



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI TERAMO



**SOCIETÀ ITALIANA DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO VETERINARIA**

# **XVI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.**

**VOLUME degli ATTI**

*Montesilvano (PE), 30 Settembre - 2 Ottobre 2015*  
*Hotel Serena Majestic*

## LA SORVEGLIANZA ENTOMOLOGICA COME STRUMENTO DI “EARLY DETECTION” DELLE MALATTIE TRASMESSE DA VETTORI: PRIME POSITIVITÀ AL WEST NILE VIRUS IN PIEMONTE E LIGURIA NEL 2014

**Keywords:** sorveglianza entomologica, malattie trasmesse da zanzare, West Nile virus

Verna F.\*<sup>[1]</sup>, Modesto P.<sup>[1]</sup>, Francese D.<sup>[1]</sup>, Pautasso A.<sup>[1]</sup>, Radaelli M.C.<sup>[1]</sup>, Travaglio S.<sup>[1]</sup>, Grattarola C.<sup>[1]</sup>, Mosca A.<sup>[2]</sup>, Desiato R.<sup>[1]</sup>, Bertolini S.<sup>[1]</sup>, Gazzuola P.<sup>[1]</sup>, Lia R.<sup>[1]</sup>, Monaci E.<sup>[1]</sup>, Vitale N.<sup>[1]</sup>, Ballardini M.<sup>[1]</sup>, Ercolini C.<sup>[1]</sup>, Rossini I.<sup>[1]</sup>, Accorsi A.<sup>[1]</sup>, Ferrari A.<sup>[1]</sup>, Savini G.<sup>[3]</sup>, Mignone W.<sup>[1]</sup>, Prearo M.<sup>[1]</sup>, Chiavacci L.<sup>[1]</sup>, Casalone C.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italy (IZSPLVA) ~ Torino ~ Italy, <sup>[2]</sup>Istituto per le Piante da Legno e l'Ambiente (IPLA) ~ Torino ~ Italy, <sup>[3]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise “G. Caporale”(IZSAM) ~ Teramo ~ Italy

### SUMMARY:

Mosquito-borne diseases (MBD) are characterized by complex epidemiology, determined by the interaction between pathogens, hosts, vectors and ecosystem. Due to globalization and climate change MBD spread in free Countries, representing an emerging threat. This work shows the results of the entomological surveillance carried out in 2014 in Piedmont and Liguria Regions. From 1st July to 7th November mosquitoes were fortnightly collected in 40 selected sites, identified to species level, pooled and analysed. A total of 20033 mosquitoes, grouped in 914 pools, were tested. In Piedmont (Alessandria) 2 pools of *Culex pipiens* were positive for West Nile Virus (WNV) and 1 for Usutu virus (USUV). In Liguria 1 pool of *Culex pipiens* was positive for WNV and one for USUV. This is the first report of WNV circulation in both regions. Control measures were quickly implemented. Entomological surveillance is currently considered the most effective tool for early detection and control of MBD spread.

### INTRODUZIONE:

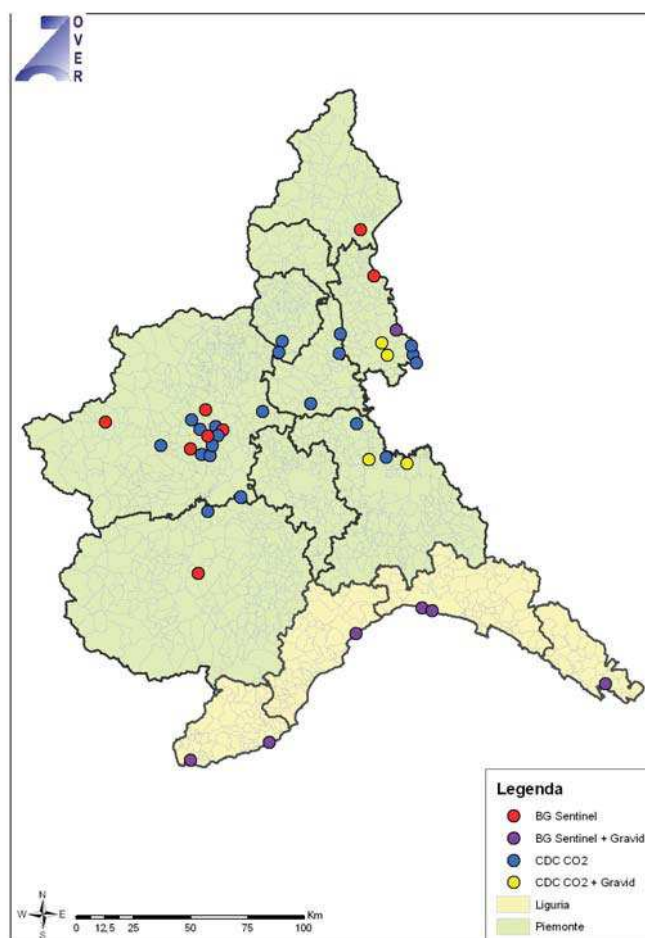
Le malattie trasmesse da zanzare (MBD) sono contraddistinte da un'epidemiologia complessa, risultato dell'interazione tra patogeno, ospite, vettore ed ecosistema. Nell'attuale scenario di globalizzazione, movimentazione di merci e persone e cambiamenti climatici, MBD virali di interesse medico umano e veterinario tipiche di aree tropicali e sub-tropicali (Chikungunya, Dengue, West Nile Disease, Usutu) sono state segnalate anche in Paesi considerati indenni, quali l'Italia, rappresentando una minaccia emergente. La sorveglianza entomologica è attualmente considerata lo strumento più efficace per la rilevazione precoce di circolazione virale.

Questo lavoro riporta i risultati della sorveglianza entomologica condotta nel 2014 in Piemonte e Liguria, regioni confinanti con aree in cui West Nile virus (WNV) e Usutu virus (USUV) sono endemici (Camargue, Emilia Romagna, Lombardia) e in cui sono stati recentemente segnalati casi autoctoni di Dengue (5). La sorveglianza entomologica si contestualizza all'interno di un network informativo di sorveglianza integrata regionale in cui convergono diverse professionalità (veterinari, biologi, entomologi, medici) nel concetto “One Medicine-One Health”.

### MATERIALI E METODI:

L'attività è stata condotta dal 1/07/14 al 7/11/14 con campionamenti quindicinali. Sono stati individuati e georeferenziati 40 siti (34 in Piemonte e 6 in Liguria) secondo criteri risk-based (aree umide, presenza di ospiti, snodi commerciali/turistici, vicinanza ai principali fiumi) in cui sono state posizionate 1 o più tipologie di trappole per la cattura di esemplari adulti di zanzara: CDC-CO2, BG-Sentinel con Bg-Lure e ghiaccio secco e Gravid Trap (Mappa 1). Nelle aree di positività si è implementato il numero di catture con l'utilizzo di un aspiratore manuale Prokopack®. Gli esemplari catturati, identificati a livello di specie (7), sono stati raggruppati in pool di massimo 100

individui (per specie, data e sito di raccolta) e omogenati in PBS. L'RNA è stato estratto utilizzando l'RNeasy Mini Kit (Qiagen) con protocollo automatizzato QIAcube e analizzato mediante 2 Real Time RT-PCR specifiche per WNV e USUV (2,3). I pool positivi sono stati analizzati tramite 2 end-point RT-PCR per WNV e USUV (1,4) e gli amplificati di 408 e 425 bp rispettivamente, sono stati sequenziati utilizzando il Big Dye Terminator Kit v3.1 (Lifetechnologies) su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer. Le sequenze ottenute sono state comparate con quelle depositate in GenBank tramite il software BLAST. I pool positivi sono stati inviati al Centro di Referenza Nazionale per le malattie esotiche (CESME, Teramo) per la conferma. Dati i casi di Dengue in Paesi confinanti, le zanzare catturate in Liguria sono state analizzate anche per la ricerca di virus della famiglia Flaviviridae (6).



Mappa 1- Siti e tipologia di trappole collocate nell'area di studio

**RISULTATI E DISCUSSIONE:**

Sono state catturate e analizzate 20033 zanzare divise in 914 pool (Tabella 1). Sono risultati positivi 5 pool di Cx. pipiens: 3 per WNV Lineage 2 (2 pool in Piemonte e 1 in Liguria) e 2 per USUV (1 in Piemonte e 1 in Liguria) (Tabella 2). La sorveglianza entomologica in atto ha permesso di rilevare WNV nel 2014, per la prima volta nell'area di studio, in zanzare Cx. pipiens, principale vettore del virus in Europa.

La rilevazione precoce della circolazione virale sul territorio ha consentito di allertare le competenti Strutture regionali di Sanità pubblica e le strutture di coordinamento per le attività trasfusionali umane per l'introduzione tempestiva delle idonee misure di prevenzione, al fine di controllare ed evitare la diffusione sul territorio. Secondo quanto previsto dalla normativa nazionale, si è provveduto al monitoraggio sierologico a campione degli equidi nel raggio di 4 km dai siti di positività, all'applicazione dei protocolli di disinfestazione locale con adulticidi e larvicidi per il controllo dei vettori e, in ambito umano, al controllo dei donatori residenti nelle Province interessate. Il riscontro di USUV, segnalato in Piemonte orientale già dal 2011, richiama la necessità di intensificare la sorveglianza, in considerazione dell'affinità ecologica e di co-circolazione di WNV e USUV descritta recentemente in Europa. In Liguria non sono stati rilevati ad ora altri Flavivirus esotici di interesse medico; considerata tuttavia l'abbondanza di Aedes albopictus, vettore competente per un'eventuale trasmissione all'uomo, risulta di fondamentale importanza il prosieguo delle attività di controllo.

Specie	Regione				Totale	
	Piemonte		Liguria		N° zanzare	N° pool
	N° zanzare	N° pool	N° zanzare	N° pool		
<i>Culex pipiens</i>	8369	275	2278	75	10622	350
<i>Aedes albopictus</i>	1334	135	2499	75	3829	210
<i>Ochlerotatus caspius</i>	2917	126	6	3	2923	129
<i>Anopheles maculipennis</i> s.l.	1613	93	1	1	1613	94
<i>Aedes vexans</i>	634	47	0	0	634	47
<i>Culex modestus</i>	38	10	0	0	38	10
<i>Culiseta annulata</i>	3	1	2	2	5	3
<i>Anopheles plumbeus</i>	13	11	2	2	15	13
<i>Culex territans</i>	16	2	1	1	17	3
<i>Culiseta subhocrea</i>	3	3	0	0	3	3
<i>Culex hortensis</i>	3	1	1	1	4	2
<i>Culex theileri</i>	0	0	1	1	2	1
<i>Ochlerotatus geniculatus</i>	119	16	0	0	119	16
<i>Culex impudicus</i>	0	0	21	4	21	4
<i>Culex mimeticus</i>	0	0	1	1	1	1
<i>Culiseta longiareolata</i>	0	0	16	12	15	12
<i>Culex</i> sp.	0	0	72	10	72	10
<i>Aedes</i> sp.	0	0	65	2	65	2
<i>Culiseta</i> sp.	2	2	1	1	3	3
<i>Ochlerotatus</i> sp.	0	0	1	1	1	1
Non determinabile	3	1	0	0	4	1
<b>Totale</b>	<b>15066</b>	<b>723</b>	<b>4967</b>	<b>192</b>	<b>20033</b>	<b>915</b>

Tabella 1- Numero e pool di zanzare catturate e testate suddivise per specie

Comune	Data	Tipologia Trappola	Specie	Numero	Positività
Valenza (AL)	27/08/2014	CDC CO <sub>2</sub>	<i>Culex pipiens</i>	42	WNV L2
San Salvatore Monferrato (AL)	10/09/2014	CDC CO <sub>2</sub>	<i>Culex pipiens</i>	16	WNV L2
Genova	23/09/2014	Gravid Trap	<i>Culex pipiens</i>	100	WNV L2
San Salvatore Monferrato (AL)	27/08/2014	CDC CO <sub>2</sub>	<i>Culex pipiens</i>	73	USUV
La Spezia	19/09/2014	Gravid Trap	<i>Culex pipiens</i>	100	USUV

Tabella 2- Positività riscontrate nell'area di studio

**BIBLIOGRAFIA:**

- Bakonyi T, Gould EA, Kolodziejek J, Weissenböck H, Nowotny N. 2004. Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: comparison with the South African strain SAAR-1776 and other flaviviruses. *Virology* Oct 25;328(2):301-10.
- Cavrini F Della Pepa ME, Gaibani P, Pierro AM, Rossini G, Landini MP, Sambri V. 2011. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J Clin Virol.* 50(3): 221-3.
- Del Amo J, Sotelo E, Fernández-Pinero J, Gallardo C, Llorente F, Agüero M, Jiménez-Clavero MA. 2013. 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.* 189(2):321-7.
- Lanciotti, R. S., Kerst, A. J., Nasci, R. S., Godsey, M. S., Mitchell, C. J., Savage, H. M., Komar N, Panella N. A., Allen B. C., Volpe K. E., Davis B. S., Roehrig, J. T. 2000. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *Journal of clinical microbiology* 38(11),4066-4071.
- Marchan E, Prat C, Jeannin C, Lafont E, Bergmann T, Flusin O, Rizzi J, Roux N, Busso V, Deniau J, Noel H, Vaillant V, Leparç-Goffart I, Six C, Paty MC. 2014. Autochthonous case of dengue in France, October 2013. *Euro Surveill.*2013;18(50).
- Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. 2001. 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.*; 39(5):1922-7.
- Severini F, Toma L, Di Luca M, Romi R. 2009. Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti (Diptera, Culicidae). *Fragmenta entomologica* 41:213-372.