

Allegato 5

Sorveglianza entomologica dei virus West Nile e Usutu: procedure operative per la cattura di zanzare e la gestione del campione.

Schema operativo per l'uso di trappole tipo CDC (o CDC-light) addizionate con CO₂

Le trappole per insetti ematofagi tipo CDC-light o tipo CDC modificata, entrambe innescate a CO₂ sono particolarmente indicate per la cattura di esemplari adulti appartenenti a differenti specie crepuscolari e notturne di Culicidi.

La trappola tipo CDC-light prevede la presenza di una lampadina (a luce bianca) come fonte di attrazione in aggiunta al ghiaccio secco che, sublimando, produce vapori di anidride carbonica (CO₂) che hanno un forte potere attrattivo sulle femmine in cerca del pasto di sangue. Possono essere utilizzate trappole dello stesso tipo modificate, che non prevedono l'installazione della lampadina.

Un comune modello di queste trappole (es. trappola tipo CDC modificata innescata con CO₂) (Figura 1), è costituito:

da un recipiente adiabatico (thermos) (1) dove si pone una quantità prestabilita di ghiaccio secco (circa 1Kg), che, sublimando produce del gas che si propaga al di fuori del contenitore grazie a dei fori (2), creando una nube di anidride carbonica sotto la trappola; può essere inoltre presente al di sotto del thermos una lampadina a luce bianca (trappola tipo CDC-light addizionate con CO₂).

- Le zanzare, attratte dal gradiente del gas (ed eventualmente dalla sorgente luminosa), entrano nel raggio d'azione di una ventola (3) azionata da un motorino elettrico che le aspira, attraverso un'imboccatura (4), spingendole in un sacchetto di tulle (5).
- La trappola, la cui ventola è alimentata da una batteria da 12V, va preferibilmente posizionata in maniera stabile e ad un'altezza tale che l'imboccatura resti a circa 1,5 mt di altezza da terra. Alberi, pali e cancellate sono ideali a questo scopo. La trappola deve essere azionata poco prima del tramonto (tra le 17:00 e le 19:00) e deve restare attiva fino al mattino seguente (circa ore 8:00).

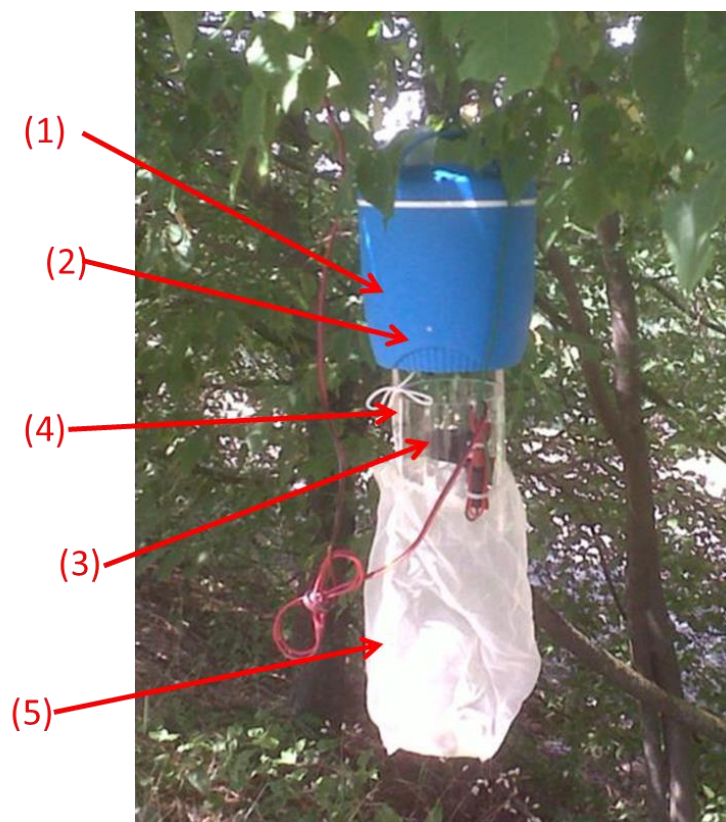


Figura 1: trappola tipo CDC modificata a CO₂.

Schema operativo per l'uso di trappole tipo Gravid

La trappola per insetti ematofagi tipo Gravid viene usata per catturare le femmine gravide di zanzare che, dovendo deporre le uova, si avvicinano all'acqua. In questo modo è possibile collezionare femmine adulte che hanno compiuto e digerito almeno un pasto di sangue, e potrebbero albergare il virus nelle ghiandole salivari.

La Gravid Trap prevede un sistema di aspirazione che poggia su un catino al cui interno vi è dell'acqua stagnante utilizzata come attrattivo. L'attrattivo è una soluzione acquosa che può essere raccolta localmente oppure preparata per simulare l'acqua trovata nell'habitat naturale. L'attrattivo può essere infatti preparato miscelando acqua, lievito di birra e fieno, il tutto lasciato a macerare per 1 o 2 giorni.

La trappola è formata da due parti (Figura 2):

- parte superiore: box con maniglia di trasporto, chiusura e cerniere (1) contenente tubo di scarico con motore e ventola, alloggiamento per batterie (4 pile a torcia da 1.5V), interruttore (2), tubo di aspirazione (3) e contenitore per la raccolta degli insetti (4);
- parte inferiore: vassoio (5) che fa da contenitore per l'attrattivo e da supporto per la parte superiore.

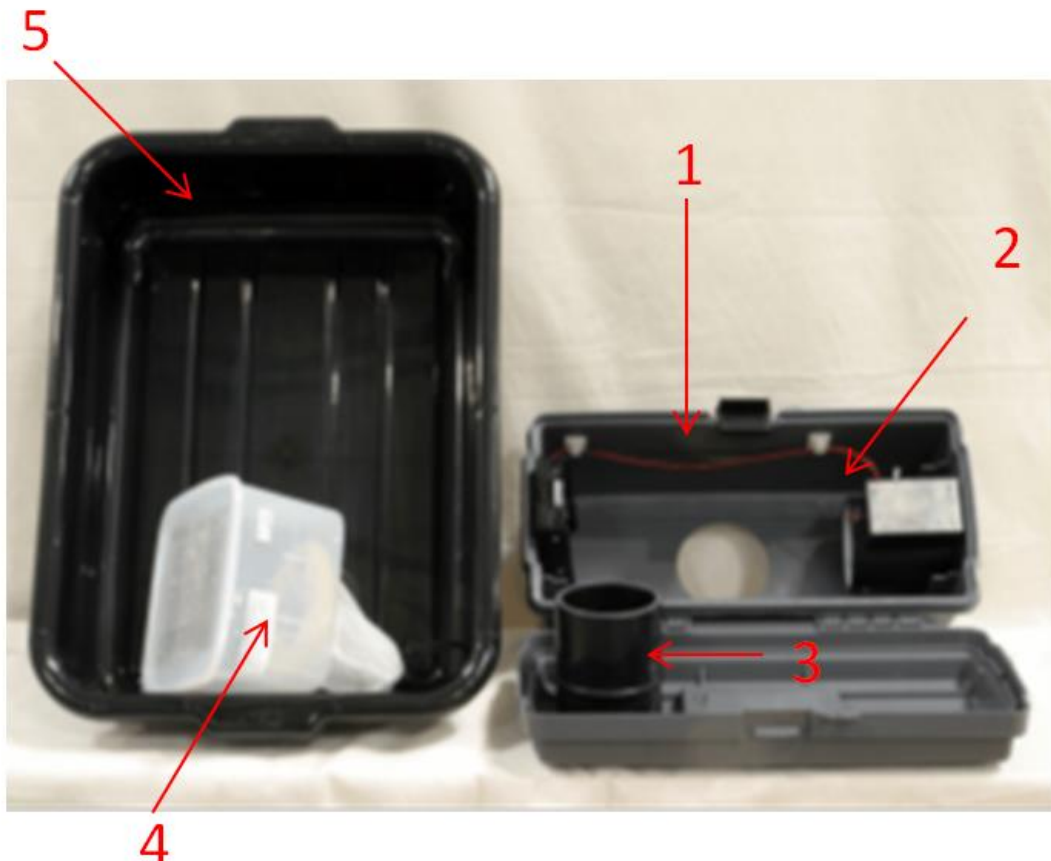


Figure 2: trappola tipo Gravid non assemblata.

Assemblaggio della trappola:

- aprire il box e togliere le parti interne;
- montare la camera di raccolta dalla parte esterna del tubo e dalla parte più corta dello stesso (Figura 3);



Figure 3: contenitore per la raccolta degli insetti e tubo di aspirazione assemblati.

- mettere il tubo di aspirazione così montato nell'apertura sul fondo del box, in modo tale che la sua estremità più lunga sia fuori dal box stesso;



Figure 4: parte superiore della trappola Gravid assemblata.

- posizionare le 4 batterie nell'apposito alloggiamento;
- posizionare il box sulla parte superiore del vassoio (appoggiare i piedi del box sui bordi del vassoio) (Figura 4)
- riempire il vassoio con il mix attrattivo fino a un dito dalla bocca del tubo di aspirazione
- accendere l'interruttore e chiudere il coperchio per il corretto funzionamento della trappola (Figura 5)



Figure 5: trappola Gravid assemblata e posizionata.

- La trappola, la cui ventola è alimentata da una batteria da 4 pile a torcia da 1.5V, deve essere azionata poco prima del tramonto (tra le 17:00 e le 19:00) e deve restare attiva fino al mattino seguente (circa ore 8:00).

Schema operativo per l'uso di trappole tipo BG-Sentinel

La trappola per insetti ematofagi tipo BG-Sentinel è particolarmente indicata per la cattura di esemplari adulti di specie di Culicidi diurne, ad esempio appartenenti al genere *Aedes*.

La trappola BG-Sentinel prevede l'utilizzo di sistema di aspirazione potenziato da un attrattivo artificiale (BG-Lure) che rilascia sostanze volatili che mimano quelle rilasciate dal corpo umano (combinazione di acido lattico, ammoniaca ed altre sostanze organiche).

Le zanzare, attratte dalla miscela di odori emanata dal BG-Lure (10) e spinte dal flusso di aria creato dalla ventola (7), vengono raccolte all'interno di un sacchetto in tessuto nero (3).

Assemblaggio della trappola (Figura 6):

- montare le 3 stecche (6) nella parte interna della struttura cilindrica bianca (5) in corrispondenza delle parti scoperte dell'anello metallico;
- applicare prima l'imbuto di stoffa nero aperto (2) e poi il sacchetto per la raccolta delle zanzare (3) all'imbuto di plastica nero (1) e posizionarli nella trappola, in corrispondenza del tubo di aspirazione interno (7);
- posizionare l'attrattivo nell'apposita tasca;
- coprire la trappola con il "cappuccio" di tessuto bianco tipo garza (4).

La trappola, la cui ventola può essere alimentata a corrente (220V) (8) o tramite batteria da 12V con appositi cavetti (9), deve essere posizionata a terra e deve rimanere in funzione per 24 ore dopo la sua accensione. È importante verificare la disponibilità di corrente elettrica.



Figure 6: trappola BG-Sentinel non assemblata.

Schema operativo per l'uso di aspiratori (a bocca o elettrici)

Il metodo dell'aspirazione è particolarmente indicato per catturare femmine adulte ingorgate all'interno dei siti di riposo, soprattutto lungo le pareti/soffitti di box, di pollai o di ogni tipo di ricovero animale, durante le prime ore della mattina.

- Aspiratore a bocca (Figura 7): tubo di plexiglass di circa 1.5 cm di diametro e di circa 40 cm di lunghezza collegato con un tubo flessibile di gomma per l'aspirazione; tra i due viene posto un filtro (es. velo di tulle).



Figure 7: aspiratore a bocca.

- Una volta catturate, riporre le zanzare in un bicchiere di carta/plastica chiuso superiormente con una rete a maglia sottile fissato con un elastico e sul cui fondo o sul cui lato è stato praticato un foro tale da permettere l'inserimento del tubo dell'aspiratore; chiudere poi il foro con dell'ovatta per impedire la fuga delle zanzare.
- Aspiratore elettrico: utile per la rapida cattura delle zanzare e per eliminare i rischi dell'aspirazione a bocca. Dispositivo costituito da: corpo principale con interruttore e alloggiamento per due pile a torcia (1,5V), contenitore di raccolta (con rete sul fondo), tappo in gomma collegato a un tubo di raccolta.



Figura 8: aspiratore elettrico.

- Una volta effettuata la cattura, togliere il tappo di gomma nero collegato al tubo di aspirazione, chiudere con l'apposito coperchio bianco, spegnere l'aspiratore e rimuovere il contenitore con le zanzare.



Figura 9: barattolo per la raccolta delle zanzare catturate con aspiratore elettrico.

Schema operativo per la cattura larvale e gestione del campione

La cattura larvale può essere utilizzata per migliorare il monitoraggio delle specie di zanzare in una data area e può fungere da valido strumento per la valutazione dell'efficacia degli interventi di lotta e controllo verso gli insetti vettori.

Dovrebbero essere ispezionati i focolai larvali siti in prossimità delle trappole per adulti ed eventualmente presenti in aree dove è stata rilevata la circolazione virale.

Per focolai larvali si intende qualunque raccolta di acqua (naturale o artificiale, perenne o temporanea) in cui vengano rinvenute, anche sporadicamente, larve di zanzara (es. aree allagate aperte e boschive, stagni o pozze, rigagnoli e ruscelli, canali di irrigazione, vasche, abbeveratoi, canalette di scolo e contenitori di varia natura).

Il campionamento va effettuato mediante un apposito «pescalarve» standard di 500 ml (o mediante l'uso di contenitori di plastica o mestoli) per prelevare l'acqua con le larve dal focolaio (Figura 10). In presenza

di raccolte d'acqua estese quali stagni, impaludamenti, canali di bonifica, ecc. gli stadi acquatici delle zanzare vanno cercati solamente lungo i bordi erbosi o in pozze isolate dal corpo d'acqua principale.

Usualmente solo le larve di 4 stadio (cioè quelle di maggiori dimensioni) sono utili per l'identificazione di specie.

Una volta che sono state raccolte, le larve possono essere trasferite con una pipetta di plastica in contenitori contenenti etanolo al 70%. Altrimenti, se l'acqua è molto sporca, filtrare con una garza stesa su un colino e sciacquare il contenuto con acqua pulita prima del trasferimento in etanolo al 70%.

- Etichettare il campione, registrando con una matita il sito e la data di cattura;
- Conservare i campioni in etanolo al 70% a temperatura ambiente, al riparo dalla luce diretta ed inviare al laboratorio accompagnato dalla scheda W05.

In alternativa, se le catture larvali sono effettuate con lo scopo di farle sfarfallare, raccogliere l'acqua con le larve in taniche che verranno chiuse con garze ed elastici (per consentire l'entrata di ossigeno). Una volta in laboratorio, mettere il contenuto delle taniche in vaschette coperte da reti a maglie sottili e aspettare che le larve sfarfallino. Una volta sfarfallate, aspirare gli adulti e procedere con la gestione del campione (zanzare adulte).



Figura 10: raccolta larvale mediante l'uso di apposito "pescalarve".

Scelta del sito per il posizionamento delle trappole per esemplari adulti

- ❖ Le trappole devono essere posizionate all'aperto.
- ❖ Non devono essere situate nei pressi di altre fonti di attrazione particolarmente forti, onde evitare fenomeni di competizione o potenziamento. Si dovranno pertanto evitare le prossimità di fonti di luce, calore, anidride carbonica ed altri attrattivi.
- ❖ La scelta deve inoltre andare incontro a ragioni di sicurezza dell'operatore che posiziona la trappola, della trappola stessa e della pubblica sicurezza a meno di essere in possesso di specifici permessi.

Il sito di campionamento deve tener presente di quelle che sono le caratteristiche ecologiche dei siti larvali delle diverse specie di zanzare che si voglia catturare. In tal senso, le attività di sorveglianza entomologiche previste dal Piano Nazionale sono programmate per rilevare precocemente la circolazione dei virus West Nile e Usutu, di cui *Culex pipiens* è il principale vettore. Il sito di campionamento dovrebbe essere individuato in aree con elevata presenza di raccolte di acqua stagnanti (es. zone irrigue, piccoli stagni, pozze con canali secondari in cui sia presente acqua ferma durante il periodo estivo). Inoltre, andrebbero preferite aree caratterizzate dalla presenza di specie migratorie di uccelli o aree in cui precedentemente è stata rilevata la circolazione del West Nile virus in altre specie animali (es. polli o equidi).

Nota: Una volta scelto il sito, occorre che esso venga georeferenziato. Nel tempo può capitare che il sito prescelto non risulti più idoneo e pertanto se ne dovrà scegliere un altro, il più vicino possibile al primo, in modo da poter utilizzare i dati raccolti fino a quel momento.

Predisposizione e posizionamento delle trappole

- Prima di procedere con il posizionamento delle trappole accertarsi che le batterie siano cariche.
- Verificare che sacchetti e contenitori usati per la raccolta degli insetti non presentino aperture e siano integri.
- Verificare che la ventola sia funzionante collegandola brevemente alla batteria.
- Dovuta attenzione deve essere fatta a come si sistema il materiale sul mezzo di trasporto. In particolare la strumentazione (trappole, batterie, contenitore del ghiaccio secco) devono essere disposte in modo che non si muovano troppo durante il tragitto, al fine di scongiurare eventuali danneggiamenti o causandone l'apertura e la perdita del ghiaccio secco. Prestare attenzione anche alla disposizione delle batterie evitando che gli elettrodi non tocchino fra loro o su superfici metalliche.
- Le trappole vanno posizionate in zone protette da condizioni ambientali avverse (es. forte vento, pioggia diretta), in particolare le trappole di tipo CDC e Gravid devono essere collocate preferibilmente in zone ombreggiate e non esposte al sole del tramonto o dell'alba.

Note per la corretta gestione delle trappole tipo CDC addizionate di CO₂.

- Per stabilire la quantità giusta di ghiaccio secco da mettere in ciascuna trappola occorre tener presente anche la temperatura cui sarà esposta e il formato del ghiaccio (pellet o panetti). I pellet, specie se di piccolo diametro, sublimano più in fretta, ma sono di più facile gestione dei panetti, che spesso devono essere spezzati.
- Raccogliere il ghiaccio secco in un sacchetto di carta prima di metterlo nella trappola, per limitare la formazione di condensa sui fori di uscita del gas.
- Quando si manipola il ghiaccio secco occorre indossare guanti ad isolamento termico e occhiali, in modo da evitare ustioni per contatto con una sostanza che ha una temperatura molto al di sotto dello zero.
- Ricordarsi di portare con sé la scheda dati di sicurezza (SDS) per il ghiaccio secco, da richiedere al fornitore del ghiaccio secco.

Ritiro ed invio dei campioni presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale competente per territorio.

I sacchetti di raccolta dovrebbero essere ritirati dopo l'alba (intorno alle 8:00 del mattino), ma non troppo tardi, per evitare che tutte le zanzare muoiano per disidratazione prima del ritiro e che le batterie si scarichino, causando la perdita degli esemplari non più trattieneuti dal flusso d'aria prodotto dalla ventola.

Il ritiro prevede le seguenti operazioni da eseguire necessariamente nell'ordine proposto:

1. verificare che la ventola sia in funzione prima di eseguire qualsiasi operazione; è importante eseguire le successive operazioni di raccolta delle sacche con la ventola funzionante;
2. far convogliare le zanzare verso il fondo della retina di raccolta (trappole CDC e BG-Sentinel) e stringere con una mano la retina nella sua parte priva di zanzare
3. staccare la retina (trappole CDC e BG-Sentinel) o la camera di raccolta della Gravid Trap e chiuderne l'apertura con l'apposita stringa;
4. mettere da parte il sacchetto o contenitore per la raccolta prestando attenzione a non schiacciare le zanzare;
5. staccare il cavo di alimentazione della trappola e la trappola dal suo supporto;
6. recuperare tutto il materiale (retini e strumentazione).

Durante il trasporto, i sacchi e contenitori devono essere trasportati refrigerati (+4°C) evitando che gli insetti possano essere schiacciati.

Gli insetti possono essere uccisi ponendo le retine in congelatore a -20°C per almeno 15-30 minuti. In alternativa, qualora vi sia del ghiaccio secco residuo nel suo contenitore o nel termos della CDC, i campioni possono essere riposti al loro interno: in tal modo gli insetti vengono uccisi e rimangono conservati congelati. Successivamente gli insetti uccisi vanno riposti in provette tipo Falcon, tra due strati di cotone idrofilo non eccessivamente pigiato (Figura 11). La provetta deve contenere per circa $1/4$ del suo volume del gel di silice o altro dissecante per evitare la formazione di muffe. I due strati di cotone dovranno esser posti in maniera tale che i campioni non si muovano durante la spedizione perdendo i caratteri utili all'identificazione, ma senza che i due strati schiaccino i campioni stessi. I campioni devono essere etichettati (tipo di trappola, luogo e data) e accompagnati dalla scheda W05. Va utilizzata una scheda W05 per ogni data di cattura. Per data di cattura si intende la data della mattina in cui si raccolgono gli insetti.



Figura 11: Falcon contenente insetti disposti tra 2 strati di cotone.