

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).

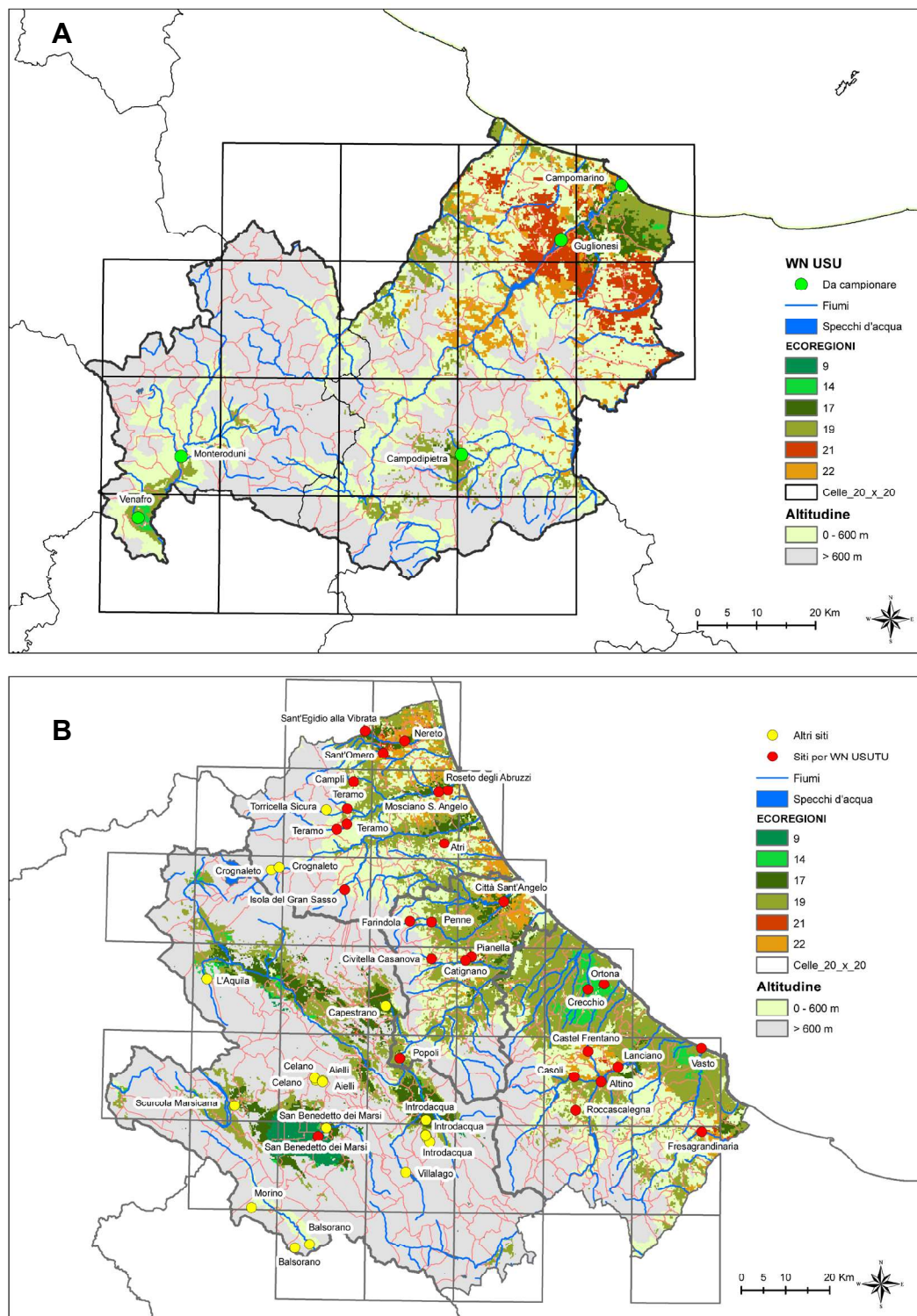


Figura 1. Siti di cattura selezionati per la cattura dei culicidi in Molise (A) e Abruzzo (B) per gli anni 2019 e 2020

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.

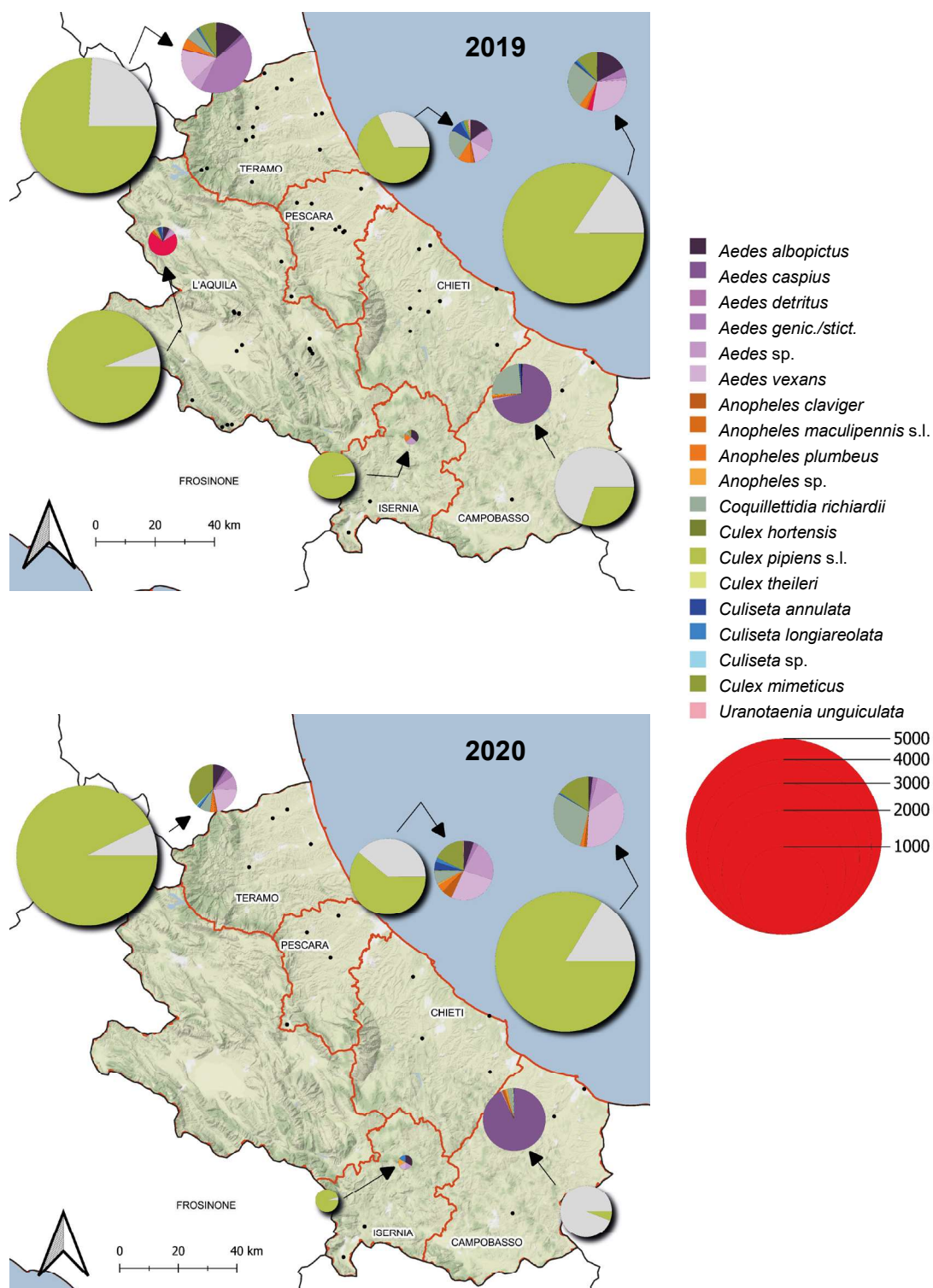


Figura 2. Distribuzione delle specie di zanzara catturate in Abruzzo e Molise (2019-2020)

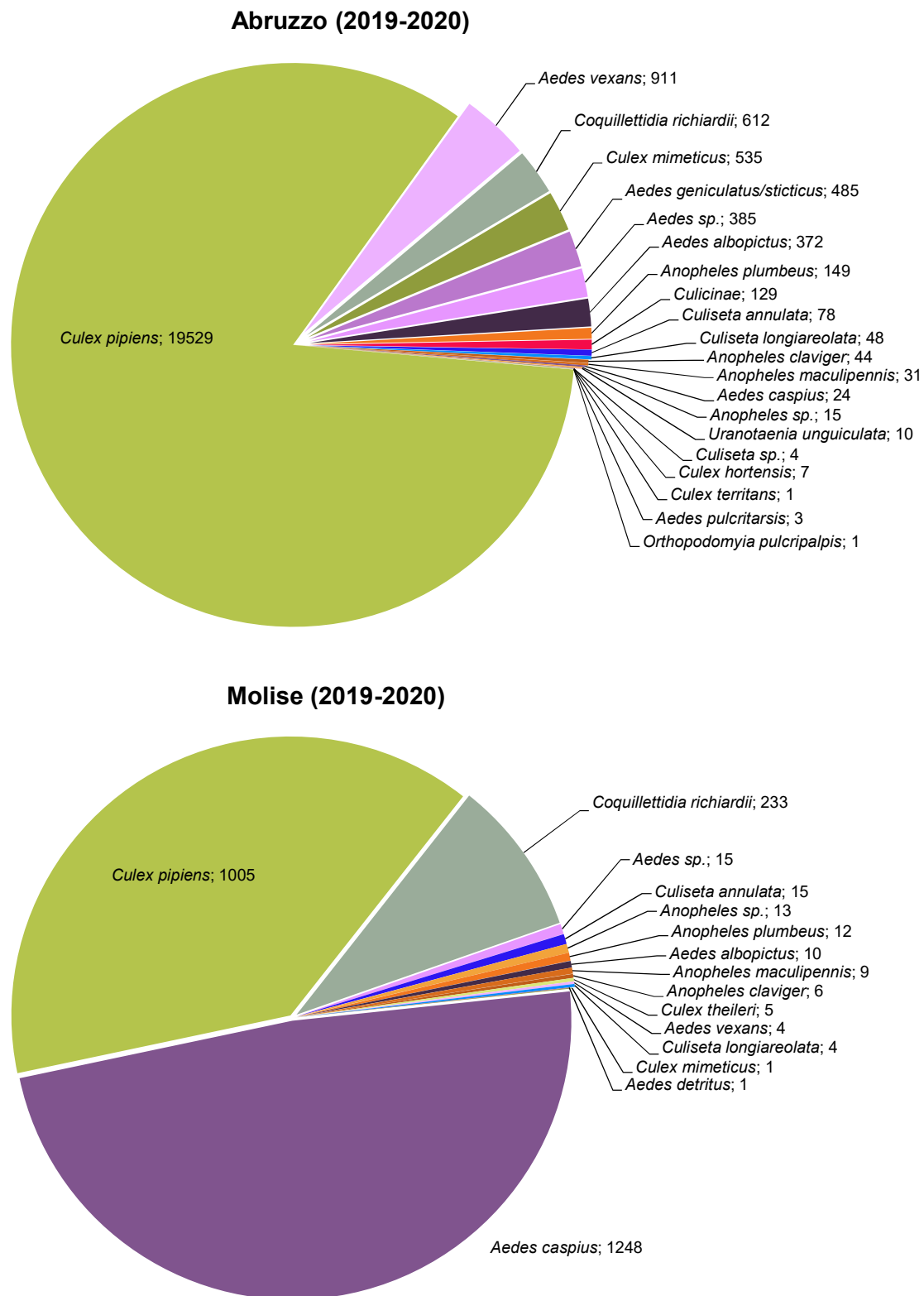


Figura 3. Abbondanza relativa (B) delle specie di zanzara catturate in Abruzzo e Molise (2019-2020)

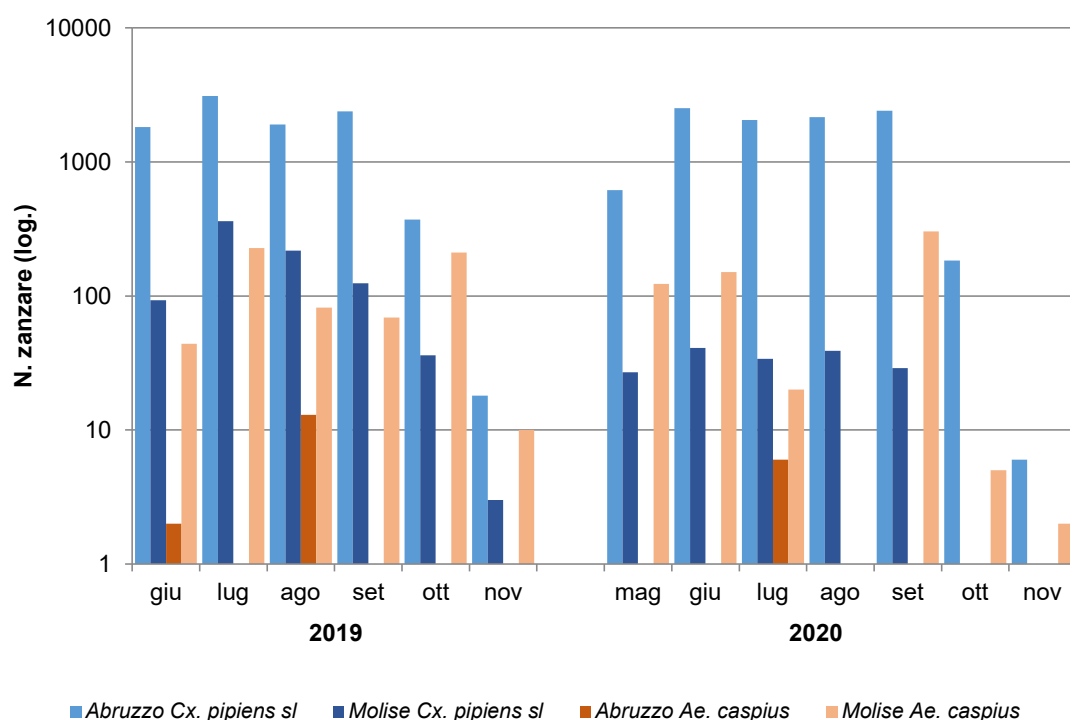


Figura 4. Andamento stagionale (log. numero zanzare per mese) di *Culex pipiens s.l.* e di *Aedes caspius* in Abruzzo e in Molise (2019-2020)

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
<i>Culiseta longiareolata</i>	Isernia	16-set-2020	1
	Pescara	18-set-2020	1
<i>Culiseta longiareolata</i>	Isernia	16-set-2020	1

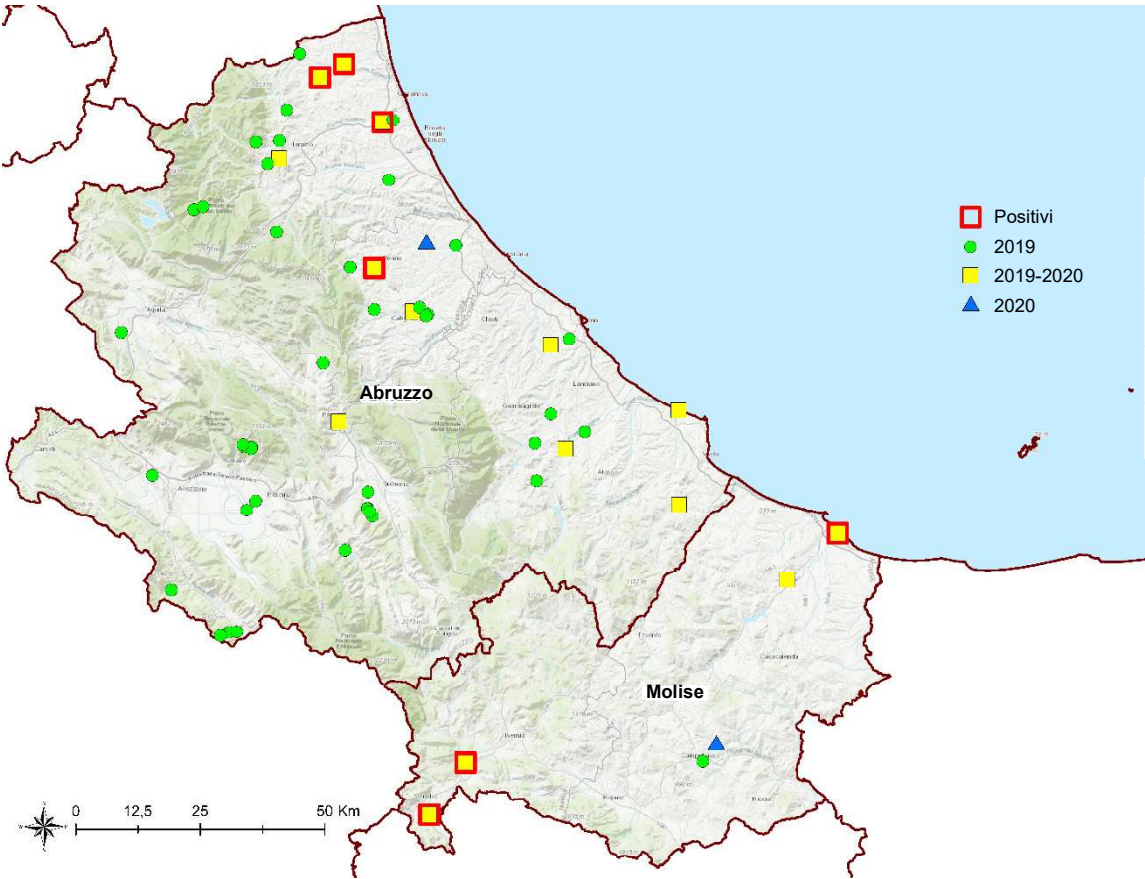


Figura 5. Siti risultati positivi al virus Usutu in Abruzzo e Molise (2019-2020)

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.