



UNIVERSITÀ DI PISA

Facoltà di Medicina Veterinaria

SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN SANITA' ANIMALE, ALLEVAMENTO E PRODUZIONI ZOOTECNICHE

TESI DI SPECIALIZZAZIONE

**“Considerazioni sulla necessità di un approccio integrato tra
medicina veterinaria e medicina umana nelle strategie di
prevenzione della West Nile Disease in Regione Toscana”**

Specializzanda

Dott. Sara Martelli

Relatore

Prof. Maurizio Mazzei

Correlatore

Dott. Andrea Leto

Direttore

Prof. Domenico Cerri

ANNO ACCADEMICO 2011- 2012

INDICE

Parole chiave	1
Introduzione	1
Obiettivi	3
<u>PARTE GENERALE</u>	5
Capitolo 1: La West Nile Disease (WND)	5
1.1. Eziologia	5
1.1.1. Vettori	7
1.1.2. Animali recettivi	8
1.2. Ciclo di trasmissione	10
1.3. Situazione epidemiologica negli animali e nell'uomo	13
1.3.1. Aggiornamento epidemiologico al 15 ottobre 2012.....	14
1.4. Sintomatologia nell'uomo e negli animali	15
1.5. Diagnosi di laboratorio	18
1.5.1. Diagnosi negli animali	18
1.5.2. Diagnosi nell'uomo.....	18
1.6. Misure di prevenzione	19
Capitolo 2: Attuazione dei piani di sorveglianza nazionali per il controllo della West Nile Disease (WND) in Regione Toscana	20
2.1. Piano di sorveglianza regionale di competenza veterinaria	20
2.1.1. Aree di intervento nel territorio regionale	21
2.1.2. Attività previste nelle aree di intervento del territorio regionale ...	24
2.1.3. Attività previste in tutto il territorio regionale	27
2.2. Piano di sorveglianza regionale di competenza medica (umana)	28
2.2.1. Definizione di caso di malattia neuro-invasiva da WNV	28
2.2.2. Sorveglianza epidemiologica dei casi umani di malattia neuro- invasiva da WNV	29
2.2.3. Modalità di segnalazione di casi umani di malattia neuro invasiva da WNV in Regione Toscana	31

2.2.4. Sorveglianza attiva nei confronti del personale esposto a seguito di infezione nei cavalli (area affetta)	33
2.2.5. Modalità di sorveglianza dei casi umani nelle aree affette	33

PARTE SPERIMENTALE35

Capitolo 3: Materiali e Metodi35

3.1. Modalità di prelievo e conferimento campioni di animali ai laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana	35
3.2. Notifica dei casi umani di meningo-encefalite virale acuta	39

Capitolo 4: Risultati43

4.1. Risultati della sorveglianza veterinaria per l'anno 2011 e primo semestre 2012	43
4.2. Risultati della notifica dei casi umani di meningo-encefalite virale acuta dal 1997 al primo semestre 2012	46

Capitolo 5: Considerazioni sulla necessità di un approccio integrato e di riordino per la prevenzione in Regione Toscana della WND e delle altre zoonosi.....48

5.1. Considerazioni relative a aspetti legislativi	48
5.2. Considerazioni inerenti le definizioni contenute negli atti di riferimento..	50
5.3. Considerazioni di tipo epidemiologico	53
5.4. Considerazioni sulla necessità della creazione di un sistema integrato di notifica delle malattie (umano-veterinario) ai fini dello scambio interattivo delle informazioni	56
5.5. Considerazioni sulla necessità di un approccio integrato tra medicina umana e veterinaria per la lotta alle zoonosi in una prospettiva “ <i>One Medicine –One Health</i> ”	58

Bibliografia.....59

Parole chiave: West Nile Disease; One Health; Prevenzione; Zoonosi.

Introduzione

La West Nile Disease (WND) è una zoonosi causata dal West Nile Virus (WNV), un Arbovirus neuropatogeno per uccelli, cavalli e uomo i cui vettori responsabili della trasmissione sono rappresentati principalmente da diverse specie di zanzare, soprattutto del genere *Culex* (40). Essendo la WND una Arbovirosi (Arthropod-Borne-Viruses) essa non possiede caratteristiche di contagiosità in quanto per la trasmissione risulta essenziale la presenza del vettore attivo: fanno eccezione alcune specie di uccelli dove è possibile una trasmissione oro-fecale del WNV (22).

Il nome West Nile deriva dal fatto che per la prima volta il WNV è stato isolato nel 1937 dal sangue di una donna febbricitante in Uganda, in una zona ad ovest del Nilo. Nei primi anni 50' il virus fu isolato in Egitto da uomini, uccelli e zanzare e nel 1957 fu ritenuto responsabile di una grave forma di meningo-encefalite nell'uomo che si manifestò in Israele. La prima epidemia europea nell'uomo si è verificata in Romania nel 1996-97, con più di 500 casi ed un tasso di letalità del 10%.

La malattia nel cavallo è stata segnalata per la prima volta nei primi anni 60' in Francia (Camargue) e in Egitto. In Italia il virus fu identificato per la prima volta nel 1998 in Toscana, nell'area del Padule di Fucecchio situata tra le province di Pistoia, Lucca e Pisa, dove causò malattia in 14 cavalli in 6 dei quali con esito mortale (3). Durante il 1999 un focolaio di WND, con circa 1000 casi nell'uomo (di cui 40 mortali), veniva segnalato nel Sud della Russia (regioni di Astrakhan, Krasnodar, Volgograd). Focolai sono stati segnalati in Azerbaijan, India e Pakistan e la malattia è endemica in diverse zone dell'Africa (Repubblica Centro Africana, Zaire, Egitto, Etiopia, Madagascar, Nigeria, Senegal e Sudan). Nel 1999 WNV è arrivato per la prima volta sulla costa orientale del Nord America; i casi di infezione umana con sintomatologia clinica segnalati nello stato di New York sono stati 62 nel 1999 (con 7 decessi) e 22 nel 2000 (con 2 decessi). Nei primi 9 mesi del 2001 si sono verificati sul territorio statunitense 20 casi umani (con 1 decesso).

A distanza di 10 anni dalla prima notifica di WND in Toscana, nell'agosto 2008 la malattia è ricomparsa in Italia nell'area del delta del Po interessando tre Regioni: Emilia Romagna, Lombardia, Veneto. Come il ceppo del 1998 anche quello del 2008 non ha causato letalità significativa nei volatili, ma, al contrario di quanto avvenne in Toscana, l'infezione è stata in grado di provocare la sintomatologia clinica, oltre che negli equidi (32 casi clinici e 5 morti), anche nell'uomo (8 casi confermati di cui 4 con sintomatologia nervosa). L'infezione si è poi ripresentata nel 2009 nelle stesse aree geografiche del 2008, coinvolgendo però, questa volta, anche alcuni territori della Regione Lazio (Provincia di Latina) (7) e di nuovo i territori della Regione Toscana con 5 focolai confermati di WND in Provincia di Arezzo (4, 31). Di questi 5 focolai 3 hanno coinvolto i Comuni di Castiglion Fiorentino (località S. Antonino Basso) e Manciano, mentre gli altri 2 si sono verificati nel Comune di Cortona (località S. Martino e Pietraia) (4): 10 cavalli sono risultati positivi alle prove sierologiche (31) e, di questi, 3 hanno manifestato sintomatologia clinica nervosa compatibile con la WND (4, 31).

Anche nel 2010 il WNV ha continuato a circolare in Italia e nuovi focolai in ambito veterinario sono stati individuati in Sicilia e Molise (7): nel 2010 sono stati segnalati 3 casi umani nelle zone del delta del Po e nell'anno 2011 14 casi confermati nell'uomo con 4 decessi.

La segnalazione di focolai in nuove aree geografiche è indice che il WNV guadagna continuamente nuovi territori e la ricomparsa di anno in anno di nuovi focolai all'interno di stessi territori regionali potrebbe indicare una possibile endemizzazione del WNV in alcune aree del nostro Paese. In ogni caso, essendo la WND una zoonosi, la sorveglianza della circolazione virale negli animali rappresenta senza dubbio il fattore chiave per il controllo dell'infezione nell'uomo (31).

Con il termine zoonosi si identifica qualsiasi malattia e/o infezione che può essere trasmessa naturalmente, direttamente o indirettamente, tra gli animali e l'uomo (17). Il termine zoonosi è stato utilizzato per la prima volta da Rudolf Virchow nel 1855 durante i suoi studi sulla Trichinellosi: egli fu il primo ad enfatizzare l'importanza di una stretta correlazione tra la medicina umana e quella veterinaria. E' stato di recente stimato (32) che il 75% delle malattie umane cosiddette "emergenti" dell'ultimo ventennio sono il risultato di un

passaggio di specie da parte di patogeni abitualmente di interesse veterinario. Le ragioni di tale passaggio (ivi compresa l'espansione delle aree geografiche tradizionalmente colpite), sono molteplici, ma l'influenza di fattori quali l'aumento della popolazione umana, la globalizzazione degli scambi commerciali e le alterazioni ambientali indotte dall'intervento dell'uomo hanno verosimilmente giocato un ruolo cruciale (24).

Alla luce di quanto sopra esposto, la necessità di un nuovo approccio interdisciplinare alla salute umana e animale sta emergendo con forza e risulta fondamentale ai fini della definizione di nuove strategie di prevenzione e controllo delle malattie in grado di determinare eventi epidemici tra gli esseri umani e gli animali (epidemie ed epizootie). Un approccio olistico teso a salvaguardare l'integrità del nostro ecosistema a beneficio di tutti gli esseri viventi rappresenta l'unica possibilità per cercare di migliorare significativamente la salute umana e animale (20).

Obiettivi

Nonostante, ad oggi, in Regione Toscana vengano attuate, sia in ambito umano che veterinario, misure di controllo della WND attraverso l'attuazione di specifici piani di sorveglianza che verranno descritti in seguito, esistono vari aspetti (sia di tipo normativo, organizzativo, diagnostico nonché informativo) che ancora non risultano chiari e ingenerano difficoltà nell'attuare il controllo della malattia in entrambe i suddetti ambiti. Uno degli aspetti più importanti è sicuramente la mancanza, ad oggi, di un unico piano di sorveglianza WND umano e veterinario in grado di delineare, sulla base della definizione di criteri comuni, una più efficiente e efficace prevenzione della malattia.

Pertanto questo lavoro non intende proporre un nuovo piano di prevenzione della WND in Regione Toscana ma vuole:

1. delineare una serie di considerazioni derivanti dall'attuazione dei piani di sorveglianza in essere della malattia analizzandone punti di forza e punti di debolezza;
2. inquadrare la valutazione delle suddette considerazioni nella visione "*One Medicine- One Health*".

Lo stesso Piano Socio Sanitario della Regione Toscana 2012-2015 **(37)**, il primo piano “integrato”, insiste sul concetto di integrazione tra le varie discipline scientifiche. Infatti, proprio a fronte dell’aumento delle segnalazioni delle malattie trasmesse da vettori riscontrate nel corso degli ultimi anni, quali la WND (ma anche Usutu, Dengue e Chikungunya), il nuovo piano ha espressamente previsto l’adozione di specifiche attività quali:

- la sorveglianza epidemiologica nell'uomo allo scopo di identificare precocemente i casi di malattia (autoctoni e non) e adottare le misure dirette alla riduzione del rischio di trasmissione;
- la sorveglianza entomologica e la lotta agli insetti vettori;
- la sorveglianza sulle popolazioni animali e l'adozione di adeguate misure di controllo veterinario;
- le misure di mitigazione del rischio nelle donazioni di sangue, organi e tessuti.

Le molteplici misure da adottare richiedono la predisposizione di specifiche direttive regionali che raccordino le attività dei Dipartimenti di Prevenzione delle Aziende USL toscane, dei laboratori regionali che eseguono le indagini virologiche e dei reparti di malattie infettive allo scopo di assicurare lo scambio interattivo di informazioni riguardo alla circolazione del virus e alle misure di controllo intraprese **(37)**.

PARTE GENERALE

Capitolo 1: La West Nile Disease (WND)

1.1 Eziologia

Il WNV (Immagine 1) è compreso nel sierogruppo del virus della Encefalite Giapponese. In questo gruppo sono inclusi anche altri virus quali il Murray Valley Encephalitis virus, l'Alfuy virus, il St. Louis encephalitis virus ed il Kunjiin virus, il Cacipacore virus, Koutango virus, Usutu virus e Yaounde virus. Fatta eccezione per l'Usutu, i virus inclusi nel sierogruppo dell'encefalite giapponese non sono ancora presenti in Europa. Il WNV è tra gli Arbovirus maggiormente distribuiti nel mondo essendo presente in tutti i continenti ad eccezione dell'Antartide (23).

Immagine 1: West Nile Virus (WNV)

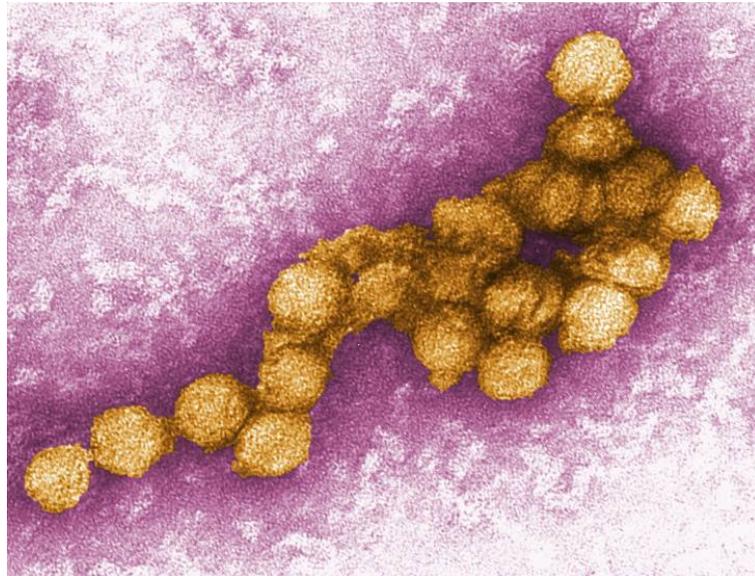


Photo Credit: Cynthia Goldsmith, CDC (transmission electron micrograph (TEM))

Si tratta un virus RNA a singolo filamento, a polarità positiva, di diametro di 45-50 nm e con envelope costituito da un doppio strato lipidico in cui sono inserite le proteine M ed E. Presenta un capsid proteico con simmetria icosaedrica. In base della sequenza nucleotidica della glicoproteina E è stato creato un albero filogenetico che ha consentito di raggruppare i ceppi del virus in due *lineages* principali:

• **lineage I** è suddiviso in almeno 3 Classi :

- Classe A: ceppi provenienti dall'Europa, Africa, Medio Oriente e America;
- Classe B: ceppi provenienti dall'Australia (Kunjin);
- Classe C: ceppi provenienti dall'India.

• **lineage II**: contiene il ceppo prototipo B 956 e altri ceppi isolati nell'Africa Subsahariana e in Madagascar. Virus appartenenti a questo *lineage* sono stati identificati anche in Ungheria.

Recentemente sono stati proposti altri due *lineages* per il virus che presentano notevoli differenze genetiche con i ceppi dei *lineages* I e II fino ad ora descritti:

• **lineage III**: comprende il ceppo virale isolato nella Repubblica Ceca nel 1997, in prossimità del confine con l'Austria, dal *Culex pipiens* chiamato Rabensburg virus;

• **lineage IV** cui appartiene un unico virus isolato nel Caucaso.

Tutti i virus isolati responsabili di gravi epidemie sono ascrivibili al *lineage* I.

I virus appartenenti agli altri *lineages*, infatti, possiedono, per il momento, minore patogenicità. Le analisi filogenetiche effettuate utilizzando una sequenza nucleotidica del gene codificante per la proteina E dei virus isolati in Italia nel 1998 e nel 2008 hanno permesso di rilevare un elevato grado di omologia (98,8%) tra i virus isolati nei due periodi che, a loro volta, sono risultati simili a quelli circolanti da circa un decennio nel bacino del Mediterraneo ed in alcuni paesi africani, tutti ascrivibili al *lineage* I (23).

Tuttavia è importante segnalare che nel 2011, per la prima volta in Italia, è stata dimostrata la circolazione virale del *lineage* II del WNV (38), isolato in Ungheria e in Grecia. Tale virus è stato isolato da un paziente affetto da una forma febbrile nelle Marche e in un caso di malattia neuro-invasiva in un paziente notificato dalla Sardegna: inoltre i dati della sorveglianza entomologica delle zanzare *Culex pipiens* nel Veneto hanno dimostrato l'isolamento di sequenze di ceppi di WNV di *lineage* II in tali insetti, confermando la circolazione nel Nord-Est di tale virus (12).

1.1.1 Vettori

I vettori si infettano con il WNV e trasmettono l'infezione durante il pasto di sangue (13). Una delle peculiarità del WNV è la possibilità di essere trasmesso da differenti generi e specie di zanzare. Ad oggi la lista delle zanzare dalle quali il WNV è stato isolato comprende almeno 75 specie. I principali vettori competenti sono alcune tra le specie di zanzare ornitofile, appartenenti al genere *Culex*, sempre strettamente associate alla trasmissione del WNV durante i focolai. In Europa il virus è stato isolato da 8 specie diverse di zanzare tra le quali i principali vettori sono *Culex pipiens*, *Culex modestus* e *Coquillettidia richiardii*. In particolare *Culex pipiens* (Immagine 2) è generalmente considerato il principale vettore di WNV in Europa e probabilmente la specie coinvolta nell'epidemia del Padule di Fucecchio del 1998. (23).

Le zanzare cessano la loro attività durante i mesi freddi, tuttavia è stata dimostrata la capacità del virus di sopravvivere, durante questo periodo, nelle zanzare infette che superano l'inverno in luoghi chiusi (*overwintering*) (39).

Immagine 2: *Culex pipiens* Linnaeus, 1758



Fonte: www.biolib.cz

I meccanismi attraverso i quali nei climi temperati il WNV supera i periodi invernali (*overwintering*) non sono del tutto chiariti. Un possibile ruolo potrebbe essere svolto dai rettili (alligatori, serpenti e tartarughe) e anfibi che possono essere infettati dal WNV. Si pensa che queste specie, a causa della lunga viremia e del fatto che vanno in letargo, siano anche in grado di svolgere un ruolo nel mantenimento del WNV nell'ambiente. Un ulteriore possibile

meccanismo potrebbe essere spiegato con i periodi di diapausa invernale alla quale vanno incontro i vettori competenti. Nei vettori è inoltre stata dimostrata la trasmissione trans-ovarica del virus (41).

Il virus è stato isolato anche in alcune specie di zecche (*Argas*, *Ornithodoros*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*).

1.1.2 Animali recettivi

La presenza di anticorpi specifici nei confronti del WNV è stata rilevata negli uomini, in un'ampia varietà di specie di uccelli domestici e selvatici, in numerosi mammiferi selvatici e domestici, ed anche negli anfibi e nei rettili. L'ampio spettro di animali interessati testimonia la grande capacità del virus di infettare un elevato numero di specie. Tuttavia i vertebrati che rivestono un ruolo importante nel ciclo vitale del WNV sono soprattutto gli uccelli, gli equidi e l'uomo.

Uccelli

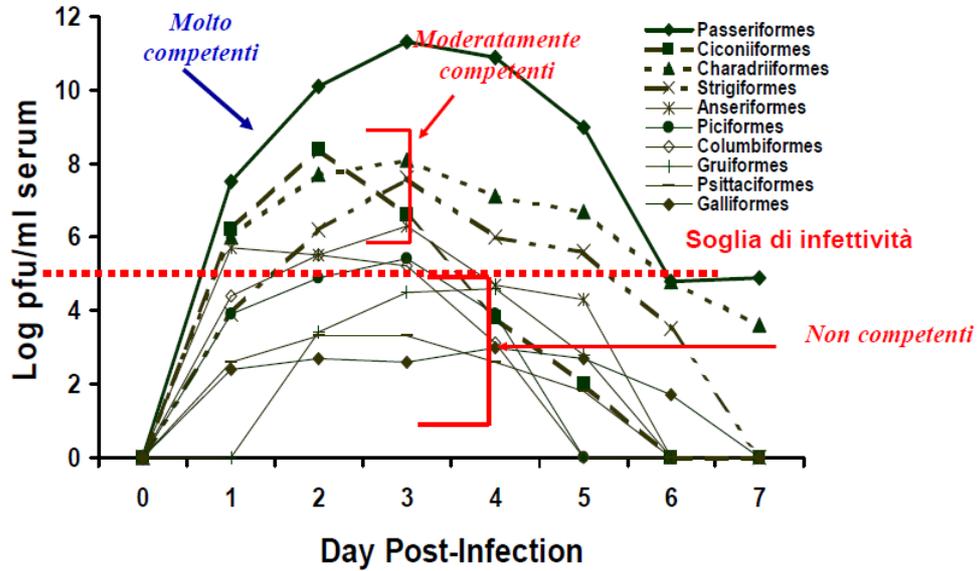
Sono i principali ospiti vertebrati del WNV e numerose sono le specie che possono essere infettate. Alcuni studi sperimentali (22) hanno permesso di accertare che le specie di uccelli appartenenti agli ordini dei Ciconiformi (Aironi, Cicogne e Spatole), dei Passeriformi (passeri, storni e corvidi), dei Caradriiformi (gabbiani, storne, beccacce, chiurli) e Strigiformi (gufo, civetta, assiolo, allocco) sono da considerarsi i principali ospiti reservoir ed amplificatori del virus in ragione degli elevati e persistenti livelli di viremia che si sviluppano in queste specie (specie "molto competenti") (Grafico 1).

Si considerano specie di uccelli "molto competenti" quelle specie che sviluppano una viremia con titolo virale nel sangue > 150 PFU/ml di siero e di durata da 1 a 6 gg post- infezione: il raggiungimento di questa viremia risulta infettante per il vettore.

Non tutte le specie di uccelli possiedono la stessa competenza nell'essere amplificatori del WNV (22): tra gli uccelli domestici, infatti, un certo ruolo può essere svolto dagli Anseriformi (specie "moderatamente competenti"), mentre i Galliformi e i Columbiformi mostrano viremie di breve durata e con titoli virali non elevati per cui sono in grado di mantenere il virus nell'ambiente, ma non

sembrano svolgere un ruolo di amplificazione (specie “scarsamente competenti”) (Grafico 1)(1, 22).

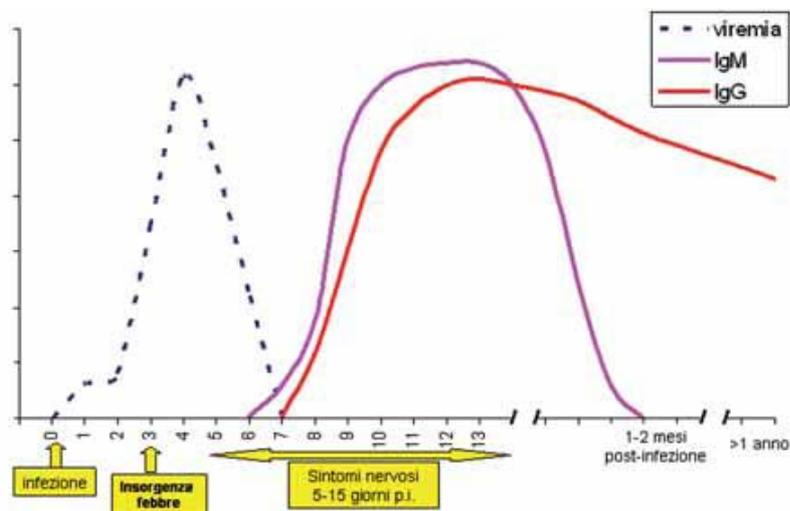
Grafico 1: Andamento della viremia da WNV in 10 ordini di uccelli (22)



Equidi e uomo

Sono le specie dove l'infezione da WNV si manifesta clinicamente e rappresentano gli ospiti terminali (o “a fondo cieco”) della malattia. Infatti i livelli di viremia in tali specie non sono tali da infettare i vettori e contribuire così alla prosecuzione del ciclo di trasmissione. Di seguito si riporta nel Grafico 2 l'andamento della viremia da WNV e del titolo anticorpale nel cavallo (Grafico 2) (6).

Grafico 2. Andamento della viremia da WNV e titolo anticorpale nel cavallo (6)



Altri mammiferi

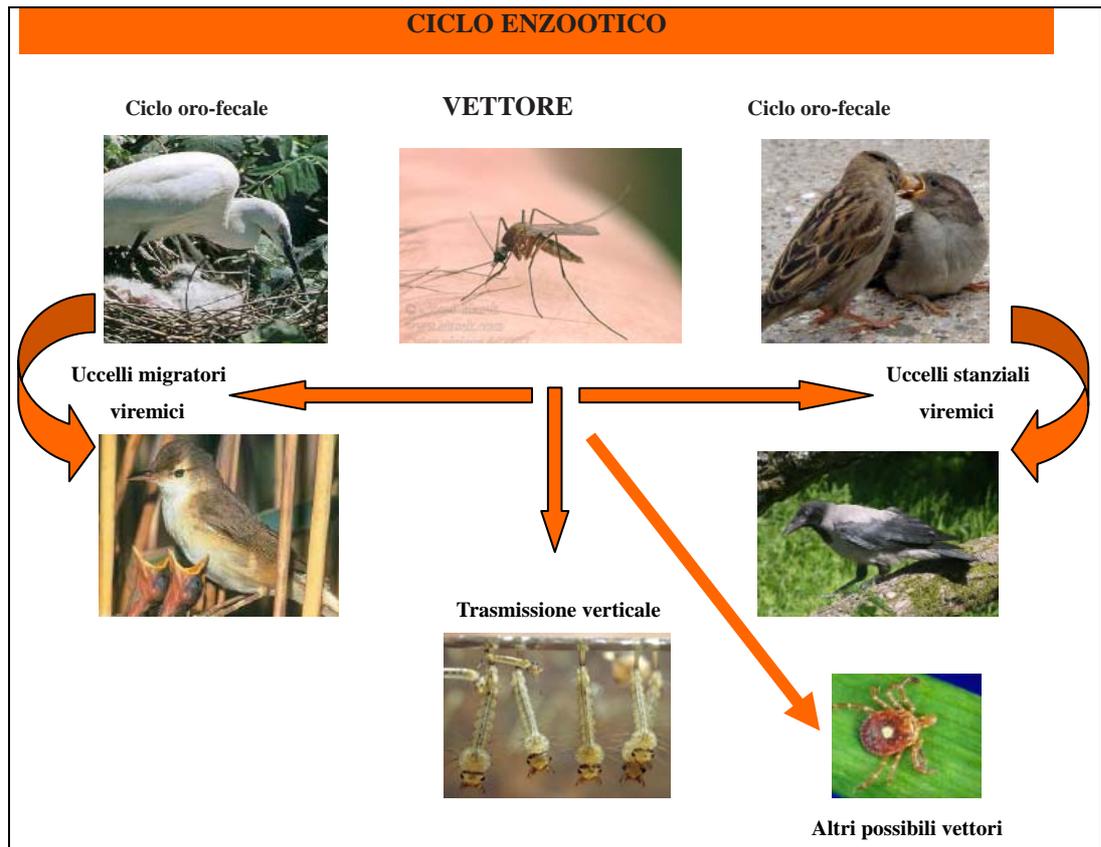
Il WNV infetta molte specie di mammiferi. È stato isolato da pipistrelli, scoiattoli, cani, gatti, conigli, foche e da diverse specie di ruminanti (13). In queste specie l'infezione decorre in genere in modo asintomatico, ma gli animali infetti siero convertono e ciò può essere di ausilio in indagini sieropidemiologiche. Particolarmente interessanti risultano gli studi effettuati sul cane che dimostrano che questa specie animale non è solo suscettibile all'infezione da WNV (2, 5) ma è in grado di siero convertire attivamente nei confronti del virus (21, 25). In particolare gli studi in diversi Paesi hanno rilevato, in questa specie animale, prevalenze che vanno dall'11% al 56,5% (5, 21, 25, 27, 35). È stato dimostrato che nei cani il virus non determina generalmente malattia (2) e che questi, presumibilmente, fungono da ospiti a fondo cieco non sviluppando una viremia in grado di ritrasmettere il virus al vettore (2, 5). Studi in cui sono stati analizzate le abitudini alimentari di zanzare del genere *Culex*, tra i principali vettori implicati nella trasmissione del WNV, hanno inoltre dimostrato che il cane rappresenta una delle specie maggiormente appetibili per queste zanzare (26). Già in precedenza è stata dimostrata l'importanza che il cane può avere come sentinella per il rilevamento precoce di infezioni trasmesse da vettori che possono colpire anche l'uomo (19).

1.2 Ciclo di trasmissione

Nel ciclo di trasmissione del WNV si riconosce un ciclo enzootico (Immagine 3) che si realizza tra vettore-uccelli (ciclo principale di amplificazione del virus) e un ciclo epizootico (Immagine 4) che si realizza tra il vettore-ospiti accidentali cosiddetti "a fondo cieco" (uomo, cavallo, uccelli domestici, cane e altri mammiferi che non svolgono un ruolo nell'amplificazione del WNV).

Una delle ipotesi che spiegherebbe il verificarsi di sporadici focolai di WND in Europa, anche in aree distanti tra di loro, si baserebbe sull'introduzione accidentale e ripetuta nel tempo del virus attraverso gli uccelli migratori sui quali evidentemente la presenza del WNV non interferisce con la capacità di effettuare lunghi voli migratori.

Immagine 3: Ciclo enzootico del WNV



Durante lo svernamento in Africa gli uccelli possono infettarsi e, durante la migrazione primaverile, nei mesi di aprile-maggio, trasportare il virus verso Nord in Europa. La presenza di vettori competenti nelle aree di sosta o di riproduzione può determinare il trasferimento del WNV agli uccelli di specie stanziali. Il passaggio su specie stanziali può, a sua volta, innescare un ciclo continuo ospite-vettore (ciclo enzootico di amplificazione del WNV). Tra queste specie il passero domestico e lo storno potrebbero svolgere il ruolo di “ponte” tra i cicli osservabili in aree rurali e urbane.

Una volta stabilitosi il ciclo enzootico tra la popolazione di uccelli stanziali-selvatici-vettori, l'infezione può accidentalmente trasmettersi attraverso la puntura delle zanzare anche a mammiferi presenti nella stessa area geografica, incluso l'uomo e cavallo dove l'infezione si rende clinicamente manifesta (ciclo epizootico). Tutto questo si realizzerebbe nel giro di 2-3 mesi e l'interessamento, quindi, delle specie di mammiferi avviene tardivamente nel corso della stagione epidemica, e ciò spiega il motivo per cui in Europa i focolai clinici di WND si evidenziano tra luglio e settembre (23).

è stata documentata la trasmissione interumana con trasfusione sangue/emocomponenti (ivi incluse le cellule staminali del sangue periferico e del sangue cordonale) o trapianto di organi e tessuti (12).

1.3 Situazione epidemiologica negli animali e nell'uomo

A partire dal 1998 il virus ricompare in Italia a distanza di 10 anni cioè nel 2008. Nella sottostante Tabella 1 si riporta il numero di casi di WND confermati in cavalli riscontrati nelle varie Regioni d' Italia dal 2008 al 2011. Nel corso dell'epidemia toscana del 1998 non si verificò nessun caso umano, anche se furono rilevate positività anticorpali in persone che condividevano la stessa esposizione dei cavalli colpiti (12).

Tabella 1: Casi confermati di malattia WND in cavalli in Italia dal 2008 al 2011

Regione	Anno 2008	Anno 2009	Anno 2010	Anno 2011	Totale
EMILIA ROMAGNA	104	50	1	0	155
FRIULI VENEZIA GIULIA	0	1	0	30	31
LOMBARDIA	61	16	0	0	77
TOSCANA	0	5*	0	0	5
VENETO	108	61	4	12	185
LAZIO	0	4	0	0	4
MOLISE	0	0	16	0	16
SICILIA	0	0	46	4	50
CALABRIA	0	0	0	3	3
BASILICATA	0	0	0	4	4
SARDEGNA	0	0	0	38	38
TOTALE	273	137	67	91	568

Fonte: Bollettini WND, CESME Centro di Referenza Nazionale

(*): 5 sono i focolai di Arezzo e non i casi (4, 31).

A distanza di 10 anni il virus si ripresenta e nel 2008 in Italia si verificarono per la prima volta anche casi nell'uomo: di seguito si riporta in Tabella 2 il numero di casi umani di forma neuro-invasiva di WND riscontrati in Italia dal 2008 al 2011.

Nel corso del 2011 è stato segnalato in Regione Toscana (Provincia di Pisa) un caso possibile, classificato poi come caso probabile in quanto presentava positività solo per le IgG verso il WNV (confermate mediante siero

neutralizzazione). Non essendo state rilevate IgM (anticorpi che indicano infezioni recenti) l'infezione è stata ritenuta assimilabile ad un'infezione pregressa. In ogni caso, nel 2011, si è assistito a una maggiore distribuzione geografica con un maggior numero di Regioni coinvolte dalla circolazione del WNV rispetto agli anni passati e con la comparsa dei primi casi nell'uomo in Sardegna e in Friuli Venezia Giulia.

Tabella 2: Casi umani di malattia neuro-invasiva da WND in Italia dal 2008 al 2011 (12)

Regione	Anno 2008	Anno 2009	Anno 2010	Anno 2011	Totale §
EMILIA ROMAGNA	3	9 (di cui 3 decessi)	1*	0	12
FRIULI VENEZIA GIULIA	0	0	0	2	2
VENETO	5°	7 (di cui 1 decesso)	3 + 1*	8° (di cui 1 decesso)	23
LOMBARDIA		2			2
SARDEGNA				4 (di cui 3 decessi)	4
TOTALE	8	18	3	14	43

°: questi casi non includono il caso di WND segnalato nel sistema di sorveglianza epidemiologica della Regione Veneto che sorveglia anche le febbri di ndd;

§: non includono i casi importati

*: importato dalla Romania

1.3.1 Aggiornamento epidemiologico al 15 ottobre 2012

In Italia

Animali

Secondo l'ultimo Bollettino epidemiologico WND, al 15 ottobre 2012 sono stati confermati in Italia dal Centro di referenza Nazionale per lo Studio delle Malattie Esotiche (CESME):

- 17 focolai di WND negli equidi (di cui 5 in Sardegna, 5 nel Veneto, 8 in Friuli Venezia Giulia e 1 nel Lazio);
- 9 positività alla PCR per WND su organi di 4 esemplari di Cornacchia grigia (*Corvus corone cornix*) nella Regione Sardegna e 5 esemplari di Gazza (*Pica Pica*) nella Regione Friuli Venezia Giulia;

- 2 positività alla PCR per WND su organi di 2 esemplari di astore (*Accipiter gentilis*) nella Regione Sardegna;
- 13 positività alla PCR per WND in 13 pool di zanzare catturate nella Regione Friuli Venezia Giulia e nella Regione Veneto.

Uomo

Al 15 ottobre 2012 sono state confermati 22 casi di forma neuro-invasiva di WND nell'uomo dei quali 18 casi in Veneto, 2 in Sardegna e 2 nel Friuli Venezia Giulia. È stata rilevata evidenza di circolazione virale in 15 pazienti con febbre da WNV in Veneto e in 5 donatori di sangue, sempre in Veneto.

Europa e Bacino del Mediterraneo

Al 15 ottobre 2012, casi di WND sono stati segnalati in Italia, Grecia, Russia, Israele, Territorio Palestinese occupato, Tunisia, Croazia, Romania, Serbia, Ungheria, Kosovo e Ex Repubblica iugoslava di Macedonia (Bollettino Epidemiologico CESME 2012).

1.4 Sintomatologia nell'uomo e negli animali

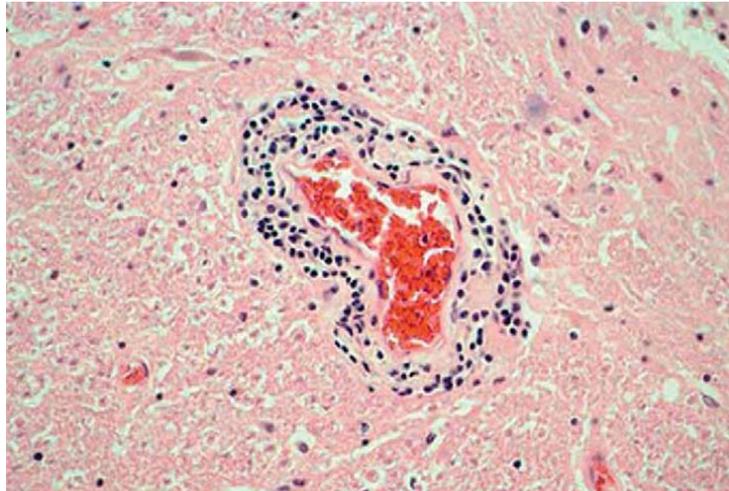
Uomo

Nell'uomo la maggior parte delle infezioni da WND decorre in modo del tutto asintomatico. Circa il 20% dei soggetti infetti sviluppa una malattia sistemica febbrile chiamata comunemente febbre di West Nile (WNF). Questa forma clinica, quando presente, si manifesta dopo un periodo di incubazione di 2-14 giorni (fino a 21 in soggetti immunocompromessi) con febbre, cefalea, dolori muscolari, eruzioni cutanee e linfadenopatia. Generalmente la fase acuta si risolve in una settimana. In meno dell'1% dei casi la malattia si manifesta come una malattia neuro- invasiva (il virus raggiunge il sistema nervoso centrale causando encefalite, e meningo-encefalite o paralisi flaccida) che può avere decorso fatale.

Il rischio di contrarre la forma neuro-invasiva della malattia aumenta all'aumentare dell'età ed è particolarmente elevato nei soggetti di età superiore ai 60 anni di età. Uno studio di sorveglianza effettuato tra il 1998 e il 2008 negli Stati Uniti ha meglio caratterizzato le caratteristiche demografiche dei

casi di WND neuro- invasiva: i casi di encefalite sono stati segnalati in percentuale maggiore in soggetti di età superiore ai 60 anni mentre le paralisi flaccide acute sono state segnalate, in percentuale maggiore, in soggetti di età inferiore ai 60 anni.

Immagine 5: infiltrazione linfocitaria perivascolare da WNV in tessuto cerebrale di uomo



Fonte: www.clevelandclinicmeded.com

La letalità delle forme neuro-invasive della malattia è intorno al 9% nei soggetti anziani e meno dell'1% nei bambini (12).

Cavallo

Nel cavallo la sintomatologia clinica è di tipo neurologico, riferibile ad una sindrome midollare acuta e subacuta, prevalentemente a carico del tratto toraco-lombare.

La malattia si può manifestare con ptosi del labbro inferiore e fenomeni più o meno gravi di atassia locomotoria (perdita di equilibrio, incoordinazione degli arti, debolezza del treno posteriore). La sintomatologia può evolvere in pochi giorni costringendo l'animale al decubito permanente. La temperatura febbrile non è un rilievo costante e l'animale continua ad alimentarsi.

Se il cavallo supera la malattia la remissione della sintomatologia avviene dopo circa una settimana dall'insorgenza, con recupero totale o parziale delle capacità motorie.

La forma neurologica è caratterizzata, da un punto di vista anatomo-patologico, da una poliencefalomielite non suppurativa con lesioni localizzate nelle corna ventrali del tratto toracico e lombare del midollo spinale. Spesso

queste sono accompagnate da fenomeni emorragici diffusi o petecchiali a livello della sostanza grigia del midollo spinale, del tronco encefalico e del talamo.

Immagine 6: uno dei tre cavalli affetti da WNV nel focolaio di Arezzo del 2009



Fonte: Azienda USL 8 di Arezzo (4)

Nei 5 focolai di WND che si sono verificati nel 2009 in Provincia di Arezzo 3 cavalli hanno manifestato una sintomatologia clinica imponente anche se hanno raggiunto successivamente la guarigione (4): nell'Immagine 6 si riportano due foto di uno di questi 3 cavalli affetto da WND (4).

Uccelli

Ad eccezione di un episodio registrato in Israele nel 1998 nel quale mostrarono sintomatologia nervosa e morirono cicogne e oche domestiche, in Europa l'infezione da WNV negli uccelli decorre, di norma, in modo asintomatico (13, 23). Al contrario, mortalità elevate di uccelli (soprattutto nei Corvidi) sono state registrate in Nord America, dove il virus è stato segnalato per la prima volta nel 1999 (22).

Altri mammiferi

In altri mammiferi quali i pipistrelli, scoiattoli, cani, gatti, conigli, foche e in diverse specie di ruminanti (13) l'infezione decorre in genere in modo asintomatico. Tuttavia gli animali infetti siero convertono e questo può essere di ausilio in indagini siero-epidemiologiche.

1.5 Diagnosi di laboratorio

1.5.1. Diagnosi negli animali

Diagnosi diretta

I materiali più adatti all'isolamento virale sono rappresentati dal sistema nervoso centrale (encefalo, midollo allungato, midollo spinale, liquido cefalorachidiano) di cavalli deceduti (o sottoposti ad eutanasia) sintomatici. Per gli uccelli gli organi dai quali è più facile l'isolamento sono cuore, cervello, fegato e rene. Per l'isolamento vengono usate in genere colture cellulari di rene di coniglio (RK-13) o di macaco verde (VERO). In genere è richiesto più di un passaggio prima che il virus mostri effetto citopatico. Sugli stessi materiali possono essere anche eseguiti test di biologia molecolare per evidenziare il genoma virale: le più usate sono la RTnPCR (*reverse-transcription nested polymerase chain reaction*) (32) o la PCR *real time* (36). L'RNA virale può anche essere evidenziato in campione di siero o sangue addizionato con EDTA, ma la breve durata della viremia (soprattutto negli ospiti a fondo cieco) permette ciò solamente nelle prime fasi dell'infezione.

Diagnosi indiretta

I test sierologici di riferimento sono l'ELISA IgM per i sieri equini e il test di riduzione del numero delle placche (*plaque reduction neutralisation test - PRNT*) per i sieri di tutte le specie, il titolo soglia per la positività è 1:10 (32). L'ELISA IgM è particolarmente utile per evidenziare le infezioni recenti, nel cavallo infatti le IgM sono generalmente rilevabili 7-10 giorni post-infezione. fino a 1-2 mesi post-infezione (32).

1.5.2 Diagnosi nell'uomo

La diagnosi nell'uomo viene prevalentemente effettuata con test di laboratorio effettuati sul siero e dove indicato sul liquor (liquido cefalo-rachidiano) per la ricerca di anticorpi di tipo IgM. Questi anticorpi possono persistere per periodi anche molto lunghi nei soggetti malati (fino a 1 anno) pertanto la positività al test può indicare infezioni pregresse.

La siero conversione o l'aumento di 4 volte il titolo anticorpale può essere usata per diagnosticare un'infezione recente. I campioni raccolti entro 8 giorni dall'insorgenza dei sintomi potrebbero risultare negativi pertanto è consigliabile a distanza di tempo ripetere il test di laboratorio prima di escludere la malattia.

La diagnosi può essere effettuata anche con PCR o coltura virale su campioni di siero o liquor entro 7 gg dall'inizio della sintomatologia acuta tenendo conto che la viremia è relativamente di breve durata e di basso titolo.

Le urine invece possono risultare positive alla PCR fino ad alcune settimane dopo l'esordio della malattia e possono costituire un campione idoneo per la diagnosi (12).

1.6 Misure di prevenzione

Le misure di prevenzione, come per tutte le malattie trasmesse da vettori, sono finalizzate a impedire il contatto tra gli animali suscettibili e i vettori infetti. A tal fine sono buone pratiche: il ricovero notturno dei cavalli all'interno di strutture con reti di protezione tali da impedire il passaggio di vettori, l'uso di ventilatori, lo spegnimento delle luci all'interno dei ricoveri mantenendone al contempo altre accese lontane dalle strutture in cui sono tenuti gli animali, tenere gli uccelli fuori dalle scuderie e impedire la loro nidificazione in vicinanza o all'interno delle scuderie stesse. Utile è anche la lotta al vettore attraverso trattamenti periodici da applicarsi sul mantello degli animali con effetto repellente per i vettori. Metodi più efficaci di lotta ai vettori si basano sulla rimozione di possibili luoghi di riproduzione delle zanzare (raccolte di acqua stagnante, stagni, tombini ecc.), la pulizia e lo sfalcio della vegetazione circostante le strutture. Solamente per la specie equina sono stati sviluppati vaccini (spenti o ricombinanti) con una buona efficacia nei confronti della malattia clinica (13).

Capitolo 2: Attuazione dei piani di sorveglianza nazionali per il controllo della West Nile Disease (WND) in Regione Toscana

2.1 Piano di sorveglianza regionale di competenza veterinaria

Il 16 maggio 2002, in seguito all'epidemia di WND verificatesi in Toscana nel 1998, fu pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale n. 13, l'Ordinanza del Ministro della Salute 4 aprile 2002 (**33**) che rese obbligatorio sul territorio nazionale l'esecuzione del primo Piano di sorveglianza per le infezioni da WNV in ambito veterinario. Gli obiettivi di questa Ordinanza erano (Parte A, Allegato I dell'Ordinanza):

- individuare e monitorare alcune delle aree del territorio nazionale che, per le loro caratteristiche ecologiche, possono essere la presenza del virus considerate idonee per la presenza e la propagazione dell'agente eziologico;
- sperimentare un sistema di allerta rapido per rilevare precocemente la presenza del virus nelle aree a rischio al fine di fornire le indicazioni di intervento. Il sistema di allerta rapido è basato sulla sorveglianza entomologica, sull'istituzione di una rete di animali sentinella e sul rafforzamento delle misure di sorveglianza sulle cause di mortalità negli uccelli selvatici.
- controllare l'efficacia dell'intero sistema attraverso il controllo sierologico della popolazione equina presente nelle aree a rischio individuate.

A questa Ordinanza, che restava in vigore fino al 31 dicembre 2003 seguirono:

- l'Ordinanza ministeriale 13 maggio 2004;
- l'Ordinanza 13 luglio 2005;
- Decreto del Ministero della Salute 29 novembre 2007 inerente l'approvazione del piano di sorveglianza nazionale per l'encefalomielite di tipo West Nile (WND) (**14**);
- Ordinanza West Nile Disease 5 novembre 2008 relativa alla notifica alla Commissione Europea e all'OIE- Piano di sorveglianza straordinaria;
- Decreto del Ministero della Salute 15 settembre 2009 relativo alle procedure operative di intervento e flussi informativi nell'ambito del piano

di sorveglianza nazionale per l'encefalomielite di tipo West Nile (West Nile Disease);

- Provvedimento (Dispositivo Dirigenziale prot. 3660-P del 2 marzo 2010) del Ministero della Salute 2 marzo 2010 relativo alla modifica dell'allegato A al decreto 15 settembre 2009, relativo alle procedure operative di intervento e flussi informativi nell'ambito del piano di sorveglianza nazionale per l'encefalomielite di tipo West Nile (West Nile Disease);
- Nota Ministero Salute prot. 0004939-P del 18 marzo 2010 avente per oggetto: West Nile Disease- Dispositivo Dirigenziale prot. 3660-P del 2 marzo 2010- Modifica Allegato A;
- Ordinanza del Ministero della Salute 4 agosto 2011 relativa alle norme sanitarie in materia di encefalomielite equina di tipo West Nile (West Nile disease) e attività di sorveglianza nel territorio (11°11622) (G.U. Serie Generale n. 209 dell' 8 settembre 2011);
- Provvedimento 13 luglio 2012 del Ministero della Salute relativo alla modifica dell'Allegato A (procedure di intervento) di cui all'Ordinanza 4 agosto 2011 (G.U. Serie generale, n. 211 del 10 settembre 2012) **(38)**.

L'attività di sorveglianza in Regione Toscana è stata svolta attraverso l'emanazione di indicazioni operative regionali in applicazione della normativa nazionale. Dal 2010 in Regione Toscana vengono effettuati dei controlli ai sensi del decreto dirigenziale n. 1841 del 20 aprile 2010, del quale, nei paragrafi successivi 2.1.1., 2.1.2 e 2.1.3, se ne descrivono i contenuti. Nel 2011 sono state fornite alle Aziende USL le stesse indicazioni del suddetto decreto con apposita nota regionale **(28)**.

2.1.1. Aree di intervento nel territorio regionale

A seguito dei focolai di WND che si sono verificati nella Provincia di Arezzo nel settembre 2009, la situazione epidemiologica della malattia in Toscana è mutata. Di conseguenza sono state apportate modifiche, da parte del Centro di Riferimento per le Malattie Esotiche (CESME), alle Aree a Circolazione Virale (ACV) individuate nell'Allegato I del Decreto del Ministero della Salute e delle Politiche Sociali del 15 settembre 2009. Ai sensi dell'Allegato I del

Decreto del Ministero della Salute e delle Politiche Sociali del 15 settembre 2009, come modificati dal Dispositivo Dirigenziale prot. 4939 del 18 marzo 2010, in Regione Toscana sono state individuate varie Aree di intervento:

Area a Circolazione Virale (ACV): è l'area che e' stata interessata dalla circolazione del WNV nel corso degli ultimi anni (32) e comprende i Comuni di Castiglion Fiorentino e di Cortona della Provincia di Arezzo (Immagine 7 e 8). Con il provvedimento del Ministero della Salute del 13 luglio 2012 (38) tale definizione è stata modificata perché per ACV si intende il territorio che è stato interessato dalla circolazione del WNV nel corso dei due anni precedenti.

Area di sorveglianza esterna all'ACV (AE): è l'area estesa per un raggio di 20 km intorno ai casi verificatisi nelle zone piu' esterne dell'ACV (34, 38) e comprende i Comuni di Anghiari, Arezzo, Bucine, Capolona, Civitella in Val di Chiana, Foiano della Chiana, Lucignano, Marciano della Chiana, Monte San Savino, Monterchi e Pergine Valdarno (Provincia di Arezzo) e Cetona, Chianciano Terme, Chiusi, Montepulciano, Pienza, Rapolano Terme, Sarteano, Sinalunga, Torrita di Siena e Trequanda (Provincia di Siena) (Immagine 8).

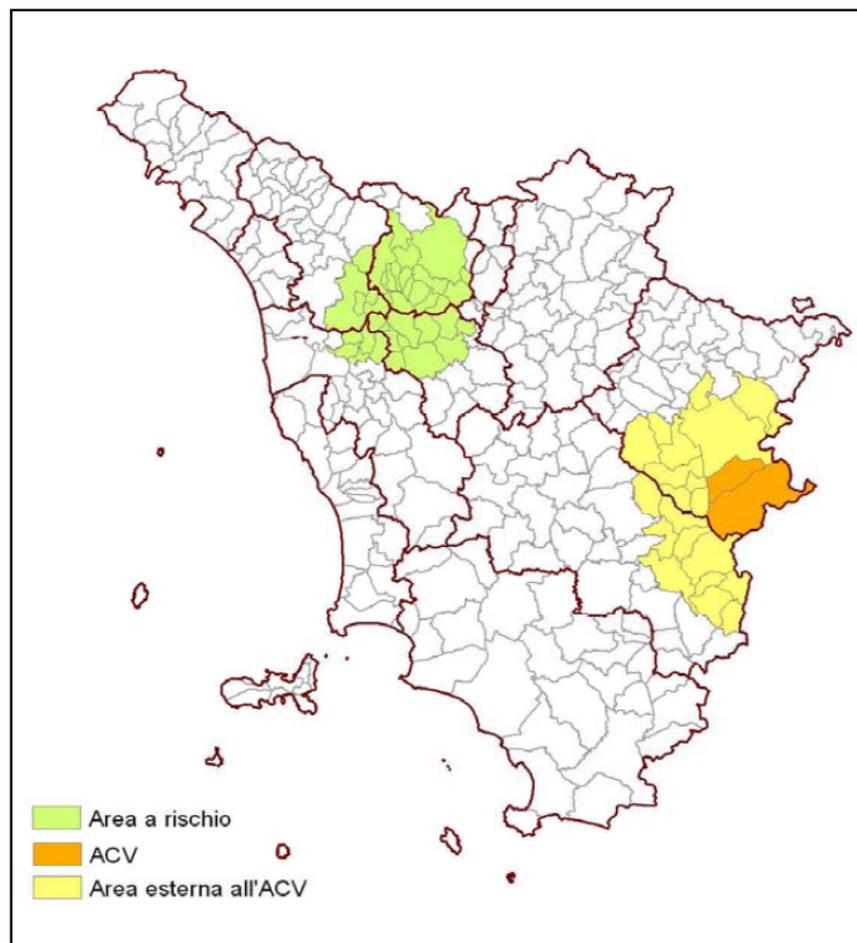
Immagine 7: (Aziende sede di focolaio nei Comuni di Castiglion Fiorentino e Cortona)



Fonte: IZS Lazio e Toscana (31)

Area a rischio (AR): in Regione Toscana è considerata Area a rischio il Padule di Fucecchio (43° 49' N – 10° 47' E), area che coinvolge i Comuni di Altopascio, Capannori, Montecarlo, Porcari, Villa Basilica (territori di competenza della Azienda USL di Lucca), Agliana, Buggiano, Lamporecchio, Larciano, Marliana, Massa e Cozzile, Monsummano Terme, Montecatini Terme, Pescia, Pieve a Nievole, Pistoia, Piteglio, Ponte Buggianese, Quarrata, Serravalle Pistoiese, Uzzano, Chiesina Uzzanese (territori di competenza dell'Azienda USL 3 di Pistoia), Bientina, Buti, Calcinaia, Santa Maria a Monte, Vicopisano (territori di competenza dell'Azienda USL 5 di Pisa), Capraia e Limite, Cerreto Guidi, Empoli, Fucecchio, Vinci, Castelfranco di Sotto, Montopoli in Val d'Arno, San Miniato, Santa Croce sull'Arno (territori di competenza dell'Azienda USL 11 di Empoli) (Immagine 8).

Immagine 8: limiti comunali della Regione Toscana con selezione delle diverse Aree di intervento



Fonte: IZS Lazio e Toscana (31)

2.1.2 Attività previste nelle aree d'intervento del territorio regionale

Area a Circolazione Virale (ACV): le attività previste in tale area sono:

Sorveglianza su uccelli stanziali appartenenti a specie "sinantropiche"

Si definiscono specie "sinantropiche" gli uccelli appartenenti alle seguenti specie (34):

- Cornacchia grigia (*Corvus corone cornix*) (Immagine 9);
- Taccola (*Corvus monedula*) (Immagine 10);
- Gazza (*Pica pica*) (Immagine 11);
- Ghiandaia (*Garrulus glandarius*) (Immagine 12);
- Piccione o colombo (*Columba livia*) (Immagine 13);
- Storni (*Sturnus vulgaris*) (Immagine 14).

Tali specie animali sono sottoposte a sorveglianza attiva nell'ACV allo scopo di individuare precocemente la ripresa della circolazione virale.

Poiché i piani di cattura e/o depopolamento all'interno dell'ACV differiscono in base alla giurisdizione amministrativa interessata (Amministrazione Provinciale, aree protette) è compito della Regione individuare gli Enti/Organizzazioni incaricati dello svolgimento di tale programma e coordinare le attività di prelievo dagli esemplari sottoposti ad eutanasia e l'invio dei campioni al Centro di Referenza Nazionale per le malattie esotiche presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Abruzzo e Molise. Dovranno essere campionati almeno 100 esemplari per unità geografica di riferimento.

Immagine 9: Cornacchia grigia (*Corvus corone cornix*)



Fonte: www.agragri.org

Immagine 10: Taccola (*Corvus monedula*)



Fonte: www.omitocultura.org

Immagine 11 : Gazza (*Pica Pica*)



Fonte: www.agraria.org

Immagine 12: Ghiandaia (*Garrulus glandarius*)



Fonte: <http://www.parks.it>

Immagine 13: Piccione (*Columba livia*)



Fonte: <http://www4.samford.edu>

Immagine 14: Storno (*Sturnus vulgaris*)



Fonte: <http://www.animaliitaliani.com>

Si segnala che il Provvedimento del 13 luglio 2012 del Ministero della Salute descrivendo la sorveglianza sugli uccelli stanziali non fa più riferimento a specie “sinantropiche” ma a specie “bersaglio” individuando in queste ultime solo tre delle sei specie menzionate nella precedente Ordinanza del 4 agosto 2011, ovvero:

- la Cornacchia grigia (*Corvus corone cornix*);
- la Gazza (*Pica pica*);
- la Ghiandaia (*Garrulus glandarius*).

Sorveglianza entomologica

La sorveglianza entomologica ha i seguenti obiettivi:

- identificare le specie di zanzare responsabili della trasmissione virale nel ciclo enzootico;
- identificare le specie di zanzare responsabili della trasmissione virale ai cavalli,
- valutare l'*overwintering* delle zanzare e del virus nelle specie di zanzare: tale valutazione è importante non solo per definire la dinamica stagionale delle popolazioni di culicidi nelle varie aree coinvolte ma può giocare un ruolo

fondamentale per indirizzare la frequenza e la stagionalità dei controlli preventivi sui donatori di sangue e organi nel corso dell'anno (38);

- valutare la precocità del rilievo del virus nelle zanzare.

La sorveglianza entomologica e' effettuata in almeno 2 aziende per ciascuna unità geografica di riferimento.

Le aziende scelte devono avere le seguenti caratteristiche:

- aziende nelle quali nel corso dei precedenti anni sono stati riscontrati casi clinici o sieroconversioni negli animali sentinella o positività nei culicidi,

- aziende situate in prossimità di aree umide e con un'elevata concentrazione di avifauna selvatica.

Presso le aziende prescelte vengono installate:

- trappola di tipo CO2-CDC;
- trappola del tipo gravid trap;
- trappola del tipo BG sentinel.

In questa Area la sorveglianza attiva sugli equidi non si effettua a causa della presenza di numerosi equidi già sierologicamente positivi (punto 3.4 dell'Ordinanza 4 agosto 2011).

Area di sorveglianza esterna all'ACV

Sorveglianza attiva negli equidi: tale attività viene effettuata selezionando 28 cavalli per ciascuna unità geografica di riferimento (il territorio avente una superficie complessiva di circa 1200-1600 km²) sui quali effettuare il controllo sierologico (animali sentinella). I capi sentinella devono essere scelti dai competenti Servizi veterinari delle Aziende USL dando priorità a cavalli già controllati e risultati negativi gli anni precedenti ed a cavalli stanziali ovvero per i quali verosimilmente non si prevedano movimentazioni e che non siano soggetti a vaccinazione specifica, secondo quanto previsto dall'OM 5/11/2008.

Sorveglianza su uccelli stanziali appartenenti a specie "sinantropiche": con le stesse modalità sopra descritte.

Sorveglianza entomologica: con le stesse modalità sopra descritte.

Area a rischio del Padule di Fucecchio

In tale area le attività previste si articolano nelle stesse attività previste per l'area di sorveglianza esterna all'ACV.

2.1.3. Attività previste su tutto il territorio regionale

Sorveglianza passiva sulle cause di mortalità degli uccelli selvatici

L'attività di sorveglianza passiva sulle cause di mortalità degli uccelli selvatici consente di rilevare precocemente l'eventuale presenza del virus della WND e deve essere effettuata sull'intero territorio regionale. La sorveglianza è attuata con la collaborazione tra Servizi Veterinari delle Aziende USL competenti, Corpo Forestale dello Stato, Polizia Provinciale, gli organismi di gestione delle oasi e delle zone umide della Toscana ed altri soggetti pubblici e privati operanti nei territori coinvolti dal Piano. In seguito alla segnalazione di mortalità anomala o di aumento dell'incidenza della mortalità dell'avifauna selvatica, gli animali rinvenuti morti appartenenti alle seguenti famiglie:

- Passeriformi;
- Columbiformi;
- Ardeidi;
- Scolopacidi;
- Charadriidi;
- Anseriformi.

Sorveglianza sindromica (sorveglianza clinica sugli equidi)

L'attività di sorveglianza clinica sugli equidi deve essere effettuata sull'intero territorio regionale. Tutti i casi di sintomatologia nervosa negli equidi devono essere notificati e sottoposti ad indagini approfondite per escludere o confermare la WND, indipendentemente dall'area geografica dove questi si manifestano. In particolare l'articolo 1 comma 2, lettera a) dell'ordinanza 4 agosto 2011 definisce come "equide sospetto di West Nile Disease" un equide che, nel periodo di attività dei vettori, presenta sintomi quali:

- atassia locomotoria o morte improvvisa in una zona a rischio;
- movimenti in circolo;

- incapacità a mantenere la stazione quadrupedale;
- paralisi/paresi agli arti;
- fascicolazioni muscolari;
- deficit propriocettivi.

Tali sintomi possono essere accompagnati da:

- debolezza degli arti posteriori;
- cecità;
- ptosi labbro inferiore o paresi/paralisi dei muscoli labiali o facciali;
- digrignamento dei denti.

Deve essere considerato come sospetto di encefalomyelitis da WNV anche un risultato sierologico positivo in assenza di sintomatologia clinica.

2.2 Piano di sorveglianza regionale di competenza medica (umana)

Le prime indicazioni inerenti la sorveglianza dei casi umani sono state emanate dal Ministero della Salute nel 2010 con l'emanazione della Circolare del Ministero della Salute prot. 0033197-P del 21 luglio 2010 relativa alla sorveglianza della Malattia di West Nile in Italia - 2010 **(9)** alla quale fece seguito la Circolare ministeriale esplicativa prot. 0036924-P del 17 agosto 2010 avente pari oggetto **(10)**. Dal 2010 al 2012 sono state emanate per la sorveglianza umana solo Circolari ministeriali annuali **(9, 11, 12)**. La Circolare del Ministero della Salute prot. 0012922-P del 12 giugno 2012 **(12)** è quella attualmente in essere che in Regione Toscana è stata trasmessa al territorio con apposita nota regionale **(29)**.

2.2.1 Definizione di caso di malattia neuro-invasiva da WNV

Caso possibile: qualunque persona con febbre alta (> o uguale 38,5°C) ed almeno una delle seguenti manifestazioni neurologiche: encefalite, meningite a liquor limpido o poliradicoloneurite (simil Sindrome di Guillain Barrè) o paralisi flaccida acuta **(12)**.

Caso probabile: la sintomatologia sopra descritta e/o uno dei seguenti criteri di laboratorio: presenza di anticorpi IgM e/o IgG anti- WNV nel siero o sangue testato **(12)**.

Caso confermato: la sintomatologia sopra descritta e/o il rispetto di almeno due dei seguenti parametri **(12)**:

- isolamento del WNV nel sangue o nel liquor;
- presenza di anticorpi IgM nel liquor;
- PCR positiva per WNV nel sangue, liquor o urine;
- siero conversione da negativo a positivo o aumento di 4 volte del titolo di anticorpi anti-WNV su due prelievi consecutivi di siero;
- conferma della specificità degli anticorpi mediante test di neutralizzazione.

2.2.2 Sorveglianza epidemiologica dei casi umani di malattia neuro-invasiva da WNV

La sorveglianza sui casi umani di WND consente, insieme alla sorveglianza animale ed entomologica, di evidenziare la circolazione virale in un determinato ambito territoriale e di avere una stima della sua entità attraverso l'individuazione sistematica dei casi clinici emergenti.

La sorveglianza in ambito umano viene effettuata in Regione Toscana:

- sui casi umani importati: tramite la segnalazione dei casi di persone che durante l'arco dell'anno rientrano da paesi esteri;
- sui casi autoctoni: nelle aree a dimostrata circolazione di WND negli animali e aree limitrofe (in base ai criteri sopra riportati) viene svolta dal 15 giugno al 30 novembre di ogni anno. Tali date possono essere modificate sulla base delle evidenze epidemiologiche ottenute fino a quel momento sia in ambito umano che animale **(29)**.

Al fine di ottimizzare le azioni di sanità pubblica da intraprendere, nel caso sia dimostrata la circolazione di WNV negli animali in un'area, vengono identificate, per la sorveglianza di WND nell'uomo, le "aree affette" (con le province come unità geografica) e le "aree di sorveglianza" (con le Regioni come unità geografica).

Area affetta: un'area identificata che soddisfa almeno una delle seguenti situazioni:

1. positività nelle sorveglianze veterinarie ed entomologiche come disposto dal D.M. del 29 novembre 2007 e successive modifiche e integrazioni e dall'Ordinanza Ministeriale del 4 agosto 2011;
2. presenza di casi di encefalomielite di tipo WND negli animali;
3. presenza di casi autoctoni confermati di malattia neuro- invasiva e/o di infezioni recenti umane autoctone.

Una volta identificata l'area affetta è necessario considerare di intraprendere azioni dirette alla riduzione del rischio di trasmissione che includano sia azioni mirate contro il vettore che misure precauzionali finalizzate a prevenire la trasmissione dell'infezione attraverso la trasfusione di sangue ed emocomponenti (incluse le cellule staminali emopoietiche) e con trapianti di organi e tessuti infetti che prevedano l'introduzione di specifici criteri di esclusione dei donatori e di test sulle donazioni di sangue, organi e tessuti.

Area di sorveglianza: si intende un area identificata attorno ad un area affetta in base ad entrambe le informazioni seguenti:

1. Presenza del vettore, competente per il WNV, nel territorio regionale, considerando le peculiarità geografiche (es. zone montane o zone umide) che possono limitare o favorire la presenza del vettore;
2. Presenza di casi umani o veterinari confermati nelle aree provinciali (aree affette) come precisato precedentemente.

A riguardo di quanto precede, si specifica che qualora l'area affetta nella quale è stata accertata la presenza del vettore o di casi umani e veterinari confermati è limitrofa al territorio di altre Regioni, l'area di sorveglianza va estesa anche al territorio di dette altre Regioni a meno che non ci siano barriere orografiche tali da rendere improbabile la diffusione del virus in quella direzione (es. province il cui confine è tracciato da catene montuose).

Le Regioni che vengono incluse tra le aree di sorveglianza devono adottare tutte le misure necessarie alla sorveglianza umana e veterinaria.

2.2.3. Modalità di segnalazione dei casi umani di malattia neuro-invasiva da WNV nella Regione Toscana

Aree di sorveglianza, Aree affette e Aree limitrofe (Regioni confinanti)

La sorveglianza si basa sulla segnalazione di casi possibili, probabili e confermati da parte del medico che deve considerare in diagnosi differenziale anche WND.

In Regione Toscana in linea con quanto concordato con i Direttori di U.O. Malattie infettive è prevista la diagnosi differenziale con il virus Toscana (29). I casi possibili/probabili di WND devono essere segnalati immediatamente o al massimo entro le 12 ore da parte del medico segnalatore (per telefono, per fax o mail secondo le modalità concordate a livello locale) al Dipartimento di Prevenzione dell'Azienda USL competente per territorio utilizzando la scheda allegata alla Circolare ministeriale (Immagine 18).

La Regione Toscana a tal proposito si riferisce solo ai casi probabili (29).

I servizi di Igiene Pubblica delle Aziende USL assicurano l'inserimento dei dati relativi alle segnalazioni dei casi di cui sopra sul sito web dedicato http://www.simi.iss.it/inserimento_dati.htm utilizzando le stesse credenziali di accesso già assegnate per le malattie batteriche invasive.

L'Azienda USL competente provvede a darne comunicazione alla Regione Toscana (D.G. Diritti di Cittadinanza e Coesione Sociale -Settore Servizi di Prevenzione in Sanità Pubblica e Veterinaria) circa l'inserimento dei dati.

Contestualmente alla segnalazione del medico un campione di sangue e/o di liquor devono essere inviati al laboratorio di riferimento regionale con la relativa scheda compilata (Immagine 18).

Si riporta in Tabella 3 l'elenco dei laboratorio presenti in Regione Toscana (29).

Tabella 3: Laboratori regionali di Area Vasta per le analisi relative alle malattie dell'uomo trasmesse da vettori artropodi

U.O.C Virologia Universitaria AUO Pisana	Laboratorio di Microbiologia e Virologia AUO Careggi	Laboratorio U.O.C Microbiologia e Virologia AUO Senese
--	--	--

Fonte: (29)

I risultati di laboratorio di riferimento regionale saranno inviati, con la massima tempestività entro 24-48 ore:

- a) alla struttura sanitaria richiedente;
- b) al Dipartimento di Prevenzione dell'Azienda USL competente per territorio (quest'ultimo invia tempestivamente il risultato alla Regione, al Ministero, al CNESPS e ISS),

Il laboratorio di riferimento regionale invia, per la conferma i campioni sospetti al Laboratorio Nazionale di Riferimento per gli Arbovirus presso l'ISS unitamente alla scheda di segnalazione (allegato 3): i laboratori di riferimento regionali devono inviare almeno 1 ml di siero per le analisi di conferma.

Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per gli Arbovirus esegue i saggi di conferma entro 7 gg dal loro arrivo e invia i risultati entro 12 ore al Laboratorio di riferimento regionale, alla Regione Toscana, al Ministero, al CNESPS e ISS. I Servizi di Igiene Pubblica delle Aziende USL competenti assicurano l'aggiornamento delle informazioni relative alle schede di segnalazione sul sito web dedicato attraverso l'inserimento dei risultati di laboratorio.

Su tutti i casi probabili e confermati va effettuato un follow-up fino a 30 giorni. Inoltre per i casi confermati di WND una relazione conclusiva, comprendente i dati clinico epidemiologici raccolti inclusi i risultati di laboratorio e gli esiti delle eventuali ricerche sul personale esposto, dovrà essere predisposta dall'Azienda USL competente per territorio e inviata alla Regione Toscana e da questa al Ministero della Salute Ufficio 5 ex DGPREV, al CNESPS, ISS (Laboratorio di Riferimento Nazionale per gli Arbovirus).

La Regione Toscana ha inoltre disposto che le direzioni sanitarie assicurino che per ogni rachicentesi effettuata presso il pronto soccorso, una aliquota di liquor, opportunamente conservata, sia messa a disposizione del reparto di malattie infettive e che siano verificate e garantite le attività di laboratorio per l'esecuzione dei test sierologici **(29)**.

2.2.4 Sorveglianza attiva nei confronti del personale esposto a seguito di infezione nei cavalli (area affetta)

L'obiettivo di questa sorveglianza è sensibilizzare le persone che lavorano e vivono in aree in cui la presenza di zanzare infette è documentata, quali ad es. attorno alle scuderie interessate da infezioni nei cavalli ad adottare misure idonee a ridurre il rischio di essere punti e permettere una diagnosi tempestiva di eventuali casi clinici.

2.2.5 Modalità di sorveglianza dei casi umani nelle aree affette

Quando giunge al servizio veterinario segnalazione di sospetto clinico di WND nel cavallo all'atto del primo sopralluogo in cui si preleva il sangue dell'animale o degli animali coinvolti e viene ricostruita la storia dei movimenti recenti dello/degli stesso/i, viene raccolto anche l'elenco dei lavoratori addetti alla scuderia e delle eventuali persone che risiedono stabilmente negli edifici annessi alla stessa. In tema di modalità di attuazione della sorveglianza dei casi umani in aree affette, ai fini dell'indagine epidemiologica, ci si riferisce alle relative modalità organizzative definite a livello regionale (29). I dati della sorveglianza veterinaria sono messi a disposizione per le Regioni sul sistema informativo malattie animali nazionale (SIMAN) (vedi <http://siman.izs.it> link web http://sorveglianza.izs.it/emergenze/west_nile/emergenze.htm).

Nel caso in cui gli accertamenti sugli animali diano luogo ad un primo referto di laboratorio positivo, come sottolineato in precedenza, ai sensi delle modalità organizzative definite a livello regionale, il Dipartimento di Prevenzione contatterà attivamente le persone sopra indicate per informarle ulteriormente circa le misure di precauzione da adottare per ridurre la probabilità di essere punte dalle zanzare e per sensibilizzarle a ricorrere tempestivamente ad un sanitario, riferendo la possibile esposizione a zanzare portatrici del WNV, in caso di insorgenza dei sintomi quali:

- febbre > 38,5°C accompagnata da mialgia, astenia e cefalea;
- linfadenopatia;
- esantema maculo papulare;

- rigidità nucale;
- sintomi neurologici.

La stessa procedura di sorveglianza attiva va attuata anche nei casi di infezione asintomatica autoctona recente nei cavalli di uno stesso allevamento.

In tema di sorveglianza entomologica, ai fini del monitoraggio della circolazione virale nell'uomo, gli insetti provenienti da aree affette con casi umani confermati e risultati positivi per ricerca di WNV presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Abruzzo e Molise sede di Teramo sono messi a disposizione del Dipartimento di Malattie Infettive, parassitarie ed immunomediate dell'ISS da parte del predetto IZS **(29)**.

PARTE SPERIMENTALE

Capitolo 3: Materiali e Metodi

3.1. Modalità di prelievo e conferimento campioni di animali ai laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Sorveglianza attiva negli equidi

Sono state prese in considerazione le attività di campionamento svolte nell'anno 2011 (a partire da aprile e terminate a settembre) e nel corso del primo semestre dell'anno 2012 dai Servizi Veterinari delle Aziende USL toscane. Nel corso di tali periodi i cavalli sono stati sottoposti a prelievo 3 volte: la prima all'inizio del periodo (aprile-maggio), la seconda volta nell'ultima settimana di agosto, ed una terza nell'ultima settimana di settembre.

I prelievi sono stati effettuati sempre sugli stessi cavalli.

I campioni prelevati sono stati inviati all'IZS Lazio e Toscana e da questo inoltrati al CESME per le analisi accompagnati dalla scheda W03 pre-compilata nella parte anagrafica scegliendo "Motivo del prelievo [2]:cavalli sentinella" (Immagine 15).

Sorveglianza su uccelli stanziali appartenenti a specie "sinantropiche":

Le specie di uccelli "sinantropiche", di cui al precedente paragrafo 2.1.2 del presente documento, nel corso dell'anno 2011 e del primo semestre 2012 sono state sottoposte a sorveglianza attiva allo scopo di individuare precocemente la presenza del virus, cui potrebbe seguire l'infezione negli equini e nell'uomo.

I Servizi Veterinari delle Aziende USL competenti sui territori coinvolti hanno provveduto a coordinarsi con i competenti uffici delle Amministrazioni Provinciali per la concertazione delle attività di cattura/abbattimento/conferimento delle carcasse secondo le modalità di seguito descritte.

Immagine 15: Scheda W03- Sorveglianza attiva equidi

WEST NILE DISEASE
PIANO DI SORVEGLIANZA E PROTOCOLLO OPERATIVO
SCHEDA W03
Sorveglianza sierologica degli equini
Scheda accompagnamento campioni

AZIENDA USL _____
COMUNE _____ SIGLA PROVINCIA _____

DATI RELATIVI ALL'ALLEVAMENTO

ALLEVAMENTO DI EQUIDI (parte precompilata)

Cod. Azienda: _____ Specie: _____

Coordinate geografiche: Latitudine: [][]. [][][][][][][] N Longitudine [][]. [][][][][][][][] E

Via/Frazione. _____

Proprietario dell'allevamento. _____

Codice fiscale del proprietario: _____

Motivo del prelievo: [1] presenza di cavalli con sintomi clinici ; [2] cavalli sentinella; [3] controllo a campione su cavalli stanziali; [4] controllo in seguito a sospetta sintomatologia.

N°	Nome	Microchip/passaporto	Sesso M/F	Anno nascita	di Sintomatologia nervosa SI/NO
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					

Data del prelievo _____ Firma _____

Immagine 17: Scheda W05- Sorveglianza entomologica: scheda accompagnamento campioni

WEST NILE DISEASE
PIANO DI SORVEGLIANZA E PROTOCOLLO OPERATIVO
SCHEDA W05
Sorveglianza entomologica
Scheda accompagnamento campioni

NOTA BENE: nel caso in cui la catturasi svolga su due notti, con due distinte operazioni di raccolta, si compila una scheda per ogni operazione raccolta

AZIENDA USL _____
 COMUNE _____ SIGLA PROVINCIA _____

Tipologia di cattura (1)	Esito cattura	N° contenitori
1 CO2-CDC light trap	<input type="checkbox"/> Presenza (2) <input type="checkbox"/> Assenza	
2 Gravid trap	<input type="checkbox"/> Presenza <input type="checkbox"/> Assenza	
3 BG Sentinel	<input type="checkbox"/> Presenza <input type="checkbox"/> Assenza	
4 Cattura larvale	<input type="checkbox"/> Presenza <input type="checkbox"/> Assenza	
5 Aspirazione	<input type="checkbox"/> Presenza <input type="checkbox"/> Assenza	
6 Altro:	<input type="checkbox"/> Presenza <input type="checkbox"/> Assenza	

Motivo del prelievo: cattura da piano cattura in seguito a positività

DATI RELATIVI ALL'AZIENDA

ALLEVAMENTO (parte precompilata nel caso di aziende sentinella)

Cod. Azienda: _____ **Specie allevata:** _____

Coordinate geografiche: Latitudine: |_|.|. |_|_|_|_|_|_|_|_| N Longitudine |_|.|. |_|_|_|_|_|_|_|_| E

Proprietario _____

Codice fiscale _____

Detentore: _____

Codice fiscale _____

DATI RELATIVI AL GRUPPO DEI VOLATILI SENTINELLA

GRUPPO VOLATILI SENTINELLA (parte precompilata nel caso di aziende sentinella)

COD. GRUPPO SENTINELLA: _____ **CODICE SOTTOGRUPPO :** [1] [2]

Specie volatile sentinella: _____ **Località:** _____

Coordinate geografiche: Latitudine: |_|.|. |_|_|_|_|_|_|_|_| N Longitudine |_|.|. |_|_|_|_|_|_|_|_| E

(1): barrare un'unica tipologia di cattura per scheda (2): si intende genericamente la presenza o assenza di insetti.

Sorveglianza entomologica:

La sorveglianza entomologica e' stata effettuata nel 2011 e nel primo semestre 2012 in aziende scelte in base alle seguenti caratteristiche:

- aziende nelle quali nel corso dei precedenti anni sono stati riscontrati casi clinici o sier conversionsi negli animali sentinella o positività nei culicidi,
- aziende situate in prossimità di aree umide e con un'elevata concentrazione di avifauna selvatica.

Presso le aziende prescelte sono state installate:

- trappole di tipo CO2-CDC,
- trappole del tipo gravid trap,
- trappole del tipo BG sentinel.

Le catture sono state effettuate con cadenza mensile durante tutto l'anno. La gravid trap e la BG sentinel sono state attive per due giorni e due notti consecutive e le catture ritirate al termine delle due giornate. La CO2-CDC sono state attive per due notti (dal crepuscolo alla mattina successiva) di seguito e le catture ritirate al termine di ogni notte di cattura. Contestualmente alle catture eseguite con le trappole, sono state effettuate in ogni azienda catture di zanzare adulte tramite aspirazione nei ricoveri degli animali. Tutti i campioni sono stati inviati all'ISLTL territorialmente competente accompagnati dalla scheda W05 pre-compilata nella parte anagrafica (Immagine 17) e da questi al CESME.

3.2 Notifica dei casi umani di meningo- encefalite virale acuta

In Sanità Pubblica la sorveglianza si basa sulla raccolta sistematica, l'aggregazione, l'analisi l'interpretazione e la diffusione dei dati. Obiettivi prioritari della sorveglianza sono:

- orientare gli interventi preventivi di sanità pubblica e verificare l'efficacia dei programmi di attività già in fase di attuazione (es. nel corso di una campagna di vaccinazione);
- verificare l'incidenza di una determinata patologia e la sua distribuzione geografica e temporale anche al fine di verificare l'eventuale esposizione ad un'unica fonte di contagio;

- analizzare le caratteristiche individuali per specifiche patologie (es. età, sesso) con lo scopo di orientare nella maniera più opportuna adeguati interventi preventivi e di educazione sanitaria.

In questo contesto, la notifica delle malattie infettive, regolamentata in Italia fin dal 1934 (art. 254 TULLSS), rappresenta la fonte informativa più rilevante per monitorare l'incidenza dei casi. L'ultima importante revisione del sistema di notifica è stata attuata con il DM 15/12/90 "Sistema informativo delle malattie infettive" (16) attualmente in vigore che descrive le modalità di notifica di alcune malattie infettive e diffuse dell'uomo. Secondo quanto disposto nel suddetto Decreto, il medico che, nell'esercizio della sua professione, venga a conoscenza di un caso di qualunque malattia infettiva e diffusiva o sospetta di esserlo, pericolosa per la salute pubblica, deve comunque notificarla all'autorità sanitaria competente. L'attuale sistema di sorveglianza delle malattie infettive prevede una suddivisione delle malattie infettive in cinque classi (16), caratterizzate da tempi e modalità di notifica diversi e proporzionali alla rilevanza della classe di appartenenza.

In Tabella 4 vengono riportate le informazioni di dettaglio.

Tabella 4: Classificazione e tipi di segnalazione dei casi umani delle malattie infettive (16)

CLASSE	TEMPI DI SEGNALAZIONE DEL MEDICO CHE NOTIFICA ALL'AZIENDA USL	MALATTIE	
I	Malattie soggette a segnalazione immediata o perchè rientrano nel regolamento sanitario internazionale o perchè rivestono particolare interesse	entro 12 ore dal sospetto di un caso	Colera, febbre gialla, febbre ricorrente epidemica, febbri emorragiche virali (febbre di Lassa, marburg, Ebola), peste, poliomielite, tifo esantematico, botulismo, difterite, influenza con isolamento virale, rabbia, tetano, trichinosi.
II	Malattie rilevanti perchè ad elevata frequenza e/o passibili di intervento di controllo	entro 48 ore dall'osservazione del caso	blenorragia, brucellosi, diaree infettive non da salmonelle, epatite virale A, epatite virale B, epatite virale NANB, epatite virale non specificata, febbre tifoide, legionellosi, leishmaniosi cutanea, leishmaniosi viscerale, leptospirosi, listeriosi, meningite e encefalite virale , meningite meningococcica, morbillo, parotite, pertosse, rickettsiosi diversa da tifo esantematico, rosolia, salmonellosi non tifoidee, scarlattina, sifilide, tularemia, varicella.
III	Malattie per le quali sono richieste particolari documentazioni	entro 48 ore	AIDS, micobatteriosi non tubercolare, lebbra, tubercolosi, malaria.
IV	Malattie per le quali alla segnalazione del medico deve seguire la segnalazione dell'Az. USL solo quando si verificano focolai epidemici	entro 24 ore	Dermatofitosi (tigna), pediculosi, scabbia, infezioni, tossinfezioni e infestazioni di origine alimentare
V	Malattie infettive e diffuse non comprese nelle classi precedenti nonché zoonosi di cui al D.P.R. 320/54.	entro 24 ore (ove tali malattie assumano le caratteristiche di focolaio epidemico)	

(Fonte: www.regione.toscana.it)

La differente rilevanza delle malattie infettive è stata attribuita sulla base:

– all'elevata gravità (in termini di letalità, costo sociale ed economico);

- all'estrema rarità attesa;
- all'interesse sul piano nazionale ed internazionale;
- alle possibilità di intervento con azioni di profilassi e/o terapia, e/o educazione sanitaria.

La notifica, effettuata dal medico per ogni caso di malattia accertata o sospetta, avviene tramite un modulo unico da trasmettere all'Azienda USL di competenza, che, a sua volta, provvede a compilare un'apposita scheda (mod. 15) a seconda della classe di appartenenza della malattia. Ad eccezione della prima classe, la cui notifica (telefonica o per telegramma) deve avvenire entro 12 ore dal sospetto di malattia, l'invio delle notifiche da parte dell'Azienda USL ha cadenza mensile. La Regione a sua volta invia all'Istituto Superiore di Sanità (ISS), al Ministero della Sanità e all'ISTAT i modelli individuali ed i riepiloghi mensili suddivisi per provincia, fasce di età e sesso. Nel 1994 in Toscana (Regione pilota) è iniziata l'informatizzazione del sistema di sorveglianza (SIMI) mediante un apposito programma messo a punto dall' ISS. Obiettivo primario del progetto è stato quello di ottenere e divulgare in tempi utili dati di qualità controllata, aggregabili e confrontabili rappresentativi dell'andamento sul territorio delle malattie sotto osservazione, aumentando così l'efficacia e l'efficienza del sistema di sorveglianza. Inoltre, per ovviare alla possibilità di manipolazioni successive che comportino difformità tra i dati a livello regionale e nazionale, il programma di sorveglianza informatizzato prevede un tempo massimo di cinque mesi per accettare nuovi casi o apportare eventuali correzioni alle notifiche esistenti. Dal SIMI restano per ora escluse le notifiche di tetano, malaria e lebbra per le quali sono previste documentazioni aggiuntive quali indagini epidemiologiche dettagliate (www.regione.toscana.it). Come si può evidenziare dalla Tabella 5 le meningo- encefaliti virali rientrano nelle malattie infettive di Classe II la cui notifica da parte del medico è obbligatoria quando sussistono determinati criteri specificati che, limitatamente alle meningo- encefaliti virali sono: presenza di segni e sintomi indicativi nell'uomo di malattia acuta (criterio clinico) associato a un esame liquorale compatibile (istruzione per la compilazione del Mod. 15-Classse II del D.M. 15/12/1990). Quando sussistono tali criteri il medico provvede a inviare all'Azienda USL, entro 48 ore dall'osservazione del caso, la scheda di notifica di malattia infettiva- Classe II che è riferita genericamente alle meningo-

encefaliti acute virali. A sua volta l'azienda USL oltre ai modelli individuali provvede a inviare mensilmente alla Regione una serie di informazioni di cui al modello 16. Per la segnalazione specifica di casi umani di WND si deve far riferimento invece a quanto descritto al paragrafo 2.2.3 del presente documento: l'unica modulistica specifica per la WND in ambito di medicina umana è l'allegato 3 alla Circolare ministeriale prot. 0012922-P del 12 giugno 2012 (Immagine 18).

Immagine 18: Scheda di segnalazione di caso umano di WND

Scheda di segnalazione di caso umano di West Nile Virus		
1. Regione _____	2. Azienda Sanitaria/Ospedale _____	
3. Servizio / Reparto _____		
4. Dati relativi al paziente:		
Cognome: _____	Nome: _____	
Sesso: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	Codice Fiscale _____	
Luogo di nascita: _____	Data di nascita _____ (gg/mm/aaaa)	
Domicilio abituale: _____		
Via/piazza e numero civico Comune Provincia _____		
5. Permanenza all'estero nelle tre settimane precedenti l'inizio della sintomatologia:		
a. _____		
b. _____		
Nazione	data inizio	data fine
6. Anamnesi positiva per trasfusione di sangue o emocomponenti nei 28 giorni precedenti la diagnosi/segnalazione?	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> Non noto	
6bis. Anamnesi positiva per donazione di sangue o emocomponenti nei 28 giorni precedenti la diagnosi/segnalazione?	<input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> Non noto	
7. Vaccinazione nei confronti di altri flavirus:		
Tick borne encephalitis: <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> Non noto; Febbre Gialla <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> Non noto; Encefalite Giapponese <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> Non noto;		
8. Informazioni cliniche:		
Febbre > 38.5°C <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> Non noto; Se sì, data inizio febbre _____ (gg/mm/aaaa)		
<i>Manifestazione clinica:</i>		
<input type="checkbox"/> Encefalite <input type="checkbox"/> Meningite <input type="checkbox"/> Poliradiculoneurite (Sindrome di Guillain Barrè atipica) <input type="checkbox"/> Paralisi flaccida acuta		
<input type="checkbox"/> Altro (specificare) _____		
9. Campione inviato al Laboratorio di riferimento Regionale: <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> Non noto		
10. Campione inviato al Laboratorio di riferimento Nazionale: <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> Non noto		
10. Campione inviato al Laboratorio di riferimento Nazionale: <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> Non noto		
11. Esami di Laboratorio effettuati:		
<input type="checkbox"/> Liquor data prelievo: _____ (gg/mm/aaaa)		
<i>Metodica</i> [è possibile indicare più di una risposta]:		
<input type="checkbox"/> IgM-ELISA/IF; <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg	<input type="checkbox"/> IgG- ELISA/IF; <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg	
<input type="checkbox"/> Isolamento virale; <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg		
<input type="checkbox"/> PCR <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg		
<input type="checkbox"/> Sangue data prelievo: _____ (gg/mm/aaaa)		
<i>Metodica</i> [è possibile indicare più di una risposta]:		
<input type="checkbox"/> IgM-ELISA/IF; <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg	<input type="checkbox"/> Isolamento virale <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg	
<input type="checkbox"/> IgG- ELISA/IF; <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg	<input type="checkbox"/> Test di neutralizzazione <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg	
<input type="checkbox"/> PCR <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg		
<input type="checkbox"/> Siero data prelievo: _____ (gg/mm/aaaa)		
<i>Metodica</i> [è possibile indicare più di una risposta]:		
<input type="checkbox"/> IgM-ELISA/IF; <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg	<input type="checkbox"/> Isolamento virale <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg	
<input type="checkbox"/> IgG- ELISA/IF; <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg	<input type="checkbox"/> Test di neutralizzazione <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg	
<input type="checkbox"/> PCR <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg		
<input type="checkbox"/> [Urine data prelievo: _____ (gg/mm/aaaa)		
<i>Metodica</i> [è possibile indicare più di una risposta]:		
<input type="checkbox"/> Isolamento virale; <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg		
<input type="checkbox"/> PCR <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> neg		
<input type="checkbox"/> Presenza di sieroconversione o aumento di 4 volte del titolo anticorpale su due prelievi consecutivi		
data 1° prelievo: _____ (gg/mm/aaaa); data 2° prelievo: _____ (gg/mm/aaaa)		
Note: _____		
12. Esito del caso al momento della segnalazione:		
<input type="checkbox"/> Guarito <input type="checkbox"/> Quadro clinico in via di miglioramento <input type="checkbox"/> Quadro clinico grave <input type="checkbox"/> Deceduto <input type="checkbox"/> Non noto		
13. Esito del caso al follow-up [30 giorni]:		
<input type="checkbox"/> Guarito <input type="checkbox"/> Quadro clinico in via di miglioramento <input type="checkbox"/> Quadro clinico grave <input type="checkbox"/> Deceduto <input type="checkbox"/> Non noto		
Data segnalazione _____ Medico compilatore _____		
telefono _____ telefax _____ e-mail _____		

Capitolo 4: Risultati

4.1 Risultati della sorveglianza veterinaria per l'anno 2011 e primo semestre 2012

Tramite accesso e consultazione del SIMAN (Sistema Informativo Malattie Animali Nazionale) da parte della Regione Toscana (accesso regionale), sono stati estrapolati i risultati delle attività di campionamento effettuate dai Servizi veterinari delle Aziende USL nell'anno 2011 e nel primo semestre 2012 inerenti: la sorveglianza sugli equidi, sugli uccelli sinantropici e sulla sorveglianza entomologica.

I risultati delle analisi effettuate sono riportati nelle Tabelle 5, 6 e 7.

Tabella 5: Risultati sorveglianza equidi in Regione Toscana

ANNO di notifica 2011 e primo semestre 2012						
n. campioni prelevati	Specie animale	Matrice prelevata	Tecnica analitica utilizzata	n. campioni analizzati	n. positivi	n. negati
9132	CAVALLO	SIERO	ELISA (ricerca anticorpi IgG)	4837	617	4220
			ELISA (ricerca anticorpi IgM)	187	0	187
			Sieroneutralizzazione (S.N.) (ricerca anticorpi IgG)	4024	73	3951
			Test di riduzione del numero delle placche	65	4	61
		SANGUE	PCR	11	0	11
176	ASINO	SIERO	Sieroneutralizzazione (S.N.) (ricerca anticorpi IgG)	176	4	172
TOTALE	-	-	-	9300	698	8602

Fonte: Regione Toscana (estratto dal SIMAN – consultabile da www.vetinfo.sanita.it)

Nel 2011 e nel primo semestre 2012 non sono stati notificati focolai di WND in tutto il territorio regionale. Il Provvedimento 13 luglio 2012 del Ministero della Salute ha recentemente cambiato la definizione di ACV che era riportata nella precedente Ordinanza del 4 agosto 2011. Secondo la nuova definizione, infatti, per ACV si deve intendere l'area che è stata interessata dalla circolazione del WNV nel corso dei due anni precedenti.

Considerato che anche nel 2010 in Toscana non sono stati segnalati focolai di WND (31) i risultati contenuti nel presente paragrafo, relativi all'anno 2011 e

primo semestre 2012, dimostrano che l'ACV confinata nella Provincia di Arezzo non è più da considerarsi come tale.

Pertanto, per quanto sopra esposto, possiamo affermare che per il 2013, salvo individuazione di nuovi focolai, in Regione Toscana non ci sono più Aree di ACV, ma solo Aree di sorveglianza esterna (AE) e l'Area a rischio (AR) del Padule di Fucecchio (Immagine 19).

Questo risultato da evidenza che i Servizi Veterinari delle Aziende USL e i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Lazio e Toscana e del CESME hanno collaborato attivamente per lo svolgimento delle attività del Piano WND previste dalla normativa vigente; tuttavia, il fatto di non avere Aree di ACV in Toscana non deve far allentare l'attenzione nei confronti del WNV. Anzi si rende ancor più necessaria, ai fini del mantenimento dell'assenza di Aree di ACV, rafforzare la collaborazione tecnico- scientifica tra tutti i servizi competenti interessati.

Tabella 6: Risultati della sorveglianza sugli uccelli sinantropi nella Regione Toscana

ANNO di notifica 2011 e primo semestre 2012							
n. campioni prelevati	Specie animale	Matrice prelevata	Tecnica analitica utilizzata	n. campioni analizzati	n. positivi	n. negativi	
650	CORNACCHIA GRIGIA (<i>Corvus corone cornix</i>)	Organi interni	PCR Real Time (Lineage 1 e 2)	646	0	646	
		Tamponi cloacali		4	0	4	
39	CORVO (<i>Corvus corax</i>)	Organi interni		39	0	39	
2	GHIANDAIA (<i>Garrulus glandarius</i>)	Organi interni		2	0	2	
1	TACCOLA (<i>Corvus monedula</i>)	Organi interni		1	0	1	
1240	GAZZA (<i>Pica pica</i>)	Organi interni		1147	0	1147	
		Tamponi cloacali		81	0	81	
		Cervello		12	0	12	
177	PICCIONE (<i>Columba livia</i>)	Organi interni		177	0	177	
1170	STORNO (<i>Sturnus vulgaris</i>)	Organi interni		1170	0	1170	
2	AIRONE CENERINO (<i>Ardea cinerea</i>)	Organi interni		1	0	1	
		Cervello		1	0		
TOTALE 3281	-	-		-	3281	0	3281

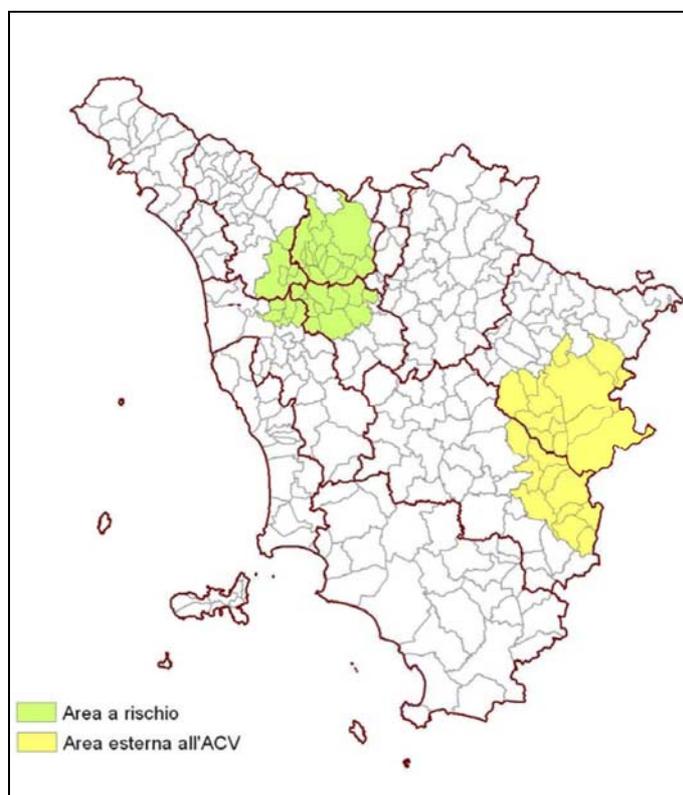
Fonte: Regione Toscana (estratto dal SIMAN – consultabile da www.vetinfo.sanita.it)

Tabella 7: Risultati della sorveglianza entomologica nella Regione Toscana

ANNO di notifica 2011 e primo semestre 2012							
n. campioni prelevati	Specie insetto	Matrice prelevata	Tecnica analitica utilizzata	n. campioni analizzati	n. positivi	n. negativi	
21	<i>Aedes Albopictus</i>	Insetto	PCR Real Time (Lineage 1 e 2)	21	0	21	
1	<i>Aedes spp.</i>		PCR Real Time (Lineage 1 e 2)	1	0	1	
4	<i>Anopheles maculipennis</i>		PCR	1	0	1	
			PCR Real Time (Lineage 1 e 2)	3	0	3	
49	<i>Culex pipiens</i>		PCR	27	0	27	
			PCR Real Time (Lineage 1 e 2)	22	0	22	
5	<i>Culex spp.</i>		PCR Real Time (Lineage 1 e 2)	5	0	5	
1	<i>Culex theileri</i>		PCR	1	0	1	
4	<i>Culiseta annullata</i>		PCR	4	0	4	
1	<i>Culiseta longiareolata</i>		PCR Real Time (Lineage 1 e 2)	1	0	1	
4	<i>Ochlerotatus caspius</i>		PCR	2	0	2	
			PCR Real Time (Lineage 1 e 2)	2	0	2	
1	<i>Ochlerotatus communis</i>		PCR Real Time (Lineage 1 e 2)	1	0	1	
TOTALE 91	-		-	-	91	0	91

Fonte: Regione Toscana (estratto dal SIMAN – consultabile da www.vetinfo.sanita.it)

Immagine 19: Nuova delimitazione delle Aree di intervento in Toscana (Assenza di Area ACV)



Fonte: modificato da IZSLT (31)

4.2 Risultati della notifica dei casi umani di meningo-encefalite virale acuta dal 1997 al primo semestre 2012

Per quanto riguarda i dati inerenti le segnalazioni dei casi umani di meningo-encefalite virale sono stati raccolti, tramite consultazione del sito internet della Regione Toscana, i dati relativi ai suddetti casi dal 1997 al 2010.

I dati del 2011 e primo semestre 2012, non essendo stati ancora inseriti sul sito della Regione, sono stati reperiti direttamente a livello regionale presso il Settore Servizi di Prevenzione in Sanità Pubblica e Veterinaria.

Di seguito vengono riportati nelle Tabelle 8 e 9 i dati relativi ai casi umani di meningo-encefalite virale acuta notificati in Toscana dal 1997 al primo semestre 2012, mentre nelle Tabelle 10 e 11 si riportano gli stessi dati suddivisi per Azienda USL di notifica.

Nel Grafico 3 è riportato il numero dei casi umani totali per Azienda USL notificati in Toscana dal 1997 al primo semestre del 2012.

Tabella 8: Casi umani di meningo-encefalite virale acuta notificate dal 1997 al 2004 in Regione Toscana

Malattia	Anno di notifica								Totale
	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	
MENINGO-ENCEFALITE VIRALE ACUTA	112	143	183	159	190	137	197	131	1252

Fonte: Regione Toscana (flusso dati sulla Sorveglianza delle malattie infettive ai sensi del D.M. 15/12/90).

Tabella 9: Casi umani di meningo-encefaliti virali acute notificate dal 2005 al primo semestre 2012 in Regione Toscana

Malattia	Anno di notifica								Totale
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012*	
MENINGO-ENCEFALITE VIRALIE ACUTA	216	212	194	159	141	113	137	48	1220

Fonte: Regione Toscana (flusso dati sulla Sorveglianza delle malattie infettive ai sensi del D.M. 15/12/90).

(*): tali i dati non sono ancora considerati definitivi in quanto per la loro validazione devono trascorrere 5 mesi dalla notifica.

Tabella 10: Casi umani di meningo-encefaliti virali acute notificate dal 1997 al 2004 in Regione Toscana

Zona e Azienda USL di notifica	Anno di notifica di MENINGO-ENCEFALITE VIRALE ACUTA								TOTALE USL
	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	
Az. USL 1 Massa Carrara	2	2	2	4	1	0	0	0	11
Az. USL 2 Lucca	5	10	3	1	3	8	6	2	38
Az. USL 3- Pistoia	2	0	3	3	1	2	9	9	29
Az. USL 4 - Prato	12	26	24	24	44	19	34	27	210
Az. USL 5-Pisa	14	5	10	3	3	3	9	2	49
Az. USL 6-Livorno	5	4	9	9	11	6	1	7	52
Az. USL 7-Siena	27	35	30	35	38	22	30	18	235
Az. USL 8-Arezzo	16	8	33	26	24	9	22	17	155
Az. USL 9 Grosseto	10	2	0	0	3	8	5	6	34
Az. USL 10 Firenze	18	51	65	51	60	59	77	42	423
Az. USL 11 Empoli	1	0	1	1	2	0	1	0	6
Az. USL 12 Viareggio	0	0	3	2	0	1	3	1	10
TOTALE REGIONE	112	143	183	159	190	137	197	131	1252

Fonte: Regione Toscana (flusso dati sulla Sorveglianza delle malattie infettive ai sensi del D.M. 15/12/90).

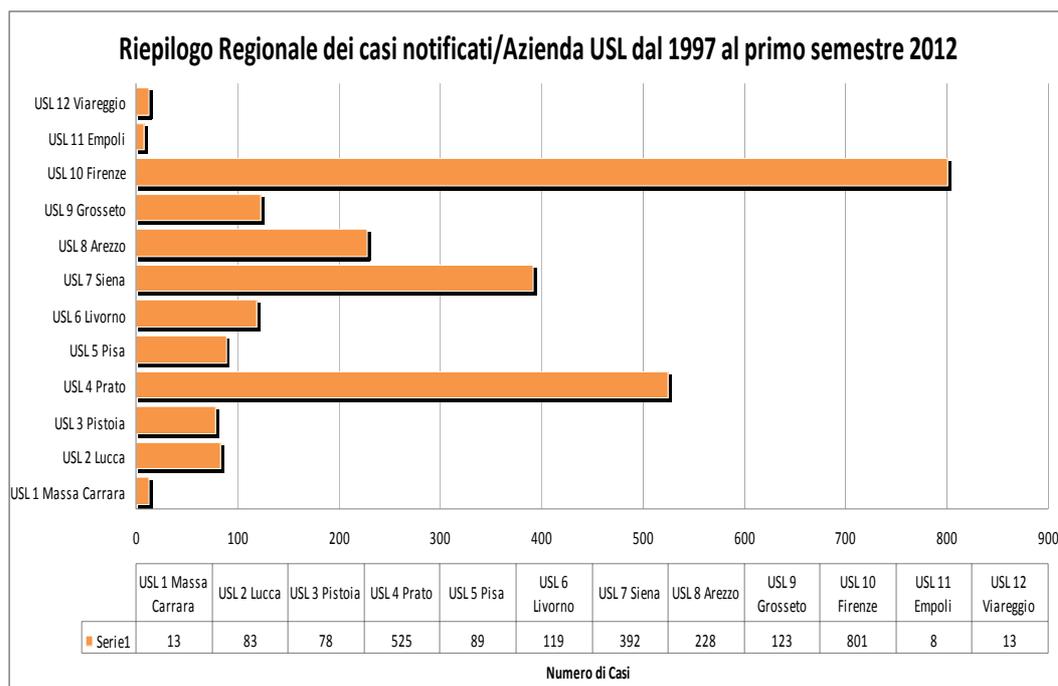
Tabella 11: Casi umani di meningo-encefaliti virali acute notificate dal 2005 al primo semestre 2012 in Regione Toscana

Azienda USL di notifica	Anno di notifica di MENINGO-ENCEFALITE VIRALE ACUTA								TOTALE USL
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012*	
Az. USL 1 Massa Carrara	0	0	1	0	0	0	1	0	2
Az. USL 2 Lucca	4	2	8	1	7	7	10	6	45
Az. USL 3- Pistoia	13	2	4	0	11	1	15	3	49
Az. USL 4 - Prato	56	53	48	45	30	36	38	9	315
Az. USL 5-Pisa	11	9	3	5	4	3	4	1	40
Az. USL 6-Livorno	5	5	7	19	8	3	14	6	67
Az. USL 7-Siena	33	35	20	24	17	11	14	3	157
Az. USL 8-Arezzo	17	13	17	8	4	7	4	3	73
Az. USL 9 Grosseto	8	20	18	12	8	7	9	7	89
Az. USL 10 Firenze	64	73	68	45	52	38	28	10	378
Az. USL 11 Empoli	2	0	0	0	0	0	0	0	2
Az. USL 12 Viareggio	3	0	0	0	0	0	0	0	3
TOTALE REGIONE	216	212	194	159	141	113	137	48	1220

Fonte: Regione Toscana (flusso dati sulla Sorveglianza delle malattie infettive ai sensi del D.M. 15/12/90).

(*): tali i dati non sono ancora considerati definitivi in quanto per la loro validazione devono trascorrere 5 mesi dalla notifica.

Gráfico 3:Riepilogo regionale dei casi notificati/Azienda USL dal 1997 al primo semestre 2012



Fonte: Regione Toscana (flusso dati sulla Sorveglianza delle malattie infettive ai sensi del D.M. 15/12/90).

Capitolo 5: Considerazioni sulla necessità di un approccio integrato e di riordino per la prevenzione della WND e delle altre zoonosi

5.1. Considerazioni relative a aspetti legislativi

Anche se a livello nazionale e regionale, come abbiamo visto, sono previsti dei controlli sia in ambito veterinario che umano per la segnalazione dei casi di WND, i sistemi di sorveglianza in essere sono molto diversi tra loro a partire dalle fonti del diritto alle quali fanno riferimento.

Ordinanza

Nel diritto italiano l'ordinanza contingibile e urgente (o di necessità e urgenza) è un'ordinanza, ossia un provvedimento amministrativo con il quale sono imposti doveri positivi (di fare o dare) o negativi (di non fare), che può essere emanata da taluni organi della pubblica amministrazione in casi eccezionali di particolare gravità e può comportare anche deroghe all'ordinamento giuridico vigente.

I presupposti per l'emanazione delle ordinanze contingibili ed urgenti sono, da un lato, l'impossibilità di differire l'intervento ad altra data, in relazione alla ragionevole previsione di danno imminente (*urgenza*) e, dall'altro, l'impossibilità di provvedere con gli ordinari mezzi offerti dalla legislazione (*contingibilità*). Richiede, inoltre, che tali presupposti siano adeguatamente motivati, che la misura adottata sia proporzionata alla situazione che s'intende fronteggiare (*principio di proporzionalità*) e che, quando è rivolta ad una generalità di soggetti, l'ordinanza sia oggetto di adeguata pubblicità (*principio di conoscibilità*).

Le ordinanze contingibili e urgenti vengono emanate principalmente:

- dal Sindaco quale ufficiale del Governo, nonché da prefetto in caso d'inerzia del sindaco, ai sensi dell'art. 54 del D.lgs 267/2000 (come modificato dal D.L. 92/2008, convertito dalla legge 125/2008), al fine di prevenire ed eliminare gravi pericoli che minacciano l'incolumità pubblica e la sicurezza urbana;
- in caso di emergenze sanitarie e di igiene pubblica, ai sensi dell'art. 32 della legge n. 833/1978 e dell'art. 117 del D.lgs. n. 112/1998 dal Ministro della Salute, dal Presidente della Giunta Regionale o dal Sindaco, con efficacia estesa, rispettivamente, all'intero territorio nazionale o parte di esso comprendente più regioni, alla regione o parte del suo territorio comprendente più comuni, al territorio comunale.

La prima Ordinanza che è stata emanata inerente misure di controllo della WND risale al 2002, 4 anni dopo il focolaio toscano del 1998.

A partire dal 2002 sono sempre state emanate dal Ministero della Salute Ordinanze aventi vigenza annuale, fino ad arrivare all'ultima Ordinanza del 4 agosto 2011. La ripetuta emanazione di anno in anno di un Ordinanza, per di più su uno stesso argomento, non si allinea con i caratteri di contingibilità e dell'urgenza insiti nell'Ordinanza stessa.

Probabilmente la ripetuta emanazione di anno in anno di tale atto ha portato anche a riproporre le stesse azioni di controllo, le quali, se da un lato hanno garantito una continuità dei controlli e della segnalazione dei casi, dall'altro non hanno consentito molto di elaborare nuove strategie di prevenzione nei confronti della malattia.

Circolare

Una circolare è una comunicazione scritta che nell'amministrazione pubblica viene inviata ad una pluralità di destinatari per impartire ordini, dare disposizioni o trasmettere informazioni. Tradizionalmente è una lettera (*lettera circolare*) ma oggi può essere anche una comunicazione telematica (ad esempio, una mail).

Dal punto di vista giuridico gli ordini e le disposizioni contenute nella circolare hanno validità limitata all'ordinamento interno dell'organizzazione e non trovano, quindi, applicazione nei confronti degli estranei che si rapportano con essa. Nella pratica le circolari sono largamente utilizzate nelle amministrazioni pubbliche, i cui uffici interpretano ed applicano le norme di legge secondo le indicazioni in esse contenute.

La circolare, quindi, rispetto all'Ordinanza, è una fonte del diritto gerarchicamente inferiore che contiene indirizzi operativi che possono più facilmente essere disattesi o reinterpretati rispetto alle disposizioni contenute in un' Ordinanza.

5.2. Considerazioni inerenti le definizioni contenute negli atti di riferimento

Altro aspetto di fondamentale importanza che rende non omogenea l'attività di controllo della WDN (e anche di altre zoonosi) in ambito della medicina veterinaria e umana è legato alle definizioni.

L'Ordinanza ministeriale del 4 agosto 2011 e la Circolare del Ministero della Salute n. 12922-P del 12 giugno 2012 riportano delle definizioni preliminari diverse tra loro e talvolta anche di significato contrastante.

Il paragrafo 2.1.1 del presente documento riporta la definizione di Area a circolazione virale (ACV) così come espressa dall'Ordinanza del 4 agosto 2011 ovvero come “area che e' stata interessata dalla circolazione del virus della West Nile nel corso degli ultimi anni”. Il paragrafo 2.2.2 invece riporta la definizione di Area affetta così come espressa dalla circolare del Ministero ovvero come “l' area in cui sia stata dimostrata la circolazione di WNV negli animali”. Innanzitutto in entrambe le definizioni manca un limite temporale

individuato entro il quale un'area si deve considerare “affetta” o “a circolazione vitale (ACV)” (secondo tale definizioni in Regione Toscana il Padule di Fucecchio, sede del primo focolaio del 1998, si dovrebbe considerare ancora oggi come ACV). Inoltre la circolare ministeriale nell'identificazione dell'Area affetta ammette anche la situazione di riscontro di “positività nelle sorveglianze veterinarie ed entomologiche” ma tale casistica non sempre è indicativa della reale presenza del WNV. Infatti una positività alla sorveglianza veterinaria può anche segnalare la presenza un animale vaccinato, oppure di una cross reazione con altri virus e soprattutto non necessariamente fa seguito all'apertura di un focolaio che invece viene sempre aperto solo previa conferma da parte del CESME del riscontro sierologico, negli equidi, di IgM che indicano infezione in corso nel soggetto (la positività al riscontro di anticorpi di tipo IgG indica un contatto pregresso con il virus ma non comporta l'apertura di un focolaio in ambito veterinario).

Tuttavia la criticità relativa all'individuazione di un limite temporale è stata recentemente risolta in quanto il Ministero della Salute con il Provvedimento 13 luglio 2012 **(38)** ha ridefinito l'ACV come “area che e' stata interessata dalla circolazione del virus della West Nile nel corso dei due anni precedenti”. Per questo motivo in Toscana nel 2013 non sono previste aree di ACV **(38)**.

Inoltre l'unità geografica di riferimento dell'ACV riportata dell'Ordinanza è identificata nel territorio avente una superficie complessiva di circa 1200- 1600 km² e in particolare con il numero di Province che essa include (che a sua volta è correlato il numero di unità da campionare). Nella definizione di Area affetta invece anche se l'identificazione delle Province come unità geografica di riferimento coincidono, manca completamente, nella circolare umana, la correlazione a un criterio di campionamento correlato.

Nella definizione di Area di sorveglianza esterna all'ACV l'unità geografica di riferimento è il territorio di uno o più Comuni avente una superficie complessiva di circa 1200- 1600 km² considerando anche che tale area è estesa per un raggio di 20 km intorno ai casi verificatisi nelle zone più esterne dell'ACV. La definizione di area di sorveglianza della circolare invece identifica tale area con l'intera Regione quale unità geografica di riferimento.

Altre definizioni diverse riguardano la definizione di caso possibile e probabile (ai fini della dichiarazione) della circolare che risultano totalmente mancanti

nell'Ordinanza veterinaria, anche se probabilmente assimilabili alla definizione di “equide sospetto di West Nile Disease”. I criteri per la definizione di caso confermato umano della circolare sono diversi da quelli definiti dalla Decisione della Commissione del 28/IV/2008 relativa alle definizioni dei casi ai fini della dichiarazione delle malattie trasmissibili alla rete di sorveglianza comunitaria. Infatti, oltre a anomalie relative all'esatta identificazione dei test di laboratorio necessari per la conferma del caso, i criteri di riferimento da utilizzare affinché il caso probabile venga dichiarato confermato risultano diversi perché la Decisione stabilisce che per dichiarare un caso confermato è necessaria la positività almeno ad uno dei 4 test individuati che sono:

- isolamento del WNV nel sangue o nell'LCR (liquido cefalorachidiano);
- identificazione dell'acido nucleico del WNV nel sangue o nell'LCR;
- risposta anticorpale specifica al WNV (IgM) nel LCR;
- titolo elevato di IgM per WNV e identificazione di IgG per WNV con conferma mediante test di neutralizzazione.

La Circolare invece stabilisce che per dichiarare un caso confermato è necessaria la positività almeno a due dei seguenti test individuati:

- isolamento del WNV nel sangue o nell'LCR (liquido cefalorachidiano);
- PCR positiva per WNV nel sangue, nel liquor o urine;
- risposta anticorpale specifica al WNV (IgM) nel LCR;
- sierconversione da negativo a positivo o aumento di 4 volte del titolo di anticorpi anti-WNV su due prelievi consecutivi di siero;
- conferma della specificità degli anticorpi mediante test di neutralizzazione.

Questa differenza non solo non rende omogenee e chiare le procedure di diagnosi della malattia, ma non consente né l'acquisizione né la trasmissione di dati nazionali validi e comparabili di risk assessment della malattia all'ECDC **(30)**.

Inoltre utilizzando i criteri della circolare si può più facilmente andare incontro a una sottostima dell'incidenza della malattia perché i casi probabili che non risultano positivi almeno a due test di laboratorio non sono considerati casi confermati e pertanto non notificati.

5.3. Considerazioni di tipo epidemiologico

Nel Capitolo 4 sono stati riportati i dati che, in riferimento alla WND, vengono inseriti nei sistemi di notifica di competenza veterinaria (SIMAN) e umana (SIMI).

La notifica di questi dati presenza dei vantaggi e degli svantaggi che vengono riportati di seguito e che creano spunti di riflessione per la costruzione di future strategie di miglioramento.

Punti di forza:

1. Dimostrazione dell'attuazione del controllo della WND in Regione Toscana nel rispetto di quanto attualmente stabilito dalle norme di riferimento;
2. Possibilità da parte della Regione di accedere direttamente ai dati sia di competenza umana (SIMI) che veterinaria (SIMAN) per consultare e verificare i controlli e gli esiti dei controlli effettuati sul proprio territorio;
3. Possibilità di predisporre report annuali relativi ai controlli effettuati;
4. L'informatizzazione dei sistemi di notifica sia umana che veterinaria ha favorito un'evoluzione molto vantaggiosa del sistema di sorveglianza sia in termini di ottimizzazione delle risorse (nell'ottica di un progressivo abbandono della segnalazione cartacea) che di miglioramento della tempestività della trasmissione delle informazioni;
5. L'informatizzazione ha influito positivamente anche sul rapporto tra il personale segnalatore (medico di base e servizi veterinari) incentivando i singoli operatori non solo a segnalare i casi ma anche a registrarli in maniera più precisa e accurata;
6. Miglioramento della qualità dei dati.

Punti di debolezza:

1. Presenza di dati poco significativi, così come tali, da un punto di vista epidemiologico: negli studi di epidemiologia descrittiva e analitica, infatti contare i singoli casi di malattia in una popolazione ed esprimerli come valore assoluto, senza fornire alcun significato di riferimento, ha spesso una scarsa utilità. Tuttavia fanno eccezione i dati per le malattie rare la cui conta dei casi può essere da sola utile a quantificare se il numero dei casi osservati è in

eccesso rispetto agli attesi. Pertanto, sarebbe opportuno fare riferimento a opportuni strumenti di misurazione, quali la prevalenza e l'incidenza, che consentano la quantificazione dei fenomeni correlati alle malattie o, più in generale, agli eventi morbosi. Sia la prevalenza che l'incidenza possono essere a loro volta costruite utilizzando le basi dati sulle popolazioni animali e umane residenti nelle aree colpite.

La prevalenza è una misura di frequenza, ovvero la proporzione in cui il numero dei casi dell'evento morboso considerato in un certo istante o in un certo periodo, viene rapportato al numero complessivo di individui presenti nella popolazione totale in quel momento. La prevalenza è la stima della probabilità e quantifica la presenza di una malattia in una popolazione in un determinato periodo di tempo. È una misura statica e si stima attraverso una proporzione ponendo al numeratore il “numero totale di casi di malattia” nel periodo considerato e al denominatore il numero di tutti i soggetti della popolazione a rischio presenti nello stesso periodo. La prevalenza stima la probabilità che un soggetto della popolazione a rischio possa essere un caso. Metaforicamente parlando rappresenta la fotografia del fenomeno considerato nella popolazione. Conoscere la prevalenza di una malattia in una popolazione a rischio e in una determinata area geografica risulta molto utile nel caso in cui:

- si voglia comprendere l'impatto indotto dalla malattia considerata in una popolazione;
- si vogliano pianificare e programmare le risorse disponibili per la realizzazione di un piano di profilassi contro una malattia;
- si vogliano stimare i costi/benefici prima dell'avvio del piano.

L'altra misura di frequenza da prendere a riferimento è l'incidenza.

L'incidenza misura la frequenza dei “nuovi casi” di malattia che si verificano in una popolazione a rischio in un determinato periodo e in una determinata area geografica. È una misura dinamica che richiede almeno due indagini distanziate nel tempo (follow-up) e metaforicamente parlando rappresenta il film (l'evoluzione) del fenomeno considerato nella popolazione.

Conoscere l'incidenza di una malattia in una popolazione a rischio in una determinata area geografica risulta pertanto molto utile nel caso in cui:

- si vogliono studiare le cause di una malattia e la loro azione in una popolazione a rischio;
- si voglia valutare l'efficacia di un programma di prevenzione contro una malattia

Tali considerazioni risultano fondamentali se consideriamo la stessa definizione di "sorveglianza" con la quale si intende un sistema di raccolta, analisi e diffusione dei dati sull'incidenza di zoonosi, di agenti zoonotici e di resistenza agli antimicrobici ad essi correlata (articolo 2, comma 1, lettera e) del D.lgs 4 aprile 2006, n. 191) **(15)**.

2. Attuazione della sorveglianza in funzione del tipo di prevenzione che si intende perseguire. La prevenzione è l'insieme di azioni finalizzate ad impedire o ridurre il rischio, ossia la probabilità che si verifichino eventi non desiderati. Le attività di prevenzione, essendo parte della più ampia attività di "tutela della salute", sono parte delle competenze professionali tipiche delle professioni sanitarie, nei loro diversi ambiti applicativi (medico, veterinario, biologo ecc..). Il principale ente sanitario internazionale, l'Organizzazione mondiale della Sanità ha definito 3 livelli di prevenzione della malattia dell'uomo. Prevenzione Primaria: volta a ridurre l'incidenza di una malattia. E' la forma classica e principale di prevenzione, focalizzata sull'adozione di interventi e comportamenti in grado di evitare o ridurre l'insorgenza e lo sviluppo di una malattia o di un evento sfavorevole. La maggior parte delle attività di promozione della salute verso la popolazione sono, ad esempio, misure di prevenzione primaria, in quanto mirano a ridurre i fattori di rischio da cui potrebbe derivare un aumento dell'incidenza di quella patologia. Questo presuppone una preventiva identificazione dei rischi associati a quella determinata malattia. Frequentemente la prevenzione primaria si basa su azioni a livello comportamentale o psicosociale (educazione sanitaria). Nel caso della WND un esempio di prevenzione primaria potrebbe essere rappresentato dalle campagne informative per la lotta ai vettori ed alle precauzioni da adottare per evitare esposizioni alle punture degli stessi.

Prevenzione Secondaria: volta a ridurre la prevalenza di una malattia.

Le azioni che caratterizzano la prevenzione secondaria sono basate sulla diagnosi precoce di una malattia, permettendo così di intervenire precocemente sulla stessa, migliorandone il decorso ma non evitando o riducendone la comparsa. La precocità di intervento aumenta le opportunità terapeutiche e riduce gli effetti negativi. Per la WND esempi di prevenzione secondaria sono ad esempio le attività di sorveglianza sugli uccelli sinantropi la sorveglianza entomologica in modo da rilevare più precocemente attività virale nel complesso ciclo del WNV: tale informazione permette inoltre, come detto sopra, di porre in atto azioni di prevenzione primaria. In ambito umano un importante esempio di prevenzione secondaria è la sorveglianza attiva sui donatori di sangue, emocomponenti e cellule staminali che devono essere sottoposti al WNV test NAT (8).

5.4. Considerazioni sulla necessità della creazione di un sistema integrato di notifica delle malattie (umano - veterinario) ai fini dello scambio interattivo delle informazioni.

Essendo la sorveglianza definita come una di raccolta, analisi e diffusione dei dati sull'incidenza di zoonosi, di agenti zoonotici e di resistenza agli antimicrobici ad essi correlata (15), si comprende come sia fondamentale avere a disposizione un sistema informativo unico tra medicina umana e veterinaria per poter effettuare prevenzione primaria.

Attualmente sono in essere due sistemi informativi, il Sistema Informatizzato Malattie Infettive (SIMI) per la medicina umana e il Sistema Informativo Malattie Animali Nazionali (SIMAN) per la medicina veterinaria.

Il Sistema SIMI è la più importante fonte informativa di notifica delle malattie infettive umane (incidenza dei casi) ed è regolamentato dal D.M del 15 dicembre 1990. Le malattie infettive dell'uomo notificate obbligatoriamente dal SIMI sono quelle di classe II, III (solo tubercolosi e micobatteriosi non tubercolare) e IV; le informazioni raccolte sono tutte quelle contenute nelle schede di notifica (modello 15).

In questo sistema esistono tuttavia delle importanti criticità quali il mancato riferimento specifico alla WND e ad altre encefaliti acute virali. Mancando

infatti nel D.M del 15 dicembre 1990 le definizioni relative alla casistica di ogni singola malattia infettiva, i dati relativi alle segnalazioni di WND sono contenute nella voce “meningo-encefaliti virali” e questo, da un punto di vista epidemiologico è una criticità perché non consente né di avere dati relativi alla WND né di costruire di conseguenza un sistema di sorveglianza specifico per quella determinata malattia.

Il SIMAN invece è il sistema per la notifica dei focolai che offre la possibilità di inserire dati sui focolai, elaborare report, interrogare, localizzare aziende e allevamenti, visualizzare (tramite accesso riservato) le attività diagnostiche svolte e verificare tramite Google maps le coordinate geografiche dei focolai a seguito di una notifica. È un sistema più strutturato che attualmente si integra con i sistemi comunitari e permette l'applicazione di quanto previsto nella DECISIONE 2119/98/ CE, che istituisce una rete di sorveglianza epidemiologica e di controllo delle malattie trasmissibili nella Comunità.

Al momento, non esiste nessuno scambio interattivo di informazioni tra il sistema SIMI e sistema SIMAN e questo non consente né al medico di essere a conoscenza dell'eventuale positività al WNV negli animali e nella sorveglianza entomologica né al personale veterinario di conoscere, in tempo reale, né gli esiti delle analisi effettuate in casi sospetti/probabili né i dati relativi ai risultati dei test di screening sui donatori di sangue, emocomponenti e cellule staminali. Pertanto, la creazione di un unico sistema informativo con lo scambio interattivo di dati risulta determinante per migliorare sia i sistemi di allerta precoce sia le strategie di prevenzione non solo della WND ma anche delle altre zoonosi: ciò infatti permetterebbe di allinearsi e rispettare quanto previsto nella DECISIONE 2119/98/ CE. Nell'ottica di una revisione del D.M. 15 dicembre 1990 e delle schede di notifica, sarebbe opportuno riorganizzare le attività di sorveglianza non solo della WND ma anche di tutte le altre zoonosi tenendo conto di quanto previsto dal D.lgs 4 aprile 2006, n. 191.

Il D.lgs 4 aprile 2006, n. 191 infatti stabilisce i criteri che devono essere utilizzati per garantire un adeguata sorveglianza delle zoonosi fra le quali rientrano le zoonosi virali trasmesse da artropodi e molte delle altre malattie infettive elencate nel D.M 15 dicembre .

5.5. Considerazioni sulla necessità di un approccio integrato tra medicina umana e veterinaria per la lotta alle zoonosi in una prospettiva “*One Medicine – One Health*”.

Nel presente documento abbiamo preso a riferimento la WND per descrivere la necessità, per la sua gestione, di un approccio integrato tra medicina umana e veterinaria. Tuttavia la necessità di tale approccio è fondamentale per l'attuazione della lotta di tutte le zoonosi anche alla luce del fatto che, come riportato nell'introduzione del presente lavoro, il 75% delle malattie umane cosiddette “emergenti” dell'ultimo ventennio sono il risultato di un passaggio di specie da parte di patogeni abitualmente di interesse veterinario (32). L'iniziativa “*One Medicine – One Health*” è una cornice logica (18) che promuove la collaborazione e la comunicazione tra diverse discipline affinché lavorino insieme a livello locale, nazionale e globale, stabilendo un approccio integrato (olistico) (20). È importante sottolineare che se viene meno tale collaborazione e soprattutto l'integrazione tra sistemi informativi della componente umana e animale viene pure meno la possibilità di creare anche sistemi di allerta rapidi. L'ideale sarebbe creare un sistema informativo unico ma, in assenza di questo, si potrebbero studiare ugualmente protocolli di trasmissione dati che siano in grado di segnalare precocemente situazioni di potenziale rischio sia ai veterinari che ai medici. A tal fine, si capisce come sarebbe importante per un medico essere a conoscenza, possibilmente in tempo reale, delle informazioni che riguardano indagini svolte sugli animali e a sua volta per un veterinario poter usufruire dei dati che riguardano l'uomo come ad esempio i risultati al test di screening NAT effettuato sui donatori di sangue.

Il concetto che la salute degli animali e l'ambiente influenzano la salute dell'uomo non è un'idea nuova (20) così come non c'è niente di nuovo nel sapere che esistono malattie ad elevata diffusibilità che possono raggiungere in breve tempo proporzioni pandemiche (o panzootiche) e malattie a carattere zoonotico. Ricondurre l'approccio e la gestione di queste malattie a un'unica cornice logica “*One Medicine- One Health*” ne rappresenta la novità (18).

Bibliografia

1. Allison AB, Mead DG, Gibbs SEJ, Hoffman DM, Stallknecht DE. (2004). West Nile virus viremia in wild rock pigeons. *Emerg. Infect. Dis.* 10(12): 2252- 2255;
2. Austgen LE., R. A. Bowen, M. L. Bunning, B. S. Davis, C. J. Mitchell, and G. J. Chang, (2004). “Experimental infection of cats and dogs with West Nile virus” *Emerg. Infect. Dis.* 10, 82–86;
3. Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, Lelli R, Murri S, Scicluna MT. (2002). West Nile virus epidemic in horses, Tuscany Regione, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 8(12): 1372-1378. *Emerg. Infect. Dis.* 8(12): 1372-1378;
4. Barneschi E., “Epidemia di West Nile Disease ad Arezzo. Attività di sorveglianza 2009-2010” (2010) *Argomenti*, pp. 57-58;
5. Blackburn NK, Reyers F, Berry WL, Shepherd AJ, “Susceptibility of dogs to West Nile virus: a survey and pathogenicity trial” (1989) *Journal of Comp. Pathol.*, 100 (1): pp. 59-66;
6. Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, Sullivan KG, Davis BS, Komar N, Godsey MS, Baker D, Hettler DL, Holmes DA, Biggerstaff BJ, Mitchell C. (2002). Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 8(4): 380-386;
7. Calistri P, Monaco F, Savini G, Guercio A, Purpari G, Vicari D, Cascio S, Lelli R, (2010) “Ulteriore diffusione del virus della West Nile in Italia” *Veterinaria Italiana*, Vol 46 (4), pp. 467-470;
8. Circolare del Centro Nazionale Sangue n. 0001037 del 19 giugno 2012 relativa a “Indicazioni per la sorveglianza e la prevenzione della trasmissione da West Nile Virus (WNV) mediante la trasfusione di emocomponenti labili nella stagione estivo-autunnale 2012”;
9. Circolare del Ministero della Salute prot. 0033197-P del 21 luglio 2010 relativa alla sorveglianza della Malattia di West Nile in Italia- 2010;
10. Circolare del Ministero della Salute prot. 0036924-P del 17 agosto 2010 relativa alla sorveglianza della Malattia di West Nile in Italia: nota esplicativa alla circolare prot. 0033197-P del 21 luglio 2010;

11. Circolare del Ministero della Salute prot. 14381 del 15 giugno 2011 relativa alla sorveglianza dei casi umani delle malattie trasmesse da vettori con particolare riferimento alla Chikungunya, Dengue e West Nile Disease-2011;
12. Circolare del Ministero della Salute n. 12922-P del 12 giugno 2012 relativa alla sorveglianza dei casi umani delle malattie trasmesse da vettori con particolare riferimento alla Chikungunya, Dengue e West Nile Disease-Aggiornamento 2012;
13. Dauphin G, Zientara S, Zeller H, Murgue B, (2004). West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 27:343-355;
14. Decreto del Ministero della Salute 29 novembre 2007 relativo all'approvazione del Piano di sorveglianza nazionale per l'encefalomielite di tipo West Nile (West Nile Disease);
15. Decreto legislativo 4 aprile 2006, n. 191 relativo all' "Attuazione della Direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza sulle zoonosi e sugli agenti zoonotici";
16. Decreto ministeriale 15 dicembre 1990 sul "Sistema informativo delle malattie infettive e diffusive";
17. Direttiva 2003/99/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003 sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici;
18. Ferrari G, "Approccio al controllo delle malattie trasmissibili nei paesi in via di sviluppo" V Workshop nazionale di epidemiologia veterinaria. Riassunti (2009) ISTISAN Congressi 09/C13: p. 5-6;
19. Henn, J. B., M. W. Gabriel, R. W. Kasten, R. N. Brown, J. H. Theis, J. E. Foley, and B. B. Chomell, (2007): Gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) as a potential reservoir of a *Bartonella clarridgeiae*-like bacterium and domestic dogs as part of a sentinel system for surveillance of zoonotic arthropod-borne pathogens in northern California. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2411–2418;
20. Kaplan B, Kahn LH, Monath TP. "The brewing storm". *Veterinaria Italiana* (2009); 45 (1):9-18;

21. Kile, J. C., N. A. Panella, N. Komar, C. C. Chow, A. MacNeil, B. Robbins, and M. L. Bunning, (2005): "Serologic survey of cats and dogs during an epidemic of West Nile virus infection in humans" *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226, 1349-1353;
22. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. (2003). Experimental infection of North America birds with the New York 1999 strain of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9(3): 311-322;
23. Lelli R, (2010) "West Nile Disease (WND)" Centro Nazionale per le malattie esotiche Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale;
24. Lelli. R, Monaco. F, Pascucci, I, "Il Bacino del Mediterraneo: la via d'accesso privilegiata alle zoonosi trasmesse da vettori " V Workshop nazionale di epidemiologia veterinaria. Riassunti (2009) ISTISAN Congressi 09/C13;).
25. Lillibridge, K. M., R. Parsons, Y. Randle, A. P. A. Travassos de Rosa, H. Guzman, M. Siirin, T. Wuithiranyagool, C. Hailey, S. Higgs, R. Pascua, T. Meyer, D. L. Vanlandingham, and R.B. Tesh, (2004): "The 2002 introduction of West Nile virus into Harris County, Texas, an area historically endemic for St. Louis encephalitis" *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 676–681;
26. Molaei G, Andreadis TG, Armstrong PM, Bueno R Jr, Dennett JA, Real SV, Sargent C, Bala A, Randle Y, Guzman H, Travassos da Rosa A, Wuithiranyagool T, Tesh RB. (2007): "Host feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and its role in transmission of West Nile virus in Harris County, Texas." *Am J Trop Med Hyg.* Jul;77(1):73-81;
27. Mostashari, F., M. L. Bunning, P. T. Kitsutani, D. A. Singer, D. Nash, M. J. Cooper, N. Katz, K. A. Liljebjelke, B. J. Biggerstaff, A. D. Fine, M. C. Layton, S. M. Mullin, A. J. Johnson, D. A. Martin, E. B. Hayes, and G. L. Campbell, (2001): "Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey." *Lancet* 358, 261–264;
28. Nota della Regione Toscana prot. AOO-GRT/170239/Q.110.30 del 4 luglio 2011;

29. Nota della Regione Toscana prot. AOO-GRT/189047/Q.100.50 del 2 luglio 2012 relativa alla sorveglianza dei casi umani delle malattie trasmesse da vettori- Circolare Ministero della Salute n. 12922-P del 12 giugno 2012;
30. Nota della Regione Toscana prot. AOO-GRT/227810/Q.100.50 del 10 agosto 2012 relativa alla sorveglianza dei casi umani delle malattie trasmesse da vettori;
31. Nota dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana prot. 0003627 del 22 aprile 2011 relativa alla Relazione West Nile Disease anno 2010 nella Regione Toscana;
32. OIE (2008). Terrestrial Manual Chapter 2.1.20 West Nile fever. <http://www.oie.int>;
33. Ordinanza del Ministro della Salute 4 aprile 2002 relativa all'esecuzione del primo Piano di sorveglianza per le infezioni da WNV in ambito veterinario;
34. Ordinanza del Ministero della Salute 4 agosto 2011 relativa alle norme sanitarie in materia di encefalomielite equina di tipo West Nile (West Nile disease) e attività di sorveglianza nel territorio nazionale (11°11622) (G.U. Serie Generale n. 209 dell' 8 settembre 2011);
35. Ozkul A, Yildirim Y, pinar D, Akcali A, Yilmaz V, Colak D. (2006) "Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey". *Epidemiol. Infect.* 134, 826–829;
36. Papin JF, Vahrson W, Dittmer DP. (2004). SYBR Green-Based Real-Time Quantitative PCR Assay for Detection of West Nile Virus Circumvents False- Negative Results Due to Strain Variability. *J. Clin. Microbiol.*, 42(4): 1511- 1518;
37. Piano Sanitario e Sociale Integrato della Regione Toscana 2012-2015;
38. Provvedimento 13 luglio 2012 del Ministero della Salute relativo all'Ordinanza 4 agosto 2011 " Norme sanitarie in materia di encefalomielite equina di tipo West Nile (West Nile disease) e attività di sorveglianza nel territorio nazionale". Modifica Allegato A "procedure operative di intervento e flussi informativi nell'ambito del piano di sorveglianza nazionale per l'encefalomielite equina di tipo West Nile – Anno 2012";
39. Roger S. N., Harry M. S., Dennis J.W., James R. M., Bruce C.C, Marvin S.G., Amy J.K, Paul B., Kristy G. and Robert S. Lanciotti (2001) "West

Nile Virus in Overwintering Culex Mosquitoes, New York City, 2000”
Emerg Infect Dis. Jul-Aug, 7(4): 742–744;

40. Toma L, Cipriani M, Goffredo M, Romi R, Lelli R, (2008) “Primo report sull’attività entomologica condotta nell’ambito del piano nazionale per la sorveglianza della West Nile disease in Italia” *Veterinaria Italiana*, Vol 44 (3), pp. 483-497;
41. Zeller HG, Schuffenecker I (2004). West Nile Virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean Basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.*, 23: 147-156;