

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

Il 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)	Miglionico	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)	Soledo	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 molecolarmente 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.cature
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 allimini/ 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	<i>Dirofilaria repens</i> pP/pT	<i>Dirofilaria immitis</i> 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)

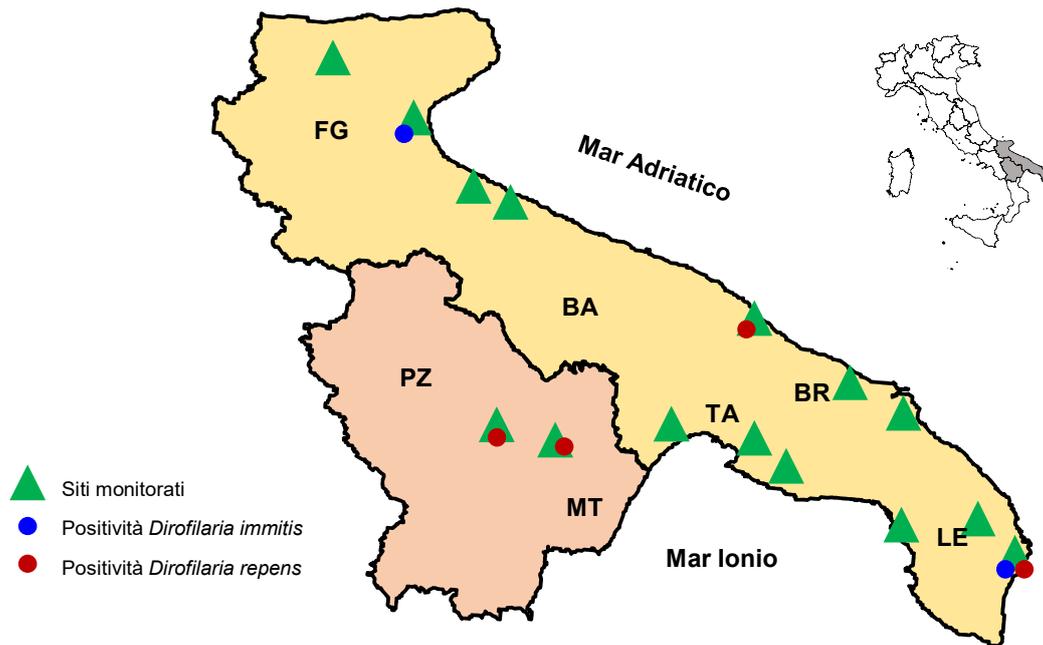


Figura 1. Sorveglianza entomologica WNV-USUV (2020) in Puglia e Basilicata: siti monitorati e positività per *Dirofilaria repens* e *Dirofilaria immitis* rilevate nei culicidi catturati

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 culicida 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 molecolarmente; Alcune di queste specie rivestono grande interesse medico in quanto in passato vettori di malaria, in particolare *An. labranthiae* 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. labranthiae* 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 simpatia con *An. labranthiae*. 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. Raelle 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.