

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 encefalomielite 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).

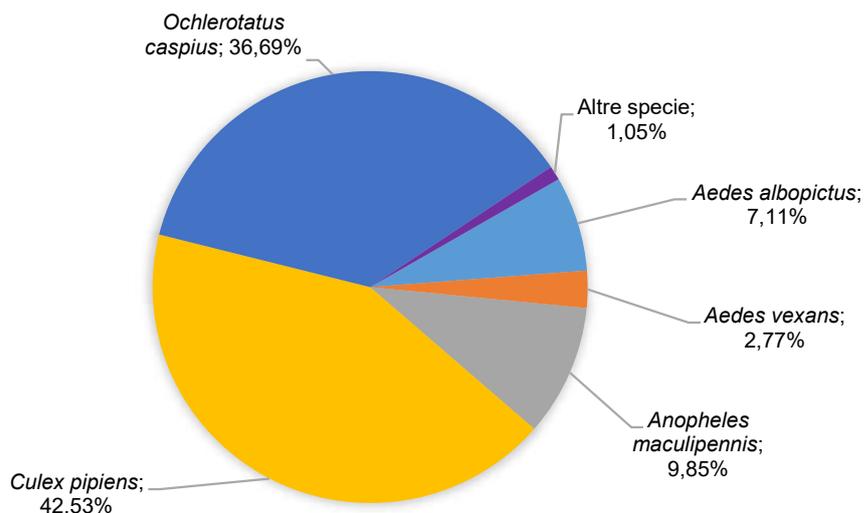


Figura 1. Specie di zanzare catturate in Piemonte, nel periodo 2014-2020

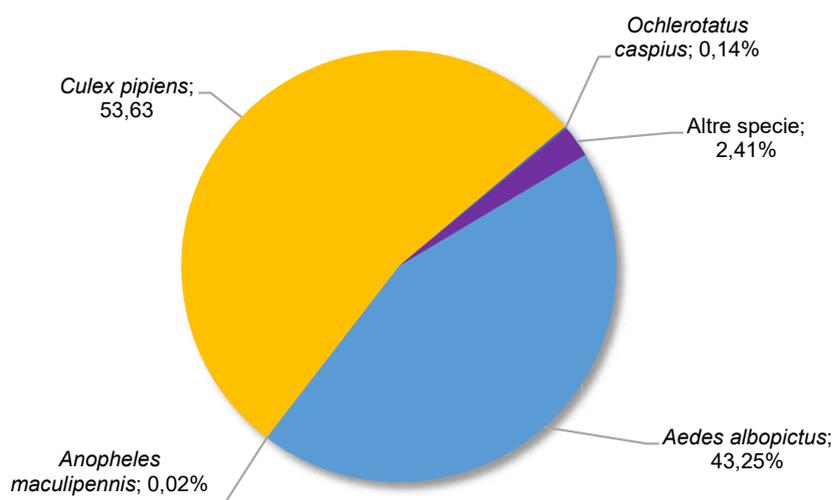


Figura 2. Specie di zanzare catturate in Liguria nel periodo 2014-2020

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'aeroporto Pescara 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'aeroporto Pescara 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).

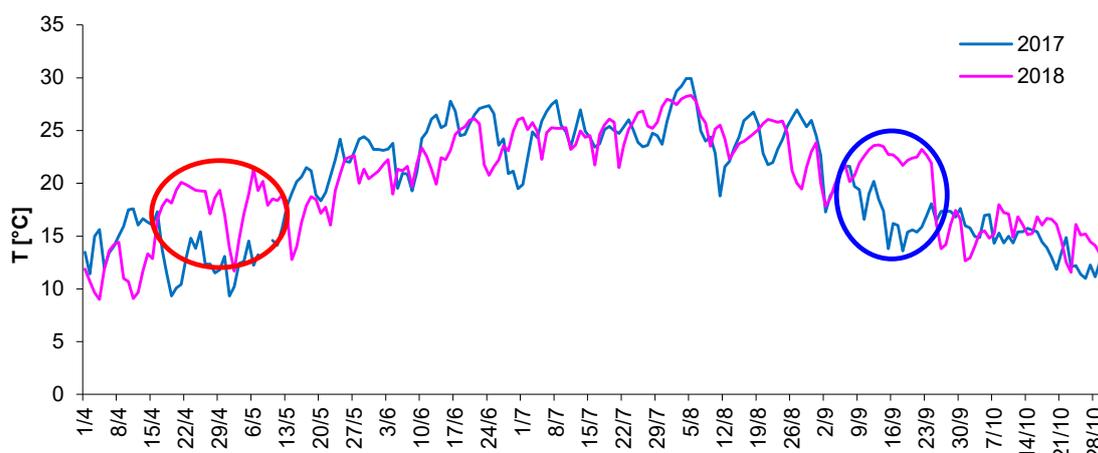


Figura 3. Confronto tra le temperature medie giornaliere 2017 e 2018 nel periodo aprile-ottobre (media tra i dati delle stazioni di Nizza Monferrato, Casale Monferrato, Alba e Cerano). Nelle ellissi sono evidenziati i periodi significativamente più caldi registrati nel 2018

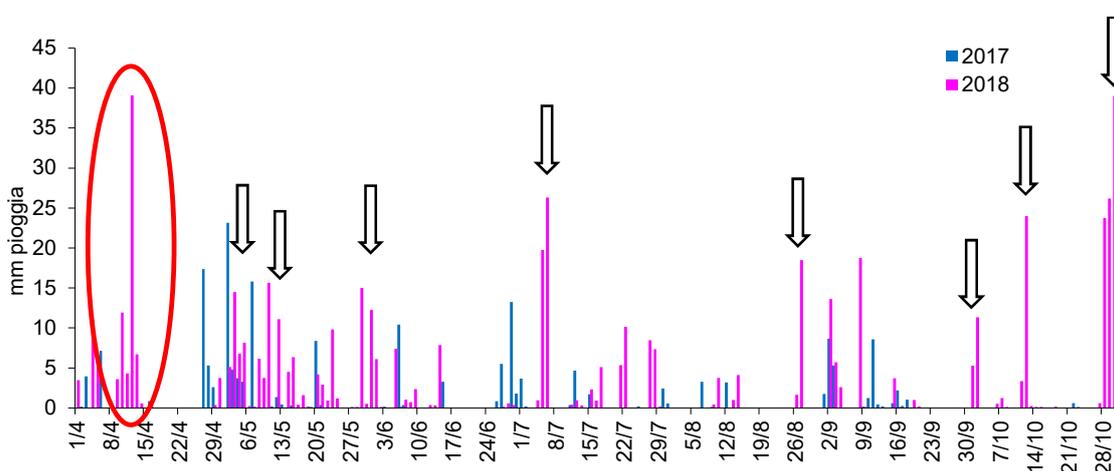


Figura 4. Confronto tra le precipitazioni giornaliere 2017 e 2018 nel periodo aprile-ottobre (media tra i dati delle stazioni di Nizza Monferrato, Casale Monferrato, Alba e Cerano). Nell'ellisse il periodo molto piovoso (aprile 2018); le frecce indicano gli altri fenomeni piovosi significativi del 2018

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.