumento per definire l'inizio dello screening dei donatori di sangue e organi in una determinata provincia, onde evitare il rischio di trasmissione tramite trasfusioni e trapianti. Ma non solo, indicando per tempo la circolazione del WNV, può contribuire ad assumere misure nella popolazione umana finalizzate ad una maggior prevenzione, non solo in ottica di interventi di disinfestazione, ma anche come comportamenti individuali (uso di repellenti, copertura delle zone corporee più esposte, etc), utili a prevenire il possibile contatto. Questo soprattutto nell'ottica di proteggere gli individui più fragili, come gli anziani e gli immunodepressi in cui la malattia potrebbe acquisire un decorso grave (meningoencefalite), talora infausto.

Di conseguenza, il Piano Nazionale Integrato di sorveglianza per WNV, oggi incluso nel PNA 2020-2025 (7), rappresenta un traguardo importante per la salute pubblica, oltre che un esempio unico di approccio *One Health* applicato.

I dati riportati dimostrano quindi come l'implementazione della sorveglianza entomologica ha negli anni migliorato la raccolta di una serie di informazioni utili alla gestione dell'intero sistema di sorveglianza.

Bibliografia

1. Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E. West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2012;25(4):635– 48.
2. Calzolari M, Pautasso A, Montarsi F, Albieri A, Bellini R, Bonilauri P, Defilippo F, Lelli D, Moreno A, Chiari M, Tamba M, Zanoni M, Varisco G, Bertolini S, Modesto P, Radaelli MC, Iulini B, Prearo M, Ravagnan S, Cazzin S, Mulatti P, Monne I, Bonfanti L, Marangon S, Goffredo M, Savini G, Martini S, Mosca A, Farioli M, Gemma Brenzoni L, Palei M, Russo F, Natalini S, Angelini P, Casalone C,

- Dottori M, Capelli G. West Nile Virus surveillance in 2013 via mosquito screening in Northern Italy and the Influence of weather on virus circulation. *PLoS One* 2015;10(10):e0140915. Erratum in: *PLoS One* 2015;10(12):e0146436
3. Rizzo C, Napoli C, Venturi G, Pupella S, Lombardini L, Calistri P, Monaco F, Cagarelli R, Angelini P, Bellini R, Tamba M, Piatti A, Russo F, Palù G, Chiari M, Lavazza A, Bella A. West Nile virus transmission: results from the integrated surveillance system in Italy, 2008 to 2015. *EuroSurveillance* 2016;21(37)
 4. Thacker SB, Berkelman RL, Stroup DF. The Science of Public Health Surveillance. *Journal of Public Health Policy* 1989;10(2):187-203.
 5. Beaty BJ, Marquardt WC. *The biology of disease vectors*. University press of Colorado; 1996
 6. Lundstrom JO. Mosquito-borne viruses in Western Europe: a review. *Journal of Vector Ecology* 1999;24:1-39.
 7. Piano nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA) 2020-2025. A cura di Ministero della Salute - Direzione generale della Prevenzione sanitaria. 2019. https://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?id=2947
 8. Magurran AE. Why diversity? In: *Ecological diversity and its measurement*. 1 Ed., Dordrecht: Springer; 1988. p. 1–5.
 9. Taylor LR. A variety of diversities. In: Mound LA, Waloff N (Ed.). *Diversity of Insect Fauna. Symposia of the Royal Entomological Society of London*. 9, 1978. New York, 1978. p. 1-18.
 10. Ferreira-de-Freitas V, França RM, Bartholomay LC, Marcondes CB. Contribution to the biodiversity assessment of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Atlantic Forest in Santa Catarina, Brazil. *Journal of Medical Entomology* 2017;54:368-76. doi: 10.1093/jme/tjw196. PMID: 28011728.
 11. Keshavarzi D, Soltani Z, Ebrahimi M, Soltani A, Nutifafa GG, Soltani F, Faramarzi H, Amraee K, Hassanzadeh A. Monthly prevalence and diversity of mosquitoes (Diptera; Culicidae) in Fars Province, Southern Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2017;7:112-20.
 12. MacDonald G. *Biogeography: introduction to space, time and life*. 1 ed. New York: John Wiley and Sons; 2003.
 13. Takken W, Verhulst NO. Host preferences of blood-feeding mosquitoes. *Annual Review of Entomology* 2013;58:433-53.
 14. Balenghien T, Vazeille M, Grandadam M, Schaffner F, Zeller H, Reiter P, Sabatier P, Fouque F, Bicout DJ. Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2008;8(5):589-95. doi: 10.1089/vbz.2007.0266. PMID: 18447623.

SORVEGLIANZA DEI VETTORI DEI VIRUS WEST NILE E USUTU IN VENETO E FRIULI VENEZIA GIULIA

Michela Bertola, Fabrizio Montarsi

Laboratorio di Parassitologia, Micologia ed Entomologia Sanitaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

Il monitoraggio delle zanzare nel nord-est Italia è iniziato già negli anni novanta in seguito all'introduzione ed espansione della zanzara tigre (*Aedes albopictus*). Il personale dei Dipartimenti di Prevenzione e dei Servizi Veterinari delle Aziende Sanitarie Locali (ASL) hanno quindi maturato, da diversi anni, esperienza riguardo il monitoraggio delle zanzare avvalendosi fin da subito della consulenza di esperti entomologi. La sorveglianza per la *West Nile Disease* (WND) è iniziata nel 2002 secondo quanto indicato dal "Piano di Sorveglianza Nazionale per la *West Nile Disease*". In base al Piano venivano monitorate due aree a rischio introduzione del virus: la laguna di Venezia (VE) e la laguna di Grado-Marano (GO).

Nel 2008 è stata evidenziata la circolazione del virus in ampie aree della Pianura Padana (1); di conseguenza, il Piano Nazionale è stato sostituito da un piano di sorveglianza per la WND a livello regionale per la Regione Veneto. Il Piano di Sorveglianza Regionale è stato finanziato dalla Regione Veneto a partire dal 2009; parte del Piano prevedeva la sorveglianza entomologica del vettore della WND, con un progetto dal titolo "Progetto finalizzato al monitoraggio della presenza, identificazione di specie, densità e differenze ecologiche di Culicidi nelle aree del Veneto interessate dalla circolazione del virus West Nile nel 2008". Da allora, la sorveglianza entomologica finalizzata alla WND è sempre stata attiva fino ad oggi (2021).

In seguito alla circolazione virale in Friuli Venezia Giulia nel 2009 è stata avviata anche qui la sorveglianza entomologica per i vettori della WND a partire dal 2011 e tuttora in corso. Dal 2017, nei suddetti Piani Regionali viene fatto riferimento anche alla sorveglianza della circolazione di virus Usutu (*Usutu Virus*, USUV). Da notare, che il Veneto è l'unica Regione in cui è stata evidenziata la circolazione virale ininterrottamente dal 2008 ad oggi.

La sorveglianza entomologica prevista dai piani viene condotta da parte dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZS_{Ve}), competente per entrambe le Regioni. L'area sottoposta a sorveglianza entomologica è tutta l'area pianeggiante sotto i 300 m s.l.m. del Veneto e Friuli Venezia Giulia. Inizialmente la scelta dei siti da monitorare seguiva l'andamento epidemiologico del virus West Nile (*West Nile Virus*, WNV), perciò le trappole erano posizionate soprattutto nelle aree a maggiore la circolazione virale (2). Dal 2015 invece la disposizione delle trappole è stata pianificata suddividendo tutto il territorio in una griglia immaginaria con dimensione di 15 km di lato; all'interno di ciascun riquadro (possibilmente al centro) è stata posizionata una trappola del tipo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) *light trap*, con attrattivo a CO₂ alimentata a batteria. In Figura 1 è riportata, a titolo di esempio, la distribuzione delle trappole nel 2020. I siti dove collocare le trappole sono stati scelti per avere caratteristiche ambientali ed ecologiche idonee allo sviluppo della specie *Culex pipiens*, vettore di WNV (3).

Tutte le province del Veneto, ad esclusione di Belluno (territorio prevalentemente montuoso) e Friuli Venezia Giulia sono state monitorate. Tutti i siti sono stati codificati, descritti in base alle caratteristiche ambientali (uso del suolo secondo il Corine Land Cover, 2000) e geo-referenziati. Il numero di siti cambiava di anno in anno in base ad esigenze epidemiologiche e gestionali (Tabella 1).

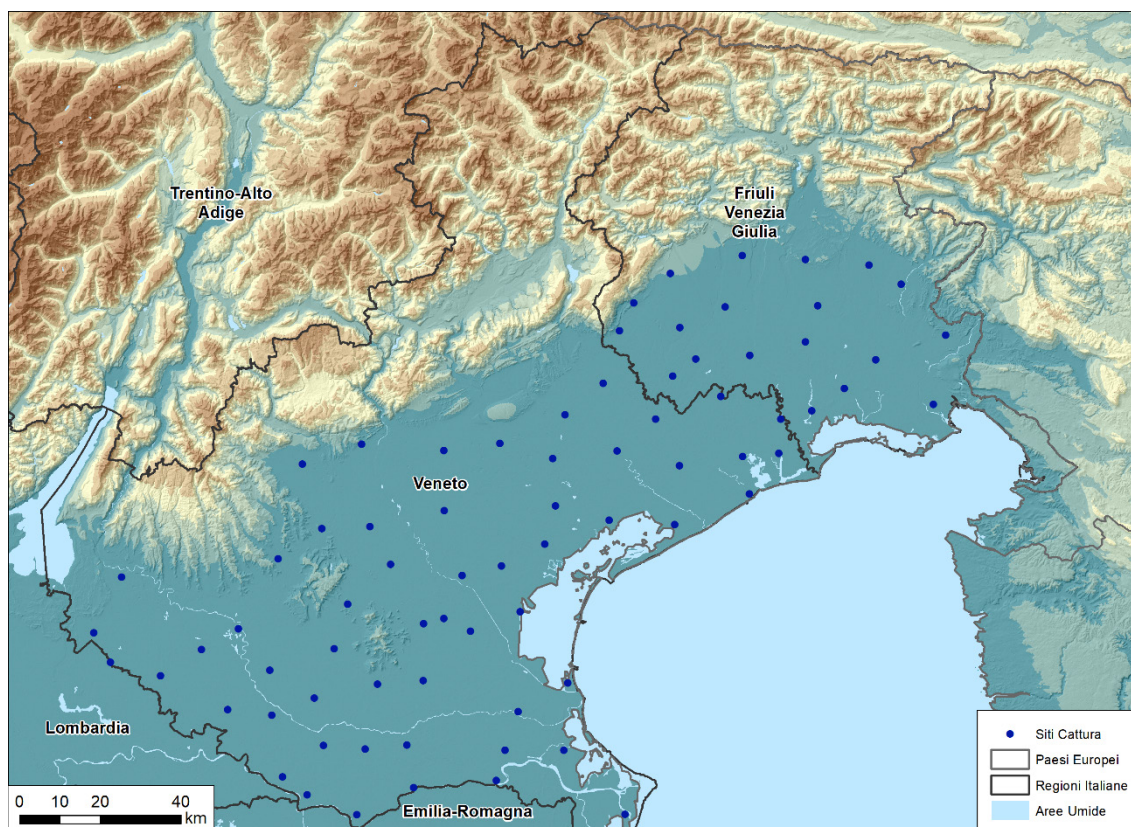


Figura 1. Distribuzione dei siti di posizionamento delle trappole in Veneto e Friuli Venezia Giulia nel 2020

Tabella 1. Periodo di monitoraggio dal 2009 al 2020, numero di siti e di catture in Veneto e Friuli Venezia Giulia

Anno	Inizio-fine monitoraggio	Veneto		Friuli Venezia Giulia	
		n. siti monitorati	n. catture	n. siti monitorati	n. catture
2009	27 maggio-12 novembre	26	237		
2010	3 maggio-27 ottobre	43	536		
2011	3 maggio-26 ottobre	48	615	13	107
2012	9 maggio-2 novembre	24	293	11	119
2013	6 maggio-30 ottobre	51	729	12	138
2014	5 maggio-5 novembre	29	353	10	122
2015	18 maggio-29 ottobre	49	561	17	186
2016	17 maggio-4 novembre	50	606	17	202
2017	22 maggio -31 ottobre	53	585	17	187
2018	21 maggio-5 ottobre	55	513	17	151
2019	6 maggio-10 ottobre	56	618	19	207
2020	18 maggio-15 ottobre	58	630	19	205

Dal 2017, in alcuni siti è stata aggiunta una *gravid trap* (es. 9 *gravid trap* nel 2020). Le trappole funzionano per una notte (attivate nel pomeriggio-sera e recuperate la mattina seguente) ogni due settimane. Il periodo di sorveglianza generalmente va da metà maggio fino a fine ottobre, a

prescindere dalla positività delle zanzare a Flavivirus, e comunque termina quando non vengono più catturate zanzare (vedi Tabella 1).

Il monitoraggio è organizzato in maniera tale che ciascuna provincia venga monitorata settimanalmente anche se i singoli siti vengono campionati ogni due settimane; questo è possibile perché la gestione delle trappole è affidata a diversi operatori che si alternano e operano in più zone nei diversi giorni della settimana. Tutte le attività, dal posizionamento delle trappole fino alla ricerca molecolare di Flavivirus nei *pool* di zanzare sono condotte da personale del Laboratorio di Parassitologia dell'IZSVe.

Le trappole sono situate prevalentemente in aree rurali o periurbane (allevamenti, aziende agricole, abitazioni private, parchi, ecc.). Le zanzare catturate vengono trasportate in laboratorio refrigerate (mantenute in contenitori con un residuo di ghiaccio secco) per evitare l'eventuale degradazione virale. Presso il laboratorio si effettua l'identificazione morfologica degli esemplari catturati; durante le fasi di riconoscimento e *pooling* i campioni vengono mantenuti refrigerati tenendo le catture su piastre eutetiche. Gli esemplari vengono suddivisi per data, sito di cattura e specie. Tutti i dati relativi alla cattura vengono riportati in un foglio di lavoro (codice sito, comune, settimana dell'anno, data posizionamento e ritiro trappola, numero, specie e sesso degli esemplari identificati) e riportati in uno specifico database sviluppato dal Laboratorio GIS dell'IZSVe. Il database, aggiornato in tempo reale, è consultabile online da tutti gli operatori sanitari del Veneto e Friuli Venezia Giulia.

Dal 2009 al 2013 gli esemplari femmina di tutte le specie venivano suddivisi in *pool* e analizzati per ricerca virale, mentre dal 2014 ad oggi (2020) vengono analizzate solo le femmine delle specie *Culex pipiens*, *Culex modestus*, *Aedes albopictus* e *Ochlerotatus caspius*. Fino al 2014 i *pool* di zanzare erano costituiti da massimo 50 esemplari della stessa specie, mentre dal 2015 in poi si è passati a massimo 100 esemplari.

La ricerca virale viene eseguita tramite test molecolari. Nello specifico viene utilizzata una *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) di screening per la ricerca di agenti virali appartenenti al genere Flavivirus. Ogni campione positivo per la presenza di Flavivirus viene poi sottoposto all'analisi di sequenza per determinare la presenza di WNV e USUV. Nei casi in cui la sensibilità della RT-PCR non risulti sufficiente per produrre ampliconi sequenziabili viene usata una semi-nested PCR per aumentarne la sensibilità. Anche i risultati della ricerca virale vengono inseriti nel database e resi disponibili per il Sistema Sanitario Regionale. Il risultato viene preventivamente comunicato ai Dipartimenti di Prevenzione Regionali. Le zanzare vengono identificate e i *pool* preparati il giorno stesso del recupero della cattura. Mediamente, dopo ulteriore 48 ore si ha l'esito della ricerca virale condotta in IZSVe; i campioni positivi per virus (omogenato del *pool* di insetti e relativo RNA virale) vengono poi inviati immediatamente al CESME.

A seguito dell'identificazione della circolazione virale (WNV e USUV) in un determinato sito di cattura vengono attivate tempestivamente le misure nei confronti delle donazioni di sangue ed emocomponenti, organi e tessuti nella relativa provincia. Per rendere più efficiente e sicuro il sistema di trigger si è deciso di adottare un sistema di trappole "sentinella" o "parlanti": in casi di positività virologica in trappole posizionate in prossimità dei confini provinciali e regionali (buffer di 5 km), le misure nei confronti delle donazioni vengono messe in atto anche nelle province confinanti, anche se di altre Regioni. Quindi, dopo 3-4 giorni dalla cattura il sistema sanitario è informato dell'eventuale circolazione virale (4).

Di seguito viene riportato il numero totale di zanzare (Tabella 2), le specie catturate (Tabella 3) e le positività a WNV e USUV (Tabella 4) nei diversi anni.

Da notare che nel corso degli anni è stata registrata la circolazione di diversi lineages di WNV: lin-1 dal 2009 al 2010, lin-1 e lin-2 dal 2011 al 2013 e lin-2 dal 2014 al 2020.

Tabella 2. Numero totale di zanzare catturate nei diversi anni (2009-2020) in Veneto e Friuli Venezia Giulia

Anno	Veneto	Friuli Venezia Giulia	Totale
2009	35409		35409
2010	137912		137912
2011	79410	6028	85438
2012	104731	13832	118563
2013	304359	12489	316848
2014	85813	12363	98176
2015	106177	9199	115376
2016	206862	10719	217581
2017	129545	12571	142116
2018	125557	10649	136206
2019	184257	13888	198145
2020	102435	11773	114208
Totale	1602467	113511	1715978

Tabella 3. Specie di zanzare catturate nei diversi anni (2009-2020) in Veneto e Friuli Venezia Giulia

Specie	20 09	20 10	20 11	20 12	20 13	20 14	20 15	20 16	20 17	20 18	20 19	20 20
<i>Aedes albopictus</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Aedes cinereus/geminus</i>	x	x	x		x			x	x			x
<i>Aedes koreicus</i>				x	x		x	x	x	x	x	x
<i>Aedes vexans</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Anopheles plumbeus</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Anopheles claviger/petragnani</i>			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Anopheles maculipennis s.l.</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Coquillettidia richiardii</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Culiseta annulata</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Culiseta longiareolata</i>		x		x		x	x	x	x	x		x
<i>Culex pipiens</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Culex hortensis</i>					x		x					x
<i>Culex modestus</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Culex territans</i>		x	x	x	x				x	x		
<i>Culex theileri</i> (?)	x											
<i>Ochlerotatus caspius</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Ochlerotatus annulipes</i>			x	x	x		x					
<i>Ochlerotatus berlandi</i>				x	x							
<i>Ochlerotatus cantans</i>		x			x	x	x		x	x	x	x
<i>Ochlerotatus cathaphylla</i>		x										
<i>Ochlerotatus detritus</i>	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Ochlerotatus echinus</i> (?)						x						
<i>Ochlerotatus geniculatus</i>		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Ochlerotatus rusticus</i> (?)	x											
<i>Ochlerotatus sticticus</i>				x	x	x			x	x	x	x
<i>Uranotaenia unguiculata</i>			x									
Totale specie	13	16	14	18	20	16	17	15	18	17	15	18

In grassetto specie analizzate per ricerca virale.

(?) identificazione dubbia.

Tabella 4. Specie, pool e positività a virus West Nile (WNV) e Usutu (USUV) nei diversi anni in Veneto e Friuli Venezia Giulia

Anno	Culex pipiens			Ochlerotatus caspius			Aedes albopictus			Culex modestus										
	Totale	Analizz.	Pool	totali WNV USUV pos. pos.	Totale	Analizz.	Pool	totali WNV USUV pos. pos.	Totale	Analizz.	Pool	totali WNV USUV pos. pos.								
2020	79310	76972	1385	21	33	21302	19851	606	0	0	3062	3049	494	0	0	5	5	4	0	0
2019	152933	125795	1811	18	30	26515	21145	607	0	1	2955	2939	480	0	1	236	236	27	0	0
2018	101285	97420	1425	163	96	13860	13550	471	11	0	2979	2972	450	1	2	40	40	10	0	0
2017	101658	92430	1449	22	40	18958	18837	580	0	0	3226	3220	461	0	0	127	127	15	0	0
2016	181480	145879	2050	30	64	12409	11744	491	0	0	2338	2297	363	0	0	20	17	9	0	0
2015	87806	87371	1609	3	49	9292	9245	478	0	2	2542	598	80	0	0	25	0	0	0	0
2014	77866	66007	1514	9	48	10285	7560	301	0	0	1340	0	0	0	0	7	7	4	0	0
2013	266837	248589	5577	57	122	14101	13561	651	0	0	1404	1381	319	0	0	101	80	26	0	0
2012	88645	87828	1961	13	34	15200	15152	460	0	0	1319	1315	216	0	0	123	123	37	0	0
2011	68531	68219	1751	6	24	6170	6159	332	0	0	1190	1187	251	0	0	189	188	30	0	0
2010	119423	119380	2631	10	22	5127	4994	201	0	1	248	14	1	0	0	503	471	19	0	0
2009	27770	14858	347	0	5	3487	2189	111	0	0	123	98	50	0	0	529	506	20	0	0

Nota 1: In *Culex pipiens*: 2 pool pos. sia a WNV che USUV (2020), 1 pool pos. sia a WNV che USUV (2019), 26 pool pos. sia a WNV che USUV (2018), 2 pool pos. sia a WNV che USUV (2017), 6 pool pos. sia a WNV che USUV (2016), 1 pool pos. sia a WNV che USUV (2010).

Nota 2: In *Culex pipiens*: 2 pool pos. WNV non confermati da Teramo (2018), 2 pool pos. WNV non confermati da Teramo (2014), 1 pool pos. WNV non confermati da Teramo (2011). In *Aedes albopictus* 1 pool pos. a USUV non confermato da Teramo (2018).

Bibliografia

1. Monaco F, Lelli R, Teodori L, Pinoni C, Di Gennaro A, Polci A, Calistri P, Savini G. Re-emergence of West Nile virus in Italy. *Zoonoses Public Health* 2010;57:476-86.
2. Mulatti P, Mazzucato M, Montarsi F, Ciocchetta S, Capelli G, Bonfanti L, Marangon S. Retrospective space-time analysis methods to support West Nile virus surveillance activities. *Epidemiol Infect* 2015;143:202-13.
3. Fornasiero D, Mazzucato M, Barbujani M, Montarsi F, Capelli G, Mulatti P. Inter-annual variability of the effects of intrinsic and extrinsic drivers affecting West Nile virus vector *Culex pipiens* population dynamics in northeastern Italy. *Parasit Vectors* 2020;13(1):271.
4. Riccardo F, Monaco F, Bella A, Savini G, Russo F, Cagarelli R, Dottori M, Rizzo C, Venturi G, Di Luca M, Pupella S, Lombardini L, Pezzotti P, Parodi P, Maraglino F, Costa AN, Liumbruno GM, Rezza G, the Working group. An early start of West Nile virus seasonal transmission: the added value of One Health surveillance in detecting early circulation and triggering timely response in Italy, June to July 2018. *Euro Surveill* 2018;23(32):1800427.

SORVEGLIANZA DEI VETTORI DEI VIRUS WEST NILE E USUTU IN EMILIA-ROMAGNA

Mattia Calzolari (a), Paolo Bonilauri (a), Annalisa Grisendi (a), Giorgio Galletti (b), Romeo Bellini (c), Michele Dottori (a), Paola Angelini (d), Marco Tamba (b)

(a) Sede Territoriale di Reggio Emilia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "B. Ubertini", Reggio Emilia

(b) Sorveglianza Epidemiologica Emilia-Romagna, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "B. Ubertini", Bologna

(c) Centro Agricoltura Ambiente "G. Nicoli", Settore Entomologia e Zoologia Sanitarie, Crevalcore

(d) Servizio Prevenzione collettiva e Sanità pubblica Regione Emilia-Romagna, Bologna

Virus West Nile, virus Usutu e loro sorveglianza entomologica

Il virus West Nile (*West Nile Virus*, WNV) è un virus a RNA del genere *Flavivirus*, che circola nell'ambiente tra uccelli e zanzare. WNV può infettare anche altri vertebrati come esseri umani ed equini, che sono considerati ospiti a fondo cieco, in quanto non presentano viremie in grado di infettare le zanzare. Nell'uomo l'infezione virale è generalmente asintomatica, ma circa il 20% dei soggetti infetti può manifestare uno stato febbrile simi-influenzale, a volte con la comparsa di rash cutaneo, che può evolvere in una malattia neuro-invasiva (*West Nile Neuro-invasive Disease*, WNND) in una minoranza di casi (meno dell'1% dei soggetti infetti). Oltre ai casi sintomatici, desta particolare preoccupazione la potenziale presenza di donatori di sangue e organi infetti, ma asintomatici (1).

Dopo la prima segnalazione del 1937 in Africa, dagli anni '90 del secolo scorso sono iniziati eventi epidemici a partire dalla Romania. In Italia, la prima segnalazione è del 1998 (2). A partire dal 2008, la circolazione del virus è stata registrata, con diverse intensità in Europa, ad ogni stagione, con una particolare recrudescenza nel 2018 (3).

Dal 2008 il virus è oggetto di una sorveglianza dedicata, iniziata in Emilia-Romagna (4). Negli anni successivi il sistema di sorveglianza integrato è stato progressivamente esteso fino a coprire l'intero bacino padano con metodiche e approcci simili fra di loro e con una collaborazione interregionale che coinvolge Piemonte, Lombardia, Veneto e Friuli Venezia Giulia (5-9).

La sorveglianza WNV ha permesso di osservare la circolazione di un altro flavivirus: il virus Usutu (*Usutu Virus*, USUV) (10). Questo virus, anch'esso di origine africana, è stato rilevato per la prima volta in Europa nel 2001 in Austria, dove ha provocato una massiccia moria di merli (11). Retrospectivamente il virus è stato individuato anche in campioni conservati di uccelli raccolti in Toscana nel 1996 (12). Seppure ritenuto meno patogeno per l'uomo del virus WNV, l'importanza sanitaria di USUV non è completamente nota. Esistono alcune segnalazioni, risalenti all'estate del 2009, di malattia neuroinvasiva correlata all'USUV, malattia riportata in pazienti immunocompromessi in Emilia-Romagna. Dopo queste prime segnalazioni, casi del genere sono stati segnalati anche nel resto d'Europa, anche in soggetti immunocompetenti, dimostrando che anche questo virus, dal ciclo simile anche se non completamente sovrapponibile al WNV, dovrebbe essere monitorato per le stesse ragioni del virus WNV. Del resto i due virus hanno molti punti in comune, sono flavivirus trasmessi dalle zanzare, entrambi appartengono al complesso antigenico della encefalite giapponese e sono anche strettamente correlati filogeneticamente, come dimostrano i dati biomolecolari (13). Il piano di sorveglianza della Regione Emilia-Romagna ha come obiettivo la rilevazione precoce, su base provinciale, di circolazione virale, con un approccio integrato che

coinvolge la ricerca dei virus negli esseri umani, nei cavalli, negli uccelli e nelle zanzare. Il sistema ha dimostrato nel tempo di essere in grado di rilevare la circolazione di WNV su scala provinciale (6) prima dell'insorgenza di casi umani di malattia e di essere economicamente sostenibile (14).

La sorveglianza entomologica, della quale ci occuperemo in questo articolo, è una parte fondamentale del piano, viene svolta mediante campionamenti regolari di zanzare presso stazioni fisse e georeferenziate. Ciò consente di avere una precisa caratterizzazione temporale e spaziale della circolazione del virus. La rilevazione di circolazione virale tramite sorveglianza entomologica in una determinata provincia è evento trigger per l'attivazione di misure di sanità pubblica, quali il test sistematico delle donazioni di sangue e di organi solidi.

Area di sorveglianza

L'area sottoposta a sorveglianza comprende la parte pianeggiante dell'Emilia-Romagna, una superficie di circa 10.000 km², pari al 22,4% della superficie totale della Pianura Padana. Quest'area è abitata da più di 3 milioni di persone, su di un totale di circa 4,5 milioni di residenti nella Regione. Inoltre sono presenti molte aree urbane, tra cui la città metropolitana di Bologna, oltre a diversi importanti distretti industriali. Questa zona ha un rilevante patrimonio zootecnico ed è parte di una delle aree agricole più produttive d'Italia.

Questo territorio è caratterizzato dall'ambiente rurale dell'agricoltura intensiva, con poche siepi, rari alberi sparsi, e una fitta rete di irrigazione, intercalato da frequenti insediamenti industriali e abitativi di dimensione variabile. Le aree naturali o rinaturalizzate sono poche e spesso relegate a zone marginali non sfruttabili dall'agricoltura (golene, cave dismesse), rappresentate principalmente da confini fluviali, caratterizzati da vegetazione ripariale. La rete Natura 2000 conta 159 siti per un totale di 300.568 ettari (<https://ambiente.regione.emilia-romagna.it/it/parchi-natura2000/rete-natura-2000/siti/rete-natura-2000-in-emilia-romagna>).

Sono presenti alcune importanti zone umide, come quella del delta del fiume Po, una delle zone umide più estese d'Europa. Pinete e macchia mediterranea sono diffuse sulla costa. L'area è caratterizzata da un clima sub-continentale, che diventa gradualmente sub-mediterraneo, spostandosi verso la costa, ad oriente.

Evoluzione della sorveglianza entomologica

La circolazione del WNV in Emilia-Romagna nel 2008 e di altri patogeni, causa di malattia nell'uomo trasmessi dalle zanzare (come il virus chikungunya nel 2007) ha suggerito la necessità di istituire un sistema di sorveglianza interdisciplinare che affiancasse alla sorveglianza sintomatica (sia veterinaria che umana), il monitoraggio della presenza di questi virus nell'ambiente, in particolare la rilevazione dei virus nei vettori invertebrati e nei serbatoi vertebrati. Questo sistema costituisce una importante integrazione al sistema pubblico di sorveglianza sanitaria, soprattutto per virus con cicli così complessi come WNV, permettendo di stimare l'intensità e la stagionalità della circolazione virale nell'ambiente. La sorveglianza integrata consente infatti un precoce allarme sanitario (15) e l'ottimizzazione dei costi connessi all'applicazione di misure di prevenzione connesse alla circolazione del virus, come l'analisi sulle donazioni di sangue.

Parte importante di questa sorveglianza è quella entomologica, partita fin da subito in Emilia-Romagna con la peculiarità di voler monitorare nel modo più omogeneo possibile l'area di pianura. Questa scelta è stata anche dettata dall'esperienza maturata nei primi anni di circolazione del WNV, che ha da subito dimostrato la sua imprevedibilità e la difficoltà di catturare zanzare positive in siti

in cui fossero stati rilevati casi nei cavalli o nelle persone. Per questo le trappole sono state posizionate seguendo una griglia regolare con celle di circa 120 km². Nell'ambito di ogni singola cella la scelta della stazione di cattura si è concentrata su ambienti particolarmente favorevoli alla presenza del vettore e dei serbatoi. Da subito la cadenza di campionamento è stata quindicinale a coprire il periodo stagionale favorevole all'attività del vettore (da inizio maggio a inizio ottobre). Negli anni l'area soggetta a sorveglianza è stata via via aumentata arrivando a coprire tutta la parte di pianura dell'Emilia-Romagna, con la distribuzione finale riportata nella Figura 1.

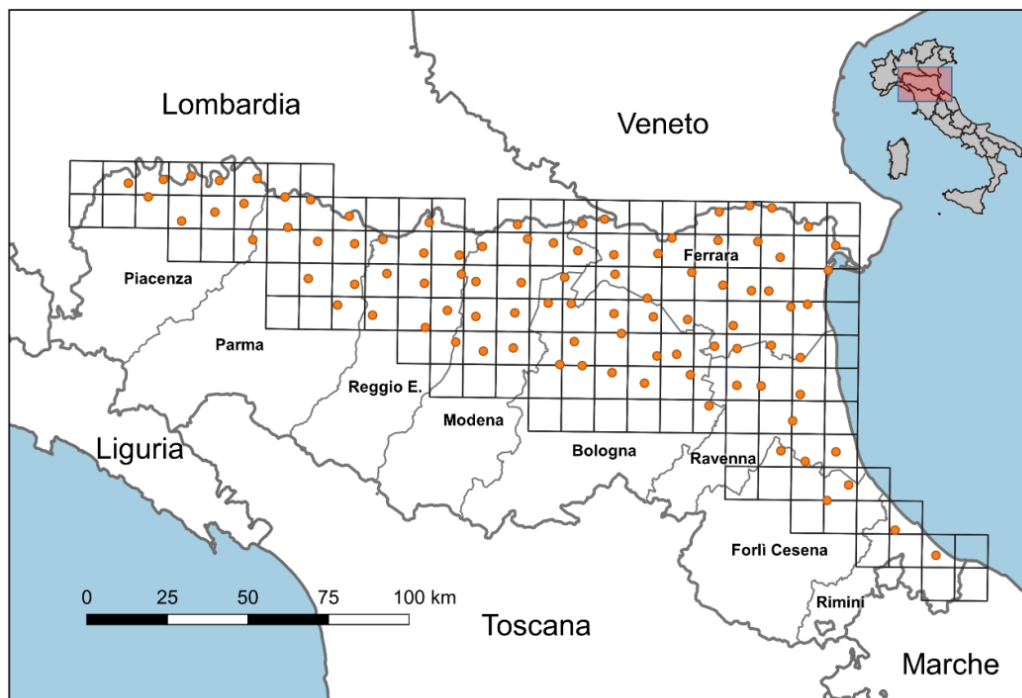


Figura 1. Griglia e siti di campionamento delle zanzare in Emilia-Romagna nel 2018

Nel momento in cui una trappola evidenzia circolazione virale, scattano in tutta la Provincia misure di contenimento del rischio di trasmissione, prevedendo sia interventi di disinfestazione sul territorio che controlli sulle donazioni di sangue, organi e tessuti.

Dal 2015 l'esperienza di sorveglianza è integrata in tutte le Regioni del bacino padano (Friuli Venezia Giulia, Veneto, Lombardia, Piemonte ed Emilia-Romagna), in particolare con l'utilizzo di positività nelle trappole vicine al confine regionale anche per la Regione confinante (trappole parlanti). Questa integrazione ha permesso di aumentare ulteriormente la sensibilità del sistema.

Metodi impiegati nella sorveglianza entomologica

La sorveglianza si basa sull'utilizzo di trappole attrattive innescate ad anidride carbonica (CO₂) senza fonte luminosa (16). Le trappole sono disposte su una griglia con maglie 11 x 11 km, che è aumentata di estensione nel tempo per arrivare ad un totale di 95 trappole nel 2018 (vedi Figura 1). All'interno di ogni quadrante è individuata una stazione di cattura fissa, privilegiando siti che possano dare abbondanti raccolte di zanzare e nello stesso tempo frequentati da avifauna. I campionamenti hanno cadenza quindicinale e coprono il periodo da maggio a ottobre. In Figura 2 è schematizzato il flusso delle analisi in laboratorio.

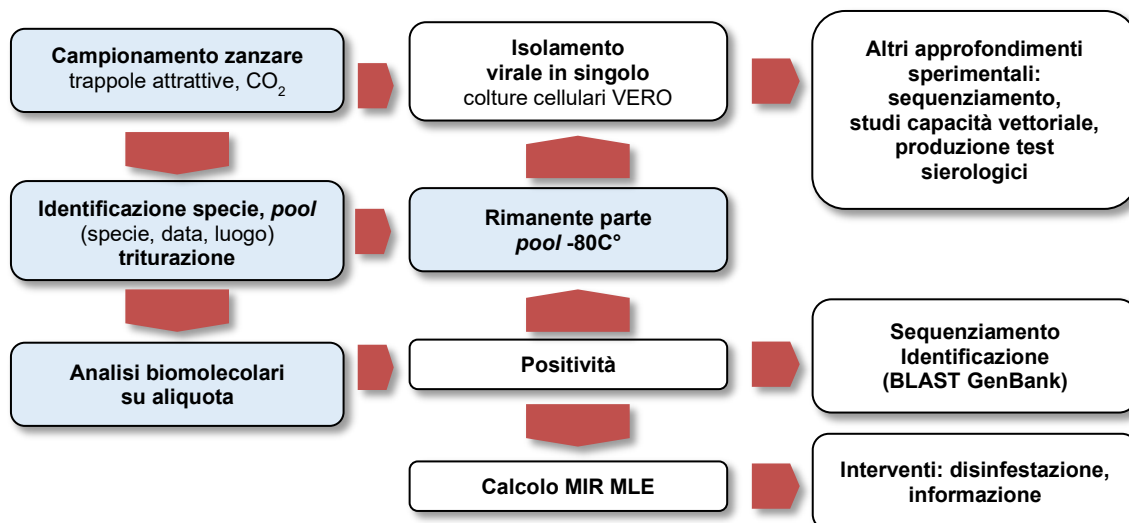


Figura 2. Diagramma di flusso delle analisi dei campioni entomologici nel piano di sorveglianza WNV e USUV in Emilia-Romagna dal 2013 al 2018

Le zanzare sono identificate a livello di specie utilizzando adeguate chiavi tassonomiche (17). La sorveglianza è volta alle specie del genere *Culex*, vettori principali dei due virus, in particolare a *Cx. pipiens* e *Cx. modestus*. Le catturate sono suddivise in *pool* con un massimo di 200 individui per specie-sito-data specifici. I *pool* così ottenuti sono triturati e testati mediante *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) per rilevare WNV (18, 19) e USUV RNA (20). I campioni risultati positivi sono ulteriormente testati con PCR tradizionali per ottenere ampliconi da sequenziare, e in particolare un protocollo Pan-flavivirus mirato al gene NS5 (21) e a due protocolli specifici diretti al gene E sia di WNV (22) che di USUV (23). Gli ampliconi sono sequenziati e le sequenze utilizzate per eseguire ricerche con BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) nel database GenBank per confermare la specificità delle reazioni ottenute. Tutta la parte laboratoristica (dalla identificazione ai risultati della PCR) è svolta garantendo brevi tempi di risposta (in media 3-4 giorni, con tempo massimo di una settimana) per segnalare al più presto eventuali positivi.

Il tasso di infezione nelle catture è stimato come tasso di infezione minimo (*Minimum Infection Rate*, MIR), considerando una sola zanzara positiva in ogni *pool* risultato positivo. Per le elaborazioni GIS è stato impiegato il software libero Qgis (<https://qgis.org/it/site/>).

Risultati entomologici dal 2013 al 2018

La sorveglianza in Emilia-Romagna ha rilevato fin dall'inizio della sua attivazione (2008) circolazione del virus WNV, e dal 2009 anche del virus USUV, con intensità variabili nelle diverse stagioni. Nel primo periodo (2008-2010) il WNV circolante apparteneva al lineaggio 1, mentre dal 2013 abbiamo assistito alla quasi esclusiva circolazione del lineaggio 2, che nel 2018 ha portato ad una recrudescenza di circolazione, con un picco di casi anche nell'uomo. Nel periodo 2013-2018, sono state campionate 1.658.459 zanzare (Tabella 1), appartenenti a 18 specie, la specie più campionata è stata *Cx. pipiens* (89%) seguita da *Aedes caspius* (8%), *Ae. vexans* (1,5%) e *Ae. albopictus* (1%), le altre specie sono state campionate con numeri minori. Complessivamente sono state analizzate per la ricerca di genoma virale 1.326.885 esemplari di zanzara suddivisi in 12.277 *pool*, il 98% delle quali appartenenti alla specie *Cx. pipiens* (1.288.350 esemplari).

Le stazioni di cattura attive per tutto il periodo sono state 71 (Figura 3), di queste 4 sono risultate positive al WNV in tutti gli anni e altre 8 per 5 stagioni su 6. Anche se si possono identificare aree nelle quali i virus indagati hanno circolato in tutte le stagioni, si sono osservate differenze di anno in anno relativamente all'intensità della circolazione e ai tempi di rilevazione della stessa.

Tabella 1. Zanzare campionate nell'ambito del piano di sorveglianza WNV e USUV in Emilia-Romagna nei diversi anni di sorveglianza, con riferimento alla specie di apparenza

Specie di zanzare	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Totale
<i>Aedes albopictus</i>	1384	1645	3904	2513	2510	4733	16689
<i>Aedes berlandi</i>			16	1		1	18
<i>Aedes caspius</i>	18720	7604	20605	16481	17563	51870	132843
<i>Aedes cinereus</i>	70		177	38		3	288
<i>Aedes detritus</i>			3	9			12
<i>Aedes flavescens</i>	1						1
<i>Aedes geniculatus</i>	88	5	12	25		15	145
<i>Aedes rusticus</i>		2					2
<i>Aedes vexans</i>	9931	1873	698	2485	1840	7639	24466
<i>Anopheles maculipennis s.l.</i>	511	507	699	401	443	753	3314
<i>Anopheles plumbeus</i>	7	16	21	9	1	10	64
<i>Coquillettidia richiardii</i>	63	40	97	34	71	658	963
<i>Culiseta annulata</i>	34	22	22	27	134	3	242
<i>Culiseta longiareolata</i>				1	9	1	11
<i>Culex mimeticus</i>				1			1
<i>Culex modestus</i>	1347	931	518	78	67	35	2976
<i>Culex pipiens</i>	384841	300599	210716	225034	134083	221150	1476423
<i>Uranotaenia unguiculata</i>			1				1
Totale	416997	313244	237489	247137	156721	286871	1658459

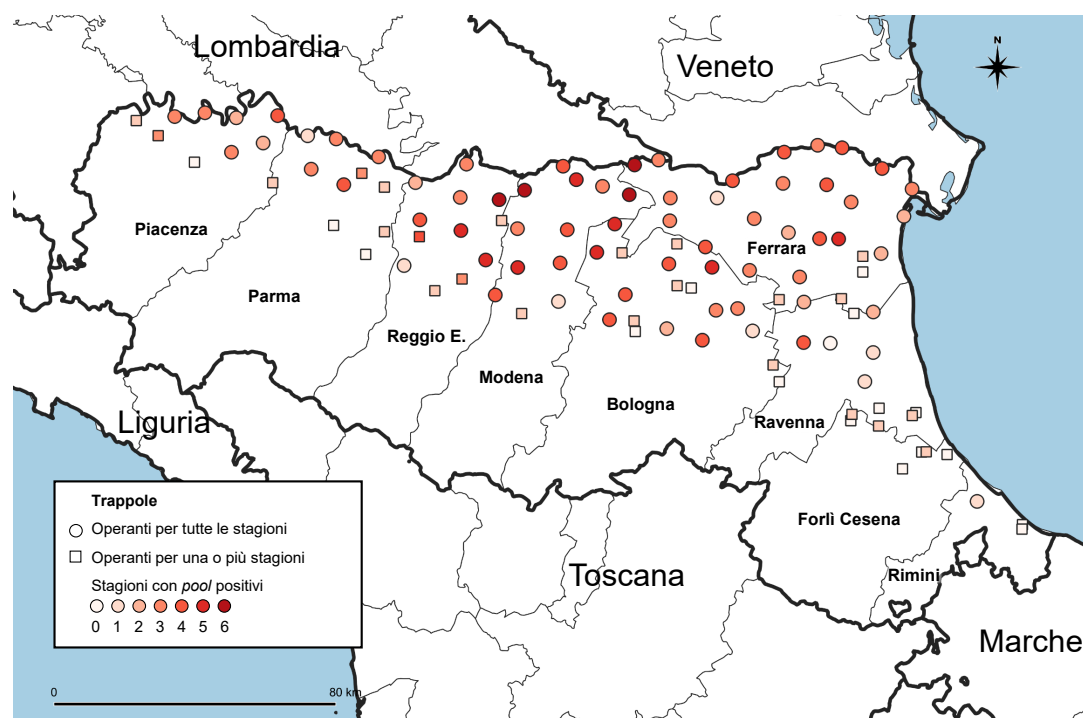


Figura 3. Trappole operanti in Emilia-Romagna (2013-2018), e numero di stagioni in cui è stato campionato almeno un *pool* positivo al WNV evidenziate con le diverse gradazioni dal bianco al rosso. Le trappole che hanno funzionato solo per parte di una stagione non sono riportate

La dinamica di popolazione della specie di maggiore interesse, *Cx. pipiens*, ha mostrato una grande variabilità sia spaziale che temporale nelle diverse stagioni di campionamento (Figura 4a).

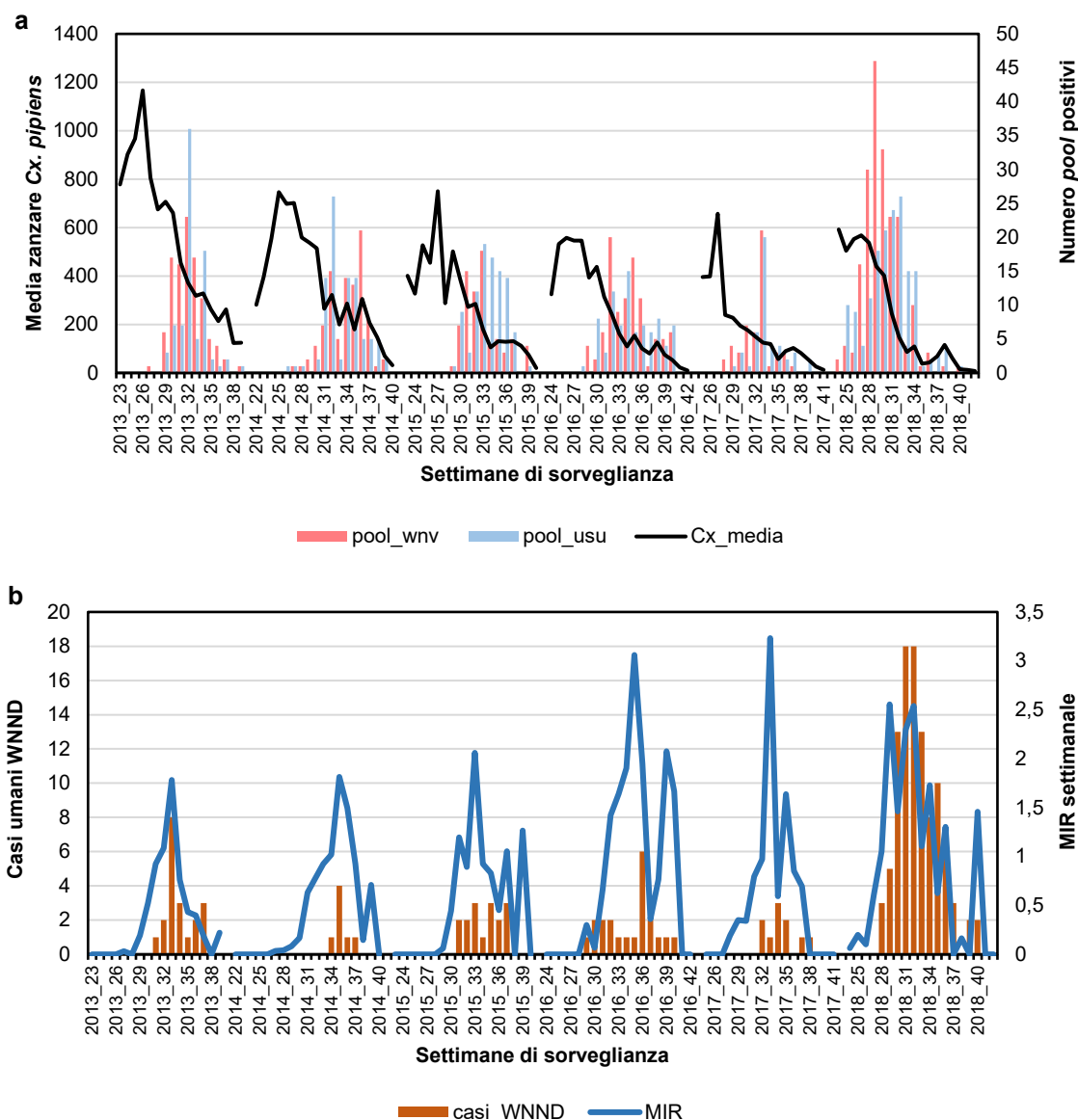


Figura 4. Dinamica di popolazione di *Culex pipiens*, numero pool positivi a WNV e a USUV dal 2013 al 2018 in Emilia-Romagna (a) e numero di casi umani di WNND per data di esordio sintomi e valore settimanale del minimum infection rate in Emilia-Romagna per lo stesso periodo (b)

Nonostante questo, c'è sempre stato un picco iniziale di densità (registrato solitamente a giugno), per poi assistere ad un calo verso l'autunno. Inoltre le zone con le più alte densità non sono state sempre le stesse (Figura 5), a conferma del fatto che l'abbondanza del vettore *Cx. pipiens* non è solo legata alle caratteristiche ecologiche, stabili nel breve periodo, ma anche ad altri fattori come all'andamento meteo-climatico.

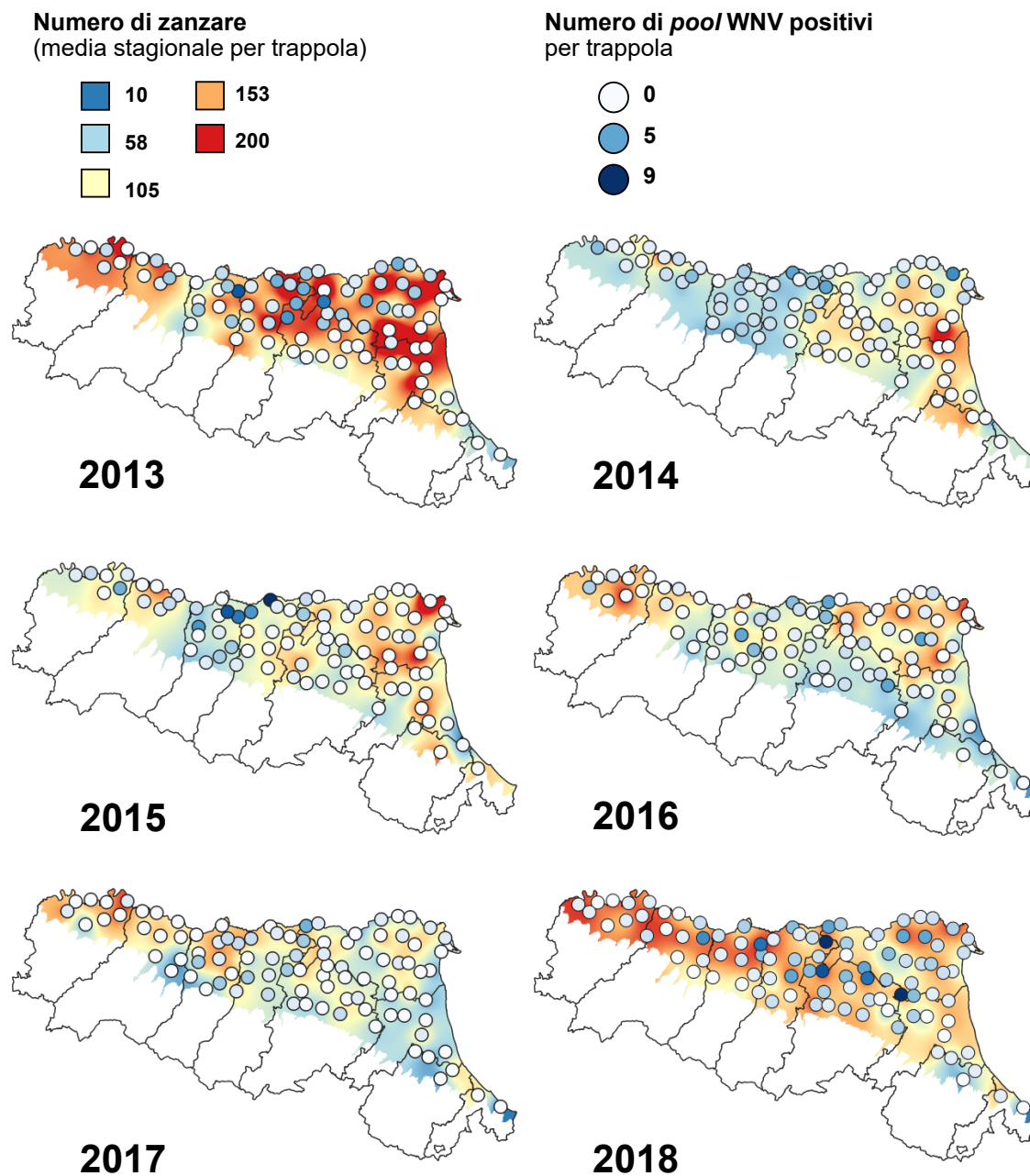


Figura 5. Rappresentazione delle densità stagionali di *Culex pipiens* (interpolazione della media di esemplari per trappola da giugno a settembre) e numero di *pool* positivi al virus West Nile raccolti dal 2013 al 2018 in Emilia Romagna

Tra le specie meno rappresentate, sono state registrate alcune positività per *Cx. modestus* (rispettivamente 3 e 2 *pool* per WNV e USUV, su 93 testati) (Tabella 2 e 3). Questo risultato conferma il ruolo come potenziale vettore di entrambi i virus di questa ultima specie, anche se con una rilevanza epidemiologica secondaria vista la sua bassa densità e la esclusiva presenza in

ambienti naturali o semi-naturali. Anche 2 *pool* di *Ae. caspius* sono risultati positivi, uno per WNV e uno per USUV, ma visto il rilevante numero di *pool* testati (411), questa specie non sembrerebbe avere un ruolo significativo nella epidemiologia dei virus (Tabella 2 e 3).

Tabella 2. Pool risultati positivi al virus West Nile e testati dal 2013 al 2018 on Emilia-Romagna per le diverse specie di zanzare

Specie di zanzare	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Totale
<i>Ae. albopictus</i>	0/78			0/2		0/10	0/90
<i>Ae. caspius</i>	1/246					0/165	1/411
<i>Ae. vexans</i>	0/115						0/115
<i>Cx. modestus</i>	1/35	1/32	0/16	0/3	0/1	0/6	2/93
<i>Cx. pipiens</i>	103/1875	94/3028	74/1843	97/2047	51/1200	200/1583	619/11558
Altre specie*	0/10						0/10

**Ae. geniculatus*, *An. maculipennis s.l.*, *Cq. richiardii*

Tabella 3. Pool risultati positivi al virus Usutu e testati dal 2013 al 2018 on Emilia-Romagna per le diverse specie di zanzare

Specie di zanzare	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Totale
<i>Ae. albopictus</i>	0/78			0/2		0/10	0/90
<i>Ae. caspius</i>	1/246					1/165	2/411
<i>Ae. vexans</i>	0/115						0/115
<i>Cx. modestus</i>	1/35	0/32	0/16	0/3	0/1	2/6	3/93
<i>Cx. pipiens</i>	91/1875	92/3028	99/1843	84/2047	46/1200	166/1583	578/11558
Altre specie*	0/10						0/10

**Ae. geniculatus*, *An. maculipennis s.l.*, *Cq. richiardii*

In totale, nel periodo considerato, a fronte di 11558 *pool* di *Cx. pipiens* esaminati, 619 sono risultati positivi al WNV, 578 a USUV e 142 sono risultati positivi ad entrambe le *real-time* RT-PCR (Tabella 2 e 3). Considerando i siti e le date di campionamento (4522 catture) i due virus sono stati rilevati contemporaneamente in 162 occasioni, e la presenza di uno dei due virus risulta associata alla presenza dell'altro, con una Odds ratio 6,89 (Intervallo di Confidenza-IC 95%: 5,50-8,63, $p < 0.001$). Questo risultato è probabilmente dovuto alla sovrapposizione ecologica dei cicli dei due virus che, anche se non identici, hanno diverse caratteristiche in comune, in particolare condividono come vettore principale *Cx. pipiens*.

In merito alla tempistica delle positività si rileva che abitualmente i primi *pool* stagionali positivi per WNV sono stati campionati nella prima quindicina di luglio (3/7/2013, 4/7/2014, 14/7/2015, 12/7/2016, 5/7/2017), così come quelli positivi per USUV (17/7/2013, 26/6/2014, 14/7/2015, 6/7/2016, 11/7/2017). Di particolare interesse è stato il 2018, quando abbiamo assistito ad una significativa anticipazione della circolazione con il primo positivo per USUV il 19/06/2018 e il primo *pool* positivo per WNV campionato il 15/06/2018, a cui ha corrisposto un'incidenza dei casi umani particolarmente elevata. Questa precoce circolazione virale è probabilmente associabile alla primavera di quell'anno caratterizzata da frequenti eventi piovosi e da temperature superiori alla media che potrebbero aver inciso sulla dinamica di popolazione delle zanzare e sostenuto un'anticipazione della nascita delle nuove nidiate degli uccelli, serbatoio del virus (24).

In tutte le stagioni la rilevazione della circolazione di WNV nei *pool* di zanzare ha preceduto la comparsa dei casi umani di almeno due settimane (vedi Figura 4b).

La densità del vettore *Cx. pipiens* non sembra giocare un ruolo preponderante nell'epidemiologia dei due virus, con anni che hanno visto un numero maggiore di zanzare senza una elevata circolazione virale (Figura 4a); questo probabilmente è legato al fatto che anche

l'abbondanza e l'immunità della popolazione di uccelli delle specie suscettibili al virus giocano un ruolo importante nell'epidemiologia di questi virus (24).

Utilità della sorveglianza e possibilità di miglioramento

La sorveglianza entomologica va sempre vista come parte integrante del piano di sorveglianza per flavivirus (WNV e USUV), insieme alla sorveglianza attiva e passiva sugli uccelli e sindromica su cavalli e persone. I dati ottenuti hanno evidenziato la presenza sul territorio dell'Emilia-Romagna, di entrambi i virus per tutto il periodo di sorveglianza di cui si riferisce. In particolare, la sorveglianza entomologica ha sempre mostrato sufficiente precocità nella rilevazione della circolazione virale, permettendo di attivare tempestivamente misure di sanità pubblica per la mitigazione del rischio correlato alla presenza di questi virus. La rete di trappole, uniformemente distribuita sul territorio regionale di pianura, è stata in grado di anno in anno di evidenziare le aree dove l'attività dei virus era più intensa e quindi il rischio di infezione maggiore.

Culex pipiens, la specie di zanzara più abbondante in Emilia-Romagna e con il maggior numero di *pool* positivi, si conferma come vettore principale per entrambi i virus. Le altre specie, anche se meno testate, sembrano avere un ruolo secondario dovuto alla loro scarsità (*Cx. modestus*), o marginalità epidemiologica (*Ae. caspius*). Il reale ruolo di queste specie dovrebbe essere oggetto di approfondimenti sperimentali, vista la scarsità di lavori presenti in questo ambito (25).

In conclusione, il sistema di sorveglianza entomologica implementato e mantenuto negli anni, ha permesso di valutare con maggiore efficacia rispetto alla sola sorveglianza sanitaria la diffusione geografica del virus e di identificare le aree a maggior rischio di trasmissione dei virus. Anno per anno i tassi di infezione nelle zanzare hanno fornito informazioni quantitative sulla intensità di trasmissione del WNV e di conseguenza delle indicazioni sul rischio di infezione per gli esseri umani e gli animali (15). Le informazioni raccolte, utilizzate per gestire la sorveglianza, ci potrebbero aiutare a comprendere meglio l'epidemiologia di entrambi i virus.

I dati ottenuti in questi anni infatti potrebbero essere impiegati in modelli previsionali che abbiano lo scopo di prevedere con maggiore anticipo la circolazione del virus, in particolare per WNV, anche se la complessità del ciclo epidemiologico rende questo compito arduo (26). Già ora questi dati hanno permesso di evidenziare alcune caratteristiche salienti della circolazione di WNV: è stato possibile associare la recrudescenza del virus nel 2018 ad una primavera particolarmente calda (24) ed è stata individuata una relazione diretta fra l'incremento di temperatura registrato nelle due settimane precedenti e il tasso di infezione delle zanzare (27). Inoltre, seppure la presenza del vettore zanzara è chiaramente necessaria per la trasmissione del virus, in buona parte del territorio sorvegliato la sua densità non sembra essere il fattore preponderante nel determinare la circolazione, vista l'assenza di una relazione diretta fra abbondanza locale di *Cx. pipiens* e intensità della circolazione di WNV (27). Nell'area di pianura dell'Emilia-Romagna il numero di zanzare presenti, sembra quindi sempre sufficiente a garantire la trasmissione del virus, con l'eccezione dell'area romagnola caratterizzata dalle minori abbondanze di *Cx. pipiens* e da scarsa incidenza del WNV. Ancora poco sappiamo della dinamica del virus negli uccelli selvatici (a partire dall'importanza relativa delle diverse specie come serbatoio del virus) che sembra essere un fattore fondamentale nel determinare l'intensità della circolazione del virus.

I dati ottenuti confermano che, con una rete di trappole efficaci e disposte su griglia a maglie sufficientemente strette, la rilevazione di WNV nel vettore precede la rilevazione negli altri target di sorveglianza, e può quindi servire come strumento di allarme precoce (15). Alla luce di queste evidenze i dati prodotti dal sistema di sorveglianza sono utilizzati come un indicatore affidabile

per dare inizio allo screening sulle donazioni di sangue, per informare la popolazione circa il rischio di infezione e per adottare misure mirate di lotta al vettore in occasione di eventi notturni all'aperto. L'analisi costi-benefici condotta sul periodo 2009-2015 in Emilia-Romagna ha permesso di valutare la convenienza anche economica derivante dall'adozione della sorveglianza integrata rispetto alla gestione del rischio WNV senza sorveglianza (14). Ciò non significa che l'esito di questo bilancio costo-benefici possa essere applicato tal quale a Regioni diverse essendo largamente determinato dal livello di rischio medio specifico di ogni territorio.

Bibliografia

1. Sambri V, Capobianchi M, Charrel R, Fyodorova M, Gaibani P, Gould E, *et al.* West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:699-704.
2. Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, *et al.* West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1372-8. doi: 10.3201/eid0812.020234
3. ECDC. *Epidemiological update: West Nile virus transmission season in Europe, 2018*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2018.
4. Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Caimi M, *et al.* Arboviral survey of mosquitoes in two northern Italian regions in 2007 and 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010 Nov;10(9):875-84.
5. Angelini P, Tamba M, Finarelli AC, Bellini R, Albieri A, Bonilauri P, *et al.* West Nile virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: the integrated surveillance system 2009. *Euro Surveill* 2010;15:19547.
6. Bellini R, Calzolari M, Mattivi A, Tamba M, Angelini P, Bonilauri P, *et al.* The experience of West Nile virus integrated surveillance system in the Emilia-Romagna region: five years of implementation, Italy, 2009 to 2013. *Euro Surveill* 2014;19:20953. doi: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.44.20953
7. Calzolari M, Pautasso A, Montarsi F, Albieri A, Bellini R, Bonilauri P, *et al.* West Nile virus surveillance in 2013 via mosquito screening in Northern Italy and the influence of weather on virus circulation. *PLoS One* 2015;10:e0140915.
8. Chiari M, Prosperi A, Faccin F, Avisani D, Cerioli M, Zanoni M, *et al.* West Nile virus surveillance in the Lombardy Region, Northern Italy. *Transbound Emerg Dis*;2015;62:343-349
9. Rovida F, Sarasini A, Campanini G, Percivalle E, Gorini G, Mariani B, *et al.* West Nile virus outbreak in the Lombardy region, northern Italy, summer 2013. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2015;15:278-283.
10. Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Albieri A, *et al.* Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. *PLoS One* 2010;5(12):e14324.
11. Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, *et al.* Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis* 2002;8: 652-6.
12. Weissenböck H, Bakonyi T, Rossi G, Mani P, Nowotny N. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg Infect Dis* 2013;19(2):274-7.
13. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus Flavivirus. *J Virol* 1998;72(1):73-83.
14. Paternoster G, Babo Martins S, Mattivi A, Cagarelli R, Angelini P, Bellini R, *et al.* Economics of one health: costs and benefits of integrated West Nile virus surveillance in Emilia-Romagna. *PLoS One* 2017;12:e0188156. doi: 10.1371/journal.pone.0188156
15. Centers for Disease Control and Prevention. *West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control*. 4th revision. Fort Collins, Colorado: CDC; 2013. Disponibile

all'indirizzo: <https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/wnvguidelines.pdf>; ultima consultazione agosto 2011.

16. Bellini R, Veronesi R, Gentile G, Pandolfi N. Optimization of carbon dioxide traps for mosquito monitoring in Italy. In: *Proceedings of the 68th Ann Meet Am Mosq Control Assoc 2002*; Denver, Colorado, February 16-21, 2002.
17. Severini F, Toma L, Di Luca M, Romi R. Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti (Diptera, Culicidae). *Fragmenta Entomologica* 2009;41:213-372.
18. Tang Y, Anne Hapip C, Liu B, Fang CT. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *J Clin Virol* 2006;36:177-82.
19. Del Amo J, Sotelo E, Fernández-Pinero J, Gallardo C, Llorente F, Agüero M, *et al.* A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. *J Virol Methods* 2013;189:321-7.
20. Cavrini F, Della Pepa ME, Gaibani P, Pierro AM, Rossini G, Landini MP, Sambri V. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J Clin Virol* 2011;50(3):221-3.
21. Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel D A, Stoll F, *et al.* Comparison of Flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol* 2001;39:1922-7.
22. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, Komar N, Panella NA, Allen BC, Volpe KE, Davis BS, Roehrig JT. Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38(11):4066-71.
23. Manarolla G, Bakonyi T, Gallazzi D, Crosta L, Weissenböck H, Dorrestein GM, Nowotny N. Usutu virus in wild birds in northern Italy. *Vet Microbiol* 2010;141(1-2):159-63.
24. Marini G, Calzolari M, Angelini P, Bellini R, Bellini S, Bolzoni L, Torri D, Defilippo F, Dorigatti I, Nikolay B, Pugliese A, Rosà R, Tamba M. A quantitative comparison of West Nile virus incidence from 2013 to 2018 in Emilia-Romagna, Italy. *PLoS Negl Trop Dis* 2020;14(1):e0007953.
25. Balenghien T, Vazeille M, Grandadam M, Schaffner F, Zeller H, Reiter P, *et al.* Vector competence of some French Culex and Aedes mosquitoes for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008;8:589-95. doi: 10.1089/vbz.2007.0266
26. Kramer LD. Complexity of virus-vector interactions. *Curr Opin Virol* 2016;21:81-6.
27. Calzolari M, Angelini P, Bolzoni L, Bonilauri P, Cagarelli R, Canziani S, Cereda D, Cerioli MP, Chiari M, Galletti G, Moirano G, Tamba M, Torri D, Trogu T, Albieri A, Bellini R, Lelli D. Enhanced West Nile Virus circulation in the Emilia-Romagna and Lombardy regions (Northern Italy) in 2018 detected by entomological surveillance. *Front Vet Sci* 2020;7:243.

SORVEGLIANZA DEI VETTORI DEI VIRUS WEST NILE E USUTU NEL LAZIO E TOSCANA

Adele Magliano, Arianna Ermenegildi, Irene Del Lesto, Federico Romiti, Claudio De Liberato
 Direzione Operativa Diagnostica Generale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri, Roma

Il virus della West Nile (*West Nile Virus*, WNV) è stato segnalato per la prima volta in Italia nel 1998 in Toscana (1). Da allora, Lazio e Toscana sono state interessate da sporadici episodi di circolazione virale, che hanno coinvolto diverse province, intervallati da anni in cui non vi è stata evidenza di circolazione. Solo nel periodo 2016-2018 il virus ha circolato con una certa continuità nelle province di Livorno, Grosseto, Viterbo e Latina. Nel 2017 in provincia di Livorno sono stati segnalati i primi 2 casi umani per il centro Italia. Nel biennio 2019-2020 non è stata segnalata circolazione virale nelle due Regioni.

Il Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA 2020-2025), così come i piani annualmente emanati dal Ministero della Salute negli anni precedenti, prevede la sorveglianza entomologica come sistema di *early detection* di circolazione virale. L'esperienza del nord Italia ha infatti dimostrato che i *pool* di zanzare sono spesso il primo substrato in cui il WNV viene riscontrato in ogni stagione, prima che si verifichino casi clinici negli equini e/o nell'uomo. Per tale motivo, il monitoraggio entomologico è considerato una componente fondamentale del complesso sistema di sorveglianza previsto dal piano.

Area di sorveglianza

Lazio e Toscana hanno superfici rispettivamente di 17.232 e 22.985 km², una popolazione di 5.800.000 e 3.730.000 abitanti e densità abitative pari a 339 (Lazio) e 161 (Toscana) abitanti/km². Complessivamente il territorio di competenza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana (IZSLT) copre un'area di 40.2017 km², con una popolazione di circa 9.530.000 abitanti. Più del 50% del territorio delle due Regioni è collinare, con la restante parte suddivisa tra aree montane e pianure costiere. Il clima delle due Regioni è molto variabile; in media andando dalla costa verso l'interno, e quindi da aree più pianeggianti a colline e poi montagne, si assiste ad un aumento delle precipitazioni e ad una diminuzione delle temperature medie, minime e massime. Si passa da medie delle massime che in estate superano i 30°C nelle zone più calde, a medie delle minime invernali intorno al grado centigrado nelle zone più fredde. Il 10% del territorio toscano e il 13,5% di quello laziale ricadono all'interno di aree naturali protette. Nel Lazio sono presenti 6 zone umide di rilevanza internazionale secondo la convenzione di Ramsar, concentrate per lo più nella parte centro-meridionale costiera della Regione, tra le province di Latina e Roma, residui della grande palude Pontina bonificata tra gli anni '20 e '30 del secolo scorso. In Toscana le aree umide di rilevanza internazionale sono 12, tra le quali ricordiamo il Padule di Fucecchio e il Padule Diaccia Botrona, per il loro interesse naturalistico.

Dal punto di vista economico, entrambe le Regioni sono caratterizzate da una prevalenza dei settori dei servizi e del commercio e da un settore agricolo che contribuisce per meno del 2% al PIL regionale. In Toscana la produzione industriale ha un maggior rilievo rispetto a quanto registrato per il Lazio, dove il settore dei servizi è ancora più rilevante.

Evoluzione del sistema di sorveglianza

La sorveglianza entomologica in Lazio e in Toscana è stata generalmente condotta secondo quanto previsto dalle diverse edizioni del Piano di Sorveglianza Nazionale, che il Ministero della Salute ha annualmente emanato a partire dal 2001:

- 2001-2008: attività di sorveglianza entomologica in prossimità di aree umide con abbondante avifauna locale e migratoria. La scelta è ricaduta su aree posizionate all'interno o nelle immediate vicinanze del Parco Nazionale del Circeo (Lazio, provincia di Latina), dove venivano effettuati periodici campionamenti di larve e catture di adulti.
- 2009: a seguito di un focolaio di circolazione virale in provincia di Arezzo, alla sopraccitata attività si è aggiunta una sorveglianza specifica per questo territorio, con prelievi di larve e catture di adulti in 2 siti in provincia di Arezzo e un sito nel Padule di Fucecchio.
- 2010-2013: le attività di sorveglianza entomologica previste dal piano sono state rimodulate, dando priorità alle catture di zanzare adulte. Trappole del tipo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) *light trap* sono state posizionate nei seguenti siti: Padule del Fucecchio (1), provincia di Arezzo (2) e provincia di Latina (2). Nel 2012, a seguito del riscontro di circolazione virale in tre aziende in provincia di Latina, non tra quelle già sede di sorveglianza, è stata avviata un'attività di sorveglianza entomologica anche in questi nuovi siti.
- 2014-2015: il Piano Nazionale non prevedeva sorveglianza entomologica per le Regioni Lazio e Toscana.
- 2016: a seguito di positività tra gli equini, attività di sorveglianza entomologica sono state attivate in un focolaio ad Artena (RM), 16 siti in provincia di Grosseto e un sito a Montalto di Castro (VT).
- 2017: considerato quanto successo nel 2016, catture di zanzare adulte sono state effettuate per tutta la stagione in un sito nelle province di Siena, Viterbo e Livorno e in 13 siti in provincia di Grosseto. A partire dalla tarda estate, l'attività si è estesa a nuove aziende sede di circolazione virale in provincia di Viterbo e Grosseto.
- 2018: la sorveglianza entomologica ha riguardato diverse province delle due Regioni, con un numero di siti di campionamento così distribuito: Grosseto 15, Viterbo 10, Pisa 4, Livorno 4, Siena 1. Nello stesso anno, a seguito della circolazione virale verificatasi al confine tra le province di Roma e Latina, un'intensa attività di sorveglianza entomologica è stata effettuata nei mesi di settembre e ottobre nei comuni di Cisterna di Latina, Velletri e Aprilia.
- 2019-2020: il Piano Nazionale ha inserito tra le aree ad alto rischio, da sottoporre a sorveglianza entomologica secondo criterio geografico, gran parte del territorio delle Regioni Lazio e Toscana. Nel biennio 2019-2020 le trappole posizionate nelle diverse province del nostro territorio erano così distribuite: Grosseto 14, Roma 11, Viterbo 7, Pisa 5, Livorno 4, Latina 4, Lucca 2, Firenze 1, Massa 1 e Frosinone 1.

Metodologia e strumenti impiegati nel monitoraggio

A partire dal 2001, protocolli e metodologie di campionamento hanno subito progressive modifiche:

- 2001-2009: la sorveglianza è stata effettuata in aree umide caratterizzate da presenza di avifauna selvatica, con particolare riferimento a specie migratrici di provenienza sub-sahariana. In queste aree si procedeva alla raccolta di larve in focolai naturali e artificiali, e alla cattura di

zanzare adulte mediante trappole luminose di tipo CDC. Le sessioni di campionamento avevano cadenza quindicinale, nel periodo marzo-novembre. Le trappole per zanzare adulte venivano posizionate in allevamenti con equini e/o pollai. I focolai larvali, individuati in sopralluoghi preliminari, venivano visitati durante ogni sessione di campionamento.

- 2010-2020: la sorveglianza entomologica prevedeva la sola cattura di zanzare adulte, con l'impiego di trappole CDC, dapprima col solo attrattivo luminoso e poi con l'aggiunta di CO₂. Per il posizionamento delle trappole è stato adottato un criterio geografico. Dapprima la sorveglianza è stata intensificata nelle province in cui l'anno precedente si era registrata circolazione virale, privilegiando i siti sede di circolazione o aree umide nelle immediate vicinanze. Successivamente, le province identificate dal Piano Nazionale come a rischio di circolazione virale, in base ai dati degli anni precedenti, sono state divise in un reticolo di 20 km di lato e in ciascuna cella doveva essere attivo almeno un sito di sorveglianza entomologica, sito scelto di solito in aziende con equini, pollame o suini.

Nei primi anni la sorveglianza entomologica è stata svolta interamente dal personale dell'IZSLT. A partire dal 2010 il lavoro (sopralluoghi preliminari per la scelta dei siti, posizionamento trappole ed effettuazione catture) è stato svolto in collaborazione con le Aziende Sanitarie Locali (ASL) competenti per territorio. Le zanzare catturate venivano inviate dalla ASL all'IZSLT per lo smistamento, l'identificazione di specie e la divisione in *pool* da sottoporre a indagini virologiche per testare la presenza dei virus WNV e Usutu (USUV). L'IZSLT ha sempre fornito alle ASL trappole e materiale di consumo (batterie, ghiaccio secco, provette, ecc.) per l'effettuazione delle catture.

Il numero di ASL coinvolto nel piano, e conseguentemente il numero di persone impegnate nella sorveglianza entomologica, sia sul campo che in laboratorio, sono variati nel tempo. Prendendo come riferimento l'ultima versione del Piano West Nile, emanata nel 2019, si può riassumere quanto segue:

1. IZSLT –Sopralluoghi per scelta siti di campionamento, formazione personale ASL, smistamento catture, identificazione zanzare, preparazione *pool*: 5 entomologi (un dirigente, due tecnici, due borsisti);
2. IZSLT – Ricerca virus in *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) su *pool* di zanzare: un dirigente veterinario, un dirigente biologo, personale tecnico;
3. IZSLT – Accettazione campioni e refertazione: personale tecnico e un dirigente;
4. IZSLT – Produzione report e mappe: un dirigente veterinario e un biologo;
5. ASL – Effettuazione catture sul campo e conferimento campioni: tra dirigenti veterinari e tecnici della prevenzione, si può stimare in circa 30-35 il numero di unità impiegate.

Le attività di sorveglianza vengono effettuate con periodicità quindicinale nel periodo marzo-novembre. Inizio e fine dell'attività possono subire variazioni a seconda delle specifiche condizioni meteorologiche di ciascuna stagione.

Le zanzare campionate sono trasportate, per il conferimento presso le sedi dell'IZSLT, in contenitori di polistirolo con ghiaccio secco. In laboratorio lo smistamento e l'identificazione delle zanzare sono effettuati allo stereomicroscopio, avendo cura di mantenere gli esemplari refrigerati. L'identificazione morfologica si basa sulle chiavi di Severini *et al.* (2). I *pool* trasferiti al Laboratorio di Virologia per la ricerca biomolecolare dei virus sono composti da un minimo di 5 ad un massimo di 100 esemplari della specie *Culex pipiens*. Qualora in una cattura si riscontri un numero particolarmente elevato di esemplari di altre specie (es. *Ochlerotatus* sp.), anche queste zanzare vengono divise in *pool* e passate al Laboratorio di Virologia. In ogni caso i *pool* sono monospecifici e non contengono esemplari maschi.

Risultati

Vengono qui di seguito riportati i risultati relativi al biennio 2019-2020, anni in cui posizione e numero dei siti di campionamento sono rimasti pressoché costanti.

Elenco specie catturate

Le specie catturate sono state:

- Lazio: *Culex pipiens*, *Anopheles maculipennis*, *Anopheles plumbeus*, *Aedes albopictus*, *Culiseta annulata*, *Culiseta subochrea*, *Culiseta longiareolata*, *Ochlerotatus caspius*, *Ochlerotatus detritus*.
- Toscana: *Culex pipiens*, *Anopheles maculipennis*, *Anopheles plumbeus*, *Aedes vexans*, *Aedes vittatus*, *Aedes albopictus*, *Culiseta annulata*, *Culiseta subochrea*, *Culiseta longiareolata*, *Ochlerotatus caspius*, *Ochlerotatus detritus*, *Ochlerotatus rusticus*.

Nei due anni di campionamento sono stati catturati in totale 23.811 esemplari di culicidae (13.416 nel 2019 e 10.395 nel 2020), in 1.073 catture (493 nel 2019 e 580 nel 2020).

Le specie più abbondanti sono risultate: *Cx. pipiens* (8.777 individui), *Oc. caspius* (5.930 individui), *Ae. albopictus* (445 individui) e *Cs. subochrea* (106 individui) (Tabella 1). In Figura 1 è riportato l'andamento stagionale delle quattro specie di zanzara più abbondanti in Lazio e Toscana.

Tabella 1. Numerosità delle 4 specie di zanzare risultate più abbondanti in Lazio e Toscana durante le attività di sorveglianza entomologica per il WNV negli anni 2019-2020

Specie	Lazio		Toscana		Totale
	2019	2020	2019	2020	
<i>Culex pipiens</i>	2011	1756	4067	943	8777
<i>Ochlerotatus caspius</i>	405	431	3790	1709	5930
<i>Aedes albopictus</i>	117	270	131	54	445
<i>Culiseta subochrea</i>	33	106	445	41	283

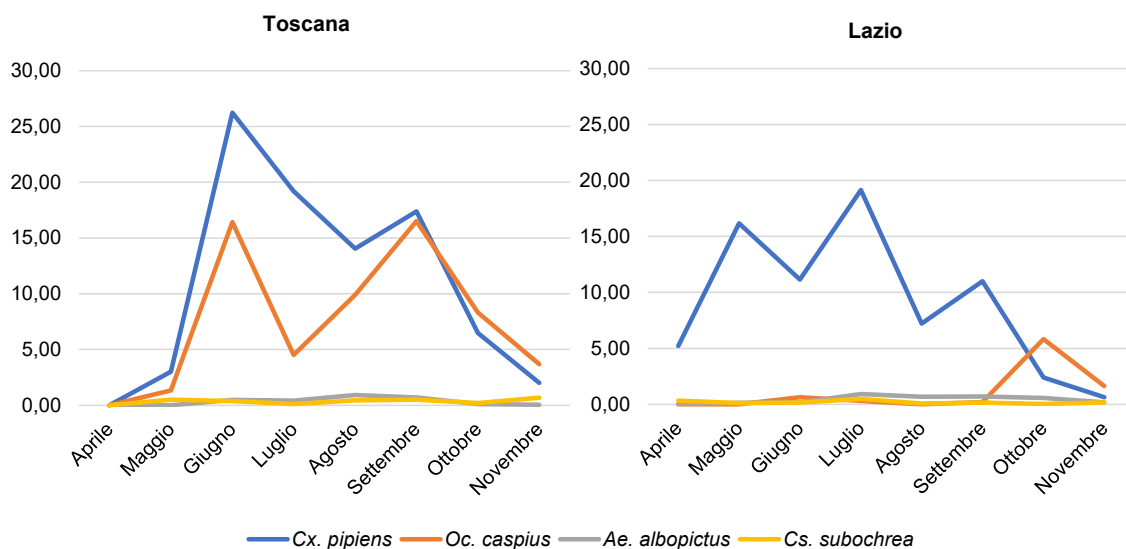


Figura 1. Andamento stagionale delle quattro specie di zanzara risultate più abbondanti in Toscana e Lazio: dati cumulativi relativi alle stagioni di sorveglianza 2019 e 2020

Sono state esaminate in *real-time* RT-PCR 13.445 zanzare (11.207 *Cx. pipiens* e 2.238 *Oc. caspius/detritus/Ochlerotatus* sp.) divise in 448 *pool*, dei quali nessuno ha dato esito positivo per WNV e USUV.

Esperienza del 2018

Nell'estate 2018 è stata riscontrata circolazione del WNV nei cavalli in un'ampia zona al confine tra le province di Roma e Latina, nei comuni di Cisterna, Aprilia, Nettuno e Velletri. Positività sierologiche e/o a test molecolari hanno riguardato 8 animali testati per sospetto clinico o per il successivo allargarsi delle attività di sorveglianza. I successivi controlli delle sacche di sangue dei donatori residenti nella stessa area hanno permesso di riscontrare due positività al USUV. Come previsto dal Piano Nazionale, a seguito delle prime positività, è stata immediatamente messa in atto un'attività di sorveglianza entomologica, durante la quale sono state effettuate 23 catture negli 8 siti in cui risiedevano i cavalli positivi. I 2.367 esemplari di *Cx. pipiens* catturati, suddivisi in 56 *pool*, sono stati testati in *real-time* RT-PCR per la presenza dei virus WNV e USUV. Diciassette *pool* sono risultati positivi per USUV (*Minimum Infectious Rate* 0,72%), nessuno per WNV (Figura 2).

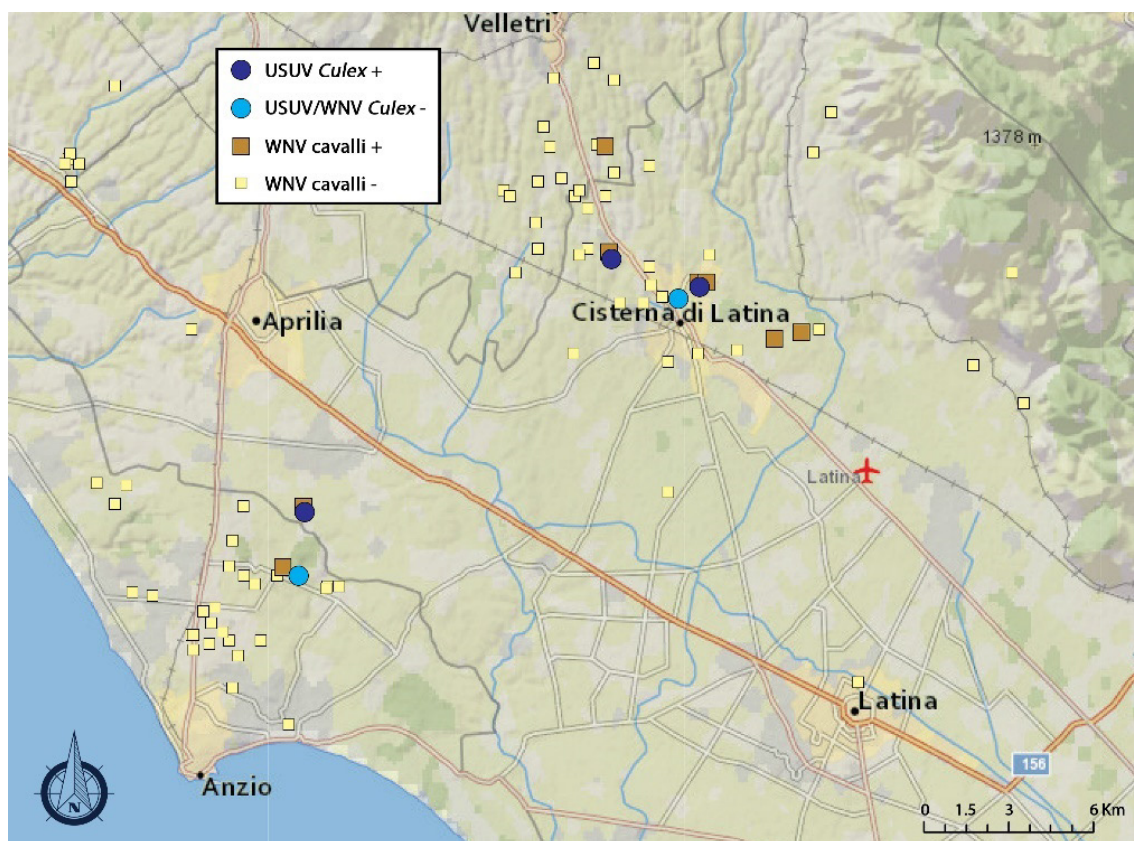


Figura 2. Distribuzione dei 3 siti a cui appartenevano i 17 *pool* di *Culex pipiens* positivi per USUV e degli 8 allevamenti in cui risiedevano i cavalli positivi al WNV, con le relative negatività (dati relativi alla sorveglianza messa in atto a seguito di circolazione virale verificatasi nel 2018 nelle province di Latina e Roma)

Per la prima volta in centro Italia è stata dimostrata la circolazione simultanea dei due virus, WNV nei cavalli, USUV in zanzare e donatori.

L'esperienza della sorveglianza integrata effettuata nel 2018 al confine tra le province di Roma e Latina sembrerebbe aver messo in evidenza alcuni limiti della sorveglianza entomologica quale sistema di *early detection* di circolazione virale. Sorprendentemente infatti il WNV non è mai stato rinvenuto nei *pool* di *Cx. pipiens* testati, nonostante le catture venissero effettuate in siti in cui era stata evidenziata la circolazione di questo virus. E questo in contraddizione con l'esperienza degli IZS Lombardia ed Emilia-Romagna e Venezie. Sembrerebbe dunque che la sorveglianza entomologica funzioni come *early detection* solo in alcune aree geografiche. Le variabili che potrebbero influenzare la validità della sorveglianza entomologica sono presumibilmente l'abbondanza dei vettori e il livello di diffusione del virus. In centro Italia la minore abbondanza delle zanzare della specie *Cx. pipiens*, se confrontata ad alcune zone della Pianura Padana, e la minore intensità della circolazione virale (testimoniata dalla saltuarietà del suo riscontro in equini e uomo), farebbero sì che la sorveglianza entomologica non raggiunga sufficienti livelli di sensibilità nell'evidenziare la circolazione del virus.

Bibliografia

1. Autorino G, Battisti A, Deubell V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, Lelli R, Murri S, Scicluna MT. West Nile virus epidemic in horses, Tuscany Region, Italy. *Emerg Inf Dis* 2002;12:1372-8.
2. Severini F, Toma L, Di Luca M, Romi R. Italian mosquitoes: general information and identification of adults (Diptera, Culicidae). Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti (Diptera, Culicidae). *Fragm Entomol* 2009;41:213-372.

SORVEGLIANZA DEI VETTORI DEI VIRUS WEST NILE E USUTU IN ABRUZZO E MOLISE

Matteo De Ascentis, Michela Quaglia, Silvio Gerardo d'Alessio, Federica Iapaolo, Daniela Cioci, Carla Ippoliti, Annamaria Conte, Federica Monaco, Daniela Morelli, Giovanni Savini, Maria Goffredo
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo

Introduzione

La sorveglianza entomologica dei virus West Nile (*West Nile Virus*, WNV) e Usutu (*Usutu Virus*, USUV) in Italia è regolamentata dal Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA) 2020-2025, che aggiorna il precedente Piano nazionale integrato di prevenzione, sorveglianza e risposta ai virus West Nile e Usutu – 2019 (circolare ministeriale n. 10381 del 05 aprile 2019). Tali disposizioni prevedono l'implementazione di una sorveglianza entomologica finalizzata al rilevamento precoce di WNV e USUV, in aree identificate ad alto e a basso rischio di trasmissione, su base provinciale. In particolare, nelle province a basso rischio è prevista l'individuazione di porzioni di territorio che, per le loro caratteristiche eco-climatiche, possano essere ritenute idonee all'instaurarsi di un ciclo di trasmissione virale tra l'avifauna e le zanzare. Nelle aree così selezionate, la sorveglianza entomologica va implementata con una griglia di 20x20 km, con almeno un sito di cattura operante almeno quindicinalmente.

In ottemperanza alle disposizioni nazionali, le Regioni Abruzzo e Molise hanno disposto la sorveglianza entomologica per WNV e USUV a partire dal 2019.

Tre delle quattro province abruzzesi (Chieti, Pescara, Teramo) e le due province molisane (Isernia e Campobasso) rientrano nelle aree a basso rischio. Invece la quarta provincia abruzzese, L'Aquila, è considerata tra le aree a rischio minimo.

La sorveglianza, nelle due Regioni di competenza, è stata coordinata ed effettuata dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (IZSAM), in collaborazione con i Servizi Veterinari locali.

Oltre alle attività previste nelle province a basso rischio, nel 2019 la sorveglianza entomologica è stata implementata anche nella provincia a rischio minimo, L'Aquila.

Di seguito sono riportati i risultati della sorveglianza entomologica effettuata nel 2019 e 2020, con riferimento alla distribuzione delle specie di zanzara catturate nelle due Regioni e alla ricerca di WNV e USUV.

Materiali e metodi

In base alle caratteristiche ambientali ed ecologiche sono state individuate le porzioni di territorio considerate idonee alla circolazione di WNV e USUV: altitudine <600 m, condizioni idonee alla presenza di avifauna selvatica e ai vettori (con particolare riferimento al *Culex pipiens sensu lato* - s.l.). La selezione delle aree è stata validata anche considerando la classificazione in ecoregioni del territorio delle due Regioni, ovvero aree con caratteristiche omogenee per temperatura, quantità di pioggia, vegetazione e altitudine, ognuna caratterizzata da un *range* peculiare di valori di tali variabili (1). Nella selezione dei siti di cattura sono state privilegiate le ecoregioni che, storicamente, sono associate in Italia alla circolazione di WNV.

Le porzioni di territorio così individuate sono state suddivise con una griglia in aree di 20x20 km, in ognuna delle quali è stato attivato almeno un sito di cattura (Figura 1).

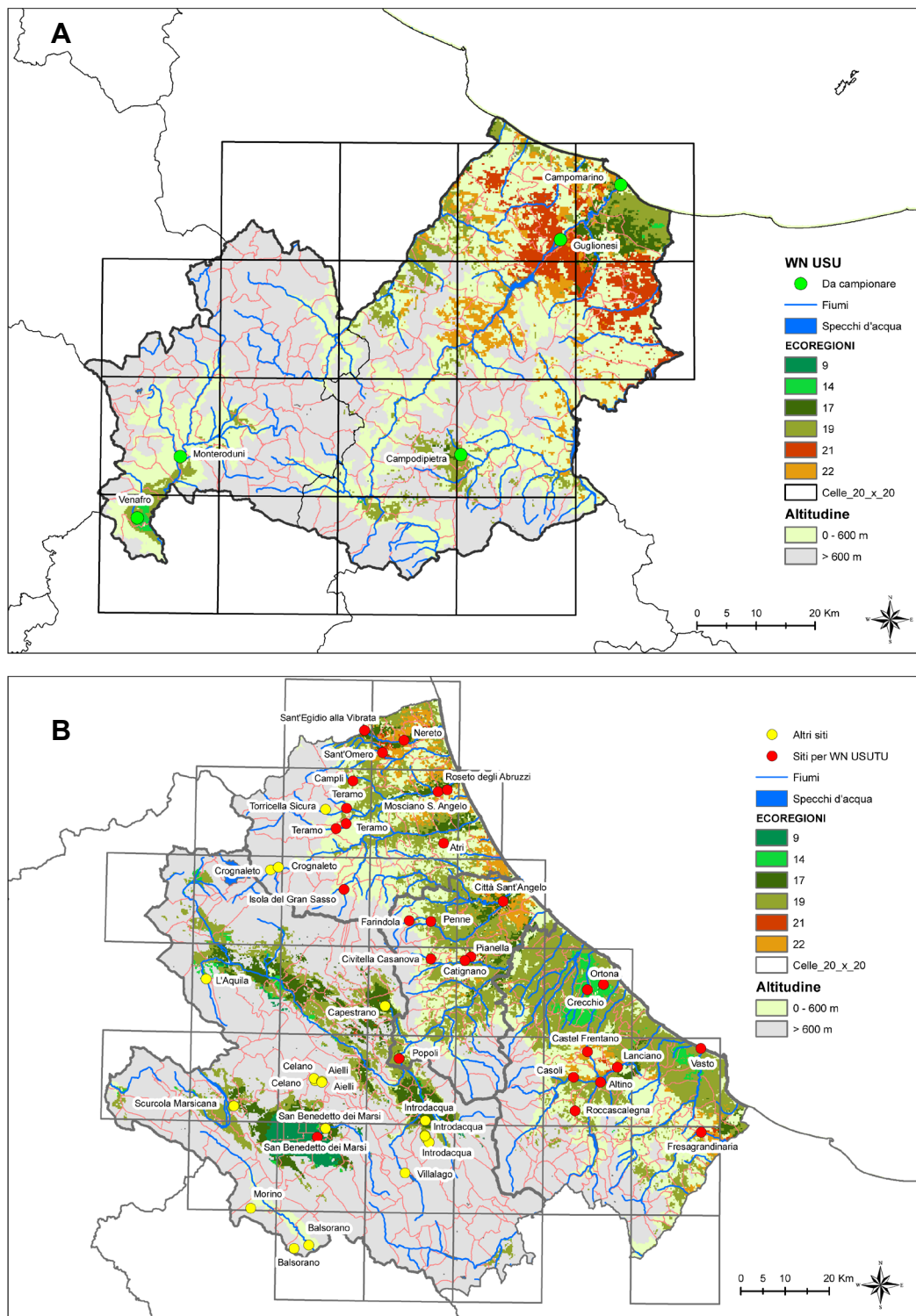


Figura 1. Siti di cattura selezionati per la cattura dei culicidi in Molise (A) e Abruzzo (B) per gli anni 2019 e 2020

Nel 2019 sono stati attivati 56 siti di cattura, dopo aver effettuato sopralluoghi per verificare la fattibilità dell'attività di campo: 51 siti nella Regione Abruzzo e 5 in Molise. In 30 siti (25 in Abruzzo e 5 in Molise) le catture sono state finalizzate alla ricerca di WNV e USUV, nei rimanenti siti le catture sono state analizzate solo morfologicamente, per definire la composizione della fauna culicidica.

Successivamente, nel 2020, sono stati selezionati per la sorveglianza entomologica delle arbovirosi 17 siti (12 siti in Abruzzo e 5 in Molise). Ogni sito è stato campionato settimanalmente in Abruzzo e quindicinalmente in Molise (da giugno a novembre nel 2019 e da maggio a novembre nel 2020).

Per le catture sono state usate trappole del tipo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) *light trap*, innescate sia con luce che ghiaccio secco e alimentate a batteria. Il ghiaccio secco è stato prodotto settimanalmente presso l'IZSAM, per un totale di circa 1500 kg nelle due stagioni, ed è stato distribuito nei siti di tutte le province con l'ausilio delle sedi periferiche dell'IZSAM.

Le trappole sono state posizionate nei siti di interesse a circa 1,5 m di altezza da terra e azionate poco prima del tramonto. Le sacche di raccolta sono state recuperate il mattino seguente ed etichettate con luogo e data di cattura, la quale si riferisce alla data del mattino in cui vengono raccolti gli insetti. Una volta catturati, gli insetti sono stati trasferiti in laboratorio in condizioni di refrigerazione e uccisi in congelatore, a -20°C per almeno 15 minuti. I campioni ottenuti sono stati registrati nel Sistema Informativo IZSAM e sono stati analizzati morfologicamente allo stereomicroscopio.

Le zanzare sono state identificate utilizzando le chiavi di identificazione di Severini *et al.* (2) e contate. Quando lo stato di conservazione degli esemplari non consentiva l'identificazione a livello di specie, è stato indicato il genere o la sottofamiglia.

Le zanzare destinate alla ricerca virologica sono state suddivise in *pool* composti da massimo 50 esemplari, omogenei per specie, data e luogo di cattura, e sottoposte ad analisi virologiche tramite *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) per la ricerca di WNV (Lineages 1 e 2) e USUV.

Risultati

In totale sono state effettuate 1.382 catture (1.026 nel 2019 e 356 nel 2020) per un totale di 25.953 zanzare campionate.

Le zanzare catturate rappresentano tutti e 7 i generi presenti in Italia e appartengono a 19 specie (Tabella 1).

Nei due anni di campionamento *Culex pipiens s.l.* è stata la specie più abbondante, rappresentando il 79,12% degli individui catturati (77,75% nel 2019 e 80,57% nel 2020), seguita da *Aedes caspius* 4,90% (4,92% nel 2019 e 4,88% nel 2020), *Aedes vexans* 3,53% (2,84% nel 2019 e 4,26% nel 2020), *Coquillettidia richiardii* 3,26% (3,82% nel 2019 e 2,65% nel 2020), *Culex mimeticus* 2,07% (1,22% nel 2019 e 2,97% nel 2020), *Aedes geniculatus/sticticus* 1,87% (3,22% nel 2019 e 0,44% nel 2020), *Aedes albopictus* 1,46% (2,23% nel 2019 e 0,64% nel 2020), *Anopheles plumbeus* 0,62% (0,83% nel 2019 e 0,40% nel 2020), *Culiseta annulata* 0,36% (0,45% nel 2019 e 0,26% nel 2020), *Culiseta longiareolata* 0,20% (0,19% nel 2019 e 0,21% nel 2020), *Anopheles claviger* 0,19% (0,01% nel 2019 e 0,38% nel 2020), *Anopheles maculipennis s.l.* 0,15% (0,20% nel 2019 e 0,10% nel 2020).

Infine, il 2,27% (2,30% nel 2019 e 2,24% nel 2020) delle zanzare comprende esemplari appartenenti a specie risultate meno comuni ($< 0.1\%$) ed esemplari che sono stati identificati solo a livello di genere o di sottofamiglia. Tra le specie meno comuni, la più abbondante è *Uranotaenia*

unguiculata (0,04%), seguita da *Culex hortensis* (0,03%), *Culex theileri* (0,02%), *Aedes pulcritarsis* (0,01%), *Aedes detritus* (0,004%), *Culex territans* (0,004%) e *Orthopodomyia pulcripalpis* (0,004%).

Tabella 1. Risultati delle catture delle specie di zanzare effettuate in Abruzzo e Molise nel periodo 2019-2020

Specie	Abruzzo			Molise			Totale
	2019	2020	totale	2019	2020	totale	
<i>Aedes albopictus</i>	291	78	369	8	2	10	379
<i>Aedes caspius</i>	17	7	24	643	605	1248	1272
<i>Aedes detritus</i>		0	0		1	1	1
<i>Aedes geniculatus/sticticus</i>	433	55	488			0	488
<i>Aedes pulcritarsis</i>	3		3			0	3
<i>Aedes sp.</i>	132	254	386	12	3	15	401
<i>Aedes vexans</i>	380	531	911	1	3	4	915
<i>Anopheles claviger</i>	2	42	44		6	6	50
<i>Anopheles maculipennis s.l.</i>	21	10	31	6	3	9	40
<i>Anopheles plumbeus</i>	102	47	149	9	3	12	161
<i>Anopheles sp.</i>	8	7	15	6	7	13	28
<i>Coquillettidia richiardii</i>	297	315	612	215	18	233	845
<i>Culex hortensis</i>	6	1	7	0	0	0	7
<i>Culex mimeticus</i>	162	373	535	1	0	1	536
<i>Culex pipiens s.l.</i>	9590	9938	19528	835	170	1005	20533
<i>Culex territans</i>	1		1			0	1
<i>Culex theileri</i>		0	0	2	3	5	5
<i>Culicinae</i>	128		128			0	128
<i>Culiseta annulata</i>	47	31	78	14	1	15	93
<i>Culiseta longiareolata</i>	25	23	48	1	3	4	52
<i>Culiseta sp.</i>	1	3	4			0	4
<i>Orthopodomyia pulcripalpis</i>	1		1			0	1
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	8	2	10			0	10
Totale	11655	11717	23372	1753	828	2581	25953

In Figura 2 è riportata la distribuzione delle specie di zanzare catturate in Abruzzo e Molise, per provincia, mentre in Figura 3 è riportata l'abbondanza relativa delle specie, per Regione.

L'andamento stagionale delle due specie risultate più abbondanti, *Culex pipiens s.l.* e *Aedes caspius*, è rappresentato in Figura 4.

Le femmine di zanzara catturate nei siti di cattura dedicati alla sorveglianza di WNV e USUV (Figura 1), sono state divise in un totale di 2.269 *pool*, il cui dettaglio è riportato in Tabella 2.

Tutti i *pool* testati sono risultati negativi al WNV. Il virus Usutu è stato invece rilevato in 18 *pool*, di cui 7 composti da *Aedes caspius* in Molise (ottobre 2019; settembre 2020), 10 da *Culex pipiens s.l.* in Abruzzo (settembre e ottobre 2019; settembre 2020) e in Molise (settembre 2020), e un *pool* da *Culiseta longiareolata* in Molise (settembre 2020) (Tabella 3). La localizzazione dei siti risultati positivi al USUV, quattro in Abruzzo e tre in Molise, è mostrata in Figura 5.

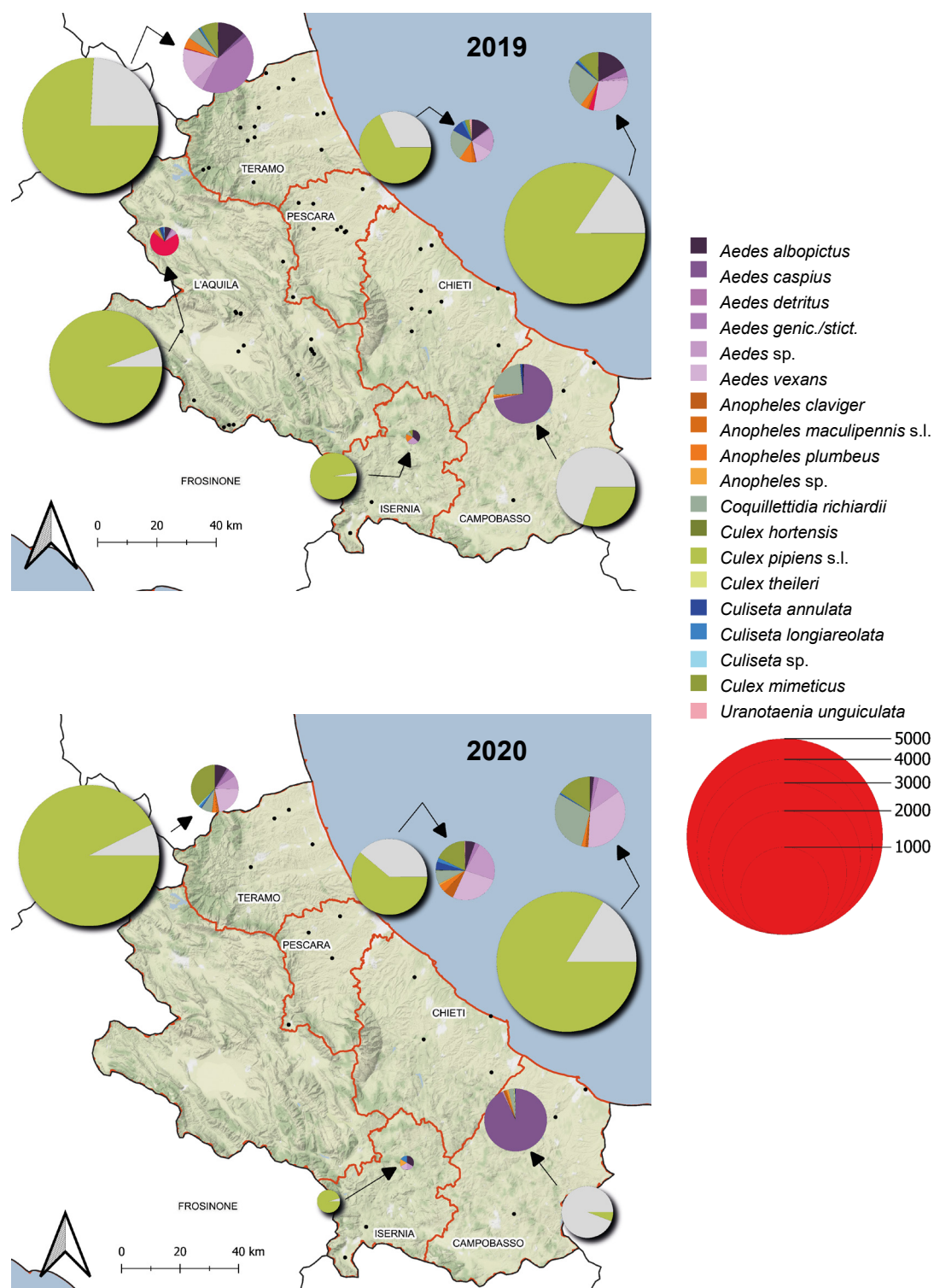


Figura 2. Distribuzione delle specie di zanzara catturate in Abruzzo e Molise (2019-2020)

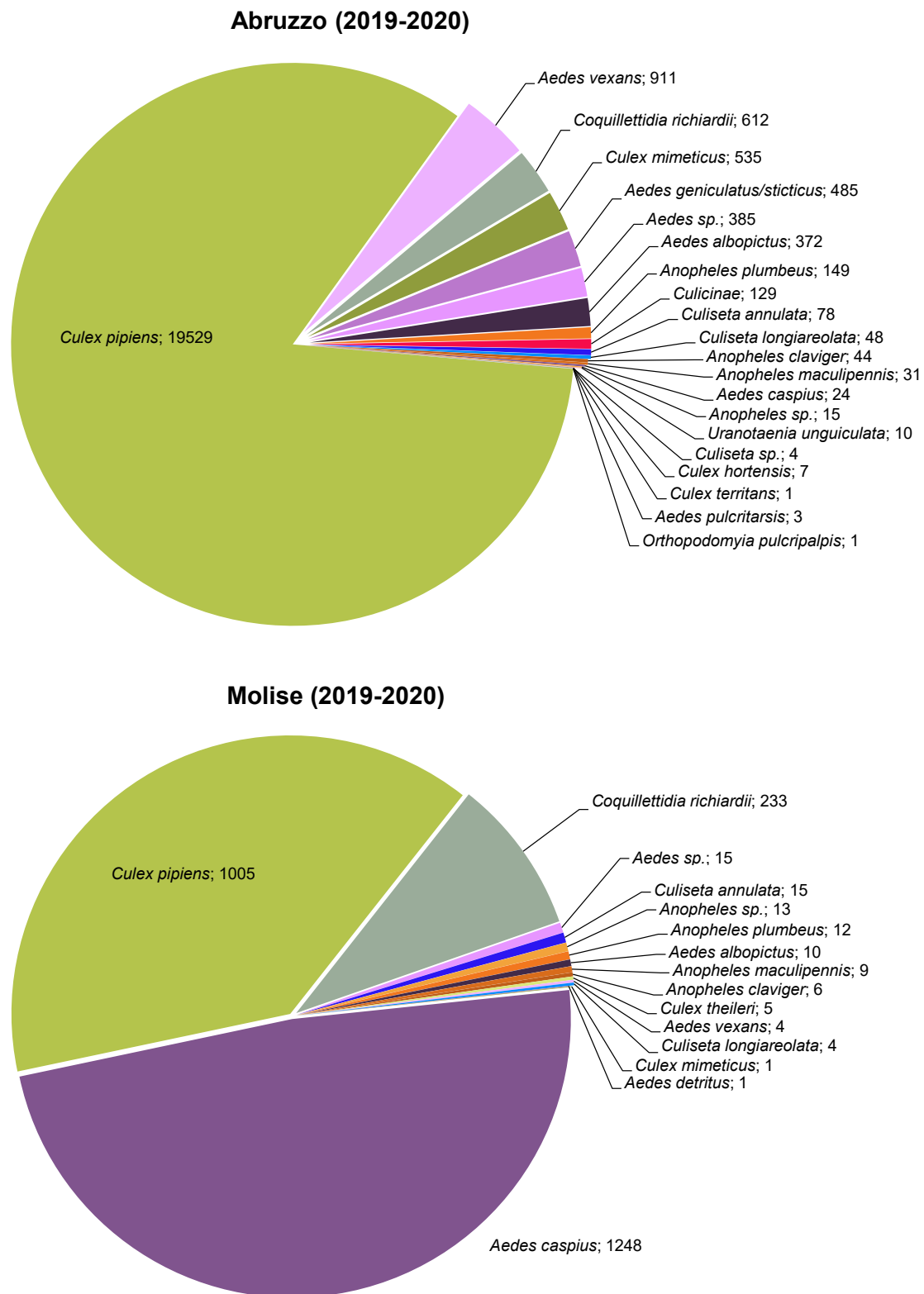


Figura 3. Abbondanza relativa (B) delle specie di zanzara catturate in Abruzzo e Molise (2019-2020)

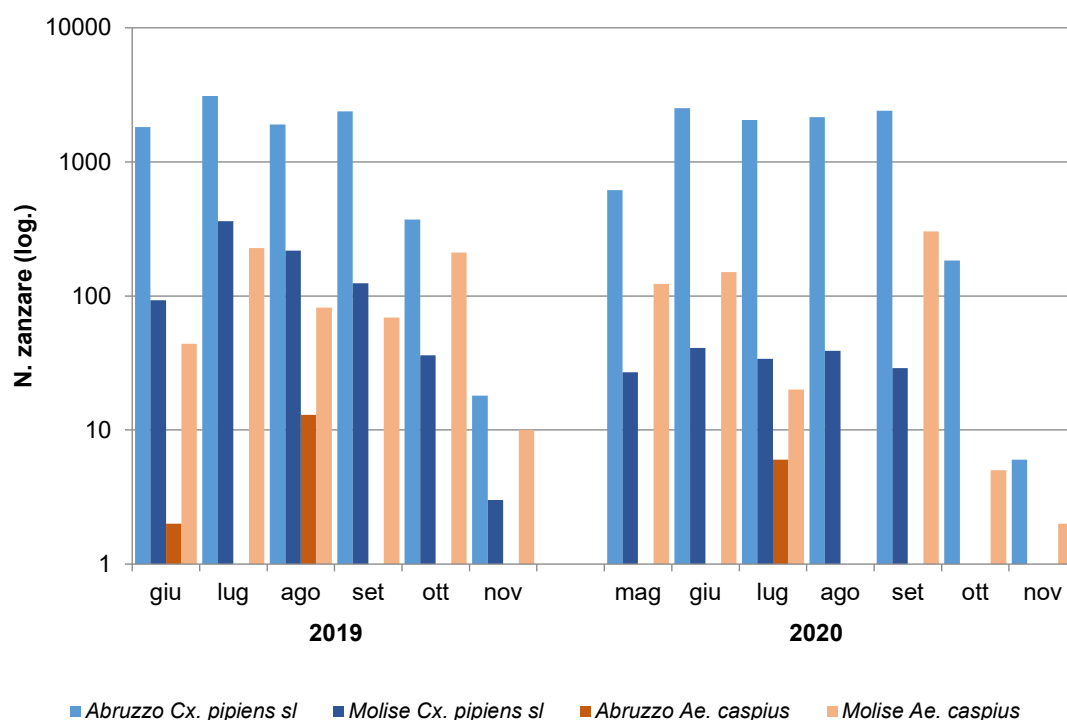


Figura 4. Andamento stagionale (log. numero zanzare per mese) di *Culex pipiens s.l.* e di *Aedes caspius* in Abruzzo e in Molise (2019-2020)

Tabella 2. Pool di zanzare analizzate per i virus West Nile (WNV) e Usutu (USUV) in Abruzzo e Molise (2019-2020) e MIR* per USUV. Tutti i pool sono risultati negativi per WNV

Specie	N. pool positivi/pool testati; N. di zanzare testate (USUV MIR%)			
	2019		2020	
	Abruzzo	Molise	Abruzzo	Molise
<i>Aedes albopictus</i>	0/118; 269	0/7; 8	0/36; 74	0/2; 2
<i>Aedes caspius</i>	0/6; 17	4/26; 642 (0,62)	0/4; 7	3/26; 600 (0,50)
<i>Aedes geniculatus/sticticus</i>	0/26; 366	-	0/15; 55	-
<i>Aedes vexans</i>	0/97; 374	0/1; 1	0/67; 515	0/3; 3
<i>Anopheles claviger</i>	0/2; 2	-	0/10; 29	0/3; 6
<i>Anopheles maculipennis s.l.</i>	0/10; 15	0/5; 6	0/7; 7	0/3; 3
<i>Anopheles plumbeus</i>	0/53; 91	0/7; 9	0/32; 45	0/2; 3
<i>Coquillettidia richiardii</i>	0/88; 291	0/15; 215	0/67; 312	0/6; 18
<i>Culex mimeticus</i>	0/53; 145	0/1; 1	0/68; 357	-
<i>Culex pipiens s.l.</i>	4/732; 7294 (0,05)	1/77; 811 (0,12)	4/350; 9747 (0,04)	1/23; 169 (0,59)
<i>Culiseta annulata</i>	0/24; 39	0/8; 11	0/18; 29	0/1; 1
<i>Culiseta longiareolata</i>	0/12; 19	0/1; 1	0/18; 19	1/1; 1 (100)
Altro	0/71; 143	0/11; 20	0/46; 255	0/10; 14
Totale	4/1292; 9065 (0,04)	5/159; 1725 (0,29)	4/738; 11451 (0,03)	5/80; 820 (0,61)

Minimum Infection Rate (MIR = N. pool positivi/N. zanzare testate%)

Tabella 3. Pool di zanzare positivi ai virus West Nile e Usutu in Abruzzo e Molise (2019-2020)

Specie	Provincia	Data prelievo	N. zanzare
<i>Aedes caspius</i>	Campobasso	01-ott-2019	50
			50
			50
		23-set-2020	27
			50
			50
<i>Culex pipiens s.l.</i>	Campobasso	01-ott-2019	9
		10-set-2019	11
		27-set-2019	7
	Teramo	11-ott-2019	10
		10-set-2020	48
		17-set-2020	50
		35	
	Isernia	16-set-2020	1
	Pescara	18-set-2020	1
<i>Culiseta longiareolata</i>	Isernia	16-set-2020	1

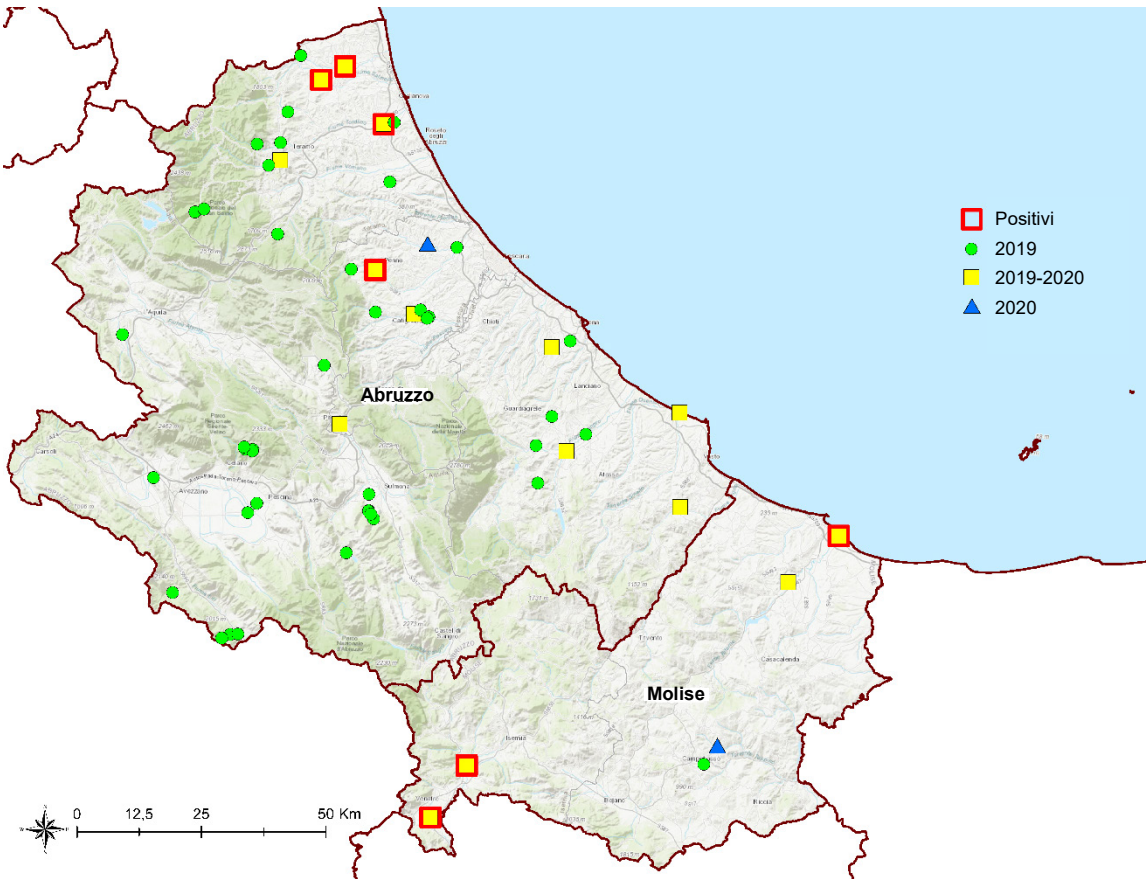


Figura 5. Siti risultati positivi al virus Usutu in Abruzzo e Molise (2019-2020)

Discussione

La sorveglianza entomologica effettuata nel biennio 2019-2020 ha consentito di definire la composizione della fauna culicidica in tutte le province dell'Abruzzo e del Molise, identificando 19 specie appartenenti ai sette generi presenti in Italia (Tabella 1).

Questi risultati consentono di avere un quadro estensivo delle specie presenti nelle due Regioni, a completamento delle osservazioni parziali già riportate in letteratura (3-5).

Nel corso delle due stagioni 2019 e 2020, in Abruzzo la specie dominante è risultata *Culex pipiens s.l.* (83,55%), pattern confermato anche considerando le singole province. In Molise invece *Culex pipiens s.l.* ha un'abbondanza simile ad *Aedes caspius* (38,94% e 48,35%, rispettivamente), ma questo pattern è legato soprattutto alla provincia di Campobasso, mentre nella provincia di Isernia *Culex pipiens s.l.* si conferma la specie dominante (Tabella 1, Figure 2 e 3).

Tuttavia, bisogna considerare che la selezione dei siti di cattura, e la metodologia utilizzata, sono state essenzialmente mirate alla rilevazione precoce di WNV e USUV, nei loro cicli di trasmissione tra uccelli e zanzare. Ne consegue che i risultati ottenuti non possono essere rappresentativi dell'intero territorio, ad esempio degli ambienti urbani, in cui probabilmente sarebbero risultate più abbondanti specie diverse, prima tra tutte *Aedes albopictus*.

Il virus Usutu è stato rilevato in 7 siti di cattura, in tarda estate 2019 e 2020, in entrambe le province molisane e in due province abruzzesi (Teramo e Pescara), in *pool* composti da *Culex pipiens s.l.*, *Aedes caspius* e *Culiseta longiareolata*. Questo risultato indica la ricorrente presenza nel territorio di USUV, che probabilmente circola annualmente tra le zanzare e gli uccelli. In particolare i dati ottenuti confermano la vocazione del territorio della provincia di Campobasso alla circolazione di USUV, in quanto già nel 2011 erano state riscontrate positività in *Culex pipiens s.l.*, *Aedes detritus* e *Culiseta annulata* (5).

In conclusione, i risultati ottenuti confermano la sensibilità di rilevamento del sistema di sorveglianza adottato, avvalorando di conseguenza anche il dato negativo relativo alla circolazione di WNV.

Bibliografia

1. Ippoliti C, Candeloro L, Gilbert M, Goffredo M, Mancini G, Curci G, Falasca S, Tora S, Di Lorenzo A, Quaglia M, Conte A. Defining ecological regions in Italy based on a multivariate clustering approach: A first step towards a targeted vector borne disease surveillance. *PLoS One* 2019;14(7):e0219072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219072>.
2. Severini F, Toma L, Di Luca M, Romi R. Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti (Diptera: Culicidae). *Fragmenta Entomologica* 2009;41:213-372.
3. Mantovan A, Restani R. Ricerche sui possibili artropodi vettori di *Dirofilaria repens* in alcune province dell'Italia centrale. *Parassitologia* 1965;7:109-16.
4. Toma L, Cipriani M, Goffredo M, Romi R, Lelli R. First report on entomological field activities for the surveillance of West Nile disease in Italy. *Veterinaria Italiana* 2008;44(3):483-97, 499-512. (English, Italian).
5. Mancini G, Montarsi F, Calzolari M, Capelli G, Dottori M, Ravagnan S, Lelli D, Chiari M, Santilli A, Quaglia M, Federici V, Monaco F, Goffredo M, Savini G. Mosquito species involved in West Nile and Usutu viruses circulation in Italy. *Veterinaria Italiana* 2017;53(2):97-110. doi: 10.12834/VetIt.114.933.4764.2.

SORVEGLIANZA DEI VETTORI DEI VIRUS WEST NILE E USUTU IN PUGLIA E BASILICATA

Donato Antonio Raele, Ilaria Vasco, Leonardo Marino, Maria Assunta Cafiero

Struttura Semplice di Diagnostica Virologica e Entomologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

Introduzione

I virus West Nile (*West Nile Virus*, WNV) e Usutu (*Usutu Virus*, USUV) (famiglia *Flaviviridae*, genere *Flavivirus*) sono arbovirus trasmessi da zanzare (Diptera, Culicidae) la cui circolazione è assicurata da un ciclo enzootico uccelli-zanzare e, occasionalmente, da un ciclo epizootico, con coinvolgimento di mammiferi, inclusi equidi e uomo considerati ospiti a fondo cieco, ossia incapaci di sviluppare una viremia sufficiente a infettare l'insetto vettore. In Italia WNV è stato segnalato per la prima volta nel 1998 in equidi in Toscana (palude di Fucecchio) e, nell'occasione, il ruolo di potenziali vettori fu attribuito a *Culex (Cx.) pipiens s.l.*, *Culex impudicus* e *Ochlerotatus (Oc.) caspius* in quanto specie prevalenti nell'area (1, 2); nella stessa Regione, uno studio retrospettivo ha evidenziato la circolazione del virus Usutu in uccelli selvatici (3). In seguito a tale focolaio di encefalomielite equina, nel 2002 è stato attivato dal Ministero della Salute un Piano di Sorveglianza Nazionale (Ordinanza Ministeriale 4/4/2002), con l'obiettivo di monitorare l'introduzione e la circolazione della malattia da WNV nel nostro Paese, individuando aree a rischio, tra cui quelle di Manfredonia (Puglia, Foggia) e del Lago di San Giuliano (Basilicata, Matera), ricomprese nel raggio di 20 km a partire dalle coordinate 41°23'N-16°02'E e 40°38'N-16°30'E, rispettivamente; tra le attività previste, la sorveglianza entomologica è stata considerata di fondamentale importanza tanto da essere riproposta e implementata nei successivi piani di sorveglianza per la *West Nile Disease* (WND). Nel periodo 2010-2018, sier conversionsi e positività virologiche in equidi e polli sentinella e due casi sintomatici nell'uomo in provincia di Foggia e Matera hanno dimostrato la circolazione di WNV in Puglia e Basilicata (Tabella 1).

Tabella 1. Positività a West Nile virus rilevate in Puglia e Basilicata (2003-2018)

Anno	Provincia	Numero e specie	Focolai	Sintomi clinici
2010	Foggia (FG)	5 polli sentinella	1	no
2011	Matera (MT)	7 cavalli	4	no
2011	Matera (MT)	1 pollo sentinella	1	no
2012	Matera (MT)	1 uomo	1	si
2012	Matera (MT)	6 polli sentinella	5	no
2013	Foggia (FG)	1 uomo	1	si
2014	Lecce (LE)	1 cavallo	1	no
2014	Brindisi (BR)	2 cavalli	1	no
2015	Lecce (LE)	1 cavallo	1	no
2018	Barletta Andria Trani (BAT)	3 cavalli	2	no
2018	Matera (MT)	1 cavallo	1	no

Dati provenienti da https://westnile.izs.it/j6_wnd/wndItalia

La sorveglianza entomologica mediante il posizionamento di trappole, CDC (*Centers for Disease Control and prevention*) *light trap* e BG-Sentinel® (*Biogents' mosquito trap*) è stata

effettuata nel periodo 2003-2018 in un totale di 27 aziende zootecniche pugliesi e lucane, in provincia di Foggia, Bari, Barletta Andria Trani, Lecce e Matera permettendo la cattura di una diversificata fauna culicidica, con prevalenza della specie *Culex pipiens s.l.*, risultata sempre negativa al rilevamento dei virus WNV e USUV (Tabella 2).

Tabella 2. Sorveglianza entomologica West Nile-USutu virus in Puglia e Basilicata (2003-2018): comuni monitorati

Provincia	Comune	N. siti
Matera (MT)	Matera	2
Matera (MT)	Miglianico	1
Matera (MT)	Montescaglioso	1
Matera (MT)	Montalbano Jonico	1
Matera (MT)	Ferrandina	6
Matera (MT)	Grottole	1
Matera (MT)	Pisticci	3
Foggia (FG)	Foggia	2
Foggia (FG)	Lesina	1
Foggia (FG)	Lucera	1
Foggia (FG)	Manfredonia	1
Foggia (FG)	Zapponeta	1
Barletta Andria Trani (BAT)	Barletta	1
Barletta Andria Trani (BAT)	Canosa Di Puglia	1
Barletta Andria Trani (BAT)	Trinitapoli	2
Lecce (LE)	Soletto	1
Bari (BA)	Altamura	1
Totale		27

Le specie di zanzare rilevate nella sorveglianza entomologica WNV-USUV in Puglia e Basilicata nel periodo 2003-2018 sono state:

- *Aedes* spp., *Ae. albopictus*;
- *Anopheles* spp., *An. claviger*, *An. plumbeus*, *An. maculipennis s.l.*, *An. superpictus*;
- *Coquillettidia richiardii*;
- *Culex* spp., *Cx. pipiens s.l.*, *Cx. theileri*, *Cx. univittatus*;
- *Culiseta* spp., *Cs. annulata*, *Cs. longiareolata*;
- *Ochlerotatus* spp., *Oc. caspius*, *Oc. detritus*, *Oc. pulcritarsis*, *Oc. communis*.

Da aprile 2020, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata (IZSPB), è nuovamente impegnato nella sorveglianza entomologica nelle due Regioni di competenza con attività programmate in tutte le province della Puglia, grazie al finanziamento regionale e in Basilicata, esclusivamente nella provincia di Matera. La pregressa esperienza e il finanziamento regionale hanno reso possibile di organizzare, per la prima volta, un monitoraggio più ampio del quale riportiamo metodologia e risultati, anche evidenziando punti di forza e criticità.

Materiali e metodi

Nel periodo da aprile a dicembre 2020, in Puglia e Basilicata, sono state svolte attività connesse alla sorveglianza entomologica, nell'ambito del Piano Nazionale integrato WNV-USUV 2019. In ciascuna provincia della Puglia e in quella di Matera (Basilicata) le Aziende Sanitarie Locali (ASL) competenti per territorio e gli entomologi del laboratorio di Entomologia Sanitaria dell'IZSPB hanno selezionato e georeferenziato alcuni siti (aziende zootecniche, Centro di Recupero Animali

Selvatici) in aree rurali, perirurali e seminaturali che, per condizioni ecologiche, risultavano idonee all'istaurarsi della circolazione avifauna-virus-zanzare prediligendo, ove possibile, quelle in prossimità di zone umide e costiere e comunque al di sotto dei 600 m s.l.m. Gli ambienti in prossimità di detti siti erano caratterizzati da aree agricole coltivate prevalentemente a ulivo, cereali (grano) e ortaggi ed erano prive di insediamenti industriali.

In ciascun sito di cattura sono state individuate 2 stazioni per il posizionamento di altrettante trappole (1 CDC trap e 1 BG-Sentinel) attivate 1 g/quindicinalmente.

In Puglia, il trappolamento è stato condotto da Veterinari ACN (Accordo Collettivo Nazionale), previo corso di addestramento erogato dall'IZSPB mentre, in Basilicata, è stato affidato a veterinari della ASL competente per territorio che avevano già collaborato al monitoraggio entomologico per WND negli anni precedenti. I prelievi con relativa scheda di accompagnamento SW05 erano conferiti alle sedi diagnostiche provinciali IZSPB. Gli insetti catturati, posti in Piastre Petri identificate per data cattura e trappola utilizzata, venivano subito inviati in condizioni di refrigerazione (4°C) al laboratorio di Entomologia Sanitaria della Sede Centrale IZSPB, Foggia per le analisi di identificazione e ricerca patogeni.

Dopo identificazione morfologica secondo le chiavi dicotomiche di Severini *et al.*, 2009 (4), i culicidi erano contati e suddivisi in *pool* per specie, sesso, data cattura, tipologia di trappola e le femmine molecularmente testate per WNV e USUV mediante *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) (5-7) e per *Dirofilaria repens* e *D. immitis* mediante qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*) (8) e successiva LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) (9,10). Agli esemplari del complesso *An. maculipennis s.l.* veniva asportata una zampa per estrarne il DNA, utilizzato successivamente per l'identificazione molecolare a livello di specie (11).

Risultati

Nell'arco dell'intero monitoraggio annuale sono stati monitorati 18 siti, ubicati in 14 comuni (12 Puglia/2 Basilicata) da 7 province ed effettuati 243 prelievi (207 Puglia, 36 Basilicata) (Tabella 4). Complessivamente sono stati catturati 478 culicidi, appartenenti a 6 generi – *Aedes*, *Anopheles*, *Coquilletidia*, *Culex*, *Culiseta*, *Ochlerotatus* – e 13 specie – *Aedes albopictus*, *Anopheles (An.) maculipennis s.l.*, *An. plumbeus*, *An. superpictus*, *Coquilletidia richardii*, *Culex (Cx.) pipiens*, *Cx. theileri*, *Culiseta (Cs.) annulata*, *Cs. longiareolata*, *Ochlerotatus (Oc.) caspius*, *Oc. communis*, *Oc. detritus*, *Oc. pulcritarsis*.

Solo per pochi esemplari (33/478; 6,9%) non è stata possibile l'identificazione di specie per la perdita di caratteri diagnostici ma solo quella di genere (*Culex* spp. 24; *Ochlerotatus* spp. 2; *Culiseta* spp. 1; *Aedes* spp. 3; *Anopheles* spp. 3). Le specie appartenenti al genere *Culex* (53,5% dell'intero campione) sono quelle maggiormente rinvenute, con la prevalenza della specie *Culex pipiens* (47,48% del totale). Nel genere *Ochlerotatus* (23,43% del totale) prevale la specie *Oc. caspius* (21,12%), mentre *Aedes albopictus* (9%) è la sola rilevata del genere *Aedes*. Nel genere *Anopheles* (6,27% del totale), il complesso *An. maculipennis s.l.* (4,6%) è quello maggiormente rappresentato con la sola specie *An. labranchiae*; altre anofeline sono risultate appartenere alle specie *An. superpictus* (0,2%) e *An. plumbeus* (0,8%).

In totale sono stati esaminati 162 *pool* risultati tutti negativi al rilevamento molecolare di entrambi i virus, WNV e USUV. Tra questi, 11 *pool* (6,7% del totale) sono invece risultati positivi a *Dirofilaria* (DNA), di cui 9 a *D. repens* e 2 a *D. immitis*. In particolare *D. repens* è stato rinvenuto in *Cx. pipiens*, *Oc. caspius*, *Cs. longiareolata*, *Cs. annulata* e in *An. maculipennis s.l.* (presumibilmente *An. labranchiae*), mentre la positività a *D. immitis* è stata registrata solo in *Ochlerotatus caspius* (Tabella 5, Figura 1).

Tabella 4. Sorveglianza entomologica West Nile e Usutu virus in Puglia e Basilicata (2020): indicazione e descrizione dei siti di cattura e del periodo di trappolamento

Data inizio	Data fine	Provincia	Comune	Coordinate	Ambiente/ animali presenti	N.catture
29/04	18/12	BAT	Trinitapoli	41°21'21.4"N 16°07'24.7"E	saline/equidi, fauna selvatica	15
29/04	18/12	BAT	Trinitapoli	41°21'42.2"N 16°07'19.9"E	saline/galline ovaiole	6
07/05	07/12	FG	Manfredonia	41°36'01.6"N 15°53'14.9"E	paludi/equidi	20
15/05	23/11	FG	Lesina	41°51'32.4"N 15°23'36.8"E	lago/ equidi, bovini	22
25/05	20/12	BA	Monopoli	40°55'36.0"N 17°18'06.6"E	costa/equidi	33
25/05	29/06	LE	Nardo	40°10'35.4"N 17°56'28.4"E	costa/equidi	5
26/05	09/09	LE	Otranto	40°13'42.8"N 18°26'31.8"E	laghi alimini/ equidi polli (free range)	14
19/06	09/10	BAT	Trinitapoli	41°21'24.8"N 16°03'59.1"E	saline/equidi, fauna selvatica	13
03/07	21/12	LE	Nardo	40°16'00.0"N 17°55'22.0"E	costa/equidi, bovini polli (free range)	19
20/07	20/07	LE	Otranto	40°07'48.0"N 18°29'24.0"E	costa / equidi, polli (free range)	3
20/08	23/10	TA	Manduria	40°22'07.8"N 17°36'16.1"E	costa / equidi	12
10/09	03/12	TA	Castellaneta	40°29'23.4"N 16°55'39.0"E	costa / equidi	14
22/09	21/12	LE	Calimera	40°14'57.4"N 18°17'53.9"E	laghetti e stagni/fauna selvatica (volatili)	9
06/10	11/12	BR	Carovigno	40°42'01.2"N 17°44'34.4"E	torre guaceto/equidi, cani, pavoni	10
09/10	19/12	BR	Brindisi	40°36'36.1"N 18°01'12.1"E	salina /equidi, fauna selvatica	10
26/11	26/11	TA	Taranto	40°31'05.5"N 17°17'56.0"E	costa/equidi, ovini polli free range	2
28/05	21/11	MT	Grottole	40°36'15.5"N 16°20'10.1"E	fiume, lago/bovini, equini, ovini	23
28/05	21/11	MT	Miglionico	40°36'46.7"N 16°28'01.3"E	fiume, lago/bovini	13
Totale						243

Tabella 5. Sorveglianza entomologica West Nile e Usutu virus in Puglia e Basilicata (2020): risultati

Specie	Totale esemplari	F	M	Pool	WNV pP/pT	USUV pP/pT	Dirofilaria repens pP/pT	Dirofilaria immitis pP/pT	Comuni positivi
<i>Aedes albopictus</i>	44	38	6	19	0/19	0/19	0/19	0/19	-
<i>Aedes</i> spp.	3	0	3	0	0/0	0/0	0/0	0/0	-
<i>Anopheles maculipennis</i> s.l.	22	20	2	13	0/13	0/13	2/13	0/13	Grottole
<i>Anopheles plumbeus</i>	4	4	0	2	0/2	0/2	0/2	0/2	-
<i>Anopheles superpictus</i>	1	1	0	1	0/1	0/1	0/1	0/1	-
<i>Anopheles</i> spp.	3	3	0	3	0/3	0/3	0/3	0/3	-
<i>Coquillettidia richiardii</i>	1	1	0	1	0/1	0/1	0/1	0/1	-
<i>Culex</i> spp.	24	10	14	7	0/7	0/7	1/7	0/7	Otranto
<i>Culex pipiens</i> s.l.	227	205	22	59	0/59	0/59	3/59	0/59	Monopoli Grottole Miglionico
<i>Culex theileri</i>	5	5	0	1	0/1	0/1	0/1	0/1	-
<i>Culiseta annulata</i>	15	15	0	9	0/9	0/9	1/9	0/9	Grottole
<i>Culiseta longiareolata</i>	16	16	0	13	0/13	0/13	1/13	0/13	Miglionico
<i>Culiseta</i> spp.	1	1	0	1	0/1	0/1	0/1	0/1	-
<i>Ochlerotatus caspius</i>	101	96	5	23	0/23	0/23	1/23	1/23	Grottole Manfredonia
<i>Ochlerotatus communis</i>	2	2	0	2	0/2	0/2	0/2	0/2	-
<i>Ochlerotatus pulcritarsis</i>	1	1	0	1	0/1	0/1	0/1	0/1	-
<i>Ochlerotatus detritus</i>	6	6	0	5	0/5	0/5	0/5	0/5	-
<i>Ochlerotatus</i> spp.	2	2	0	2	0/2	0/2	0/2	1/2	Otranto
Totale	478	426	52	162	0/162	0/162	9/162	2/162	-

(pP = pool positivi; pT= totale pool)

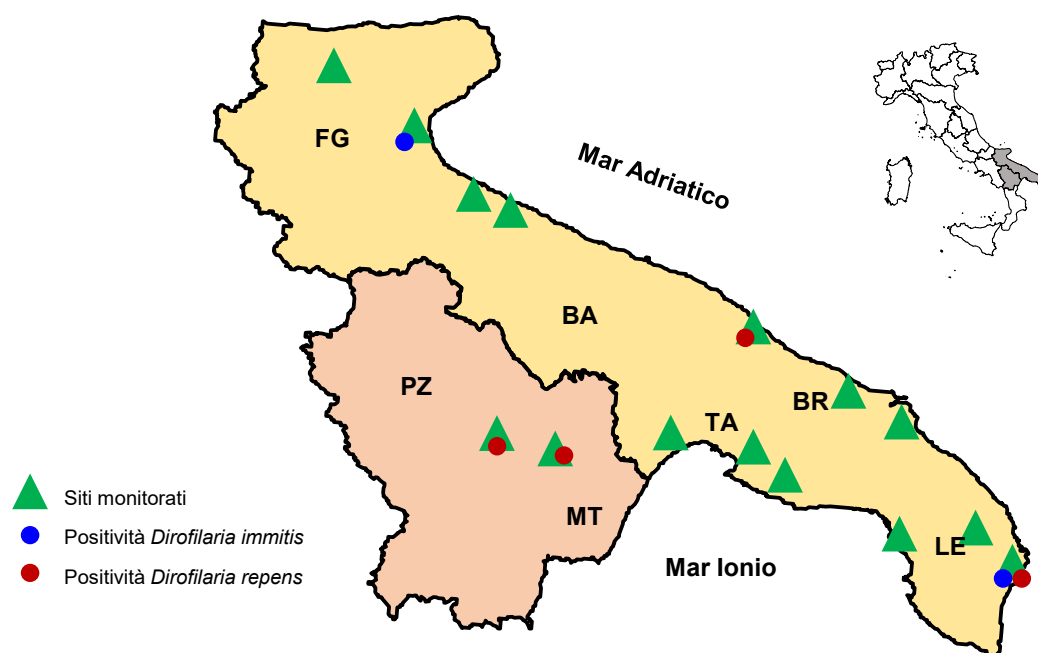


Figura 1. Sorveglianza entomologica WNV-USUV (2020) in Puglia e Basilicata: siti monitorati e positività per *Dirofilaria repens* e *Dirofilaria immitis* rilevate nei culicidi catturati

Discussione

I risultati ottenuti durante tutto il periodo di indagine evidenziano la presenza di una ricca entomofauna culicidica nelle aziende lucane e pugliesi oggetto di studio, a conferma della varietà di biotopi presenti nelle due Regioni. Tra le specie identificate, alcune rivestono o potrebbero rivestire un ruolo vettoriale nei confronti di WNV e USUV, con la possibilità di circolazione di entrambi i virus, anche alla luce delle positività sierologiche riscontrate negli anni dal 2010 al 2018 in volatili e mammiferi, uomo incluso (vedi Tabella 1).

In particolare, *Culex pipiens s.l.*, vettore provato di WNV e USUV risulta la specie prevalente (Tabella 3), al pari di quanto rilevato durante precedenti indagini entomologiche nel decennio 2003-2014 nelle province sottoposte a monitoraggio (Piano Nazionale di Sorveglianza WND). Abbondante risulta anche *Ochlerotatus caspius* (21,12%), specie che ha preferenze per i mammiferi, uomo incluso, ma che, quando la sua popolazione raggiunge livelli consistenti, può nutrirsi anche su volatili (12). Tali specie di culicidi, al pari di quanto da noi riscontrato, sono risultate le più diffuse anche in indagini entomologiche per WND condotte in altre Regioni italiane da altri gruppi di ricerca e positive per entrambi i virus (13, 14).

Aedes albopictus culicide esotico, ma ormai stabilmente presente e diffuso in Italia potrebbe svolgere un ruolo di *bridge vector* nel ciclo WNV, in considerazione della positività al virus riscontrata in *pool* della specie catturati in USA (15) e Turchia (16) e come dimostrato in studi di competenza vettoriale (17, 18). Durante la sorveglianza entomologica, è stato rinvenuto prevalentemente nel periodo estivo-autunnale nelle aziende zootecniche perirurali di Nardò (LE) e Castellaneta Marina (TA), site entrambe in prossimità di lidi balneari sulla costa ionica. L'ambiente intorno a tali aziende risente, pertanto, dell'impatto antropico specialmente durante il periodo estivo,

con presenza di ospiti e breeding sites che permettono alla specie di riprodursi con facilità raggiungendo buone densità sul finire dell'estate. *Aedes albopictus*, come noto, è stata coinvolta nel focolaio autoctono di *chikungunya* nel 2007 in Romagna (19) e nel 2017 nel Lazio e in Calabria (20), ma è anche vettore naturale, insieme a *Cx pipiens*, di *D. repens* in Italia (21). Anche se tutti i pool di *Ae. albopictus* sono risultati negativi ai patogeni oggetto di indagine, positività a *D. repens*, nematode di interesse zoonotico, sono state registrate nel 2012 dal nostro gruppo di ricerca in esemplari catturati nel Porto di Taranto, nel corso di una indagine entomologica condotta nell'ambito del Progetto di Ricerca Corrente RC IZSPB 01/2010. Ulteriori positività sono state rilevate in esemplari della specie nel 2019, catturati nel canile di Manfredonia, FG (22), confermando la circolazione del parassita nel territorio oggetto di indagine, dove il parassita è presente nel cane, suo serbatoio naturale e anche nell'uomo (23, 24), al pari di quanto riscontrato in altri territori del bacino del Mediterraneo (25). Ciò può rappresentare un ulteriore motivo di preoccupazione di salute pubblica nella Regione Puglia, soprattutto in aree urbane, dove la specie, fortemente antropofila, ha colonizzato diverse città e per questo sarebbe auspicabile che la sorveglianza entomologica sistematica venisse estesa anche alle aree urbane, in collaborazione con ASL (Dipartimenti di Prevenzione) e comuni.

Anopheles maculipennis s.l. (4,6%) è registrata come complesso con 7 specie all'interno, indistinguibili morfologicamente e identificabili solo molecularmente; Alcune di queste specie rivestono grande interesse medico in quanto in passato vettori di malaria, in particolare *An. labranchiae* e *An. sacharovi*, quest'ultimo presente soprattutto lungo le coste del Gargano ma da 1959 non più segnalato in Italia; tale complesso di specie, tuttavia, risulta anche essere competente per WNV. Come mostrato in Tabella 5 tutti gli esemplari *An. maculipennis s.l.* identificati appartengono all'unica specie *An. labranchiae* per la quale, per la prima volta, viene registrata la positività a *D. repens*. Di interesse, è il rilevamento di *An. superpictus* (0,2%), seppur con un solo esemplare e anche in simpatria con *An. labranchiae*. Tale ritrovamento, infatti, conferma la sua presenza nella medesima azienda (Grottole, Matera), dove, tuttavia, era risultato più abbondante nel corso di una precedente inchiesta entomologica condotta (ottobre-novembre 2017) con l'Istituto Superiore di Sanità, in occasione dei casi di malaria sospetta autoctona registrati a Ginosa (Taranto) in ottobre 2017 (26). La presenza di questa specie era comunque già stata documentata durante la sorveglianza entomologica per WNV (2011-2014), in allevamenti situati in provincia di Matera (27), dopo oltre 20 anni dall'ultimo ritrovamento riportato da Sabatini e collaboratori (1989) (28).

La rarefazione della sua densità nel sito di campionamento di Grottole rispetto al passato potrebbe riflettere delle modifiche dell'ambiente, tra cui una diminuita disponibilità di ospiti, nel caso specifico i bovini, da noi osservata negli anni di monitoraggio.

Le attività di sorveglianza entomologica WNV-USUV condotte in Puglia e Basilicata nel corso del 2020 hanno risentito fortemente delle restrizioni imposte dal lockdown nazionale per la pandemia da SARS-CoV-2, con difficoltà riscontrate nelle attività di campo e di laboratorio; in aggiunta, il monitoraggio entomologico per la prima volta esteso a tutta la Regione Puglia, ha reso necessario affrontare e risolvere le diverse problematiche gestionali che di volta in volta si sono presentate.

Rispetto a quanto disposto dal Piano di Sorveglianza WNV-USUV, l'attività di trappolamento è partita con ritardo, particolarmente marcato in alcune province (Brindisi, Taranto), dove è stato possibile disporre di veterinari ACN solo dal mese di settembre, come mostrato in Tabella 4; ciò non ha permesso di ottenere risultati omogenei e di valutare l'andamento stagionale dei culicidi catturati. Nel corso dei mesi, tuttavia, è stato possibile svolgere e rodare tutte le attività fondamentali e indispensabili all'attuazione della sorveglianza entomologica (formazione dei Medici Veterinari dell'Accordo collettivo nazionale (ACN), gestione campioni/strumentazione, flusso dati, analisi diagnostiche, ecc.), ponendo le premesse per una più efficace conduzione del Piano negli anni a seguire.

Le specie di culicidi registrate in questo studio, in relazione alla loro biologia, sarebbero capaci di mantenere sia il ciclo epidemico che il ciclo endemico di entrambe le infezioni da WNV e USUV durante tutto l'anno. Per tale motivo, in un territorio dove sono già stati rilevate sieropositività sierologiche per WNV in equidi allevati e volatili sentinella, nonchè casi di malattia nell'uomo appare strategico un piano di sorveglianza integrata nei confronti di tali infezioni.

Bibliografia

1. Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, Lelli R, Murri S, Scicluna MT. West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1372-8. doi: 10.3201/eid0812.020234
2. Romi R, Pontuale G, Ciufolini MG, Fiorentini G, Marchi A, Nicoletti L, Cocchi M, Tamburro A. Potential vectors of West Nile virus following an equine disease outbreak in Italy. *Med Vet Entomol* 2004;18 (1) 14-9.
3. Weissenboch H, Bakonyi T, Rossi G, Mani P, Nowotny N. Usutu virus, Italy 1996. *Emerg Infect Dis* 2013;19(2): 274-7.
4. Severini F, Toma L, Di Luca M, Romi R. Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti (Diptera, Culicidae). *Fragm Entomol* 2009;41:213-372. doi: 10.4081/fe.2009.92
5. Tang Y, Anne Hapip C, Liu B, Fang CT. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *J Clin Virol* 2006;36:177-82. doi: 10.1016/j.jcv.2006.02.008
6. Del Amo J, Sotelo E, Fernández-Pinero J, Gallardo C, Llorente F, Agüero M, Jiménez-Clavero MA. A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2 and Usutu virus. *Journal of Virological Methods* 2013;189:321-7.
7. Cavrini F, Della Pepa ME, Galbani P, Pierro AM, Rossini G, Landini MP, Sambri V. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Virology* 2011;50: 221-3.
8. Silbermayr K, Eigner B, Joachim A, Duscher GG, Seidel B, Allerberger F, Indra A, Hufnagl P, Fuhrer HP. Autochthonous *Dirofilaria repens* in Austria. *Parasites & Vectors* 2014;7:226-35.
9. Raele DA, Pugliese N, Galante D, Latorre LM, Cafiero MA. Development and application of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) approach for the rapid detection of *Dirofilaria repens* from biological samples. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10(6):e0004789 doi:10.1371/journal.pntd.0004789
10. Aonuma H, Yoshimura A, Perera N, Shinzawa N, Bando H, Oshiro S, Nelson B, Fukumoto S, Kanuka H. Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: *Dirofilaria immitis* as a study model *Parasites & Vectors* 2009;2:15. doi:10.1186/1756-3305-2-15.
11. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1994;3(5):294-9.
12. Ballenghien T, Fouque F, Sabatier P, Bicout DJ. Horse, bird and human seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a WNV focus of southern France. *J Med. Entomol* 2006;43(5) 936-46.
13. Mancini G, Montarsi F, Calzolari M, Capelli G, Dottori M, Ravagnan S, Lelli D, Chiari M, Santilli A, Quaglia M, Quaglia M, Federici V, Monaco F, Goffredo M, Savini G. Mosquito species involved in the circulation of West Nile and Usutu viruses in Italy. *Vet Ital* 2017;53:97-110. doi: 10.12834/VetIt.114.933.4764.2

14. Toma L, Cipriani M, Goffredo M, Romi R, Lelli R. First report on entomological field activities for the surveillance of WND in Italy. *Vet Ital* 2008;44(3):499-512.
15. Holick J, Kyle A, Ferraro W, Delaney RR, Iwaseczko M. Discovery of *Aedes albopictus* infected with West Nile virus in southeastern Pennsylvania. *J Am Mosq Control Assoc* 2002;18:131.
16. Akiner MM, Öztürk M, Başer, AB, Günay F, Hacıoğlu S, Brinkmann A, Emanet N, Alten B, Özkul A, Nitsche A, Linton YM, Ergünay K. Arboviral screening of invasive *Aedes* species in northeastern Turkey: West Nile virus circulation and detection of insect-only viruses. *PLoS Negl Trop Dis* 2019;13:e0007334. doi: 10.1371/journal.pntd.0007334
17. Sardelis MR, Turell MJ, O'Guinn ML, Andre RG, Roberts DR. Vector competence of three North American strains of *Aedes albopictus* for West Nile virus. *J Am Mosq Control Assoc*. 2002;18:284-9.
18. Tiawsirisup S, Platt KB, Evans RB, Rowley WA. Susceptibility of *Ochlerotatus trivittatus* (Coq.), *Aedes albopictus* (Skuse), and *Culex pipiens* (L.) to West Nile virus infection. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2004;4:190-7. doi: 10.1089/1530366042162524
19. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 2007;370(9602):1840-6
20. Venturi G, Di Luca M, Fortuna C, Remoli MA, Riccardo F, Severini F, Toma L, Del Manso M, Benedetti E, Amendola A, Fiorentini C, De Liberato C, Giammatei R, Romi R, Pettotti P, Rezza G, Rizzo C. Detection of a *chikungunya* outbreak in Central Italy, August to September 2017. *Euro Surveillance* 22(39):pii=17-00646.
21. Cancrini G, Scaramozzino P, Gabrielli S, Di Paolo M, Toma L, Romi R. *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* implicated as natural vectors of *Dirofilaria repens* in central Italy. *J Med Entomol* 2007;44:1064-6.
22. Raele DA, Latorre L, Vasco I, Abbenante A, Urbano L, Pennuzzi G, Cafiero MA. Rilevamento di *Dirofilaria repens* DNA mediante LAMP in zanzare e cani in un canile della Puglia (Manfredonia, Foggia). In: *Atti della Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria (SIDILV)*; Matera 23-25 ottobre 2019. p. 47-8.
23. Giangaspero A, Marangi M, Latrofa MS, Martinelli D, Traversa D, Otranto D, Genchi C. Evidences of increasing risk of dirofilarioses in southern Italy. *Parasitol Res* 2013;112:1357-61. doi: 10.1007/s00436-012-3206-1.
24. Raele DA, Pugliese N, La Bella G, Calvario A, Scarasciulli M, Vasco I, La Salandra G, Cafiero MA. Molecular detection of *Dirofilaria repens* in an Italian patient after a stay in Tanzania, *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 2021;104(6):2042-5. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1360>
25. Capelli G, Genchi C, Baneth G, Bourdeau P, Brianti E, Cardoso L, Danesi P, Fuehrer HP, Giannelli A, Ionică AM, Maia C, Modrý D, Montarsi F, Krücken J, Papadopoulos E, Petrić D, Pfeffer M, Savić S, Otranto D, Poppert S, Silaghi C. Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasites & Vectors* 2018;11:663.
26. Cafiero MA, Raele DA, Toma L, Boccolini D, Desiante F, Franco E, Salerno P, Latorre L, Cavaliere N, Romi R, Di Luca M. Entomological investigation around four suspected autochthonous malaria cases in Apulia region (Italy). In: *Atti del Congresso European Society for Vector Ecology (E-SOVE)*, Palermo 22-26 ottobre 2018. p. 151.
27. Fares F, Mancini G, Santilli A, Goffredo M, Latorre L, Cafiero MA, Severini F. Ritrovamento di *Anopheles (Cellia) superpictus* in Basilicata. *Biologi Italiani* 2012;2:34-8.
28. Sabatini A, Coluzzi M, Boccolini D. Field studies on inversion polymorphism in *Anopheles (Cellia) superpictus* from southern Italy. *Parassitologia* 1989;22:245-9.

SORVEGLIANZA DEI VETTORI DEI VIRUS WEST NILE E USUTU IN SARDEGNA

Cipriano Foxi (a), Stefano Cappai (b), Luigi Vento (a), Salvatore Ledda (a), Giuseppe Satta (a)

(a) *Struttura Complessa Sanità animale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", Sassari*

(b) *Centro di Sorveglianza Epidemiologica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", Cagliari*

Il piano di sorveglianza entomologica è un programma di controllo mirato a rilevare precocemente la circolazione dei virus West Nile (*West Nile Virus*, WNV) e Usutu (*Usutu Virus*, USUV) nel territorio nazionale. Predisposto con specifiche disposizioni nazionali e regionali, viene svolto con lo scopo di identificare le specie di zanzare responsabili della trasmissione di WNV e USUV e di individuare in esse la eventuale presenza dei virus così da rilevare il periodo maggiormente a rischio per la trasmissione vettoriale. Tale attività è coordinata a livello regionale dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna (IZSSA) in collaborazione con i Servizi Veterinari dell'Azienda Tutela Salute Regionale e con le Province. L'IZS è anche responsabile dell'attività diagnostica di laboratorio e, tramite l'Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regionale (OEVR), della raccolta ed elaborazione dei dati epidemiologici.

Area monitorata

Attualmente la Sardegna ricade nell'area ad Alto Rischio (AR) di trasmissione dove WNV e USUV stanno circolando o hanno circolato nei 5 anni precedenti e dove si sono ripetutamente osservati episodi di infezione. Nell'area AR, la sorveglianza entomologica prevede la disposizione di una trappola specifica per la cattura di zanzare in ciascuna unità geografica di riferimento, suddividendo il territorio in aree regolari di dimensioni non superiori ai 20 km di lato ed escludendo i territori al di sopra dei 600 metri s.l.m.

Metodologia

Per il monitoraggio sono state utilizzate trappole del tipo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) *light trap*, innescate con CO₂ che permettono la cattura di culicidi adulti appartenenti a specie crepuscolari e notturne, in particolare di *Culex pipiens*, principale vettore della *West Nile Disease* (WND) in Europa.

La scelta dei siti in cui posizionare le trappole, all'interno di ciascuna area, è stata impostata prendendo in considerazione alcuni parametri ambientali, ecologici ed epidemiologici. In particolare sono stati considerati:

- a. presenza di ampie raccolte d'acqua stagnante favorevoli allo sviluppo degli stadi preimmaginali delle zanzare, come stagni, lagune, risaie, etc;
- b. presenza di uccelli e in particolare uccelli migratori che frequentano aree umide;
- c. presenza di allevamenti di equidi;
- d. altimetria;

- e. circolazione virale in equidi, uccelli e umani negli anni precedenti. Le catture sono state eseguite con cadenza quindicinale da aprile ad ottobre mentre negli altri mesi è stata effettuata una cattura al mese.

Risultati

Nel 2018 il monitoraggio entomologico è stato effettuato in 36 località impiegando 38 trappole (Figura 1). Sono stati eseguiti 665 campionamenti che hanno portato alla cattura di 13.128 zanzare (Tabella 1).

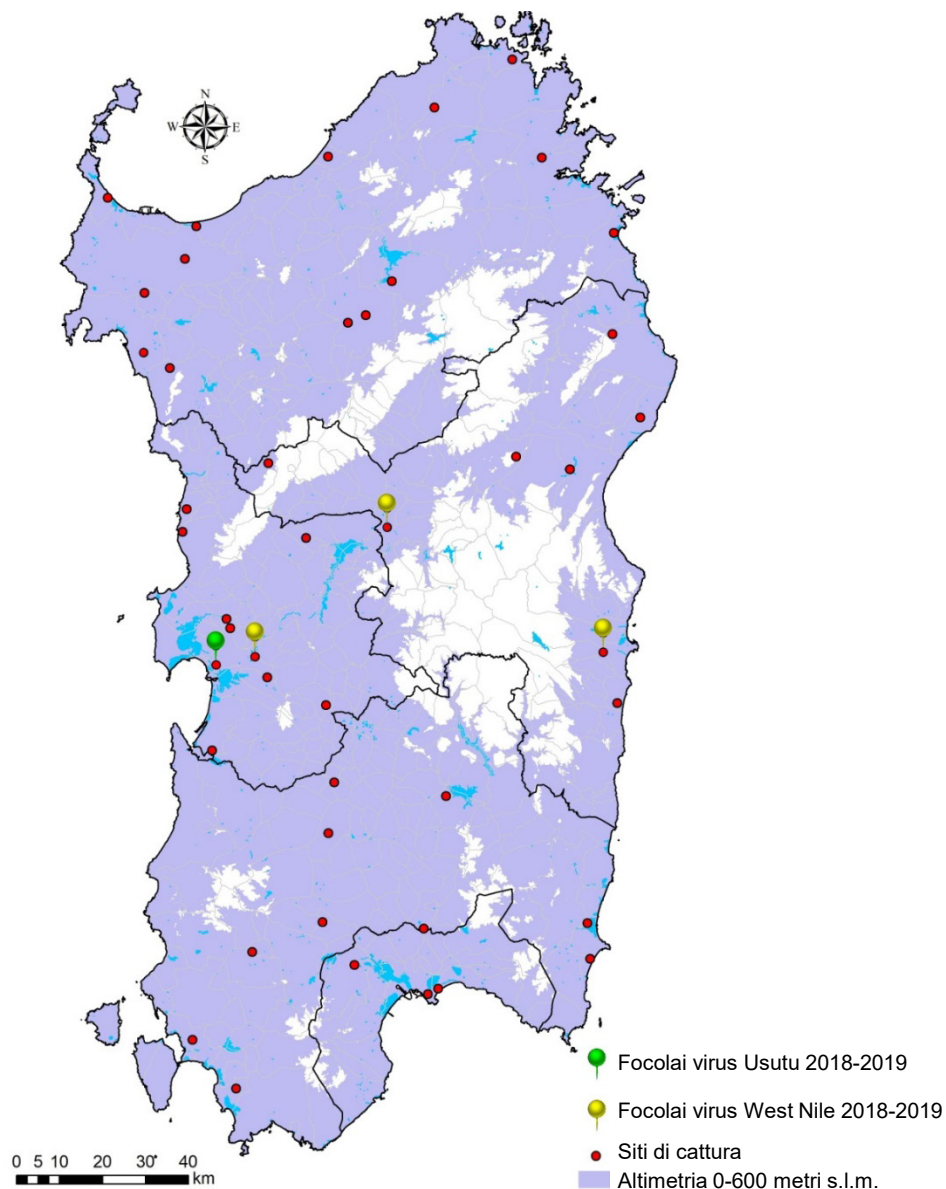


Figura 1. Mappa della Sardegna con la localizzazione dei siti di cattura e delle positività per WNV e USUV (2018-2019)

Tabella 1. Culicidi catturati in Sardegna nel 2018 e 2019 nell'ambito della sorveglianza entomologica per i virus West Nile e Usutu

Specie	2018			2019		
	M	F	Totale	M	F	Totale
<i>Aedes albopictus</i>	85	304	389	78	156	234
<i>Aedes</i> spp.	2	81	83	7	68	75
<i>Aedes vexans</i>	0	192	192	0	8	8
<i>Anopheles algeriensis</i>	0	93	93	1	15	16
<i>Anopheles labranchiae</i> s.l.	3	200	203	1	56	57
<i>Anopheles</i> spp.	0	3	3	0	6	6
<i>Coquillettidia buxtoni</i>	0	1	1	0	7	7
<i>Coquillettidia richiardii</i>	0	1	1	0	0	0
<i>Culex hortensis</i>	2	7	9	10	21	31
<i>Culex mimeticus</i>	0	1	1	0	0	0
<i>Culex pipiens</i>	214	3818	4032	230	1034	1264
<i>Culex</i> spp.	12	78	90	24	47	71
<i>Culex theileri</i>	13	988	1001	0	62	62
<i>Culiseta annulata</i>	39	1019	1058	6	160	166
<i>Culiseta longiareolata</i>	50	95	145	39	36	75
<i>Culiseta</i> spp.	1	10	11	1	11	12
<i>Culiseta subochrea</i>	0	9	9	0	2	2
<i>Ochlerotatus berlandi</i>	0	2	2	0	0	0
<i>Ochlerotatus caspius</i>	64	4683	4747	12	442	454
<i>Ochlerotatus detritus</i>	35	984	1019	2	116	118
<i>Ochlerotatus mariae</i>	0	0	0	0	5	5
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	0	39	39	0	0	0
Totale	520	12608	13128	411	2252	2663

M = Maschi; F = Femmine

Sono state identificate 17 differenti specie di culicidi ma, nonostante la varietà, circa il 90% appartenevano a sole 5 specie: *Ochlerotatus caspius* (35%), *Culex pipiens* (31%), *Culiseta annulata* (8%), *Ochlerotatus detritus* (8%) e *Culex theileri* (7%).

Nel 2019 il campionamento entomologico è stato eseguito con 44 trappole dislocate in 42 differenti località (Figura 1). Problemi organizzativi (approvvigionamento e distribuzione) non hanno consentito di rifornire di ghiaccio secco le varie unità responsabili dell'effettuazione delle catture, pertanto sono state utilizzate le CDC trap senza CO₂. Sono state effettuate 606 catture che hanno consentito di catturare 2.663 culicidi per un totale di 14 specie (Tabella 1). Le più abbondanti sono risultate *Cx. pipiens* (47%) e *Oc. caspius* (17%).

Nella Figura 2 è riportata la dinamica stagionale delle due specie più numerose.

Si possono osservare picchi di abbondanza nel corso dell'anno, specifici per ciascuna specie, variati nei due anni. *Culex pipiens* è stata catturata durante tutto l'anno, con popolazioni che sono aumentate a partire dal mese di aprile raggiungendo un massimo a giugno nel 2018 e a luglio nel 2019. *Ochlerotatus caspius* non è stata catturata nei primi mesi dell'anno (gennaio e febbraio) e ha presentato due picchi di popolazione nei mesi di luglio e settembre nel 2018 e agosto e novembre nel 2019.

Tutte le zanzare catturate sono state trasportate in laboratorio per l'identificazione morfologica e successivamente sono state raggruppate in *pool* contenenti massimo 25 esemplari della stessa specie e della stessa data e località di cattura, quindi inviate al laboratorio di Virologia per la ricerca dei virus. Nel 2018 sono stati analizzati 1.803 *pool* e 3 sono risultati positivi per WNV (Tabella 2).

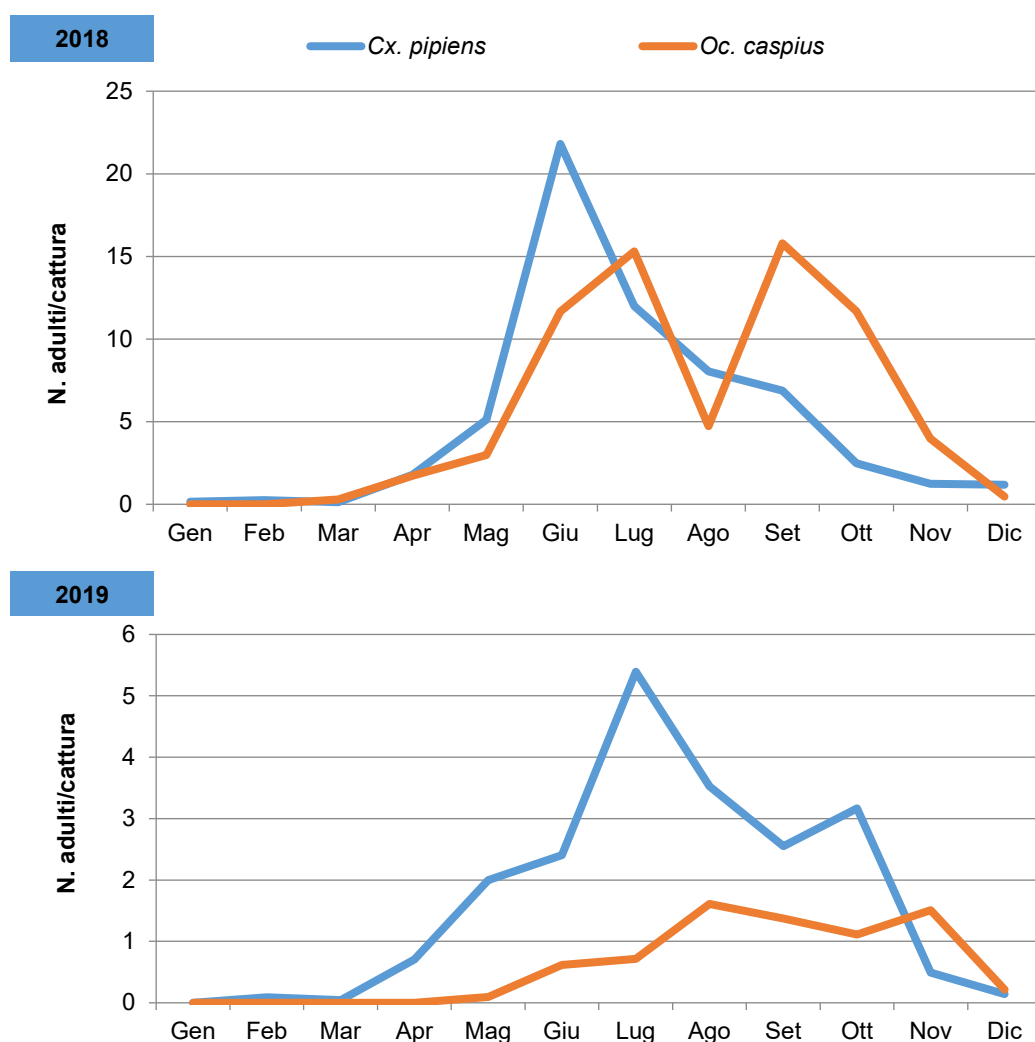


Figura 2. Andamento stagionale delle popolazioni di *Culex pipiens* e *Ochlerotatus caspius* in Sardegna nel 2018 e 2019

Tabella 2. Numero di *pool* analizzati e *pool* positivi per i virus West Nile (WNV) e Usutu (USUV) nelle province della Sardegna nel biennio 2018-2019

Provincia	2018			2019		
	N. pool analizzati	N. pool positivi WNV	N. pool positivi USUV	N. pool analizzati	N. pool positivi WNV	N. pool positivi USUV
Cagliari Città metropolitana	80	0	0	24	0	0
Sud Sardegna (SU)	498	0	0	119	0	0
Oristano (OR)	396	1	1	136	0	0
Nuoro (NU)	428	2	0	109	0	0
Sassari (SS)	401	0	0	337	0	0
Totale	1803	3	1	725	0	0

I *pool* positivi erano tutti costituiti da femmine di *Culex pipiens* catturate a Solarussa (OR) il 7 agosto, a Ottana (NU) il 21 agosto e a Girasole (NU) il 20 settembre. Nel 2019 sono stati analizzati 725 *pool* e non è stata rilevata nessuna positività per WNV (Tabella 2). USUV è stato rilevato solo nel 2018 in un *pool* costituito da femmine di *Culex pipiens* catturate ad Oristano (OR) il 25 settembre (Tabella 2).

La sorveglianza entomologica per WNV e USUV, condotta in Sardegna nel biennio 2018-2019, ha consentito di rilevare la presenza di 18 differenti specie di zanzare su 67 segnalate in Italia (1). L'isola si conferma un'area ad ampia variabilità di specie considerando anche che il monitoraggio è stato condotto esclusivamente con trappole luminose attivate con CO₂ che funzionavano esclusivamente la notte. Delle 18 specie catturate ben 7 sono state ritrovate naturalmente infette o sono state infettate con successo in laboratorio con i due virus: *Aedes albopictus* (2), *Aedes vexans* (3), *Coquillettidia richiardii* (4), *Culex pipiens* (5), *Culex theileri* (6), *Ochlerotatus caspius* (5) e *Ochlerotatus detritus* (5).

Aedes albopictus è ormai una specie ben stabilizzata nell'isola e la sua presenza è segnalata praticamente tutto l'anno. Questa specie è particolarmente fastidiosa per il suo comportamento aggressivo e inoltre ha mostrato competenza per oltre 20 arbovirus. Nei nostri campionamenti non è stata molto abbondante poiché la tipologia di trappola utilizzata e la scelta dei siti di cattura (ambienti rurali) non si prestano a rilevare una specie diurna e prevalentemente "cittadina" come la zanzara tigre.

Aedes vexans è una specie abbastanza comune nell'Isola ma con popolazioni piuttosto basse. Le femmine pungono aggressivamente l'uomo e presentano una attività diurna e notturna.

Coquillettidia richiardii è piuttosto rara in Italia e in particolare in Sardegna. Le sue femmine si nutrono sia su uccelli che su mammiferi (uomo compreso) e potrebbe pertanto fungere da vettore ponte.

Culex pipiens è risultata la specie più abbondante ed è stata anche l'unica ritrovata positiva a WNV e USUV, confermandosi il principale vettore dei due virus in Italia e in Europa. Questa specie è presente in due forme biologiche morfologicamente identiche: la forma urbana *Cx. pipiens molestus* e la forma rurale, *Cx. pipiens pipiens*. La disposizione delle nostre trappole, quasi esclusivamente in siti rurali, lascia presupporre che la maggior parte degli adulti catturati appartenga alla forma rurale prevalentemente ornitofila.

Culex theileri è stata catturata soprattutto nelle aree costiere e in prossimità di stagni e zone paludose. Le femmine hanno attività crepuscolare e spesso pungono l'uomo.

Ochlerotatus caspius è risultata presente in tutta l'isola con popolazioni abbondanti. Questa specie è stata ritrovata naturalmente infetta in Italia per entrambi i virus mentre in Sardegna è stata ritrovata positiva per WNV nel 2017, quando alcune femmine infette furono catturate in Provincia di Oristano in seguito al monitoraggio entomologico effettuato nel domicilio di una persona risultata positiva per WNV (7).

Ochlerotatus detritus è stata catturata su tutto il territorio regionale ma con basse densità. È una specie considerata un potenziale vettore ponte per le sue abitudini alimentari (spiccatamente antropofila) e per le caratteristiche ecologiche molto simili ad *Oc. caspius*.

Durante il nostro monitoraggio non è stata rilevata la presenza di *Culex modestus*, specie già ritrovata infetta in Sardegna nel 2011 (8).

La sorveglianza entomologica effettuata nel biennio 2018-2019 ha consentito di rilevare la presenza dei due virus nell'isola e di mettere in evidenza una ampia popolazione di culicidi. In Sardegna la popolazione di zanzare è stata ampiamente studiata negli anni, anche se mancano studi recenti. Infatti, l'ultimo ampio studio sull'intero territorio regionale risale ad oltre 30 anni (9).

Le catture effettuate durante il campionamento entomologico hanno permesso quindi di verificare la diffusione, la distribuzione e l'abbondanza delle specie segnalate e di fornire utili

indicazioni sulla presenza di potenziali vettori dei due virus. Soprattutto nel primo anno le catture sono state abbondanti e questo maggior numero di zanzare campionate è sicuramente imputabile alla maggiore azione di attrazione della CO₂ che invece non è stata utilizzata nel 2019.

Il monitoraggio entomologico è sicuramente un aspetto importante del più ampio piano di sorveglianza per le arbovirosi che va ad integrarsi con altri sistemi di controllo relativi, ad esempio, alla circolazione dei virus negli animali ospiti e all'emergenza dei casi nell'uomo.

Bibliografia

1. Severini F, Toma L, Di Luca M, Romi R. Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti (Diptera, Culicidae). *Fragmenta Entomologica* 2009;41(2):213-372.
2. Moore, CG, Mitchell CJ. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerging Infectious Diseases* 1997;3(3):329-34. <https://doi.org/10.3201/eid0303.970309>.
3. Turell MJ, O'Guinn ML, Dohm DJ, Jones JW. Vector competence of North American mosquitoes (Diptera-Culicidae) for West Nile virus. *Journal of Medical Entomology* 2001;38:130-4.
4. Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever-a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 1999;5:643-50.
5. Mancini G, Montarsi F, Calzolari M, Capelli G, Dottori M, Ravagnan S, Lelli D, Chiari M, Santilli A, Quaglia M, Federici V, Monaco F, Goffredo M, Savini G. Mosquito species involved in the circulation of West Nile and Usutu viruses in Italy. *Veterinaria Italiana* 2017;53(2):97-110.
6. Jupp PG. The ecology of West Nile virus in South Africa and the occurrence of outbreaks in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001;951:143-52. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02692.x>.
7. Cappai S, Rolesu S, Coccollone MA, Loi F, Meloni G, Foxi C, Satta G, Puggioni G, Campus M, Cappai R, Coghe F. Reoccurrence of West Nile Virus disease in humans and successive entomological investigation in Sardinia, Italy, 2017. *Journal of Animal Science and Research* 2017;2(1). doi.org/10.16966/jasr.108.
8. Monaco F, Goffredo M, Briguglio P, Pinoni C, Polci A, Iannetti S, Marruchella G, Di Francesco G, Di Gennaro AP, Pais M, Teodori L, Bruno R, Catalani M, Rui A, Lelli R, Savini G. The 2011 West Nile disease outbreak in Sardinia region, Italy. *Veterinaria Italiana* 2015;51(1):5-16.
9. Marchi A, Munstermann LE. The mosquitoes of Sardinia: species records 35 years after the malaria eradication campaign. *Medical and Veterinary Entomology* 1987;1:89-96.

SORVEGLIANZA DEI VETTORI DEI VIRUS WEST NILE E USUTU IN SICILIA

Francesco La Russa, Valeria Blanda, Sara Mariolina Villari, Alessandra Torina
Laboratorio di Entomologia e Controllo dei vettori Ambientali, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" Palermo

I virus West Nile (*West Nile Virus*, WNV) e Usutu (*Usutu Virus*, USUV) sono trasmessi dalla puntura di zanzare, in particolare quelle appartenenti al genere *Culex* (vettori competenti) e veicolati ad un elevato numero di uccelli e mammiferi, tra cui l'uomo.

Entrambi i virus appartengono alla famiglia *Flaviviridae*, genere *Flavivirus* e dunque sono accumulati dallo stesso ciclo epidemiologico, il quale è possibile suddividere in:

- *Primario* (ciclo endemico), con trasmissione zanzara-uccello-zanzara, in cui le zanzare ornitofile adulte (vettori) pungendo uccelli viremici (ospiti amplificatori o serbatoio) si infettano a loro volta. Il virus, una volta ingerito, è in grado di diffondersi nell'organismo della zanzara, dove si moltiplica localizzandosi a livello delle ghiandole salivari per poi essere trasmesso ad un altro uccello.
- *Secondario* (ciclo epidemico), in cui le zanzare adulte (vettori ponte) sono capaci di trasmettere il virus ai mammiferi come il cavallo e l'essere umano, (ospiti accidentali).

In Europa il virus è stato isolato da 8 specie di zanzare, tra queste *Coquillettidia richiardii*, *Culex modestus* e *Culex pipiens*, quest'ultima considerata principale vettore di WNV e probabilmente coinvolta nell'epidemia di Cerbaie-Fucecchio.

Le zanzare interrompono la loro attività durante i mesi freddi, riuscendo a sopravvivere grazie alla loro capacità di superare l'inverno in luoghi chiusi, garantendo così la sopravvivenza del virus.

La complessità del ciclo biologico del WNV e dell'USUV, legato a fattori ambientali e alla presenza di vettori competenti e ospiti amplificatori richiede, pertanto, una sorveglianza mirata a rilevare la circolazione virale, rendendo indispensabile l'interazione tra diverse professionalità.

L'integrazione dei sistemi di sorveglianza in diversi ambiti come quello entomologico, veterinario e umano è fondamentale per la stima del rischio.

La sorveglianza entomologica prevede la suddivisione del territorio in aree dove è posizionata almeno una trappola e permette di ottenere dati misurabili e oggettivi sulla popolazione del vettore attraverso la loro sistematica raccolta, archiviazione, analisi e interpretazione, consentendo di valutare l'efficacia delle azioni di lotta e preparare rapide strategie di risposta in caso di necessità, per tali motivi risulta essere di cardinale importanza nel controllo di tali malattie.

Considerato che l'andamento dei virus è legato all'attività delle zanzare, le quali prediligono aree caldo-umide e che la Sicilia denota proprio tali caratteristiche climatiche, risulta opportuno effettuare un monitoraggio della stessa in ambito entomologico.

La Sicilia è la Regione più meridionale ed estesa d'Italia, ha una superficie totale di circa 25.700 km² e grazie alla sua ubicazione al centro del bacino del Mediterraneo è considerata uno dei suoi più importanti hotspot di biodiversità (1-3).

Tale diversità è giustificata da una orografia molto varia e dinamica, caratterizzata dalla presenza di aree collinari che occupano il 61,4% del territorio regionale, aree montuose che occupano il 24,5%, mentre il restante 14,1% è costituito da pianure alluvionali.

L'alternarsi di aree collinari e montuose determina condizioni microclimatiche molto eterogenee, rappresentate da fasce bioclimatiche che vanno da quelle infra-mediterranee delle zone costiere a quelle criomediterranee della sommità dell'Etna.

Anche i termotipi variano notevolmente, dal termomediterraneo, che occupa la fascia altitudinale compresa tra 0-500 metri s.l.m., al mesomediterraneo tra 500-1000 metri s.l.m., nonché il termotipo supramediterraneo oltre i 1000 metri.

La componente idrografica è piuttosto complessa, con reti fluviali a regime prevalentemente torrentizio (4,5), in cui gli unici corsi d'acqua che raggiungono dimensioni rilevanti sono l'Imera Meridionale, il più lungo dell'isola, e il Simeto, con il bacino idrografico più ampio.

I sistemi agricoli coprono il 66% della superficie totale dell'isola e sono maggiormente rappresentati da colture cerealicole.

La densità abitativa è di 187,82 ab./km², con circa 5 milioni di abitanti, risultando la quarta Regione d'Italia (dopo Lombardia, Lazio e Campania).

Per via delle sue caratteristiche è stata inserita nelle attività di sorveglianza dal 2002, anno in cui il Ministero del Lavoro della Salute e delle Politiche Sociali ha istituito il primo Piano di sorveglianza nazionale volto ad individuare precocemente l'eventuale circolazione del virus, dopo il focolaio del 1998, registratosi nella zona umida Padule di Fucecchio (Toscana). Grazie ad esso, nel 2008 è stato possibile identificare la circolazione del WNV appartenente al lineage 1 in uccelli, mammiferi e vettori, a cui ha fatto seguito il lineage 2 (6,7).

La diffusione del virus ha avuto un andamento crescente coinvolgendo sempre più Regioni, da quelle settentrionali a quelle meridionali a dimostrazione della sua endemizzazione.

Il piano di sorveglianza veterinaria nazionale italiana WNV, iniziato nel 2002, comprendeva la sorveglianza entomologica e sierologica in ambito equino e avicolo.

Sul territorio nazionale sono state individuate alcune delle aree che, in base alle caratteristiche ecologiche, sono state ritenute particolarmente idonee per la presenza della *West Nile Disease* (WND).

Per la Regione Sicilia è stata indicata la Riserva di "Stagni costieri di Vendicari" (Siracusa).

Essa è certamente tra le aree italiane di maggiore interesse dal punto di vista ornitologico. La sua posizione geografica, la rende un luogo ideale di sosta, costituendo una sorta di luogo ponte con l'Africa, una via privilegiata per i flussi migratori da e verso il nord Europa nelle stagioni autunnali e primaverili.

In tale area sono stati eseguiti monitoraggi entomologici al fine di evidenziare la densità degli insetti vettori, nonché per determinarne la dinamica di popolazione nel corso dell'anno e individuare i siti di riproduzione larvale delle specie potenzialmente vettrici.

Con Ordinanza del 5 novembre 2008 (*Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 227, 26 novembre 2008), è stato emanato un Piano di sorveglianza straordinario che ha integrato le attività già previste dal DM del 29 novembre 2007. Nel 2009, attraverso il Decreto 15 settembre (pubblicato sulla *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 229 del 2 ottobre 2009), in applicazione del DM 29 novembre 2007, sono state rese esecutive su tutto il territorio nazionale le procedure operative e i flussi informativi nell'ambito del Piano di sorveglianza nazionale per l'encefalomielite di tipo West Nile (WND), con lo scopo di:

- individuare precocemente la circolazione del WNV sul territorio nazionale;
- verificare la circolazione virale nelle popolazioni di equidi presenti sul territorio per poter individuare precocemente il passaggio del virus dagli uccelli ai mammiferi;
- verificare la persistenza e la possibile endemizzazione dell'infezione.

La Sicilia è stata inserita tra le Aree a Rischio (AR) includendo l'Oasi del Simeto (Catania) tra le aree da sottoporre a sorveglianza entomologica. L'Oasi del Simeto è una zona umida, tappa fissa per le rotte di tante specie di uccelli migratori e luogo in cui folaghe, cormorani e aironi trovano condizioni climatiche e ambientali idonee allo svernamento.

La sorveglianza entomologica predisposta dal Piano, in tale area, ha avuto come obiettivo quello di definire la composizione della fauna culicidica dell'area, monitorando un'azienda sentinella, equina o avicola, all'aperto situata in prossimità di zone umide e/o con un'elevata concentrazione di avifauna selvatica. Presso l'azienda prescelta sono state installate:

- 1 trappola di tipo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) *light trap* a CO₂;
- 1 trappola del tipo BG-Sentinel® (*Biogents' mosquito trap*).

Le catture sono state effettuate una volta al mese a partire dalla fine di marzo fino alla fine di ottobre e durante il primo anno di attività sono state effettuate catture larvali con la stessa cadenza delle catture degli adulti.

In Sicilia il primo focolaio di infezione da WNV animale si è verificato nell'agosto 2010: sintomi neurologici sono stati osservati in cinque cavalli a Trapani. Successive indagini, attivate secondo il piano di sorveglianza, hanno confermato 46 focolai nella stessa zona, con sintomi neurologici in sette cavalli (8).

Altri due equidi affetti da disabilità neurologiche sono stati osservati nei pressi di Messina e Palermo nell'ottobre 2011 (dati non pubblicati).

Pertanto, a seguito dell'evoluzione della situazione epidemiologica, nel 2012 oltre ad essere confermata l'Oasi del Simeto quale area AR, sono state individuate (Figura 1):

- Aree a Circolazione Virale (ACV): nei comuni della provincia di Messina, Palermo e Trapani, ovvero quei territori in cui vengono accertati focolai nel corso degli ultimi due anni;
- Aree di Sorveglianza Esterna (AE): nei comuni delle province di Agrigento, Palermo, Trapani e Messina, ovvero quei territori dei comuni che ricadono nel raggio di 20 km rispetto ai casi verificatisi nell'ACV.

L'AR è costituita dal territorio dei comuni insistenti in un'area di studio specifica, che, per caratteristiche orografiche ed ecologiche, risulta favorevole alla diffusione del virus. In particolare è stata confermata una sola AR costituita dal territorio dei comuni della provincia di Catania e di Siracusa.

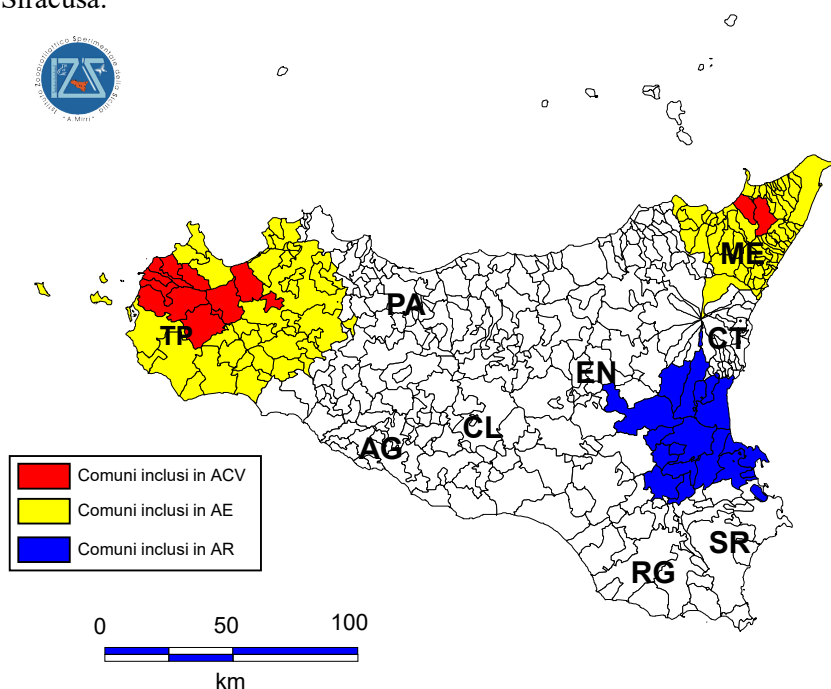


Figura 1. Mappa delle Aree monitorate in Sicilia, in accordo con il Piano di sorveglianza della West Nile Disease 2012

Nell'ambito di tali aree sono state effettuate le seguenti attività:

- a. Sorveglianza sugli equidi sentinella;
- b. Sorveglianza in allevamenti avicoli rurali all'aperto;
- c. Sorveglianza entomologica.

Ai fini di uniformare il monitoraggio, ciascuna area è stata suddivisa in più unità, denominate Unità Geografiche di Riferimento (UGR), con una superficie di circa 1200-1600 km² ed è stato possibile definire il numero di UGR contenuto da ciascuna di esse. Inoltre, l'attività di sorveglianza entomologica, come avvenuto sia in passato che attualmente, è stata effettuata dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) della Sicilia in collaborazione con i servizi veterinari delle Aziende Sanitarie Provinciali interessate. Le catture sono state effettuate con cadenza mensile secondo le indicazioni riportate nella Tabella 1.

Tabella 1. Distribuzione delle Unità Geografiche di Riferimento (UGR) in Sicilia in accordo con il Piano di sorveglianza della West Nile Disease del 2012

Area	Azienda Sanitaria Provinciale (ASP)	N. comuni per provincia	UGR	Periodo di cattura
ACV	ME	2	0,25	Tutto l'anno
	PA	1	0,25	
	TP	9	0,5	
AE	AG	3	0,25	Tutto l'anno
	PA	18	1	
	TP	14	1	
	ME	58	1	
AR	CT	10	1	Da marzo ad ottobre
	SR	6		

In linea generale, la sorveglianza entomologica ha come obiettivo principale, ai fini predittivi, l'individuazione dei vettori, lo studio della loro distribuzione e abbondanza in una data area, con l'intento di prevenire o contrastare la diffusione del WNV e USUV.

Per tali motivi, durante le attività di monitoraggio, sui culicidi catturati è stata effettuata la conta e l'identificazione a livello di specie attraverso l'ausilio delle chiavi morfologiche per ciascuna provincia appartenente alle diverse aree (ACV, AE, AR).

Dai risultati ottenuti si evince che:

- Per l'Area a Circolazione Virale (ACV) (Figura 2), nelle province di Trapani e Messina, la specie maggiormente presente è stata *Culex pipiens*, con il 46,6% e il 54,3% rispettivamente, invece nelle province di Catania e Palermo la sua presenza è stata più bassa, con percentuali pari al 21,2% e 10,2% rispettivamente. Un'ampia presenza di *Aedes albopictus* è stata registrata nella provincia di Messina (25%) seguita dalle province di Trapani (10,2%) e Palermo (3,8%); nessuna *A. albopictus* è stata rinvenuta, invece, a Catania. In tutta l'ACV è stata riscontrata, inoltre, la circolazione della specie *Culiseta longiareolata* con percentuali poco significative. Come può essere osservato dal grafico, risulta elevata la percentuale di zanzare appartenenti al genere *Culex* che non sono state identificate a livello di specie (*Culex* spp.), maggiore nelle province di Palermo e Catania. Infine, è possibile notare la presenza, in quantità ridotte, di culicidi appartenenti a specie ritenute secondarie in ambito di WNV e USUV.

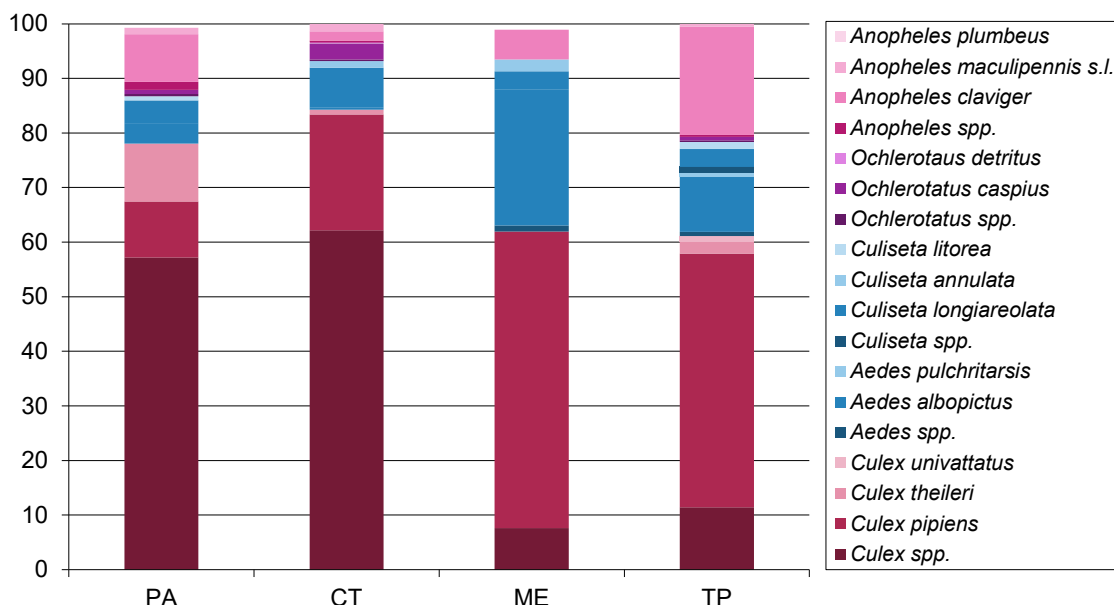


Figura 2. Sorveglianza entomologica delle aree a circolazione virale in Sicilia anni 2010-2014

- Per l'Area di Sorveglianza Esterna (AE) (Figura 3) è possibile osservare che nelle province di Palermo, Agrigento e Trapani la specie maggiormente riscontrata attraverso i sistemi di cattura è stata *Culex pipiens* (con il 50,6% , 38,25% , 50,9% rispettivamente), con percentuali minori nella provincia di Messina, tuttavia *significativa* (18,5%), in contrasto con quanto segnalato nella ACV in cui la sua presenza è stata più abbondante rispetto alle altre specie. *Aedes albopictus* è stata riscontrata in tutta la AE, con una elevata presenza nella provincia di Messina (49,4%) seguita dalla provincia di Trapani (13,9%) e di Palermo (13,5%); bassa, invece, ad Agrigento (7,9%).

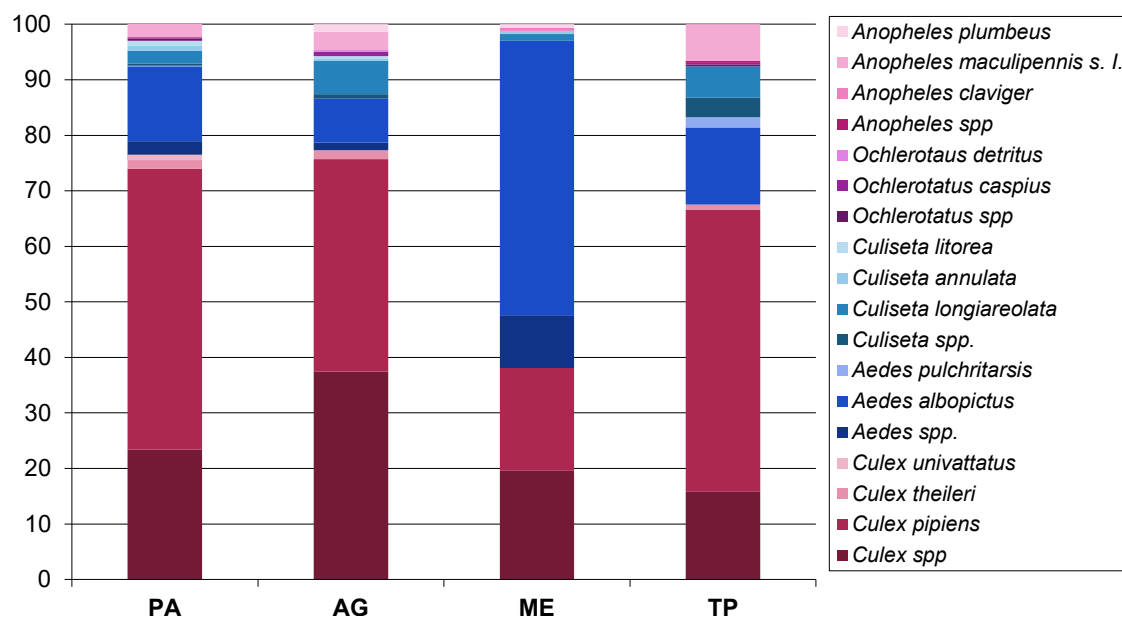


Figura 3. Sorveglianza entomologica nelle aree di sorveglianza esterna in Sicilia anni 2010-2014

Osservando il grafico della Figura 3 emerge che anche in questa Area è stata rinvenuta una consistente percentuale di zanzare appartenenti al genere *Culex* che non sono state identificate a livello di specie (*Culex* spp.), così come è avvenuto per la ACV.

- Per l'Area a Rischio (AR) (Figura 4) dall'osservazione del grafico si denota una presenza massiccia di *Culex pipiens* con il 94%, invece il restante 6% occupato da specie presenti in percentuali molto basse (Tabella 2) di cui solo *Ochlerotatus caspius* appena rilevante (2,7%).

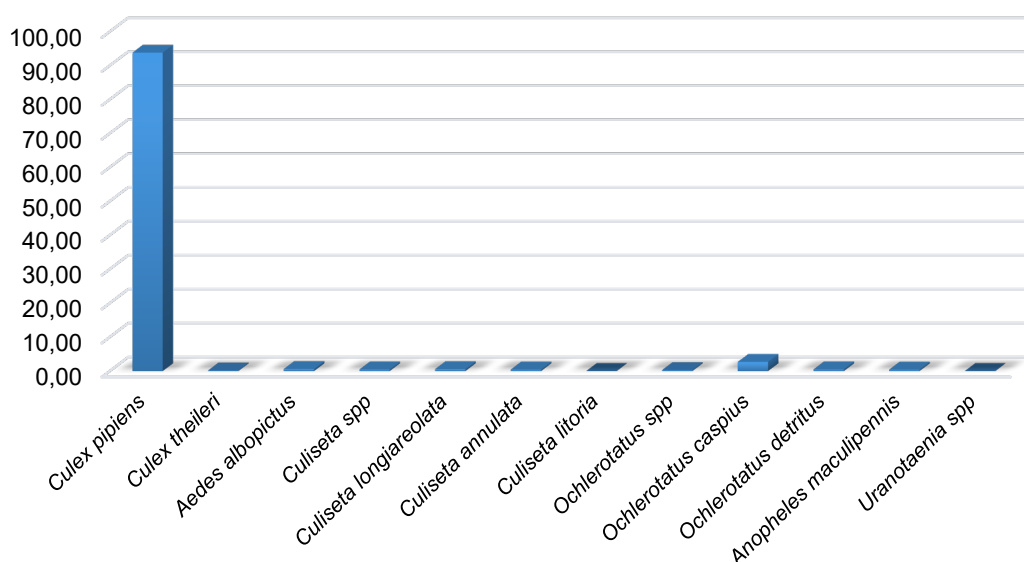


Figura 4. Culicidi catturati nell'Area a Rischio – Oasi del Simeto (CT) (2009-2013)

Tabella 2. Diverse specie (%) di culicidi presenti nell'Area a Rischio – Oasi del Simeto (CT) (2009-2013)

Specie	Esemplari	
	n.	%
<i>Culex pipiens</i>	4688	93,79
<i>Culex theileri</i>	9	0,18
<i>Aedes albopictus</i>	30	0,6
<i>Culiseta</i> spp.	23	0,46
<i>Culiseta longiareolata</i>	28	0,56
<i>Culiseta annulata</i>	22	0,44
<i>Culiseta litoria</i>	2	0,04
<i>Ochlerotatus</i> spp.	14	0,28
<i>Ochlerotatus caspius</i>	135	2,7
<i>Ochlerotatus detritus</i>	24	0,48
<i>Anopheles maculipennis</i>	21	0,42
<i>Uranotaenia</i> spp.	2	0,04
Totale	4998	

Considerato che l'Oasi del Simeto (AR), come descritto precedentemente, è un territorio caratterizzato dalla svariata presenza di uccelli migratori e che in tale area, tra le diverse specie di

zanzare è stata riscontrata proprio *Culex pipiens* in grossa percentuale, si suppone un maggiore rischio riguardo la trasmissione di WNV e USUV, in quanto è stata osservata la contemporanea presenza di vettori e di ospiti amplificatori o serbatoio.

Nel 2016 è stato adottato un approccio multidisciplinare dal Ministero della Salute italiano, con l’emanazione del “Piano Nazionale integrato di sorveglianza e risposta al virus della West Nile – 2016” (Circolare Ministero della Salute del 10/08/2016).

Il piano ha predisposto una sorveglianza medica, veterinaria ed entomologica integrata e ha rappresentato un modello unico in Europa.

Nel mese di settembre dello stesso anno si è assistito al ricovero di un paziente di 38 anni con sintomatologia neurologica riconducibile al WNV. I primi sintomi clinici dell’uomo si sono verificati il 23 agosto dopo aver trascorso le vacanze durante le prime due settimane del mese a Santo Domingo.

Gli esami sierologici hanno confermato la diagnosi.

Essendosi verificata la situazione del livello di rischio definito nel Piano Nazionale come Area di tipo B (Figura 5) quella area in cui è presente il vettore e dove si verifichi un singolo caso umano di WNV e in ottemperanza a quanto riportato nel Piano Nazionale Integrato per WNV del 2016, sono state attivate tempestivamente le procedure relative alla sorveglianza entomologica.



Figura 5. Area di tipo B - superficie avente raggio di 200 m dall’abitazione del caso umano positivo a WNV, Marsala (TP) 2016

Poiché la zona rispecchia la tipologia semi-rurale con pochi siti pubblici disponibili idonei, le trappole sono state collocate ad una distanza maggiore di 200 m (Figura 6), inoltre, sono state monitorate le aree umide limitrofe, oasi di sosta per uccelli migratori, ritenute altamente a rischio per la diffusione del WNV

Al fine di massimizzare l’efficienza della raccolta delle zanzare, sono state utilizzate diverse tipologie di trappole:

- BG-Sentinel innescate con BG-Lure (Figura 7);
- CDC *light trap* (Figura 8);
- *gravid trap* (Figura 9).



Figura 6. Ubicazione delle trappole in siti individuati esternamente all'area di tipo B, Marsala (TP) 2016



Figura 7. BG-Sentinel collocata in Area B, nei pressi dell'abitazione del caso umano positivo al virus West Nile, Marsala (TP) 2016



Figura 8. CDC *light trap* collocata in Area B, nei pressi dell'abitazione del caso umano positivo al virus West Nile, Marsala (TP) 2016



Figura 9. *Gravid trap* collocata in Area B, nei pressi dell'abitazione del caso umano positivo al virus West Nile, Marsala (TP), 2016

Il campionamento è stato effettuato per 25 giorni e ogni trappola ha funzionato sia di giorno che di notte, effettuando ogni giorno la raccolta delle zanzare. Tutti i campioni raccolti sono stati conservati a -80°C.

Complessivamente, sono stati raccolti 2712 culicidi adulti da 160 catture. *Culex pipiens* è stata la specie più rappresentativa (93,3%), seguita da *Aedes albopictus* (5,2%), *Culex hortensis* e *Culiseta longiareolata* (0,6%) e un maschio di *Anopheles maculipennis* s.l.

Le zanzare femmine sono state analizzate per la presenza di WNV. L'analisi ha riguardato 2642 zanzare suddivise in 175 *pool*, per specie, sito e data di raccolta. Ciascun *pool* conteneva *Cx. pipiens* 2488, 16 *Cx. hortensis*, 105 *Ae. albopictus* e 15 *Cs. longiareolata*. Tutti i *pool* di zanzare sono risultati negativi per WNV RNA.

Piano nazionale integrato di prevenzione, sorveglianza e risposta ai virus West Nile e Usutu (2020-2025)

Dal 2020 le attività di sorveglianza nei confronti WNV e USUV sono incluse nel Piano Nazionale prevenzione, sorveglianza e risposta Arbovirosi (PNA) 2020-2025. Il documento integra in un unico Piano le misure di sorveglianza da attuare sul territorio nazionale nei confronti delle arbovirosi autoctone e di importazione, promuovendo un approccio multidisciplinare nella definizione e attuazione delle misure di prevenzione, sorveglianza e controllo. Le modalità di attuazione delle sorveglianze differiscono a seconda della situazione epidemiologica locale riferita ai 5 anni precedenti, oltre che sulla base di informazioni ecologiche e ambientali.

La Sicilia rientra tra le aree ad alto rischio (AR) di trasmissione. Le aree AR sono quelle in cui il WNV sta circolando o ha circolato in almeno uno dei 5 anni precedenti e dove si sono ripetutamente osservati episodi di infezione, nonché le aree limitrofe o subito a ridosso delle stesse. In queste aree è prevista:

- a. la sorveglianza su uccelli stanziali appartenenti a specie bersaglio;
- b. la sorveglianza entomologica;
- c. la sorveglianza dei casi di sintomatologia nervosa negli equidi (solo WNV);
- d. la sorveglianza su esemplari di uccelli selvatici rinvenuti morti;
- e. la sorveglianza dei casi di malattia neuro-invasiva e/o di infezioni recenti umane.

Sorveglianza entomologica

La rete degli IZS presenti sul territorio nazionale fornisce alle Regioni il contributo tecnico-scientifico per le attività di sorveglianza entomologica.

Nelle aree AR la sorveglianza entomologica va effettuata in ciascuna unità geografica di riferimento suddividendo il territorio in aree regolari, tenendo conto dei limiti altitudinali nelle varie fasce latitudinali e comunque non al di sopra dei 600 metri s.l.m. Tenendo presente che, minore è la dimensione dell'area sorvegliata da una singola trappola, maggiore è la capacità del sistema di rilevare circolazione virale, le Regioni hanno facoltà di scegliere, in base a una specifica valutazione organizzativa, la dimensione dell'area che comunque non deve superare i 20 km di lato o i 400 km². In Sicilia sono state individuate 15 Unità geografiche di riferimento, (Tabella 3); per ogni Unità sono state posizionate 2 trappole, pertanto in tutto il territorio regionale sono state distribuite 30 trappole, del tipo BG-Sentinel, CDC *light trap* e *gravid trap* (Figura 10).

Le catture devono essere effettuate con cadenza quindicinale nel periodo da aprile fino a novembre. Le Regioni e Province Autonome (PA) possono, comunque, adattare tale periodo in base allo specifico andamento climatico e meteorologico locale. La trappola deve essere attiva per almeno una notte (dal crepuscolo alla mattina successiva).

I campioni, accompagnati dalla scheda W05, devono essere inviati all'IZS competente per territorio che provvede ad effettuare l'identificazione degli esemplari catturati e la preparazione di appositi *pool*.

Tabella 3. Distribuzione delle Unità Geografiche di Riferimento (UGR) in Sicilia (PNA 2020-2025)

Provincia	UGR
Agrigento	2
Caltanissetta	1
Catania	2
Enna	1,5
Palermo	3
Messina	2
Ragusa	1
Siracusa	1
Trapani	1,5
Totale	15

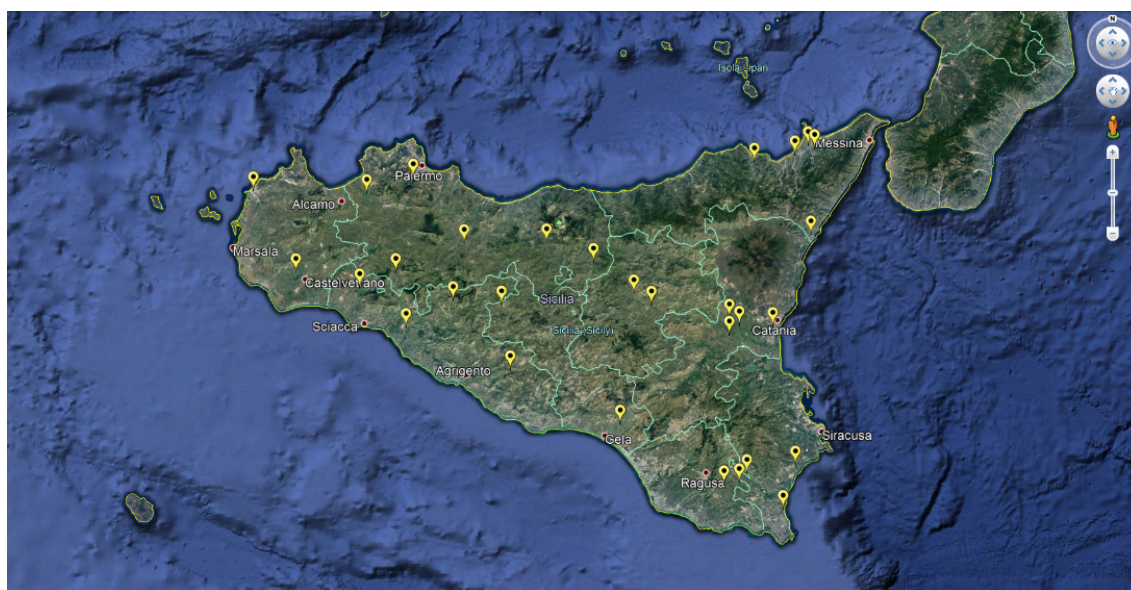


Figura 10. Ubicazione delle 30 trappole distribuite nel territorio regionale come previsto dal PNA 2020-2025

Tenuto conto che, minore è la dimensione dei *pool*, maggiore è la capacità di rilevare circolazione virale, i *pool* devono essere composti da un massimo di 200 esemplari della stessa specie. Su detti campioni devono essere eseguiti i test *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) specifici per WNV e USUV.

In totale sono stati inviati 293 *pool* di zanzare all'Area di Diagnostica Virologica – Laboratorio di Sorveglianza Malattie esotiche e tutti i campioni analizzati hanno dato esito negativo ai test biomolecolari effettuati in *real-time* RT-PCR per la ricerca dei virus WNV e USUV.

Nel corso del 2020 sono stati esaminati 5949 culicidi adulti, di cui 5172 zanzare femmine, in gran parte appartenenti alle specie *Culex pipiens*, *Aedes albopictus* e *Culiseta longiareolata*.

Dai dati presentati, pertanto, in Sicilia *Culex pipiens*, il principale vettore del WNV, si conferma presente in maniera predominante in tutti i siti che sono stati attivati (71,5% delle femmine identificate).

Bibliografia

1. Medail F, Quezel P. Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 1997;84(1):112-27. <https://doi.org/10.2307/2399957>
2. Balletto E, Bonelli S, Cassulo L. Insecta Lepidoptera Papilionoidea. In: Ruffo S, Stoch F (Ed.). *Checklist and Distribution of the Italian Fauna. 10,000 terrestrial and inland water species. 2nd and revised edition*. Verona: Comune di Verona; 2006. (Memorie del Museo Civico di Storia Naturale di Verona - 2. Serie Sezione Scienze della Vita 17). p. 257-61.
3. Balletto E, Cassulo LA, Bonelli S. An annotated checklist of the Italian butterflies and skippers (Papilionoidea, Hesperioidea). *Zootaxa* 2014;1:1-114.
4. Brullo S, Scelsi F, Siracusa G, Spampinato G. Caratteristiche bioclimatiche della Sicilia. *Giornale Botanico Italiano* 1996;130 (1):177-85.
5. Drago A. Atlante climatologico della Sicilia. Seconda edizione. *Rivista Italiana di Agrometeorologia* 2005;(2):67-83.
6. Savini G, Monaco F, Calistri P, Lelli R. Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008. *Euro Surveillance* 2008;13(48):19048.
7. Savini G, Capelli G, Monaco F, Polci A, Russo, F, Di Gennaro A, Marini V, Teodori L, Montarsi F, Pinoni C, Piscicella M, Terregino C, Marangon S, Capua I, Lelli R. Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Veterinary Microbiology* 2012;158(3-4):267-73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.018>
8. Calistri P, Monaco F, Savini G, Guercio A, Purpari G, Vicari D, Cascio S, Lelli R. Further spread of West Nile virus in Italy. *Veterinaria Italiana* 2010;46(4):467-74.

SECONDA SEZIONE
Sorveglianza entomologica
nei sistemi regionali di sorveglianza e risposta
alle arbovirosi trasmesse da zanzare del genere *Aedes*

MONITORAGGIO DELLA ZANZARA TIGRE IN PIEMONTE

Andrea Mosca, Cristina Grieco, Mirko Francesco Perna, Paolo Roberto

Area Tecnica Territorio e Agricoltura, Istituto per le Piante da Legno e l'Ambiente (IPLA) SpA, Torino

Scopo

Come previsto dal Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi 2020-2025, la sorveglianza entomologica delle zanzare del genere *Aedes* ha come obiettivo primario l'acquisizione di una conoscenza adeguata della distribuzione e della densità delle infestazioni da *Aedes albopictus*, in particolare nelle aree a maggior rischio di propagazione di arbovirosi trasmissibili da questa specie. Inoltre, in presenza di casi possibili, probabili o confermati di infezioni trasmissibili da zanzare del genere *Aedes* (per il momento essenzialmente quelle relative ai virus chikungunya, dengue e Zika), la sorveglianza entomologica deve servire come supporto per l'applicazione delle misure di controllo vettoriale e a verificare la specie coinvolta nei casi di circolazione autoctona. Questi ultimi non si sono finora mai verificati in Piemonte e non hanno pertanto richiesto indagini in merito, mentre la sorveglianza nei casi d'importazione e le indagini per la conoscenza delle infestazioni da *Aedes albopictus* sono in atto ormai da diversi anni su tutto il territorio regionale.

Excursus storico

La prima segnalazione di *Aedes albopictus* in Piemonte risale al 1994. Quattro anni dopo fu avviata la prima campagna di sorveglianza entomologica della specie. Questo fu possibile grazie al fatto che pochi anni prima il Consiglio Regionale del Piemonte aveva promulgato una legge con lo specifico intento di favorire le azioni di monitoraggio e lotta alle zanzare. Si trattava della Legge Regionale n. 75 del 24 ottobre 1995 (1), tuttora in vigore, sebbene nel frattempo abbia subito alcune modifiche e integrazioni. Nell'ambito di questa legge, l'Assessorato regionale alla Sanità si avvale della consulenza del Centro Agricoltura e Ambiente (CAA) di Crevalcore e, dal 2006, dell'Istituto per le Piante da Legno e l'Ambiente (IPLA) di Torino, società a controllo regionale. Tra i compiti affidati prima al CAA e poi all'IPLA, vi erano appunto le attività relative alla sorveglianza entomologica, ivi compresa quella sulle zanzare invasive del genere *Aedes*.

Nei primi anni d'indagine, la sorveglianza era finalizzata all'eradicazione di *Ae. albopictus* dai siti infestati o quanto meno a circoscriverla. La sorveglianza si concentrò sui principali siti a rischio d'infestazione, al fine di poter individuare prontamente lo sviluppo di nuove popolazioni e intervenire rapidamente su di esse. Nel contempo, veniva fornita assistenza tecnica e formazione agli operatori delle ASL incaricati dell'attività di campo: dopo aver definito i criteri standard per l'individuazione dei siti a rischio da considerare nella sorveglianza, costituiti prevalentemente da aziende che a vario titolo ricevevano Pneumatici Fuori Uso (PFU), venivano fornite le indicazioni per la corretta gestione della rete di monitoraggio basata sull'uso di ovitrappole standard, una consulenza nella lettura dei supporti di ovideposizione, un addestramento al riconoscimento di larve e adulti di *Ae. albopictus* e un supporto nelle attività di coordinamento con le amministrazioni locali. Veniva quindi verificata la corretta applicazione dei protocolli standard e

delle strategie di sorveglianza adottate dai Servizi di Igiene e Sanità Pubblica (SISP) delle varie Aziende Sanitarie Locali (ASL). Nelle aree infestate, furono inoltre condotte specifiche attività per l'individuazione e la rimozione dei microfocolai di sviluppo larvale e per informare la cittadinanza affinché adottasse i comportamenti corretti per evitare la proliferazione e la propagazione della specie. In caso d'individuazione di un nuovo sito infestato, era inoltre previsto l'ampliamento della sorveglianza in un raggio di circa 200 m, l'indagine sui clienti delle aziende interessate dal fenomeno in modo da allertare le ASL in cui poteva essere introdotto del materiale infestato e l'attivazione di una campagna di lotta mirata su tutti i potenziali focolai presenti nelle aree pubbliche e private della zona, eventualmente con l'emanazione di ordinanze mirate.

Queste attività hanno permesso di rallentare, ma non di fermare l'avanzata della zanzara tigre in Piemonte, che già nel 2006 era presente sul 40% dei comuni monitorati. Di conseguenza, negli anni successivi, la sorveglianza non fu più pensata come attività propedeutica ad un'ormai anacronistico tentativo di eradicazione della specie, quanto piuttosto alla costruzione di un sistema di risposta alle sempre più impellenti e diffuse domande di protezione da parte di quei cittadini che mai prima di allora avevano dovuto far fronte ad un "problema zanzare" così rilevante per l'ambiente urbano. Ci riferiamo in questo caso principalmente al Piemonte occidentale, dove tra l'altro sorge l'area metropolitana torinese e vive oltre metà della popolazione regionale, in quanto nelle città prospicienti la pianura risicola orientale, la zanzara tigre passava quasi inosservata per le continue e massicce invasioni di altre specie di zanzare, provenienti dalle risaie. S'intensificarono così le attività di sorveglianza e risposta sul territorio, coinvolgendo un numero via via crescente di Comuni nelle azioni di lotta e rinforzando gli strumenti informativi al fine di dare ad un più vasto pubblico possibile gli strumenti migliori per contrastare lo sviluppo della zanzara tigre in ambito domestico. Furono così introdotte svariate iniziative divulgative, dai siti dedicati all'argomento, alla cartellonistica, dagli spettacoli teatrali organizzati nelle scuole, alle pagine social, dai video a tema, agli spot radiofonici. Poco tempo dopo e in risposta ai primi casi di arbovirosi trasmesse da zanzare del genere *Aedes* in Europa (epidemia di chikungunya in Emilia-Romagna nel 2007), la Regione Piemonte si dotava di un nuovo strumento, sempre fortemente imperniato sulla LR 75/1995: l'istituzione del Centro di coordinamento per la sorveglianza e prevenzione dell'importazione e diffusione di chikungunya, dengue e altre malattie d'importazione trasmesse da vettore (2), costituito integrando le competenze di IPLA e del Servizio di riferimento Regionale di Epidemiologia per la sorveglianza, la prevenzione e il controllo delle Malattie Infettive (SeREMI). Sotto quest'egida, nel novembre 2010 fu per la prima volta messo in atto il protocollo operativo regionale d'intervento finalizzato a prevenire la diffusione di arbovirus in occasione della segnalazione relativa a un caso d'importazione di dengue. Entrava così in gioco un nuovo obiettivo per la sorveglianza entomologica e da allora, per ogni caso di arbovirosi trasmissibile da zanzare del genere *Aedes* segnalato in Piemonte, gli entomologi IPLA sono scesi in campo per definire le aree d'intervento, determinando se (con indagine entomologica), dove (zonazione) e quando (andamenti stagionali) è presente il vettore, programmando gli interventi (larvicidi e adulticidi) e le azioni d'informazione ai cittadini (porta a porta e informative su tutto il territorio comunale). Il tutto in costante collegamento con il SISP dell'ASL di competenza, il SeREMI e il Comune in cui veniva segnalato il caso.

Nel 2012, le attività di sorveglianza e risposta alle arbovirosi trasmesse da zanzare del genere *Aedes* in Piemonte furono accorpate a quelle analoghe rivolte ai virus West Nile e Usutu, alla prevenzione dell'introduzione e diffusione di nuove specie invasive e ad altre attività di sorveglianza ai vettori, in un unico piano, chiamato "Progetto regionale unitario d'informazione e monitoraggio della diffusione dei vettori di patologie umane e animali veicolate da zanzare" (3).

Dal 2015, considerando l'aumento dei casi di malattie trasmesse da vettori e che i medici e i pediatri, per il loro ruolo peculiare nel Servizio Sanitario Nazionale, potrebbero esser chiamati a fronteggiare e farsi carico della diagnosi precoce e della co-gestione con lo specialista di tali

malattie, sono stati attivati dei corsi di formazione a distanza (FAD) per aumentare la sensibilità dei Medici sulle malattie trasmesse da insetti vettori, in modo da ridurne la sottostima e fornire loro gli strumenti per individuare e gestire casi sospetti di pazienti affetti da tali malattie e attuare le azioni necessarie per l'invio dei pazienti ai centri di secondo livello. Considerando che nella prevenzione delle malattie trasmesse da vettore, la comunicazione del rischio, la formazione e l'informazione rivestono un ruolo determinante per la salute pubblica, nel 2017, si è deciso di estendere la partecipazione al corso anche ad altri professionisti sanitari (infermieri, farmacisti, medici del pronto soccorso, guardia medica, continuità assistenziale, biologi e veterinari).

Tale progetto, dal 2020 recepisce e attua anche le attività previste dal Piano Nazionale Arbovirus 2020-2025.

Nei prossimi paragrafi saranno descritti i risultati più significativi raggiunti tramite le azioni di sorveglianza entomologica alle arbovirus trasmesse da zanzare del genere *Aedes* in Piemonte.

Diffusione della zanzara tigre in Piemonte

Come visto in precedenza, il primo obiettivo della sorveglianza entomologica su *Ae. albopictus* è quello di definire il suo areale di diffusione. Tale obiettivo è stato raggiunto attraverso campagne annuali di sorveglianza che, a partire dal 1998, hanno permesso di definire le aree in cui la specie era via via presente.

Come si può osservare dalle carte mostrate in Figura 1 (limitate, per questioni di spazio, a soli sei anni degli ultimi ventidue, l'ultimo dei quali mostra il risultato cumulativo di tutte le annate precedenti), la sorveglianza ha evidenziato l'inesorabile avanzamento dell'infestazione in tutta l'area pianiziale e collinare (gli spazi bianchi in mezzo alle aree infestate riguardano comuni mai monitorati o mai rinvenuti positivi, ma non per questo non ancora infestati).

Per quanto riguarda la parte montana, contrariamente a quanto osservato prima del 2014 (4), *Ae. albopictus* è stata recentemente individuata anche a quote superiori ai 1.000 m s.l.m., sebbene si tratti di popolazioni stagionali, verosimilmente innescate durante il periodo estivo dal trasporto passivo da quote inferiori. Qui, l'infestazione è ben evidente da giugno alla metà di ottobre, sebbene vi siano spesso femmine attive già da marzo e fino a novembre, a seconda delle temperature stagionali. Inoltre, all'interno di alcuni edifici con condizioni particolari, sono state osservate popolazioni isolate e a tutti gli stadi di sviluppo anche in pieno inverno (5).

Soglie di rischio e supporto agli interventi per il controllo di *Aedes albopictus* in caso di circolazione virale

Oltre a permettere di definire la reale diffusione del vettore sul territorio, la sorveglianza entomologica viene utilizzata per stimare la densità delle varie popolazioni locali di *Ae. albopictus*. Ciò è particolarmente importante per stabilire a priori se l'accidentale introduzione di un certo arbovirus in una data zona possa o meno, e con quale probabilità di successo, innescare una trasmissione autoctona dello stesso.

Allo scopo, negli ultimi anni è stato realizzato un piano di sorveglianza basato sull'impiego di ovitrappole standard posizionate in tutti i centri urbani con più di 30.000 abitanti, dove quindi è più probabile che un viaggiatore infetto giunga e possa dare luogo a casi di trasmissione autoctona.

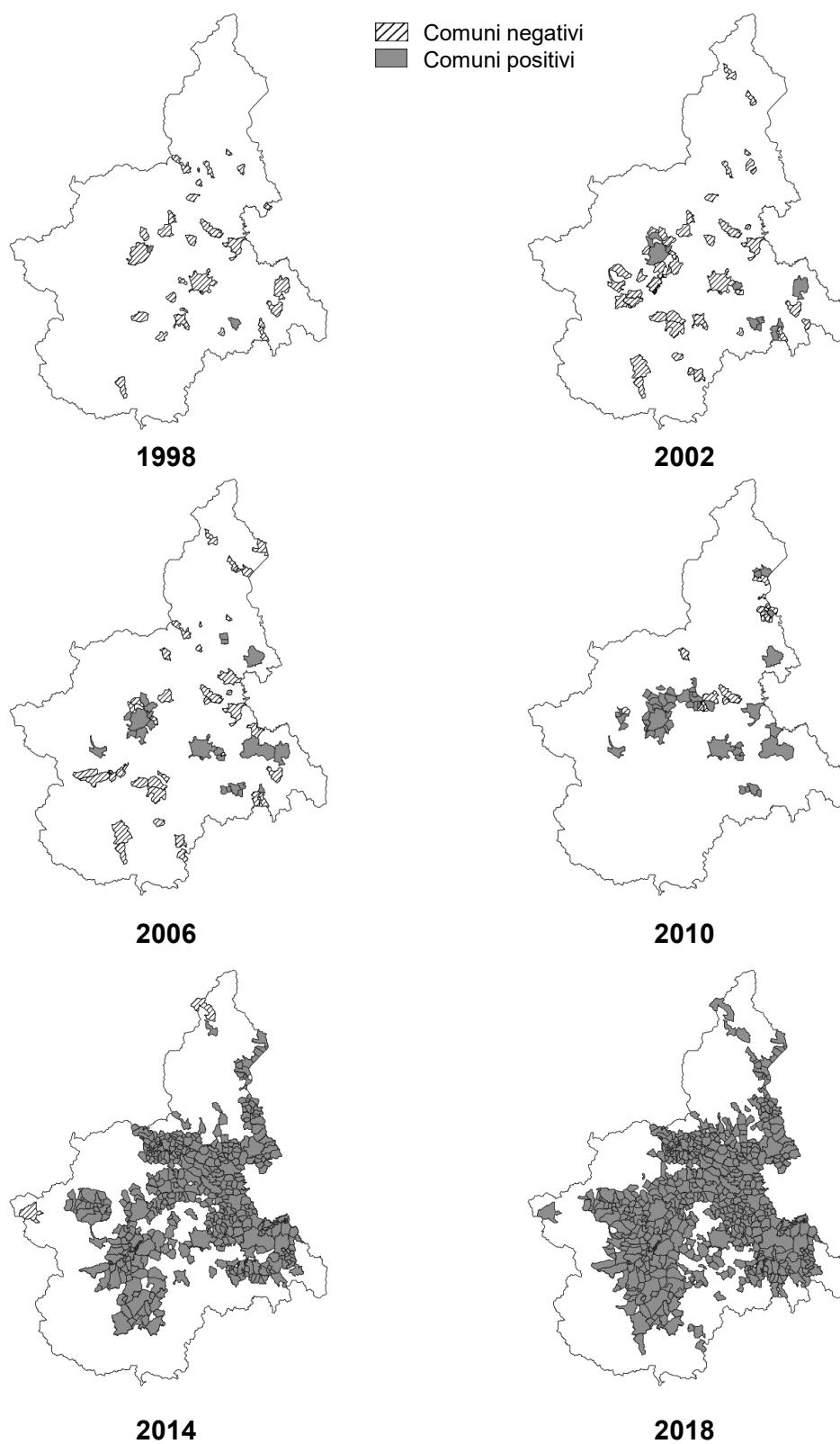


Figura 1. Diffusione di *Aedes albopictus* per comune in Piemonte dal 1998 al 2018

Come dimostrato da Carrieri *et al.* (6), il numero di uova raccolte in un'ovitrappola può essere ricondotto per via matematica alla consistenza complessiva di una popolazione di *Ae. albopictus*, dato di norma stimato attraverso la tecnica dello *Human Landing Collection* (HLC), che però richiede molte più risorse e implica questioni etiche rilevanti. Questo dato, insieme alla temperatura media del periodo e ad una serie di parametri opportunamente scelti o calcolati in base alla specie culicidica (nel nostro caso sempre *Ae. albopictus*) e al virus in questione (CHIK, CHIK con mutazione E1-A226V, DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 o ZIK), come ad esempio durata del ciclo gonotrofico, grado di antropofilia e competenza vettoriale della zanzara, sopravvivenza giornaliera delle femmine, durata del ciclo estrinseco del virus nella zanzara stessa, suscettibilità della specie al virus, durata media della viremia e così via, permette di stabilire il tasso di riproduzione dell'infezione (R_0), definito come il numero atteso di nuovi casi causati da un primo soggetto infetto (caso 0), comparso durante il suo periodo di contagiosità, in una popolazione di soggetti suscettibili. Perché possa innescarsi un'epidemia, il tasso di riproduzione deve essere maggiore di 1. Se invece R_0 è uguale a 1 la malattia potrebbe diventare endemica, mentre se è inferiore all'unità si potranno comunque avere delle infezioni accidentali, ma non si assisterà all'innescarsi di un'epidemia o alla comparsa di un endemismo.

Quando viene segnalato un caso (finora solo d'importazione, ma lo stesso varrebbe per un caso autoctono), è quindi possibile preventivamente stabilire il grado di rischio con cui una data arbovirosi si può diffondere nelle aree in cui il soggetto ha soggiornato nel periodo viremico. Ciò permette di dirigere meglio gli sforzi delle successive operazioni di controllo, concentrandole dove saranno realmente utili a limitare la diffusione dell'infezione.

Citiamo come esempio alcuni casi di arbovirosi trasmissibili da *Ae. albopictus* segnalati nel 2019, in quanto l'ultimo anno utile a disposizione (il 2020, è poco significativo a causa dello scarso numero di viaggi internazionali intrapresi, in conseguenza alla pandemia di COVID-19). Si tratta di una trentina di casi, spesso raggruppati, in quanto più viaggiatori (coppie o gruppi) provenienti dalla medesima destinazione avevano contratto la stessa malattia. Per ciascuno di essi, è stato possibile definire il tasso di riproduzione dell'infezione nelle aree di residenza o comunque di frequentazione dei soggetti nel periodo viremico (nel caso della dengue, non sempre veniva rilevato e/o comunicato il ceppo e pertanto il tasso di riproduzione fa riferimento al ceppo che meglio si è adattato ad essere trasmesso da *Ae. albopictus*, vale a dire il DEN-2).

Come si può osservare in Tabella 1, tutti i casi con esordio dei sintomi avvenuto prima della ventitreesima settimana dell'anno (inizio giugno) e dopo la trentasettesima (metà settembre) sono ricaduti in aree e periodi che avevano un tasso di riproduzione stimato per l'infezione in questione inferiore a 1. In particolare, nei primi tre casi dell'anno (da metà febbraio a fine aprile) il tasso era pari a zero e non hanno pertanto richiesto alcun tipo d'intervento. Al contrario, nella parte centrale della stagione (da inizio luglio a metà settembre), il tasso di riproduzione è risultato maggiore di 1 per tutti i casi presi qui in esame (12 casi di dengue, 4 di chikungunya e 1 di Zika).

Nei centri minori, in seguito alla segnalazione di un caso, può essere invece necessario svolgere un sopralluogo preliminare per stabilire la presenza e l'eventuale consistenza della popolazione vettoriale. Questa, quando presente, è finora sempre risultata essere costituita unicamente da *Ae. albopictus*.

In tutti i casi in cui si decide d'intervenire sulla base dei dati della sorveglianza entomologica e dell'indagine epidemiologica, si passa alla definizione delle zone d'intervento, secondo quanto indicato dal protocollo operativo regionale e nazionale (200 m di raggio da ciascun luogo frequentato dal soggetto infetto in fase viremica) e ad una perimetrazione dell'area, basata su limiti naturali o artificiali di una certa significatività, quali grosse arterie viarie, corsi d'acqua, confini verso l'aperta campagna ecc.

Tabella 1. Principali casi d'importazione di arbovirosi trasmissibili da *Aedes albopictus* registrati in Piemonte nel 2019 e relativo tasso di riproduzione dell'infezione (R_0) fatto registrare nell'area e nel periodo in questione

Settimana	Località	Vettore potenziale	Virus	R_0
8	Torino	<i>Ae. albopictus</i>	DEN-2	0,00
13	Rivoli	<i>Ae. albopictus</i>	DEN-2	0,00
18	San Mauro Torinese	<i>Ae. albopictus</i>	DEN-2	0,00
19	Torino	<i>Ae. albopictus</i>	DEN-2	0,02
19	Rivoli	<i>Ae. albopictus</i>	DEN-2	0,05
23	Torino	<i>Ae. albopictus</i>	DEN-2	0,41
28	Alessandria	<i>Ae. albopictus</i>	CHIK E1-A226V	1,86
32	Beinasco	<i>Ae. albopictus</i>	DEN-2	2,33
35	Torino	<i>Ae. albopictus</i>	DEN-2	2,64
36	Torino	<i>Ae. albopictus</i>	DEN-2	1,59
36	Torino	<i>Ae. albopictus</i>	CHIK E1-A226V	1,76
36	Pianezza	<i>Ae. albopictus</i>	DEN-2	2,04
37	Torino	<i>Ae. albopictus</i>	DEN-2	1,59
37	Torino	<i>Ae. albopictus</i>	ZIK	1,28
37	Torino	<i>Ae. albopictus</i>	CHIK E1-A226V	1,07
39	Alessandria	<i>Ae. albopictus</i>	CHIK E1-A226V	0,59
41	Novara	<i>Ae. albopictus</i>	DEN-2	0,12

in **grassetto** i valori di R_0 superiori a 1, soglia che rappresenta il rischio reale di trasmissione della malattia

Gli interventi, riconducibili alle attività di lotta “porta a porta”, all’informazione ai cittadini, ai trattamenti larvicidi e quelli adulticidi, sono sempre svolti da o almeno in presenza di tecnici con adeguate competenze di entomologia sanitaria. L’efficacia degli interventi viene poi valutata confrontando i dati entomologici raccolti in maniera oggettiva prima e dopo gli interventi stessi.

Siti sensibili

Sempre allo scopo di consentire una più rapida applicazione del protocollo d’intervento per i casi di arbovirosi trasmissibili da *Ae. albopictus*, fin dal 2009 si sono incominciati a censire i cosiddetti “siti sensibili” presenti sul territorio regionale. Si tratta di luoghi in cui *Aedes albopictus* ha notevoli occasioni di sviluppo (siti attivi) o in cui vi è un’elevata concentrazione di individui potenzialmente infettabili (siti passivi), in particolare soggetti fragili (come bambini, anziani o malati). Nella prima categoria rientrano tutti quei luoghi in cui i focolai larvali potenziali sono particolarmente abbondanti e difficili da tener sotto controllo solo con la prevenzione, come ad esempio cimiteri e depositi di PFU. Al secondo gruppo afferiscono ad esempio scuole, ospedali e Residenze Sanitarie Assistenziali (RSA). Ovviamente, se un sito risponde ad entrambi i requisiti, può essere contemporaneamente attivo e passivo.

Per ogni sito sensibile, via via identificato e georeferenziato, viene compilata una scheda che ne riporta indirizzo, nome e recapito telefonico del responsabile da contattare in caso di necessità e tutti i dati relativi ai focolai e alle eventuali problematiche identificate nel corso dei sopralluoghi, che hanno interessato la struttura nel corso degli anni. In questo modo, quando uno o più siti sensibili dovessero ricadere nelle aree da sottoporre ad interventi per limitare la diffusione di un’arbovirosi, si hanno già a disposizione molti dati utili a realizzare le attività necessarie nel più breve tempo possibile. Inoltre, ai responsabili delle strutture identificate come siti sensibili viene consegnata una copia della scheda o una relazione dettagliata che permettono loro d’intervenire

in autonomia e indipendentemente dalla presenza di casi di arbovirosi, contribuendo in questo modo a tener sotto controllo la popolazione vettoriale di base.

Per una gestione rapida e flessibile dei dati, è stato predisposto dall'IPLA, su incarico della Regione Piemonte, un database online (<http://zanzare.ipla.org/>), organizzato in due sezioni: una di libero accesso, ove gli utenti possono ricevere informazioni riguardanti le zanzare e il progetto di lotta, e una riservata. In questa seconda sezione, gli utenti accreditati (tecnici di campo, referenti di progetto, addetti alla programmazione degli interventi emergenziali, supervisori) possono caricare, consultare e scaricare i dati delle schede, operando direttamente online e in base al proprio livello di autorizzazione. Infatti ai tecnici di campo è permesso solo di caricare e consultare i dati dei siti di propria competenza, i referenti di progetto possono consultare e correggere i dati inseriti, mentre agli addetti alla programmazione degli interventi emergenziali e ai supervisori è consentita la consultazione e lo scarico esteso dei dati di tutti i siti.

Dopo l'accesso alla pagina web, regolato da un nome utente e una password diversi per ciascun utente, l'applicazione mostra una maschera che permette di cercare i siti già inseriti in base ai criteri specifici (per comune, tipologia, nome), di esportarli o di crearne uno nuovo (Figura 2).

Figura 2. Pagina iniziale del database della Regione Piemonte per la gestione dei siti sensibili, dove si può scegliere tra la creazione di un nuovo record (pulsante “nuovo sito sensibile”) o la selezione e la possibile esportazione dei record già inseriti, eventualmente filtrati per comune, tipologia e/o nome

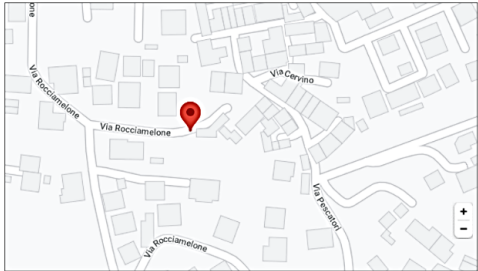
Scegliendo di consultare i dati di un sito sensibile esistente, l'applicazione aprirà la relativa scheda, ovviamente già compilata (con identificativo, tipo, stato attivo e/o passivo, nome, indirizzo, provincia, comune, numero di telefono e nome del responsabile, campo note) accompagnata da una carta interattiva sulla quale appare indicata la posizione del sito.

Se invece si è scelto di creare un nuovo record, apparirà una scheda vuota, analoga alla precedente e una carta che permette di individuare l'ubicazione esatta e di contrassegnarla con un marker (Figura 3).

Dopo aver consultato o creato una nuova scheda, si possono aggiungere i dati relativi ad un nuovo sopralluogo effettuato sul sito in questione o di consultare i dati relativi a tutti i sopralluoghi che lo riguardano e che sono già stati inseriti (Figura 4).

I dati di sopralluogo consistono nella sua data di svolgimento, nello stato in cui versava il sito in quel dato momento (infestato o non infestato), nel grado dell'infestazione rilevato (alto, medio, basso, secondo parametri oggettivi comuni a tutti i tecnici), nelle specie d'interesse sanitario rinvenute (al momento limitate a *Culex pipiens* e a *Ae. albopictus*), nei focolai rilevati (fusti/bidoni, secchi/innaffiattoi, teli impermeabili, tombini/caditoie, vasche/cisterne/cassoni, vasi/sottovasi, materiale abbandonato, recipienti vari, piscinette, altri microfocolai, fossi/scoli, laghetti/stagni, ristagni epigei, ristagni ipogei, altro) e in eventuali note reputate utili dal compilatore (Figura 5).

Nuovo sito sensibile



ID Tipo

Stato ☐ Attivo ☐ Passivo

Nome

Indirizzo

Provincia Comune

Telefono Responsabile

Note

Sopralluoghi

Figura 3. Maschera per la creazione di un nuovo sito sensibile che prevede l'ubicazione geografica sotto forma di *marker*, l'inserimento dei dati identificativi del sito e l'aggiunta di un nuovo sopralluogo. La consultazione di un sito già inserito ha una schermata analoga, con in più attivo il pulsante "consulta elenco sopralluoghi" che consente la visualizzazione dei dati relativi ai sopralluoghi già inseriti

Nuovo sopralluogo

Data Stato sito ☐ Infestato ☐ Non infestato Grado d'infestazione ☐ Alto ☐ Medio ☐ Basso Specie d'interesse sanitario presenti ☐ *Ae. albopictus* ☐ *Cx. pipiens*

Focolai

☐ Copertoni ☐ Fusti/bidoni ☐ Secchi/innaffiatoi ☐ Teli impermeabili
☐ Tombini/caditoie ☐ Vasche/cisterne/cassoni ☐ Vasi/sottovasi ☐ Materiale abbandonato
☐ Recipienti vari ☐ Piscinette ☐ Altri microfocolai ☐ Fossi/scoli
☐ Laghetti/stagni ☐ Ristagni epigei ☐ Ristagni ipogei ☐ Altro:

Note del sopralluogo

Figura 4. Maschera per l'inserimento dei dati di sopralluogo, attivabile cliccando sul pulsante "nuovo sopralluogo", ovvero data, stato del sito (infestato o no), grado d'infestazione rilevato (alto, medio, basso), specie d'interesse sanitario rilevata (*Aedes albopictus* o *Culex pipiens*), focolai rinvenuti ed eventuali note sulle attività di lotta o prevenzione effettuate

Elenco dei sopralluoghi

	9-7-20	11-8-20	15-9-20	8-10-20	Data_05	Data_06	Data_07	Data_08	Data_09	Data_10	Data_11	Data_12
Infestazioni	x	x	x									
Grado	A	B	B									
<i>Cx. pipiens</i>	x											
<i>Ae. albopictus</i>	x	x	x									
Copertoni												
Fusti/bidoni	x		x									
Secchi/innaffiatoi												
Teli impermeabili												
Tombini/caditoie	x	x										
Vasche/cisterne/cassoni												
Vasi/sottovasi	x											
Materiale abbandonato	x											
Recipienti vari	x											
Piscinette												
Altri microfocolai	x											
Fossi/scoli												
Laghetti/stagni												
Ristagni epigei												
Ristagni ipogei												
Altro												
Note del sopralluogo	fatto coprire o eliminare focolai trattato caditoie con acqua [6/9]	trattato caditoie con acqua [7/9]	detto di nuovo di coprire i fusti	nessuna infestazione								

Figura 5. Tabella riassuntiva dei dati di ciascun sopralluogo effettuato nel sito sensibile inquisito, attivabile cliccando sul pulsante "consulta elenco sopralluoghi". Nelle note si vedono le attività svolte durante ciascun sopralluogo (nell'esempio si sono riportati anche il numero di caditoie trattate sul loro numero totale)

Bibliografia

1. Regione Piemonte. Legge Regionale 24 ottobre 1995, n. 75. Contributi agli Enti locali per il finanziamento di interventi di lotta alle zanzare. *Bollettino Ufficiale Regione Piemonte* 31 ottobre 1995, n. 44. Testo coordinato su <http://arianna.consiglioregionale.piemonte.it/base/coord/c1995075.html>
2. Regione Piemonte. Deliberazione Giunta Regionale 19 ottobre 2009, n. 6-12353. Approvazione del Programma regionale unitario di monitoraggio e lotta alla zanzara tigre (*Aedes albopictus*) e istituzione del Centro di Coordinamento per la sorveglianza e prevenzione dell'importazione e diffusione di chikungunya, dengue e altre malattie da importazione trasmesse da vettore. *Bollettino Ufficiale Regione Piemonte* 5 novembre 2009, n. 44
3. Regione Piemonte. Deliberazione Giunta Regionale 29 maggio 2012, n. 42-3932. Approvazione, ai sensi della L.R. 75/95 e s.m.i., del Progetto Regionale Unitario di lotta alle zanzare in risaia, del Progetto Regionale Unitario d'informazione e monitoraggio della diffusione dei vettori di patologie umane e animali veicolati da zanzare e delle iniziative ammissibili a contributo per gli interventi di lotta alle zanzare per le aree urbane - Anno 2012. *Bollettino Ufficiale Regione Piemonte* 21 giugno 2012, n. 25
4. Mosca A, Ferrara AM, Grieco C, Grasso I, Mossi G, Perna M, Roberto P. Diffusione di *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera, Culicidae) in Piemonte e prima segnalazione per la Valle d'Aosta. *Rivista Piemontese di Storia Naturale* 2016; 37:127-36.
5. Dutto M, Mosca A. Preliminary considerations about the presence of *Aedes albopictus* (Skuse 1897) (Diptera: Culicidae) during winter in the Northwestern Italy. *Ann Ig* 2017; 29:86-90
6. Carrieri M, Angelini P, Venturelli C, Maccagnani B, Bellini. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) population size survey in the 2007 chikungunya outbreak area in Italy. II: estimating epidemic threshold. *J Med Entomol* 2012;49(2):388-99.

MONITORAGGIO DELLA ZANZARA TIGRE IN VENETO

Michela Bertola, Alice Michelutti, Fabrizio Montarsi

Laboratorio di Parassitologia, Micologia ed Entomologia Sanitaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

La sorveglianza entomologica in risposta alle arbovirosi trasmesse da zanzare del genere *Aedes* in Veneto è sempre stata condotta seguendo le indicazioni riportate nelle circolari del Ministero della salute per sorveglianza dei casi umani di chikungunya, dengue e Zika, adesso riportate nel Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA) 2020-2025. In base a tali piani la sorveglianza entomologica per le *Aedes* viene attuata in caso di presenza di casi umani importati e/o casi autoctoni di chikungunya, dengue e Zika.

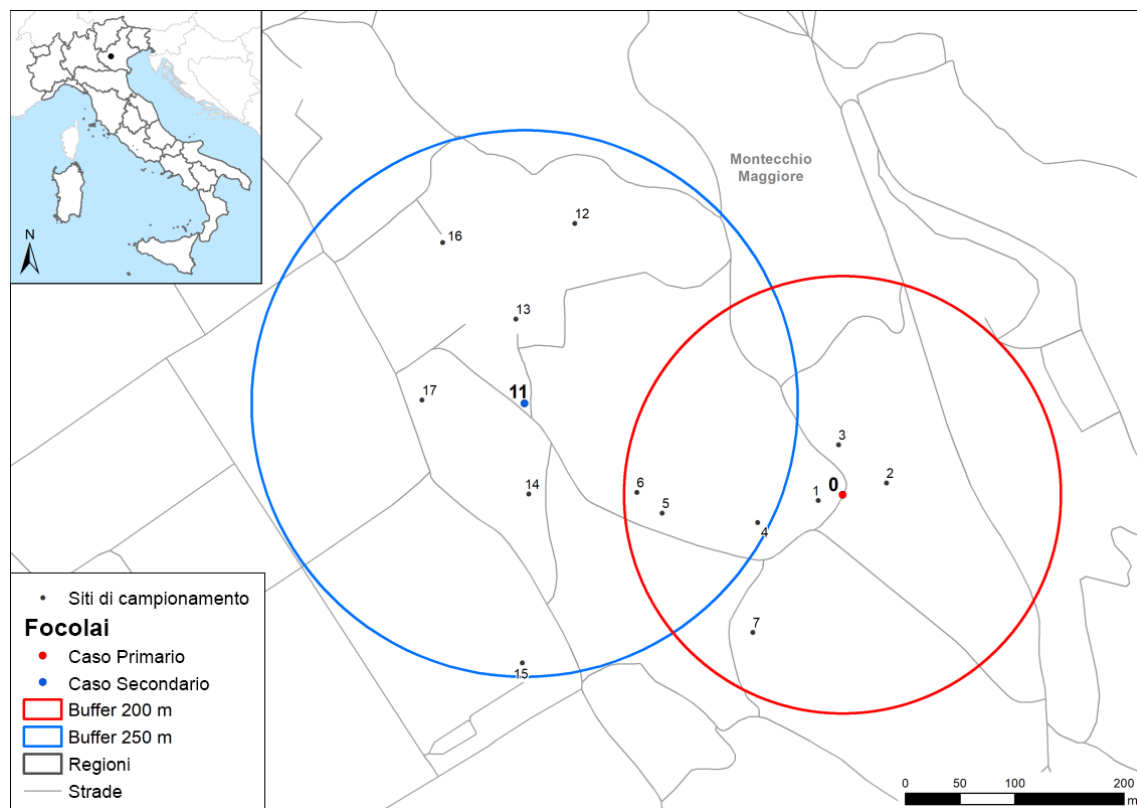
A seguito della segnalazione di un caso umano le Aziende Sanitarie Locali vengono chiamate ad effettuare un sopralluogo nell'area di soggiorno del soggetto. L'indagine prevede la valutazione della presenza di zanzare *Aedes* nel raggio di circa 200 metri dal luogo di residenza del caso indice. Nello specifico, viene valutata la presenza e densità della zanzara tigre (*Aedes albopictus*). L'indagine è di competenza dell'ASL, ma quasi tutte le ASL del Veneto si avvalgono della consulenza di esperti entomologi per fare questo tipo di valutazioni. L'IZSVE svolge un ruolo di supporto scientifico e solitamente non viene coinvolto nel sopralluogo, se non richiesto.

La presenza e densità della zanzara tigre viene valutata principalmente mediante ricerca di larve nei potenziali focolai di sviluppo (caditoie, contenitori artificiali e qualunque oggetto possa contenere acqua), sia in area pubblica che privata, e per la presenza di adulti per osservazione diretta e cattura tramite aspiratore manuale. Se necessario, possono essere utilizzate trappole BG Sentinel® con attrattivo (Lure) o attivate con CO₂ all'interno e in prossimità dell'abitazione del caso umano e negli altri luoghi considerati sensibili, in funzione dal primo mattino al crepuscolo. Il numero di trappole da utilizzare viene valutato in base alle condizioni locali ed epidemiologiche. In caso di presenza di zanzare viene attivata nell'arco di 24 ore una disinfestazione con larvicida e adulticida dell'area. Dopo il ciclo di trattamenti si provvede ad un nuovo sopralluogo per valutare l'efficacia dell'intervento a meno che non esista già un piano di controllo delle zanzare e di valutazione dell'efficacia degli interventi.

A fine agosto 2020 è stato notificato nel comune di Montebelluna (VI) il primo caso autoctono di dengue in Italia (1). Il caso indice era una donna che aveva contratto l'infezione in Indonesia a luglio; tornata in Italia aveva continuato a manifestare sintomi. Data l'emergenza sanitaria Covid-19, la persona è stata sottoposta ad isolamento domiciliare e test molecolare per SARS-CoV-2 risultato poi negativo. In seguito, tutti i familiari (5 persone) hanno cominciato a manifestare gli stessi sintomi (febbre, rash cutaneo, artralgia). Dopo essere stati tutti testati e negativi per SARS-CoV-2, uno dei soggetti si è recato in ospedale; qui è stata effettuata diagnosi di infezione da DENV1 con *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*). Dopo tale segnalazione, anche gli altri soggetti sono stati testati per DENV1 risultando tutti positivi. Le positività sono state notificate al Servizio di Igiene e Sanità Pubblica (SISP) il 26 agosto 2020. Da subito sono state messe in atto le indicazioni previste dal "Piano di Sorveglianza Arbovirosi 2020-2025" e dalle "Linee operative per la sorveglianza delle Arbovirosi nella Regione del Veneto". Il giorno stesso (26 agosto) è stata effettuata la disinfestazione straordinaria di emergenza, ovvero tre cicli di intervento larvicida e adulticida in tutte le aree pubbliche e private comprese nel raggio di 200 m dall'abitazione del caso indice. Inoltre, si è deciso di estendere la disinfestazione a siti sensibili presenti nelle vicinanze e oltre i 200 m

(Ospedale Civile di Montecchio) e nei luoghi frequentati da alcune persone infette prima del periodo di isolamento, ovvero i comuni di Sovizzo (VI) e Rosolina (RO).

Un sopralluogo è stato effettuato il 31 agosto 2020 per valutare la presenza di zanzare del genere *Aedes* e l'efficacia delle azioni di disinfestazione nell'area circoscritta di 200 m di raggio (di seguito nominata come area di sorveglianza I) dal caso indice (di seguito come Sito 0) (Figura 1).



Legenda: l'abitazione del caso indice è il sito 0 (area di sorveglianza I). I siti 8, 9 e 10 risultano fuori dall'area rappresentata nella mappa e corrispondono rispettivamente all'Ospedale, alla Cantina Sociale e all'abitazione a Sovizzo. Il sito 11 è l'abitazione del caso 11 (area di sorveglianza II).

Figura 1. Area di sorveglianza I e II sottoposte a sopralluogo e trattamenti, Comune di Montecchio 2020

Sopralluoghi sono stati condotti anche all'Ospedale di Montecchio Maggiore e alla Cantina Sociale dei Colli Vicentini, dove uno dei soggetti infetti era stato per un'intera giornata. Infine, è stata ispezionata per la ricerca di zanzare anche l'abitazione di parenti frequentata più volte da uno dei soggetti nel comune di Sovizzo (VI). Nel corso del sopralluogo sono state ispezionate tutte le residenze private ricadenti dell'Area di sorveglianza. In ciascuna di esse è stata valutata sia la presenza di zanzare adulte che di focolai larvali attivi (raccolte d'acqua con presenza di larve del genere *Aedes*). In tutte le residenze dell'Area di sorveglianza, nell'Ospedale, Cantina Sociale e abitazione a Sovizzo sono state posizionate ovitrappole e in 9 siti su 11 siti sono state anche posizionate trappole tipo BG-Sentinel® (*Biogents' mosquito trap*) con attrattivo odoroso e anidre carbonica per la cattura di zanzare adulte. Le BG-Sentinel sono state recuperate il giorno successivo (01 settembre), mentre le altre trappole sono state recuperate dopo una settimana (07 settembre). Alcune zanzare adulte sono state catturate tramite aspirazione diretta con aspiratore manuale (Tabella 1).

Tabella 1. Siti, numero di trappole e zanzare catturate nell'area di sorveglianza I nel Comune di Montecchio (2020)

Sito	Focolai larvali	BG-Sentinel	Aspirazione	Ovitrapbola	Altre trappole
0	Assenti	negativa		1	
1	1	2 <i>Ae. albopictus</i>		1	2
2	2	6 <i>Ae. Albopictus</i> 3 <i>Ae. koreicus</i>	1 <i>Ae. albopictus</i>	1	2
3	1			1	2
4	1	1 <i>Ae. Albopictus</i> 1 <i>Ae. koreicus</i>		1	2
5	6	4 <i>Ae. albopictus</i>		1	-
6	1			1	-
7	3	12 <i>Ae. Albopictus</i> 1 <i>Ae. koreicus</i>	1 <i>Ae. albopictus</i>	1	-
8	Assenti	1 <i>Ae. albopictus</i>		1	-
9	>3	24 <i>Ae. albopictus</i>		1	-
Sovizzo	2	nulla		1	-

I focolai larvali riportati si riferiscono a siti di riproduzione con presenza di larve di *Aedes*. Per negativa si considera una cattura con assenza di *Aedes albopictus*; eventuali altre zanzare catturate non sono riportate. I numeri nelle colonne "ovitrappole" e "altre trappole" indicano il numero di trappole utilizzate.

In seguito al rilevamento nella zona di focolai attivi con larve e di adulti di zanzare *Aedes* anche dopo la disinfestazione, il 31 agosto si è reso necessario attivare con carattere di assoluta urgenza un ulteriore intervento.

Un ulteriore caso (caso 11), che si trovava al di fuori dell'area già trattata, è stato confermato in data 09 settembre. Lo stesso giorno è stato effettuato un altro sopralluogo dal personale dell'ASL e dell'IZSVE nella zona di residenza del caso. È stata osservata la presenza di zanzare tigre adulte e di focolai larvali sia nella via di residenza che nelle vicine abitazioni; perciò il giorno successivo si è provveduto a trattare l'area fino a 250 metri dal nucleo familiare del caso 11 (area di sorveglianza II). Anche qui sono state utilizzate ovitrappole e BG-Sentinel per valutare l'efficacia dei trattamenti (posizionamento di 7 BG-S e 7 ovitrappole) (vedi Figura 1 e Tabella 2).

Tabella 2. Siti, numero di trappole e zanzare catturate nell'area di sorveglianza II nel Comune di Montecchio (2020)

Sito	BG-Sentinel	Ovitrapbola
11	12 <i>Ae. albopictus</i>	1
12	6 <i>Ae. albopictus</i>	1
13	5 <i>Ae. albopictus</i>	1
14	9 <i>Ae. albopictus</i>	1
15	47 <i>Ae. albopictus</i>	1
16	141 <i>Ae. albopictus</i>	1
17	negativa	1

Da sottolineare il ritrovamento nell'area di un'altra specie di zanzara invasiva, *Aedes koreicus*, la cui presenza era già nota nella provincia di Vicenza, ma non a Montecchio Maggiore. Dall'indagine epidemiologica è emerso che uno dei casi aveva soggiornato a Pieve di Cadore (BL). Questo comune montano era già oggetto di sorveglianza per le zanzare invasive, per cui era noto che nell'area non era presente *Aedes albopictus*; perciò qui non è stato necessario fare alcun intervento. Gli adulti delle zanzare catturate sono stati analizzati dall'IZSVE e dall'Istituto Superiore di Sanità per la ricerca del virus dengue risultando però tutti negativi.

Ad esclusione della sorveglianza entomologica in risposta alle arbovirosi, il monitoraggio della zanzara tigre nella Regione Veneto viene realizzato nell'ambito di specifici progetti di ricerca o su iniziativa di alcuni enti locali. Alcuni progetti di ricerca condotti negli ultimi anni sono:

- LEXEM (*Laboratory of Excellence for Epidemiology and Modeling*), progetto finanziato dalla Provincia Autonoma di Trento, in collaborazione con altri enti, per monitorare e contrastare la diffusione delle specie invasive;
- messa a punto di saggi ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) per la valutazione dell'esposizione umana a vettori di Arbovirosi (zanzare *Aedes*) (2);
- AedesRisk (Decision support tool for the surveillance and control for dengue, chikungunya and Zika in Europe transmitted by *Aedes albopictus*), progetto dello European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC);
- monitoraggi locali per valutare l'efficacia dei trattamenti contro le zanzare;
- monitoraggi locali per valutare l'andamento stagionale di zanzare invasive del genere *Aedes*.

Nella Tabella 3 vengono riportate le aree/comuni oggetto di monitoraggio e gli anni di attivazione dei progetti sopra citati.

Tabella 3. Comuni monitorati per *Aedes* con uso di trappole in Veneto dal 2013 al 2020

Provincia	Comune	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Belluno	Agordo			Ov	Ov				
Belluno	Alleghe			Ov	Ov		Ov	Ov	Ov
Belluno	Auronzo di Cadore			Ov	Ov	Ov	Ov	Ov	Ov
Belluno	Belluno	Ov	BG; Ov	BG; Ov	BG; Ov	Ov	Ov	Ov; BG	Ov; BG
Belluno	Borgo Val Belluna							BG	BG
Belluno	Calalzo di Cadore			Ov	Ov	Ov	Ov		
Belluno	Canale d'Agordo					Ov			
Belluno	Cencenighe Agordino			Ov	Ov		Ov	Ov	Ov
Belluno	Domegge di Cadore			Ov	Ov	Ov	Ov	Ov	Ov
Belluno	Farra d'Alpago		BG						
Belluno	Feltre		BG; Ov	BG; Ov			Ov	Ov; BG	Ov; BG
Belluno	Forno di Zoldo		Ov	Ov		Ov	Ov		
Belluno	Gosaldo		Ov						
Belluno	Limana	Ov						BG	BG
Belluno	Lozzo di Cadore		Ov	Ov					
Belluno	Perarolo di Cadore					Ov			
Belluno	Pieve d'Alpago	Ov							
Belluno	Pieve di Cadore		Ov	Ov	Ov				
Belluno	Ponte nelle Alpi	Ov			BG				
Belluno	Rivamonte Agordino			Ov	Ov				
Belluno	Santa Giustina		BG; Ov	BG; Ov				BG	BG
Belluno	Sedico							BG	BG
Belluno	Sospirolo		BG; Ov	BG; Ov			Ov		
Belluno	Val di Zoldo							Ov	Ov
Belluno	La Valle Agordina			Ov	Ov	Ov			
Belluno	Valle di Cadore			Ov	Ov				
Belluno	Zoldo Alto		Ov	Ov		Ov	Ov		
Padova	Padova					Ov	Ov		
Rovigo	Occhiobello	Ov	Ov	Ov	Ov	Ov	Ov	Ov	Ov
Venezia	Chioggia						Ov		
Vicenza	Asiago		Ov						
Vicenza	Marostica		Ov	Ov					
Vicenza	Romano d'Ezzelino		Ov	Ov					
Vicenza	San Nazario		Ov	Ov					

Note: trappole impiegate (Ov= ovitrappole, BG= BG-Sentinel). In giallo attività nell'ambito del progetto Lexem, in verde per lo studio di Buezo Montero *et al.*, 2020, in blu per AedesRisk, in arancio per efficacia trattamenti e in grigio per andamento stagionale specie invasive.

Le trappole vengono posizionate in siti particolarmente sensibili (parchi, giardini, scuole e ospedali). La gestione delle trappole è affidata ai tecnici della Prevenzione dell'ASL.

Generalmente le stecchette delle ovitrappole vengono raccolte ogni due settimane. Oltre a contare il numero di uova deposte in ogni sito si procede anche con la schiusa delle stesse per verificare quale specie di *Aedes* circolino in un determinato comune (in molte aree oltre ad *Ae. albopictus* sono presenti altre specie invasive) (Tabella 4).

Tabella 4. Monitoraggio con ovitrappole in alcuni comuni montani del bellunese, 2019-2020

Anno	Comune	Periodo di monitoraggio	Siti n.	Catture n.	Uova n.
2019	Belluno	21 giu-25 ott	20	200	16923
2019	Feltre	19 giu-16 ott	20	200	25989
2019	Alleghe	28 giu-24 sett	3	18	36
2019	Auronzo	17 giu-18 ott	3	30	165
2019	Domegge	17 giu-18 ott	3	30	55
2019	Cencenighe	28 giu-24 sett	3	18	310
2019	Val di Zoldo	24 giu-21 ott	16	128	2391
2020	Belluno	15 mag-16 ott	20	240	17023
2020	Feltre	16 mag-21 ott	20	260	24541
2020	Alleghe	8 mag-21 ott	3	36	91
2020	Auronzo	4 mag-5 ott	3	36	131
2020	Domegge	4 mag-5 ott	3	36	148
2020	Cencenighe	8 mag-12 ott	3	36	540
2020	Val di Zoldo	12 mag-6 ott	16	176	1941

Le BG-Sentinel con attrattivo odoroso funzionano per 24 ore e vengono attivate una volta a settimana. Se c'è la possibilità di collegamento alla rete elettrica, le BG-Sentinel restano attive per un'intera settimana (es. in alcuni comuni del bellunese nel 2019-2020, Tabella 5).

Tabella 5. Monitoraggio con le BG-Sentinel in alcuni comuni del bellunese, 2019-2020

Anno	Comune	Periodo di monitoraggio	Siti n.	Catture n.	Zanzare catturate n.	<i>Ae. albopictus</i> n. (%)	Zanzare/cattura n. medio
2019	Belluno	14 giu- 25 ott	3	57	875	743 (84,9%)	15,4
2019	Feltre	12 giu-16 ott	3	54	2422	2026 (83,7%)	44,9
2019	Borgo Val Belluna	9 lug-1 ott	3	12	601	551 (91,7%)	50,1
2019	Limana	2 lug-24 sett	3	12	519	410 (79,0%)	43,3
2019	Santa Giustina	18 giu-8 ott	3	15	1044	845 (80,9%)	69,6
2020	Belluno	12 ago-23 ott	4	52	558	445 (79,7%)	10,7
2020	Feltre	12 ago-21 ott	2	18	627	349 (55,7%)	34,8
2020	Borgo Val Belluna	2 ott-21 ott	2	2	188	72 (38,3%)	94,0
2020	Limana	1 ottobre	1	1	48	37 (77,1%)	48,0
2020	Santa Giustina	19 ago-28 ott	2	6	314	272 (86,6%)	52,3

Nota: trappole attive ininterrottamente per una settimana (collegamento a rete elettrica)

Bibliografia

1. Lazzarini L, Barzon L, Foglia F, Manfrin V, Pacenti M, Pavan G, Rattu M, Capelli G, Montarsi F, Martini S, Zanella F, Padovan MT, Russo F, Gobbi F. First autochthonous dengue outbreak in Italy, August 2020. *Euro Surveill* 2020;25(36):pii=20-01606.
2. Buezo Montero S, Gabrieli P, Montarsi F, Borean A, Capelli S, De Silvestro G, Forneris F, Pombi M, Breda A, Capelli G, Arcà B. IgG antibody responses to the *Aedes albopictus* 34k2 Salivary Protein as novel candidate marker of human exposure to the Tiger Mosquito. *Front Cell Infect Microbiol* 2020 Jul 29;10:377.

MONITORAGGIO DELLA ZANZARA TIGRE IN EMILIA-ROMAGNA

Marco Carrieri (a), Alessandro Albieri (a), Paola Angelini (b), Claudio Venturelli (c),
Carmela Matrangolo (c), Romeo Bellini (a)

(a) Centro Agricoltura Ambiente “G. Nicoli”, Settore Entomologia e Zoologia Sanitarie, Crevalcore,
Bologna

(b) Servizio Prevenzione collettiva e Sanità pubblica Regione Emilia-Romagna, Bologna

(c) Dipartimento Sanità Pubblica, AUSL della Romagna, Cesena

Aedes albopictus è una specie di origine asiatica introdotta in Italia alla fine degli anni ‘80 e segnalata per la prima volta in Emilia-Romagna a metà degli anni ‘90 del secolo scorso in un deposito di pneumatici usati alla periferia di Bologna. Negli anni successivi questa specie si è diffusa rapidamente in gran parte della Regione e nel 2005 l’Assessorato alle Politiche per la Salute della Regione Emilia-Romagna (RER) attivò un progetto sperimentale di sorveglianza per raccogliere informazioni sulla evoluzione della colonizzazione dell’insetto in Regione, con il coordinamento affidato al Dipartimento di Sanità Pubblica di Cesena (1).

Nell’estate del 2007 un inatteso evento epidemico di chikungunya (il primo in Europa causato dalla zanzara tigre) interessò diverse località della Romagna con oltre 300 casi di malattia; l’evento suscitò un forte allarme nell’opinione pubblica e aumentò la consapevolezza dei rischi sanitari e della necessità di rafforzare l’azione di contrasto a questo vettore. Il Servizio Sanitario della RER nel 2008 elaborò un primo Piano Regionale di sorveglianza e controllo delle Arbovirosi (PRA) dedicandovi risorse economiche per attività di ricerca, di sorveglianza e di supporto tecnico ed economico alle Amministrazioni Locali per le attività di controllo di loro competenza (2).

Nel 2008 la RER costituì un gruppo tecnico regionale allo scopo di guidare e coordinare le attività necessarie per l’attuazione del PRA con un approccio omogeneo sul territorio regionale, di individuare strategie più efficaci di contenimento e di sorveglianza del vettore (3), di condividere le conoscenze acquisite e supportare gli operatori coinvolti nella sorveglianza e nella gestione delle attività di lotta e di contribuire all’informazione e al coinvolgimento dei cittadini nella prevenzione.

Tra le attività previste nel PRA c’era la realizzazione di una rete di monitoraggio regionale che qui presentiamo.

Il monitoraggio della zanzara tigre in Emilia-Romagna si basa soprattutto sull’impiego di ovitrappole che sono ampiamente utilizzate a livello mondiale per il rilevamento delle specie *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Le ovitrappole presentano numerosi vantaggi rispetto ad altri tipi di trappola, quali l’elevata sensibilità (capacità di rilevare la presenza dell’insetto anche a basse densità), la facilità di gestione in campo (non richiedono personale specializzato) e basso costo del materiale (una ovitrappola costa pochi euro).

Le ovitrappole sono costituite da contenitori in plastica di colore nero riempite con una soluzione di acqua e *Bacillus thuringiensis israelensis* (1 mL/litro) per evitare lo sviluppo delle larve e al cui interno viene fissato, con una graffetta, il substrato dove le femmine di *Ae. albopictus* depongono le uova (es. una listella di masonite). Fino al 2009 le ovitrappole impiegate in Emilia-Romagna avevano un volume di 400 mL e i substrati di deposizione venivano sostituiti con cadenza settimanale. Dal 2010 sono state adottate trappole di dimensioni più grandi (volume di 1400 mL) che rendono possibile una manutenzione ogni due settimane con una riduzione significativa dei costi di gestione della rete di monitoraggio.

Le femmine di zanzara tigre non depongono le uova in un unico sito di riproduzione, ma le distribuiscono in diversi contenitori (fenomeno chiamato *skip oviposition*) e il numero di uova deposte dipende dalle caratteristiche fisico-chimiche del contenitore (4). Per raccogliere dati quantitativi confrontabili e avere una stima sufficientemente affidabile della densità di popolazione, è necessario scegliere con cura e con criteri univoci il numero di ovitracce da attivare in ogni area urbana e le caratteristiche ambientali delle stazioni di rilevamento.

Numero di stazioni di monitoraggio

Il numero ottimale di trappole per avere una stima della densità di popolazione attendibile dal punto di vista statistico è funzione della densità e della distribuzione spaziale dell'insetto che a sua volta dipende dalle caratteristiche ambientali, climatiche e dalla fase di colonizzazione del territorio (nella fase iniziale di colonizzazione la distribuzione di *Ae. albopictus* è irregolare e aggregata, a macchia di leopardo, mentre a colonizzazione avvenuta la distribuzione è più omogenea). Per quantificare il grado di aggregazione dei dati di monitoraggio è possibile utilizzare l'equazione di Taylor (5, 6, 7), dalla quale vengono ricavati due parametri "a" e "b" che dipendono dall'aggregazione dei dati, dalla dimensione dell'unità di campionamento e dalle condizioni ambientali. Attraverso questi parametri è possibile dimensionare la rete di rilevamento e definire il numero minimo di trappole dell'unità di campionamento (es. un Comune) per avere una stima con un grado di precisione D. Si considera ottimale un D = 0,1 (8), mentre un D compreso tra 0,2 e 0,3 è considerato sufficiente per il monitoraggio di *Ae. aegypti* da Mogi *et al.* 1990 (9):

$$N = [Z_{\alpha/2} / D]^2 * a * m^{b-2}$$

dove Z è il valore della distribuzione normale standardizzata per una probabilità data (10), D è il grado di precisione, "a" e "b" i coefficienti di Taylor e "m" la media.

Nel 2008 il monitoraggio in Emilia-Romagna è stato attivato nel 64% dei Comuni regionali (la maggior parte dei Comuni di pianura), adottando due coefficienti di precisione: D = 0,2 per i Capoluoghi di Provincia in Romagna dove nel 2007 si erano registrati il maggior numero di casi di chikungunya e D = 0,3 per tutte le aree urbane con una superficie superiore a 600 ettari. Nelle aree con una superficie inferiore a 600 Ha sono state attivate un numero variabile di trappole da 5 a 20 in funzione della disponibilità economica dei Comuni, ma i dati raccolti (non significativi dal punto di vista statistico) sono stati utilizzati solo per una stima a livello provinciale. La rete negli anni è stata estesa fino a raggiungere nel 2013 il 76% dei Comuni della Regione (Tabella 1) (11, 12).

Tabella 1. Quadro storico del monitoraggio di *Aedes albopictus* in Emilia-Romagna

Anno	N. ovitracce	N. Comuni	Periodicità di raccolta (gg)
2008	2744	242	7
2009	2606	245	7
2010	2777	256	14
2011	2783	256	14
2012	2581	253	14
2013	2705	262	14
2014	2646	257	14
2015	2640	256	14
2016	2640	254	14
2017	755	10	14
2018	755	10	14
2019	755	10	14
2020	755	10	14

L'analisi dei dati raccolti col sistema di sorveglianza descritto ha consentito di verificare come la zanzara tigre fosse stabilmente insediata in tutta la Regione, con picchi stagionali da fine luglio a fine agosto e di evidenziare un livello di infestazione molto alto in tutta la pianura, senza differenze significative tra aree provinciali. Si è quindi proceduto a una valutazione del potenziale informativo che il sistema di sorveglianza con ovitrappole può garantire in una logica costo-beneficio, arrivando a una ridefinizione degli obiettivi del monitoraggio con il passaggio da un ritorno informativo su scala regionale a uno focalizzato sui centri abitati più grandi e la verifica, attraverso un periodo di sperimentazione, della possibilità di usare i dati in modo operativo (vedi capitoli successivi).

Dal 2017 si è quindi deciso di mantenere il monitoraggio solo nei 10 Capoluoghi di Provincia, adottando un livello di precisione $D = 2,0-2,5$ e attivando complessivamente 755 ovitrappole.

Scelta delle stazioni di rilevamento e gestione del monitoraggio

Le condizioni micro-ambientali delle stazioni di rilevamento influenzano fortemente l'efficacia delle ovitrappole (13) e devono quindi essere individuate con criteri univoci da tecnici esperti. Per garantire la copertura omogenea del territorio, sulla base di foto satellitari, l'area urbana viene suddivisa in quadranti e in ognuno viene posizionata una ovitrappola scegliendo luoghi sicuri, facilmente accessibili, ombreggiati e rappresentativi dell'ambiente del quadrante. La gestione delle ovitrappole è stata realizzata ogni 7 giorni fino al 2009 e ogni 14 giorni dal 2010, da personale incaricato dai singoli Comuni.

Il periodo stagionale di monitoraggio va da metà maggio circa alla prima settimana di ottobre (settimane da 21 a 40), mentre nel periodo invernale il numero di ovitrappole è ridotto a 110.

I substrati di deposizione raccolti sono inviati per l'analisi e il conteggio alla Rete dei Laboratori Provinciali dell'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale (ARPAE) e, nei primi anni di monitoraggio, anche alle Università di Parma e Ferrara.

A supporto della gestione delle ovitrappole in campo è stata predisposta una istruzione operativa aggiornata annualmente e scaricabile dal sito internet istituzionale (<https://www.zanzaratigreonline.it/it/approfondimenti/documenti-tecnici>).

Validazione dei dati

Dal 2014 è stata introdotta una procedura per la verifica della qualità dei dati raccolti dalla rete di monitoraggio regionale in campo e il conteggio delle uova. L'obiettivo è quello di inserire in archivio solo i dati che hanno superato l'esame di validazione (14).

Il protocollo adottato prevede diversi livelli di validazione.

Il primo livello consiste in un controllo preliminare di tutti i dati di gestione raccolti in campo e viene realizzato dal laboratorio di analisi prima e durante il conteggio uova (ovitrappole secche, rovesciate, manipolate, sparite). I dati validati sono sottoposti ad ulteriori livelli di validazione, mentre i dati non conformi vengono eliminati dal data base (Figura 1).

In caso di non conformità di un numero elevato di dati (superiore al 10%) per più di due turni viene attivata una indagine per verificarne le cause.

Il secondo livello di validazione dei dati avviene attraverso l'impiego di due semplici algoritmi.

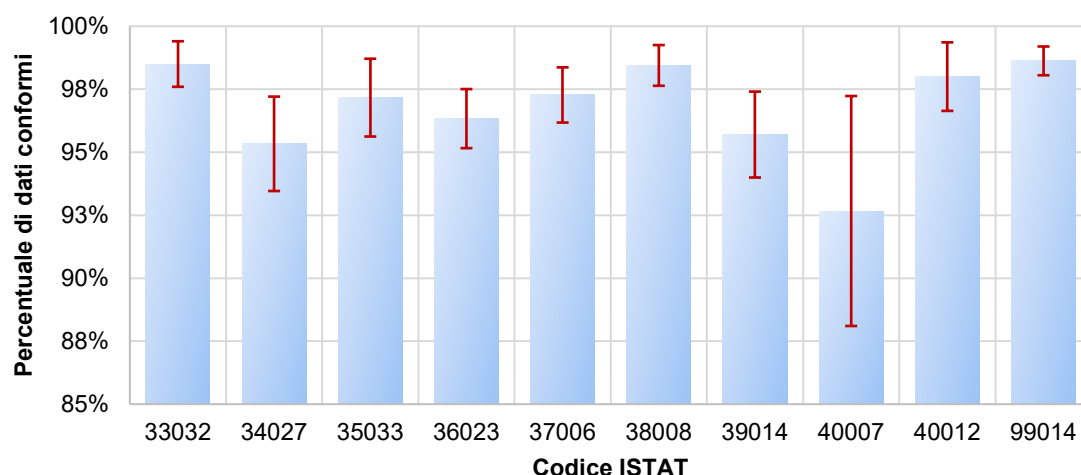


Figura 1. Percentuale di dati conformi al primo step di validazione (controllo preliminare dei dati di gestione in campo) rilevata nel 2020 nei capoluoghi di provincia della Regione Emilia-Romagna. Le barre indicano gli Intervalli di Confidenza al 95% (IC \pm 95%)

Nel periodo compreso tra luglio e settembre la percentuale di ovitracce prive di uova deve essere inferiore al 5%. In questo periodo la popolazione di *Ae. albopictus* raggiunge infatti la massima densità e diffusione sul territorio e le ovitracce senza uova devono essere considerate un evento molto raro. Se il numero di substrati di deposizione negativi è superiore al 5% per due raccolte consecutive, il sistema richiede che i dati vengano sottoposti a ulteriori passaggi di convalida prima di essere inclusi nel database (Figura 2).

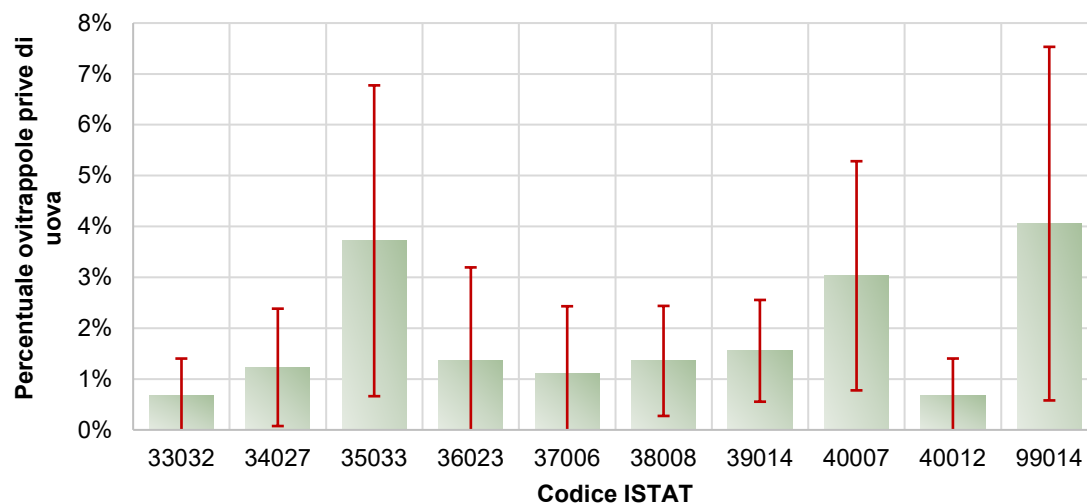


Figura 2. Secondo livello di validazione della qualità di monitoraggio. Percentuale di ovitracce prive di uova rilevata nei capoluoghi di provincia della RER nel 2020 (IC \pm 95%)

Per una data area urbana la variazione relativa del numero medio di uova rispetto alla media storica (AM) è generalmente bassa. L'eventuale scostamento significativo dal valore atteso indica

un cambiamento anomalo della dimensione della popolazione che può essere legato a cambiamenti nelle attività di lotta, ad effetti meteorologici locali o ad una gestione non corretta del monitoraggio. Si considera che il valore AM si possa discostare al massimo del 50% dal rapporto rilevato negli anni precedenti validati, secondo l'equazione:

$$AM = (AM0 - AMt) / AM0$$

$AM0 = Mc0 / Mr0$ dove $Mc0$ è la media storica (media dei dati validati) registrata nel Comune negli anni precedenti e $Mr0$ è la media storica della Regione.

$AMt = Mct / Mrt$ dove Mct è la media dei dati sottoposti a validazione del Comune e Mrt la media regionale.

AM è positivo quando il numero di uova raccolte è inferiore al previsto e viceversa AM è negativo quando il numero di uova è superiore al previsto.

Il valore Mct è ritenuto “non conforme” quando $AM \geq \pm 0,50$ per due turni consecutivi di monitoraggio nel periodo compreso tra luglio e settembre. Nel caso in cui il valore non risulti conforme i dati sono sottoposti al successivo livello di validazione (Figura 3).

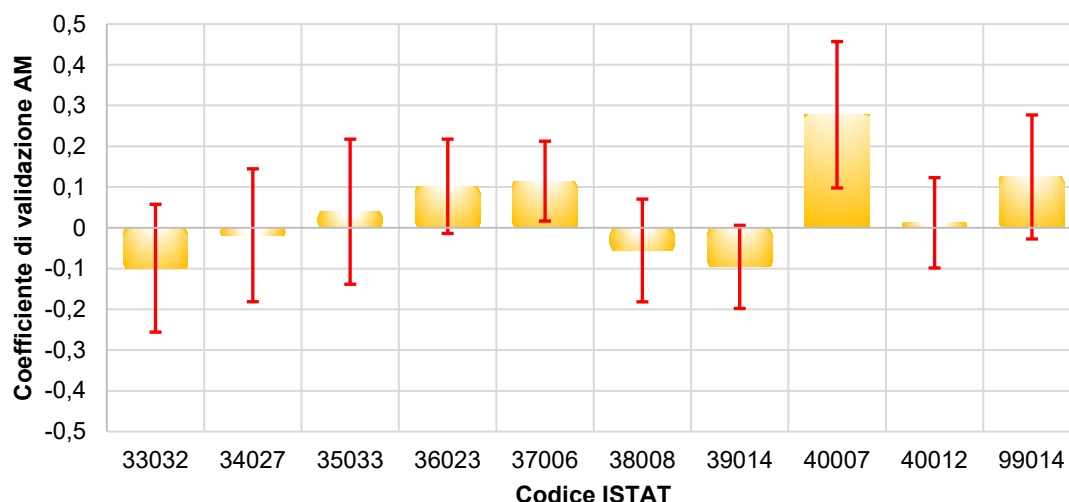


Figura 3. Secondo livello di validazione. Variazione anomala della dimensione della popolazione AM. Esempio di coefficienti AM nel processo di validazione rilevato nei capoluoghi di provincia della RER nel 2020 (IC±95%)

I dati che risultano non conformi al secondo livello vengono sottoposti al terzo livello con quattro passaggi consecutivi di convalida prima di essere inclusi nel database:

- analisi delle condizioni climatiche locali per evidenziare eventuali anomalie che possano aver influenzato il monitoraggio (per esempio prolungati periodi di siccità locale);
- valutazione delle attività di lotta svolte dal Comune. L'incremento delle attività di disinfestazione (per esempio col metodo Porta-a-Porta o il metodo Sterile Insect Technique) potrebbe determinare un calo sensibile della popolazione, così come un blocco delle attività di disinfestazione potrebbe produrre un incremento della popolazione;
- ispezione entomologica in campo per verificare il corretto posizionamento e la corretta gestione delle ovitrappole;
- ri-conteggio delle uova sui substrati di deposizione, il conteggio viene considerato accettabile se si riscontra variabilità inferiore al 10%.

Se vengono riscontrate anomalie nei suddetti controlli i dati vengono considerati non validi ed eliminati dal database. Se non si osservano anomalie i dati vengono ulteriormente valutati con un quarto livello che prevede il campionamento in campo della densità di femmine attraverso catture standardizzate su uomo (*Human Landing Collection*, HLC) e il confronto tra il numero teorico di uova “E” stimato tramite il numero di femmine catturate “F” (HLC) e le uova raccolte in campo attraverso il monitoraggio, utilizzando l’equazione:

$$E = (128,85 * F) - 63,23 \quad (15)$$

Oltre alla validazione dei dati raccolti in campo la rete di laboratori deputata all’analisi dei substrati di deposizione ha sviluppato una procedura di verifica della classificazione e del conteggio delle uova. Sono stati identificati diversi passaggi e sono stati sviluppati protocolli per il controllo di qualità nella formazione continua dei tecnici, controlli giornalieri intra-laboratorio (il doppio conteggio casuale dei substrati) e confronti periodici inter-laboratorio. Infine, nel caso di substrati con molte uova (>1000 uova), per ridurre i tempi di analisi, è stato sviluppato un metodo di conteggio che prevede l’impiego di una griglia trasparente e il conteggio delle uova solo in alcuni quadranti (16).

I dati così validati vengono inseriti nel DB regionale e resi disponibili nel sito <https://www.zanzaratigreonline.it/it/monitoraggio/dati-di-monitoraggio>.

Andamento stagionale storico dei dati di monitoraggio

La schiusura delle uova invernali diapausanti avviene gradualmente da marzo ad aprile e gli adulti della prima generazione compaiono normalmente verso fine aprile - inizio maggio. Nella prima fase di sviluppo stagionale la velocità di accrescimento di *Ae. albopictus* è di tipo esponenziale ($N_{t+1} = N_t e^{rt}$), con un tasso di accrescimento $r=0,21$. A fine luglio - inizio agosto si raggiunge il picco, dopodiché a settembre si assiste ad un lento e progressivo declino della popolazione legato all’andamento climatico, con comparsa delle uova in diapausa embrionale, in seguito alla riduzione del numero di ore di luce (Figura 4).

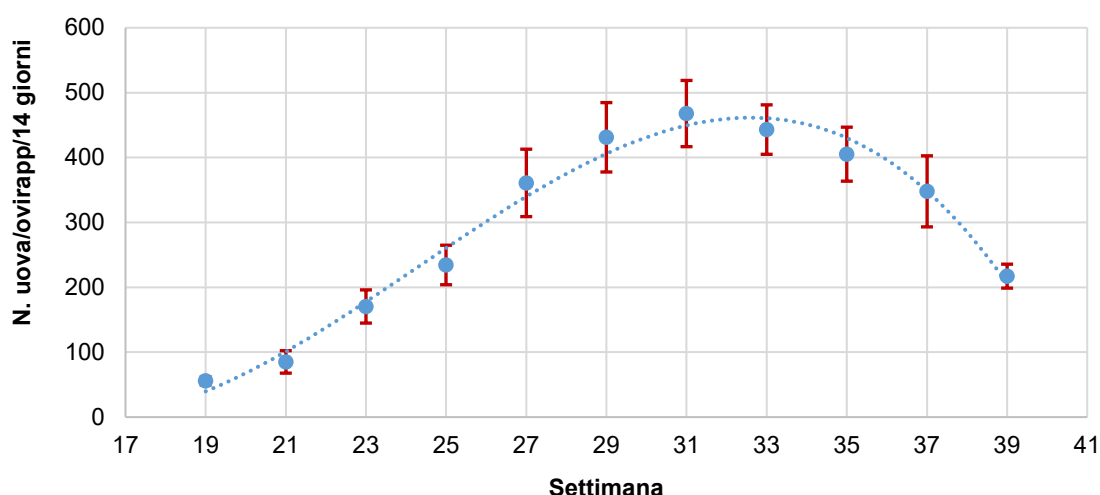


Figura 4. Andamento stagionale del numero medio uova/ovirappola/14 giorni registrato nelle 755 ovirappole attivate dal 2008 al 2020 nella RER (IC±95%)

L'andamento storico del numero medio di uova raccolte nei capoluoghi di provincia viene riportato in Figura 5. La dinamica di popolazione appare abbastanza costante dal 2008 al 2014, con una media stagionale pari a 232,39 uova/ovitrappola/14 gg (IC 95% $\pm 22,77$); negli anni successivi si assiste ad un incremento significativo della popolazione con una media che nel periodo 2015-2020 sale a $422,34 \pm 60,91$ uova/ovitrappola/14 gg. Al momento non sono chiare le cause di questo incremento di popolazione e studi specifici sono in corso.

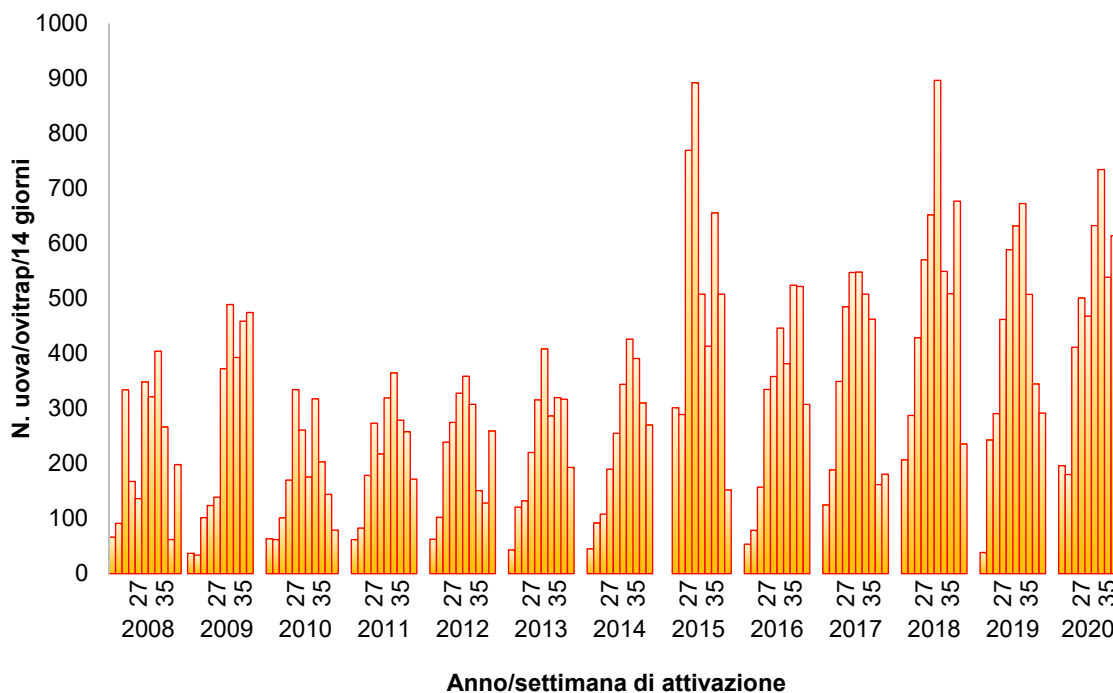


Figura 5. Andamento storico della media di uova raccolte nei capoluoghi di provincia in Emilia-Romagna dal 2008 al 2020

Soglie di rischio epidemico

Uno degli aspetti più interessanti degli studi condotti nell'ambito del Piano Regionale di sorveglianza e controllo delle Arbovirosi (PRA) è stata la definizione delle soglie di rischio in funzione del numero di uova di *Ae. albopictus* raccolte con il sistema regionale di monitoraggio (17).

Le soglie di rischio sono state definite attraverso l'equazione di McDonald (18), che lega i diversi parametri del vettore (capacità vettoriale, tasso di riproduzione, grado di antropofilia, longevità, numero di punture) e del patogeno (livello di viremia, periodo di incubazione nel vettore), per stimare il tasso di crescita della malattia R_0 (numero di casi secondari che si originano dal caso primario in una popolazione suscettibile):

$$R_0 = (SF * X_v * (a \cdot S_m \cdot V \cdot S_v \cdot \pi)) / (-\log_e p)$$

dove:

- SF è il numero di punture/uomo/giorno calcolato in base al numero di uova raccolte
- a corrisponde a h/GC , dove GC è la durata in giorni del ciclo gonotrofico calcolato in base al modello proposto da Vallorani *et al.* (2015) (19) e h è la proporzione di femmine di *Ae. albopictus* che effettua il pasto di sangue sull'uomo (20));
- X_v è un fattore di correzione della capacità vettoriale calcolato da Carrieri *et al.* (2012) (21);
- Sm è la competenza vettoriale di *Ae. albopictus* ai diversi arbovirus. Sono attualmente considerati i seguenti valori: $Sm = 0,24$ per il ceppo non mutato di CHIKV e $Sm = 0,80$ per il ceppo mutato CHIK A226V. Sm varia da 0,08 a 0,43 per i quattro sierotipi di DENV. Per ZIKV abbiamo usato $Sm = 0,21$ ottenuta come media di diversi studi condotti negli ultimi anni (22, 23, 24, 25, 26, 27);
- V è il periodo di viremia nell'uomo che varia da $1/V = 0,17$ per CHIKV, $1/V = 0,25$ per DENV e $1/V = 0,22$ per ZIKV (28);
- S_v è la proporzione di popolazione umana suscettibile all'infezione; si considera $S_v = 1$;
- p è la percentuale di sopravvivenza giornaliera delle femmine di *Ae. albopictus*;
- i è la durata del ciclo estrinseco del virus (EIP) in *Ae. albopictus*. EIP dipende dalla temperatura e per calcolarlo è stata utilizzata l'equazione proposta da Johansson *et al.* (2014) (29).

Alcuni parametri dell'equazione di R_0 sono stati definiti attraverso studi specifici condotti nei nostri ambienti nell'ambito del PRA (SF , P , X_v), mentre altri parametri sono stati ricavati dalla bibliografia. Il numero di punture/uomo è stato calcolato attraverso l'equazione che lega il numero di uova raccolte con le ovitrappele e il numero di punture ricevute in 15 minuti di esposizione nel periodo di massima attività del vettore. L'equazione è stata definita grazie ad uno studio specifico condotto a Bologna nel 2011 in un'area di 11 km² dove sono state attivate da fine maggio ad inizio ottobre 16 ovitrappele distribuite omogeneamente sul territorio e sono state svolte in 16 stazioni fisse 3 sessioni di catture di 15 minuti di femmine pungenti di *Ae. albopictus* (HLC) ogni 14 giorni (15).

Vi sono diversi fattori ambientali, socioeconomici e comportamentali dei cittadini che influenzano l'esposizione alle punture. Per superare queste difficoltà è stato introdotto un fattore di correzione X_v nell'equazione di McDonald, che rappresenta la proporzione di punture realmente infettive. X_v è stato calcolato utilizzando i dati di R_0 e di densità di femmine pungenti (stimato con HLC) raccolti durante l'epidemia del 2007 a Castiglione di Cervia e di Ravenna.

Uno dei parametri più importanti per valutare il rischio epidemico da arbovirus è la sopravvivenza delle femmine vettrici e la determinazione della percentuale di femmine pluripare (che hanno fatto più cicli gonotrofici). Durante la stagione estiva 2011 è stato analizzato lo stato fisiologico delle femmine di *Ae. albopictus* attraverso l'esame microscopico degli ovari e l'osservazione delle tracheole ovariche. Dalla percentuale di femmine pluripare è stato possibile ricavare attraverso la formula di Davidson (1954) (30) la probabilità di sopravvivenza quotidiana "P" delle femmine (31).

In base all'equazione di McDonald è possibile stimare il rischio di trasmissione durante la stagione estiva in funzione della temperatura e del numero di uova raccolte dal monitoraggio regionale (Figura 6).

L'analisi dei dati raccolti dal 2008 al 2020 evidenzia che il rischio di diffusione di arbovirus da parte di *Ae. albopictus* cresce gradualmente durante la stagione estiva a seguito dell'incremento sia della temperatura media che della densità di popolazione del vettore, raggiungendo il picco massimo nel mese di agosto (Figura 6).

Per gli arbovirus più diffusi a livello mondiale e per i quali la probabilità di introduzioni accidentali in Emilia-Romagna è maggiore (CHIK e DEN) il rischio è, per gran parte dell'estate, medio-basso ($R_0 < 2$) e solo nel periodo compreso dalla 31^a alla 34^a settimana raggiunge valori $2 < R_0 < 3$.

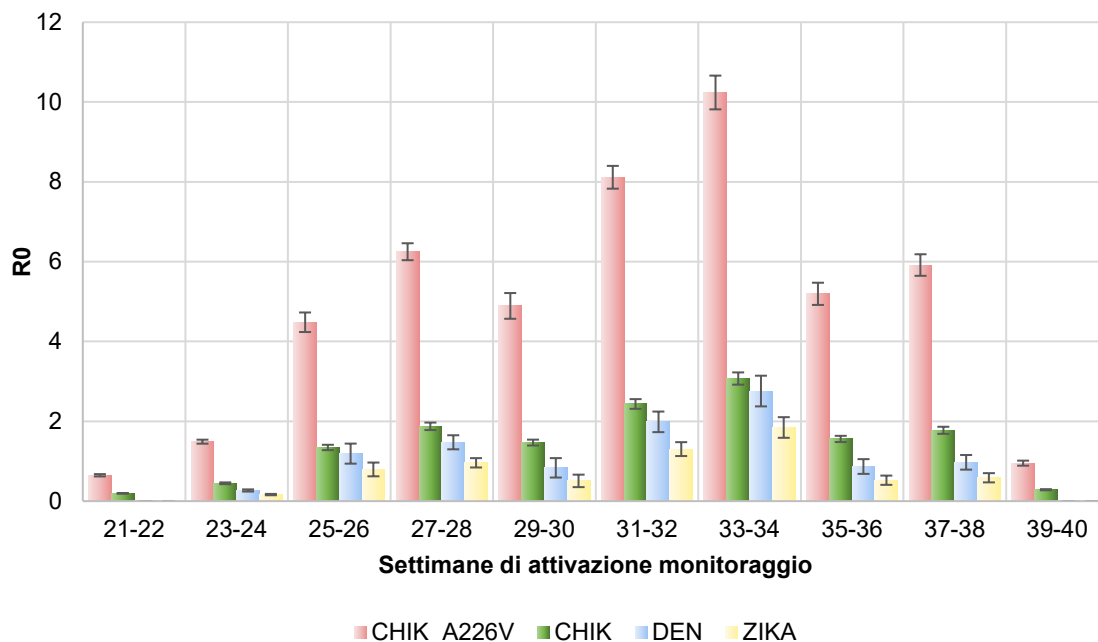


Figura 6. Andamento stagionale del potenziale tasso di accrescimento dei casi R_0 stimato nel 2020 in base ai dati di monitoraggio di *Aedes albopictus* ($IC \pm 95\%$)

Per ZIKV che ha avuto una forte esplosione epidemica nel 2015-16 sostenuta da *Ae. aegypti*, il rischio di trasmissione da parte di *Ae. albopictus*, decisamente meno competente, appare molto basso per tutta la stagione di sviluppo del vettore.

Per il ceppo mutato di chikungunya, CHIK A226V, responsabile dell'epidemia del 2007 in Romagna, il rischio appare molto alto in tutta la Regione e per gran parte del periodo estivo (dalla 25^a alla 38^a settimana).

Dai dati raccolti in questi anni è evidente che il rischio di trasmissione di CHIKV e DENV in Emilia-Romagna da parte di *Ae. albopictus* non è trascurabile.

Analisi spaziale dei dati di monitoraggio

I dati validati di monitoraggio vengono anche utilizzati per creare mappe mensili di interpolazione della densità di *Ae. albopictus* con una risoluzione a 50 metri. L'analisi spaziale viene realizzata applicando due metodi di interpolazione: il metodo deterministico IDW (*Inverse Distance Weighted*) e, se significativo dal punto di vista geostatistico, il metodo stocastico Kriging (Figura 7).

Le mappe ricavate vengono messe a disposizione dei Comuni per indirizzare al meglio le risorse e intensificare le attività di lotta nelle aree a maggiore densità (aree *hot spots*) e dal 2020 sono consultabili nel sito <https://www.zanzaratigreonline.it/it/monitoraggio/mappe-comunali>.

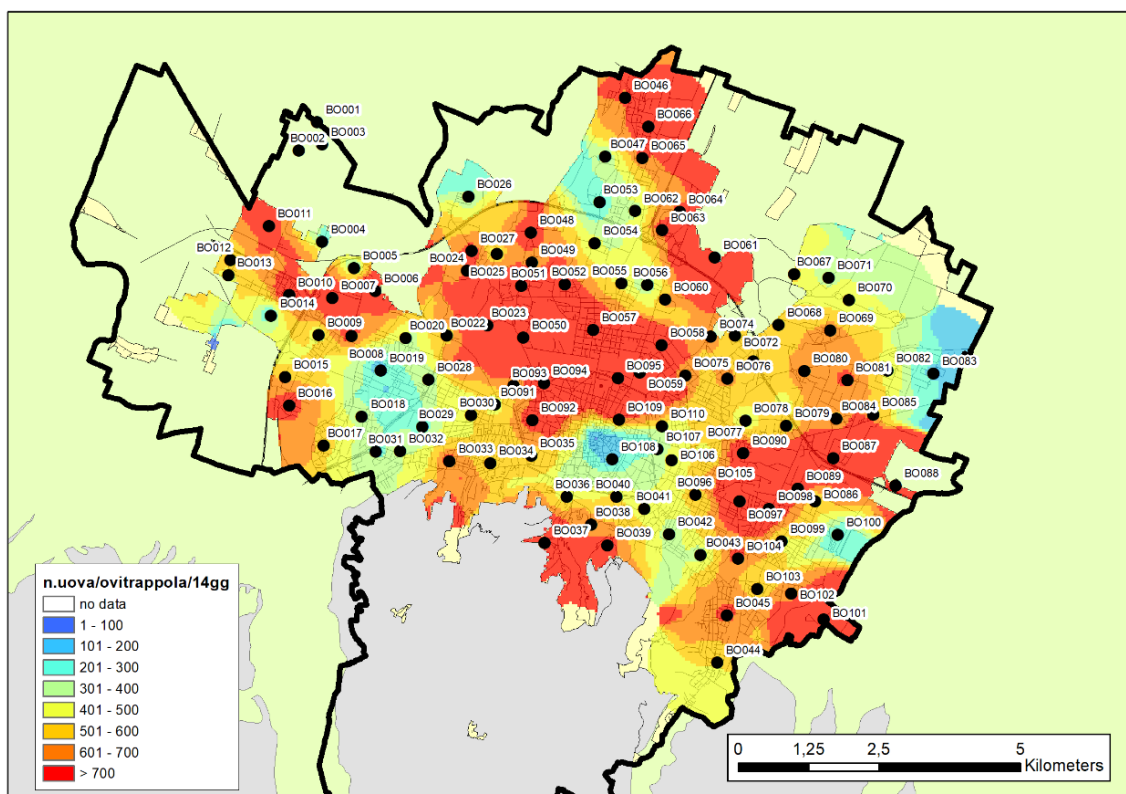


Figura 7. Esempio di una mappa di interpolazione IDW, Bologna, agosto 2020

Azioni a seguito del rilevamento dei casi importati di malattia a trasmissione vettoriale

In presenza di casi importati di malattia trasmessa da zanzara tigre, nel periodo di attività stagionale del vettore, viene attivato, entro 24 ore dalla segnalazione, un protocollo straordinario che prevede una disinfestazione articolata in tre fasi che devono essere condotte in modo sinergico: trattamento adulticida, trattamento larvicida, rimozione dei focolai larvali, la cui successione ottimale è la seguente:

- adulticidi in orario notturno in aree pubbliche per tre notti consecutive;
- adulticidi, larvicidi e rimozione dei focolai in aree private (porta-porta);
- contestuale trattamento larvicida nelle tombinature pubbliche.

L'area da disinfestare, in caso di singola segnalazione, corrisponde, di norma, a un cerchio di raggio pari a 100 m dall'abitazione ed eventualmente da altri luoghi dove il soggetto ammalato ha soggiornato. In aree a scarsa densità abitativa la zona da disinfestare va ampliata a un cerchio di raggio 200 m. In caso di cluster la dimensione dell'area in cui applicare le misure straordinarie è definita da un raggio di 300 m.

Lo scopo è impedire che *Ae. albopictus* avvii una trasmissione locale del virus innescando un evento epidemico. Nell'ambito delle attività svolte è prevista anche una verifica di efficacia dei trattamenti condotti. Nei giorni immediatamente successivi agli interventi di disinfestazione

straordinaria, svolti a cura di ASL e Comune interessati, gli entomologi incaricati dalla Regione verificano l'efficacia degli interventi di lotta e l'eventuale rischio sanitario residuo a valle dei trattamenti. In caso di non conformità si chiede che i trattamenti vengano ripetuti tempestivamente.

Nell'indagine entomologica vengono realizzati sopralluoghi nel 10% dei giardini privati trattati (scelti con osservazione da esterno per la presenza di ambienti favorevoli alle zanzare) per verificare la presenza residua di adulti e di focolai di sviluppo larvale attivi. All'interno dell'area trattata vengono individuate tre aree ombreggiate dove svolgere le catture di femmine adulte (*Human Landing Catch*, HLC) attraverso un aspiratore elettrico. Gli adulti eventualmente raccolti durante le ispezioni, vengono mantenuti in catena del freddo, e inviati al laboratorio presso la sede territoriale di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER RE) per le analisi virologiche del caso.

La maggior parte dei controlli di qualità realizzati dal 2016 ha dato un esito ottimale e in nessun caso è stata evidenziata la circolazione virale dopo i trattamenti. Negli anni si è assistito ad un graduale miglioramento delle attività di lotta attuate dalle Amministrazioni Locali, quelle con un esito ottimale dei controlli (assenza di focolai larvali e di femmine di *Ae. albopictus*) sono passate dal 50% del 2016 al 71% del 2019 (nel 2020 non sono stati registrati casi di malattia importati) (Figura 8).

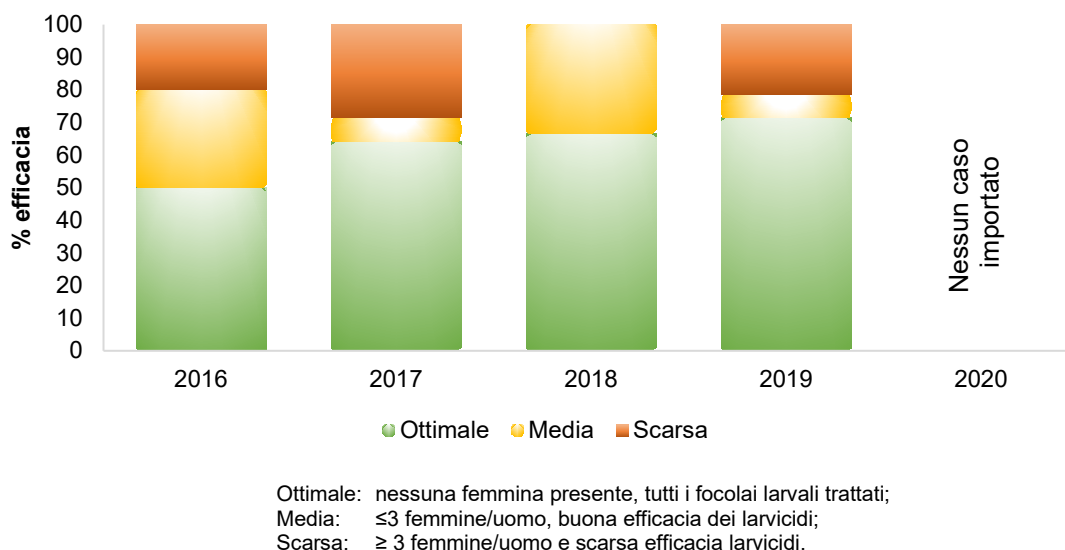


Figura 8. Efficacia delle attività di lotta straordinaria nelle aree riferite ai casi importati di chikungunya, dengue e Zika. Nel 2020 i casi importati si sono registrati al di fuori del periodo di sorveglianza definito dal piano arboviroosi

Indagini entomologiche di supporto scientifico

Per studiare le caratteristiche ecologiche della zanzara tigre sono state realizzate indagini entomologiche nelle principali aree urbane regionali col supporto del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali (2008). Lo studio è stato realizzato dal 2008 al 2015 in otto capoluoghi di provincia, attraverso sopralluoghi e campionamenti larvali in tutti i potenziali

luoghi di sviluppo presenti in area privata e pubblica. Nella Tabella 2 vengono riportati i dati descrittivi dello studio.

Tabella 2. Dati descrittivi delle indagini entomologiche condotte dal 2008 al 2015 in Emilia-Romagna

Anno di studio	Città	Area di studio (ha)	N. civili nell'area di studio	Civici ispezionati		N. tombini campionati		
				N.	% sul totale	privati	pubblici	totale
2008	Ravenna	821,0	15.468	706	4,56%	1.526	822	2.348
	Cesena	1.111,0	14.119	695	4,92%	1.634	633	2.267
	Forlì	1.367,0	21.150	719	3,40%	2.130	502	2.632
	Rimini	1.699,0	26.699	799	2,99%	1.584	1.330	2.914
2011	Bologna	971,6	6.209	396	6,38%	1.876	216	2.092
2014	Ferrara	688,0	11.883	460	3,87%	671	512	1.183
	Parma	768,1	9.853	463	4,70%	1.002	753	1.755
2015	Piacenza	752,0	12.144	312	2,57%	569	707	1.276
Totale		8.177,7	117.525	4.550	3,87%	10.992	5.475	16.467

La densità di larve di IV età (L_4) e pupe (P) rilevata nello studio è risultata variare da $8,48 \pm 7,65$ (L_4+P)/contenitore nei micro-focolai rilevati in area privata (bidoni, sottovasi, secchi, ecc.) a $87,42 \pm 83,64$ (L_4+P)/tombino nei tombini infestati presenti nei giardini e nei cortili privati a $119,86 \pm 49,67$ (L_4+P)/tombino nelle caditoie stradali in area pubblica. Si può stimare che circa il 98% delle L_4 e pupe si sviluppa nei tombini pubblici e privati che costituiscono quindi la principale tipologia di focolaio di sviluppo larvale negli ambienti urbani.

La densità per ettaro dei focolai di sviluppo larvale è riportata nella Tabella 3. Si osservano differenze sostanziali tra le aree campionate. Il numero di tombini con acqua (quindi potenziali focolai di *Ae. albopictus*) presenti in area privata è nettamente superiore (2,5 volte) a quello delle caditoie stradali in area pubblica, ma la densità di (L_4+P)/tombino è inferiore (i tombini in area privata sono generalmente più piccoli). Fa eccezione Bologna dove nelle aree private si rileva una densità minore di tombini e di microfocolai (maggiore estensione delle aree condominiali e minore di giardini privati) e in area pubblica la densità di caditoie stradali è maggiore. A Cesena si è osservata la minor densità di tombini pubblici con acqua, mentre nelle province romagnole si osserva una maggiore presenza di focolai in area privata.

Tabella 3. Risultati delle indagini entomologiche condotte nei capoluoghi di Provincia dal 2008 al 2015

Anno di studio	Area	N. tombini privati con acqua/Ha	N. micro-focolai potenziali/Ha	N. caditoie stradali pubbliche con acqua/Ha
2008	Cesena	$16,34 \pm 6,28$	$16,10 \pm 8,23$	$3,02 \pm 0,80$
	Forlì	$28,56 \pm 11,38$	$22,96 \pm 18,11$	$7,61 \pm 3,20$
	Ravenna	$30,42 \pm 9,56$	$19,36 \pm 4,00$	N.D.
	Rimini	$20,29 \pm 7,58$	$15,72 \pm 3,90$	$9,80 \pm 0,62$
2011	Bologna	$13,46 \pm 3,99$	$3,68 \pm 0,82$	$13,46 \pm 5,14$
2014	Ferrara	$23,10 \pm 22,42$	$10,77 \pm 16,71$	$10,21 \pm 4,53$
	Parma	$18,68 \pm 22,47$	$6,34 \pm 11,53$	$5,88 \pm 3,23$
2015	Piacenza	$15,38 \pm 11,09$	$7,68 \pm 18,11$	$9,09 \pm 3,15$
Totale		$20,43 \pm 16,78$	$8,90 \pm 15,35$	$8,47 \pm 4,04$

La capacità portante, intesa come stima della popolazione massima di zanzara tigre che l'ambiente può sostenere in assenza di attività di contenimento, è stata calcolata moltiplicando il numero di focolai potenziali/ha per la densità larvale massima rilevata in ogni tipologia di focolaio. Ogni area urbana ha una sua capacità portante che dipende dalle condizioni ambientali e dai comportamenti dei cittadini, pertanto la valutazione delle attività di contenimento in base al confronto dei dati di monitoraggio della popolazione di zanzare deve tener conto di queste differenze. La capacità portante sul territorio regionale è risultata variare da 2000 (L_4+P)/ha di Cesena a oltre 3500 (L_4+P)/ha di Ravenna e Forlì (Figura 9).

Questo studio ha fornito indicazioni utili sul contributo alla popolazione adulta di zanzara tigre dei diversi focolai di sviluppo larvale presenti nelle aree urbane. In generale si è osservato che i tombini privati contribuiscono nel range 40-75% alla popolazione complessiva. Per poter incidere sulla densità di popolazione occorre quindi intensificare le attività di contenimento in area privata.

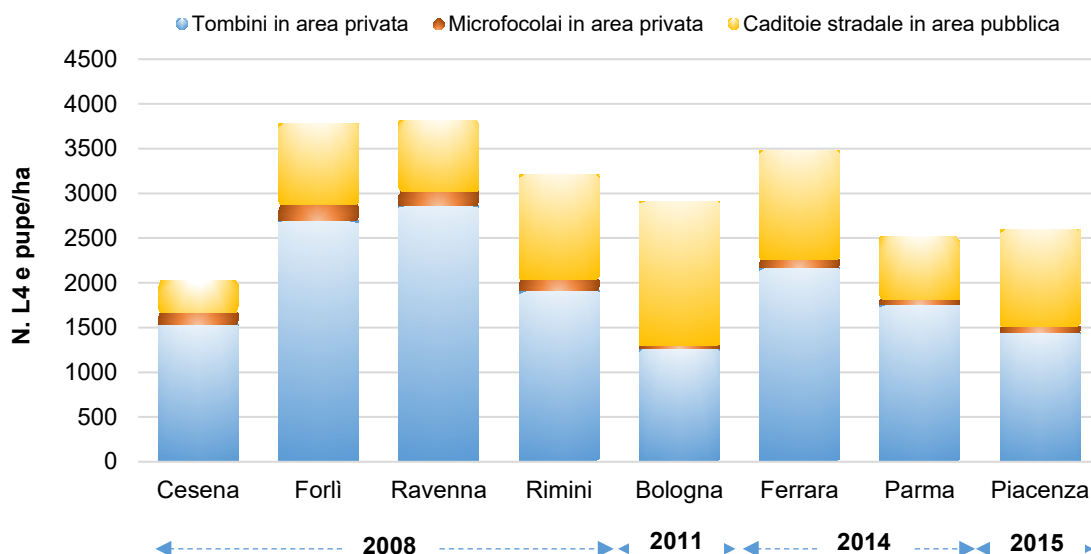


Figura 9. Capacità portante stimata attraverso studi specifici nei capoluoghi di provincia della Regione Emilia-Romagna dal 2008 al 2015

Conclusioni

Le attività entomologiche condotte dall'inizio della colonizzazione di *Ae. albopictus* hanno consentito di impostare il Piano Regionale Arbovirosi sulla base di evidenze scientifiche e migliorare le attività di sorveglianza e di lotta necessarie per contenere i rischi di trasmissione locale di arbovirus e il disagio causato dalle punture.

I dati di monitoraggio indicano che è in atto un sensibile incremento della popolazione di zanzara tigre da seguire con attenzione nei prossimi anni.

Recentemente in alcune zone d'Italia sono state rinvenute due specie esotiche (*Aedes japonicus* e *Aedes koreicus*) che il sistema di sorveglianza regionale conferma invece non essere presenti in Emilia-Romagna.

La sorveglianza entomologica dovrà comunque continuare a monitorare il rischio di introduzione di nuove specie che potrebbero trovare nei nostri ambienti le condizioni necessarie

per lo sviluppo e la sopravvivenza invernale. Tra queste particolare attenzione va posta a *Ae. aegypti*, data la sua competenza vettoriale nella trasmissione della dengue.

Bibliografia

1. Carrieri M. Monitoraggio mediante ovitrappe: evoluzione dell'infestazione in Romagna. In: Angelini P, Mignani R, Mascali Zeo S (Ed.). *Atti del Convegno Verso una strategia di lotta integrata alla zanzara tigre*. Cesena 23 febbraio 2006. Collana Contributi della Regione Emilia-Romagna n. 50 del 2007. Bologna: Centro Stampa Giunta, Regione Emilia-Romagna; 2007. p. 19-41. Disponibile all'indirizzo: <https://salute.regione.emilia-romagna.it/normativa-e-documentazione/rapporti/contributi/contributi-n.-50-2007>; ultima consultazione 20/6/2022.
2. Angelini P, Finarelli AC, Silvi G, Borriani BM, Frasca G, Mattivi A, Massimiliani E, Po C, Angelini R, Venturelli C, Macini P. L'emergenza chikungunya in Emilia-Romagna: apprendere dall'esperienza. *Epidemiol Prev* 2008;32(4-5):258-63.
3. Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia-Romagna. Sottoprogetto 3 - Infezione da virus Chikungunya: caratteristiche epidemiologiche e cliniche. In: *Zoonosi e Infezioni virali esotiche: fronteggiare le emergenze attraverso un approccio integrato tra medicina umana e veterinaria*. Programma strategico di Ricerca finalizzata RFPS-2007-7-639191 del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali; 2008.
4. Hawley WA. The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 1988;1:1-39.
5. Taylor LR. Aggregation variance and the mean. *Nature* 1961;189:732-5.
6. Taylor LR. Assessing and interpreting the spatial distributions of insect populations. *Annu Rev Entomol* 1984;29:321-57.
7. Kuno E. Sampling and analysis of insect populations. *Annu Rev Entomol* 1991;36:285-304.
8. Southwood TRE, Henderson PA. The sampling programme and the measurement of description and dispersion. In: *Ecological methods*. Oxford: Blackwell Science Ltd.; 2000. p. 7-62.
9. Mogi M, Choochote C, Khamboonruang C, and Suwanpanit P. Applicability of presence, absence and sequential sampling for ovitrap surveillance of *Aedes* (Diptera: Culicidae) in Chiang Mai, northern Thailand. *J Med Entomol* 1990;27:509-14.
10. Buntin GD. Developing a primary sampling program. In: Pedigo LP, Buntin GD (Ed.). *Handbook of Sampling Methods for Arthropods in Agriculture*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.; 1994. p. 99-115.
11. Albieri A, Carrieri M, Angelini P, Baldacchini F, Venturelli C, Mascali Zeo S, Bellini R. Quantitative monitoring of *Aedes albopictus* in Emilia-Romagna, Northern Italy: cluster investigation and geostatistical analysis. *Bulletin of Insectology* 2010;63(2):209-16.
12. Carrieri M, Albieri A, Angelini P, Baldacchini F, Venturelli C, Mascali Zeo S, Bellini R. Surveillance of the chikungunya vector *Aedes albopictus* (Skuse) in Emilia-Romagna (northern Italy): organizational and technical aspects of a large scale monitoring system. *J Vector Ecol* 2011;36(1):108-16.
13. Craig RW, Long SA, Russell RC, Ritchie SA. Optimizing ovitrap use for *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. *J Am Mosq Contr Assoc* 2006;22:635-40.
14. Carrieri M, Albieri A, Urbanelli S, Bellini R. Quality control and data validation procedure in large-scale quantitative monitoring of mosquito density: the case of *Aedes albopictus* in Emilia-Romagna region, Italy. *Pathogens and Global Health* 2017;111(2). doi: 10.1080/20477724.2017.1292992.
15. Bellini R, Carrieri M. dengue, chikungunya e valutazione del rischio. *Ecoscienza* 2014;4(2):66-7.
16. Carrieri M, Albieri A, Gentili L, Bacchi M, Manzieri AM, Angelini P, Venturelli C, Matrangelo C, Leis M, Pezzi M, Rani M, Iezzi RS, Melotti M, Casari A, Bellini R. Egg data validation in quantitative monitoring of *Aedes albopictus* in Emilia-Romagna region, Italy. *Pathogens and Global Health* 2020;115(2). doi: 10.1080/20477724.2020.1866375.

17. Carrieri M, Angelini P, Venturelli C, Maccagnani B, Bellini R. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) population size survey in the 2007 chikungunya outbreak area in Italy. I. Characterization of breeding sites and evaluation of sampling methodologies. *J Med Entomol* 2011;48(6):1214-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1603/ME10230>.
18. Bølle PY, Thomas G, Vergu E, Renault P, Valleron AJ, Flahault A. Investigating transmission in a two-wave epidemic of chikungunya fever, Reunion Island. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2008;8(2):207-17.
19. Vallorani R, Angelini P, Bellini R, Carrieri C, Crisci A, Mascali Zeo S, Messeri G, Venturelli C. Temperature characterization of different urban microhabitats of *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) in Central-Northern Italy. *Environ Entomol* 2015;1-11. doi: 10.1093/ee/nvv067.
20. Valerio L, Marini F, Bongiorno G, Facchinelli L, Pombi M, Caputo B, Maroli M, Della Torre A. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in urban and rural contexts within Rome Province, Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2010;10(3):291-4.
21. Carrieri M, Angelini P, Venturelli C, Maccagnani B, Bellini R. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) population size survey in the 2007 chikungunya outbreak area in Italy. II: Estimating epidemic thresholds. *J Med Entomol* 2012;49(2):388-99. doi: <http://dx.doi.org/10.1603/ME10259>.
22. Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, Thiria J, Dehecq JS, Fontenille D, Schuffenecker I, Despres P, Failloux AB. Two chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS ONE* 2007;2(11):e1168. doi:10.1371:1-9.
23. Whitehorn J, Kien DT, Nguyen NM, Nguyen HL, Kyrillos PP, Carrington LB, Tran CN, Quyen NT, Thi LV, Le Thi D, Truong NT, Luong TT, Nguyen CV, Wills B, Wolbers M, Simmons CP. Comparative susceptibility of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* to dengue virus infection after feeding on blood of viremic humans: implications for public health. *J Infect Dis* 2015;212(8):1182-90. doi: 10.1093/infdis/jiv173.
24. Di Luca M, Severini F, Toma L, Boccolini D, Romi R, Remoli ME, Sabbatucci M, Rizzo C, Venturi G, Rezza G, Fortuna C. Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Euro Surveill* 2016;21(18):pii=30223. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.18.30223>.
25. Heitmann A, Jansen S, Lühken R, Leggewie M, Badusche M, Pluskota B, Becker N, Vapalahti O, Schmidt-Chanasit J, Tannich E. Experimental transmission of Zika virus by mosquitoes from central Europe. *Euro Surveill* 2017;22(2):pii=30437. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.2.30437>.
26. Hugo LE, Stassen L, La J, Gosden E, Ekwudu O, Winterford C, Viennet E, Faddy HM, Devine GJ, Frentiu FD. Vector competence of Australian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* for an epidemic strain of Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis* 2019;13(4):e0007281. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007281>.
27. McKenzie BA, Wilson AE, Zohdy S. *Aedes albopictus* is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis. *PLoS ONE* 2019;14(5):e0216794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216794>.
28. Gubler DJ, Suharyono W, Tan R, Abidin M, Sie A. Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bull WHO* 1981;59(4): 623-30.
29. Johansson MA, Powers AM, Pesik N, Cohen NJ, Staples JE. Nowcasting the spread of chikungunya virus in the Americas. *PLoS ONE* 2014;9(8):e104915. doi:10.1371/journal.pone.0104915.
30. Davidson G. Estimation of the survival-rate of Anopheline mosquitoes in nature. *Nature* 1954;174:792-4.
31. Detinova TS. *Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria*. Geneva: World Health Organization; 1962.

MONITORAGGIO DELLA ZANZARA TIGRE NEL LAZIO E IN TOSCANA

Adele Magliano, Arianna Ermenegildi, Irene Del Lesto, Federico Romiti, Claudio De Liberato
Direzione Operativa Diagnostica Generale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio
e della Toscana M. Aleandri, Roma

Recependo quanto previsto dal “Piano nazionale di sorveglianza e risposta alle arbovirosi trasmesse da zanzare (*Aedes* sp.) con particolare riferimento ai virus chikungunya, dengue e Zika – 2017”, l’Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana (IZSLT) si è fatto promotore, per il biennio 2018-2019, di un progetto dal titolo “Organizzazione di una rete entomologica regionale per il Lazio a tutela della salute pubblica (maggio 2018-aprile 2019)”, che ha previsto, tra le altre attività, la creazione di una rete di monitoraggio della zanzara tigre in alcuni centri urbani della Regione, con il posizionamento di ovitrappole gestite da Aziende Sanitarie Locali (ASL), amministrazioni comunali e ospedali, con il coordinamento e il supporto dell’IZSLT. Un progetto analogo è stato attivato nel 2020 in Toscana (Tabella 1).

Tabella 1. Province e comuni del Lazio e Toscana coinvolti nella sorveglianza per *Aedes albopictus*

Provincia	N. ovitrappole	Comune coinvolto (n. siti, n. ovitrappole)
Roma	70	Anzio (6, 6), Ardea (5, 5), Bracciano (1, 2), Ciampino (6, 6), Civitavecchia (2, 2), Colferro (1, 5), Guidonia (1, 2), Monterotondo (1, 2), Nettuno (5, 5), Palestrina (1, 2), Pomezia (5, 5), Rocca di Papa (7, 7), Roma (9, 17), Subiaco (1, 2), Tivoli (1, 2)
Latina	27	Aprilia (3, 3), Cisterna (2, 2), Fondi (6, 6), Formia (3, 3), Latina (3, 3), Pontinia (3, 3), Sabaudia (3, 3), Terracina (4, 4)
Frosinone	5	Frosinone (3 siti, 5)
Grosseto	8	Grosseto (8, 8)
Firenze	13	Firenze (8, 8), Bagno a Ripoli (5, 5)

Enti partecipanti al piano: ASL RM2, ASL RM4, ASL RM5, ASL RM6, ASL Latina, ASL Frosinone, INMI Lazzaro Spallanzani, ASL Toscana Centro, IZSLT Sezione di Grosseto.

Descrizione delle attività

Il monitoraggio di *Ae. albopictus* si è basato sull’uso di ovitrappole standard, ispezionate una volta a settimana per il ritiro delle bacchette di masonite, poi trasferite al laboratorio dell’IZSLT per la conta delle uova. Il numero di ovitrappole per ciascuna località è stato definito in base alle caratteristiche del sito e alla disponibilità delle ASL e altre amministrazioni che si occupavano della loro gestione sul territorio. Ciascuna trappola è stata georeferenziata e mappata su apposita cartografia GIS (*Geographical Information System*). Al fine di fornire indicazioni pratiche per il contrasto alla zanzara tigre, al superamento di una soglia di 200 uova/bacchetta (1), ASL e comuni competenti venivano allertati per procedere ad eventuali interventi di controllo. A seguito del rinvenimento, durante i mesi autunnali, di bacchette negative (assenza di uova per due settimane

consecutive), il monitoraggio passava ad una forma ridotta, con una sola ovitrappola per località/sito prelevata ogni 15 giorni. Il monitoraggio in modalità ridotta era finalizzato ad evidenziare un'eventuale attività della zanzara tigre nei mesi invernali e il momento della ripresa della sua attività in primavera.

Le attività di monitoraggio sono state suddivise tra i vari enti come segue.

- IZSLT: sopralluoghi, individuazione siti di campionamento, mappatura siti con cartografia GIS, fornitura trappole, analisi dei campioni e conta uova, gestione dataset, invio risultati alle ASL;
- ASL (Dipartimenti Prevenzione), Amministrazioni Comunali e ospedali: individuazione siti di campionamento, gestione delle trappole e prelievo bacchette, invio dei campioni all'IZSLT.

Un'ulteriore attività, prevista dal Piano, è stata svolta per monitorare le zanzare adulte a seguito di casi umani di arbovirosi di importazione, usando trappole del tipo BG-Sentinel® (*Biogents' mosquito trap*).

Risultati sorveglianza *Aedes albopictus*

Nel periodo settembre 2017 – settembre 2020 sono stati effettuati 4.474 campionamenti, così ripartiti tra le province del Lazio: Roma, 3.136; Latina, 1.287; Frosinone 51. Per la Regione Toscana, i 61 campionamenti sono stati effettuati come segue: Grosseto 48; Firenze 13. *Ae. albopictus* è risultata presente in tutti i siti monitorati. Si riportano di seguito i risultati della sorveglianza effettuata nel Lazio, nel periodo 2017-2019 (2). Durante il periodo di sorveglianza (settembre 2017 – dicembre 2019) sono stati effettuati 2.896 campionamenti in 21 comuni del Lazio (province di Roma, Latina e Frosinone) (Figura 1).

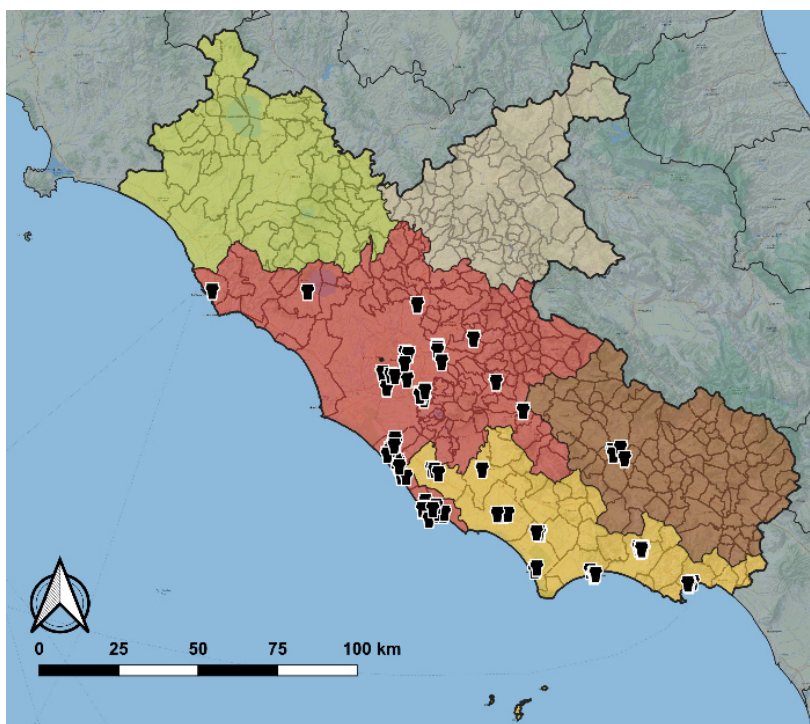


Figura 1. Distribuzione dei siti di monitoraggio di *Aedes albopictus* nei territori delle Aziende Sanitarie Locali del Lazio

Sono state contate un totale di 169.657 uova, con un numero medio settimanale per ovitrappola di 59 ($DS \pm 95$). Per confermare l'identificazione specifica delle uova, parte delle bacchette positive per ciascuno dei siti (con un numero di uova > 50) è stata immersa in acqua per permettere lo sviluppo delle larve e il successivo riconoscimento degli adulti. Questo ha permesso l'identificazione di ~ 9.000 *Ae. albopictus*, approssimativamente il 5% delle uova totali. Il 64,8% delle bacchette esaminate è risultato positivo per la presenza della specie. Il periodo di deposizione è durato dai 5 agli 8 mesi, iniziando a maggio/giugno per finire a ottobre/dicembre, a seconda del comune. Il 95% delle uova è stato deposto tra i primi di giugno e la metà di novembre, con un picco di attività durante la seconda metà del mese di agosto (Figura 2).

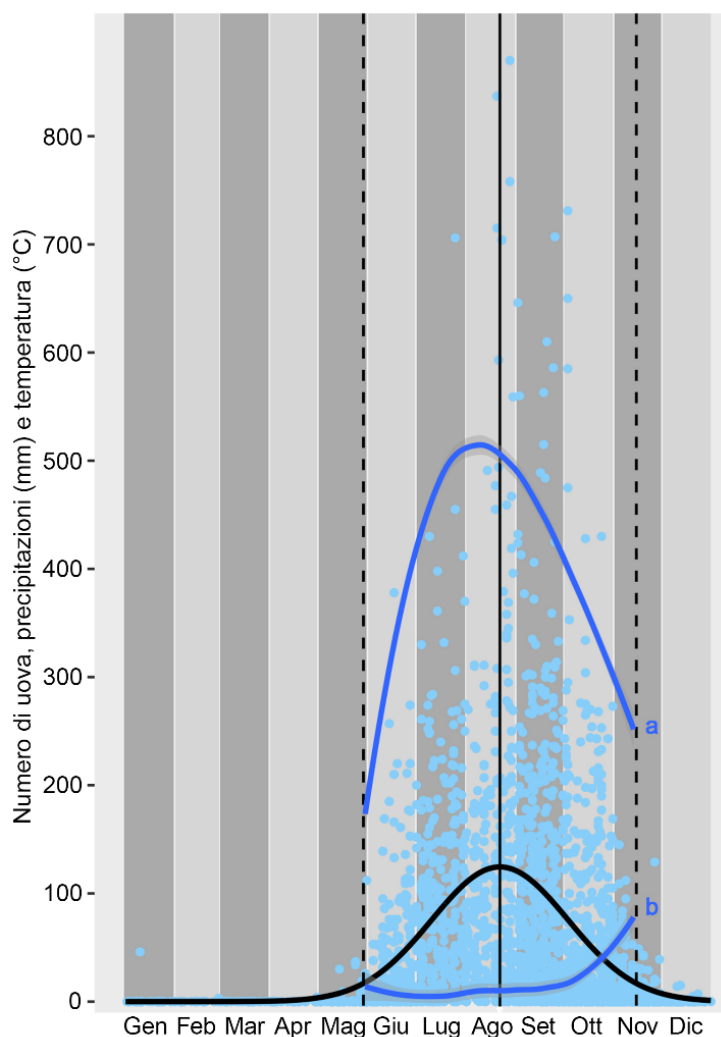


Figura 2. Andamento annuale della quantità di uova di zanzara tigre (*Aedes albopictus*) nei tre anni di sorveglianza (2017-2019) (n. uova/7 gg). La fenologia della specie è indicata dal risultato del modello Gaussiano (linea continua nera), di cui la linea continua verticale indica il picco, nella terza parte di agosto. Le linee tratteggiate verticali indicano il limite iniziale e finale del periodo di maggiore attività (95% delle uova deposte). La linea blu in alto (a) indica l'andamento della temperatura cumulata (TC) nelle quattro settimane precedenti il campionamento; la linea blu in basso (b) riporta l'andamento delle precipitazioni cumulate nella settimana precedente il campionamento

L'attività di deposizione è durata mediamente 186 giorni, superando i 200 giorni solo in alcuni comuni del Lazio centro-meridionale (Ciampino, Anzio, Fondi, Pontinia e Sabaudia).

Sono da menzionare due casi inattesi di deposizione durante i mesi invernali nei comuni di Fondi (46 uova il 10/1/2019) e di Pontinia (3 uova il 28/2/2019).

Il numero massimo di uova (870) è stato rilevato nel comune di Roma il 28/8/19. Il numero di uova contate ha superato 200 nell'8,1% dei casi (235 campioni), principalmente durante il periodo che va dall'ultima decade di agosto a ottobre (70,6%).

Il numero di uova riportate per ogni comune è illustrato dal boxplot in Figura 3.

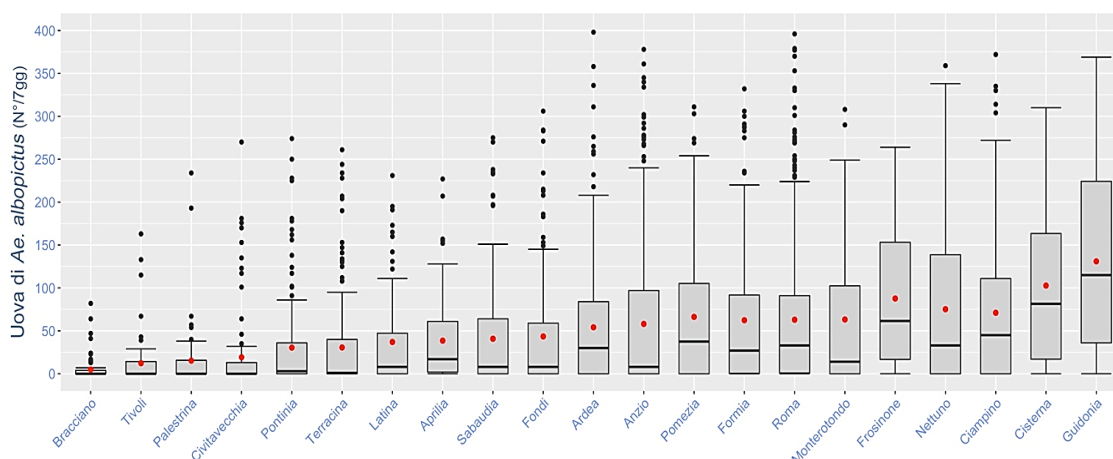


Figura 3. Boxplot che illustra il numero di uova di zanzara tigre (*Ae. albopictus*) contate settimanalmente in ognuno dei comuni oggetto della sorveglianza. I comuni sono stati ordinati in modo crescente considerando il numero totale di uova contate. Le linee orizzontali in ogni boxplot indicano il valore mediano e punti rossi il valore medio di uova. I valori superiori a 400 sono stati esclusi dalla rappresentazione per agevolare la visualizzazione

I risultati dell'analisi statistica hanno mostrato un significativo effetto positivo della media delle temperature minime registrate nella seconda settimana precedente al prelievo (MmS2) sul numero di uova deposte. In particolare, quando MmS2 supera il valore soglia di 10,4°C (ES \pm 0,2°C), comincia l'attività di ovideposizione di *Ae. albopictus*.

Ulteriori analisi hanno chiarito come l'attività di deposizione sia legata al fotoperiodo. In particolare, un valore di 13,1 h di luce giornaliera (~ metà aprile alla nostra latitudine) può essere considerato la soglia oltre la quale inizia l'ovideposizione. La fine dell'attività di deposizione si è verificata quando le ore di luce erano meno di 9,9.

Per quanto riguarda la temperatura, la fine dell'attività di deposizione è legata ai valori medi delle massime registrate nella prima (MMS1) e nella seconda (MMS2) settimana precedente il campionamento. Per valori di MMS1 e MMS2 rispettivamente inferiori ai 19,22°C e 12,26°C il numero di uova deposte scende a zero. Durante il periodo di massima attività di ovideposizione, la quantità di uova è direttamente legata alla temperatura cumulata nelle quattro settimane precedenti il campionamento (somma delle differenze positive tra la media giornaliera della temperatura e la soglia di attività di 10,4°C) e inversamente alla quantità di precipitazioni accumulate durante la settimana precedente il campionamento (linee blu in Figura 2).

In ultima analisi, i risultati delle indagini a scala spaziale hanno sottolineato una relazione positiva tra impatto antropico sul territorio (*human footprint*) (dati NASA da *Earth Observing System Data and Information System*, EOSDIS) e quantità di uova nelle ovitrappe. La presenza di superficie occupata da strade, reti ferroviarie, arbusti e vegetazione bassa in un raggio di 100

m dall'ovitrappola influisce positivamente su media e numero massimo di uova. In particolare, la relazione tra numero massimo di uova riscontrate su ciascuna bacchetta nel periodo di massima attività della specie (inizio giugno – metà novembre) e l'impatto antropico sul territorio, ha predetto un valore superiore alle 500 uova deposte settimanalmente (Figura 4 A e B). Vale a dire che, durante il periodo estivo, in quelle aree dove l'impatto antropico raggiunge il suo valore soglia, il numero di uova di *Ae. albopictus* può superare di un ordine di grandezza il valore medio riscontrato durante l'anno (da 59 a 545).

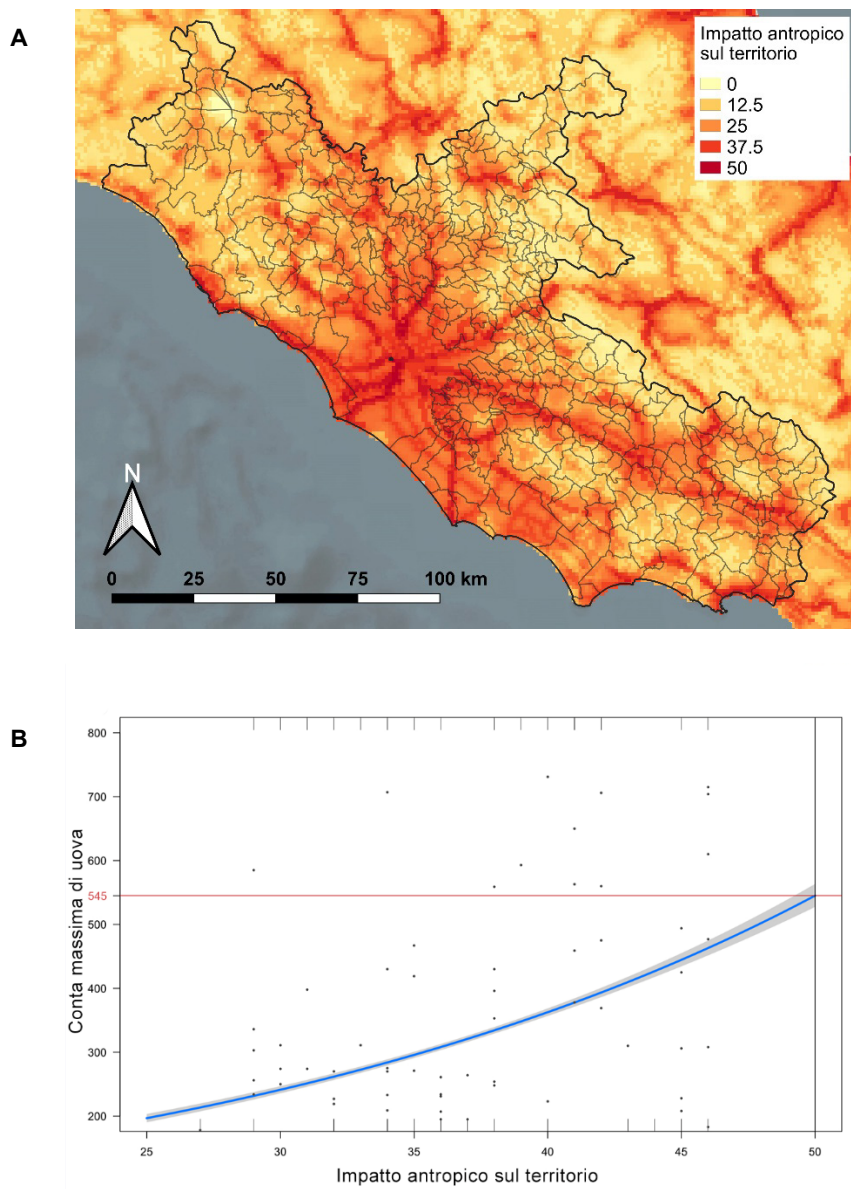


Figura 4. Rappresentazione della distribuzione dell'impatto antropico sul territorio, come calcolata da Earth Observing System Data and Information System (EOSDIS) (A). Grafico relativo alla relazione tra numero massimo di uova contate su ciascuna bacchetta e impatto antropico, la linea rossa orizzontale segna il valore predetto di uova deposte settimanalmente nei siti interessati da maggiore impatto (B)

Conclusioni e considerazioni

Come prevedibile, *Ae. albopictus* è risultata presente in tutti i siti di monitoraggio che, con la sola eccezione di Rocca di Papa (680 m s.l.m.), erano in località a quote relativamente basse. L'assenza di dati storici su distribuzione, abbondanza e stagionalità della zanzara tigre nelle nostre Regioni non consente di valutare se la sua distribuzione e la sua abbondanza siano variate col passare degli anni e se gli attuali livelli d'infestazione siano da considerarsi stabili o in evoluzione.

Dati relativi al comune di Roma risalenti agli anni 1999 e 2000 (3) indicano numerosità medie di uova per bacchetta paragonabili a quelle attualmente riscontrate (1999) o inferiori (2000), ma comunque nello stesso ordine di grandezza.

L'abbondanza di uova, direttamente collegata all'intensità dell'attività trofica e alla densità della specie, è direttamente dipendente dalla temperatura cumulata (oltre la soglia indicata di 10,4°C) durante le quattro settimane precedenti il prelievo. Il periodo di massima attività ricade tra giugno e ottobre, con un picco a fine agosto. È stata inoltre evidenziato un notevole effetto dello specifico punto di posizionamento delle trappole sull'abbondanza delle uova.

Variabili spaziali come l'impatto antropico sul territorio e la presenza di arbusti in prossimità dell'ovitrappola hanno un effetto positivo sul numero di uova, sottolineando la natura sinantropica della specie e la predilezione per luoghi ombreggiati e ricchi di vegetazione per digerire il pasto. In particolare, l'indice di impatto antropico, vista la sua influenza significativa sull'abbondanza della specie, sembrerebbe essere una variabile da tenere in considerazione sia nella definizione di attività di monitoraggio che per eventuali sviluppi nell'ambito della ricerca.

La disponibilità di dati relativi a distribuzione, abbondanza e stagionalità di un vettore è prerequisito fondamentale per la valutazione del rischio in caso di circolazione di agenti patogeni da esso trasmessi e per la messa in opera di efficaci interventi di controllo, sia routinari che di emergenza. Questi primi anni di attività sono stati finalizzati alla messa a punto di un sistema operativo sul territorio che in futuro, diventando più capillare ed esteso, potrebbe fornire dati ancora più significativi e utilizzabili a fini di prevenzione e controllo.

Bibliografia

1. European Centre for Disease prevention and Control. *Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe*. Stockholm: ECDC; 2012
2. Romiti F, Ermenegildi A, Magliano A, Rombolà P, Varrenti D, Giammattei R, Gasbarra S, Ursino S, Casagni L, Scriboni S, Puro V, Ruta A, Brignola L, Fantasia O, Corpolongo D, Di Luzio G, De Liberato C. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) monitoring in the Lazio Region (Central Italy). *J Med Entomol* 2020; 58(2):847-56. doi: 10.1093/jme/tjaa222
3. Toma L, Severini F, Di Luca M, Bella A, Romi R. Seasonal patterns of oviposition and egg hatching rate of *Aedes albopictus* in Rome. *J Am Mosquito Contr* 2003;19:19-22.

TERZA SEZIONE

**Sorveglianza entomologica per prevenire l'introduzione
e la diffusione di nuove specie di zanzare invasive**

PREVENZIONE DELL'INTRODUZIONE E DIFFUSIONE DI SPECIE ESOTICHE INVASIVE IN PIEMONTE, LIGURIA E VALLE D'AOSTA

Alessandra Pautasso (a), Rosanna Desiato (b), Andrea Mosca (c), Annalisa Accorsi (b), Valeria Listorti (b), Maria Cristina Radaelli (b), Serena Canola (b), Valerio Carta (b), Alessio Ferrari (b), Marco Ballardini (b), Enrica Berio (b), Mirko Francesco Perna (c), Cristina Grieco (c), Matteo Giovannozzi (c), Paolo Roberto (c), Walter Mignone (b), Roberto Moschi (b), Laura Chiavacci (b), Cristina Casalone (b)

(a) *Struttura Complessa Sanità Animale, Dipartimento di Prevenzione, Azienda Sanitaria Locale 1 Imperiese, Imperia*

(b) *Unità Operativa Malattie Emergenti, Struttura Semplice Neuropatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

(c) *Area Tecnica Territorio e Agricoltura, Ipla, Istituto per le Piante da Legno e l'Ambiente SpA, Torino*

Come previsto dal Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi 2020-2025, la sorveglianza entomologica per prevenire l'introduzione e la diffusione di nuove specie invasive ha come scopo l'attivazione di una risposta rapida al possibile ingresso sul territorio nazionale di nuove specie di zanzare. Essa rappresenta infatti uno strumento efficace per controllare l'introduzione di nuove specie di vettori competenti nella trasmissione di agenti virali, che potrebbero trovare nel contesto territoriale le condizioni favorevoli all'insediamento stabile.

L'individuazione precoce di queste specie permette, inoltre, l'adozione di appropriate e tempestive misure di controllo e di eradicazione rappresentando un'importante azione preventiva per ridurre il rischio di emergenze sanitarie.

Da queste considerazioni emerge l'importanza di monitorare, ad esempio, i collegamenti internazionali e interregionali e i loro punti di snodo e interscambio (1).

Per affrontare in modo efficace ed efficiente il problema, si è ritenuto fondamentale sviluppare e affiancare alla rete di sorveglianza entomologica prevista dal piano arbovirosi e al sistema di rilevazione dei virus West Nile e Usutu, un sistema di monitoraggio dei luoghi di potenziale ingresso di nuove specie esotiche. Liguria, Piemonte e Valle d'Aosta sono, infatti, dal punto di vista territoriale, climatico e ambientale zone idonee all'introduzione di nuove specie di zanzare, lungo le rotte turistiche e commerciali. Liguria e Piemonte, in particolare, presentano un elevato rischio di introduzione di specie esotiche, come *Aedes koreicus* e *Aedes japonicus*, due specie invasive originarie del Sud-Est Asiatico (2), ma già presenti in Europa in aree climaticamente simili, la prima nell'Italia nordorientale (3), la seconda nella vicina Svizzera (4).

La necessità di implementare tali sistemi di sorveglianza deriva dall'aumento costante di casi umani di importazione di chikungunya, Zika e dengue anche nei territori in esame, come osservato recentemente in conseguenza del rientro di numerosi viaggiatori che si recano in zone endemiche per turismo o lavoro (5-7).

Infine, in alcune Regioni non troppo distanti e dissimili dalle nostre, sono già stati documentati diversi casi di trasmissione autoctona di chikungunya (primo focolaio nel 2007 in Emilia-Romagna, successivi focolai nel 2017: in Lazio, Calabria e 2 casi in Emilia-Romagna) e dengue (Francia meridionale, Croazia, Spagna, Veneto) (8, 9).

Excursus storico

In Piemonte, fin dal 2012, si è incominciato a censire e monitorare i potenziali punti d'ingresso di specie invasive, i cosiddetti PoE (*Points of Entry*) attraverso una serie d'iniziative tutt'ora in corso e nate in un primo momento nell'ambito del cosiddetto "Progetto regionale unitario d'informazione e monitoraggio della diffusione dei vettori di patologie umane e animali veicolati da zanzare", iniziativa finanziata da Regione Piemonte, che per la sua esecuzione ha incaricato l'Istituto per le Piante da Legno e l'Ambiente (IPLA) di Torino. Altre collaborazioni si sono instaurate nell'ambito di progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute:

- progetto di ricerca corrente "Possibile introduzione di insetti vettori esotici in Italia: monitoraggio entomologico come strumento di prevenzione" capofila l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZS PLVA);
- progetto del Centro Nazionale per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (CCM) "Prevenzione delle malattie a trasmissione vettoriale: sviluppo e implementazione pilota di strumenti di supporto" che ha visto il coinvolgimento di 5 Regioni italiane (Piemonte, Emilia-Romagna, Veneto, Marche e Sicilia) e che ha permesso la redazione delle "Linee guida per l'identificazione e la sorveglianza dei siti a rischio di introduzione delle zanzare invasive", impostando piani di campionamento specifici sulla base delle caratteristiche territoriali, climatiche ed epidemiologiche di ciascuna area.

Come ormai noto, il traffico internazionale di Pneumatici Fuori Uso (PFU) è stato uno dei maggiori responsabili della diffusione della zanzara tigre e di altre specie invasive di zanzara in giro per il globo. Per questo motivo, tra i primi PoE ad essere indagati in Piemonte, fin dagli anni '90 del secolo scorso, vi furono quelli inseriti nella filiera dei PFU, con il duplice scopo di intercettare la possibile introduzione e diffusione di nuove specie e di fornire ai soggetti coinvolti degli efficaci mezzi di contrasto alla proliferazione di zanzare che, come la zanzara tigre, trovano nei PFU, non solo un comodo mezzo di trasporto passivo, ma anche un ottimo focolaio per lo sviluppo degli stadi preimaginali. Come illustrato successivamente, oltre alla sorveglianza entomologica e alla promozione delle buone pratiche per limitare la proliferazione culicidica, nei primi anni ci si è dedicati alla ricostruzione della filiera dei PFU per poterne seguire i flussi intra e interregionali.

Un'altra filiera messa subito sotto stretta osservazione è stata quella del florovivaismo, in quanto anche alcuni materiali trattati in quest'ambito possono fungere da supporto per il trasporto di specie esotiche in vari stadi di sviluppo. Anche in questo caso, si è affrontata la questione per intercettare la possibile introduzione di nuove specie e fornire un supporto per la lotta alle zanzare che si sviluppano in quei siti in cui la proliferazione larvale è favorita dalle attività vivaistiche.

A partire dal 2013, sono stati anche identificati i principali punti d'ingresso, di prima sosta e d'interscambio di potenziali mezzi di trasporto passivo per specie invasive, ossia aeroporti, autoporti, interporti, aree di sosta lungo le principali arterie stradali, siti di confine, ecc.

Tutti i PoE individuati sono poi stati classificati per pericolosità in base a criteri legati al volume delle merci o al numero di veicoli in transito, alla presenza di specie invasive dalle località d'origine e alla quantità e qualità dei potenziali focolai di sviluppo larvale presenti dentro o intorno ai siti. Successivamente, le attività di sorveglianza sono state graduate in base alla tipologia e al livello di pericolosità risultante dall'analisi precedente. Nei PoE a maggior rischio, la sorveglianza si è svolta mediante il campionamento periodico e variamente combinato di uova, larve e adulti ed è stato esteso anche all'esterno del sito, in luoghi particolarmente favorevoli allo sviluppo di specie invasive, come i cimiteri. Con il decrescere del grado di pericolosità, le attività di sorveglianza sono state proporzionalmente ridotte in frequenza ed estensione. Come vedremo

nelle prossime pagine, per alcuni PoE sono state svolte attività particolari ed estemporanee, mentre per altri le attività sono state standardizzate e ripetute negli anni. Il livello di pericolosità di un PoE può inoltre variare nel tempo e di conseguenza anche la sua sorveglianza.

In Liguria, l'attività di sorveglianza nei confronti delle specie invasive esotiche è cominciata nel 2011 a partire dai progetti transfrontalieri del Programma Marittimo Italia-Francia REDLAV e REDLAV 2.1, in cui era coinvolto l'IZSPLVA. Poiché il territorio regionale presenta i tratti caratteristici di una stretta fascia costiera collinare, il monitoraggio è stato attuato posizionando le trappole per la cattura di zanzare (BG-Sentinel®, *Biogents' mosquito trap*), addizionate con ghiaccio secco e *gravid trap*) e ovitrappole lungo la costa, in siti selezionati in base ai fattori di rischio per l'introduzione e la diffusione di zanzare esotiche invasive e malattie trasmesse da zanzare (*Mosquito-Borne Diseases*, MBD) (caratteristiche dell'habitat, vicinanza ad aree commerciali e rotte turistiche – porti, aeroporti e terminal merci – e presenza di ospiti).

Grazie al supporto della Azienda Ligure Sanitaria (ALISA) e al coinvolgimento dei servizi veterinari delle ASL e della Città di Genova dal 2016 (a seguito dell'emergenza internazionale di salute pubblica" legata all'aumento dei casi di microcefalia e altri disturbi neurologici occorsi in alcune aree affette dall'infezione sostenuta da Zika virus in Sud America) è stato implementato un sistema di sorveglianza straordinaria nella Regione, attraverso il rafforzamento della rete di sorveglianza (aumento del numero di trappole e individuazione di ulteriori siti sensibili) e la sensibilizzazione della popolazione residente, italiana e straniera, sulle problematiche connesse alle malattie trasmesse da zanzare, con particolare riferimento alla zanzara tigre e alle infezioni da Zika.

Particolare attenzione è stata riservata alla città di Genova, per la presenza di diversi fattori di rischio per importazione di zanzare invasive e malattie virali: il porto, l'aeroporto e la presenza della più grande comunità ecuadoriana etnica dell'America Latina al di fuori dell'Ecuador stesso. Nell'ultimo decennio, infatti, il Sudamerica ha registrato cambiamenti nella distribuzione spazio-temporale delle malattie infettive, comprese le MBD dovute alla globalizzazione e ai cambiamenti climatici (10).

Metodologia e strumenti impiegati nel monitoraggio

I siti sottoposti a sorveglianza sono stati selezionati sulla base delle caratteristiche di urbanizzazione e di attività antropiche e commerciali, e del posizionamento delle principali vie di comunicazione.

In particolare, le trappole sono state posizionate tenendo conto della presenza di condizioni favorevoli all'introduzione di specie esotiche, impiegando trappole BG-Sentinel® (*Biogents' mosquito trap*) in aree di snodo turistico-commerciale (porti/aeroporti/autoporti-interporti/aree di sosta), nell'ipotesi di movimentazione di zanzare esotiche al seguito di merci, animali o persone. Nelle zone considerate a maggior rischio, al posizionamento di trappole e ovitrappole si sono aggiunti dei sopralluoghi finalizzati alla raccolta diretta di larve nei focolai di sviluppo ed eventualmente di adulti tra la vegetazione.

In Piemonte, sono stati scelti gli aeroporti principali (Torino Caselle, Cuneo Levaldigi e l'aeroporto militare di Cameri), gli autoporti/interporti (Pescarito, Orbassano, Rivalta Scrivia, Novara, Beura-Cardezza e Susa) e le aree turistiche di maggior movimento di persone (di passaggio e soggiorno) nella stagione estiva, in particolare verso il confine elvetico (Figura 1).

In Liguria, sono stati invece scelti i porti di Genova, Savona, Imperia (Porto Maurizio) e La Spezia, l'Aeroporto di Genova, e l'Interporto di Ventimiglia (Figura 2).

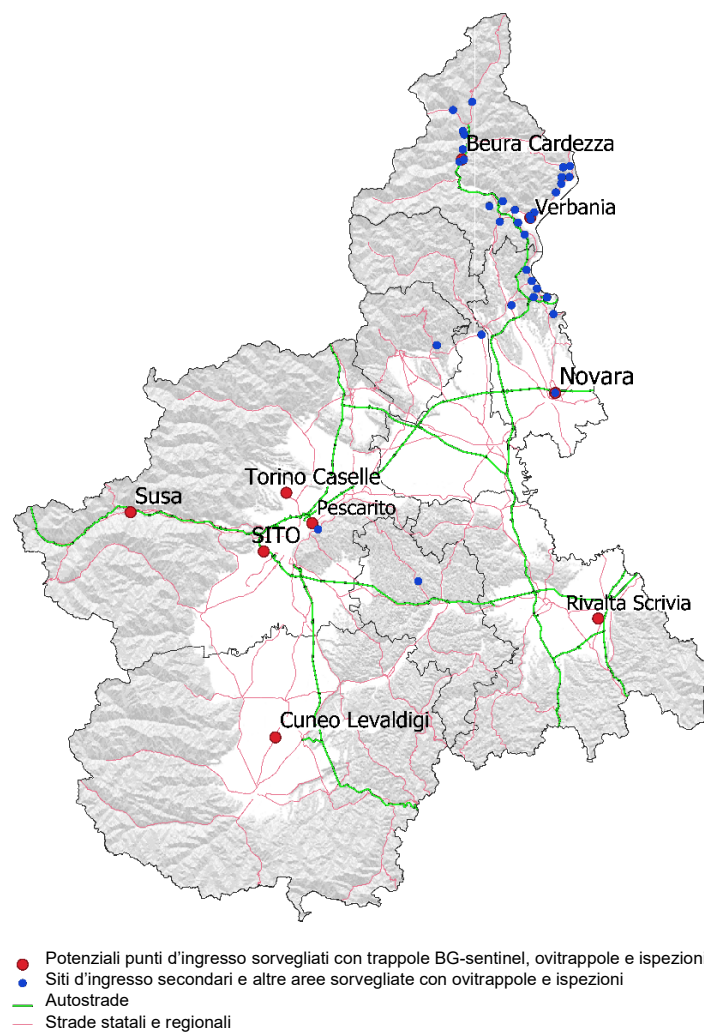


Figura 1. Localizzazione dei siti utilizzati nel sistema di sorveglianza entomologica in Piemonte, 2019-2021

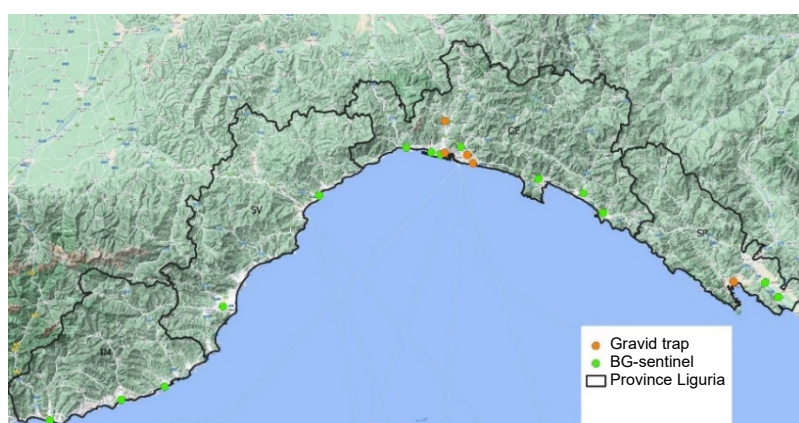


Figura 2. Localizzazione dei siti utilizzati nel sistema di sorveglianza entomologica in Liguria, 2011-2021

In Valle d'Aosta, nel 2013 sono stati selezionati l'Aeroporto di Quart (Aosta), l'interscambio di Pont St. Martin (area turistica di sosta e passaggio persone). Nel 2014 è stato dismesso il sito di Quart (aeroporto ormai in disuso) e oltre al mantenimento del sito di Pont St. Martin, sono stati aggiunti Pollein (area turistica di sosta e passaggio persone), Chatillon (stazione di sosta autostradale, assimilabile a un interporto), Morgex e Aosta.

Le zanzare catturate sono state identificate tassonomicamente e raggruppate in *pool* di specie, data e luogo di cattura. Una selezione di *pool* di *Aedes* sp. catturate in siti considerati a rischio per l'introduzione di patogeni esotici sono stati sottoposti ad analisi biomolecolari tramite end-point PCR per la ricerca del frammento NS5 del genere Flavivirus per dengue, Zika (11) e tramite *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*), il cui target è il gene NSP1 (12), per l'identificazione del virus chikungunya. Le stecchette di masonite delle ovitrappole sono state sottoposte alla conta delle uova e all'identificazione dei soggetti nati dalla successiva schiusa in laboratorio delle uova deposte.

Nei prossimi paragrafi saranno descritte le esperienze più significative svolte nelle tre Regioni nell'ambito della sorveglianza entomologica attuata per prevenire l'introduzione e la diffusione di nuove specie invasive.

Rinvenimento di *Aedes koreicus* in Liguria e Piemonte

Il sistema di sorveglianza attivo in Liguria ha permesso di rilevare la presenza di *Ae. koreicus*, catturata per la prima volta a Genova nel 2015, e stabilmente insediata non solo nell'area del comune di Genova, ma anche in provincia di Savona, nelle cittadine di Vado Ligure (2019) e di Albenga (2020). L'analisi dei dati mostra che l'andamento delle catture di esemplari di *Ae. koreicus* non segue quello del numero di catture complessive operate nel corso del periodo di studio.

Infatti, nelle province di Imperia e La Spezia, a fronte di un numero non trascurabile di esemplari di zanzare catturate, non è stato rivenuto alcun esemplare della specie di interesse. Nella provincia di Genova, invece, dopo l'individuazione dei primi due esemplari di *Ae. koreicus* nel 2015 e 2016, il numero di ritrovamenti di esemplari di tale specie balza immediatamente a 25 nel 2017, per poi crescere fino a raggiungere 29 nel 2019. Nel medesimo periodo, invece, il numero complessivo di esemplari catturati oscilla in modo irregolare tra circa 2.400 e 5.550.

Infine, le trappole nella provincia di Savona hanno catturato mediamente quasi 700 esemplari per anno nel periodo 2013-2018, con un incremento notevole negli anni successivi; a tale incremento corrisponde anche il ritrovamento dei primi 6 esemplari di *Ae. koreicus* nel 2019 e del boom di catture di individui di questa specie (ben 41) nel 2020.

In termini di prevalenza, ossia di percentuale di *Ae. koreicus* catturati rispetto al numero complessivo di individui di tutte le specie catturati, si osserva un trend decrescente in provincia di Genova, mentre è presente un andamento crescente a livello comunale (Genova) e in provincia di Savona. Inoltre, nel 2020 esemplari di *Ae. koreicus* sono stati ritrovati sia nelle trappole collocate nella città di Genova, sia in quelle collocate a Lavagna, indicando una sua espansione verso est (13).

Il sistema di sorveglianza attivo in Piemonte ha invece permesso ai tecnici IPLA di rilevare la presenza di *Ae. koreicus* nel marzo 2021, in provincia di Asti e, nei mesi successivi, in varie località nel sud del Piemonte, verosimilmente per introduzione dalla vicina Liguria (14). Tra il settembre del 2021 e il giugno 2022, la specie è stata intercettata anche nel nord della Regione (tra le province di Biella e Verbania), forse a causa di uno o più fenomeni d'introduzione dalla Lombardia e/o dal Canton Ticino (Confederazione Svizzera) dove risultava già presente (15).

Rinvenimento di *Aedes japonicus* in Piemonte

Essendo venuti a conoscenza che nel limitrofo Canton Ticino erano state via via individuate alcune specie esotiche di zanzara (16), a partire dal 2014 furono intensificate le attività di sorveglianza nei pressi del confine di Stato italo-svizzero e lungo le relative vie d'accesso. Le principali vie di comunicazione tra Italia e Svizzera in Piemonte sono la strada costiera occidentale del Lago Maggiore (SS34), la strada della Val Vigezzo (SS337) e la strada del Sempione (SS33). Le prime due sono importanti non solo per il commercio e il lavoro transfrontaliero, ma soprattutto per il turismo, specie quello estivo. La strada del Lago Maggiore, che in Svizzera diventa Strada Principale 13, attraversa numerosi centri turistici lungo il lago su entrambi i lati del confine di Piaggio Valmara, fornendo ottime occasioni di trasporto passivo di insetti. Per questa ragione e per diversi anni si sono svolti dei sopralluoghi con campionamenti di larve e adulti, interessando soprattutto i cimiteri di una decina di località poste lungo la strada, a partire da Cannobio e fino a Verbania. In alcuni siti, oltre ai sopralluoghi, sono stati effettuati dei monitoraggi con ovitrappe e, a Verbania, il periodico posizionamento di una trappola BG-Sentinel.

Le altre due strade si congiungono nei pressi di Domodossola, ma raggiungono quote più alte e quella del Sempione conduce al Vallese, dove non sono ancora segnalate specie invasive di zanzara. Ciò nonostante, alcune località tra Varzo, Crodo e Domodossola sono state oggetto di sopralluoghi analoghi a quelli fatti lungo al Lago Maggiore.

Grazie a queste attività, nell'aprile 2019 sono stati trovati i primi esemplari di *Ae. japonicus* nel nord-ovest del Paese. Si trattava di larve e pupe prelevate da un vaso di pietra del cimitero di Suna (VB) che sono successivamente state portate allo sfarfallamento e identificate con certezza. Nei mesi seguenti e nella stagione successiva, la sorveglianza fu intensificata ed estesa e la specie fu ritrovata nei focolai larvali di altre otto località: Cannobbio, Cannero Riviera, Oggebbio, Stresa, Crodo, Gravellona Toce (tutti comuni della provincia del Verbano-Cusio-Ossola), Castelletto Sopra Ticino e Dormelletto (entrambi in provincia di Novara). Nell'ottobre 2020, furono catturate anche due femmine in una trappola BG-Sentinel posizionata nel comune di Verbania.

Nei due anni successivi, la specie è stata progressivamente intercettata anche nelle province di Vercelli, Biella, Torino e Asti, dimostrando una grande capacità di dispersione (14).

Indagini all'aeroporto internazionale di Torino Caselle

In tempi recenti, gli aeroporti hanno giocato un importante ruolo nella dispersione a distanza di vettori e di malattie da vettore (16). Per questa ragione e grazie ad una convenzione siglata nel 2014 tra IPLA e SAGAT (Società Azionaria Gestione Aeroporto Torino), azienda che gestisce lo scalo aeroportuale torinese, e il coinvolgimento dell'Ufficio di Sanità Marittima, Aeroportuale e di Frontiera (USMAF) dell'aeroporto "Sandro Pertini", si sono potute svolgere diverse iniziative volte a individuare e a contrastare l'introduzione di nuove specie di zanzare, fornendo al contempo alla struttura aeroportuale un servizio di monitoraggio finalizzato alla rimozione o al trattamento dei focolai di sviluppo larvale presenti nel sito.

Nei primi anni, la convenzione prevedeva anche delle ispezioni a bordo di velivoli provenienti da località in cui era acclarata la presenza di zanzare non appartenenti alla fauna italiana o note per endemismi di malattie il cui vettore era presente nell'area aeroportuale (*Culex pipiens* e *Aedes albopictus*). All'aeroporto torinese non atterrano voli provenienti da località tropicali e pertanto gli scali di partenza utili ai fini della sorveglianza erano molto limitati (nord Africa, Medio Oriente, Paesi Bassi e Svizzera per quanto riguarda la presenza di zanzare non appartenenti alla fauna italiana, regioni e paesi del Mediterraneo e dell'Europa orientale per le località con acclarata

circolazione di arbovirus veicolabili dalle zanzare presenti in Piemonte). Le ispezioni avevano lo scopo di verificare la presenza di zanzare nelle parti pressurizzate e climatizzate degli aerei appena atterrati e di sottoporre a ulteriori indagini le zanzare eventualmente individuate. Per le catture sono stati impiegati sia aspiratori manuali alimentati a batteria, dotati di manico allungabile per poter raggiungere le zone più scomode delle aree ispezionate, quali cappelliere o griglie di aerazione sotto la linea dei sedili (Figura 3), sia delle trappole attrattive variamente innescate (con anidride carbonica, BG lure ed emanatori di calore) e posizionate negli aeromobili che si fermavano almeno una notte intera presso lo scalo torinese (Figura 4).



Figura 3. Attività di sorveglianza da parte di un operatore IPLA all'interno di un aeromobile appena atterrato all'aeroporto Sandro Pertini di Torino Caselle e proveniente da Sharm el-Sheikh (Egitto) per catturare, mediante aspiratore telescopico, eventuali zanzare accidentalmente introdottesi all'interno dei vani pressurizzati



Figura 4. Trappola attrattiva innescata con ghiaccio secco, BG-Lure (Biogents®) e cuscinetto autoriscaldante (Thermo Therapy® ricarica), posizionata per una notte all'interno di un aeromobile in sosta notturna all'aeroporto Sandro Pertini di Torino Caselle, per la cattura di eventuali zanzare accidentalmente introdottesi durante gli scali

L'ispezione diretta con aspiratore portatile ha riguardato circa 160 aeromobili in tre anni, portando alla raccolta di appena 2 campioni, entrambi dalla Sardegna e relativi a specie presenti in Piemonte (*Ae. albopictus* e *Aedes caspius*). In alcuni casi, oltre alle cabine, l'ispezione ha riguardato i vani bagagli pressurizzati. Il posizionamento notturno delle trappole attrattive all'interno delle cabine passeggeri è stato effettuato in una quindicina di aerei in due anni, ma non ha mai portato alla cattura di esemplari di zanzare. Dato lo scarso apporto fornito da questi due metodi, a fronte di un grande impegno profuso, anche nell'organizzazione dei sopralluoghi con le compagnie aeree, essi sono stati accantonati, lasciando più spazio alle indagini all'aperto, onde verificare la possibile presenza di popolazioni in fase di insediamento.

A tal fine si sono effettuati dei campionamenti periodici di uova, larve e adulti di zanzare mediante l'impiego di ovitrappole distribuite nelle varie aree dell'hub, il controllo dei focolai larvali man mano identificati e il posizionamento di trappole modello BG-Sentinel. In sette anni di monitoraggio non sono state finora identificate nuove specie invasive. Il periodico controllo dei focolai larvali ha però permesso di effettuare interventi di rimozione e di trattamento larvicida dei siti di sviluppo larvale, contribuendo a mantenere basso il livello delle infestazioni culicidiche e riducendo così il rischio di trasmissione di patogeni veicolati dalle zanzare, eventualmente presenti nel sangue dei passeggeri in arrivo o l'instaurarsi di popolazioni di specie invasive involontariamente introdotte tramite i voli.

Indagini sulla Rollende Landstraße Novara – Friburgo

All'interno dell'Autoporto di Novara, ha sede il terminal italiano della Rollende Landstraße (ROLA), che collega Novara a Freiburg in Breisgau (Friburgo) e che effettua quotidianamente vari viaggi nelle due direzioni per il trasporto su rotaia di TIR tra Italia e Germania, attraverso la Svizzera. In seguito all'identificazione di *Ae. albopictus* a Friburgo, questi treni, che oltre a trasportare gli automezzi hanno delle carrozze per lo svago e il riposo degli autisti, sono stati sospettati di esser stati il tramite per il trasporto passivo della specie da una zona da tempo infestata (Novara), ad una fino a poco prima indenne (Friburgo). Per verificare questa ipotesi, e valutare se *Ae. japonicus* potesse eventualmente compiere con la stessa modalità il percorso inverso, nel 2014 IPLA, l'Agenzia dell'Ambiente Tedesca, l'Università di Friburgo, l'Istituto di Ditterologia di Speyer e l'Istituto Bernhard Nocht per la Medicina Tropicale di Amburgo hanno realizzato, con la preziosa collaborazione del personale del RALpin, la società che gestisce il servizio di trasporto, un programma di monitoraggio per la ricerca di zanzare adulte sui convogli, mediante l'impiego di specifiche trappole.

Con cadenza settimanale, a partire dalla metà di luglio e fino alla fine di settembre, sono state posizionate all'interno di alcune cabine dei TIR e sulle carrozze viaggiatori, delle trappole attrattive appositamente costruite. Vista l'impraticabilità di poter impiegare in questi ambienti delle classiche trappole innescate ad anidride carbonica o altri attrattivi chimici, si è scelto di impiegare il calore come unico attrattivo. Le trappole erano costituite da un contenitore di ridotte dimensioni, il cui coperchio era internamente sovrastato da un piccolo imbuto cavo, nero e cosparso di una sostanza vischiosa (Figura 5).

Dentro l'imbuto vi era posto per un cuscinetto autoriscaldante a lunga durata che veniva innescato al momento del posizionamento, al fine di creare una fonte di calore per attirare le zanzare e intrappolarle sulle parti adesive. Le trappole venivano consegnate agli autisti durante il check-in nei rispettivi terminal, insieme ad un'informativa predisposta in varie lingue, in base alle loro nazionalità (Figura 6).



Figura 5. Trappola con parte adesiva (il tronco di cono nero), innescata con cuscinetto autoriscaldante (Thermo Therapy® ricarica), ideata dai partner tedeschi del progetto, posizionata per la cattura di eventuali zanzare accidentalmente introdottesi nelle cabine dei TIR e nei vagoni dei treni in viaggio sulla Rollende Landstraße tra Novara a Friburgo e viceversa



Figura 6. Operazione di consegna di una trappola adesiva e relativa spiegazione da parte di un tecnico IPLA ad un autotrasportatore in procinto di caricare il proprio mezzo sopra un vagone di un treno in partenza da Novara per Friburgo, attraverso la Rollende Landstraße. Analoga operazione veniva eseguita a Friburgo dai colleghi tedeschi sui mezzi in partenza per Novara

Altre trappole venivano posizionate all'interno delle carrozze viaggiatori e nelle cuccette dove gli autotrasportatori trovavano posto nel corso del viaggio. In media erano posizionate su ogni convoglio circa 20 trappole a viaggio. Le trappole posizionate a Friburgo venivano ritirate a Novara dai nostri tecnici e quelle posizionate a Novara venivano ritirate a Friburgo dai nostri partner tedeschi. Al ritiro, le trappole venivano richiuse, inserendo l'imbuto nella scatola, e portate nei rispettivi laboratori per la ricerca e l'identificazione di eventuali campioni. Sui convogli provenienti dall'Italia sono stati catturati alcuni esemplari di *Ae. caspius* (particolarmente abbondante nel novarese) e di *Ae. albopictus* (Figura 7), confermando la ROLA come possibile via d'introduzione della specie in Germania.



Figura 7. Esemplare femmina di *Aedes albopictus* rimasto invischiato in una trappola adesiva posizionata su di un treno della Rollende Landstraße, in viaggio da Novara a Friburgo, nell'estate del 2014

Dalla Germania all'Italia ha invece solo viaggiato un esemplare di *Ae. albopictus* e nessuno di *Ae. japonicus*. Il sito è però rimasto sotto osservazione anche negli anni successivi, mediante il posizionamento di alcune GAT trap e di una BG-Sentinel.

Indagini sulle aziende florovivaistiche e sulla filiera PFU in Piemonte

Il florovivaismo è un segmento dell'agricoltura molto particolare, difficilmente assimilabile ad altre attività e con peculiarità diverse fra il settore del fiore reciso, piante in vaso stagionali e piante da vivaio. Molte però sono le criticità comuni che rischiano di favorire la diffusione di varie specie di zanzare, in particolare quelle di origine esotica, a causa dell'elevata quantità di potenziali focolai di riproduzione larvale (colture idroponiche, vasi, sottovasi e altri innumerevoli contenitori accatastati) e della presenza di vegetazione che, fornendo ombra e umidità, favorisce un microclima ideale al permanere degli adulti. Queste attività possono anche rappresentare luoghi in cui, grazie al commercio del materiale florovivaistico, adulti di zanzara e soprattutto uova possono essere passivamente trasportati permettendo alle specie di colonizzare aree anche molto lontane da quella di origine.

Alla luce di quanto esposto, già a partire dal 2014, sono state predisposte delle attività specifiche per comprendere le dinamiche e fornire mezzi per limitare la proliferazione di specie invasive già insediate (*Ae. albopictus*) e sorvegliare la diffusione di specie nuove.

Innanzitutto, è stata redatta e inviata a tutte le aziende florovivaistiche una lettera di presentazione in cui erano sintetizzati gli obiettivi e le attività del progetto regionale di sorveglianza e lotta alle zanzare. Congiuntamente, è stato predisposto e consegnato un decalogo da seguire in azienda per contrastare la proliferazione di zanzara tigre; ovviamente, le indicazioni riportate servivano anche per le altre specie culicidiche eventualmente presenti.

È stato inoltre redatto un questionario strutturato con risposte pre-codificate, con il duplice scopo di comprendere il flusso di materiale florovivaistico, onde individuare vivai o punti vendita a maggior rischio d'importazione di zanzare esotiche, e di delimitare comportamenti e azioni che inconsapevolmente possano favorire lo sviluppo delle zanzare. La fase di strutturazione del questionario è stata preceduta da sopralluoghi in alcuni vivai, al fine di individuare comportamenti e pratiche atti a favorire la formazione di ristagni d'acqua e comprendere le informazioni disponibili sul flusso del materiale florovivaistico.

In aggiunta alle aziende florovivaistiche vere e proprie, sono state intervistate anche quelle direttamente collegate al settore, come grossisti, distributori, garden center e così via.

Le risposte sono state successivamente elaborate in modo da classificare ciascun'azienda secondo due potenziali rischi principali, ovvero la possibilità di importare zanzare alloctone e la possibilità di favorire focolai di sviluppo larvale di specie culicidiche in generale. Infine, ciascun florovivaista è stato collocato in una delle seguenti classi di rischio: assente, basso, moderato, alto. Questa classificazione ha permesso di allestire una rete di monitoraggio calibrata; ad esempio, per le aziende florovivaistiche a maggior rischio d'importazione di specie esotiche, i campioni raccolti mediante ovitrappole o durante i sopralluoghi venivano esaminati al fine di identificare eventuali esemplari di specie alloctone. All'opposto, nelle aziende che presentano solo strutture o azioni atte a favorire focolai culicidici, veniva attivata solo la rete di sorveglianza mediante ovitrappole.

A partire dalla metà del secolo scorso, era già risultato evidente che le caratteristiche degli pneumatici privi di cerchione costituiscono non solo degli ottimi focolai di sviluppo larvale per diverse specie culicidiche, quando esposti a eventi meteorici, essendo in grado di contenere indefinitamente l'acqua che vi si raccoglie, ma perfino un veicolo con cui alcune specie di zanzara possono venir trasportate anche per migliaia di chilometri (16). Ciò è particolarmente valido per le uova deposte sulla superficie interna dello pneumatico, perché possono resistere per lungo tempo al disseccamento. Il caso di *Ae. albopictus* è ormai paradigmatico (19), ma specie con caratteristiche analoghe hanno dimostrato di poter seguire la medesima via (20).

Si è quindi cercato di comprendere la mole e i flussi del commercio piemontese di Pneumatici Usati (ossia ancora utilizzabili tal quali o previa ricostruzione) e, soprattutto, di Pneumatici Fuori Uso (PFU, ovvero quelli non più idonei alla ricostruzione), dai punti di produzione, attraverso vari passaggi intermedi (i più critici per la diffusione delle zanzare) e fino alla trasformazione finale.

I PFU sono considerati rifiuto a tutti gli effetti, classificati nel CER (Codice Europeo dei Rifiuti) con la codifica 16.01.03, siano essi destinati al recupero o allo smaltimento.

A norma di legge, dall'inizio degli anni duemila, i PFU non possono più essere ammessi in discarica e viene previsto l'obbligo, per gli importatori e i produttori, della gestione completa della filiera, fino alla trasformazione finale. In ottemperanza a tale normativa, si sono costituiti numerosi consorzi che coordinano e gestiscono tali flussi. I principali tra quelli operanti anche in Piemonte sono Ecotyre Srl, Ecopneus Sepa e Greentire Srl. La loro attività ha consentito una mappatura dei luoghi in cui avviene il cambio degli pneumatici, cioè la produzione del rifiuto PFU. Altri soggetti da cui abbiamo ottenuto dei dati sono il Comitato PFU (costituito presso l'ACI), i dossier di Legambiente su discariche abusive e traffici illeciti, (21, 22) e le Aziende di smaltimento dei rifiuti. Generalmente i PFU, analogamente ad altri tipi di rifiuto, vengono conferiti dai cittadini nelle Ecoisole o Ecocentri allestiti in numero variabile nei vari comuni consorziati. I PFU vengono stoccati in scarrabili aperti o richiudibili, più raramente in cumuli non coperti.

Al fine di limitare la proliferazione di *Ae. albopictus* e di prevenire la diffusione di nuove specie culicidiche presso i punti di raccolta di PFU, nel corso degli anni IPLA ha predisposto e distribuito vario materiale informativo che fornisse indicazioni chiare e semplici per la

prevenzione e, ove necessario, la corretta gestione dei focolai di sviluppo per gli operatori professionali degli pneumatici. Nello specifico, è stato redatto un volantino con le norme di buon comportamento e un questionario anonimo volto alla comprensione dei flussi di pneumatici e alla loro gestione prima del conferimento finale. Il materiale è stato inviato, in prima battuta, a circa 900 operatori presenti in Piemonte. Negli anni è stata effettuata una revisione del materiale, al fine di tarare meglio il messaggio informativo e, grazie alla collaborazione con il Consorzio Ecotyre, si sono raggiunte alcune migliaia di operatori.

Analogamente a quanto fatto sui vivai, l'attività di monitoraggio ha permesso la comprensione dei livelli quali/quantitativi dell'impatto che una gestione non oculata dei cumuli dei PFU può avere sulla diffusione di specie invasive sul territorio regionale. In particolare, presso gommisti e grandi depositi di pneumatici, sono state attivate delle stazioni di monitoraggio con ovitrappole. Questa metodologia permette un monitoraggio capillare e relativamente economico delle varie realtà del territorio regionale. Nei siti più importanti, sono stati anche effettuati periodici campionamenti larvali, sia nei copertoni, sia in eventuali altri focolai (ad esempio teloni, secchi, fusti, ecc.) e aspirazioni di adulti. Tutto il materiale biologico campionato, tanto nei vivai, quanto nei depositi di PFU, veniva conferito al laboratorio di entomologia dell'IPLA di Torino per la determinazione ed eventualmente l'allevamento delle larve per portarle allo sfarfallamento e consentire una più agevole determinazione.

Sorveglianza diagnostica su selezione di *pool* di *Aedes* sp.

Dal 2015 al 2018 sono stati testati dai laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta 775 *pool* di *Aedes* sp. (n. 256; 33% in Piemonte; n. 519; 67% in Liguria), prelevate da siti a rischio di introduzione per la ricerca di virus esotici patogeni per l'uomo (Zika, dengue e chikungunya). Nessun virus di interesse medico è stato riscontrato.

Conclusioni

La Liguria e il Piemonte sono state in passato tra le prime Regioni italiane ed europee in cui *Ae. albopictus* è stata introdotta, trovandovi un idoneo ambiente di sviluppo. Condizioni che, come descritto nei precedenti paragrafi, sono favorevoli anche per altre specie invasive di zanzara. La Valle d'Aosta, sebbene abbia condizioni climatiche peculiari e diverse dalla maggior parte del territorio ligure e piemontese, può anch'essa offrire ampi spazi per la diffusione di specie più avvezze a climi meno miti, come ad esempio proprio *Ae. japonicus*. Non dimentichiamo poi che, in tempi storici recenti, vari porti liguri furono interessati dalla presenza stagionale di *Aedes aegypti*, uno dei più importanti e pericolosi vettori di arbovirosi umane, il cui areale di diffusione è in lenta, ma costante crescita (23, 24). In caso d'introduzione accidentale di questa specie, i cambiamenti climatici in atto potrebbero addirittura favorire una sua permanenza e diffusione ancora maggiore che in passato (25).

Per tutte queste ragioni, la sorveglianza all'introduzione di specie invasive ha rivestito e riveste tuttora un'importanza fondamentale come attività propedeutica alle azioni di contrasto della diffusione di queste specie.

Bibliografia

1. Gage KL, Burkot TR, Eisen RJ, Hayes E. Climate and vectorborne diseases. *Am J Prev Med* 2008;35:436–50. <https://doi.org/10.1016/j.amepr.2008.08.030>.
2. Tanaka K, Mizusawa K, Saugstad ES. A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae). *Contrib Am Entomol Inst* 1979;16:1–987.
3. Capelli G, Drago A, Martini S, Montarsi F, Soppelsa M, Delai N, Ravagnan S, Mazzon L, Schaffner F, Mathis A, Di Luca M, Romi R, Russo F. First report in Italy of the exotic mosquito species *Aedes* (Finlaya) *koreicus*, a potential vector of arboviruses and filariae. *Parasit Vectors* 2011;4:188.
4. Schaffner F, Kaufmann C, Hegglin D, Mathis A. The invasive mosquito *Aedes japonicus* in Central Europe. *Med Vet Entomol*. 2009;23:448–51.
5. Burdino E, Milia MG, Sergi G, Gregori G, Allice T, Cazzato ML, Lucchini A, Lipani F, Calleri G, Orofino G, Di Perri G, Ghisetti V. Diagnosis of dengue fever in North West Italy in travelers from endemic areas: a retrospective study. *J Clin Virol*. 2011;51(4):259–63. doi: 10.1016/j.jcv.2011.05.011.
6. Burdino E, Milia MG, Allice T, Gregori G, Ruggiero T, Calleri G, Lipani F, Lucchini A, Venturi G, Di Perri G, Ghisetti V. Laboratory findings in Zika infection: The experience of a reference centre in North-West Italy. *J Clin Virol*. 2018;101:18–22. doi: 10.1016/j.jcv.2018.01.010.
7. Burdino E, Ruggiero T, Milia MG, Proietti A, Sergi G, Torta I, Calleri G, Caramello P, Tiberti D, Ghisetti V. Travelers with chikungunya virus infection returning to Northwest Italy from the Caribbean and Central America during June–November 2014. *J Travel Med* 2015;22(5):341–4. doi: 10.1111/jtm.12219.
8. Tomasello D, Schlagenhauf P. chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007–2012. *Travel Med Infect Dis* 2013;11(5):274–84. doi: 10.1016/j.tmaid.2013.07.006.
9. Jourdain F, Roiz D, de Valk H, Noël H, L'Ambert G, Franke F, Paty MC, Guinard A, Desenclos JC, Roche B. From importation to autochthonous transmission: Drivers of chikungunya and dengue emergence in a temperate area. *PLoS Negl Trop Dis* 2020 May 11;14(5): e0008320. doi: 10.1371/journal.pntd.0008320.
10. Pinto J, Bonacic C, Hamilton-West C, Romero J, Lubroth J. Climate change and animal diseases in South America. *Revue Scientifique et Technique* 2008;27(2):599–613.
11. Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol* 2001;39(5):1922–7. doi: 10.1128/JCM.39.5.1922–1927.2001.
12. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet* 2007;370(9602):1840–6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61779-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61779-6).
13. Ballardini M, Ferretti S, Chiaranz G, et al. First report of the invasive mosquito *Aedes koreicus* (Diptera: Culicidae) and of its establishment in Liguria, northwest Italy. *Parasit Vectors* 2019;12(1):334.
14. Mosca A, Perna MF, Giovannozzi M, Roberto P. First report of two Asian invasive mosquito species, *Aedes japonicus* and *Aedes koreicus*, in Piedmont, northwest Italy. *Ann Ist Super Sanità* 2022;58(3):162–5.
15. Arnoldi I, Negri A, Soresinetti L, Brambilla M, Carraretto D, Montarsi F, Roberto P, Mosca A, Rubolini D, Bandi C, Epis S, Gabrielli P. Assessing the distribution of invasive Asian mosquitoes in Northern Italy and modelling the potential spread of *Aedes koreicus* in Europe. *Acta Tropica* 2022;232:106536.

16. Gruppo cantonale Lotta alle Zanzare; Fondazione Bolle di Magadino. *Ricerca di nuove specie di zanzare in Ticino mediante analisi MALDI-TOF MS. Rapporto 2013-2014*. Dipartimento della sanità e socialità – Bellinzona e Ufficio federale dell’ambiente UFAM di Berna; 2015. Disponibile all’indirizzo: http://paradiso.ch/pdf/documentazione/zanzaratigre/Rapporto%20di%20attivit%C3%A0%20GLZ%202014_Allegato%203_Ricerca%20zanzare%20esotiche%202013%202014%20in%20Ticino.pdf; ultima consultazione 20/6/2022.
17. Gezairy HA. Travel epidemiology: WHO perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2003;21(2):86-8.
18. Pratt JJ, Heterick RH, Harrison JB, Haber L. Tires as a factor in the transportation of mosquitoes by ships. *Mil Surgeon* 1946;99:785-8.
19. Hawley W, Reiter P, Copeland R, Pumpuni C, Craig G. *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. *Science* 1987;236:1114-6. doi:10.1126/science.3576225
20. Laird M, Calder L, Thornton RC, Syme R, Holder PW, Mogi M. Japanese *Aedes albopictus* among four mosquito species reaching New Zealand in used tires. *J Am Mosq Control Assoc* 1994;10:14–23.
21. Fontana E, Pergolizzi A, Dodaro F, Biffi L. I numeri e le storie del traffico e dello smaltimento illegale di pneumatici fuori uso (PFU) in Italia dal 2005 al 2011. *Osservatorio Nazionale Ambiente e Legalità di Legambiente*. Seconda edizione. 2011. Disponibile all’indirizzo: <http://www.ecopneus.it/wp-content/uploads/2018/06/01.-Copertone-selvaggio-1.pdf>; ultima consultazione 20/6/2022
22. Pergolizzi A, Dodaro F, Fontana E. I flussi illegali di pneumatici e PFU in Italia. Numeri, scenari e proposte. Osservatorio sui flussi illegali di pneumatici e PFU in Italia. 2020. Disponibile all’indirizzo: https://www.asso-airp.it/pdf/Dossier_PFU_web.pdf; ultima consultazione 20/6/2022
23. Almeida AP, Gonçalves YM, Novo MT, Sousa CA, Melim M, Grácio AJ. Vector monitoring of *Aedes aegypti* in the Autonomous Region of Madeira, Portugal. *Euro Surveill* 2007;15;12(11):E071115.6. doi: 10.2807/esw.12.46.03311-en.
24. Akiner MM, Demirci B, Babuadze G, Robert V, Schaffner F. Spread of the Invasive Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Black Sea Region Increases Risk of chikungunya, dengue, and Zika Outbreaks in Europe. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;26;10(4):e0004664.
25. European Centre for Disease P, Control. *The climatic suitability for dengue transmission in continental Europe*. Stockholm: ECDC; 2012.

PREVENZIONE DELL'INTRODUZIONE E DIFFUSIONE DI SPECIE ESOTICHE INVASIVE IN LOMBARDIA

Francesco Defilippo (a), Sabrina Canziani (a), Cristina Malucelli (a), Tiziana Trogu (a),
Mattia Calzolari (b), Giovanni Sala (c), Irene Bertoletti (d), Enrica Sozzi (a), Ana Moreno (a),
Davide Lelli (a), Antonio Lavazza (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, sede di Brescia

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, sede di Reggio Emilia

(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, sede di Binago

(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, sede di Sondrio

Introduzione

Le invasioni biologiche rappresentano una delle minacce più serie per la biodiversità del pianeta e per il funzionamento e il mantenimento degli ecosistemi (1).

Secondo Wilson (2010) (2), in termini di alterazioni della biodiversità ad opera dell'uomo, la diffusione di specie esotiche è seconda soltanto alla perdita e alla frammentazione degli habitat.

Diverse ricerche (3, 4) mostrano chiaramente come le invasioni biologiche di specie esotiche possano alterare la struttura delle comunità native delle aree invase.

Vitousek (5) indica tre vie principali attraverso le quali le specie invasive possono alterare gli ecosistemi:

- introducendo una diversa efficienza nell'uso e/o nell'approvvigionamento di risorse rispetto alle specie native;
- trasformando le catene trofiche (tramite, ad esempio, rimozione o aggiunta di un superpredatore);
- mutando il regime di disturbo (tipo, frequenza e/o intensità).

Alcuni autori (6,7) hanno tentato di quantificare l'impatto e gli effetti di specie introdotte sulle popolazioni, le comunità residenti e le loro interazioni con l'ecosistema. Le specie invasive mostrano spesso caratteristiche che conferiscono loro vantaggi all'interno dei nuovi habitat. Varie ricerche sulle invasioni biologiche (8, 9) pongono l'accento su alcune di queste caratteristiche che potrebbero permettere di prevedere il successo di una specie introdotta. Questi autori suggeriscono alcune principali generalizzazioni che definiscono il potenziale successo di specie invasive:

- ampia distribuzione e relativa abbondanza nei luoghi di origine;
- capacità di sopravvivere entro un'ampia gamma di tipologie di habitat;
- occupazione di nicchie "vacanti" nel nuovo ambiente;
- stretti rapporti con gli esseri umani che ne favoriscono la diffusione a distanza;
- elevato tasso riproduttivo;
- ridotti tempi di generazione;
- rapida espansione.

L'endemizzazione di zanzare invasive è un fenomeno comune e tra queste le specie appartenenti al genere *Aedes* sono particolarmente frequenti e importanti. Esistono attualmente cinque specie di zanzare *Aedes* invasive note per essersi stabilite in Europa, vale a dire *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *Aedes japonicus*, *Aedes atropalpus* e *Aedes koreicus*. *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* (10,11) sono i vettori incriminati nei recenti focolai di chikungunya e febbre

dengue in Europa. L'Italia, per la sua posizione nel Mediterraneo e per il clima, è particolarmente interessata da questo fenomeno, che purtroppo non appare facilmente contrastabile.

L'esempio più eclatante è quello della zanzara tigre (*Ae. albopictus*), segnalata per la prima volta in Italia negli anni '90 del secolo scorso, ma oggi è diventata ampiamente diffusa e, recentemente, sono state riportate segnalazioni sporadiche di presenza anche di *Aedes japonicus* e *Aedes koreicus*.

In particolare, *Aedes (Finlaya) koreicus* (Edwards, 1917) è una specie di zanzara invasiva proveniente dal sud-est asiatico dotata di una grande plasticità ecologica, capace di adattarsi quindi a condizioni climatiche e ecologiche molto diverse da quelle di origine. È stata ripetutamente rilevata in Europa negli ultimi anni: in Belgio nel 2008 (12), in Italia nel 2011 (13), in Svizzera nel 2013 (14) e in Germania nel 2015 (15). Questa specie si caratterizza per una minore termofilia rendendola adatta ad occupare aree anche collinari (16).

La conoscenza della presenza e della distribuzione di zanzare invasive (presenza/assenza e abbondanza) in un dato territorio è senza dubbi un dato epidemiologico basilare nella valutazione del rischio di trasmissione di malattie virali trasmesse da vettori alle popolazioni umane e animali che abitano tali aree.

In tal senso risulta importante valutare anche l'interazione con le specie native, in modo da valutare eventuali maggiori o minori rischi stagionali nella possibile diffusione di patologie legate ad un vettore piuttosto che all'altro (17). Questo rende necessario, in termini operativi, una collaborazione multidisciplinare in grado di coinvolgere diverse figure professionali quali entomologi, medici e veterinari, come già dimostrato dalla sorveglianza della *West Nile Disease* (WND), capace di svolgere un ruolo importante nella prevenzione della diffusione di patologie mediate da vettori.

Monitoraggio e metodi di campionamento per la valutazione della distribuzione di *Aedes koreicus* in Lombardia

Attività di campionamento e identificazione di specie

Aedes koreicus è stata ritrovata per la prima volta in Lombardia nelle provincie di Como e Sondrio nel 2015. Da allora l'Istituto Zooprofilattico Lombardia e Emilia-Romagna ha attivato una serie di attività volte a definire l'areale di distribuzione di questa specie esotica e a verificare la presenza di eventuali altre zanzare invasive nel territorio di competenza.

L'attività "esplorativa" della presenza di specie invasive in Lombardia ha previsto dei campionamenti mirati a diverse altitudini di tutti gli stadi di sviluppo della fauna culicidica presente in Lombardia. Tutti i campionamenti sono stati effettuati nel periodo compreso tra inizio giugno e fine ottobre negli anni 2018-2020. Il campionamento di adulti ha previsto l'uso di trappole CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) *light trap* a CO₂ utilizzate con cadenza quindicinale nel monitoraggio previsto dal piano di controllo e prevenzione regionale della WND. Il loro utilizzo ha permesso una copertura totale della Regione, essendo poste in modo da coprire ciascuna un quadrante di 20 km² di area (vedi Figura 1 a pag. 30).

A questo si è associato il campionamento tramite trappola BG-Sentinel® (*Biogents' mosquito trap*) (Figura 1) in alcune aree collinari, a partire dalle provincie lombarde in cui è stato rilevato il primo ritrovamento (Como e Sondrio). Similmente il monitoraggio larvale è iniziato dalle provincie di Como e Sondrio per poi spostarsi negli anni alle provincie limitrofe. Il campionamento larvale è stato eseguito su tutti i probabili siti di riproduzione, come bacini

di raccolta artificiali (contenitori, vasche per fontane, vasi) e habitat larvali di zanzara (cavità degli alberi, pozzanghere).

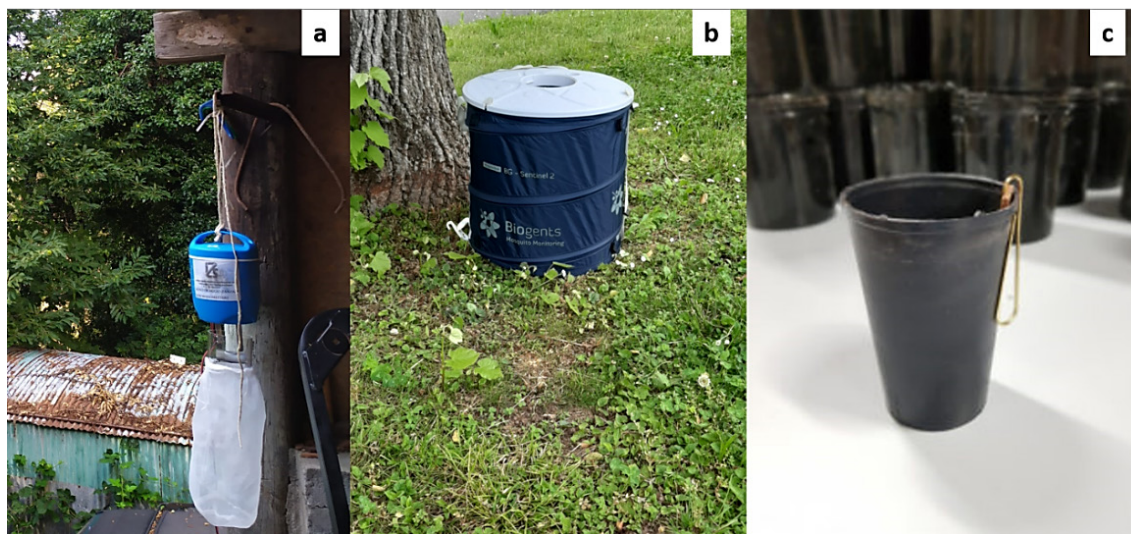


Figura 1. Trappole utilizzate per la verifica della presenza di *Aedes koreicus* in Lombardia: (a) Trappola CDC innescata a CO₂, (b) trappola BG-Sentinel, (c) Ovitrap

I siti oggetto del monitoraggio presentavano caratteristiche ecologiche differenti, prevedendo zone residenziali, aree industriali, cimiteri, garden center e fioristi, aree metropolitane con importanti vie di comunicazioni (prossimità di aeroporti). Le larve sono state raccolte utilizzando un mestolo standard. I campioni di larve sono stati fissati in alcol al 90%. In totale sono stati eseguiti, tra il 2018 e 2019, 33 campionamenti da 9 diverse località.

Tutti gli esemplari sono stati identificati morfologicamente (18, 19). Nei casi in cui il cattivo stato di conservazione degli esemplari non garantiva una sicura identificazione su base morfologica, si è reso necessario eseguire analisi biomolecolari per l'identificazione genetica della specie di appartenenza della zanzara, attraverso il sequenziamento dei due marcatori molecolari COI e ITS2, metodica ampiamente utilizzata per l'identificazione di svariate specie (20, 21).

L'anno 2019 ha previsto l'attività di monitoraggio di uova di *Aedes* spp. nelle provincie di Como, Varese, Bergamo, Sondrio e Brescia, eseguita dal personale delle rispettive Aziende Sanitarie Locali. La raccolta delle uova è stata eseguita tramite ovitrappe standard, caratterizzate da vasi neri con un diametro superiore a 8 cm riempiti con circa 300 mL di acqua, e 1 striscia di masonite come supporto per la deposizione delle uova (vedi Figura 1), posizionate dalla 31^a alla 41^a settimana, in 33 siti selezionati nelle provincie di Varese, Como, Brescia, Bergamo e Sondrio.

Come per i campionamenti larvali anche i siti per il campionamento delle uova presentavano caratteristiche ecologiche differenti prevedendo zone residenziali, aree industriali, cimiteri, e zone boschive (Tabella 1). Al fine di una corretta identificazione di specie, le uova sono state portate a maturazione e schiusa, secondo le linee guida FAO/IAEA 2017 (22). La determinazione di specie è stata eseguita sulle larve ottenute.

Tabella 1. Siti di posizionamento delle ovitrappole e numero di uova ritrovate, suddivise per settimana nel 2019

Provincia	Ambiente	Settimana											Tot.
		31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	
Bergamo	Residenziale				15	102	67			11			195
Brescia	Residenziale						0						0
Brescia	Residenziale		0		0		0			0			0
Como	Boschivo					334		276		70			680
Como	Residenziale					336							336
Como	Residenziale					280		225		0			505
Como	Residenziale					293		142					435
Como	Residenziale		46	16	21	36							119
Como	Residenziale	117	232		74	116							539
Como	Residenziale					65	55	0	38				158
Como	Residenziale		31	16	1	27							75
Como	Cimitero	7					0	0		0			7
Como	Industriale	13		57	110	134	105	0		21			440
Como	Industriale	120						116	255	4			495
Como	Boschivo					0	0	0	0				0
Como	Residenziale		0	0	14	0							14
Como	Boschivo	6	0	0	22								28
Como	Boschivo	0						0	0	0			0
Como	Residenziale	59			52	83	21						215
Sondrio	Boschivo				0								0
Sondrio	Residenziale				117	14	363		440				934
Sondrio	Residenziale					8	22	0		23	0	0	53
Sondrio	Residenziale				0	0							0
Sondrio	Industriale					52	110		10	39			211
Sondrio	Residenziale					0							0
Varese	Residenziale			51	181	160	430						822
Varese	Boschivo	78		19	42	82							221
Varese	Boschivo	13	45	73	123								254
Varese	Industriale			103			69	21	63				256
Varese	Industriale	191	126	63	192								572
Varese	Boschivo		61	299	212	467							1039
Varese	Residenziale	59	100		57	46							262
Varese	Residenziale	123	345			36							504

Dinamica e distribuzione di *Aedes koreicus* in Lombardia

Il sistema di sorveglianza della WND, che prevede l'uso di trappole CDC innescate a CO₂, ha permesso negli anni non solo di confermare la presenza di individui adulti di *Aedes koreicus* nelle provincie di Como e Sondrio, ma anche di rilevarne la presenza per la prima volta nelle provincie di Lecco, Bergamo, Varese e Milano (Figura 2). Questo evidenzia una diffusione di *Ae. koreicus* ancora in corso e una capacità di occupare areali anche di bassa quota. Similmente campionamenti mirati di adulti, utilizzando trappole BG-Sentinel, uniti al campionamento larvale ha dato modo di valutare la presenza di *Ae. koreicus* nelle provincie di Como, Lecco, Sondrio, Varese, Bergamo e Brescia); le aree a maggior diffusione sono comprese tra Como, Sondrio e Bergamo, dove si è registrato il maggior numero sia di larve che di adulti (Figura 3).

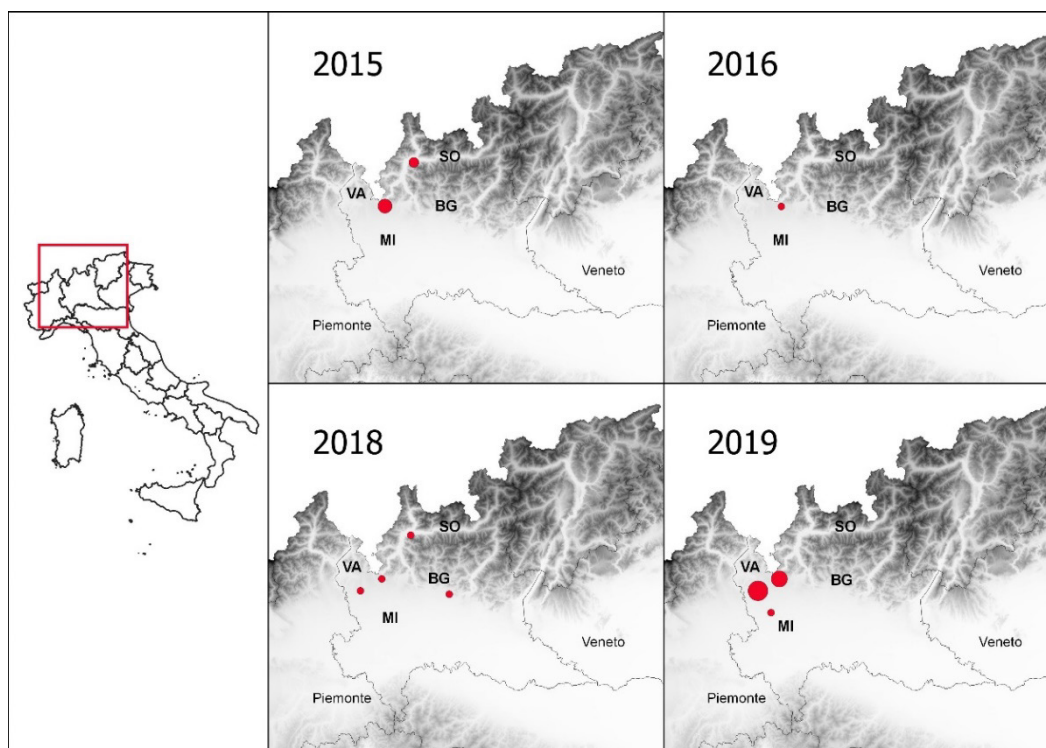


Figura 2. Adulti di *Aedes koreicus* campionati nell'ambito del piano di sorveglianza regionale della WND durante il periodo 2015-2019

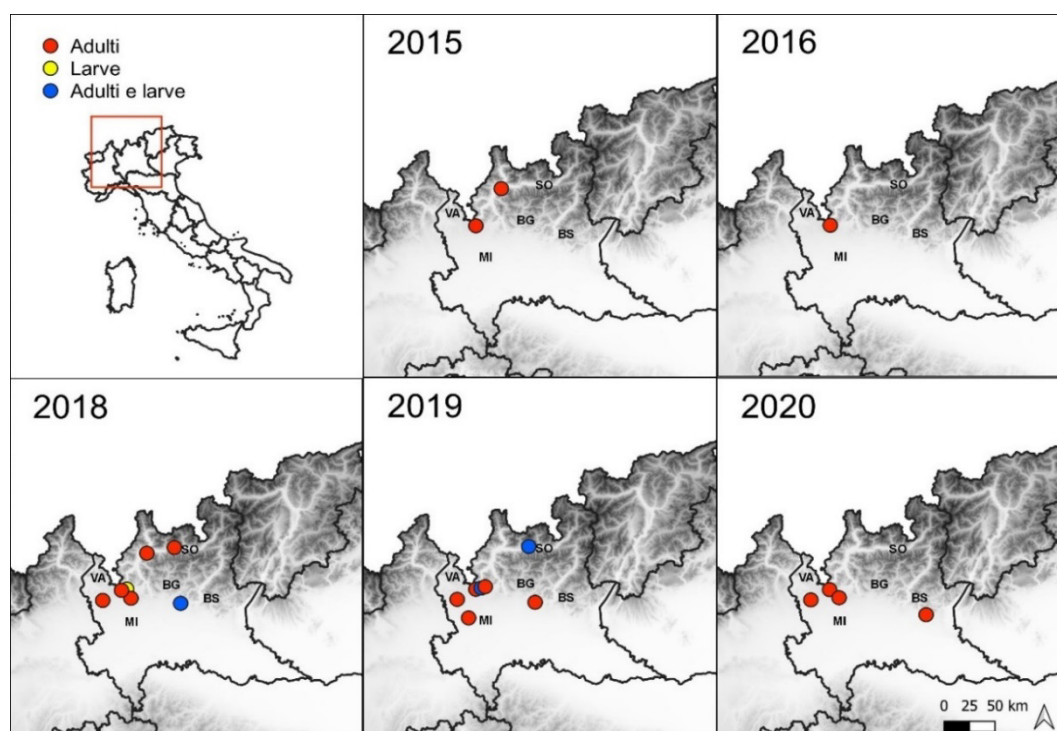


Figura 3. Diffusione di *Aedes koreicus* in Lombardia durante il periodo 2015-2020

I dati altimetrici hanno evidenziato che la maggior parte degli adulti campionati ricadono nella fascia 200-300 m s.l.m., mentre il campionamento larvale ha dato risultati maggiori in una fascia altimetrica tra 400-500 m s.l.m. (Figura 4).

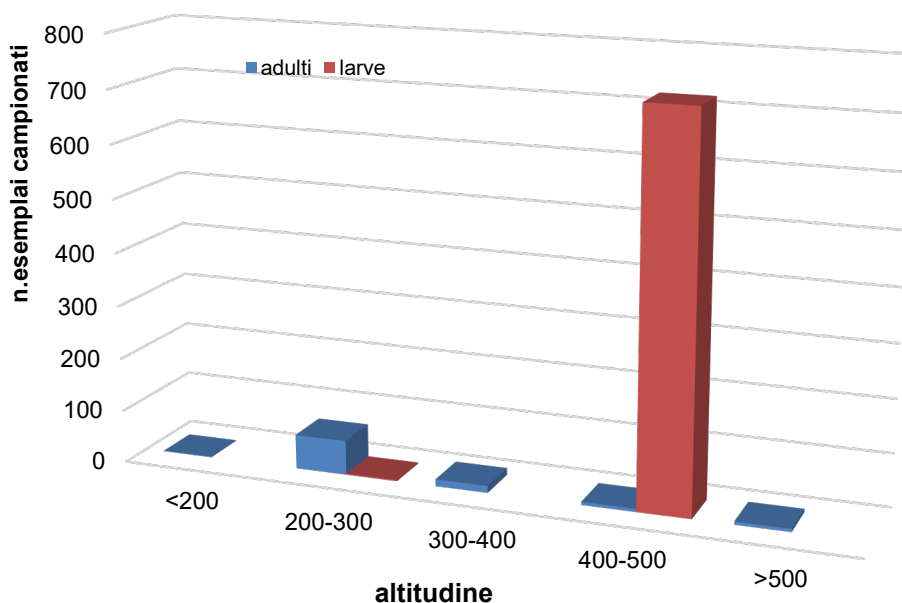


Figura 4. Numero totale di adulti e larve campionati in relazione al gradiente altimetrico durante il periodo 2015-2019

Il monitoraggio tramite ovitrappole ha prodotto in totale 9369 uova di *Aedes* sp. Alcuni siti hanno mostrato un elevato numero di uova per trappola, altri non hanno mai mostrato positività (vedi Tabella 1).

L'andamento del numero di uova deposte durante la stagione 2019 presenta un picco nella 35^a settimana, che però risulta dovuto ad un maggiore numero di ovitrappole posizionate in quella settimana, piuttosto che ad un aumento effettivo della deposizione da parte delle zanzare. Infatti, analizzando il numero medio di uova per ovitrappola (Figura 5), l'andamento della deposizione appare essere quasi costante.

Ciò potrebbe essere imputabile al differente profilo termico dei siti campionati, che favorirebbe una traslazione temporale dei picchi nelle varie stazioni e un appiattimento della curva del numero di uova nel tempo.

I siti in cui l'ovideposizione è stata maggiore sono quelli caratterizzati da un ambiente industriale e/o residenziale. Il cimitero non ha permesso un buon campionamento probabilmente per la presenza di altri potenziali siti larvali (più adatti) o per eventuali attività di disinfestazione previste generalmente per questi ambienti (Figura 6).

Quasi tutte le larve ottenute dalla schiusa delle uova appartenevano alla specie *Ae. albopictus*. Larve appartenenti alla specie *Ae. koreicus* si sono sviluppate solo in due siti della provincia di Como nella 33^a, 34^a e 35^a settimana, entrambi aventi elementi di zone industriale.

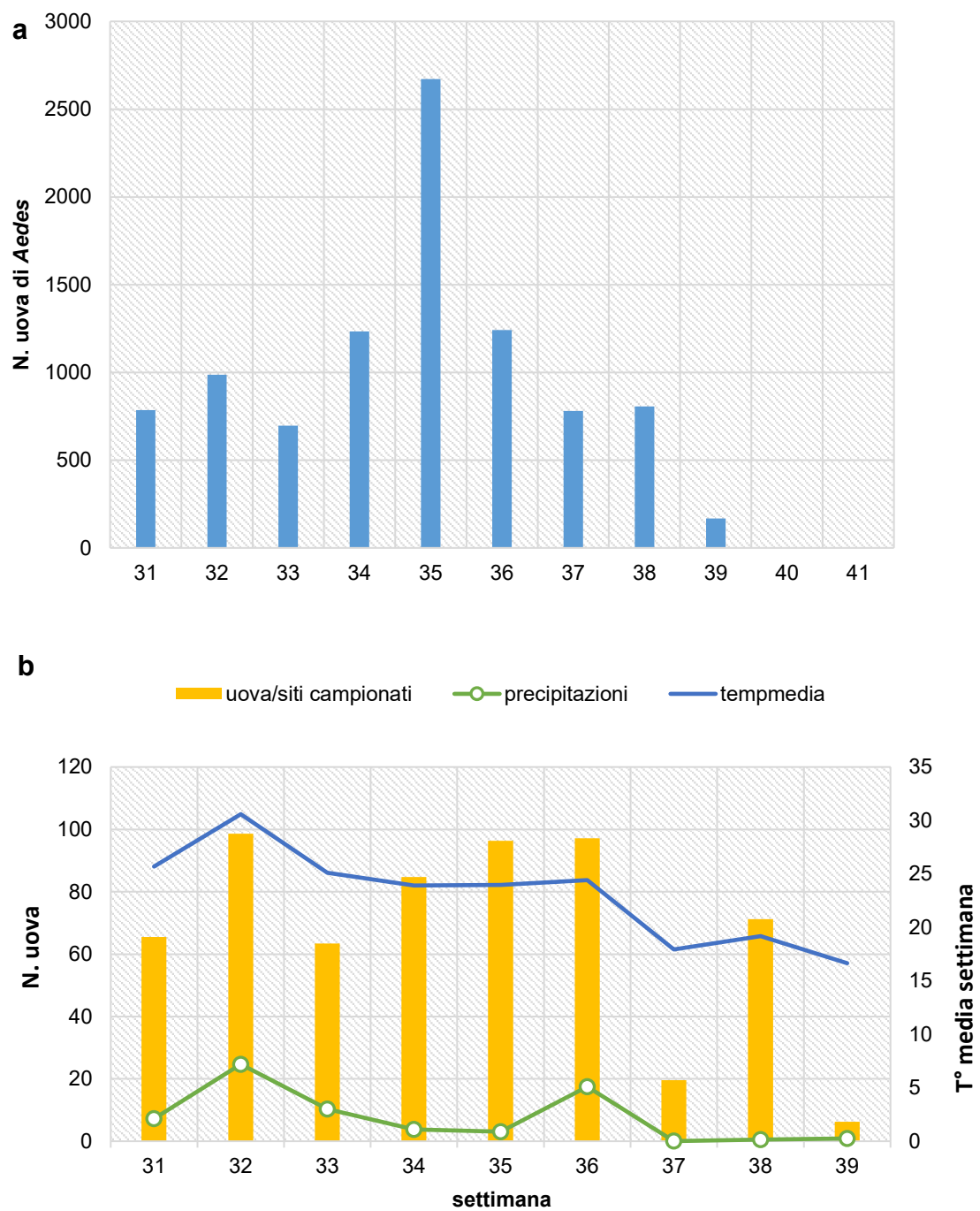


Figura 5. Numero cumulativo delle uova di Aedes spp. (a) e del numero di uova medio per ciascuna trappola per settimana (b) campionate durante la stagione 2019 in Lombardia

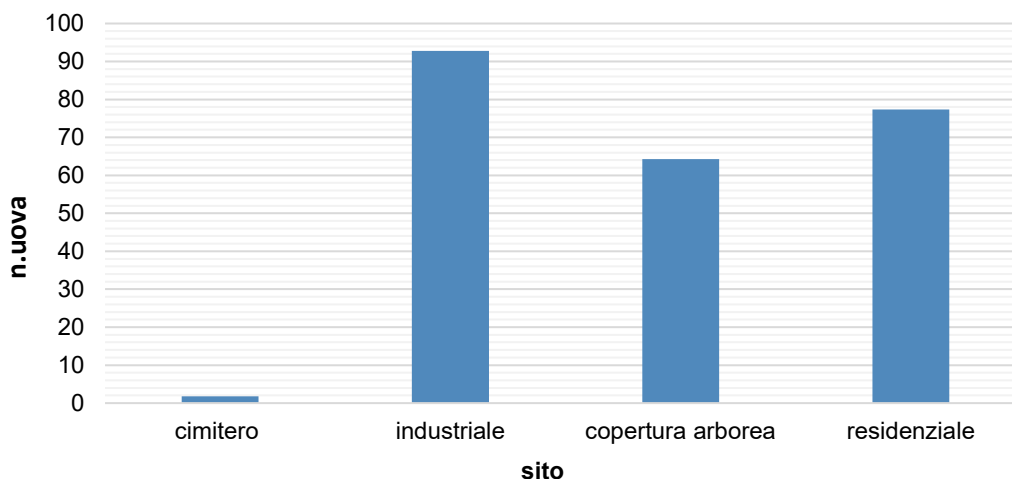


Figura 6. Numero di uova di *Aedes* spp. per trappola e per tipologia di sito durante la stagione 2019 in Lombardia

Discussione e conclusioni

Come ormai evidente da tempo, la globalizzazione dei commerci e dei viaggi ha fortemente facilitato la diffusione di molte specie animali e vegetali al di fuori del loro areale di distribuzione naturale. Nei nuovi ambienti, una certa parte di queste specie è causa di danni agli equilibri ambientali, alle attività agricole e alla salute pubblica. Gli insetti ne costituiscono il gruppo predominante con oltre 1300 specie. Tra gli insetti, diverse specie di zanzara hanno trovato condizioni favorevoli all'insediamento stabile: come la ben nota *Aedes albopictus*, anche *Aedes koreicus* e *Aedes japonicus* stanno colonizzando vaste aree del Nord Italia e del Centro Europa.

Le invasioni biologiche non sono necessariamente un fenomeno inevitabile, infatti, costituiscono solo una conseguenza – o meglio, l'esito meno probabile – di un processo a più stadi, che inizia quando gli organismi sono trasportati dai loro areali originari verso nuove zone (23). Anche se vi è una certa confusione riguardo alla terminologia utilizzata (24), vi è un sostanziale consenso generale circa le fasi che descrivono il processo di invasione:

1. *Introduzione* (dispersione di propaguli in un sito oltre la loro iniziale area geografica);
2. *Insedimento* (formazione di una popolazione vitale che possa persistere senza ulteriore input di nuovi propaguli);
3. *Diffusione* (accrescimento e dispersione delle popolazioni nei nuovi territori);
4. *Impatto* (effetti a breve e lungo termine sulle specie native e l'ambiente).

L'attuale scenario di *Ae. koreicus* in Lombardia sembra rappresentare la terza fase, caratterizzata da occasionale dispersione a lunga distanza e formazione di nuove colonie isolate (vedi Figura 4). Tuttavia, non possiamo definire se la presenza di *Aedes koreicus* sia dovuta ad una introduzione dalla Svizzera (dove la specie è presente), o derivi dalle Regioni del Veneto e del Trentino-Alto Adige, regioni nelle quali è stata comprovata la presenza di questa specie. Il primo ritrovamento a Como, e solo successivamente nelle aree ad est di questa provincia fanno propendere per una possibile introduzione dalla Svizzera. La presenza di *Ae. koreicus* in nuove

province rispetto agli anni passati comunque indica e conferma l'espansione di questa specie sul territorio lombardo.

L'attività di campionamento ha comunque dato la possibilità di definire alcune importanti conclusioni meritevoli di ulteriori e futuri approfondimenti:

1. Gli habitat maggiormente interessati da una possibile presenza di *Ae. koreicus* potrebbero coincidere con aree industriali o zone in cui si concentrano una ampia varietà di raccolte d'acqua artificiali
2. Il solo uso delle ovitrappole non rappresenta probabilmente il metodo migliore di monitoraggio. Sarebbe necessario affiancare ad esse l'uso di *gravid trap* e/o campionamento larvale, similmente a quanto impostato in altri paesi europei dove la presenza di *Ae. koreicus* è stata confermata ormai da diversi anni (Belgio, Germania, Ungheria). L'utilizzo delle ovitrappole ha comunque confermato quanto già riportato in letteratura (16) e cioè che la coesistenza larvale di *Ae. koreicus* e *Ae. albopictus* sono osservabili, ma non comuni.
3. L'assenza di uova di *Ae. koreicus* nelle ovitrappole (tranne alcune deposte a fine agosto) avvalorare la tesi di una possibile competizione per i siti larvali con *Ae. albopictus*. Infatti, i diversi tempi di sviluppo a parità di temperatura ambientale (più lenti per le larve di *Ae. koreicus* rispetto ad *Ae. albopictus*) e la grande capacità riproduttiva di *Ae. albopictus* rispetto ad *Ae. koreicus* potrebbe costringere quest'ultima a deporre le uova a primavera e autunno e/o comunque in siti larvali non scelti dalla zanzara tigre (25).
4. Le osservazioni su base altimetrica hanno confermato la sua maggiore resistenza, rispetto a *Ae. albopictus*, alle basse temperature (18). Infatti, la maggior parte dei siti larvali positivi sono stati osservati in ambienti compresi tra 400-500 m s.l.m.
5. Se l'intensità del monitoraggio entomologico è adeguata si avrà la possibilità di intercettare specie di vettori e/o patogeni di nuova introduzione, così come dimostrato nel caso del ritrovamento di adulti di *Ae. koreicus* durante il campionamento previsto dal piano di sorveglianza del virus West Nile.

In questo contesto e alla luce dei risultati ottenuti risulta altresì importante una attenta valutazione dell'impatto del surriscaldamento globale sulla diffusione dei vettori a più alte latitudini e localmente ad altitudini più elevate, contribuendo nel tempo ad una sempre più rapida modifica della struttura delle comunità di vettori in ecosistemi specifici (es. zone rurali, zone antropizzati, o zone a diverse altitudini) e a un maggior rischio di trasmissione di malattie infettive mediate da zanzare esotiche-invasive.

Bibliografia

1. Wilcove DS, Rothstein D, Dubow J, Phillips A, Losos E. Quantifying threats to imperiled species in the United States. *Bioscience* 1998;48:607-15.
2. Wilson KA, Meijaard E, Drummond S, Grantham HS, Boitani L, Catullo G, Christie L, Dennis R, Dutton I, Falcucci A, Maiorano L, Possingham HP, Rondinini C, Turner WR, Venter O, Watts M. Conserving biodiversity in production landscapes. *Ecological Applications* 2010;20(6):1721-32
3. Nichols FH, Thompson JK, Schemel LE. Remarkable invasion of San Francisco Bay (California, USA) by the Asian clam *Potamocorbula amurensis*. II. Displacement of a former community. *Marine Ecology Progress Series* 1990;66:95-101.
4. D'Antonio CM, Vitousek PM. Biological invasions by exotic grasses, the grass-fire cycle, and global change. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1992;23:63-87.
5. Vitousek PM. Biological invasions and ecosystem processes: towards an integration of population biology and ecosystem studies. *Oikos* 1990;57(1):7-13

6. Parker JD, Hay ME. Biotic resistance to plant invasions? Native herbivores prefer non-native plants. *Biology Letters* 2005;8:959-67.
7. Ruiz GM, Fofonoff P, Hines AH. Non-indigenous species as stressors in estuarine and marine communities: Assessing invasion impacts and interactions. *Limnology and Oceanography* 1999;44(3):950-72.
8. Brown JH. Patterns, mode and extents of invasions by vertebrates. In: Drake JA, Mooney HA, Di Castri F, Groves RH, Kruger FJ, Rejmanek M, Williamson M (Ed.). *Biological invasions: a global perspective*. Chichester, UK: Wiley; 1989. p. 85-109
9. Collado-Vides L. Clonal architecture in marine macroalgae: ecological and evolutionary perspectives. *Evolutionary ecology* 2001;15:531-5
10. Schaffner F, Medlock JM, van Bortel W. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 2013;19:685-92.
11. Seixas G, Salgueiro P, Bronzato-Badial A, Gonçalves Y, Reyes-Lugo M, Gordicho V, Ribolla P, Viveiros B, Clara Silva A, Pinto J, Sousa CA. Origin and expansion of the mosquito *Aedes aegypti* in Madeira Island (Portugal). *Scientific Reports* 2019;9:2241 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38373-x>.
12. Versteirt V, De Clercq EM, Fonseca DM, Pecor J, Schaffner F, Coosemans M, van Bortel W. Bionomics of the established exotic mosquito species *Aedes koreicus* in Belgium, Europe. *Journal of Medical Entomology* 2012;9(6):1226-32.
13. Capelli G, Drago A, Martini S, Montarsi F, Soppelsa M, Delai N, Ravagnan S, Mazzon L, Schaffner F, Mathis A, Di Luca M, Romi R, Russo F. First report in Italy of the exotic mosquito species *Aedes* (Finlaya) *koreicus*, a potential vector of arboviruses and filariae. *Parasites & Vectors* 2011;4:188.
14. Suter T, Flacio E, Fariña Bf, Engeler L, Tonolla M, Müller P. First report of the invasive mosquito species *Aedes koreicus* in the Swiss-Italian border region. *Parasites & Vectors* 2015;8:402.
15. Werner D, Zielke De, Kampen H. First record of *Aedes koreicus* (Diptera: Culicidae) in Germany. *Parasitology Research* 2015;115:1331-4.
16. Montarsi F, Drago A, Martini S, Calzolari M, Defilippo F, Bianchi A, Mazzucato M, Ciocchetta S, Arnoldi D, Baldacchino F, Rizzoli A, Capelli G. Current distribution of the invasive mosquito species, *Aedes koreicus* [Hulecoeteomyia koreica] in northern Italy. *Parasites & Vectors* 2015;8:614.
17. Marini G, Guzzetta G, Baldacchino F, Arnoldi D, Montarsi F, Capelli G, Rizzoli A, Merler S, Rosà R. The effect of interspecific competition on the temporal dynamics of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens*. *Parasites & Vectors* 2017;10(1):102.
18. Miyagi I. Notes on the *Aedes* (Finlaya) *chrysolineatus* Subgroup in Japan and Korea (Diptera: Culicidae). *Tropical Medicine* 1971;13(3):141-51.
19. Montarsi F, Martini S, Dal Pont M, Delai N, Ferro Milone N, Mazzucato M, Soppelsa F, Cazzola L, Cazzin S, Ravagnan S, Ciocchetta S, Russo F, Capelli G. Distribution and habitat characterization of the recently introduced invasive mosquito *Aedes koreicus* [Hulecoeteomyia koreica], a new potential vector and pest in north-eastern Italy. *Parasites & Vectors* 2013;6:292.
20. Marinucci M, Romi R, Mancini P, Di Luca M, Severini C. Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the *Maculipennis* complex inferred from ITS2 sequence analysis. *Insect Molecular Biology* 1999;8(4):469-80.
21. Jalali S, Ojha R, Venkatesan T. DNA barcoding for identification of agriculturally important insects. In: Chakravarthy AK (Ed.). *New horizons in insect science: towards sustainable pest management* Springer; India, 2015. p. 13-23.
22. Guidelines for mass-rearing of *Aedes* mosquitoes. In: Maiga H, Mamai W, Yamada H, Argilés Herrero R, Bouyer J (Ed.). *Insect Pest Control Section, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture*; Vienna (Austria), 2020. p. 24.

23. Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, Evans H, Clout M, Bazzaz FA. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 2000;10(3):689-710.
24. Richardson DM, Pyšek P, Rejmánek M, Barbour MG, Panetta FD, West CJ. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distribution* 2000;6:93-107.
25. Kurucz K, Manica M, Delucchi L, Kemenesi G, Marini G. Dynamics and distribution of the invasive mosquito *Aedes koreicus* in a temperate European city. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020;17:2728.

PREVENZIONE DELL'INTRODUZIONE E DIFFUSIONE DI SPECIE ESOTICHE INVASIVE IN VENETO, TRENTINO E FRIULI VENEZIA GIULIA

Alice Michelutti, Fabrizio Montarsi

Laboratorio di Parassitologia, Micologia ed Entomologia Sanitaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

Il commercio a livello globale, la movimentazione di persone, uniti ai cambiamenti climatici e ambientali, aumentano il rischio di introduzione di zanzare esotiche e il loro adattamento a nuovi ambienti. In particolare, le zanzare appartenenti al genere *Aedes* sono in grado di diffondersi e colonizzare nuove aree, essendo in grado di deporre uova resistenti alla disidratazione in contenitori artificiali (es. copertoni usati) e piante che trattengono acqua (es. bromeliacee).

Le zanzare rappresentano un problema rilevante per la sanità pubblica esercitando un'azione di disturbo e fastidio nei confronti della popolazione, soprattutto quando presenti a densità elevate. L'aspetto più importante riguarda però la loro capacità di trasmettere agenti patogeni agli animali e all'uomo.

In Europa focolai endemici ed epidemici di malattie trasmesse dalle zanzare sono sempre stati registrati, tuttavia, le occasioni di introduzione di vettori e patogeni sono aumentate e alcune di queste malattie stanno emergendo, o riemergendo dopo una lunga assenza, mentre altre si stanno diffondendo. Sono un esempio i recenti focolai di dengue e chikungunya nell'area mediterranea veicolati da una zanzara invasiva, *Aedes albopictus*, conosciuta anche come zanzara tigre.

L'introduzione di una specie invasiva non è un evento immediatamente associato alla comparsa di malattie trasmesse dalle zanzare. La zanzara tigre, ad esempio, era presente in Italia da almeno 17 anni prima che giocasse avesse il ruolo di vettore in un focolaio di chikungunya, mentre in altri Paesi, focolai di dengue e chikungunya sono stati rilevati solo quattro anni dopo che *Ae. albopictus* si era stabilizzata in quel territorio. Questo dimostra come il periodo di tempo che intercorre tra l'acclimatazione di una specie invasiva e l'insorgenza di un focolaio di malattia trasmessa dalle zanzare è variabile e dipendente da diversi fattori, quali l'introduzione dell'agente patogeno, la competenza vettoriale della popolazione presente e la frequenza del contatto ospite-vettore. Anche le condizioni climatiche influenzano i tempi di replicazione e disseminazione del patogeno nel vettore, oltre all'attività del vettore stesso (come il tempo di sopravvivenza, l'intensità dell'attività e il tempo di sviluppo). Questa correlazione può essere utilizzata per predire la distribuzione delle zanzare sulla base delle esigenze ecologiche della specie e le prospettive future del cambiamento climatico.

La sorveglianza delle zanzare invasive mira a rilevare precocemente la presenza di una specie introdotta in un nuovo territorio, monitorarne l'acclimatazione e la diffusione, incrementare le misure di controllo e definire il rischio sanitario conseguente alla sua introduzione. Il rilevamento delle zanzare nelle fasi iniziali dell'introduzione, determinerà l'adozione di misure di controllo efficaci, aumentando la probabilità di risoluzione del problema.

Se la specie invasiva è già presente e diffusa nel territorio, le attività di sorveglianza devono mirare alla definizione del rischio per la salute dell'uomo, considerando sia l'azione di disturbo (aggressività nei confronti dell'uomo, ipersensibilità alle punture, fobie, etc.), sia la trasmissione di patogeni. La sorveglianza, in questo caso, fornisce il supporto necessario per pianificare misure di controllo sanitario (limitando l'azione di disturbo) e di prevenzione delle malattie (riducendo il rischio di trasmissione).

Se necessario, le attività comprendono la definizione del rischio sanitario per gli animali e la valutazione degli effetti negativi sulla biodiversità.

L'Italia per le sue caratteristiche climatiche e ambientali, offre molti habitat favorevoli all'adattamento e sviluppo di zanzare invasive. In particolare, nelle Regioni del nord-est, dove è stata registrata per la prima volta l'introduzione di due nuove specie invasive, in aggiunta alla zanzara tigre, la sorveglianza viene condotta secondo le indicazioni riportate nelle linee guida europee (*Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe*) dell'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), adattate al contesto nazionale e all'esperienza acquisita grazie a diversi anni di monitoraggio (1).

Inizialmente, in queste Regioni, le attività di sorveglianza delle zanzare invasive sono state avviate per monitorare l'espansione della zanzara tigre, a partire dalla provincia di Padova, dove era stata segnalata per la prima volta (2). Grazie a questa attività, nel 1996 è stata trovata un'altra zanzara invasiva, *Aedes atropalpus* (3), specie di origine nord-americana, che non si è adattata alle condizioni ambientali e climatiche del territorio e, dopo questa segnalazione, non è più stata osservata.

A differenza di quanto accaduto per *Ae. atropalpus*, *Ae. albopictus* si è ben acclimatata e nel 2006 ha occupato tutte le province del Veneto e del Friuli Venezia Giulia. Negli anni successivi al primo ritrovamento, è stato messo in atto un piano di sorveglianza per definire i limiti latitudinali e altitudinali dell'areale di distribuzione di *Ae. albopictus*.

Il metodo di sorveglianza principalmente utilizzato è stato la ricerca attiva di focolai larvali, ad opera di esperti entomologi e del personale dei Dipartimenti di Prevenzione delle Aziende Sanitarie Locali (ASL) territorialmente competenti. Grazie a questo monitoraggio, nel comune di Sospirolo (BL), un'area in cui la presenza della zanzara tigre non era ancora stata segnalata, è stata trovata una nuova *Aedes* invasiva, *Aedes koreicus* (4). In seguito alla segnalazione di *Ae. koreicus* nel comune bellunese, la sorveglianza delle zanzare invasive è stata intensificata, monitorando le municipalità confinanti, mediante ricerca dei focolai larvali. Questa attività ha permesso di monitorare costantemente l'espansione di *Ae. koreicus* negli anni successivi (5).

Parallelamente all'introduzione e all'estensione dell'areale di distribuzione di *Ae. koreicus*, nel 2015 è stata osservata un'ulteriore specie esotica di *Aedes*, *Aedes japonicus*, al confine con l'Austria, da parte degli entomologi della Carinzia (6). Come per *Ae. koreicus*, sono state intensificate le attività monitoraggio dei focolai larvali per valutare l'estensione della specie sul territorio, partendo dai comuni in cui è stata inizialmente segnalata, proseguendo con quelli confinanti (7).

La ricerca dei focolai larvali delle zanzare del genere *Aedes* ha previsto l'ispezione di piccole raccolte d'acqua, in particolare contenitori per la raccolta dell'acqua piovana, utilizzata per l'irrigazione di giardini e orti privati, vasi e sottovasi presenti in ambienti sia domestici che pubblici (es. cimiteri). Piccole raccolte d'acqua sono state frequentemente trovate nei depositi di materiale agricolo o edile, cantieri, o ambienti in stato di abbandono. Negli spazi pubblici sono stati esaminati anche i tombini, come abitualmente avviene nell'ambito della sorveglianza delle attività di disinfestazione. Le larve raccolte sono trasportate al laboratorio per l'identificazione di specie all'interno di provette o contenitori di plastica, avendo cura di lasciare una sufficiente quantità d'aria per la respirazione di larve e pupe. Inoltre, per evitare l'eccessivo riscaldamento dell'acqua (e la morte degli esemplari raccolti) durante il trasporto, i campioni sono mantenuti all'interno di cassette termiche.

Ogni sito di campionamento è stato georeferenziato, per permettere l'elaborazione di una mappa di distribuzione delle specie invasive, aggiornata annualmente. A partire da questa, è definito il piano di monitoraggio per l'anno successivo, mantenendo lo stesso tipo di approccio sopra descritto, basato sulla ricerca attiva dei focolai larvali, nei comuni limitrofi a quelli già positivi. In Figura 1 è riportata la mappa di distribuzione delle *Aedes* invasive aggiornata a dicembre 2020, mentre in Tabella 1 è riportato l'elenco dei comuni campionati nel corso della sorveglianza delle zanzare invasive dal 2011 al 2020 e il numero di comuni risultati positivi a *Ae. koreicus* e *Ae. japonicus*.

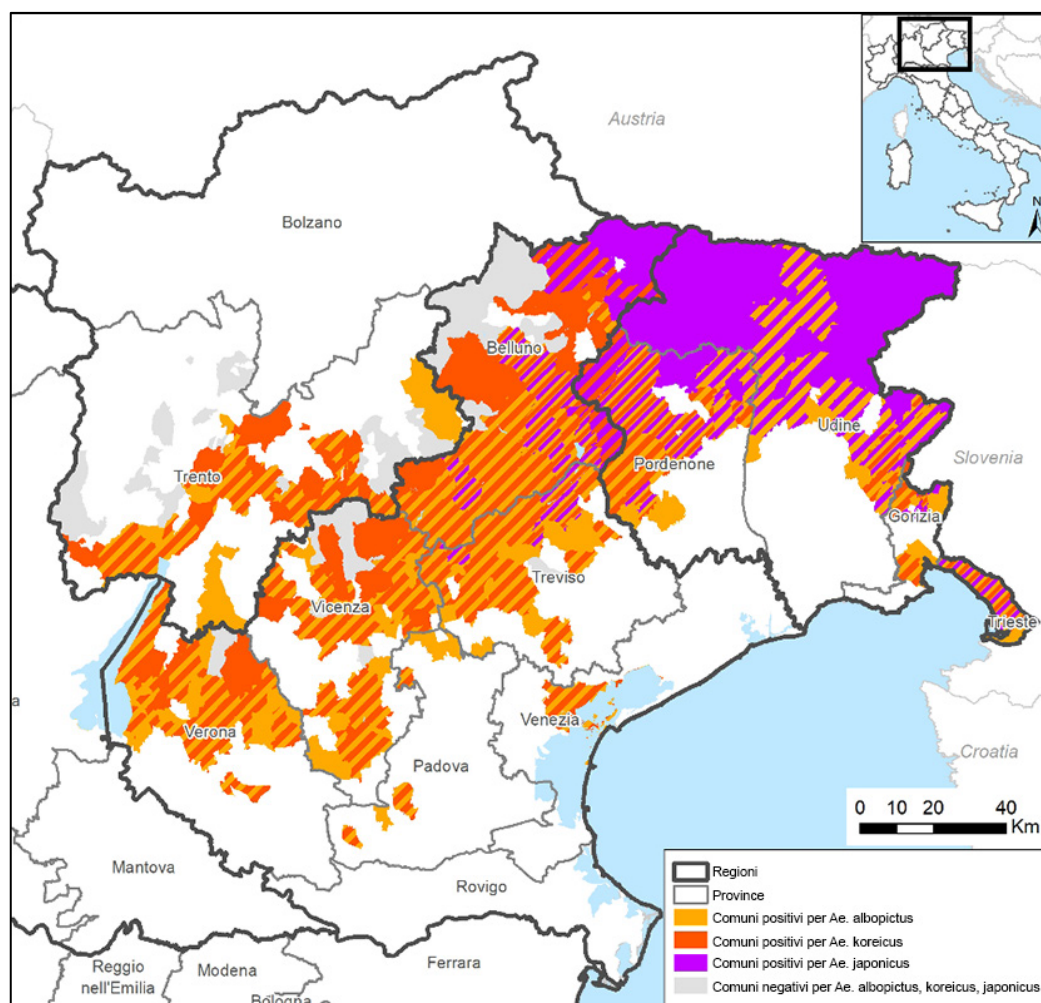


Figura 1. Mappa di distribuzione delle *Aedes* invasive nel territorio del nord-est Italia, aggiornata a dicembre 2020

Tabella 1. Numero di comuni campionati durante la sorveglianza per le zanzare invasive dal 2011 al 2020 e numero di comuni positivi per *Aedes koreicus* e *Aedes japonicus*

Regione	Provincia	Comuni monitorati	<i>Ae. koreicus</i>	<i>Ae. japonicus</i>	<i>Ae. koreicus</i> e <i>Ae. japonicus</i>
Veneto	Belluno	66	50	15	10
Veneto	Padova	8	4	0	0
Veneto	Treviso	53	32	6	6
Veneto	Venezia	1	1	0	0
Veneto	Verona	45	33	0	0
Veneto	Vicenza	70	48	0	0
Friuli Venezia Giulia	Gorizia	16	9	7	5
Friuli Venezia Giulia	Pordenone	26	18	17	11
Friuli Venezia Giulia	Trieste	6	4	4	4
Friuli Venezia Giulia	Udine	84	5	73	3
Prov. Aut. Trento	Trento	27	18	0	0
Totale complessivo		402	222	122	39

L'identificazione morfologica è abitualmente eseguita osservando i caratteri visibili sulle larve al quarto stadio di sviluppo o sugli esemplari adulti, descritti nelle linee guida dello European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (1) e in altre pubblicazioni scientifiche (8, 9).

Nei casi in cui si osservi una specie invasiva per la prima volta in una municipalità, l'identificazione morfologica è confermata dall'analisi molecolare. Il protocollo utilizzato si basa sull'amplificazione del gene mitocondriale ND4 – tramite *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) usando come fluoroforo il SYBR Green – seguito dal sequenziamento (10).

Nelle aree in cui le *Aedes* invasive sono ben acclimatate (ritrovamenti ripetuti in più anni successivi) sono state condotte indagini ulteriori, volte all'acquisizione di informazioni relative alla biologia ed ecologia di queste specie e alla definizione dei metodi di cattura degli esemplari adulti più efficienti.

Con queste finalità, il piano di monitoraggio è stato integrato, affiancando ai campionamenti larvali altri metodi di cattura delle zanzare. Tra i diversi metodi di cattura, le ovitracce sono state le più utilizzate. Queste hanno costituito il principale sistema di monitoraggio nei comuni notoriamente positivi alle *Aedes* invasive. In questi territori, grazie alla collaborazione dei Dipartimenti di Prevenzione delle ASL territorialmente competenti, il cui personale ha contribuito al posizionamento delle trappole e alla gestione dei campioni, è stato possibile acquisire informazioni in merito alle dinamiche di popolazione delle *Aedes* invasive e monitorare l'efficacia dei programmi di disinfestazione nei territori comunali; inoltre, il monitoraggio con le ovitracce ha permesso di rilevare la presenza di *Ae. japonicus* in nuove aree dove non risultavano segnalazioni (7). Infine, a partire dalle uova raccolte nel corso del monitoraggio, è stata ottenuta una colonia stabile di *Ae. koreicus*, mantenuta presso lo stabulario dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe).

Le ovitracce sono state utilizzate anche per il monitoraggio dei *Point of Entry*, punti ad alto rischio di introduzione delle zanzare invasive, come porti e aeroporti. Nello specifico sono state posizionate nel porto di Marghera (VE) e nell'aeroporto di Venezia, siti monitorati dal 2018 al 2020 e nell'aeroporto di Treviso, sito monitorato negli anni 2018 e 2019 (nel 2020 non è stato oggetto di monitoraggio poiché non operativo a causa dell'emergenza sanitaria COVID-19). All'interno di ciascuna area, sono state posizionate 7-10 ovitracce, ad una distanza di 250 m circa l'una dall'altra. I campioni sono stati raccolti settimanalmente a partire da giugno, fino a ottobre. Le uova sono state fatte schiudere nello stabulario dell'IZSVe, prima di procedere all'identificazione di specie sulle larve al quarto stadio di sviluppo. L'andamento dell'abbondanza delle uova di *Aedes* raccolte nell'ambito della sorveglianza dei *Point of Entry* è riportato in Figura 2.

La sorveglianza dei *Point of Entry* è stata implementata nel 2019, posizionando delle trappole per la cattura degli esemplari adulti, specifiche per le zanzare del genere *Aedes* (BG-Sentinel®, *Biogents' mosquito trap* con lure). Come le ovitracce, anche le BG-Sentinel, in numero di tre per ciascun sito monitorato, sono state mantenute attive in modo continuato per una settimana, al termine della quale si è provveduto a raccogliere gli esemplari catturati.

Entrambe le tipologie di trappole sono state efficaci nel rilevare precocemente l'introduzione delle *Aedes* invasive in aree in cui la loro presenza non era ancora stata segnalata: ne è un esempio il ritrovamento di *Ae. koreicus* nell'aeroporto di Venezia nel 2018 (esemplare catturato allo stadio di uovo, in un'ovitracca raccolta il 12 luglio) e la cattura di un adulto nel 2020 (esemplare adulto catturato mediante BG-Sentinel, il 15 luglio). Le due segnalazioni sono rimaste puntiformi, non essendo stati trovati ulteriori esemplari di questa specie nelle aree circostanti l'aeroporto, dove si è provveduto ad operare una ricerca mirata, ispezionando i focolai larvali. Analogamente, nell'aeroporto di Treviso sono stati catturati due esemplari adulti di *Ae. koreicus* nel 2019

(rispettivamente il 29 luglio e il 8 ottobre). Anche in questo caso si tratta di segnalazioni isolate, dal momento che la specie non è stata osservata nel corso dei monitoraggi successivi.

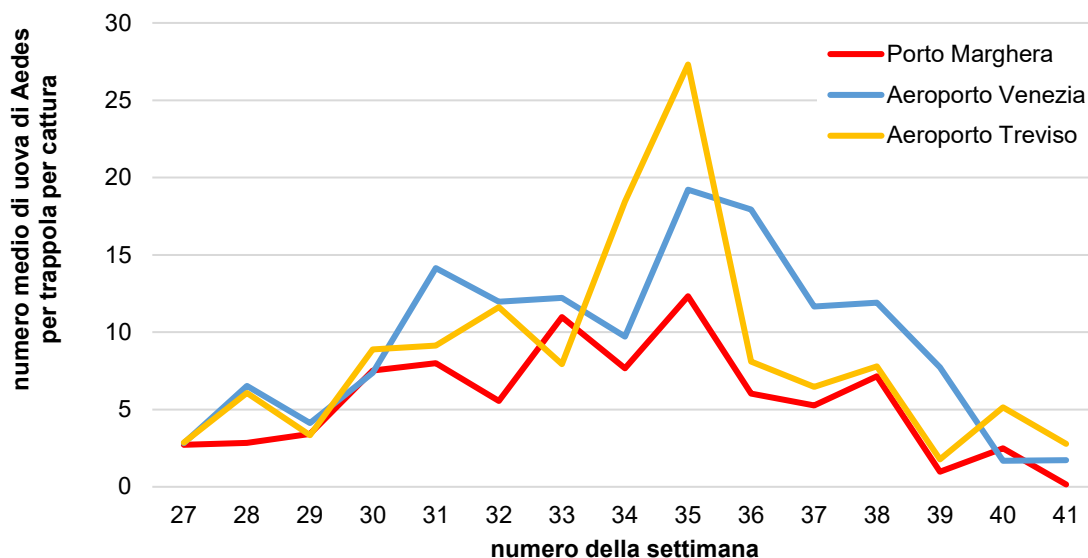


Figura 2. Andamento stagionale del numero medio di uova/cattura di *Aedes* nei *Point of Entry* dal 2018 al 2020 in Veneto

Ulteriori studi di campo sono stati condotti per approfondire alcuni aspetti biologici di *Ae. koreicus*, come la valutazione del grado di antropofilia e della preferenza d'ospite, al fine di definire l'eventuale suo coinvolgimento nella trasmissione di patogeni all'uomo, alla luce dell'aumento delle densità di popolazione e dell'estensione dell'areale di distribuzione. Il comportamento antropofilo di questa specie è stato valutato utilizzando il metodo di cattura dell'uomo-esca (*Human Landing Catch*) nelle aree in cui *Ae. koreicus* è da tempo acclimatata, come i comuni di Belluno, Feltre e Sospirolo (provincia di Belluno) e di Castel Ivano e Grigno (provincia di Trento). Per valutare la preferenza d'ospite sono state catturate, mediante aspirazione, le femmine ingorgate che si trovavano nei siti di riposo, in prossimità dei ricoveri per gli animali in aziende agricole, agriturismi e allevamenti a conduzione familiare. Le femmine ingorgate sono state sottoposte ad analisi molecolare per l'identificazione della specie ospite (11) su cui hanno compiuto il pasto di sangue. I risultati di questi studi sono tuttora in corso.

Le attività di sorveglianza delle zanzare invasive continueranno secondo le modalità sopra descritte anche nei prossimi anni, vista la velocità di espansione delle *Aedes* invasive in nuovi territori e la necessità di avere una mappa aggiornata della loro distribuzione, alla luce del crescente rischio di introduzione e diffusione delle malattie trasmesse dalle zanzare.

Bibliografia

1. European Centre for Disease prevention and Control. *Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe*. Stockholm: ECDC; 2012. Disponibile all'indirizzo: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/guidelines-surveillance-invasive-mosquitoes-europe>; ultima consultazione 20/6/2022
2. Dalla Pozza G, Majori G. First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *J Am Mosq Control Assoc* 1992;8(3):318-20.

3. Romi R, Sabatinelli G, Savelli LG, Raris M, Zago M, Malatesta R. Identification of a North American mosquito species, *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae), in Italy. *J Am Mosq Control Assoc* 1997;13(3):245-6.
4. Capelli G, Drago A, Martini S, Montarsi F, Soppelsa M, Delai N, Ravagnan S, Mazzon L, Schaffner F, Mathis A, Di Luca M, Romi R, Russo F. First report in Italy of the exotic mosquito species *Aedes (Finlaya) koreicus*, a potential vector of arboviruses and filariae. *Parasites & Vectors* 2011;4:1-5.
5. Montarsi F, Drago A, Martini S, Calzolari M, De Filippo F, Bianchi A, Mazzucato M, Ciocchetta S, Arnoldi D, Baldacchino F, Rizzoli A, Capelli, G. Current distribution of the invasive mosquito species, *Aedes koreicus* [*Hulecoeteomyia koreica*] in northern Italy. *Parasites & Vectors* 2015;8:614.
6. Seidel B, Montarsi F, Huemer HP, Indra A, Capelli G, Allerberge F, Nowotny N. First record of the Asian bush mosquito, *Aedes japonicus japonicus*, in Italy: invasion from an established Austrian population. *Parasites & Vectors* 2016;9:1-4.
7. Montarsi F, Martini S, Michelutti A, Da Rold G, Mazzucato M, Qualizza D, Di Gennaro D, Di Fant M, Dal Pont M, Palei M, Capelli, G. The invasive mosquito *Aedes japonicus japonicus* is spreading in northeastern Italy. *Parasites & Vectors* 2019;12:120.
8. Romi R, Portuale G, Sabatinelli G. Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli stadi preimaginali. *Fragmenta Entomologica* 1997; 29:1-141.
9. Montarsi F, Martini S, Dal Pont M, Delai N, Ferro Milone N, Mazzucato M, Soppelsa F, Cazzola L, Cazzin S, Ravagnan S, Ciocchetta S., Russo F, Capelli G. Distribution and habitat characterization of the recently introduced invasive mosquito *Aedes koreicus* [*Hulecoeteomyia koreica*], a new potential vector and pest in north-eastern Italy. *Parasites & Vectors* 2013;6:292.
10. Cameron EC, Wilkerson RC, Mogi M, Miyagi I, Toma T, Kim HC, Fonseca DM. Molecular phylogenetics of *Aedes japonicus*, a disease vector that recently invaded Western Europe, North America, and the Hawaiian islands. *Journal of Medical Entomology* 2010;47(4):527-35.
11. Reeves LE, Gillett-Kaufman JL, Kawahara AY, Kaufman PE. Barcoding blood meals: New vertebrate-specific primer sets for assigning taxonomic identities to host DNA from mosquito blood meals. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12(8):e0006767.

PREVENZIONE DELL'INTRODUZIONE E DIFFUSIONE DI SPECIE ESOTICHE INVASIVE NEL LAZIO

Adele Magliano, Arianna Ermenegildi, Irene Del Lesto, Federico Romiti, Claudio De Liberato
Direzione Operativa Diagnostica Generale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Roma

Il "Piano Nazionale di sorveglianza e risposta alle arbovirosi trasmesse da zanzare invasive (*Aedes* sp.) con particolare riferimento ai virus chikungunya, dengue e Zika – 2018", prorogato per l'anno 2019, sollecitava gli enti del Servizio Sanitario Nazionale all'implementazione di attività di monitoraggio nei confronti della possibile introduzione di nuove zanzare invasive del genere *Aedes* (es. *Aedes aegypti*, *Aedes koreicus* e *Aedes japonicus*), in quelli che sono considerati possibili punti d'entrata (*Point of Entry*, PoE): porti, aeroporti, interporti, ecc.

Il recente Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA 2020-2025) riprende e amplia il discorso relativo ai PoE, dettagliando più accuratamente quelli che devono essere considerati possibili luoghi a rischio di introduzione e il tipo di monitoraggio da portare avanti in questi siti. La sorveglianza nei confronti di zanzare invasive presso i possibili PoE è peraltro auspicata anche da linee guida internazionali (1).

Nella Regione Lazio, il Porto di Civitavecchia (RM) è il PoE a maggior rischio introduzione di zanzare invasive. Dotato di banchine con 25 attracchi operativi, è diviso in un'area riservata a traghetti e navi passeggeri e un'area per il traffico commerciale. In quest'ultima, ogni anno vengono movimentate 11 milioni di tonnellate di merci, provenienti da tutto il mondo. Particolarmente rilevante, per il rischio di introduzione di zanzare invasive, è l'arrivo giornaliero di container di frutta da paesi tropicali, container che vengono aperti presso le banchine del porto.

Un altro sito a rischio per l'introduzione di *Aedes* spp. invasive è stato individuato nell'area logistica situata nei pressi della città di Colferro (RM), nota come Interporto. Si tratta di un'area con hangar destinati a ricevere container di merci provenienti da tutto il mondo. In molti casi i container vengono aperti lì per la prima volta da quando sono arrivati nel nostro paese, via nave e/o treno. Nelle strette vicinanze dell'area logistica è situato un parcheggio di sosta per i mezzi pesanti che trasportano i container.

In quest'ambito, il Dipartimento di Prevenzione della ASL Roma 4 e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana (IZSLT) hanno attivato al Porto di Civitavecchia, nel 2019, un sistema di monitoraggio volto ad individuare l'eventuale arrivo di zanzare alloctone.

Nel 2020, un analogo sistema di monitoraggio è stato attivato dalla ASL Roma 5 e dall'IZSLT presso il polo logistico di Colferro.

Descrizione delle attività

Porto di Civitavecchia

Sono stati scelti 5 siti nella zona delle banchine commerciali (Figura 1), in prossimità del Posto d'Ispezione Frontaliera (PIF) e nell'area occupata dall'azienda che si occupa del trattamento e dello smaltimento dei rifiuti provenienti dalle navi. In questi siti sono state posizionate 5 trappole di tipo BG-Sentinel® (*Biogents' mosquito trap*), che hanno lavorato in continuo da maggio a settembre.



Figura 1. Immagine del Porto di Civitavecchia, sito monitorato come possibile punto di introduzione di specie invasive del genere *Aedes*

Personale della ASL Roma 4 prelevava le zanzare catturate ogni 2-3 giorni e le inviava all'IZSLT, dove venivano identificate.

Complessivamente sono stati effettuati 103 prelievi nel periodo maggio-settembre. Dal mese di settembre il protocollo di monitoraggio è stato modificato. Si è infatti constatato che le zanzare catturate con le BG-Sentinel erano spesso in cattivo stato di conservazione, tale da rendere impossibile la loro identificazione. Si è quindi deciso di sostituire le BG-Sentinel con ovitrappole, le cui bacchette sono state prelevate dalla ASL una volta a settimana e inviate all'IZSLT.

In laboratorio le uova presenti sulle bacchette sono state contate e fatte schiudere e le larve sono state fatte sviluppare fino allo sfarfallamento delle zanzare adulte, che venivano poi identificate.

Sono state posizionate 10 ovitrappole, negli stessi siti che erano stati scelti originariamente per le BG-Sentinel.

Interporto di Colleferro

Il protocollo di campionamento ha seguito le stesse modalità di quanto sopra esposto per il Porto di Civitavecchia con l'utilizzo delle ovitrappole.

Sono state posizionate 5 ovitrappole in prossimità degli hangar di stoccaggio e transito delle merci e del parcheggio di sosta dei mezzi pesanti.

Risultati

Porto di Civitavecchia 2019-2020

L'attività di monitoraggio effettuata da maggio a dicembre 2019 al Porto di Civitavecchia non ha evidenziato la presenza di zanzare alloctone, fatta eccezione per la zanzara tigre, *Ae. albopictus*.

Nel periodo maggio-settembre le BG-Sentinel hanno catturato 3.077 zanzare adulte. La specie più abbondante è risultata *Cx. pipiens* (1.481 esemplari), seguita dalla zanzara tigre (1.270 esemplari).

Altre specie nostrane sono state catturate con numerosità più basse. Sulle bacchette delle ovitrappe sono state rinvenute complessivamente 945 uova di *Aedes* sp. L'identificazione degli esemplari sfarfallati in laboratorio ha evidenziato la sola presenza della specie *Ae. albopictus*.

Nel 2020 l'attività è stata effettuata in forma ridotta, a causa della minor disponibilità del personale ASL dovuta all'emergenza COVID-19. Le sessioni di cattura effettuate sono state 7, per un totale di 553 uova schiuse, tutte risultate essere *Ae. albopictus*.

Interporto di Colleferro 2020

Sono stati effettuati 13 prelievi. Dalle uova messe a schiudere sono state ottenute 1.367 zanzare adulte, tutte risultate essere *Ae. albopictus*.

Bibliografia

1. European Centre for Disease prevention and Control. *Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe*. Stockholm: ECDC; 2012.

PREVENZIONE DELL'INTRODUZIONE E DIFFUSIONE DI SPECIE ESOTICHE INVASIVE IN CAMPANIA

Luciano Toma (a), Gianluca Miletto (b), Mario Santoro (c), Marco Paone (b), Giovanna Fusco (b), Maurizio Viscardi (b), Claudia Fortuna (a), Giorgio Galiero (b), Antonio Salzano (d), Rosa Maria Russo (e), Giovanni Battista Cuciniello (f), Monica Manzo (d), Esterina de Carlo (b)

(a) *Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma*
(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Napoli, Portici*
(c) *Ministero della Salute, Uffici di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera - Servizi territoriali per l'Assistenza Sanitaria al personale navigante, marittimo e dell'Aviazione civile Campania Sardegna, Napoli*
(d) *Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli*
(e) *Ministero della Salute, Uffici di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera - Servizi territoriali per l'Assistenza Sanitaria al personale navigante, marittimo e dell'Aviazione civile Liguria, Genova*
(f) *Ministero della Salute, Uffici di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera - Servizi territoriali per l'Assistenza Sanitaria al personale navigante, marittimo e dell'Aviazione civile Campania Sardegna, Salerno*

Introduzione

Le malattie trasmesse da vettori costituiscono un importante problema di sanità pubblica: l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che ogni anno causino oltre 1 miliardo di casi umani ed 1 milione di morti rappresentando circa il 17% dei casi totali di malattie trasmissibili. Nel 2017, l'Assemblea Mondiale della Sanità ha approvato la risoluzione 70.16 "Global vector control response: an integrated approach for the control of vector-borne diseases" (1) che approva la nuova strategia globale dell'OMS 2017-20301 contro i vettori. Tale strategia si basa su quattro pilastri (rafforzare le attività e la collaborazione intra e intersettoriale; favorire la partecipazione comunitaria; rafforzare il monitoraggio e la sorveglianza dei vettori e valutare gli interventi, consolidare e integrare gli approcci e gli strumenti disponibili) e su due elementi fondanti (sostenere l'innovazione e la ricerca di base e applicata; migliorare le capacità di controllo dei vettori). A livello europeo, la "Regional framework for surveillance and control of invasive mosquito vectors and re-emerging vector-borne diseases, 2014-2020" (2) è stata resa più operativa con la pubblicazione del "Manual on prevention of establishment and control of mosquitoes of public health importance in the WHO European Region (with special reference to invasive mosquitoes)" (3). In base alla mutata situazione epidemiologica in ambito europeo, la Commissione europea ha approvato la Decisione di esecuzione (UE) 2018/945 del 22 giugno 2018 con cui ha aggiornato l'elenco di malattie da incorporare nella rete di sorveglianza epidemiologica comunitaria, estendendolo a diverse arbovirosi, fra cui chikungunya, dengue e Zika, che pongono una minaccia per la sanità pubblica. Fra le malattie trasmesse da vettori, un importante gruppo è costituito dalle arbovirosi, ossia dalle infezioni virali trasmesse da artropodi. In Italia sono presenti sia arbovirosi autoctone, fra cui si annoverano la malattia di West Nile, l'infezione da virus Usutu, l'infezione da virus Toscana e l'encefalite virale da zecche, sia arbovirosi prevalentemente di importazione, come le infezioni causate dai virus chikungunya, dengue e Zika. Sempre più spesso, tuttavia, sia a livello nazionale che internazionale, si assiste ad eventi epidemici, anche di dimensioni rilevanti.

L'attuale Piano Nazionale sulle Arbovirosi (PNA 2020-2025) si applica alla sorveglianza delle arbovirosi, con particolare riferimento ai virus (West Nile, Usutu, chikungunya, dengue, Zika) e, in

particolar modo, identifica la necessità di effettuare la sorveglianza entomologica presso i punti sensibili di ingresso per gli insetti vettori (4). Tra i punti di possibile entrata, o comunque di passaggio, dei possibili vettori di patogeni, figurano aeroporti e porti, soprattutto quelli che garantiscono lo scambio e il trasporto di persone o merci a livello internazionale. Infatti porti e aeroporti rappresentano luoghi a rischio in cui le zanzare possono giungere sia come esemplari adulti sia come uova e larve. In Italia, ad esempio, la prima segnalazione della zanzara tigre, *Aedes albopictus* (vettore molto efficiente del virus chikungunya nonché in grado di trasmettere altri arbovirus), è stata registrata nel 1990 a Genova, che possiede uno tra i principali porti marittimi del bacino del Mediterraneo, nodo cruciale per il rischio d'ingresso di nuovi patogeni e vettori. Di qui l'importanza di monitorare i collegamenti internazionali e interregionali per evidenziare l'eventuale ingresso di specie esotiche di zanzare potenzialmente infette e che si possono insediare nel nostro Paese. L'individuazione precoce di nuovi vettori e la limitazione del loro sviluppo rappresenta un'importante azione preventiva al fine di ridurre il rischio di emergenze sanitarie (4).

In base alla circolare del Ministero della Salute del 27 gennaio 2016 avente oggetto “Infezioni da Virus Zika – Misure di prevenzione e controllo” (5) ci si è organizzati per avviare una attività di sorveglianza entomologica e virologica presso le principali aree aeroportuali e portuali della Regione Campania. L'obiettivo principale di questa attività è stato quello di individuare aree considerate sensibili per quanto riguarda la possibilità di ingresso di zanzare vettori di patogeni nella Regione Campania. Sono stati monitorati, per quanto è stato possibile in assenza di una attività finanziata e programmata, l'Aeroporto Internazionale di Napoli di Capodichino, il Porto di Napoli e il Porto di Salerno, in quanto aree soggette ad un intenso movimento di beni e persone con destinazioni nazionali e internazionali. Va sottolineato che questa esperienza rappresenta ad oggi l'unico tentativo di monitorare hot spot potenziali per l'ingresso di insetti vettori nell'Italia meridionale che si affaccia sul versante tirrenico e pertanto rappresenta una interessante base di dati per attività simili che auspichiamo possano trovare attuazione in futuro.

Materiali e metodi

Selezione delle aree di studio e dei siti di trappolamento

In generale, le operazioni di monitoraggio hanno interessato le maggiori aree aeroportuali e portuali della Campania, e sono state condotte dal 2016 al 2018 con modalità dettate da contingenze organizzative diverse. Le operazioni qui descritte sono state realizzate su iniziativa dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZSM), Sede di Portici in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), con l'Ufficio di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera – Servizio Assistenza Sanitaria Naviganti di Campania e Sardegna (USMAF-SASN Campania Sardegna), l'Unità Territoriale (UT) Napoli Capodichino, UT Napoli Porto, UT Salerno. In particolare, sono stati monitorati l'Aeroporto di Napoli di Capodichino (2016, 2017, 2018), il Porto di Napoli (2017, 2018) e il Porto di Salerno (2017, 2018). Per le ragioni appena indicate l'attività è stata condotta nei mesi estivi e/o autunnali.

All'interno dell'area aeroportuale di Capodichino sono stati selezionati sei siti (Figura 1) (scalo merci, Area Atitech SpA, Area ristoro, Varco carraio, Area gialla, PMA Punto Medico Avanzato) nei quali l'attività è stata condotta da giugno ad agosto del 2016, nel mese di settembre 2017 e da giugno a ottobre 2018. All'interno dell'area portuale di Napoli sono stati selezionati tre siti (Figura 2) (Terminal Flavio Gioia, Molo Immacolatella vecchia, SOTECO), nei quali l'attività è stata condotta a ottobre 2017 e da agosto a settembre 2018. All'interno dell'area portuale di Salerno sono stati selezionati due siti (Figura 3) (Molo Manfredi, lato Finanza e Molo Manfredi, lato Capitaneria) nei quali l'attività è stata condotta a ottobre 2017 e da agosto a settembre 2018.

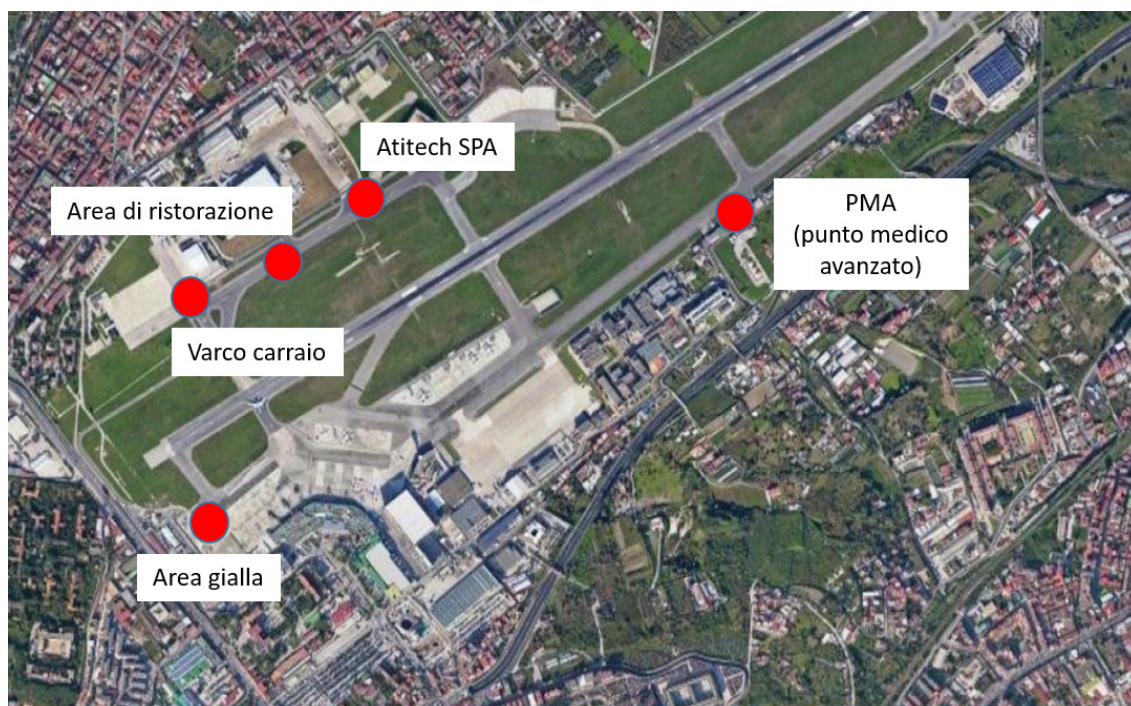


Figura 1. Vista aerea dell'area aeroportuale dell'Aeroporto Internazionale di Napoli di Capodichino, dove l'attività di monitoraggio è stata condotta da giugno ad agosto 2016, a settembre del 2017 e da giugno a ottobre del 2018. I simboli rossi indicano i siti selezionati per il posizionamento delle trappole



Figura 2. . Vista aerea dell'area del Porto di Napoli, dove l'attività di monitoraggio è stata condotta nel mese di ottobre del 2017 e da agosto a settembre del 2018. I simboli rossi indicano i siti selezionati per il posizionamento delle trappole)



Figura 3. Vista aerea dell'area del Porto di Salerno, dove l'attività di monitoraggio è stata condotta nel mese di ottobre del 2017 e da agosto a settembre del 2018. I simboli rossi indicano i siti selezionati per il posizionamento delle trappole

Nel corso delle attività progetto, è stata svolta attività di campo per la raccolta dei campioni entomologici, in particolare sono stati:

- selezionati i siti di raccolta in base all'habitat elettivo delle zanzare e alle attività umane svolte;
- effettuati campionamenti periodici nei siti scelti, durante il periodo di maggiore attività delle specie presenti (aprile-ottobre) per stabilirne la distribuzione e la densità relativa nell'area di studio;
- esaminati e identificati i campioni mediante indagini morfologiche.

Scelta e selezione delle trappole

Le catture hanno riguardato prevalentemente zanzare adulte e in minima parte stadi larvali. Rispetto alla scelta delle trappole ci si è basati su quanto indicato dall'allegato 4 del Piano di Sorveglianza Nazionale delle malattie trasmesse da zanzare del genere *Aedes* (4), che consiglia l'uso di ovitrappole per raccogliere le uova della zanzara tigre e l'uso delle trappole BG-Sentinel® per la raccolta di zanzare adulte, sia della zanzara tigre ma anche della zanzara comune *Culex pipiens*. Poiché la gestione settimanale delle ovitrappole e la lettura dei dati in laboratorio avrebbe creato problemi organizzativi si è optato per la raccolta di esemplari adulti con il posizionamento di trappole BG-Sentinel® (*Biogents' mosquito trap*). Le BG-Sentinel (Figura 4) sono trappole che emettendo stimoli olfattivi, attirano le zanzare, simulando un ospite a sangue caldo. La trappola (35 cm di diametro e 40 cm di altezza) è infatti provvista di un attrattivo chimico, che riproduce l'odore del sudore umano, diffuso grazie alla circolazione d'aria prodotta da una ventola. Al centro della trappola un imbuto nero costituisce l'ingresso per le zanzare che, attratte

dall'odore, vengono aspirate dalla corrente d'aria prodotta dalla ventola stessa. In tal modo le zanzare sono guidate nel sacchetto di cattura situato sotto l'apertura. La trappola può essere posizionata per terra oppure appesa fino a circa 1 metro da terra.



Figura 4. Esempio di trappola BG-Sentinel® (*Biogents' mosquito trap*) in funzione presso uno dei siti di cattura

Per quanto riguarda la scelta dei siti adatti al posizionamento delle trappole, l'IZS del Mezzogiorno si è avvalso della collaborazione con l'ISS (DMI-MTV) per i primi sopralluoghi presso l'Aeroporto di Capodichino per una prima raccolta di dati sulle zanzare presenti (in termini di focolai larvali e cattura di larve) e di siti idonei al posizionamento delle trappole.

Inoltre su alcune zanzare adulte catturate, sono stati effettuati test molecolari, mediante *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) per saggiare la possibile positività ai virus West Nile, chikungunya, dengue e Zika. La ricerca molecolare è stata effettuata presso l'ISS e presso l'IZSM di Portici.

Risultati

Nel corso del triennio, nelle tre aree monitorate sono state catturate in totale 837 zanzare (822 adulti e 17 larve) appartenenti a 3 specie: *Aedes albopictus* (666 di cui 17 larve; 79,5%), *Culex pipiens* (167 adulti; 19,9%), e *Culiseta longiareolata* (4 adulti; 0,4%).

A livello locale, nel periodo di monitoraggio considerato complessivamente, la situazione delle catture è stata la seguente. Nell'Aeroporto di Capodichino sono state raccolte 669 zanzare (di cui 17 larve), di cui 77 *Cx. pipiens*, 593 *Ae. albopictus* e 4 *Cs. longiareolata*. Nel Porto di Napoli sono state raccolte 146 zanzare di cui 88 *Cx. pipiens* e 58 *Ae. albopictus*. Nel Porto di Salerno sono state raccolte 22 zanzare di cui 7 *Cx. pipiens* e 15 *Ae. albopictus*.

La fauna culicidica rilevata ha messo in evidenza la presenza preponderante di due specie di interesse sanitario, *Ae. albopictus*, e *Cx. pipiens*. La proporzione delle due specie e la presenza in

tracce della specie ornitofila *Cs. longiareolata* risulta la stessa già riscontrata in ambienti portuali come quello di Civitavecchia (6).

Sugli esemplari raccolti sono stati condotti test molecolari mediante *real-time* RT-PCR per la ricerca dei virus. Presso l'ISS sono state processate singolarmente le seguenti zanzare femmine: 4 *Cx. pipens*, 1 *Cs. longiareolata* e 1 *Ae. albopictus*. La ricerca è stata effettuata utilizzando i target molecolari per i virus West Nile (lineage 1 e 2), chikungunya, dengue e Zika. Gli esemplari sono risultati tutti negativi. Presso l'IZSM di Portici sono stati effettuati test molecolari mediante *real-time* RT-PCR per la ricerca dei virus West Nile (lineage 1 e 2), e Usutu sia su singoli esemplari che su *pool*. La ricerca su singoli esemplari ha interessato le seguenti zanzare femmine: 5 *Ae. albopictus*, 2 *Cs. longiareolata* e 11 *Cx. pipiens* catturate nell'Aeroporto di Capodichino e 2 *Ae. albopictus* e 4 *Cx. pipiens* nel Porto di Napoli. Gli esemplari singoli e i *pool* sono risultati tutti negativi.

Conclusioni

Alla luce dei risultati ottenuti è evidente che le aree prescelte forniscono condizioni favorevoli alla presenza e allo sviluppo di alcuni importanti vettori di malattie in Italia, primo fra tutte la specie *Ae. albopictus* che ha costituito quasi l'80% dell'intero campione di zanzare catturate. Inoltre, tale sorveglianza, se attuata sistematicamente e mantenuta in funzione con i mezzi sia umani che tecnici di cui necessita, costituirebbe un valido sistema di allerta rapido per rilevare la presenza di specie di zanzare invasive simili alla zanzara tigre, come *Aedes koreicus* e *Aedes japonicus*, già presenti da alcuni anni nel nord Italia e nel nord est rispettivamente.

I test virologici non hanno rilevato la presenza di virus, ma questo risultato era prevedibile, data la mancanza di evidenze di circolazione virale nella popolazione umana. Tuttavia queste prove costituiscono un esempio di quella che dovrebbe essere una attività di controllo di routine che potrebbe essere effettuata in presenza di una sorveglianza entomologica continua.

L'area portuale e aeroportuale di Napoli e Salerno, si prestano non soltanto all'introduzione di specie di vettori e patogeni alloctoni, ma, per le caratteristiche ambientali del territorio possono senz'altro favorirne l'eventuale sviluppo, come dimostrato dalla schiacciante preponderanza numerica della zanzara tigre nelle catture effettuate in questa esperienza preliminare. Va ricordato infatti che la sorveglianza entomologica e quando possibile la sorveglianza virologica associata, possono fornire dati essenziali a individuare episodi di circolazione virale, se condotte con regolarità nel periodo di attività delle zanzare che va da maggio a fine ottobre, come indicato dal PNA. Da ciò emerge l'importanza della conoscenza, da parte delle Amministrazioni sanitarie, delle problematiche legate a questi insetti, della loro biologia e della loro distribuzione. Infine, il lavoro qui descritto dimostra quale potenzialità operativa rappresenti la collaborazione tra Enti del Servizio Sanitario Nazionale, quali IZS, ISS e USMAF, quali realtà competenti in materia di sanità pubblica e senz'altro idonee, se adeguatamente supportate, a gestire un sistema di sorveglianza dei vettori in aree così importanti per la vita economica del Paese.

Bibliografia

1. World Health Organization. *WHA resolution 70.16. Global vector control response: an integrated approach for the control of vector-borne diseases*. In: Seventieth World Health Assembly (WHA70.16). Geneva; 22/05/2017. Disponibile all'indirizzo: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA70/A70_R16-en.pdf; ultima consultazione 20/6/2022.

2. World Health Organization Regional Office for Europe. *Regional Framework for surveillance and control of invasive mosquito vectors and re-emerging vector-borne diseases 2014-2020*. Copenhagen: WHO/Europe; 2021. Disponibile all'indirizzo: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/197158/Regional-framework-for-surveillance-and-control-of-invasive-mosquito-vectors-and-re-emerging-vector-borne-diseases-20142020.pdf; ultima consultazione 20/6/2022.
3. World Health Organization Regional Office for Europe. *Manual on prevention of establishment and control of mosquitoes of public health importance in the WHO European Region (with special reference to invasive mosquitoes)*. Copenhagen: WHO/Europe; 2021. Disponibile all'indirizzo: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/392998/mosquito-manual-eng.pdf; ultima consultazione 20/6/2022.
4. Ministero della Salute - Direzione generale della Prevenzione sanitaria. Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA) 2020-2025. Roma: Ministero della Salute; 2019. Disponibile all'indirizzo: file:///C:/Users/spuri/Downloads/C_17_pubblicazioni_2947_allegato.pdf; ultima consultazione 20/6/2022
5. Ministero della Salute. *Circolare del 27 gennaio 2016 n. 0002291. Infezioni da Virus Zika – Misure di prevenzione e controllo*. Roma: Ministero della Salute; 2016. Disponibile all'indirizzo: <http://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/dettaglioAtto?id=54017> ultima consultazione 20/6/2022
6. Laghezza Masci V, Di Luca M, Toma L, Severini F, Boccolini D, Gambellini G, Belardinelli MC, Guerra L, Catenacci M, De Martino F, Romi R, Fausto AM. Zanzare (Diptera: Culicidae), potenziali vettori di malattie, nell'area portuale di Civitavecchia. In: Lenzi A, Leoni L, Baldacci C, Brizzi B, De Santi C, Dell'Agnello P, Domenici V, Feri E, Lenzi P, Montesarchio E, Piombanti PP, Santinelli M (Ed.). *Codice Armonico. Quinto congresso di scienze naturali, Ambiente toscano*. Pisa: Edizioni ETS; 2014. p. 25-32

PREVENZIONE DELL'INTRODUZIONE E DIFFUSIONE DI SPECIE ESOTICHE INVASIVE IN PUGLIA

Maria Assunta Cafiero, Giuseppe Mancini*, Donato Antonio Raelle

Struttura Semplice di Diagnostica Virologica e Entomologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

* in servizio dal 2010 al 2014

Introduzione

L'intenso traffico internazionale e la movimentazione transcontinentale di persone e merci favoriscono la dispersione e, a volte, l'insediamento e la colonizzazione di nuove aree geografiche da parte di culicidi esotici, con grave minaccia per la salute pubblica.

Negli ultimi decenni, diverse specie di zanzare esotiche invasive (*Invasive Mosquitoes Species*, IMS) – *Aedes* (*Ae.*) *albopictus*, *Aedes aegypti*, *Aedes japonicus*, *Aedes atropalpus*, *Aedes triseriatus* e *Aedes koreicus* – sono state introdotte in Europa, soprattutto via mare, attraverso l'importazione di merci in containers, soprattutto copertoni usati (1-4). È stato così già per il primo ingresso di *Ae. albopictus* in tutti i Paesi europei, ivi inclusa l'Italia dove la specie è stata segnalata per la prima volta nel 1990 a Genova (5) e, poco dopo a Padova (6). Con le stesse modalità ha fatto il suo ingresso una seconda specie invasiva, ossia *Ae. atropalpus* in Italia (7) e Paesi Bassi, importata dall'Asia con pneumatici usati e/o piante ornamentali infestate da forme immature dell'insetto (8, 9) ma, fortunatamente, nel nostro Paese, è stato possibile circoscrivere tale specie all'area di ingresso (Treviso) e poi eradicarla (10). Al contrario, a diversi anni dalla loro prima segnalazione, focolai larvali di *Ae. koreicus* e *Ae. japonicus* risultano stabilmente presenti nel Nord-Est Italia (11, 12). L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata (IZSPB) segnalò per la prima volta la presenza di *Ae. albopictus* nel 2005, identificando esemplari occasionalmente raccolti in provincia di Foggia e Bari, e nel 2006, focolai in provincia di Foggia (13). Negli anni successivi, ulteriori conferimenti da parte di cittadini hanno permesso di registrare la presenza dell'insetto in altri comuni pugliesi e lucani, prevalentemente costieri, e in entrambe le isole abitate dell'arcipelago delle Isole Tremiti; qui, nell'estate 2008, un breve monitoraggio condotto dall'IZSPB (Cafiero e collaboratori) ha permesso di rilevare anche i primi focolai larvali mediante posizionamento di ovitrappole, sempre confermati negli anni successivi.

La consapevolezza dell'espansione del fenomeno “zanzara tigre” nel territorio di competenza e l'outbreak di febbre chikungunya in Emilia-Romagna nel 2007 hanno anche suggerito, in quegli anni, di intraprendere uno studio epidemiologico per rilevare la presenza di zanzare *Aedes* esotiche nei porti e aeroporti della Puglia, per la nota capacità di queste specie di spostarsi attraverso i commerci, nonché valutare i principali fattori di rischio correlati alla loro introduzione. In relazione al rischio di importazione di insetti esotici, potenziali vettori di arbovirus, la Commissione Europea aveva già allertato gli Stati Membri del pericolo di diffusione del virus chikungunya, con nota RIF. EU/2006/007 del 12/04/2006, diffusa all'Agenzia delle Dogane.

La Puglia, pertanto, con la imponente estensione di coste e l'intensa attività di traffici commerciali, turistici e migratori, in entrata e uscita, con numerosi Paesi, può considerarsi un territorio a rischio di “importazione” di zanzare IMS, ivi inclusa la temuta *Ae. aegypti*. Questa specie, capace di adattarsi a climi aridi, come quello dell'Italia meridionale, era stata già in passato segnalata occasionalmente nei porti pugliesi di Bari, Brindisi e Taranto (14) nonché rinvenuta nelle principali città portuali del Mediterraneo. Lo studio epidemiologico che qui verrà illustrato

è stato finanziato dal Ministero della Salute con fondi di ricerca corrente (Ricerca Corrente IZSPB 05.2010) ed è stato condotto negli anni 2011-2013 in collaborazione con l'Università degli Studi di Foggia, Dipartimento PriMe. A diversi anni dalla sua conclusione, sebbene la presenza di alcune specie di IMS sia stata confermata in zone del continente europeo non considerate convenzionalmente come “esotiche” (*Ae. aegypti* in Georgia, Russia e Turchia, del progetto *European network for medical and veterinary entomology - Vectornet*, finanziato dallo European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC e dalla European Food Safety Authority - EFSA), si ritiene che possa ancora rivestire un certo interesse, sia nei contenuti che nella metodologia e, pertanto, se ne propone una sintesi, evidenziando i risultati ottenuti, i punti di forza e le criticità rilevate.

Materiali e metodi

Le attività svolte nel progetto sono state divise in 2 fasi.

Fase I

La prima fase (Figura 1) è stata caratterizzata da un complesso di attività di studio (normativa, bibliografia) e di tipo burocratico (incontri con le Autorità Portuali/Aeroportuali, autorizzazioni e questionari), preliminari alla ricerca di campo. Per lo studio della normativa comunitaria e nazionale in materia di sorveglianza e controllo di artropodi infestanti di interesse medico e, in particolare, di culicidi nei porti e aeroporti, sono stati consultati siti web e articoli scientifici di interesse. Dopo l'indagine in rete volta ad avere una visione generale della struttura Amministrativa dei principali porti e aeroporti pugliesi, sono stati avviati i primi contatti telefonici con le Autorità portuali (Bari, Taranto, Manfredonia) e il Presidente degli Aeroporti di Puglia, per il rilascio delle autorizzazioni a svolgere le attività previste nelle diverse fasi della ricerca, ivi comprese le attività di cattura.

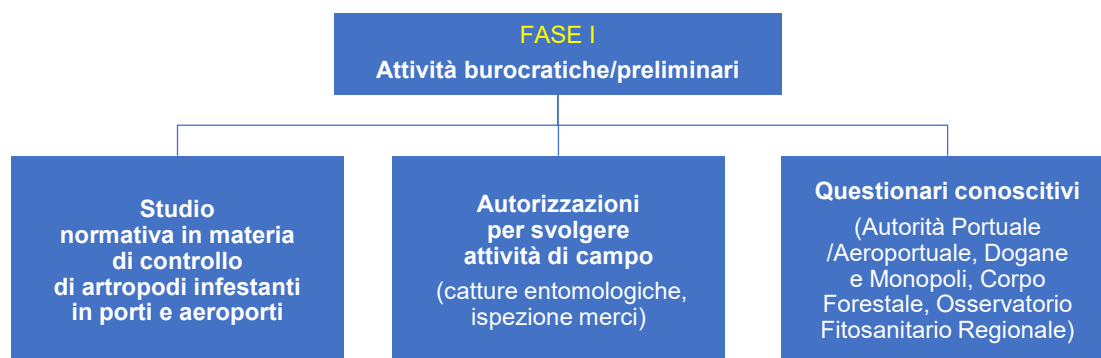


Figura 1. Zanzare invasive in porti e aeroporti della Puglia (2011-2013): sintesi delle attività programmate nella Fase I del Progetto di Ricerca Corrente con indicazione degli Enti coinvolti nelle diverse operazioni

Contestualmente, sono stati concepiti ed elaborati due questionari, uno generale (QG) e uno di approfondimento (QA). Con il QG ci si prefiggeva di acquisire informazioni (organizzazione, struttura del traffico, tratte, tipologie di merci importate, provenienza delle merci, ecc.) utili ad avere un quadro conoscitivo delle realtà portuali e aeroportuali della Regione, sottoponendolo alle

rispettive Autorità Portuali e Aeroportuali e alla Dogana (Direzione Interregionale delle Dogane per la Puglia, Molise e Basilicata, DIDPMB). Con il QA si intendeva acquisire specifiche informazioni (quantità importate, metodo di trasporto, metodo di imballaggio, certificazioni, ecc.) sull'importazione di merci a rischio (pneumatici e piante ornamentali), epidemiologicamente rilevanti ai fini dell'introduzione di culicidi esotici. Esso è stato sottoposto al DIDPMB e al Corpo Forestale dello Stato e, limitatamente alla merce "piante ornamentali", anche all'Osservatorio Fitosanitario della Regione Puglia. Ulteriori permessi sono stati necessari per effettuare ispezioni su dette merci, volte alla ricerca di culicidi esotici, inoltrando la richiesta agli Organismi coinvolti nello sdoganamento e/o controllo delle merci a rischio (pneumatici e piante ornamentali) (Agenzia delle Dogane e dei Monopoli e all'Osservatorio Fitosanitario Regionale, Puglia).

Fase II

Nella seconda fase del progetto sono state previste attività di campo e di laboratorio (Figura 2).

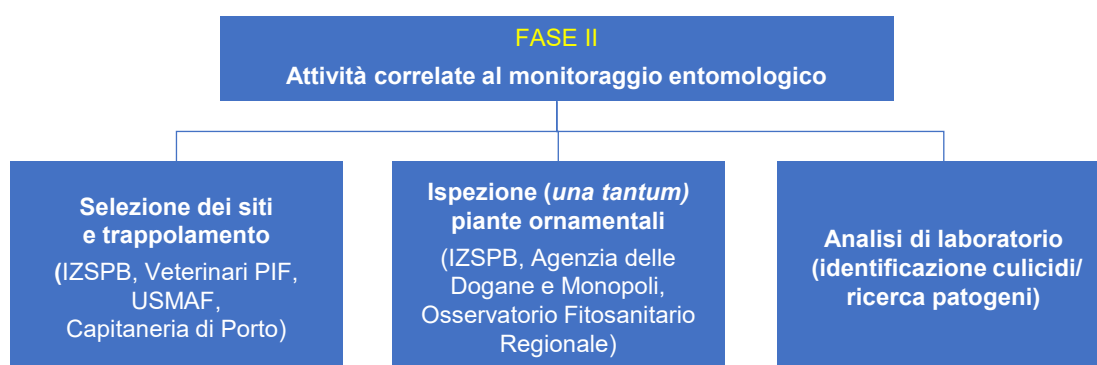


Figura 2. Zanzare invasive in porti e aeroporti della Puglia (2011-2013): sintesi delle attività programmate nella Fase II del Progetto di Ricerca Corrente con indicazione degli Enti coinvolti nelle diverse operazioni

In particolare sono state selezionate le seguenti 3 aree di studio:

- *Bari Porto* (BA) (latitudine 41°08'17'', longitudine 16°50'40''): è uno scalo polivalente per navi commerciali, passeggeri e in misura ridotta per pescherecci, navi militari, rimorchiatori e rappresenta lo scalo commerciale meridionale più importante nei rapporti con i mercati balcanici e del Medio Oriente (Figura 3).
- *Taranto Porto* (TA) (latitudine 40°27'N longitudine 17°12'E): situato nell'omonimo golfo è un porto naturale che consta di una rada grande (Mar Grande) e una interna minore (Mar Piccolo), sede quest'ultima della Marina Militare. In prossimità della rotta Suez-Gibilterra e in posizione strategica rispetto alle rotte principali Oriente-Occidente, si estende per 350.000 km² ed è essenzialmente un porto mercantile (commerciale, industriale, area Terminal Container) con parte delle banchine in concessione a Industrie Siderurgiche ILVA SpA, Raffinerie ENI SpA, Cementificio Cementir. È tra i maggiori di Italia e Europa per traffico di merci gestito (Figura 4).

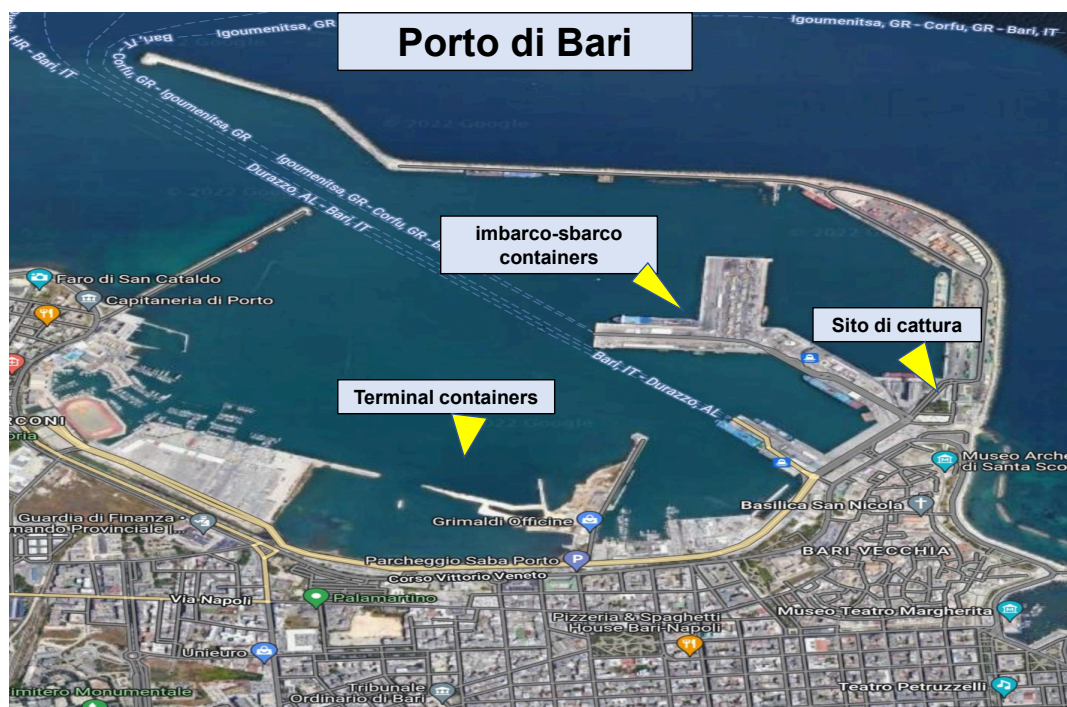


Figura 3. Porto commerciale di Bari con indicazione del sito di cattura dei culicidi invasivi (anno 2012-2013)



Figura 4. Porto commerciale di Taranto con indicazione del sito di cattura dei culicidi invasivi (anno 2012-2013)

- *Manfredonia Porto* (FG) (latitudine 41°38'10''N - longitudine 15°56'10''E): costituito dal “Porto Commerciale” e dal “Bacino Alti Fondali”, ubicati in zone diverse del territorio, distanti uno dall’altro circa due chilometri e costruiti in tempi diversi. Situato in prossimità del centro cittadino, il “Porto Commerciale” ha funzione prevalentemente di porto peschereccio, oltre che di traffico per i passeggeri diretti verso le Isole Tremiti. Il Bacino Alti Fondali, invece, ubicato a nord del centro abitato e del porto commerciale, consente l’attracco di navi fino a 35.000 tonnellate e ha un utilizzo esclusivamente commerciale a servizio dell’attigua area industriale.

Le visite alle aree di studio e il monitoraggio entomologico per culicidi (adulti e stadi immaturi) sono stati condotti nelle aree portuali, in collaborazione con Veterinari PIF (Posto di Ispezione Frontaliera), tecnici USMAF (Ufficio di Sanità Marittima e Aerea Frontaliera), Capitaneria di Porto di Bari, Taranto e Manfredonia.

In particolare, è stato selezionato 1 sito per ciascun porto e posizionate 2 trappole – 1 BG-Sentinel® (*Biogents’ mosquito trap*), innescata con attrattivo e 1 CDC (*Centers for Disease Control and prevention*) *light trap* per culicidi adulti – attivate 2 giorni consecutivi a settimana; contestualmente, posizionate nei porti di Bari e Taranto 15 ovitrappole/settimana.

Le bacchette per la raccolta delle uova, e le catture di esemplari adulti suddivise in base a luogo, data, tipologia di trappola erano trasportate in contenitori refrigerati presso l’IZSPB, sede di Foggia, Laboratorio di Entomologia Sanitaria dove si procedeva alla identificazione morfologica degli esemplari adulti (15) e alla ricerca di potenziali patogeni presenti (*Flavivirus* e *Dirofilaria repens/immitis*), con le metodiche in uso presso il laboratorio. Le bacchette di masonite venivano ispezionate per la ricerca e conta di uova di zanzare del genere *Aedes* e, quando possibile, conservate per la successiva schiusa, raccolta e identificazione degli adulti sfarfallati.

Se rilevata importazione di merci a rischio da Paesi endemici dopo analisi dei questionari, era condotta la ricerca di culicidi (adulti e stadi immaturi) su almeno un carico di piante ornamentali e/o copertoni.

Tale attività, effettuata in collaborazione con gli Organismi deputati al controllo su dette merci, prevedeva ispezione delle merci *in loco* con raccolta di campioni di acqua di trasporto (piante) o acqua depositatasi sul fondo interno di copertoni e successivo trasporto dei campioni in laboratorio per ricerca culicidi (lente di ingrandimento, stereomicroscopio).

Risultati

Fase I

La ricerca condotta in rete ha evidenziato che le prime linee guida europee per contrastare l’introduzione di culicidi esotici alle frontiere erano state proposte nel 1996 dall’Italia (16), in seguito all’ingresso di *Aedes albopictus* nel porto di Genova (1990), attraverso copertoni importati dagli USA (5). L’Istituto Superiore di Sanità (ISS), a tal proposito sottolineava anche la carenza di norme nazionali riguardo la loro importazione e, nello specifico, la necessità di controlli sulle importazioni di detta merce, nonché di trattamenti di disinfestazione (1,2).

Ulteriori disposizioni internazionali per limitare la diffusione di *Aedes albopictus* e delle altre zanzare del genere *Aedes* sono state emanate dallo European Centre of Disease and Control (17, 18, 19), dall’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (20) e dalla European Mosquitoes Control Association (21), in seguito al verificarsi del primo focolaio epidemico italiano di *chikungunya*, nell’estate del 2007 (22) e, nel 2010, dei primi due focolai autoctoni di *dengue* in

Francia e Croazia (23, 24). In sintesi, tutti questi organismi ribadivano quanto già suggerito dall'ISS in Italia, ossia la necessità di prevedere o, se già in atto, di intensificare i controlli sulle merci a rischio nei punti di entrata, ivi inclusi porti e aeroporti.

L'OMS, con il documento *International Health Regulations* (25) raccomanda, su navi e aerei, interventi di disinfestazione contro zanzare anche del genere *Aedes*, e sui mezzi in arrivo da aree endemiche per febbre gialla e malaria.

L'analisi dei questionari ha consentito di ottenere le seguenti informazioni generali e specifiche sulle rotte e i traffici nei porti di Bari, Taranto e Manfredonia e negli aeroporti della Puglia nel periodo 2010-2012, come qui di seguito riportato:

– *Bari Porto*

- Traffico passeggeri: consistente soprattutto da/verso l'opposta sponda Adriatica, ma notevole anche il numero di crocieristi (soprattutto rotte per il Mediterraneo).
- Traffico merci: importati circa 5 milioni di tonnellate (t) di merci, per metà rinfuse solide (merci trasportate senza contenitori o imballaggi), tra cui soprattutto cereali, e per metà merci in containers. Importati pneumatici nuovi (Turchia, Cina e Serbia) (120.000 pezzi) con navi containers/cargo e piante (318 t), incluse le ornamentali, da Asia (Cina, Taiwan) e Albania, quasi tutte destinate a vivai pugliesi.

– *Taranto Porto*

- Traffico passeggeri: poco rilevante.
- Traffico merci: importazioni (30 milioni di tonnellate/anno), per lo più di merci rinfuse per siderurgia, raffinerie, cementifici, di cui 20% in containers. Dall'Asia (Cina, India, Thailandia, Taiwan, Corea, Arabia, Giappone, Israele) importati pneumatici nuovi (2.000 t/anno), sfusi o imballati in plastica e piante (450t.), incluse le ornamentali (Cina, Thailandia, Taiwan), per gran parte destinata a vivai pugliesi.

– *Manfredonia Porto*

- Traffico passeggeri: poco rilevante.
- Traffico merci: non risultano importate piante e pneumatici.

– *Aeroporti di Puglia SpA*

- sono presenti 4 aeroporti civili (traffico civili/merci), di cui uno a duplice vocazione (BA), due con solo traffico civili (FG/BR) e uno (Grottaglie) con solo traffico merci; non risultano comunque importati pneumatici, né piante.
- sono presenti 6 aeroporti militari (Bari-Palese Macchie, Gioia del Colle, Galatina, Martina Franca, Brindisi, Foggia-Amendola).

Negli aeroporti, gli interventi di disinfestazione (contro mosche, zanzare, tafani) sono effettuati in ottemperanza alla normativa.

I risultati sono sintetizzati in Tabella 1 e Tabella 2.

I controlli sanitari sulla tipologia merce “piante esotiche ornamentali” sono previsti esclusivamente per escludere la presenza di agenti fitopatogeni (Direttiva 2000/29/CE), ivi inclusi quelli esotici che potrebbero rappresentare un pericolo per la flora spontanea o coltivata del Paese; per la tipologia merce “pneumatici” non sono previsti controlli sanitari, né trattamenti di bonifica nei confronti di culicidi.

Tabella 1. Risultati ottenuti dall'analisi dei questionari somministrati all'Autorità Portuale (Bari, Taranto, Manfredonia) negli anni 2011-2013, per acquisire informazioni su rotte marittime, traffico merci/passeggeri e relativi Paesi di provenienza

Tipologia	Porto di Bari			Porto di Taranto			Porto di Manfredonia		
Rotte marittime	Tipologia di nave								
	Passeggeri	Cargo	Porta- container	Passeggeri	Cargo	Porta- container	Passeggeri	Cargo	Porta- container
	Europee								
	Mar Mediterraneo	X	X	X	X	X	X	X	
	Oceano Atlantico	X	X		X	X	X		X
Extraeuropee									
Asia	X	X			X	X		X	
America	X	X			X	X		X	
Africa	X	X			X	X		X	
Paesi di provenienza	Merci a rischio								
	Pneumatici	Piante ornamentali		Pneumatici	Piante ornamentali		Pneumatici	Piante ornamentali	
	X	X		X	X		-	-	
Europa	Serbia Turchia	Albania							
Asia	Cina	Cina Taiwan		Cina India Taiwan Corea Tailandia Giappone Israele Arabia Saudita	Cina Taiwan Tailandia				
America									
Africa									

Tabella 2. Risultati ottenuti dall'analisi dei questionari somministrati all'Autorità Aeroportuale della Puglia (Aeroporti del Levante) negli anni 2011-2012, per acquisire informazioni circa la tipologia di scalo e il traffico merci/passeggeri*

Tipologia di scalo	Aeroporto di Bari		Aeroporto di Taranto		Aeroporto di Foggia		Aeroporto di Brindisi		Aeroporto di Lecce	
	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M
Nazionali	X	X		X	X		X		X	
Internazionali	X	X		X			X			

* Nessuna tipologia di merci è risultata a rischio a rischio

P: Passeggeri; M: Merci

Fase II

Nei porti di Bari, Taranto e Manfredonia è stato catturato negli anni 2012-2013 un totale di 1137 culicidi adulti, di cui il 13,54% (154/1137) rappresentato da *Ae. albopictus*, il 79,33% (902/1137) da *Cx. pipiens* s.l. e il restante 7,13% da altre specie. Il dettaglio delle catture per anno e sede è riportato in Tabella 3.

Tabella 3. Elenco delle specie di zanzare catturate mediante trappolamento nei porti di Bari, Taranto, Manfredonia

Specie	Porto di Bari (2012)		Porto di Taranto (2012)		Porto di Manfredonia (2013)	
	N.	%	N.	%	N.	%
<i>Aedes albopictus</i>	13	5,5	27	8	114	20,1
<i>Culex pipiens</i>	195	82,9	293	87,4	414	73
<i>Culex</i> sp.	19	8	10	2,9	36	6,3
<i>Culiseta longiareolata</i>	4	1,7	-	-	1	0,2
<i>Ochlerotatus caspius</i>	-	-	1	0,29	-	-
<i>Coquillettidia richiardii</i>	-	-	-	-	1	0,2
<i>Anopheles maculipennis</i> s.l.	-	-	-	-	1	0,2
Culicinae	4	1,7	4	1,1	-	-
Totale	235		335		567	

Il monitoraggio per mezzo delle ovitrappole posizionate ha evidenziato che, da un totale di 180 bacchette di masonite, ne sono state recuperate 50 (20/50 BA; 30/50 TA); di queste 18 (18/50), appartenenti a 3 differenti raccolte, sono risultate positive (7/18 BA; 11/18 TA), contenendo uova di *Aedes*. Le uova poste in acqua hanno prodotto esemplari che sono stati successivamente identificati come *Ae. albopictus*.

La ricerca virale condotta su 46 *pool* di zanzare ha dato esito negativo per Flavivirus, mentre 6 (6/46) *pool*, di cui 4 (4/6) *pool* di *Cx. pipiens* (BA, TA porto) e 2 (2/6) *pool* di *Ae. albopictus* (TA, Manfredonia), sono risultati positivi per *Dirofilaria repens*.

L'ispezione delle merci ha riguardato due carichi di piante ornamentali importate dalla Cina ed è stata condotta da un veterinario IZSPB, in collaborazione con tecnici dell'Osservatorio Fitosanitario Regionale Pugliese e personale della Dogana.

L'ispezione è avvenuta nella zona di ingresso dei containers. All'apertura dei containers, il controllo visivo non ha evidenziato presenza di culicidi adulti sfarfallati; l'esame di 12 piante esotiche ornamentali, di cui 6 *Ficus microcarpa* appartenenti al carico del 12.04.2013 e 6 *Pachira aquatica* del carico del 08.08.2013, con relativa acqua di trasporto, non ha evidenziato presenza di stadi preimaginali di *Aedes* (Figura 4).



Figura 4. Porto di Taranto (anno 2013), alcuni momenti correlati alla ricerca di zanzare invasive su due carichi di piante (*Pachira aquatica* e *Ficus microcarpa*) in arrivo dall'Asia. Nelle attività è stato coinvolto personale dell'IZSPB (veterinario entomologo), dell'Osservatorio Fitosanitario della Regione Puglia e dell'Agenzia delle Dogane e Monopoli

Discussione

Nel periodo antecedente il progetto di ricerca corrente RC IZSPB 05.2010, erano scarsi gli studi che riportavano esperienze simili e mettersero in atto quanto indicato dalle linee guida internazionali e nazionali in materia di controllo di zanzare esotiche invasive o IMS in porti e aeroporti; tra questi sicuramente è da menzionare il monitoraggio effettuato in porti e aeroporti (11) della Gran Bretagna nel 2009-2010 (26).

A livello nazionale, un'attività di sorveglianza entomologica veniva implementata nel porto di Civitavecchia da parte dell'ISS e dell'Università degli Studi della Tuscia nel periodo 2010-2011 e 2013-2014 (27); in quegli anni, catture di culicidi erano state anche condotte nel porto di Ravenna da entomologi del Centro Agricoltura e Ambiente "Giorgio Nicoli", in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna.

A differenza della quasi totalità delle esperienze che miravano ad evidenziare potenziali introduzioni di zanzare esotiche, per lo più attraverso il monitoraggio entomologico, nel nostro progetto sono stati introdotti ulteriori strumenti conoscitivi, quali l'impiego di questionari e l'ispezione sanitaria delle piante ornamentali importate. Per far ciò è risultato essenziale il coinvolgimento diretto dei numerosi Organismi operanti in aree portuali/aeroportuali; essi hanno collaborato con interesse compilando i questionari e hanno anche fornito, al bisogno, preziose informazioni e suggerito modalità di intervento migliorative.

La realizzazione e la successiva analisi dei questionari, insieme alle attività burocratiche per richiedere le numerose autorizzazioni e permessi, hanno rappresentato una grande parte del lavoro e sono risultate oltremodo impegnative, non solo in termini di tempo, ma anche di complessità: numerosi organismi preposti al controllo, di norme e modalità a noi sconosciute.

Tuttavia, è stato possibile acquisire una buona conoscenza del *modus operandi* in dette aree, rivelatasi indispensabile per la costruzione di un ideale modello di sorveglianza attiva, oltre a informazioni specialistiche.

L'analisi dei questionari ha evidenziato l'importazione di "merci a rischio" (pneumatici e piante ornamentali) dai Paesi Asiatici in due (Bari e Taranto) dei tre porti oggetto di indagine, con dati consolidati relativi agli anni 2010-2012; su dette merci, mancava l'evidenza di controlli specifici nei confronti di culicidi, sia nel paese di origine prima dell'imbarco, che di destinazione (Italia). La quasi totalità delle piante esotiche e degli pneumatici importati nei porti pugliesi risulta acquistata da aziende regionali; il dato è di sicuro interesse e suggerisce l'importanza di attivare un monitoraggio attivo e sistematico nei vivai e nelle rivendite pugliesi di pneumatici, per intercettare la presenza di eventuali zanzare esotiche.

Il porto di Taranto, essenzialmente commerciale, risulterebbe potenzialmente più esposto al rischio di introduzione di IMS attraverso le merci, incluse quelle a rischio, sia per la maggiore quantità di prodotto importato, sia per il numero di Paesi asiatici (Cina, India, Tailandia, Taiwan, Corea, Arabia, Giappone, Israele) da cui importa, molti dei quali endemici per IMS. Nel porto di Bari, l'intensa movimentazione di passeggeri e dei loro mezzi verso i Paesi della opposta sponda adriatica e delle aree nord africane potrebbe rendere possibile lo scambio di popolazioni di culicidi tra questi Paesi, con rischio per la salute pubblica, in caso di situazioni epidemiologiche sfavorevoli, come il focolaio autoctono di *dengue* in Croazia nel 2010 (24).

Il rischio di introduzione di zanzare esotiche nel porto di Manfredonia, attraverso le merci, risulterebbe limitato per l'assenza di importazione di piante e pneumatici; ridotto risulta anche il numero di navi passeggeri, per lo più costituite da piccoli yacht appartenenti a privati.

Negli aeroporti di Bari e Grottaglie, i soli che gestiscono traffico merci, non risultano introdotti né pneumatici né piante esotiche nel periodo di indagine; in merito al traffico passeggeri, gli aeroporti di Bari e Brindisi non prevedono voli diretti internazionali con paesi asiatici. Le operazioni di disinfestazione richieste dalla regolamentazione nazionale e internazionale vigenti prevedono trattamenti nei confronti di artropodi infestanti e, in particolare, di culicidi vettori e sono sistematicamente certificate.

Siamo consapevoli che i risultati qui riportati (rotte, traffici, merci, ecc.) fotografano la situazione nel periodo 2010-2013 e sarebbe indispensabile un aggiornamento, possibile con un nuovo monitoraggio e con una nuova sottomissione dei questionari; questi ultimi, si ritengono uno strumento utilissimo e duttile per acquisire conoscenze specifiche.

Nei due anni di monitoraggio è stata rilevata la presenza di zanzare esotiche *Aedes*, limitatamente alla specie *Aedes albopictus* in tutti i porti investigati, mentre la specie prevalente risulta essere *Culex pipiens s.l.*; entrambe le specie risultano abbondanti nelle aree urbane costiere pugliesi, ivi incluse le tre città portuali oggetto di indagine. La positività a *Dirofilaria repens* rilevata in ciascuno dei porti monitorati in *pool* di *Cx. pipiens s.l.* (Bari e Taranto, porto) e *Ae. albopictus* conferma anche in queste aree il coinvolgimento di queste specie nella diffusione e trasmissione del parassita (28), come rilevato in precedenti indagini anche in Puglia (29, 30), dove la presenza di questo nematode è riportata anche nell'uomo (31). Relativamente alla specie *Cx. pipiens s.l.* e all'interesse sanitario che essa riveste come vettore di Arbovirus e dirofilarie, potrebbero essere utili anche analisi molecolari finalizzate a differenziare le due forme biologiche (*Culex pipiens pipiens* e *Culex pipiens molestus*) e a rilevare la presenza di possibili forme ibride, in quanto le stesse potrebbero essere caratterizzate da una diversa competenza vettoriale (27).

L'attività di campionamento entomologico nelle aree portuali è stato il frutto di un ovvio compromesso tra le esigenze di ricerca e quelle più strettamente pratiche e di gestione sicura dello strumentario. Difficoltà sono state riscontrate nella fase di recupero delle ovitrappe; molti barattoli, risultavano spostati, dispersi e capovolti per la continua movimentazione di mezzi che caratterizzano il traffico merci portuale e per le condizioni atmosferiche ventose, tipiche di queste

aree. L'impossibilità di disporre in loco di un congruo numero di operatori che quotidianamente accertasse il regolare posizionamento delle ovitrappe, ha rappresentato una importante criticità e, per tale motivo, la ricerca degli stadi immaturi è stata condotta solo per un periodo limitato nei porti di Bari e Taranto non riproposta nel porto di Manfredonia, pur nella consapevolezza della sua utilità. Ulteriori difficoltà nel porto di Taranto sono state riscontrate per gli eventi connessi alla "vicenda ILVA" (manifestazioni, blocchi stradali) che, in diverse occasioni, non hanno consentito l'accesso all'area portuale.

Rappresenta un punto di forza di questo studio la co-ispezione sanitaria di merci a rischio, finalizzata alla ricerca di uova di *Aedes*; pur se eseguita non sistematicamente, ma solo su due carichi di piante, tale attività ha posto le basi per la costruzione di un possibile modello. Fondamentale per il suo concretizzarsi è stato l'interesse alla problematica e la disponibilità a collaborare, mostrata dai responsabili degli uffici dell'Osservatorio Fitosanitario della Regione Puglia e Agenzia della Dogana e Monopoli. Il personale di detti Enti ha attivamente collaborato, non solo informandoci puntualmente sul complesso iter burocratico relativo al rilascio delle necessarie autorizzazioni, ma ha fornito indispensabili informazioni tecniche sulle modalità ispettive in materia di controlli fitosanitari, di fatto creando le migliori condizioni affinché la ricerca di zanzare *Aedes* (adulti e stadi immaturi) fosse resa possibile.

L'aver assistito al completo ciclo di operazioni correlate allo sdoganamento di questa merce ha fornito utili conoscenze sulle possibili problematiche (burocrazia, tempistica, ecc.) da affrontare per dare seguito a una ispezione fitosanitaria sul campo.

Sulla base della nostra esperienza, ad esempio, l'esecuzione di catture entomologiche nel container (adulti e uova) si ritiene poco concretizzabile per motivi di carattere pratico; a mo' di esempio vale la pena sottolineare che *i)* necessità di "mercato" impongono che la merce importata venga liberalizzata il prima possibile, riducendo di conseguenza i tempi per effettuare un eventuale monitoraggio nei containers *ii)* la presenza di cassoni in legno per l'alloggiamento delle piante, ostacolano l'accesso alla parte più interna del container, ecc. Ciò suggerisce che debbano essere studiati dei protocolli *ad hoc* in sinergia con le Istituzioni impegnate nel controllo delle merci di interesse.

Le piante esotiche ornamentali da noi analizzate nel corso delle due visite ispettive, pur ritenute epidemiologicamente a rischio, sembrerebbero poco esposte alla infestazione rispetto ad altre specie, quali ad esempio il "Lucky bamboo" (*Dracaena* spp.). Quest'ultima, infatti, è di norma importata in apposite vaschette o infissa su spugnette imbevute di acqua, mentre le specie da noi ispezionate erano in vaso (*Ficus microcarpa*) o in fusto (*Pachira aquatica*), condizioni apparentemente meno favorevoli l'ovideposizione e lo sviluppo di culicidi sebbene la notevole resistenza delle uova di *Aedes* spp. alla privazione dell'acqua e la loro capacità di schiudere, in condizioni favorevoli, non escludono, tuttavia, la presenza di merci infestate da uova vitali. Per questo motivo, riteniamo che l'ispezione fitosanitaria su piante importate dovrebbe essere parte del sistema di sorveglianza dei culicidi esotici e venire adeguatamente normata e realizzata su tutto il territorio nazionale, come raccomandato da linee guida nazionali e internazionali. Per far ciò, tuttavia, occorre stabilire "*Chi Fa Cosa*".

Le attività finalizzate alla sorveglianza e al controllo delle *invasive mosquitoes species* sono caratterizzate da una notevole complessità, in particolare nelle aree portuali/aeroportuali; esse necessitano di un numero elevato di operatori e della mobilitazione di diverse competenze, attuabile attraverso la collaborazione professionale (medici, biologi, veterinari, entomologi, fitopatologi, personale di dogana, autorità portuali e aeroportuali ecc.) e un'azione sinergica tra diverse Istituzioni per l'individuazione e adozione delle opportune strategie (32, 33).

Agli IZS, che dispongono di una rete distribuita capillarmente su tutto il territorio nazionale e di diversi profili professionali al loro interno, potrebbero essere affidate dette attività in tali aree, ivi compreso il controllo a campione su "merci a rischio". Nella nostra esperienza, la

collaborazione tra IZS e le diverse Istituzioni operanti in area portuale e aeroportuale ha favorito un costruttivo confronto e reso possibile l'individuazione e applicazione di interventi migliorativi e può essere considerata il punto di forza di questo progetto.

Nel pianificare gli interventi di lotta al vettore, la sorveglianza nei porti, così come negli aeroporti, appare un anello imprescindibile nella catena dei controlli per prevenire l'entrata e la diffusione di zanzare esotiche.

Ringraziamenti

Autorità Portuale di Bari, Taranto, Manfredonia; Ufficio di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera di Bari e Taranto; Capitaneria di Porto di Bari, Taranto, Manfredonia, Aeroporti di Puglia, Corpo Forestale dello Stato, Agenzia delle Dogane e dei Monopoli (Direzione Interregionale per la Puglia, il Molise e la Basilicata); Regione Puglia, Ufficio Osservatorio Fitosanitario, Reparto di Malattie trasmesse da vettore dell'Istituto Superiore di Sanità.

Bibliografia

1. Romi R, Majori G. Commercio di copertoni usati e importazione di zanzare: un aggiornamento della distribuzione di *Aedes albopictus* e *Aedes atropalpus* in Italia. *Notiz Ist Super Sanità* 1998;11(6):1-5.
2. Romi R. *Aedes albopictus* in Italia: un problema sanitario sottovalutato. *Ann Ist Super Sanità* 2001;37(2):241-7.
3. Versteirt V, Schaffner F, Garros C, Dekoninck W, Coosemans M, Van Bortel W. Introduction and establishment of the exotic mosquito species *Aedes japonicas japonicas* (Diptera: Culicidae) in Belgium. *Journal of Medical Entomology* 2009;46:1464-7.
4. Medlock JM, Hansford KH, Schaffner F, Versteirt V, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W. A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2012;12(6): 435-447.
5. Sabatini A, Raineri V, Trovato G, Coluzzi M. *Aedes albopictus* in Italia e possibile diffusione della specie nell'area mediterranea. *Parassitologia* 1990;32:301-4.
6. Dalla Pozza G, Majori G. First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *J Am Mosq Control Assoc* 1992;8(3): 318-20.
7. Romi R, Sabatinelli G, Giannuzzi Savelli L, Zago M, Malatesta R. Used tires imported from North America and invasion of *Aedes atropalpus* (Coquillett, 1902) in Italy. *J Am Mosq Control Assoc* 1997;13:245-6.
8. Scholte EJ, Jacobs F, Linton YM, Dijkstra E, Franssen J, Takken W. First record of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in the Netherlands. *European Mosquito Bulletin* 2007;22:5-9.
9. Scholte EJ, den Hartog W, Braks M, Reusken C, Dik M, Hessels A. First report of a north american invasive mosquito species *Ochlerotatus atropalpus* (coquillett) in The Netherlands, 2009. *Eurosurveillance* 2009;14:24-26.
10. Romi R, Di Luca M, Majori G. Current status of *Aedes albopictus* and *Aedes atropalpus* in Italy. *J Am Mosq Control Assoc* 1999;15:425-7.
11. Capelli G, Drago A, Martini S, Montarsi F, Soppela M, Delai N, Ravagnan S, Mazzon L, Schaffner F, Mathis A, Di Luca M, Romi R, Russo F. First report in Italy of the exotic mosquito species *Aedes (Finlaya) koreicus*, a potential vector of arboviruses and filariae. *Parasites & Vectors* 2011;4:188. doi 10.1186/1756-3305-4-188.
12. Seidel B, Montarsi F, Huemer HP, Indra A, Capelli G, Allerberger F, Nowotny N. First record of the Asian bush mosquito *Aedes japonicas japonicus* in Italy: invasion from an established Austrian population. *Parasites & Vectors* 2016;9:284 doi.org/10.1186/s13071-016-1566-6.

13. Giangaspero A, Cafiero MA. *Aedes albopictus* (zanzara tigre) nella provincia di Foggia: risultati della campagna 2006. Foggia: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata; 2006. (Dossier Q6/71).
14. Toma L, Di Luca M, Severini F, Boccolini D, Romi R. *Aedes aegypti*: risk of introduction in Italy and strategy to detect the possible re-introduction. In: *Pest Management e salute pubblica*. Teramo: Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise; 2011. (*Veterinaria Italiana - Monografia* 23). p. 18-26.
15. Severini F, Toma L, Di Luca M, Tomi R. Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti (Diptera, Culicidae). *Fragmenta Entomologica* 2009;41:213-372.
16. Romi R. Linee guida per la sorveglianza e il controllo di *Aedes albopictus* in Italia. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1996 (Rapporti ISTISAN 96/4).
17. European Centre for Disease Prevention and Control. *Technical Report. Development of Aedes albopictus risk maps*. Stockholm: ECDC; 2009. Disponibile all'indirizzo: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0905_TER_Development_of_Aedes_Alboipictus_Risk_Maps.pdf; ultima consultazione 14/5/2022
18. European Centre for Disease Prevention and Control. *Meeting Report. Expert consultation on guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes. Stockholm, 8-9 December 2011*. Stockholm: ECDC; 2012. Disponibile all'indirizzo: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1203-MER-ECDC-Expert-consultation-on-mosquito-surveillance-guidelines.pdf>; ultima consultazione 14/5/2022.
19. European Centre for Disease prevention and Control. *Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe*. Stockholm: ECDC; 2014.
20. World Health Organization. *Handbook for integrated vector management*. Geneva: WHO; 2012. Disponibile all'indirizzo: http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241502801_eng.pdf; ultima consultazione 14/5/2022.
21. EMCA/WHO. *Guidelines for the control of mosquitoes of public health importance in Europe*. European Mosquito Control Association, WHO Regional Office for Europe; 2013. Disponibile all'indirizzo: https://www.emca-online.eu/assets/PDFs/EMCA_WHOEURO-Guidelines_Control_Mosquitoes_PH_Importance_Europe-2013.pdf; ultima consultazione 20/6/2022.
22. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A, (2007). Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 2007;370:1840-46.
23. La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P, Lenglet A, Jourdain F, Leparc-Goffart I, Charlet F, Ollier L, Mantey K, Mollet T, Fournier JP, Torrents R, Leitmeyer K, Zeller H, Van Bortel W, Dejour-Salamanca D, Grandadam M, Gastellu-Etcheberry M. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Eurosurveillance* 2010;15(39):19676.
24. Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, Lesnikar V, Klobučar A, Pem-Novosel I, Kurečić-Filipović S, Komparak S, Martić R, Đuričić S, Betica-Radić I, Okmadžić J, Vilibić-Čavlek T, Babić-Erceg I A, Turković B, Avšić-Županc T, Radić I, Ljubić M, Šarac K, Benić N, Mlinarić-Galinović G. Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Eurosurveillance* 2011;16:2-5.
25. World Health Assembly. Resolution WHA58.3. Revision of the International Health Regulations. In: *Fifty-eighth World Health Assembly*, Geneva, 16-25 May 2005. Volume 1. Resolutions and decisions, and list of participants. Geneva: World Health Organisation; 2005. Disponibile all'indirizzo: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA58-REC1/english/Resolutions.pdf, accessed 14 July 2013).
26. Vaux AGC, Murphy G, Baskerville N, Burden G, Convery N, Crossley L, Dettman L, Haden P, Jarrold L, Massey C, Napier K, Pocknell I, Seddon S, Smith A, Tsoi S, Medlock JM. Monitoring for invasive and endemic mosquitoes at UK Seaports. *European Mosquito Bulletin* 2011;29:133-40.

27. Toma L, Severini F, Di Luca M, Boccolini D, Laghezza-Masci V, Buzzi G, Pautasso A, Fausto AM, Romi R. Indagine sulla fauna culicidica nel porto di Civitavecchia. In: *Atti XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Orosei 9-14 giugno 2014*, p. 83.
28. Cancrini G, Scaramozzino P, Gabrielli S, Di Paolo M, Toma L, Romi R. *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* implicated as natural vectors of *Dirofilaria repens* in central Italy. *J Med Entomol* 2007;44:1064-6.
29. Giangaspero A, Marangi M, Latrofa MS, *et al.* Evidences of increasing risk of dirofilarioses in southern Italy. *Parasitol Res* 2013;112:1357-61.
30. Capelli G, Genchi C, Baneth G, *et al.* Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasites & Vectors* 2018;11:663.
31. Raele DA, Pugliese N, La Bella G, Calvario A, Scarasciulli M, Vasco I, La Salandra G, Cafiero MA. (2021). Molecular detection of *Dirofilaria repens* in an Italian patient after a stay in Tanzania, *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 2021;104 (6):2042-45 doi 10.4269/ajtmh.20-1360.
32. Mancini G, Chiocco D, Galante D, Palmisano L, Raele D, Nardella La Porta C, Schino G, Cafiero MA. Zanzare esotiche (*Aedes*) nei porti pugliesi: risultati preliminari di uno studio pilota. In: *Atti XV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V, Monreale (PA)*, 23-25 ottobre 2013.
33. Mancini G, Galante D, Chiocco D, Lecce G, Palmisano L, Bianco P, Raele D.A, Cafiero MA. Surveillance of invasive mosquitoes at seaports: monitoring and study by questionnaire in Italy (Apulia region). In: *Atti Convegno ECE 2014 York*, 3-9 August, 2014.

PREVENZIONE DELL'INTRODUZIONE E DIFFUSIONE DI SPECIE ESOTICHE INVASIVE IN SARDEGNA

Cipriano Foxi (a), Stefano Cappai (b), Luigi Vento (a), Salvatore Ledda (a), Giuseppe Satta (a)

(a) *Struttura Complessa Sanità animale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna*
"G. Pegreffi", Sassari

(b) *Centro di Sorveglianza Epidemiologica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna*
"G. Pegreffi, Cagliari

A partire dal 2016 è stato definito un accordo di collaborazione tra l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna (IZSSA) e l'Ufficio Sanità Marittima Aeroportuale di Frontiera (USMAF) di Porto Torres e Cagliari rivolto ad individuare l'introduzione di nuove specie di zanzare, in particolare vettrici di patologie umane, in Sardegna.

A tale scopo è stato predisposto un programma di sorveglianza entomologica per monitorare nel territorio regionale le specie di zanzare di nuova introduzione per la fauna italiana e nello specifico per la fauna regionale e valutare la possibile diffusione di virus di interesse sanitario. Inoltre è stata studiata la diffusione e l'abbondanza di specie autoctone, in particolare *Aedes albopictus*, potenzialmente vettrici di patologie virali in aree urbane.

Descrizione delle attività

La sorveglianza entomologica è stata eseguita nei più importanti punti di ingresso dell'isola (Figura 1).

Questi punti sono:

- scalo commerciale e passeggeri del porto di Cagliari (3 trappole);
- aeroporto civile di Cagliari - Elmas (3);
- scalo commerciale del porto di Oristano - Santa Giusta (2);
- scalo commerciale e passeggeri del porto di Olbia (2);
- aeroporto civile di Olbia (3);
- aeroporto civile e militare di Alghero (3);
- scalo passeggeri del porto di Porto Torres (1);
- scalo passeggeri del porto di Santa Teresa di Gallura (1).

Il monitoraggio urbano ha interessato le principali città dell'isola e in particolare sono state posizionate:

- 2 trappole a Cagliari;
- 2 ad Oristano;
- 2 a Tortolì;
- 2 a Nuoro;
- 2 ad Olbia,
- 1 a Sassari;
- 1 ad Alghero.

Sono state utilizzate trappole di tipo BG-Sentinel® (*Biogents' mosquito trap*), sviluppate in particolare per il monitoraggio delle zanzare appartenenti al genere *Aedes*. Le trappole, innescate con lo specifico attrattivo chimico, sono state sistemate in ambienti esterni in luoghi riparati da pioggia, vento e luce solare diretta e in prossimità di siti di sviluppo larvale (Figura 2).

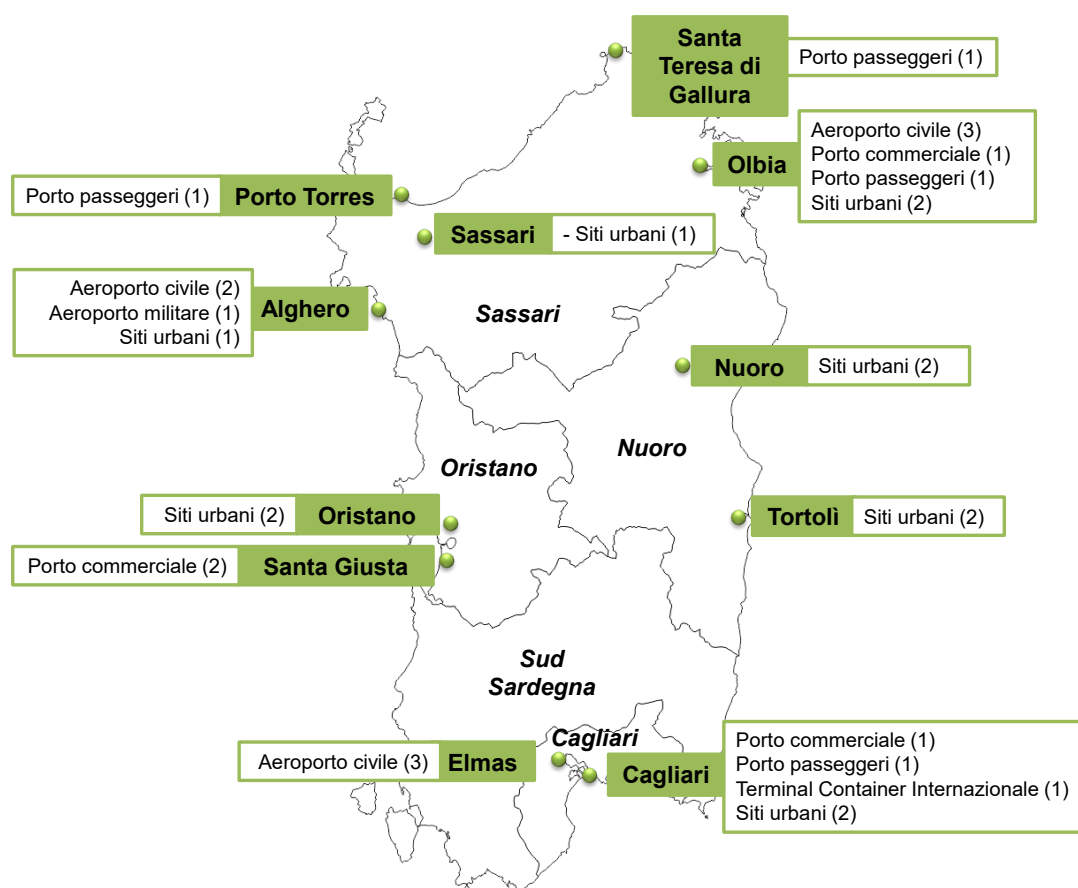


Figura 1. Mappa della Sardegna con la localizzazione dei siti di cattura nel biennio 2018-2019 (tra parentesi il numero di trappole posizionate)



Figura 2. Esempi di habitat larvali riscontrati nelle aree di sorveglianza entomologica: (a) accumulo di copertoni, (b) tombini, (c) vasche di raccolta, (d) piccole raccolte d'acqua

In particolare nei porti sono state posizionate in prossimità degli attracchi delle navi mentre negli aeroporti sono state collocate di fronte all'area di sosta degli aerei di linea dei voli nazionali e internazionali e in prossimità delle aree di scarico dei bagagli o delle merci (Figura 3).

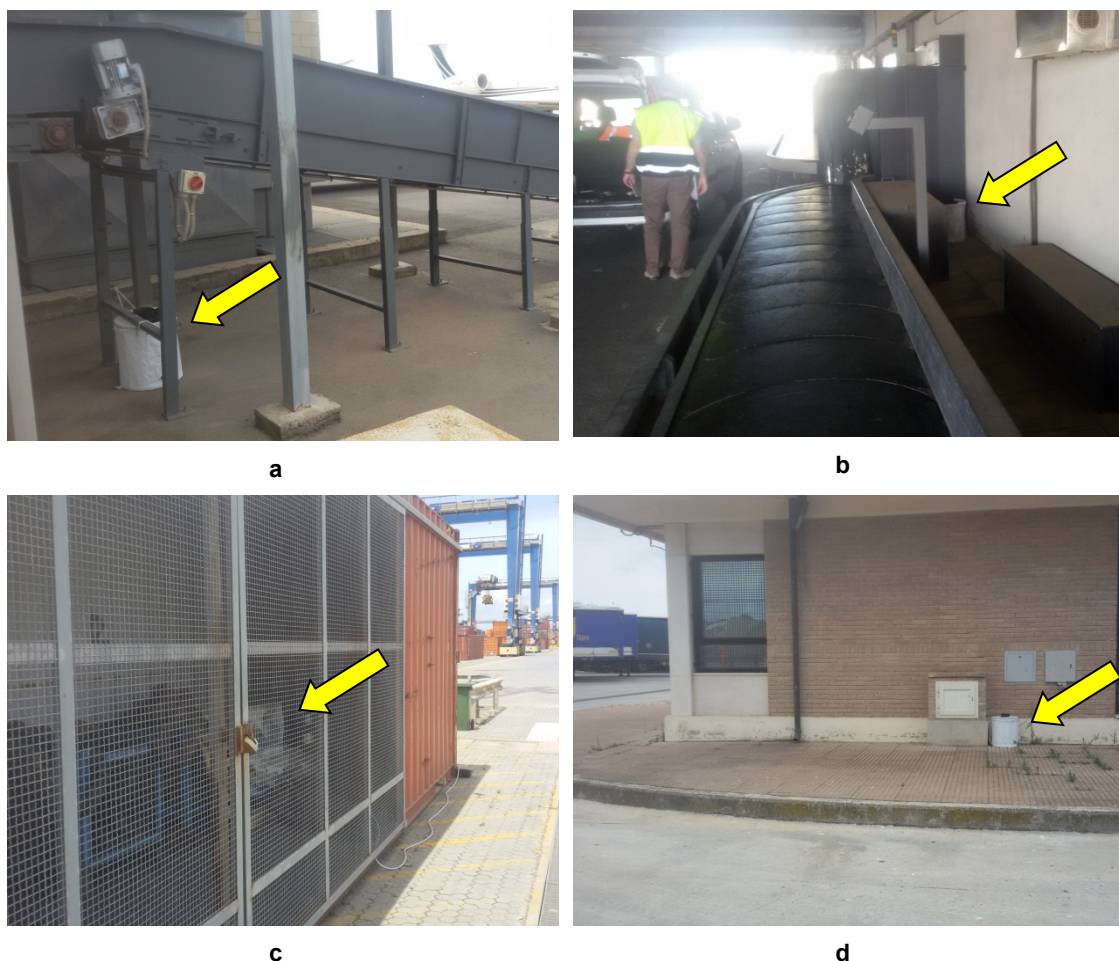


Figura 3. Trappole BG-Sentinel posizionate in prossimità delle aree di sosta degli aerei (a) e degli scarichi bagagli (b) negli aeroporti; nelle aree di scarico dei container negli scali commerciali (c) e scalo passeggeri (d) nei porti. La freccia indica la posizione della trappola.

Nei siti urbani sono state spesso sistemate in aree verdi (orti botanici o ampi giardini di ospedali e scuole) e cimiteri. Il monitoraggio viene svolto annualmente da marzo sino a dicembre con catture a cadenza quindicinale. Ogni trappola viene attivata per 24 ore e le zanzare catturate vengono inviate il più rapidamente possibile al laboratorio di Entomologia e controllo dei vettori dell'IZSSA per l'identificazione morfologica delle specie.

Successivamente vengono raggruppate in *pool* contenenti massimo 25 esemplari della stessa specie e della stessa data e località di cattura, quindi inviate al laboratorio di Virologia dell'IZSSA per la ricerca dei virus tramite *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*). In particolare vengono ricercati *West Nile Virus* (WNV) e *Usutu Virus* (USUV), già circolanti nell'Isola, *dengue virus* (DENV) e *chikungunya virus* (CHIKV), segnalati nel territorio nazionale e comunque presenti nel bacino del Mediterraneo, e *Zika Virus* (ZIKV) in quanto nel 2016

l'Italia è stata considerata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) a moderata probabilità di trasmissione del virus (1).

Risultati

Di seguito vengono riportati i risultati dello studio entomologico effettuato nel 2018 e 2019. In questo biennio il monitoraggio ha interessato nel complesso 11 comuni con il posizionamento di 30 trappole per la cattura di adulti di culicidi. Nel 2018 sono stati effettuati 513 campionamenti che hanno portato alla cattura di 4.254 zanzare (Tabella 1).

Tabella 1. Culicidi catturati in Sardegna nel 2018 e 2019 nell'ambito della sorveglianza entomologica per prevenire l'introduzione di nuove specie invasive

Specie	2018			2019		
	M	F	T	M	F	T
<i>Aedes albopictus</i>	252	676	928	261	674	935
<i>Aedes</i> spp.	1	1	2	2	1	3
<i>Anopheles labranchiae</i> s.l.	0	2	2	0	2	2
<i>Anopheles</i> spp.	0	0	0	0	1	1
<i>Culex hortensis</i>	7	34	41	5	1	6
<i>Culex pipiens</i>	324	2708	3032	217	2218	2435
<i>Culex</i> spp.	1	15	16	3	2	5
<i>Culex theileri</i>	0	1	1	0	7	7
<i>Culiseta annulata</i>	0	16	16	0	0	0
<i>Culiseta longiareolata</i>	49	27	76	21	18	39
<i>Culiseta subochrea</i>	0	1	1	0	0	0
<i>Ochlerotatus caspius</i>	22	96	118	1	15	16
<i>Ochlerotatus detritus</i>	1	19	20	0	3	3
<i>Ochlerotatus geniculatus</i>	0	1	1	0	0	0
Totale	657	3597	4254	510	2942	3452

M = Maschi; F = Femmine; T = Totale

Le specie più abbondanti sono risultate *Culex pipiens* con 3.032 individui (71%) e *Aedes albopictus* con 928 adulti (22%). Nel 2019 il campionamento entomologico è stato condotto negli stessi comuni dell'anno precedente e con lo stesso numero di trappole. Sono stati eseguiti 529 campionamenti che hanno consentito la cattura di 3.452 zanzare (Tabella 1). Anche nel 2019 la specie più numerosa è stata *Cx. pipiens* con 2.435 adulti (71%) seguita da *Ae. albopictus* con 935 esemplari (27%).

Culex pipiens è stata catturata durante tutto il periodo di indagine con un picco di abbondanza nel mese di giugno in entrambi gli anni (Figura 4). *Aedes albopictus*, invece, è risultata assente nei mesi di marzo e aprile; successivamente le sue popolazioni sono aumentate raggiungendo dei massimi a fine estate e inizio autunno (Figura 4).

Tutte le zanzare sono state analizzate per la ricerca dei 5 virus precedentemente riportati. Nel 2018 sono stati analizzati 684 *pool* ed è stata rilevata una sola positività per WNV in un campione di femmine di *Cx. pipiens* catturate il 28 giugno nella trappola posizionata nell'aeroporto dell'aeronautica militare di Alghero (SS). Nel 2019 sono stati esaminati 607 *pool* e non è stata rilevata nessuna positività.

Il monitoraggio entomologico condotto in Sardegna nel corso del 2018 e 2019 non ha evidenziato la presenza di nuove specie invasive ma ha consentito di rilevare la presenza di 11 specie di zanzare autoctone o esotiche, come *Ae. albopictus*, note da tempo e con popolazioni attualmente ben stabili nel territorio regionale. Durante le nostre indagini *Cx. pipiens* e *Ae. albopictus* sono state le principali specie rilevate e hanno rappresentato oltre il 95% del totale delle zanzare catturate. Entrambe le specie sono presenti in Sardegna con popolazioni ampiamente diffuse nelle aree urbane, suburbane e rurali.

In Europa, *Cx. pipiens* è considerato un importante vettore di diversi virus zoonotici compresi WNV, USUV, virus della *Rift Valley Fever* (RVFV) e virus dell'encefalite giapponese (JEV) (2, 3). In Sardegna questa specie è stata ritrovata positiva per WNV e USUV. *Culex pipiens* comprende due differenti biotipi: *Culex pipiens pipiens* e *Culex pipiens molestus* (4).

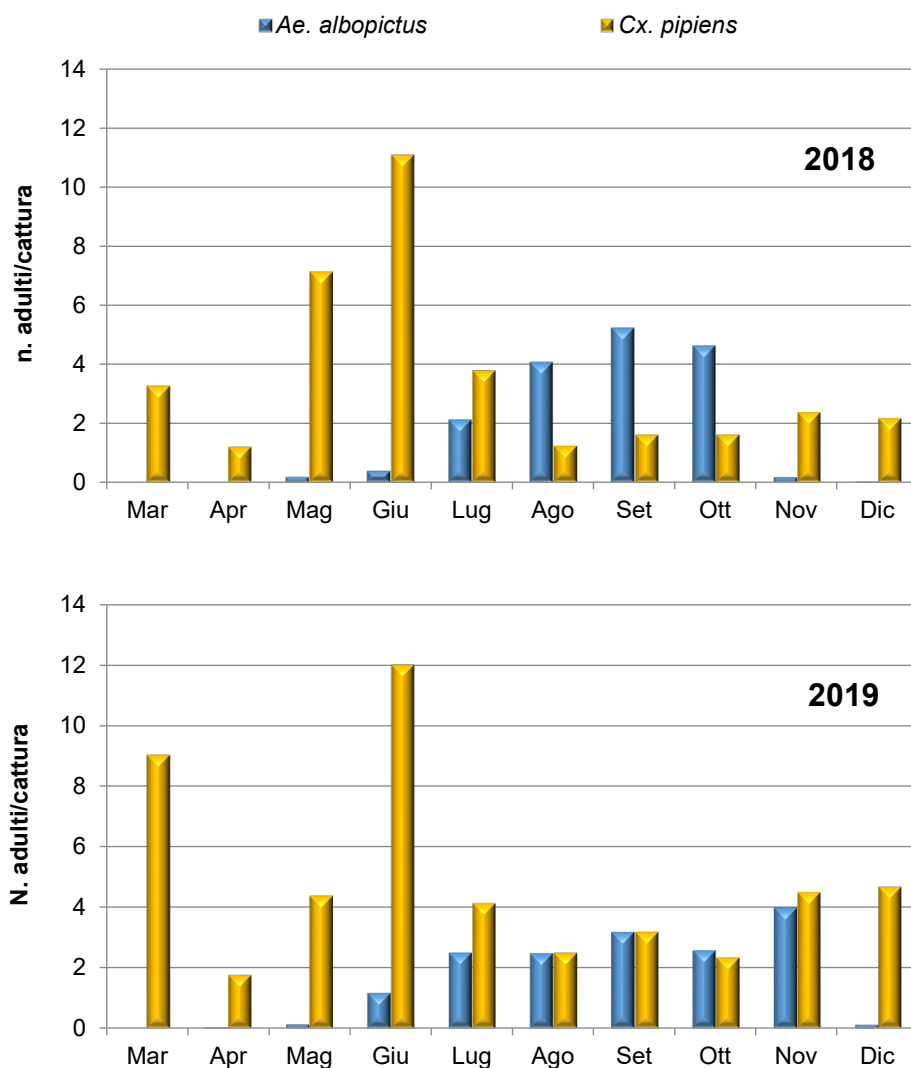


Figura 4. Dinamica stagionale delle popolazioni di *Aedes albopictus* e *Culex pipiens* rilevate con trappole BG-Sentinel in Sardegna nel 2018 e 2019

Queste forme sono morfologicamente indistinguibili ma esibiscono caratteristiche biologiche e fisiologiche differenti. Inoltre, esiste anche una forma ibrida che presenta caratteristiche biologiche di entrambe le forme. Durante le nostre indagini non sono state eseguite analisi biomolecolari per discriminare le 3 forme ma considerando un precedente studio condotto in Italia (5), non possiamo escludere la presenza di tutte e tre le forme di *Cx. pipiens*.

Aedes albopictus, specie originaria delle zone tropicali e sub tropicali, è stata segnalata per la prima volta in Italia nel 1990 e in Sardegna nel 1994, dove attualmente presenta popolazioni ben stabilizzate. Questa specie, strettamente correlata con *Aedes aegypti*, è considerata un potenziale vettore di DENV, CHIKV e ZIKV. Infatti, femmine di *Ae. albopictus* sono state ritrovate naturalmente infette per ZIKV in varie parti del mondo e, inoltre, tale specie ha supportato la replicazione virale dopo infezione sperimentale in laboratorio (6). Attualmente è considerata vettore di DENV e CHIKV dopo ripetuti isolamenti virali in adulti catturati in alcuni paesi africani ed europei, Italia compresa (7, 8). *Aedes albopictus* si nutre principalmente su animali selvatici e domestici inclusi esseri umani. È una specie particolarmente aggressiva e presenta spiccata esofagia ed esofilia.

Questo monitoraggio eseguito per verificare il potenziale ingresso di nuove specie invasive è stato molto importante anche perché ha consentito di evidenziare anticipatamente la circolazione di WNV in Sardegna. Infatti il ritrovamento di zanzare infette catturate il 28 giugno è stato il primo della stagione nel 2018 permettendo così di allertare il sistema sanitario regionale sulla circolazione virale nell'Isola.

I ripetuti focolai di WNV e CHIKV nel territorio nazionale e di DENV in alcuni paesi europei e le occasionali segnalazioni di casi umani di importazione rappresentano una continua e rilevante minaccia da considerare. Infatti un caso importato è una potenziale fonte di infezione che in presenza di una idonea popolazione di vettori potrebbe determinare la diffusione della malattia. In Italia, inoltre, recentemente è stata segnalata l'introduzione di due nuove specie esotiche *Aedes koreicus* e *Aedes japonicus*, il cui potenziale ruolo vettore è ancora da valutare (9; 10).

L'aumento della connettività globale, dei traffici commerciali e i cambiamenti climatici rappresentano un rischio reale di diffusione di patogeni esotici e artropodi vettori di malattie. La Sardegna rappresenta un territorio ad elevata probabilità di introduzione di arbovirus perché situata al centro del bacino del Mediterraneo con un'alta intensità di flussi turistici e commerciali e una popolazione ben consolidata di specie vettrici, tra cui *Ae. albopictus*. La sorveglianza entomologica nelle aree urbane e nei punti di ingresso, come porti e aeroporti, dovrebbe essere fortemente implementata e resa permanente per fornire informazioni epidemiologiche continue al fine di poter valutare il rischio di introduzione di arbovirus in Italia.

Bibliografia

1. WHO/Europe. *Zika virus technical report. Interim Risk Assessment May 2016*. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe; 2016.
2. Moutailler S, Krida G, Schaffner F, Vazeille M, Failloux AB. Potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean Region. *Vector-Borne and Zoonotic Disease*, 2008;8:749-54.
3. Ravanini P, Huhtamo E, Ilaria V, Crobu MG, Nicosia AM, Servino L, Rivasi F, Allegrini S, Miglio U, Magri A, Minisini R, Vapalahti O, Boldorini R. Japanese encephalitis virus RNA detected in *Culex pipiens* mosquitoes in Italy. *Euro Surveillance* 2012;17(28):pii=20221.
4. Amara Korba R, Alayat MS, Bouiba L, Boudrissa A, Bouslama Z, Boukraa S, Francis F, Failloux AB, Boubidi SC. Ecological differentiation of members of the *Culex pipiens* complex, potential vectors of West Nile virus and Rift Valley fever virus in Algeria. *Parasites and Vectors* 2016;9:455. doi: 10.1186/s13071-016-1725-9.

5. Di Luca M, Toma L, Boccolini D, Severini F, La Rosa G, Minelli G, Bongiorno G, Montarsi F, Arnoldi D, Capelli G, Rizzoli A, Romi R. Ecological distribution and CQ11 genetic structure of *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) in Italy. *PLoS One* 2016;11(1):e0146476. doi:10.1371/journal.pone.0146476.
6. Di Luca M, Severini F, Toma L, Boccolini D, Romi R, Remoli ME, Sabbatucci M, Rizzo C, Venturi G, Rezza G, Fortuna C. Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Eurosurveillance* 2016;21(18). doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.18.30223.
7. Sivan A, Shriram AN, Sugunan AP, Anwesh M, Muruganandam N, Kartik C, Vijayachari P. Natural transmission of dengue virus serotype 3 by *Aedes albopictus* (Skuse) during an outbreak in Havelock Island: Entomological characteristics. *Acta Tropica* 2016;156:122-9. doi:10.1016/j.actatropica.2016.01.015.
8. Venturi G, Di Luca M, Fortuna C, Remoli ME, Riccardo F, Severini F, Toma L, Del Manso M, Benedetti E, Caporali MG, Amendola A, Fiorentini C, De Liberato C, Giammattei R, Romi R, Pezzotti P, Rezza G, Rizzo C. Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy, August to September 2017. *Euro Surveill* 2017;22(39):pii=17-00646. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00646>.
9. Montarsi F, Drago A, Martini S, Calzolari M, De Filippo F, Bianchi A, Mazzucato M, Ciocchetta S, Arnoldi D, Baldacchino F, Rizzoli A, Capelli G. Current distribution of the invasive mosquito species, *Aedes koreicus* [*Hulecoeteomyia koreica*] in northern Italy. *Parasites and Vectors* 2015;8:614.
10. Seidel B, Montarsi F, Huemer HP, Indra A, Capelli G, Allerberger F, Nowotny N. First record of the Asian bush mosquito, *Aedes japonicus japonicus*, in Italy: invasion from an established Austrian population. *Parasites and Vectors* 2016;9:284.

QUARTA SEZIONE
Nuove frontiere della sorveglianza entomologica

CITIZEN SCIENCE PER IL MONITORAGGIO DELLE ZANZARE: IL PROGETTO MOSQUITO ALERT

Beniamino Caputo (a), Eleonora Longo (a), Alice Michelutti (b), Fabrizio Montarsi (b), Maria Vittoria Zucchelli (c), Valeria Lencioni (c), Daniel Remondini (d), Marco Di Luca (e), Francesco Severini (e), Alessandra della Torre (a)

(a) Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Roma

(b) Laboratorio di Parassitologia, Micologia ed Entomologia Medica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (Padova)

(c) Area Biodiversità, Museo delle Scienze - MUSE, Trento

(d) Dipartimento di Fisica e Astronomia, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Bologna

(e) Dipartimento Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Che cos'è Mosquito Alert?

Mosquito Alert è un progetto di scienza partecipata (*citizen science*) che si avvale di un'applicazione (App) per smartphone e dispositivi affini per coinvolgere i cittadini nella raccolta di dati in modo da contribuire allo studio, al monitoraggio e al controllo delle specie di zanzare presenti in Europa, che non solo rappresentano una fonte di fastidio e un eventuale danno economico (es. nel settore turistico), ma che sono anche potenziali vettori di malattie virali quali ad esempio la dengue, Zika, chikungunya e la febbre del Nilo Occidentale (*West Nile Disease*, WND). Attraverso l'App gratuita Mosquito Alert i cittadini possono inviare agli esperti segnalazioni fotografiche di zanzare e contribuire così al monitoraggio e alla sorveglianza di *Aedes albopictus* – la zanzara tigre – e di altre specie invasive del genere *Aedes* (*Aedes japonicus*, *Aedes koreicus*, *Aedes aegypti*) e della zanzara urbana autoctona più comune in Europa (*Culex pipiens*) (Figura 1).

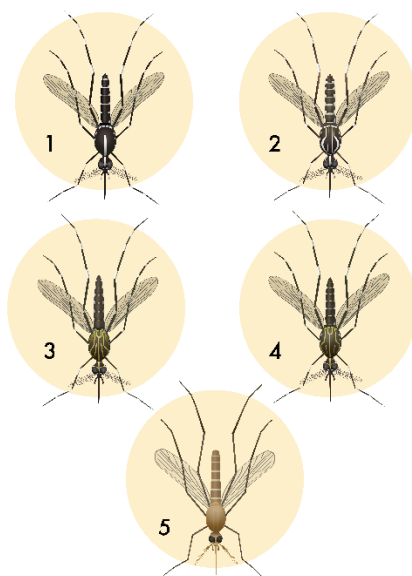


Figura 1. Le cinque specie di zanzara focus dell'applicazione Mosquito Alert: (1) *Aedes albopictus*; (2) *Aedes aegypti*; (3) *Aedes japonicus*; (4) *Aedes koreicus*; (5) *Culex pipiens*
Fonte: Mosquito Alert CC-BY, "Guida sulle zanzare"

Inoltre, l'applicazione permette di inviare foto dei potenziali focolai larvali identificati dai cittadini, e segnalazioni sulle punture ricevute. Queste ultime, non richiedendo l'invio di fotografie, sono meno laboriose per l'utente e, pur non essendo verificabili come le segnalazioni fotografiche, consentono di stimare la possibilità di contatto tra le zanzare e l'uomo, parametro di fondamentale importanza sia per la valutazione del rischio di trasmissione di patogeni e la pianificazione degli interventi di controllo.

Il processo di raccolta dati, l'analisi dei risultati e la disseminazione del progetto Mosquito Alert sono mostrati in Figura 2.



Figura 2. Progetto Mosquito Alert:
i diversi step nel processo di raccolta dati, analisi dei risultati e divulgazione

Le segnalazioni fotografiche di esemplari di zanzara inviate dai cittadini tramite l'App (step 2) vengono validate da un team di esperti entomologi (step 3), che notifica direttamente all'utente tramite l'App la specie di zanzara identificata (step 4). Le foto validate vengono pubblicate online in tempo reale su una mappa interattiva di pubblico accesso (<http://webserver.mosquitoalert.com/>) (step 5). I dati raccolti vengono poi analizzati dai ricercatori (step 6) al fine di monitorare l'espansione delle specie invasive già presenti nel territorio, sorvegliare l'introduzione di nuove specie (come la temibile *Aedes aegypti*, principale vettore di arbovirus in aree tropicali, che potrebbe cambiare drasticamente il rischio di trasmissione di arbovirus in Italia), produrre mappe interattive pubblicate per l'Italia sul sito www.mosquitoalertitalia.it) (step 7) nonché monitorare e stimare il rischio di trasmissione di patogeni e fornire infine informazioni utili per pianificare gli interventi di controllo.

Perché Mosquito Alert?

Le zanzare (Diptera: Culicidae) sono vettori di patogeni per l'uomo e gli animali. All'uomo trasmettono patogeni di natura parassitaria, come i plasmodi della malaria, e virale (arbovirus). Nelle regioni tropicali provocano oltre 700.000 morti ogni anno (1) (per approfondimenti è possibile consultare le pagine dell'OMS sulle malattie trasmesse da vettori: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>), tuttavia il rischio di trasmissione di alcuni patogeni, e in particolare di alcuni arbovirus, è presente anche in Europa e in Italia, seppure in misura minore.

La zanzara comune, *Culex pipiens*, autoctona in Italia, è vettore primario della malattia endemica della WND causata da un flavivirus (per approfondimenti è consultare il sito del Ministero della Salute al seguente indirizzo: <https://www.salute.gov.it/portale/sanitaAnimale/dettaglioContenutiSanitaAnimale.jsp?lingua=italiano&id=214&tab=3>).

Inoltre, negli ultimi decenni la globalizzazione e l'aumento della circolazione internazionale di merci e persone, l'urbanizzazione, i cambiamenti climatici e ambientali hanno consentito a specie invasive del genere *Aedes*, diffuse originariamente in aree tropicali e sub-tropicali del sud-est asiatico, di estendere enormemente il proprio areale di distribuzione invadendo e colonizzando nuove aree incluse quelle temperate (2).

L'Italia è stato il primo Paese europeo ad essere invaso e colonizzato quasi completamente dalla zanzara tigre asiatica, *Ae. albopictus*, negli anni '90 (3-5) e negli ultimi anni sta assistendo alla colonizzazione da parte di *Ae. japonicus* e *Ae. koreicus*, due specie adattate a climi più freddi della prima, e in espansione anche nel centro Europa (6-8). Queste specie sono importanti vettori di arbovirus, quali il chikungunya, dengue, Zika e il virus dell'encefalite giapponese. La possibile introduzione di questi virus tramite viaggiatori viremici provenienti da aree endemiche e la presenza sul territorio di queste specie hanno creato il presupposto per l'istaurarsi di cicli di trasmissione autoctona. Segnalazioni di casi si registrano ormai ogni anno in paesi dell'Europa meridionale, e in Italia si sono verificate le prime due epidemie del virus chikungunya in Europa, la prima nel 2007 con 197 casi notificati a Cervia (Ravenna) (9), e la seconda nel 2017 con focolai epidemici nei comuni di Anzio, Roma e Latina per un totale di 242 casi nel Lazio e 74 casi nel comune di Guardavalle Marina in Calabria (10, 11). Nel 2020, inoltre è stato registrato il primo focolaio di trasmissione autoctona del virus dengue in provincia di Vicenza (12).

Il monitoraggio entomologico nello spazio e nel tempo delle specie di zanzare autoctone e la sorveglianza dell'introduzione e dell'espansione delle specie invasive attraverso metodi tradizionali (es. ovitrappole, trappole per adulti) sono fortemente limitati da fattori economici e giurisdizionali, e sono effettuati in maniera molto disomogenea nel territorio tanto in Italia, quanto in altri Paesi europei. Pur non potendosi sostituire integralmente al monitoraggio entomologico, il coinvolgimento attivo dei cittadini nella raccolta dei dati offre la possibilità di superare molti di questi ostacoli (13, 14). Il progetto Mosquito Alert consente inoltre di formare la cittadinanza a conoscere meglio le zanzare e i rischi sanitari ad esse connesse e ad adottare le misure preventive necessarie per limitarne la diffusione. Il risultato è la produzione di informazioni sul monitoraggio di specie invasive e autoctone, accurate e tempestive, che possono costituire una valida fonte di dati da utilizzare per la salute pubblica.

Inoltre, nel 2020 il Ministero della Salute ha pubblicato il Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi 2020-2025 (PNA) che individua le attività da attuarsi in un periodo di sei anni per la prevenzione della trasmissione di arbovirus, con particolare riferimento ai virus trasmessi da zanzare, ed estende la sorveglianza a livello nazionale alle specie di zanzare invasive e al monitoraggio delle resistenze agli insetticidi. Il PNA individua azioni di carattere generale da realizzarsi a livello nazionale nel breve o nel lungo periodo, lasciando alle

Regioni e agli Enti Locali il compito di pianificare e attuare azioni specifiche sulla base della vulnerabilità del territorio all'impatto dei cambiamenti climatici. Consapevole delle difficoltà nell'implementazione di attività entomologiche di monitoraggio e sorveglianza su vasta scala, il PNA menziona esplicitamente:

“la diffusione della ‘citizen science’, intesa come una fattiva collaborazione tra cittadini e ricercatori finalizzata ad arricchire le banche dati delle segnalazioni di specie esotiche e di raccolta dati nelle attività di monitoraggio”.

Più in generale, i progetti di *citizen science*, coordinati e sostenuti da organizzazioni impegnate nella ricerca scientifica, hanno una forte connotazione educativa: i) condividono con la popolazione dati e informazioni scientifiche, ii) sensibilizzano i cittadini a problematiche attuali e iii) aumentano la loro consapevolezza e la conoscenza del metodo scientifico.

Origine di Mosquito Alert e sviluppo di Mosquito Alert Italia

Il monitoraggio entomologico delle zanzare – essenziale per conoscere la biodiversità, la distribuzione, l'abbondanza e la dinamica stagionale nei diversi habitat, tracciare la diffusione, stimare il rischio di trasmissione di virus e ottimizzare le strategie di controllo delle specie endemiche e di quelle invasive – presenta molti limiti di fattibilità, in primo luogo economici, e difficilmente viene condotto, se non sporadicamente, a livello locale. Nell'ultimo decennio si è diffusa la consapevolezza della potenzialità della *citizen science* nel superare questi limiti e nel fornire un contributo importante per integrare i dati entomologici attraverso segnalazioni volontarie da parte dei cittadini (13, 14).

In questo contesto, nel 2014 è stato avviato in Spagna il progetto Mosquito Alert (inizialmente nominato Tigratrapp) con l'obiettivo di monitorare l'espansione della zanzara tigre asiatica, grazie a segnalazioni fotografiche geolocalizzate inviate dai cittadini tramite un'apposita App gratuita e completamente open-source e validate da esperti entomologi (15). Negli anni successivi, il progetto ha consentito di monitorare con successo l'invasione del Paese da parte di *Ae. albopictus* (16), di identificare per la prima volta in Spagna la presenza di una nuova specie invasiva, *Ae. japonicus* (17) e di cominciare a costruire modelli di rischio di presenza di specie vettrici (15).

Negli stessi anni, altri progetti di *citizen science* sono stati attivati in Europa con lo scopo di acquisire maggiori conoscenze sulle zanzare tramite l'aiuto dei cittadini e di aumentare le conoscenze della cittadinanza su questi insetti, sui rischi sanitari ad essi connessi e sulle misure preventive da mettere in atto a livello individuale per prevenirne la diffusione. In Germania, per esempio, è attivo dal 2012 il progetto Mückenatlas, in cui i cittadini sono chiamati a raccogliere e inviare campioni di zanzare per coadiuvare il monitoraggio svolto dai ricercatori sul territorio (18). Mückenatlas è diventato uno strumento efficiente per la raccolta di dati, con quasi 30.000 zanzare raccolte dal 2012 al 2015, e ha permesso la scoperta di esemplari di *Ae. albopictus*, *Ae. japonicus* e *Ae. koreicus*. Inoltre, le osservazioni di Mückenatlas hanno portato alla rilevazione di tre popolazioni di *Ae. japonicus* nella Germania occidentale, settentrionale e sudorientale rispettivamente nel 2012, 2013 e 2015 (19, 20).

Nei Paesi Bassi, invece, nel gennaio 2014, è stato attivato il progetto Muggenradar (www.muggenradar.nl), uno strumento di sorveglianza inizialmente lanciato per studiare l'attività delle zanzare durante l'inverno. Tramite la compilazione di un questionario, i partecipanti hanno fornito varie informazioni sulle zanzare e sul fastidio da loro percepito. Ai partecipanti, inoltre, è

stata data la possibilità di presentare campioni di zanzare per ulteriori identificazioni. Muggenradar ha permesso la raccolta di oltre 3.000 questionari e più di 2.000 zanzare (21).

In Italia, nel 2016 è stato lanciato dall'Università Sapienza di Roma il progetto pilota ZanzaMapp, nell'ambito del quale i cittadini potevano segnalare la presenza di zanzare tramite un'apposita App sviluppata grazie alla collaborazione tra GH srl (Roma, Italia) e l'Università Sapienza di Roma. ZanzaMapp rappresenta la prima applicazione mobile per smartphone progettata specificamente per valutare la percezione dei cittadini dell'abbondanza e del fastidio provocato dalle zanzare. A differenza di altre App che richiedono un discreto sforzo da parte dei cittadini per inviare segnalazioni fotografiche o addirittura esemplari di zanzare, ZanzaMapp richiedeva agli utenti di rispondere a quattro semplici domande sulla presenza e abbondanza delle zanzare e del fastidio percepito, geolocalizzando il sito della segnalazione. In questo senso, ZanzaMapp dava priorità alla quantità delle segnalazioni (presumibilmente più elevato grazie alla semplicità e velocità d'uso), rispetto alla qualità delle segnalazioni fotografiche o dell'identificazione dell'esemplare, richiesti dalle altre App europee. In effetti, malgrado una modesta campagna di promozione del progetto, dal 2016 al 2018 è stato possibile ottenere 36.867 segnalazioni. La validità dell'approccio è stata poi confermata confrontando i risultati ottenuti con ZanzaMapp rispetto a dati di monitoraggio entomologico (13).

Tutti i progetti di *citizen science* sopra citati – ognuno con il suo specifico obiettivo, dall'identificazione di specie invasive tramite foto o l'acquisizione di campioni di adulti e/o larve per analisi molecolare o di dati sull'abbondanza e biodiversità delle zanzare adulte, sulla presenza di focolai larvali, sulla percezione del fastidio delle punture – hanno contribuito nel 2017 alla concretizzazione di un'iniziativa sponsorizzata dalle Nazioni Unite denominata Global Mosquito Alert (<https://www.wilsoncenter.org/global-mosquito-alert>) che ha lo scopo di raccogliere in tutto il mondo dati sulle zanzare utilizzando la *citizen science*, inserendoli in un'unica piattaforma internazionale e promuovendo la creazione di un database comune.

Nell'ottobre 2020 è stata rilasciata una nuova versione di Mosquito Alert non più focalizzata solo su *Ae. albopictus*, ma su tutte le specie di *Aedes* invasive e sulla zanzara comune *Cx. pipiens*. Inoltre, la nuova versione, oltre a consentire, come la precedente, l'invio di segnalazioni fotografiche di zanzare e di focolai larvali, è stata arricchita di una nuova funzione, ispirata all'esperienza italiana di ZanzaMapp, ovvero la possibilità di segnalare molto facilmente l'attività di puntura. Questa nuova versione di Mosquito Alert è stata tradotta in 19 lingue e resa disponibile in tutti i Paesi europei (e Paesi limitrofi) grazie al progetto “*Aedes* Invasive Mosquito COST ACTION” (AIM-COST, CA17108, www.aedescost.eu) – che riunisce gruppi di ricerca nazionali e internazionali, funzionari di sanità pubblica e imprese private nel campo della sorveglianza e del controllo di zanzare invasive e dei patogeni da loro trasmessi.

Contestualmente alla disponibilità dell'App in italiano, è stato avviato, attraverso un protocollo di intesa tra le parti, il progetto Mosquito Alert Italia, che vede la partecipazione di una task force che include ricercatori dell'Istituto Superiore della Sanità, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, del Museo delle Scienze di Trento (il MUSE), e del Dipartimento di Fisica e Astronomia (DIFA) dell'Università di Bologna Alma Mater Studiorum, coordinati da docenti del Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Università Sapienza di Roma. La task force, che si occupa della promozione e implementazione dell'App, è parte attiva della piattaforma Digital Entolab di Mosquito Alert che include oltre 50 esperti entomologi europei responsabili dell'identificazione e validazione delle segnalazioni fotografiche dei cittadini, l'analisi dei risultati delle segnalazioni provenienti dall'Italia e la produzione di report e mappe spaziali. Inoltre, grazie alle competenze complementari dei vari enti coinvolti, la task force opera sul territorio nazionale promuovendo attività di formazione, *citizen science* e ricerca sul tema zanzare.

I vari enti firmatari del protocollo di intesa collaborano alla gestione del progetto in Italia, all'utilizzo di EntoLab per il riconoscimento e la validazione delle foto ricevute tramite Mosquito Alert, alla divulgazione nelle scuole, nei comuni, ai cittadini e agli enti, sia pubblici che privati, all'analisi statistica dei dati e alla gestione delle piattaforme social e della piattaforma web www.mosquitoalertitalia.it.

Come funziona l'applicazione Mosquito Alert?

Scaricare l'applicazione

L'App Mosquito Alert è disponibile per sistemi iOS e Android e si può scaricare gratuitamente da Apple Store e Google Play. Al primo accesso, l'App richiede il consenso per l'attivazione dello "sforzo di campionamento", ovvero la raccolta di dati georeferenziati relativi al proprio dispositivo.

Per ragioni di privacy, l'App non registra l'esatta localizzazione dell'utente, ma la posizione approssimativa del dispositivo in un raggio di 2 km (in non più di 5 momenti della giornata) e ai dati vengono attribuiti codici random che non consentono ai ricercatori di associare il dispositivo ai dati acquisiti.

La georeferenziazione periodica dei dispositivi, tuttavia, è essenziale per poter stimare lo sforzo di campionamento, parametro necessario per valutare il tasso di contatto uomo-vettore e valutare il rischio di trasmissione di arbovirus.

Nel caso in cui l'utente non volesse fornire queste informazioni può forzatamente disattivare la funzione (e attivarla in un secondo momento) accedendo alle impostazioni dell'App.

Infine, è possibile aggiungere dal menù impostazioni un hashtag o tag (ovvero una parola chiave, preceduta da # associata all'oggetto e che lo descrive in maniera sintetica), con il nome di un eventuale progetto di *citizen science* specifico a cui si sta partecipando (es. #scuola, #ente, #università, ecc.). L'hash-tag indicato sarà associato ad ogni successiva segnalazione dell'utente consentendo ai ricercatori di creare sotto-insiemi di dati e valutare l'esito di uno specifico progetto, mantenendo comunque l'anonimità della segnalazione a tutela della privacy dell'utente.

Inviare una segnalazione

Benché l'App permetta di inviare segnalazioni di qualsiasi specie di zanzara, come già ricordato Mosquito Alert è focalizzata su 5 specie target, oggi di interesse strategico in Italia ed Europa:

- 4 specie di *Aedes* invasive – di cui 3 già presenti in Italia (*Ae. albopictus*, *Ae. japonicus*, *Ae. koreicus*)
- *Ae. aegypti*, per il momento osservata nel continente europeo solo sulle sponde orientali del Mar Nero – e la zanzara comune autoctona, *Cx. pipiens* (Figura 3).

La schermata home dell'App ha 4 icone principali:

- 1) segnalare una zanzara,
- 2) segnalare una puntura,
- 3) segnalare un sito di riproduzione (es. focolaio larvale),
- 4) i miei dati.

Nei punti 1 e 3 è richiesto, qualora possibile, di allegare una foto.

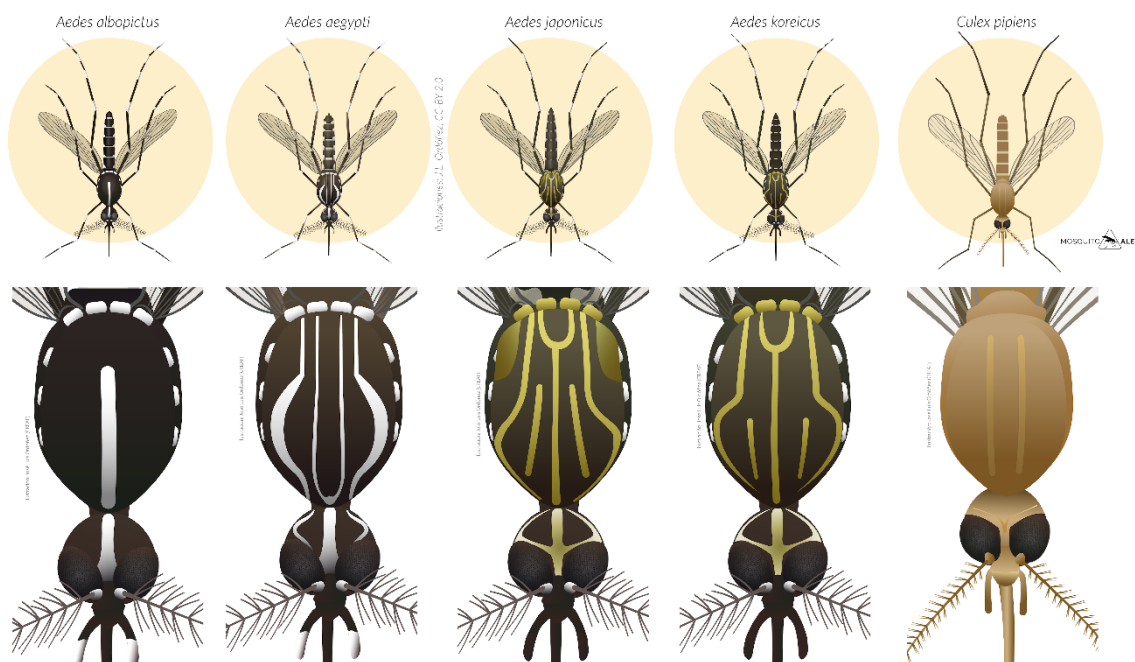


Figura 3. Dettagli delle principali specie di zanzare presenti nell'App Mosquito Alert.
Fonte: Mosquito Alert CC-BY, <http://www.mosquitoalert.com/en/>

Vediamo in sequenza i vari passaggi richiesti dalla App:

1. Segnalare una zanzara

- 1.1. Serve per effettuare la segnalazione di una zanzara, inviando una o più fotografie;
- 1.2. Una volta cliccato sull'icona apposita, l'utente dovrà rispondere alla domanda "Che zanzara credi sia stata?" cliccando su quattro icone alternative: "Aedes aliena", "Zanzara Comune", "Altra specie", "Non saprei". Nel menù Impostazioni sono fornite alcune informazioni di base per effettuare l'identificazione, basandosi principalmente sul colore generale (nero o molto scuro per *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, marrone per le altre specie), sul bandeggio del dorso e delle zampe (vedi Figura 3);
- 1.3. Successivamente l'utente potrà scattare e allegare una o più fotografie dell'esemplare di cui è in possesso cercando di ottimizzare la messa a fuoco e di mettere in evidenza il torace e le zampe, che come anticipato presentano caratteri tassonomici utili per distinguere le cinque specie. Questo faciliterà l'identificazione dell'esemplare da parte degli esperti e consentirà di inserire la segnalazione nel database e nelle mappe. L'esemplare potrà essere fotografato vivo o, se in buone condizioni, anche morto. Per catturare un esemplare appoggiato su una superficie è sufficiente intrappolarlo in un bicchiere o in un piccolo contenitore facendo poi passare un foglio di carta tra il bordo nel contenitore e il piano di appoggio, in modo da prevenirne la fuga. Il contenitore può essere poi mantenuto qualche minuto in freezer per uccidere l'esemplare. In alternativa, si può cercare di catturare la zanzara in volo (anche tramite delle racchette elettrificate) o schiacciarla delicatamente direttamente mentre sta pungendo o mentre è poggiata su una superficie;

- 1.4. Se alla domanda “Che zanzara credi sia stata?” l’utente ha selezionato “*Aedes aliena*”, l’App fornirà un’immagine con le caratteristiche tassonomiche principali delle 5 specie di zanzara, che l’utente potrà selezionare. È consigliabile selezionare solo le caratteristiche chiaramente visibili sull’esemplare;
- 1.5. È possibile indicare anche se si è stati punti e, in caso affermativo, segnalare il numero di punture ricevute, il punto del corpo dove si è stati punti (*vedi* punto 2);
- 1.6. Successivamente, l’App richiede di inserire la localizzazione della segnalazione e di specificare se la puntura è avvenuta all’interno di un edificio o di una macchina o all’aperto.
- 1.7. Se non lo si è fatto a monte dal menù impostazioni, come precedentemente indicato (*vedi* punto 4.1), è possibile aggiungere un commento/un hashtag o tag alla singola segnalazione. È possibile, inoltre, inserire dei commenti, utili per l’esperto che valuterà la foto.
- 1.8. Un importante accorgimento è quello di evitare di fotografare qualsiasi cosa che possa contenere informazioni sensibili (es. carte d’identità, indirizzo di residenza, volti di persone, ecc.); Mosquito Alert, infatti, non raccoglie informazioni personali e qualsiasi foto che ne contenga non verrà inserita sulla mappa interattiva online.

2. Segnalare una puntura

- 2.1. Serve per effettuare la segnalazione di una (o più) punture ricevute.
- 2.2. Una volta cliccato sull’icona apposita, l’utente dovrà fornire le seguenti informazioni:
 - 1) il numero di punture ricevute;
 - 2) la parte del corpo dove si è stati punti (è importante ricordarsi di cliccare sopra il numero corrispondente di punture ricevute);
 - 3) il luogo in cui si è stati punti (specificare se la puntura è avvenuta all’interno di un edificio o di una macchina o all’aperto);
 - 4) quando (in che momento del giorno) si è stati punti;
- 2.3. Successivamente, l’App richiede di inserire la localizzazione della segnalazione sulla mappa (a tal fine è necessario che il GPS del dispositivo sia attivato) (*vedi* punto 1).
- 2.4. Infine, è possibile aggiungere un commento/un hashtag o tag (*vedi* punto 1).

3. Segnalare un sito di riproduzione

- 3.1. Serve per effettuare la segnalazione di una raccolta d’acqua nella quale si possano e/o siano state rinvenute larve di zanzara, che hanno bisogno di acqua stagnante per potersi sviluppare e trasformarsi in zanzare adulte. Il suggerimento è di segnalare le raccolte d’acqua inamovibili (es. i tombini e le caditoie stradali) e di eliminare e svuotare quelli rimovibili (sottovasi e altri piccoli contenitori);
- 3.2. Una volta cliccato sull’icona apposita, l’utente dovrà indicare il tipo di sito di riproduzione trovato (tombino/caditoia o altro tipo). Se si seleziona l’opzione tombino/caditoia l’applicazione chiede di indicare l’eventuale presenza di acqua;
- 3.3. È necessario allegare una foto del sito di riproduzione;
- 3.4. Successivamente, l’App richiede di inserire la localizzazione della segnalazione sulla mappa (a tal fine è necessario che il GPS del dispositivo si attivi) (*vedi* punto 1);
- 3.5. Infine, è possibile aggiungere un commento/un hash-tag o tag.

4. I miei dati

- 4.1. Consente di accedere ad una mappa dove vengono visualizzate in tempo reale le segnalazioni dell’utente;

- 4.2 Cliccando su “Lista” sarà possibile accedere all’elenco delle proprie segnalazioni (notifiche).

5. *Invia la zanzara tramite posta*

- 5.1. Consente di accedere alle spiegazioni riguardanti la possibilità per l’utente di spedire la zanzara catturata tramite posta ai ricercatori dell’Università di Roma Sapienza, che potranno utilizzare l’esemplare per analisi molecolari, come ad esempio l’identificazione di esemplari non identificabili morfologicamente, la ricerca di possibili patogeni quali le *Dirofilarie* canine, o di alleli di resistenza agli insetticidi).
- 5.2. Accedendo alla lista delle proprie segnalazioni (*vedi* sopra punto 4) e selezionando la segnalazione corrispondente alla zanzara catturata, è possibile visualizzare un codice alfanumerico con cui classificare l’esemplare di zanzara al momento della spedizione. Questa associazione è assolutamente fondamentale per permettere di associare l’esemplare alle informazioni su sito e data di cattura.

Altre funzionalità

Nella schermata principale dell’applicazione è presente una barra superiore tramite cui è possibile accedere a:

- *Menù Impostazioni* (rotellina in alto a sinistra sulla schermata principale) da cui è possibile visualizzare il proprio ID, cambiare la lingua, attivare lo “sforzo di campionamento” (*vedi sopra*), inserire il proprio hash-tag in maniera automatica a tutte le proprie segnalazioni, accedere a contenuti extra (guida sulle zanzare, tutorial sull’utilizzo dell’App, informazioni sul progetto, ecc.), termini d’uso dell’App e politiche di privacy per l’adesione al progetto. Inoltre, si può accedere ad informazioni sul proprio punteggio;
- *Istruzioni per l’invio di esemplari di zanzara* (simbolo DNA, in alto a destra, sulla schermata principale). È incoraggiato, se possibile, l’invio di zanzare tramite posta per consentire agli esperti di effettuare un esame morfologico e/o molecolare più approfondito direttamente sul campione che è stato fotografato e inviato su Mosquito Alert. È comunque fondamentale, prima di inviare la zanzara effettuare la segnalazione tramite Mosquito Alert. Questo genererà un codice ID (in “I miei dati”) che dovrà essere associato all’esemplare inviato per permettere ai ricercatori di associare l’esemplare alla segnalazione via Mosquito Alert. Completata la segnalazione, un messaggio indicherà se sarà possibile inviare la zanzara per posta. Potranno essere inviati esemplari catturati e uccisi facendo attenzione a posizionarli (senza pressarli eccessivamente) tra due pezzi di carta assorbente /ovatta/garza per evitare che il campione si danneggi con il trasporto;
- *Notifiche da parte degli esperti* (campanella in alto a destra, sulla schermata principale). Ogni volta che una segnalazione fotografica sarà validata dal team di esperti entomologi (*vedi* paragrafo successivo), l’utente riceverà una notifica sull’identificazione finale ed eventuali osservazioni. Altre notifiche riguarderanno aggiornamenti o novità sull’App. Infine, l’utente riceverà dei punti in base alle segnalazioni, alle informazioni fornite e alla loro qualità. Il punteggio acquisito consente di salire di livello da “principiante” a “grandmaster”. È possibile acquisire bonus extra per la prima zanzara della stagione, il primo rapporto della giornata o per la partecipazione frequente. La classifica generale è accessibile cliccando sul punteggio nella schermata principale.

Sistema di validazione delle segnalazioni fotografiche

Le segnalazioni fotografiche inviate dai cittadini vengono analizzate e validate dagli esperti entomologi europei del Mosquito Alert Digital EntoLab prima di essere utilizzate a fini statistici o per costruire mappe e previsioni (Figura 5).

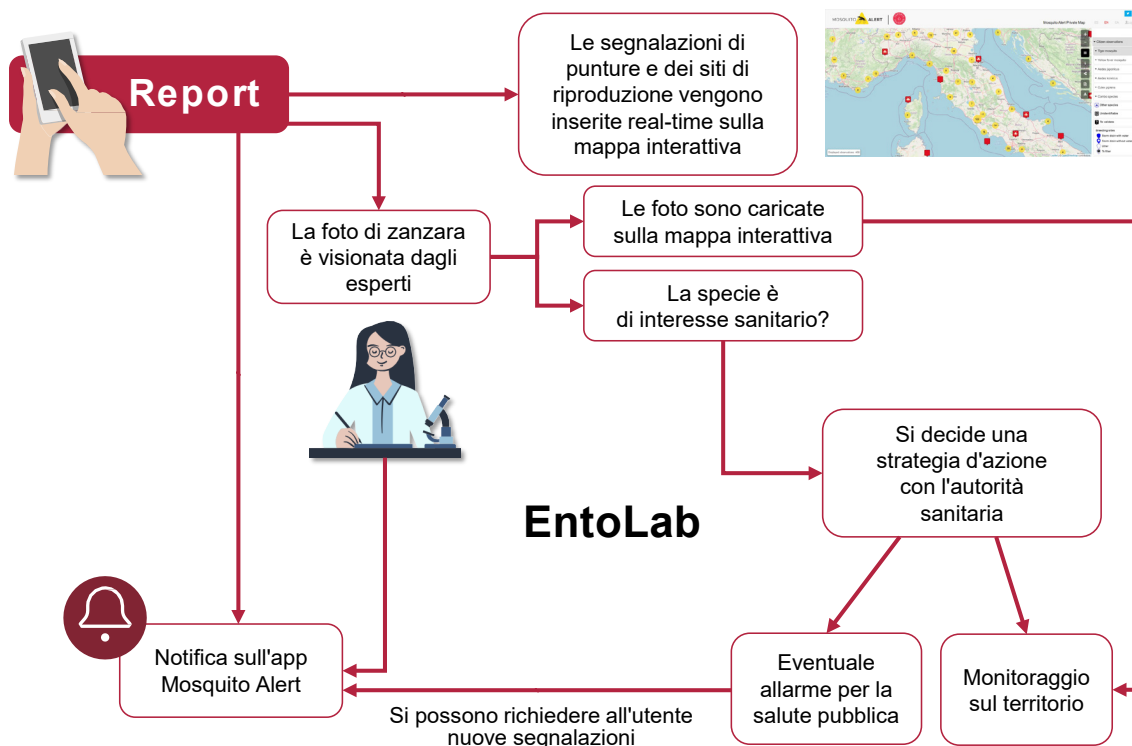


Figura 4. Mosquito Alert Digital EntoLab: dinamica di validazione delle segnalazioni fotografiche e notifiche inviate da parte degli esperti. Qualsiasi esperto può contrassegnare un rapporto mettendolo in stato di attesa. Se il report è in stato di attesa è prevista una discussione tra gli esperti di Mosquito Alert, e, in base ai criteri di controllo e monitoraggio della nazione, viene presa una decisione

Più in dettaglio, ogni segnalazione fotografica inviata viene analizzata da tre esperti che identificano separatamente la specie di zanzara in modo da non influenzarsi tra loro; quando l'identificazione viene confermata e validata da un super-revisore, è inserita nel database e pubblicata nella mappa interattiva online. I valutatori identificano le specie target assegnando la categoria "confermato" se tutti i caratteri morfologici risultano chiaramente visibili nella foto e "possibile" se solo alcuni caratteri sono facilmente distinguibili. Se la foto raffigura una zanzara che non appartiene a una delle cinque specie target del progetto o un altro insetto, la foto viene etichettata come "altra specie". Se la foto è sfocata e quindi non valutabile scientificamente verrà etichettata come "non saprei". Nel caso in cui nella foto siano presenti dati personali, il report non sarà visibile sulla mappa.

L'utente viene informato dell'esito della validazione tramite notifica direttamente sul proprio dispositivo e, in alcuni casi, gli esperti aggiungono alla notifica commenti sull'osservazione (vedi Figura 4). Il processo di validazione è accurato e richiede del tempo e, nonostante i ricercatori

facciano di tutto per rispondere immediatamente alle segnalazioni ricevute, le tempistiche possono variare a seconda della quantità/qualità delle segnalazioni ricevute. Il processo di validazione è attuato su Digital EntoLab, un insieme di piattaforme e software dedicati al progetto (accessibili tramite login e on demand) per gestire internamente il flusso di dati dal server Mosquito Alert alla sua web map pubblica e per consentire agli esperti di convalidare le osservazioni dei cittadini analizzando le fotografie allegate.

Il team Mosquito Alert sta lavorando affinché il processo di validazione delle segnalazioni fotografiche e di gestione dei dati siano progressivamente affiancati, e in parte sostituiti, da strumenti digitali (machine learning, digital twins e Big Data) che consentano un'analisi ottimale dei dati.

Sistema di allerta per specie di interesse sanitario

Uno dei principali obiettivi del progetto Mosquito Alert è il tracciamento e la sorveglianza di specie di zanzare invasive.

Durante il processo di validazione, gli esperti del Digital Entolab possono notare un esemplare appartenente ad una specie invasiva o di interesse per la sanità pubblica mai segnalata prima nell'area/regione/paese. In questo caso, i ricercatori contattano direttamente e in forma anonima l'utente attraverso il sistema di notifiche dell'applicazione (vedi punto *Altre funzionalità*) per acquisire più dati sulla segnalazione.

Se valutata rilevante, i ricercatori contattano le autorità competenti (Istituto Superiore di Sanità, Azienda Sanitaria Locale di riferimento, Ministero della Salute) per dare avvio ad un monitoraggio di campo che consenta la conferma definitiva della segnalazione. In questo caso, è necessario mettere in atto un intervento tempestivo per impedire/limitare la diffusione di una nuova specie.

In questo senso, Mosquito Alert si pone come un sistema di allerta atto a prevenire gravi rischi sanitari, come ad esempio quello dell'invasione da parte di *Ae. aegypti* il più efficiente vettore di arbovirus al mondo, la cui introduzione e diffusione in Italia potrebbe aumentare drasticamente il rischio di focolai epidemici e il numero di persone a rischio di infezione.

Visualizzazione dei dati da parte degli utenti

Sul sito di Mosquito Alert è presente una mappa interattiva accessibile pubblicamente in forma completamente gratuita su cui vengono pubblicate le segnalazioni fotografiche di zanzare ricevute, analizzate e convalidate dagli esperti del Digital EntoLab, le segnalazioni dei siti di riproduzione (potenziali focolai larvali) e lo sforzo di campionamento.

Tutte le segnalazioni visibili sulla mappa possono essere filtrate dagli utenti in base alla specie di zanzara, a un determinato lasso temporale (anno, mese) e a una specifica area geografica (comune) o tramite un tag/hashtag specifico. Come già menzionato, aggiungere un tag/hashtag alle segnalazioni consente quindi una facile individuazione sulla mappa. È inoltre possibile scaricare dati e preparare un report personalizzato.

Infine, sulla mappa, è possibile visualizzare i risultati di modelli predittivi sviluppati per conoscere la probabilità di trovare una specie (es. *Ae. albopictus* o *Ae. koreicus*) in un'area specifica. Tali previsioni sono sviluppate mensilmente sulla base delle segnalazioni ricevute. Al momento è possibile visualizzare tali informazioni solo per la Spagna, ma in futuro sarà possibile anche per l'Italia e gli altri Paesi europei.

Analisi dati per i ricercatori

Reperibilità delle segnalazioni

Mosquito Alert è un progetto *open source* e *open science*, pertanto parte dei dati (dati non soggetti a privacy e accordi di riservatezza, ovvero senza informazioni personali degli utenti) sono utilizzabili da tutti i ricercatori. Al momento è possibile accedere ad un dataset di immagini (Mosquito Alert Image Dataset; <http://www.mosquitoalert.com/en/mosquito-images-dataset/>), ad un database di osservazioni (Observation database) e al codice sorgente dell'applicazione Mosquito Alert. Nella repository Mosquito Alert Image Dataset è condiviso il set di immagini raccolte dal 2014, data di lancio del progetto in Spagna. L'Observation database è scaricabile e aggiornato giornalmente sulla piattaforma Zenodo (<https://zenodo.org/record/5733532#.YaTHLceZO3A>). Zenodo è un archivio *open access* sviluppato nell'ambito del programma europeo OpenAIRE e gestito dal CERN (Conseil Européen pour la Recherche Nucléaire). Consente ai ricercatori di depositare documenti di ricerca, set di dati, software di ricerca, rapporti e qualsiasi altro prodotto digitale correlato alla ricerca. Il codice sorgente e codici disponibili per l'analisi di dati sono resi disponibili sul sito web e i repository del progetto (es. github) sotto il nome Mosquito Alert.

Modelli predittivi

I dati ottenuti vengono usati dai ricercatori per elaborare modelli statistici che possano predire la distribuzione delle diverse specie, con particolare riferimento a quelle invasive e la probabilità di incontro uomo-zanzara, un parametro molto importante per stimare il fastidio e il rischio di trasmissione di patogeni da parte di una specie. I modelli predittivi sviluppati al fine di stimare la probabilità di contatto ospite-vettore, tengono conto non solo delle segnalazioni delle foto e/o delle punture, ma anche dei tre fondamentali parametri relativi al contesto da cui provengono le segnalazioni (ha infatti un valore diverso se la segnalazione viene da un'area poco o densamente abitata, o dalla frequenza delle segnalazioni inviate da un utente):

1. *tempo di partecipazione* di ogni utente, cioè il numero di giorni trascorsi dall'installazione dell'App nel dispositivo dell'utente all'invio dell'ultimo report;
2. *livello di partecipazione* di ogni utente, cioè quante volte l'utente ha inviato delle segnalazioni.
3. *sforzo di campionamento* ottenuto dalla stima dei parametri 1 e 2, definito come il *prodotto tra il numero di partecipanti in una determinata cella per la probabilità di inviare un report*. La stima di questo parametro richiede la conoscenza della posizione approssimativa del dispositivo da cui è stata inviata la segnalazione. Tuttavia, l'App non raccoglie mai la posizione esatta del partecipante, ma solo informazioni anonime sulla distribuzione geografica dei dispositivi su cui è stata scaricata. Nello specifico, l'App utilizza dati satellitari e di rete per stimare la posizione del dispositivo non più di 5 volte al giorno. La posizione viene poi arrotondata ai 0,05° di latitudine e longitudine più vicina, assegnando la posizione in una cella di circa 20 km², in modo da tutelare ulteriormente la privacy degli utenti. Nella Figura 5, l'intensità del colore per cella indica un numero maggiore di partecipanti o un maggior tempo passato nella cella. Conoscere lo sforzo di campionamento in una determinata area è un parametro chiave per costruire modelli di rischio di trasmissione vettoriale. Senza questa informazione non sarebbe possibile sapere se ci sono molte zanzare o molta partecipazione in un'area. Questo dato, inoltre, consente di correggere le osservazioni per renderle confrontabili tra aree diverse.

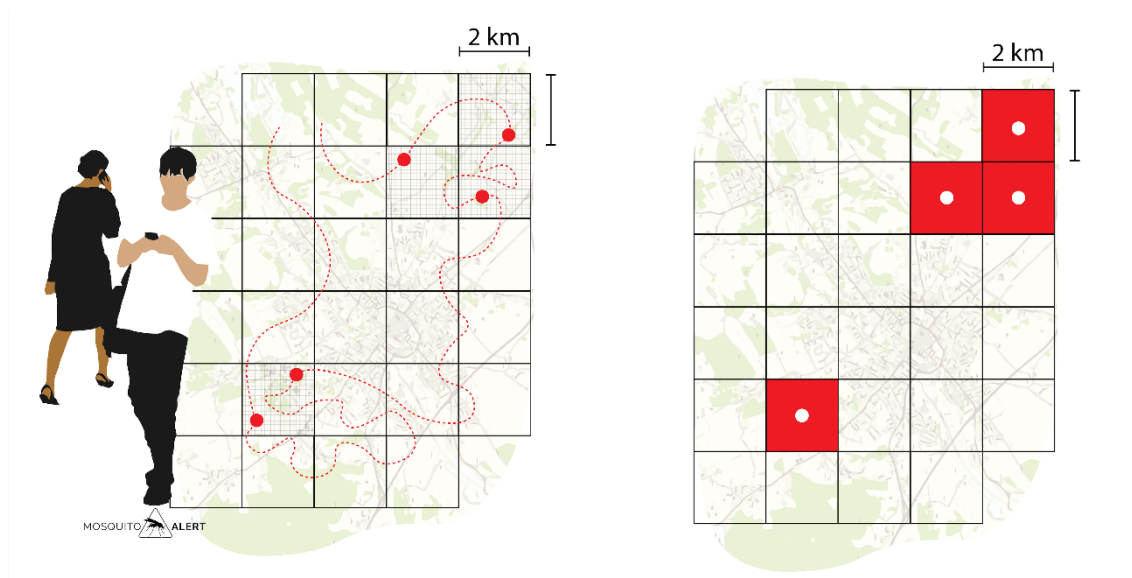


Figura 6. Griglie per la stima dello sforzo di campionamento.
Fonte: Mosquito Alert CC-BY, “Tutorial di utilizzo”

Divulgazione dei dati

I dati ottenuti tramite l'applicazione e i risultati acquisiti dall'elaborazione statistica (modelli statistici predittivi) vengono rilasciati al pubblico tramite l'utilizzo di diverse piattaforme e modalità, quali ad esempio il sito web di Mosquito Alert Italia (www.mosquitoalertitalia.it) o i siti istituzionali dei collaboratori del progetto o di enti pubblici coinvolti (es. comuni, municipi, enti locali).

Il sito www.mosquitoalertitalia.it è un utile strumento di divulgazione e informazione. È una piattaforma totalmente gratuita e liberamente consultabile. Dal sito si può facilmente scaricare l'applicazione Mosquito Alert e aprire la mappa interattiva online. La piattaforma dà un'idea generale del progetto e fornisce degli spunti su eventuali progetti da sviluppare nelle scuole e/o nei comuni tramite l'uso dell'App. Il sito fornisce sezioni dedicate a:

- 1) il cittadino, con informazioni sulla biologia, sulla biodiversità in un'area, e consigli pratici su come evitare e combattere le zanzare;
- 2) il comune e le ditte coinvolte nella disinfestazione, con informazioni riguardanti l'utilizzo dei prodotti, le schede di sicurezza dei principi attivi, mappe della diffusione della resistenza in popolazioni naturali di Culicidi, esempi di capitolati d'appalto;
- 3) le scuole primarie e secondarie di primo e secondo grado, con progetti dedicati.

Il sito è in costante aggiornamento e tiene traccia della divulgazione sia locale che nazionale del progetto (vedi sezione news), delle più recenti pubblicazioni scientifiche sul monitoraggio e controllo di Culicidi e informazioni utili per contattare gli enti partecipanti.

Perché collaborare al progetto Mosquito Alert Italia?

Il progetto Mosquito Alert Italia si basa su una vasta partecipazione e collaborazione da parte di singoli cittadini, ma anche di enti pubblici e privati, e sulla creazione di un processo virtuoso (Figura 7) che da un lato rende gli utenti attivi nella raccolta di dati scientifici, e dall'altro ne aumenta la consapevolezza sui rischi sanitari associati alle zanzare e sulle misure preventive da prendere a livello individuale per limitarne la diffusione (es. rimuovendo o svuotando contenitori di acqua stagnante in cui si trovano le larve).

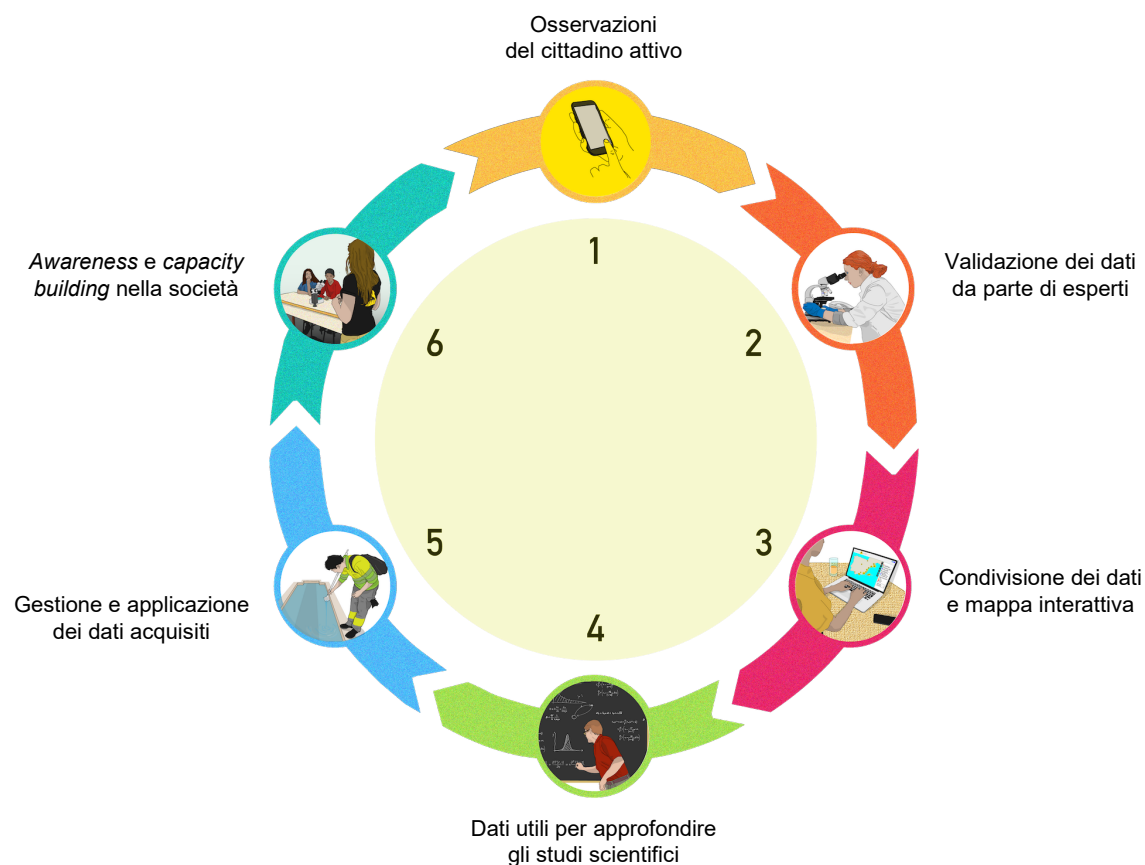


Figura 7. L'immagine rappresenta il processo di collaborazione tra la comunità dei cittadini attivi nel progetto (punto 1 e 6), i ricercatori impegnati nelle validazioni delle foto e nella elaborazione di mappe (punto 2, 3 e 4), e gli enti competenti che si occupano di gestione integrata di vettori molesti (punto 5). Fonte: Mosquito Alert CC-BY, Mosquito Alert Spain report 2018

Nel medio periodo, inoltre, il progetto si propone di divenire uno strumento di monitoraggio complementare a quello entomologico nel fornire informazioni utili (es. sulla presenza delle specie più aggressive o più pericolose in una data area e sulla loro stagionalità) che possano consentire l'ottimizzazione di interventi di disinfestazione professionali contro le zanzare. Il progetto si propone quindi di coinvolgere organi pubblici e privati per creare una rete regionale/nazionale, in modo da creare una comunità che partecipi attivamente inviando segnalazioni che possano essere utilizzate per produrre in tempo reale mappe di distribuzione e di contatto uomo-zanzare. L'impatto del progetto sul controllo delle zanzare sarà tanto maggiore

quanto più grande sarà il numero di partnership tra cittadini, enti pubblici e privati, che saranno create.

Il progetto Mosquito Alert Italia ha, quindi, una diversa valenza per i singoli cittadini, per scuole e/o università, per enti pubblici e per imprese di disinfestazione. L'applicazione, infatti, pur mantenendo il suo scopo principale come mezzo efficace per la segnalazione, l'identificazione e il monitoraggio delle zanzare sul territorio, assume ulteriori funzioni in base all'utente.

Cittadini

Il cittadino – grazie alla partecipazione attiva nel progetto e alla consultazione delle informazioni fornite dall'App e dal sito www.mosquitoalertitalia.it – ha la possibilità di aumentare la propria consapevolezza riguardo: 1) le zanzare presenti sul proprio territorio, 2) il loro ciclo di vita (es. focolai larvali e adulti), 3) comportamenti da attuare a livello individuale per prevenire lo sviluppo e la diffusione delle zanzare. Nel medio periodo, il cittadino inviando le segnalazioni potrà fornire dati utile per ricevere un miglior servizio di disinfestazione, mirato dove ve ne è più bisogno e, quindi, implementando l'efficacia e riducendo l'impatto ambientale.

Scuole

Il team Mosquito Alert Italia propone l'utilizzo dell'App Mosquito Alert come mezzo didattico ed educativo. Attraverso progetti scolastici dedicati, gli studenti possono sperimentare i metodi della ricerca scientifica (raccolta e catalogazione dati), apprendere metodi per prevenire, monitorare e controllare le zanzare, diventare consapevoli delle problematiche sanitarie relative alle zanzare e sensibilizzare le proprie famiglie. I progetti proposti alle scuole consentono anche di sperimentare un approccio innovativo e una didattica mista, sia in presenza che a distanza.

Enti pubblici

Gli Enti pubblici possono avvalersi dell'App Mosquito Alert e dei risultati ottenuti dal progetto sia per promuovere le attività di divulgazione sia per ottimizzare gli interventi contro le zanzare. Inoltre, il progetto Mosquito Alert favorisce la sensibilizzazione alla problematica delle zanzare e la partecipazione attraverso comportamenti di prevenzione della cittadinanza (es. rimozione dei focolai larvali nei luoghi privati e pubblici). In sinergia con gli esperti e il team di ricerca Mosquito Alert Italia, l'Ente pubblico potrà contribuire alla divulgazione del progetto e acquisire in cambio delle mappe relative al proprio territorio contenenti informazioni riguardanti la distribuzione delle zanzare, il fastidio percepito dai cittadini, i focolai larvali potenzialmente attivi e il rischio di contatto uomo-zanzara. Grazie alle segnalazioni raccolte, l'Ente pubblico sarà in grado di focalizzare gli interventi di disinfestazione avendo a disposizione parametri utili per gestirli a seconda delle necessità.

Imprese di disinfestazione

Le Ditte di disinfestazione, aderendo al progetto, potranno contribuire localmente alla divulgazione e nel contempo ad organizzare gli interventi di controllo anti-vettoriale (es. dati su inizio e fine stagione e su pre/post trattamento) in base a dati oggettivi sulla presenza delle specie di zanzara (segnalazioni fotografiche validate da esperti internazionali), e realizzare delle

mappature geolocalizzate dei potenziali focolai larvali da trattare e/o trattati periodicamente e di presenza del vettore (attraverso lo sviluppo di mappe di probabilità del contatto uomo-vettore).

Ad oggi, ancora troppo spesso, gli interventi di nebulizzazione di prodotti adulticidi a base di piretroidi vengono calendarizzati su tutto il territorio comunale senza concentrarli dove ce ne è più bisogno, con conseguente minore efficacia, maggiori costi e impatto ambientale. I dati forniti dall'App Mosquito Alert permetterebbero alle Ditte di disinfestazione di individuare più accuratamente le tempistiche e selezionare le aree da trattare, ottenendo un riscontro immediato dell'operato svolto anche attraverso le segnalazioni degli utenti di Mosquito Alert e le successive rielaborazioni degli esperti, mantenendo un contatto diretto con gli utenti con l'opportunità di mettere in evidenza le proprie professionalità al servizio dei cittadini.

Primi risultati raggiunti

Ad oggi il progetto Mosquito Alert ha prodotto risultati significativi soprattutto in Spagna, dove è attivo dal 2014. I dati raccolti tra il 2014 e il 2021 a livello globale sono stati recentemente pubblicati (22) e disponibili per l'intera comunità scientifica. Monitoraggi entomologici, effettuati in seguito a segnalazioni dei cittadini, hanno consentito di evidenziare la presenza di *Ae. albopictus* per la prima volta in Andalusia (16), di *Ae. vittatus* nella regione autonoma della Galizia (23) e *Ae. japonicus* nella regione delle Asturie (17), dimostrando la capacità della *citizen science* nel supportare, e in alcuni casi precedere, il monitoraggio entomologico, spesso difficile da sviluppare in modo capillare su vasta scala anche a causa dei costi elevati. Inoltre, il progetto ha fornito stime del rischio di contatto uomo-zanzara, rilevanti per la modellizzazione epidemiologica e sufficientemente scalabili da coprire l'intero Paese. Questi risultati mostrano quanto la partecipazione pubblica alla ricerca scientifica possa essere efficace e suggeriscono che la *citizen science* sia in grado di migliorare e ottimizzare la sorveglianza delle specie invasive a livello globale.

In Italia, l'App Mosquito Alert è stata lanciata nell'ottobre del 2020 e una seconda volta a maggio 2021 per sensibilizzare la popolazione anche all'inizio della stagione di riproduzione delle zanzare e incentivarne l'utilizzo nei mesi estivi. Durante il 2021, il progetto è stato divulgato sia a livello nazionale che locale da ciascun partner attraverso la stampa, i social media e programmi televisivi (vedi sezione "News" nel sito www.mosquitoalertitalia.it).

Nel 2020-2021 il gruppo di ricerca di Entomologia Sanitaria della Sapienza Università di Roma ha avviato una campagna (#SCATTALAZANZARA) per coinvolgere studenti e personale Sapienza ed un progetto pilota con gli studenti del corso di Ecobiologia, poi esteso anche a studenti di corsi di Zoologia anche dell'Università di Roma Tor Vergata ai quali è stato chiesto, in forma volontaria, di utilizzare l'App e, quando possibile, di catturare gli esemplari fotografati e consegnarli ai docenti per la validazione dell'identificazione. Un altro progetto pilota, organizzato dal MUSE a Trento ha coinvolto studenti di scuola secondaria di primo grado (<https://www.mosquitoalertitalia.it/galleria-fotografica-dei-progetti-svolti/>) intenti a monitorare la presenza di zanzare all'interno del giardino della propria scuola grazie al posizionamento di ovitrappole e trappole per adulti.

I risultati ottenuti nel 2021 e quelli degli anni successivi verranno pubblicati sotto forma di report annuali accessibili gratuitamente e scaricabili dal sito www.mosquitoalertitalia.it.

Bibliografia

1. Patterson J, Sammon M, Garg M. dengue, Zika and chikungunya: emerging arboviruses in the new world. *The western journal of emergency medicine* 2016;17(6):671-9.
2. Ryan SJ, Carlson CJ, Mordecai EA, Johnson LR. Global expansion and redistribution of *Aedes*-borne virus transmission risk with climate change. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2019;13(3).
3. Dalla Pozza GD, Majori G. First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *J Am Mosq Control Assoc* 1992;8(3):318-20.
4. Romi R. History and updating on the spread of *Aedes albopictus* in Italy. *Parassitologia* 1995;37(2-3):99-103.
5. European Centre for Disease Prevention and Control. *Aedes albopictus - current known distribution: October 2021*. Stockholm: ECDC; 2022. Disponibile all'indirizzo <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-albopictus-current-known-distribution-october-2021>; ultima consultazione 20/6/2022.
6. Gradoni F, Bertola M, Carlin S, Accordi S, Toniolo F, Visentin P, Patregnani T, Adami S, Terzo L, Dal Pont M, Candela G, Qualizza D, Mulas A, Landini P, Olivo G, Palei M, Russo F, Martini S, Michelutti A. Geographical data on the occurrence and spreading of invasive *Aedes* mosquito species in Northeast Italy. *Data Brief* 2021;36:107047.
7. Pfitzner WP, Lehner A, Hoffmann D, Czajka C, Becker N. First record and morphological characterization of an established population of *Aedes* (*Hulecoeteomyia*) *koreicus* (Diptera: Culicidae) in Germany. *Parasites & Vectors* 2018;11(1).
8. Kalan K, Šušnjar J, Ivović V, Buzan E. First record of *Aedes koreicus* (Diptera, Culicidae) in Slovenia. *Parasitology research* 2017;116(8):2355-8.
9. Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, Po C, Petropulacos K, Macini P, Fiorentini C, Fortuna C, Venturi G, Romi R, Majori G, Nicoletti L, Rezza G, Cassone A. An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Eurosurveillance* 2007;12(9).
10. Venturi G, Di Luca M, Fortuna C, Remoli ME, Riccardo F, Severini F, Toma L, del Manso M, Benedetti E, Caporali MG, Amendola A, Fiorentini C, De Liberato C, Giammattei R, Romi R, Pezzotti P, Rezza G, Rizzo C. Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy, August to September 2017. *Eurosurveillance* 2017;22(39):11-4.
11. Caputo B, Russo G, Manica M, Vairo F, Poletti P, Guzzetta G, Merler S, Scagnolari C, Solimini A. A comparative analysis of the 2007 and 2017 Italian chikungunya outbreaks and implication for public health response. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2020a;14(6):1-12.
12. Barzon L, Gobbi F, Capelli G, Montarsi F, Martini S, Riccetti S, Sinigaglia A, Pacenti M, Pavan G, Rassu M, Padovan MT, Manfrin V, Zanella F, Russo F, Foglia F, Lazzarini L. Autochthonous dengue outbreak in Italy 2020: clinical, virological and entomological findings. *Journal of Travel Medicine* 2021;28(8).
13. Caputo B, Manica M, Filippini F, Blangiardo M, Cobre P, Delucchi L, de Marco CM, Iesu L, Morano P, Petrella V, Salvemini M, Bianchi C, della Torre A. ZanzaMapp: a scalable citizen science tool to monitor perception of mosquito abundance and nuisance in Italy and beyond. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020b;17(21):7872.
14. Bartumeus F, Oltra A, Palmer JRB. citizen science: A gateway for innovation in disease-carrying mosquito management? *Trends in Parasitology* 2018; 34(9):727-9.
15. Palmer JRB, Oltra A, Collantes F, Delgado JA, Lucientes J, Delacour S, Bengoa M, Eritja R, Bartumeus F. Citizen science provides a reliable and scalable tool to track disease-carrying mosquitoes. *Nature Communications* 2017;8(1):1-13.
16. Delacour-Estrella S, Collantes F, Ruiz-Arrondo I, María Alarcón-Elbal P, Delgado JA, Eritja R, Bartumeus F, Oltra A, Palmer JRB, Lucientes J. Primera cita de mosquito tigre, *Aedes albopictus*

- (Diptera, Culicidae), para Andalucía y primera corroboración de los datos de la aplicación Tigatrapp. *Anales de Biología* 2018;0(36):93-6.
17. Eritja R, Ruiz-Arrondo I, Delacour-Estrella S, Schaffner F, Álvarez-Chachero J, Bengoa M, Puig MÁ, Melero-Alcíbar R, Oltra A, Bartumeus F. First detection of *Aedes japonicus* in Spain: An unexpected finding triggered by citizen science. *Parasites & Vectors* 2019;12(1):1-9.
 18. Pernat N, Kampen H, Ruland F, Jeschke JM, Werner D. Drivers of spatio-temporal variation in mosquito submissions to the citizen science project “Mückenatlas.” *Scientific Reports*. 2021;11(1).
 19. Walther D, Kampen H. The citizen science Project “Mueckenatlas” helps monitor the distribution and spread of invasive mosquito species in Germany. *Journal of Medical Entomology* 2017;54(6):1790-4.
 20. Werner D, Kowalczyk S, Kampen H. Nine years of mosquito monitoring in Germany, 2011-2019, with an updated inventory of German culicid species. *Parasitology Research* 2020;119(9):2765-74.
 21. Kampen H, Medlock JM, Vaux AGC, Koenraadt CJM, van Vliet AJH, Bartumeus F, Oltra A, Sousa CA, Chouin S, Werner D. Approaches to passive mosquito surveillance in the EU. *Parasites & Vectors* 2015;8(1).
 22. Južnič-Zonta Z, Sanpera-Calbet I, Eritja R, Palmer J, Escobar A, Garriga J, Oltra A, Richter-Boix A, Schaffner F, della Torre A, Miranda MÁ, Koopmans M, Barzon L, Bartumeus Ferre F, Mosquito Alert Digital Entomology Network, Mosquito Alert Community,. Mosquito alert: leveraging citizen science to create a GBIF mosquito occurrence dataset, *Gigabyte* 2022. doi: 10.46471/gigabyte.54
 23. Eritja R, Rubido Bará M, Delacour Estrella S, Bengoa M, Ruiz Arrondo I. Ciencia ciudadana y biodiversidad: primera cita de *Aedes* (*Fredwardsius*) *vittatus* (Bigot, 1861) (Diptera: Culicidae) en Galicia, mediante el proyecto Mosquito Alert. *Anales de Biología* 2018;(40):41-5.

IDENTIFICAZIONE MORFOLOGICA E CLASSIFICAZIONE DI INSETTI ADULTI PER SORVEGLIANZA ENTOMOLOGICA: IL CONTRIBUTO DEL *DEEP-LEARNING*

Noemi Sarleti (a), Francesco Silvestrini (a), Guido Gigante (b), Andrea Ciardiello (c), Pietro Alano (a)

(a) Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Centro Nazionale Protezione dalle Radiazioni e Fisica Computazionale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Sezione di Roma

Approcci computazionali alla analisi di immagini e al riconoscimento di insetti

L'identificazione e classificazione di un insetto a livello di genere e specie avviene, a livello morfologico, con il riconoscimento di caratteri macroscopici e microscopici accompagnato dall'uso di chiavi dicotomiche. La manipolazione del campione e l'interrogazione delle chiavi dicotomiche richiedono un personale esperto, capace di operare le scelte binarie su cui si basano le chiavi al fine di categorizzare ogni individuo nel modo più corretto. La struttura dicotomica delle chiavi consente di classificare un individuo sulla presenza/assenza o su variazioni di forma, dimensione e colore di determinati caratteri (*feature*). L'estrazione dei caratteri ad ogni passaggio è possibile grazie al nostro sistema visivo ed è proprio sull'organizzazione della corteccia visiva che si ispirano strumenti come gli algoritmi di *deep-learning* basati su reti neurali convoluzionali (*Convolutional Neural Network*, CNN), afferenti agli approcci di *machine-learning* nell'ambito del *Artificial Intelligence technology* (Figura 1).

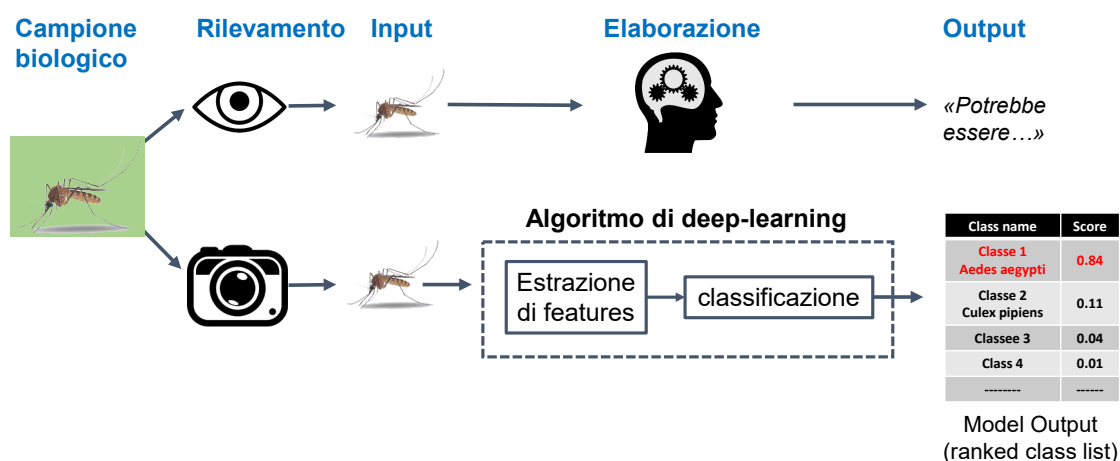


Figura 1. Estrazione di caratteri morfologici rilevanti per l'identificazione/classificazione di insetti adulti da parte del meccanismo visivo ed elaborazione a livello della corteccia nell'uomo e da parte di un algoritmo di *deep-learning* basato su una rete neurale convoluzionale

Similarmente alla corteccia visiva, le CNN sono costituite da più livelli operativi specializzati (o livelli di convoluzione), la cui funzione è estrarre le *feature* da un'immagine per analizzarne il contenuto e assegnare ogni oggetto presente ad una data categoria (nel caso di insetti, un genere o una specie). Quindi, con il termine *deep-learning* si definiscono, più generalmente, tutti quei software in grado di emulare parzialmente il funzionamento del sistema nervoso mediante le CNN.

Quest'ultimo aspetto determina le principali differenze tra la maggioranza degli algoritmi di *deep-learning* e i classici algoritmi di *machine-learning*; mentre un algoritmo di *machine-learning* necessita di un *input* informativo (ovvero le *feature* da osservare) da parte dell'operatore per realizzare un'identificazione, un algoritmo di *deep-learning* è in grado di estrapolare in maniera autonoma le *feature* più significative per classificare uno o più oggetti (Figura 2).

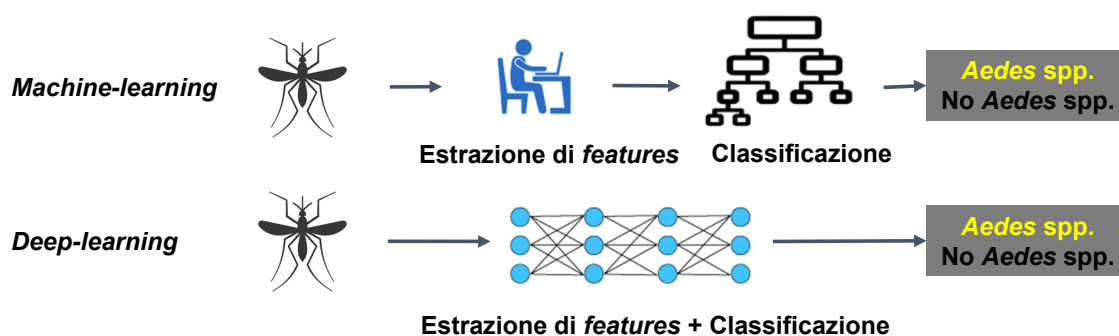


Figura 2. Schemi operativi di algoritmi di *machine-learning* e di *deep-learning* nella classificazione morfologica di insetti adulti

Tale differenza è evidente nel lavoro di Okaiasu *et al.* (1), dove sono stati messi a confronto le performance ottenute con un approccio di *machine-learning* (basato su 12 *feature* morfologiche selezionate da un operatore) ed uno di *deep-learning* (dipendente solamente dalla capacità della CNN di estrarre autonomamente le *feature*), nel riconoscimento e classificazione dei generi *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*. L'accuratezza massima raggiunta dalla CNN è stata del 95.5% contro l'82.4% ottenuto dal *machine-learning*.

Oltre a raggiungere *performance* spesso superiori, gli algoritmi di *deep-learning* tendono a trarre beneficio in misura maggiore rispetto ad approcci più classici da un grande numero di immagini nella fase di *training*. Di fondamentale importanza è dunque la realizzazione di un ampio numero di immagini in cui l'operatore posiziona gli oggetti che vuole che l'algoritmo impari ad identificare e classificare nelle *N* categorie scelte; questa collezione di immagini viene definita *training set*. La disponibilità di un alto numero di immagini permette a una CNN di estrarre *feature* che risultano meno sensibili a differenze di luminosità, posizione, orientamento e integrità/stato di conservazione degli esemplari fotografati e quindi più robustamente associate alle specifiche categorie, nonché più affidabili nella classificazione di nuove immagini.

Data la difficoltà pratica di ottenere gallerie di immagini sufficientemente grandi da poter essere utilizzate sia nella fase di *training* che nei successivi passaggi di validazione dell'algoritmo, vengono utilizzate tecniche di *augmentation*, ovvero ogni fotografia può essere modificata in luminosità, contrasto, saturazione, tinta ma anche meccanicamente con rotazioni a diverse angolature, aumentando significativamente il numero di immagini a disposizione (Figura 3). Applicare in modo rigoroso questa tecnica risulta un passaggio decisivo nell'incrementare l'accuratezza nella classificazione di una CNN (1, 2, 3).

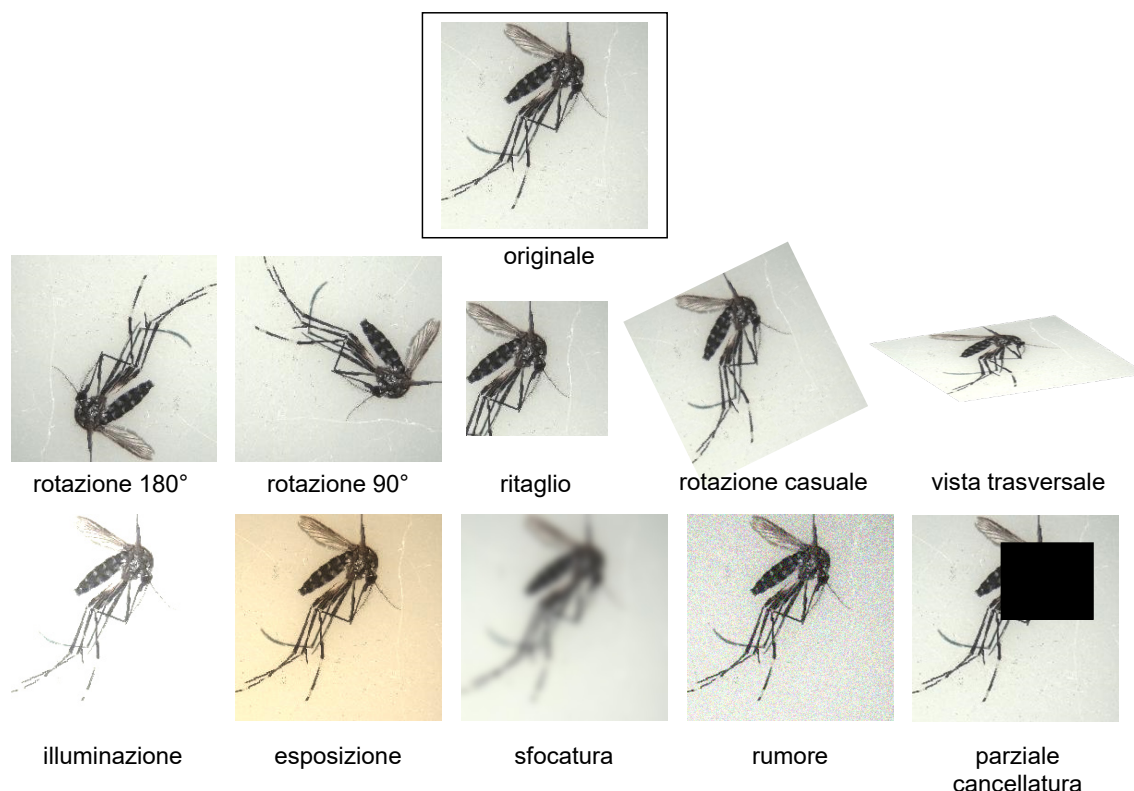


Figura 3. Esempi di tecniche di *augmentation* a partire dalla fotografia di un esemplare

Le immagini originali che possono essere fornite all'algoritmo ed utilizzate nel passaggio di *augmentation* possono provenire da fonti diverse e non necessariamente "omogenee" tra loro, ad esempio da laboratori (1, 3), trappole entomologiche (4), ambiente naturale (5, 6) oppure da gallerie di immagini online (7).

Contributo del *deep-learning* per la sorveglianza entomologica

Approcci di riconoscimento e classificazione basati sul *deep-learning* di insetti adulti sono stati applicati con successo soprattutto nel settore dell'agricoltura intensiva (8). La ragione dell'ampio utilizzo di questi metodi risiede nel fatto che i tradizionali sistemi di sorveglianza entomologica risultano spesso complessi e non completamente efficaci nello stimare la presenza e l'abbondanza delle specie dannose. Un minor numero di lavori riguarda invece insetti di interesse sanitario; in particolare, le CNN vengono utilizzate con l'obiettivo di distinguere diverse specie appartenenti ai tre principali generi di zanzare vettori di patogeni, vale a dire *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* (6, 9). In questo ambito, da citare è il lavoro di Couret *et al.* (10) in cui una CNN è stata in grado di distinguere quattro specie del complesso *Anopheles gambiae sensu lato* (s.l.), estraendo *feature* specifiche per ciascuna di esse con accuratezze superiori al 90%. Il complesso di specie *Anopheles gambiae* s.l. comprende entità tassonomiche pressoché indistinguibili morfologicamente, ma che possono essere identificate sulla base di differenze genetiche. Data la

grande difficoltà di distinguere le minime e impercettibili differenze morfologiche tra le quattro specie del complesso, quest'ultimo studio sottolinea la capacità delle CNN di estrarre autonomamente le *feature* per ogni classe da riconoscere senza avere esplicite istruzioni su quali strutture siano diagnostiche per l'identificazione. Lo studio condotto da Park et al. (3) su 8 specie appartenenti ai generi *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* ha rivelato come le diverse *feature* estratte dalla rete neurale avessero un "peso" diverso nella classificazione; ad esempio, la forma della zampa o la forma dei palpi, suscettibili a rotture o alterazioni, contribuivano in misura minore nella catalogazione.

Lavori di questo tipo hanno aperto nuovi scenari per la sorveglianza entomologica; requisito fondamentale per la raccolta di dati entomologici affidabili è la disponibilità di strumenti di cattura efficaci e capaci di rappresentare il più oggettivamente possibile la situazione sul campo. L'attività di sorveglianza entomologica è tuttora basata prevalentemente su una prima identificazione morfologica da parte di operatori esperti a seguito di una cattura mediante trappola, con un eventuale successivo passaggio di analisi molecolare di sequenze geniche specie-specifiche dell'insetto e/o di quelle diagnostiche della presenza nell'insetto di specifici patogeni. Queste attività risultano un processo laborioso che limita la quantità e la qualità dei dati nel tempo e nello spazio, con la possibilità di produrre parametri entomologici inadeguati e, conseguentemente, attività di prevenzione e risposta non corrette. Lo sviluppo e l'utilizzo di un algoritmo di *deep-learning* per l'identificazione/conteggio automatico e remoto può consentire l'ampliamento e l'ottimizzazione delle campagne di sorveglianza, generando inoltre omogeneità nelle procedure.

Approcci basati su strumenti di apprendimento artificiale vengono sviluppati con crescente attenzione in campo entomologico anche per la loro capacità di stimare correttamente abbondanza, biomassa, diversità e localizzazione di popolazioni di insetti (11), in particolare nella prospettiva di controllare questi parametri in aree urbane (12). L'analisi di immagine di insetti adulti, oggetto di questo articolo, è solo uno degli aspetti su cui tali approcci si stanno sviluppando; altre aree di interesse sono la rilevazione e l'analisi di parametri geografici, ecologici e ambientali per la geolocalizzazione di insetti di interesse agronomico o sanitario o, ancora, la rilevazione e identificazione basata sul ronzio provocato dal battito alare mediante opportuni sensori acustici e pseudo-acustici (12). In questo scenario, stanno affacciandosi con crescente rilevanza anche le attività di monitoraggio individuale e volontario collettivamente raccolte sotto l'etichetta di *citizen science*. La integrazione di approcci di *deep-learning* con entrambe queste attività rappresenterebbe un decisivo salto di qualità nell'ambito della sorveglianza entomologica. Tuttavia, raggiungere questo obiettivo richiederà di delineare specifici modelli operativi e soluzioni tecnologiche a seconda delle diverse tipologie di attività e di scenari.

Applicazioni del *deep-learning*

Scenario 1: monitoraggio in aree a rischio di malattie a trasmissione vettoriale

Uno degli scenari in cui il *deep-learning* può trovare applicazione è il rapido intervento per l'identificazione e localizzazione di insetti vettori di patogeni in un determinato territorio; ad esempio, quando si tratta di circoscrivere un possibile focolaio epidemico in seguito ad uno o più casi clinici provocati da un dato patogeno a trasmissione vettoriale oppure nell'ispezionare un territorio per la potenziale presenza di patogeni a trasmissione vettoriale prima di collocare insediamenti e attività.

In questi casi, la classificazione a livello di genere è spesso sufficiente per selezionare gli esemplari su cui condurre saggi di amplificazione genica patogeno-specifici. L'analisi morfologica degli insetti condotta sui singoli esemplari da personale specializzato, seppur con

chiavi dicotomiche e criteri semplificati, limita necessariamente ampiezza e velocità dell'indagine. In alternativa, lo sviluppo di un protocollo che preveda una semplice fotografia, che contenga tutti gli esemplari ottenuti in una cattura, e il suo immediato processamento mediante una CNN istruita a restituire la classificazione a livello di genere, consentirebbe di selezionare un elevato numero di esemplari per l'analisi molecolare in tempi brevissimi e con precisione. Un simile protocollo si inserirebbe in una filiera "cattura-classificazione del vettore-identificazione molecolare del patogeno" affidabile anche ad operatori non esperti, suscettibile di significativo *scaling up*.

Scenario 2: prevenzione dell'introduzione e diffusione di nuovi vettori e patogeni

Globalizzazione e cambiamenti climatici motivano l'importante obiettivo della sorveglianza entomologica di rilevare tempestivamente l'introduzione nel territorio nazionale di specie esotiche di vettori. In questo campo le attività di cattura prevedono il monitoraggio dei potenziali mezzi di trasporto e punti d'ingresso (porti, aeroporti, ecc.). L'incertezza a priori di quali specie invasive possano presentarsi e la prevista sporadicità degli esemplari nelle catture sono i principali punti critici. A complicare ciò, si aggiunge la difficoltà di individuare le stesse specie invasive, in quanto possono presentare differenze morfologiche minime rispetto alle specie congeneriche autoctone (13).

La prospettiva di sviluppare una filiera di saggi analoga a quella descritta sopra impone di affrontare due ostacoli proprio a partire dallo sviluppo dell'algoritmo. Il primo ostacolo riguarda l'allestimento di una galleria di immagini per il *training set* che permetta l'individuazione di oggetti rari. Il secondo ostacolo è l'identificazione a livello di specie che l'algoritmo dovrà raggiungere per discriminare e classificare gli oggetti analizzati. Nel primo caso, il passaggio di *augmentation* può essere sfruttato per bilanciare la galleria di immagini del training set aumentando il numero di immagini delle specie invasive bersaglio rispetto a quello delle immagini delle specie autoctone, anche con la creazione di immagini artificiali (14). Nel secondo caso è possibile l'integrazione di due diversi algoritmi di cui uno riconosce il genere e l'altro la specie, limitatamente a quelle presenti sul territorio; in questo modo una prima classificazione a livello di genere sarà attesa per tutti gli esemplari, mentre gli esemplari che il secondo algoritmo non sarà in grado di classificare oltre il livello di genere potranno essere oggetto di allerta e soggetti ad analisi, sia morfologica esperta che molecolare.

Scenario 3: supporto alla *citizen science*

Il potenziale contributo della *citizen science* alla sorveglianza entomologica è documentato dai primi successi quale l'individuazione della comparsa di *Aedes japonicus* nel Nord-Ovest della Spagna nell'ambito del progetto *Mosquito Alert* (15). In questo progetto, fotografie di insetti, insieme alle coordinate geografiche, vengono inviate via smartphone ad entomologi che le analizzano per una identificazione dell'esemplare (vedi il contributo di Caputo *et al.* in questo volume). Alcune applicazioni permettono l'identificazione attraverso una sequenza di passaggi interattivi tra l'utente e gallerie di immagini, ad esempio di zanzare anofeline (16).

Anche in questo settore, algoritmi di *deep-learning* per classificare le immagini cominciano ad essere oggetto di ricerca e sviluppo. L'applicazione scaricabile su smartphone *Seek* di *iNaturalist* permette di associare ad una immagine raccolta in modalità video una possibile assegnazione a livello di specie in tempo reale, sfruttando una CNN (www.seek.org).

Il fatto che la raccolta delle immagini di insetti nei progetti di *citizen science* sia affidata a iniziative volontarie e individuali da un lato ha il potenziale di raccogliere informazioni originali da ambienti e localizzazioni geografiche normalmente ignorate da attività di sorveglianza entomologica istituzionali.

D'altra parte, per gli stessi motivi, questo contributo manca della sistematicità spazio temporale che assicurerebbe la robustezza attesa per un'attività sentinella.

Scenario 4: sviluppo di un sistema “cattura-identificazione” automatizzato

Lo sviluppo delle applicazioni di *deep-learning* capaci di classificare immagini in tempo reale permette di ipotizzare che un analogo salto di qualità possa essere applicato alla sorveglianza entomologica di vettori di interesse sanitario. Questo implica integrare in un unico sistema la cattura di insetti, l'acquisizione di immagine (verosimilmente da video) e l'analisi tramite una CNN, con trasmissione di dati da remoto.

Alcuni prototipi di questo tipo di trappole complesse sono già stati sviluppati, come quelli capaci di attirare falene in trappole dove sono immobilizzate e fotografate, oppure filmate in volo, per essere identificate tramite reti neurali che inviano i risultati a server dedicati (17-19). Questi risultati sono incoraggianti nel tentativo di estendere questi protocolli e sistemi integrati al monitoraggio di insetti di rilevanza sanitaria.

Il vantaggio di sviluppare sistemi di riconoscimento e monitoraggio in tempo reale di insetti, a livello di genere se non di specie, rappresenterebbe un salto di qualità sia nel sistema di sorveglianza territoriale che nella sorveglianza di specie invasive in punti d'ingresso.

Nel primo caso, permetterebbe il monitoraggio costante in sistemi di sorveglianza in cui oggi la predisposizione e successiva ispezione delle trappole avviene con cadenza variabile nelle diverse stagioni, ad esempio quindicinale (*vedi* il contributo di Calzolari *et al.* in questo volume), con un importante dispendio di risorse economiche ed umane.

Nel secondo caso, il riconoscimento in tempo reale di vettori sospetti nella ispezione di aeromobili in transito o di convogli marittimi o terrestri permetterebbe di intervenire immediatamente con misure di controllo specifiche e mirate.

Approcci di *deep-learning* per applicazioni in entomologia medica all'Istituto Superiore di Sanità

Un gruppo di lavoro trasversale dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), che unisce ricercatori del Dipartimento di Malattie Infettive (reparto di Malattie Trasmesse da Vettori) e del Centro Nazionale Protezione dalle Radiazioni e Fisica computazionale, ha iniziato ad applicare approcci di *deep-learning* allo studio della motilità cellulare del parassita malarico *Plasmodium falciparum* e sta ora affrontando le tematiche qui descritte, applicando tali approcci al riconoscimento di artropodi di interesse sanitario.

Nell'ambito del progetto del Piano Nazionale di Ricerca Militare del Ministero della Difesa “Cattura Caratterizzazione Controllo di artropodi vettore e relativi patogeni-C3LAB”, una collaborazione tra Policlinico Militare di Roma, ISS e Sapienza Università di Roma, è iniziata in ISS un'attività che punta a realizzare un algoritmo di *deep-learning* in grado di identificare, a livello di genere, zanzare e flebotomi raccolti e fotografati in trappole entomologiche.

L'algoritmo è concepito per essere integrato in un protocollo di “cattura-classificazione del vettore-identificazione molecolare del patogeno” affidabile anche ad operatori non esperti, ad uso civile in emergenze epidemiologiche o militare in missioni in paesi endemici.

Il *workflow* generale per la costruzione di un suddetto algoritmo prevede una serie di passaggi riportati in Figura 4.

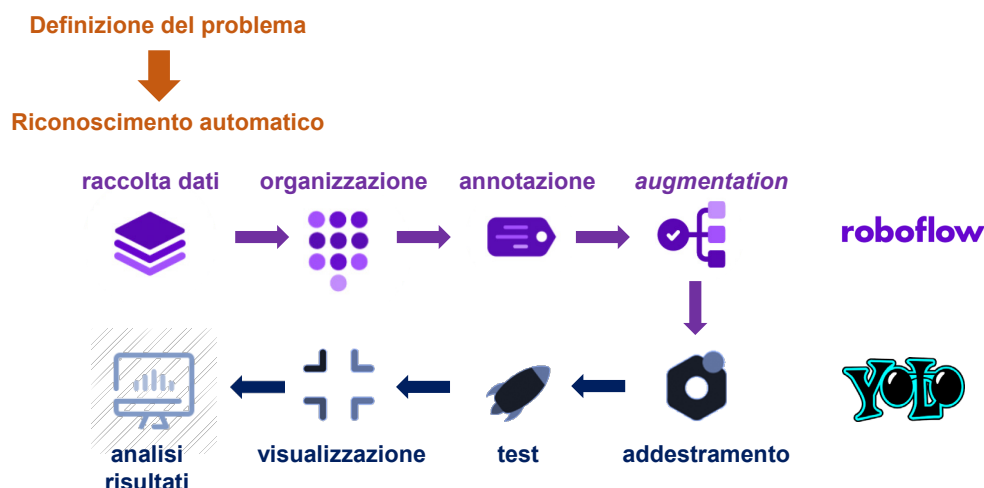


Figura 4. Workflow utilizzato per lo sviluppo di un algoritmo di *deep-learning* per l'identificazione e classificazione di zanzare e flebotomi da trappole entomologiche

Vediamo nel dettaglio le varie fasi:

1. Creazione di un data set di immagini a partire da esemplari disponibili negli insettari dell'ISS e dell'Università di Roma La Sapienza, grazie a collaborazioni con i gruppi di ricerca del Dott. Marco Di Luca (Dipartimento di Malattie Infettive, ISS) e del Prof. Marco Pombi (Istituto di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma). Le fotografie ritrarranno esemplari dei generi di interesse, insieme ad altri insetti che non rivestono importanza sanitaria e che possono essere rinvenuti nelle trappole sul campo, in configurazioni che imitano le condizioni di una reale cattura.
2. Organizzazione del data set e applicazione di un passaggio di *augmentation* mediante il software dedicato *Roboflow* (20), al fine di ottenere una collezione di immagini sufficientemente grande e bilanciata per ogni categoria (genere) da riconoscere.
3. Annotazione da parte di entomologi esperti delle immagini del data set per introdurre i "tag" genere-specifici in corrispondenza degli esemplari, sempre mediante *Roboflow* (20), ed esportazione del data set in formato leggibile dall'algoritmo.
4. Suddivisione casuale delle immagini in un *training set* (70% del data set), in cui le immagini saranno utilizzate dall'algoritmo per estrarre le feature, un *validation set* (20%), in cui saranno utilizzate per valutare l'apprendimento, e un *test set* (10%), in cui saranno utilizzate per misurare l'efficienza dell'algoritmo nel riconoscimento delle categorie.
5. Utilizzo dell'algoritmo di *deep-learning Yolo-v5PyTorch* (21) sui data set precedentemente creati per la configurazione di una CCN. La *performance* della CNN verrà valutata attraverso i parametri di *precision* (precisione), *recall* (sensibilità) e *F1 score*. La *precision* e il *recall* sono due indicatori, inversamente correlati, utili a valutare la qualità di un modello decisionale o di un modello predittivo. Per *precision* si intende il rapporto tra il numero delle previsioni corrette di un evento (categoria) sul totale delle volte che il modello lo prevede, mentre la *recall* è il rapporto tra le previsioni corrette per una classe sul totale dei casi in cui si verifica effettivamente. La metrica denominata *F1 score* bilancia i due

precedenti parametri e restituisce un valore di riferimento per i successivi passaggi di ottimizzazione della CNN. Tanto più è elevato questo parametro, tanto più alti sono i valori associati a *precision* e *recall*, indicando una buona *performance* dell'algoritmo.

Bibliografia

1. Okayasu K, Yoshida K, Fuchida M, Nakamura A. Vision-based classification of mosquito species: comparison of conventional and deep learning methods. *Applied Sciences*. 2019;9(18):3935.
2. He HZ, Fan Y, Ji S, Wu J. Application of deep learning in integrated pest management: a real-time system for detection and diagnosis of oilseed rape pests. *Mobile Information Systems* 2019;4570808.
3. Park J, Kim DI, Choi B, Kang W, Kwon HW. Classification and morphological analysis of vector mosquitoes using deep convolutional neural networks. *Sci Rep* 2020;10(1):1012.
4. Kim K, Hyun J, Kim H, Lim H, Myung H. A deep learning-based automatic mosquito sensing and control system for urban mosquito habitats. *Sensors* 2019;19(12):2785.
5. Minakshi PB, Chellappan S. Leveraging smart-phone cameras and image processing techniques to classify mosquito species. *Proceedings of the 15th EAI International Conference on Mobile and Ubiquitous Systems: Computing, Networking and Services (MobiQuitous '18)*. 2018. Association for Computing Machinery, New York, NY, USA. p. 77-86.
6. Motta D, Santos AÁB, Winkler I, Machado BAS, Pereira DADI, Cavalcanti AM, Fonseca EOL, Kirchner F, Badaró R. Application of convolutional neural networks for classification of adult mosquitoes in the field. *PLoS One* 2019 14(1):e0210829.
7. Fuchida M, Pathmakumar T, Mohan RE, Tan N, Nakamura A. Vision-based perception and classification of mosquitoes using support vector machine. *Applied Sciences* 2017;7(1):51-62.
8. Li W, Zheng T, Yang Z, Li M, Sun C, Yang X. Classification and detection of insects from field images using deep learning for smart pest management: A systematic review. *Ecological Informatics* 2021;66:101460.
9. Lorenz C, Ferraudo AS, Suesdek L. Artificial Neural Network applied as a methodology of mosquito species identification. *Acta Trop* 2015 152:165-9.
10. Couret J, Moreira DC, Bernier D, Loberti AM, Dotson EM, Alvarez M. Delimiting cryptic morphological variation among human malaria vector species using convolutional neural networks. *PLoS Negl Trop Dis* 2020;14(12):e0008904.
11. Høye TT, Årje J, Bjerger K, Hansen OLP, Iosifidis A, Leese F, Mann HMR, Meissner K, Melvad C, Raitoharju J. Deep learning and computer vision will transform entomology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021;118(2):e2002545117.
12. Joshi A, Miller C, Review of machine learning techniques for mosquito control in urban environments, *Ecological Informatics* 2021;61:101241.
13. Ballardini M, Ferretti S, Chiaranz G, Pautasso A, Riina MV, Triglia G, Verna F, Bellavia V, Radaelli MC, Berio E, Accorsi A, De Camilli M, Cardellino U, Fiorino N, Acutis PL, Casalone C, Mignone W. First report of the invasive mosquito *Aedes koreicus* (Diptera: Culicidae) and of its establishment in Liguria, Northwest Italy. *Parasit Vectors* 2019;12(1):334. doi: 10.1186/s13071-019-3589-2.
14. Lu CY, Rustia DJ, Lin TT. Generative adversarial network based image augmentation for insect pest classification enhancement. *IFAC-PapersOnLine* 2019;52(30):1-5.
15. Eritja R, Ruiz-Arrondo I, Delacour-Estrella S, Schaffner F, Álvarez-Chachero J, Bengoa M, Puig MÁ, Melero-Alcibar R, Oltra A, Bartumeus F. First detection of *Aedes japonicus* in Spain: an unexpected finding triggered by citizen science. *Parasit Vectors* 2019;12(1):53-62. doi: 10.1186/s13071-019-3317-y.

16. Gupta SK, Nagpal BN, Singh H, Vikram K, Nayak A, Chalga MS, Srivastava A, Joshi MC, Saxena R. Mobile App based pictorial identification key for Indian anophelines. *J Vector Borne Dis.* 2021;58(4):306-10.
17. Ding W, Taylor G. Automatic moth detection from trap images for pest management. *Computers and Electronics in Agriculture* 2016;123:17-28.
18. Bjerger K, Nielsen JB, Sepstrup MV, Helsing-Nielsen F, Høye TT. An automated light trap to monitor moths (lepidoptera) using computer vision-based tracking and deep learning. *Sensors (Basel)* 2021;21(2):343-60.
19. Brydegaard M, Jansson S, Malmqvist E, Mlacha YP, Gebru A, Okumu F, Killeen GF, Kirkeby C. Lidar reveals activity anomaly of malaria vectors during pan-African eclipse. *Sci Adv* 2020;6(20):eaay5487.
20. Alexandrova S, Tatlock Z, Cakmak M. RoboFlow: a flow-based visual programming language for mobile manipulation tasks. *IEEE International Conference on Robotics and Automation* 2015:5537-44.
21. Redmon J, Divvala S, Girshick R, Farhadi A. You only look once: unified, real-time object detection. *IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* 2016; 779-88.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di settembre 2022, 1° Suppl.*

*Stampato in proprio
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, settembre 2022