

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE, AMBIENTALI E ALIMENTARI**

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 07/D1

Settore Scientifico disciplinare: AGR/11

**SVILUPPI DI MEZZI E SISTEMI DI SORVEGLIANZA E MONITORAGGIO
DEI DITTERI CULICIDI DI IMPORTANZA SANITARIA**

Presentata da: Dott. Alex Pezzin

Coordinatore Dottorato

Prof. Giovanni Dinelli

Relatore

Prof. Stefano Maini

Esame finale anno 2015

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 Uomo, agenti patogeni e artropodi.....	1
1.2 Monitoraggio, Sorveglianza e Sorveglianza entomologica.....	3
1.3 Culicidi vettori in Italia con particolare riferimento al complesso <i>Culex</i>	5
1.4 Il West Nile Virus.....	10
1.5 Piano regionale per la sorveglianza delle malattie trasmesse da vettori in Emilia-Romagna.....	13
1.6 Trappole utilizzate nell'ambito della sorveglianza entomologica.....	18

2. SCOPO DELLA RICERCA.....23

3. MATERIALI E METODI

ATTIVITA' DI CAMPO

3.1 Studio comparativo sull'efficacia attrattiva di diversi modelli di trappole per zanzare.....	24
3.2 Prova comparativa sull'efficacia di diversi infusi per Gravid Trap (2012 e 2014) e valutazione in campo di un prototipo di trappola.....	28

ATTIVITA' DI LABORATORIO

3.3 Miglioria tecnica apportata alla Gravid Trap.....	35
3.4 Olfattometro a due vie: progettazione e costruzione.....	37
3.5 Prove preliminari per la standardizzazione dell'olfattometro.....	41
3.6 Prove comparative sull'efficacia di diversi infusi mediante l'uso dell'olfattometro.....	42

4. RISULTATI

ATTIVITA' DI CAMPO

4.1 Dati studio comparativo sull'efficacia attrattiva di diverse trappole per zanzare.....	43
4.2 Dati prova comparativa sull'efficacia di diversi infusi per Gravid Trap (2012 e 2014) e dati prova in campo di un prototipo di trappola.....	54

ATTIVITA' DI LABORATORIO

4.3 Dati prove preliminari per la standardizzazione dell'olfattometro.....58
4.4 Dati prove comparative sull'efficacia di diversi infusi mediante
l'uso dell'olfattometro.....60

5 CONCLUSIONI

ATTIVITA' DI CAMPO.....62
ATTIVITA' DI LABORATORIO.....66

6 BIBLIOGRAFIA.....67

7 ALLEGATO: ARTICOLO IN SUBMISSION PRESSO RIVISTA SCIENTIFICA.....75

1 INTRODUZIONE

1.1 Uomo, agenti patogeni e artropodi.

Fin dalla sua comparsa sulla Terra, l'uomo ha avuto a che fare con malattie dovute alle infezioni. Le infezioni sono principalmente la conseguenza dell'esistenza del mondo microbico (indispensabile comunque per la vita sul nostro pianeta). I microbi per sopravvivere hanno bisogno di un animale superiore ove impiantarsi, moltiplicarsi e diffondersi. La malattia può essere funzionale a ciò, in quanto attraverso i liquidi biologici dell'animale malato, viene facilitato il contagio, la diffusione e quindi la sopravvivenza del microrganismo. I microrganismi patogeni (detti semplicemente agenti patogeni) sono dunque gli agenti biologici responsabili dell'insorgenza della condizione di malattia nell'organismo ospite. Si distinguono in:

- Virus.
- Procarioti: batteri.
- Eucarioti: miceti, protozoi, elminti.

La patogenicità (ovvero la capacità generica di determinare uno stato morboso) è definita da due fattori:

- Virulenza: indica la maggiore o minore capacità di generare una malattia.
- Invasività: capacità di invadere i tessuti dell'ospite e moltiplicarsi all'interno.

L'invasività, in particolare, dipende da parametri quali l'adesività (cioè la capacità del patogeno di legarsi con le strutture esterne superficiali ai siti recettoriali delle cellule dell'ospite), la produzione di enzimi extracellulari che facilitano la distruzione dei tessuti dell'ospite e la produzione di sostanza antifagocitarie, che consentono al patogeno di resistere ai meccanismi di difesa dell'ospite.

La malattia infettiva appare quindi la conseguenza dell'interazione tra i patogeni ed i sistemi di difesa specifici (risposta immunitaria) ed aspecifici (infiammazione) dell'ospite; definito questo concetto si possono distinguere:

- Patogeni obbligati: la loro presenza nell'ospite determina sempre la malattia.
- Patogeni facoltativi od opportunisti: determinano la malattia solo nell'ospite immunocompromesso o immunodepresso.

Dal 1600 (inizio dell'uso del microscopio come strumento d'indagine), i ricercatori hanno identificato più di un centinaio di agenti patogeni che possono causare malattie infettive nell'uomo attraverso la puntura di artropodi (organismi vettori, cioè portatori di malattie). Al giorno d'oggi la velocità e la facilità con cui l'uomo è in grado di spostarsi e viaggiare per le sue attività ha reso praticamente nullo un fattore per prevenire le infezioni: il tempo. Una persona malata, può manifestare l'insorgere di una malattia anche molti giorni dopo essersi infettata e quindi una malattia può giungere in un territorio anche in maniera "silenziosa" per poi diffondersi se trova le condizioni a lei adatte.

Gli arbovirus sono virus trasmessi da artropodi (Beaty and Marquardt 1996). L'International Catalogue of Arboviruses ne conta circa 534 suddivisi in 8 famiglie e 14 generi. Gli arbovirus che causano patologie nell'uomo sono classificati in 3 principali famiglie: *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae*. Il termine

arbovirus, ha origine datata: è l'acronimo di arthropod borne viruses. Generalmente sono virus che circolano in natura senza comprendere nel loro ciclo l'uomo, infatti solo casualmente lo infettano ma non per questo motivo si devono intendere di bassa rilevanza e importanza sanitaria, anzi la comunità scientifica concentra grande attenzione a queste malattie coinvolgendo anche altri ambiti presenti a livello delle comunità. Nel loro insieme, le arbovirosi fanno parte della complessa categoria delle zoonosi che comprende le malattie di origine virale, batterica, protozoica e metazoica, trasmesse da animali (quindi non solo artropodi, ma anche roditori e altri mammiferi). Si tratta di virus ad RNA, appartenenti a diverse famiglie. Recentemente dagli esperti di settore, le arbovirosi sono inserite nel gruppo delle ectoparassitosi. L'interazione temporale vettore-ospite è suscettibile di ampia variabilità, infatti può durare solo il tempo di una puntura (per esempio durante un cosiddetto "pasto di sangue"), oppure può durare molto di più con persistenza dell'agente vettore sulla cute dell'ospite per settimane, mesi o a volte anche anni.

Tra gli artropodi vettori di arbovirosi, si possono sicuramente menzionare, per grande interesse sanitario, le zecche (*Aracnidae*) e diverse specie appartenenti alla superclasse degli insetti (mosche, simuliidi, flebotomi, pidocchi e zanzare). Gli insetti rappresentano, con ogni probabilità, il maggiore gruppo a cui appartengono esempi che recano fastidio all'uomo in termini di portatori di malattie, non foss'altro perché sono nettamente la più vasta suddivisione del Regno animale comprendente almeno un milione di specie conosciute. L'epidemiologia delle malattie trasmesse da insetti vettori può essere condizionata da una complessa rete di interazioni tra l'ambiente, l'agente patogeno, il vettore, e spesso un serbatoio animale (domestico o selvatico).

1.2 Monitoraggio, sorveglianza e sorveglianza entomologica

Monitoraggio e sorveglianza sono due termini che vengono spesso confusi o usati indistintamente ma che possiedono in realtà un significato ben distinto.

Il monitoraggio consiste in procedure adottate per l'osservazione temporanea o permanente (ad esempio una dinamica di specie) e non è seguita da attività aggiuntive. Un monitoraggio si basa su una raccolta e analisi di dati effettuata allo scopo di quantificare cambiamenti nelle condizioni o valutare l'efficacia di azioni nel conseguire un obiettivo di gestione. Il monitoraggio prevede protocolli standardizzati, una certa periodicità dell'operato ed un elevato e adeguato numero di stazioni di raccolta dati.

Negli ultimi decenni, la sorveglianza (in particolare quella delle malattie) è diventata una disciplina ben distinta dall'epidemiologia (disciplina biomedica con la quale si studia la distribuzione e la frequenza delle malattie ed eventi di rilevanza sanitaria nella popolazione mediante la statistica e altre discipline come la medicina preventiva e clinica, la demografia, la sociologia).

L'idea di utilizzare dati di mortalità e morbosità come base per interventi di sanità pubblica nacque in Europa circa seicento anni fa con lo sviluppo del pensiero scientifico durante il Rinascimento e, in seguito, si diffuse nelle Americhe tramite i coloni europei (Declich e Carter 1996).

La sorveglianza è intesa come "un sistema organizzato di raccolta dei dati". Una malattia trasmessa da vettori ha almeno 4 componenti diversi che vengono utilizzati in un programma di sorveglianza: 1.rilevazione di malattie negli esseri umani o animali domestici, 2.la sorveglianza di vettori, 3.sorveglianza delle attività di agente patogeno in vertebrati ospiti selvatici, e 4.studi di modelli climatici relativi al patogeno trasmissione. Un sistema di sorveglianza è una procedura o un gruppo di procedure utilizzate per la raccolta di stime di dati necessari per prevedere, prevenire, o controllare le malattie trasmesse da vettori. I programmi di sorveglianza per le malattie trasmesse da vettori sono dunque utilizzati per anticipare, prevenire, o controllare la malattia negli esseri umani o animali domestici. Anche se i progetti di ricerca spesso sono intensivi, programmi di prevenzione e di controllo delle malattie in genere comportano ampi programmi di sorveglianza (Beaty e Maquardt 1996)

La sorveglianza si avvale di numerose metodologie d'indagine effettuate su una data popolazione ai fini di rilevare la presenza di una malattia, monitorare il trend di una malattia e razionalizzare gli interventi sanitari in sanità pubblica.

Il tipo di sorveglianza dipende da numerosi fattori: dall'agente patogeno, dalla malattia, dagli obiettivi, dai rischi sanitari e dalle risorse. Si possono pertanto distinguere due tipi di sorveglianza: attiva e passiva.

Una sorveglianza attiva viene effettuata attraverso specifici campionamenti, dimensionati su base statistica e probabilistica per fornire indicazioni attendibili sulla presenza e/o assenza e/o sull'entità di determinate patologie che si intendono indagare. Una sorveglianza attiva richiede grande impegno e necessariamente ingenti spese e costi.

Una sorveglianza passiva si basa sull'osservazione occasionale di sintomi, anomalie di comportamento o di lesioni che inducano il sospetto di presenza di malattia. Medici, ospedali, veterinari o laboratori comunicano a centri o ad organi preposti i casi di particolari malattie.

Il significato di sorveglianza entomologica è concettualmente simile al significato di sorveglianza descritto precedentemente ma rivolto a possibili soggetti appartenenti al mondo degli insetti come potenziali vettori di agenti patogeni e quindi di malattie.

Pertanto una sorveglianza entomologica è una sistematica raccolta, archiviazione, analisi e interpretazione di dati, seguita da una diffusione delle informazioni a tutte le persone che le hanno fornite e a coloro che devono decidere di intraprendere eventuali interventi. Come presupposti della sorveglianza, fondamentali

sono la sistematicità e la completezza nella raccolta più l'accuratezza nella interpretazione dei dati. Questi aspetti sono indispensabili per ottenere informazioni utili ad impostare un intervento efficace.

I cambiamenti climatici e la globalizzazione del commercio e del trasporto sono fattori che influenzano l'epidemiologia delle malattie potenzialmente trasmesse in via diretta o indiretta dagli animali all'uomo (zoonosi).

Numerosi possono essere gli esempi di sorveglianza, di seguito ne sono citati due:

- BLUE TONGUE: entrata in Europa agli inizi del 2000. Malattia virale (*Orbivirus*) infettiva, contagiosa dei ruminanti, trasmessa da insetti del genere *Culicoides*, in particolare *Culicoides imicola* nel Bacino del Mediterraneo.
Piano di sorveglianza sierologica: su bovini sentinella e popolazioni vaccinate.
Piano di sorveglianza entomologica: presenza/assenza del vettore, area geografica di distribuzione.
- LEISHMANIOSI: malattia sostenuta da parassiti appartenenti ai protozoi. L'agente principale della leishmaniosi nelle aree mediterranee è la *Leishmania infantum* un parassita in grado di colpire soprattutto il cane, ma anche gli esseri umani. La leishmaniosi viene veicolata in Europa dalla puntura di *Phlebotomus spp*, comunemente chiamati pappataci.
Dal 2007 sorveglianza in Emilia-Romagna, attiva e passiva. Nei canili: monitoraggio sierologico nei cani e sorveglianza dei casi clinici; monitoraggio entomologico. Nei cani di proprietà in seguito a caso umano. Nei cani di proprietà (sorveglianza passiva, da veterinari clinici). Nell'uomo (sorveglianza passiva da notifiche obbligatorie).

1.3 Culicidi vettori in Italia con particolare riferimento al complesso *Culex*

In Italia, *Aedes albopictus* e *Culex pipiens* rappresentano attualmente le uniche due specie di importanza sanitaria fra le zanzare della sottofamiglia *Culicinae*. Negli ultimi anni il ruolo di vettori di agenti patogeni di queste specie non è più solo potenziale ma reale. Dal suo arrivo in Italia in Liguria, si presume nei primi anni '90, attraverso il commercio internazionale di copertoni usati, *Ae. albopictus*, comunemente nota come “zanzara tigre”, si è rapidamente adattata al nostro clima ed ha colonizzato nell’arco di pochi anni quasi tutte le Regioni del Paese. Le popolazioni di zanzara tigre presenti nelle regioni centro-settentrionali raggiungono picchi di densità durante la stagione calda. Con temperature medie superiori ai 25 °C, *Ae. albopictus* è capace di completare il ciclo di sviluppo – da uovo ad adulto – in meno di 10 giorni. La specie sopravvive ai mesi invernali diapausando allo stadio di uovo. Passando dai focolai naturali presenti nelle foreste asiatiche a quelli resi disponibili dalle attività umane, questa specie è diventata una tipica zanzara da contenitori artificiali. In Italia i principali focolai larvali presenti sul suolo pubblico sono i tombini stradali per la raccolta delle acque di superficie. L’attività trofica degli adulti di *Ae. albopictus* si esplica principalmente nelle prime ore del mattino e in quelle che precedono il tramonto all’aperto, ma la specie può attaccare anche in pieno giorno, anche all’interno delle abitazioni. Il pasto di sangue può essere effettuato su qualunque mammifero o uccello. Gli adulti sono prevalentemente esofili, ovvero riposano all’aperto, al riparo dal sole, tra la vegetazione bassa, le siepi verdi o l’erba alta. La presenza di *Ae. albopictus* costituisce normalmente un problema sanitario per l’elevato grado di molestia procurato all’uomo con l’attività ectoparassitaria, ma rappresenta anche un ben più grave pericolo come vettore di arbovirus esotici. La specie è ormai saldamente radicata sul territorio tanto da dover essere considerata come parte integrante della nostra entomofauna. La drastica riduzione della densità delle popolazioni costituisce l’unico, seppur non facile, obiettivo da raggiungere al fine di evitare l’emergenza sanitaria e perseguire quindi un’azione preventiva delle potenziali diffusioni delle malattie.

Il complesso *Culex* è costituito da un insieme di entità dal valore tassonomico dubbio. Ad oggi, sul complesso è aperto un dibattito che riguarda le differenze biologiche tra i diversi individui e sulle diverse sottospecie. Le principali entità considerate appartenenti a questo complesso sono *Culex quinquefasciatus* Say, *Culex pipiens* L. e *Culex torrentium* Martini (Becker et al. 2012). La prima si sviluppa nelle regioni a clima tropicale e subtropicale, mentre la seconda e la terza si sviluppano nelle regioni temperate. Al complesso fanno parte altre specie minoritarie: *Culex pipiens pallens* e *Culex australicus* (Smith e Fonseca 2004) (Figura 1.3.1).

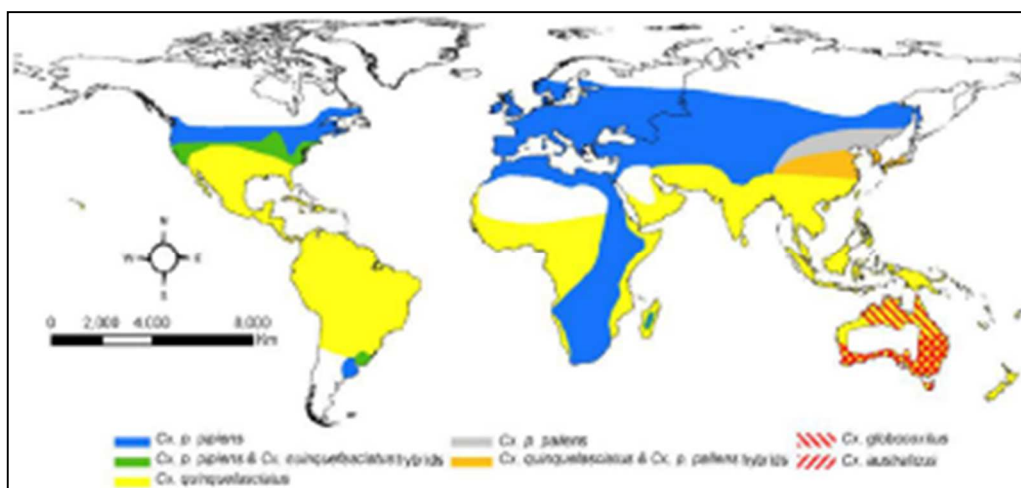


Fig. 1.3.1 Distribuzione mondiale del complesso *Culex* (da Farajollahi et al. 2011)

In Europa il complesso *Culex* è costituito da diverse specie, sottospecie, forme, razze, varianti fisiologiche o biotopi (Becker et al. 2012). Vengono normalmente però distinte due sottospecie di *Culex pipiens*: *Cx. pipiens pipiens* sensu strictu definita “forma rurale” e *Cx. pipiens molestus* definita “forma urbana”.

Entrambe le forme non si spostano a grandi distanze (da qualche centinaia di metri a un massimo di circa 3 Km) e hanno attività crepuscolare e notturna, tuttavia possono essere elencate peculiari caratteristiche biologiche distintive. La forma rurale predilige per riprodursi acque limpide con sostanza organica di origine vegetale in ampi spazi (eurigamia); inoltre necessitano di un pasto di sangue per lo sviluppo delle uova (anautogenia), sono principalmente ornitofile e presentano una diapausa invernale (eterodinamia). La forma urbana si è ampiamente adattata agli ambienti antropizzati e si riproduce prevalentemente in acque luride ad elevato carico organico, anche fortemente inquinate e in spazi ristretti (stenogamia) come tombini e caditoie stradali. Non necessitano di un pasto di sangue per lo sviluppo del primo ciclo di uova (autogenia), sono principalmente antropofile e non presentano una diapausa invernale, anche se generalmente non si nutrono. A fronte di una possibile distinzione delle due sottospecie se si considerano i fattori biologici, è tuttavia difficile elencare distinzioni morfologiche anche se in passato tentativi sono stati fatti (Christophers 1951). Anche se queste popolazioni sono simpatriche, pare che in natura rimanga un certo grado di isolamento (Spielman 1964). Solo adeguate analisi genetiche possono chiarire ed inequivocabilmente la loro distinzione (Kent et al. 2007, Becker et al. 2012).

Il ciclo vitale di *Cx. pipiens* è composto da una fase acquatica costituita da tutti gli stadi immaturi (uovo, larva e pupa) e da una fase aerea che corrisponde allo stadio adulto. Normalmente *Cx. pipiens* sverna come femmina feconda rifugiandosi in luoghi nascosti e tranquilli, spesso costruiti dall'uomo come stalle e cantine, fienili, e casolari di campagna. La femmina adulta ovidepone posandosi sulla superficie dell'acqua e sfruttando la tensione superficiale, depone parecchie centinaia di uova in gruppi, una di fianco all'altra, perpendicolari alla superficie dell'acqua a costituire aggregati galleggianti a forma di "zattera". Dalla schiusa delle uova escono le larve (Figura 1.3.2a) che si mantengono in posizione obliqua presso la superficie dell'acqua; quest'ultime tengono l'estremità anteriore (il capo) rivolta all'ingiù respirando aria atmosferica grazie ad un'apertura posteriore (sifone). Le larve si nutrono con le spazzole boccali, le quali con il proprio movimento creano un vortice con lo scopo di filtrare le particelle e microrganismi presenti nell'acqua. La larva attraversa 4 stadi di sviluppo separati da tre mute e può misurare da meno di un millimetro (primo stadio) a poco più di un centimetro (quarto stadio) (Severini et al. 2009). La durata del ciclo preimmaginale è variabile ed è condizionato dalla temperatura dell'acqua e dalla disponibilità di cibo. Al termine del quarto stadio, la larva si impupa. La pupa (Figura 1.3.2b) è molto mobile, presenta una forma "a virgola" ed è costituita dal cefalotorace (torace e testa sono fusi) e dall'addome. Le trombette (strutture respiratorie) sono due e sono poste sulla regione dorsale del cefalotorace. La pupa è in grado di spostarsi nell'ambiente acquatico grazie a un paio di palette natatorie presenti al termine dell'addome non si nutre ed è stazionaria nei pressi della superficie dell'acqua per respirare. Una volta terminato lo stadio di pupa, l'adulto già completamente sviluppato "sfarfalla". Durante i mesi estivi il ciclo di sviluppo può completarsi in meno di due settimane dando origine a elevate densità di specie. *Cx. pipiens* è una specie multivoltina, capace di sviluppare fino a 15 generazioni all'anno.

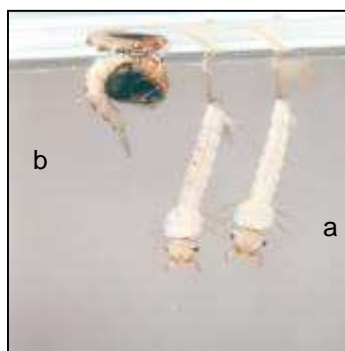


Fig. 1.3.2a-b Due esemplari di larva (a) e un esemplare di pupa (b)

L'adulto presenta un corpo allungato e diviso in capo, torace e addome. Sulla testa presenta due occhi composti formati da un numero variabile di ommatidi: 440-462 nei maschi e 503-566 nelle femmine, due

antenne (“piumose” nel maschio e “sottili” nella femmina, sede in entrambi i sessi di sensilli e chemiorecettori indispensabili per molteplici funzioni) e un apparato boccale (Figura 1.3.3).

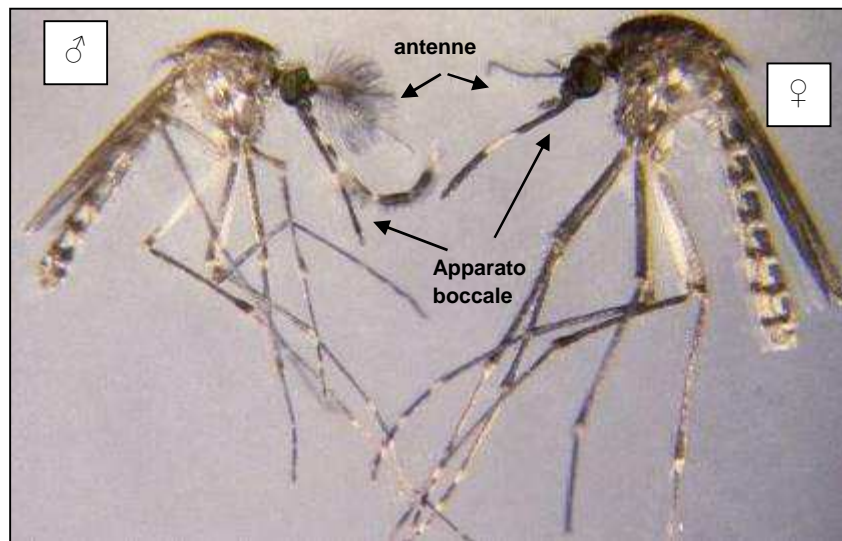


Fig. 1.3.3 Esempjari di *Cx. pipiens* maschio e femmina adulti

Le femmine adulte sono ematofaghe (si nutrono di sangue) per la maturazione delle uova usano le proteine del sangue, mentre i maschi sono glicifaghi (Figura 1.3.4). Il torace è suddiviso in protorace, mesotorace e metatorace, ognuno dei quali ospita una coppia di zampe. Sul mesotorace è presente una coppia di ali funzionali mentre sul metatorace è presente un paio di bilancieri dotati di sensilli essenziali per il mantenimento dell’equilibrio e la stabilizzazione in volo. L’addome è costituito da 10 segmenti dei quali gli ultimi due sono modificati nell’apparato riproduttore. Nei maschi la struttura riproduttiva è a forma di pinza e viene chiamata ipopigio.



Fig 1.3.4 Un esemplare adulto femmina di *Culex pipiens* durante un “pasto di sangue”

La femmina adulta ovidepone posandosi sulla superficie dell'acqua e sfruttando la tensione superficiale, depone parecchie centinaia di uova in gruppi, una di fianco all'altra, perpendicolari alla superficie dell'acqua a costituire aggregati galleggianti a forma di "zattera" (Figura 1.3.5).



Fig. 1.3.5 Un esemplare adulto femmina di *Culex pipiens* durante l'ovideposizione

Il complesso *Culex* presenta elevata importanza sanitaria (Vinogradova 1966, Fonseca et al. 2004). E' il principale vettore della malattia infettiva virale chiamata West Nile Disease (WND); ed è in grado di trasmettere sei specie di *Plasmodium* incluso *P. gallinaceum* agente patogeno responsabile della malaria degli uccelli e del pollame.

Numerosi fattori (tra cui fisici, chimici, biologici e visivi) possono essere importanti per una zanzara durante la selezione di un sito di deposizione delle uova in natura. Fattori ambientali o climatici, come la stagionalità o la piovosità sono stati valutati come parametri che possono influenzare l'ovideposizione per *Culex* in studi di valutazione di efficacia di trappole (O'Meara et al. 1989). L'olfatto è il principale senso utilizzato dalle zanzare del genere *Culex* per individuare e valutare possibili siti di deposizione delle uova. Le zanzare gravide, per scegliere il sito idoneo, sono stimolate da sentieri odorosi provenienti da fonti acquatiche (Gjullin et al. 1965) ed effettuano diversi "step" comportamentali prima e durante l'ovideposizione (Weber e Tipping 1990). Negli insetti vettori è stato individuato un coinvolgimento di sostanze feromoniche che rilasciate da alcuni individui stimolano l'ovideposizione, nel caso del genere *Culex* si tratta di feromoni anche a scopo di aggregazione, come stimolo collettivo di inizio deposizione (Mc Call e Cameron 1995). A causa dei loro particolari meccanismi di adattamento, le zanzare sono in grado di prosperare in ambienti diversi: ambienti acquatici temporanei, stabili, grandi oppure piccoli. Il fatto che l'inizio delle fasi di sviluppo può verificarsi in diversi habitat e in diverse stagioni dà alle zanzare un vantaggio ecologico in quanto i siti di riproduzione disponibili sono utilizzati idealmente in termini di luogo e di tempo, senza alcuna concorrenza su larga scala all'interno della specie (Becker 1989). Risultati di studi dimostrano che la materia organica contenuta nell'acqua gioca un ruolo importante per attirare le femmine di *Cx. pipiens* quando sono in procinto di deporre le uova (Stern 1980). Studi effettuati hanno dimostrato che infusi liquidi a base di numerose sostanze con presenza di carico organico come di letame di vacca, fieno o paglia, pellet per conigli, o erba mista funzionano tutti bene per l'attrazione e la raccolta mediante dispositivi (Gravid Trap) di zanzare gravide del genere *Culex*, tuttavia esistono differenze in termini di scelta di odori attrattivi tra le varie specie nell'ambito della scelta di un adeguato sito dove. Studi si sono concentrati su comparazioni attrattive per diversi generi

di zanzare basandosi su infusi di sola origine vegetale (Burkett 2005). Un altro aspetto interessante è che, per alcune specie di zanzare, gli infusi possono avere efficacia attrattiva differente a seconda del periodo di utilizzo: qualche infuso appare essere più attrattivo ad inizio stagione mentre altri infusi funzionano meglio a metà o a fine stagione (Jackson et Al. 2005). Aspetto interessante nell'ambito delle indagini rivolte all'attrattività degli infusi è il fatto che sia stata accertata la presenza di batteri responsabili di produzioni chimiche che attraggono le zanzare gravide. In uno studio inerente ad un liquido a base di fieno è stata rilevata presenza batterica composta per lo più da *Aerobacter aerogenes*, un batterio appartenente alla Famiglia *Enterobacteriacee* (Hazard et al. 1967).

Composti chimici che attraggono e stimolano l'ovideposizione per *Culex*, sono stati isolati e identificati da un mezzo liquido fermentato appositamente attraverso la formazione di un infuso erbaceo. La cromatografia liquida ha rivelato la presenza in frazioni di fenolo, 4-metilfenolo, 4-etilfenolo, indolo e 3-metilindolo. È stato osservato che i suddetti 5 composti stimolano fortemente l'ovideposizione, prove sui singoli composti hanno evidenziato che il 3-metilindolo risulta di oltre 5 ordini di grandezza la capacità stimolante all'ovideposizione rispetto agli altri composti chimici (Millar et al. 1992).

Un'interessante studio ha rivelato inoltre che l'aggiunta di alcol isopropilico ha migliorato l'efficacia attrattiva di un infuso usato in un tipo particolare di trappola per catturare zanzare *Culex* gravide. L'alcol, di per se, non sembra essere un fattore di attrazione, ma ha la capacità di amplificare la volatilità dei composti attrattivi riuscendo ad avvicinare più zanzare alla trappola (Ritchie 1984).

1.4 Il West Nile Virus

Il West Nile Virus (WNV), isolato per la prima volta nel 1937 a Omogo (Uganda) appartiene al genere *Flavivirus*, famiglia *Flaviviridae*, in cui sono compresi circa 70 virus (Figura 1.4.1).

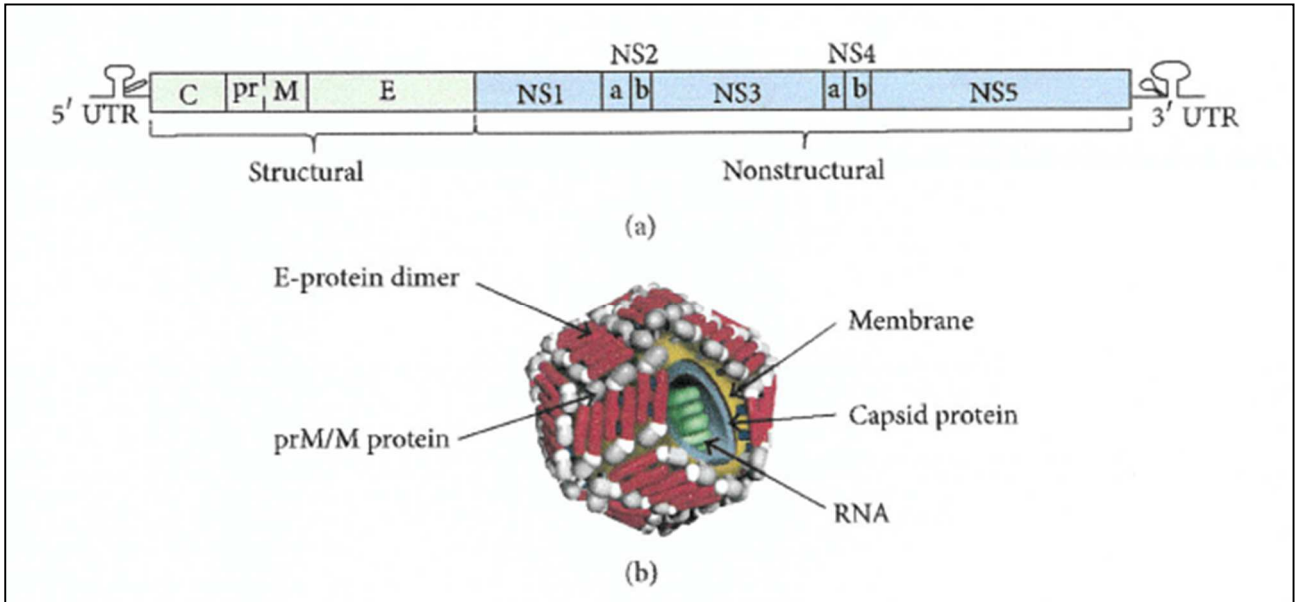


Fig. 1.4.1 Organizzazione del genoma e composizione del virione. (da Chancey et al. 2014)

Dal suo isolamento iniziale ad oggi, tale virus è considerato agente patogeno causa importante di malattie umane e animali in gran parte del mondo (Chancey et al. 2014). Negli anni Sono stati individuati globalmente diversi lineage, in Italia sono state accertata la presenza del Lineage 1 e 2 (Barzon et al. 2013) (Figura 1.4.2).

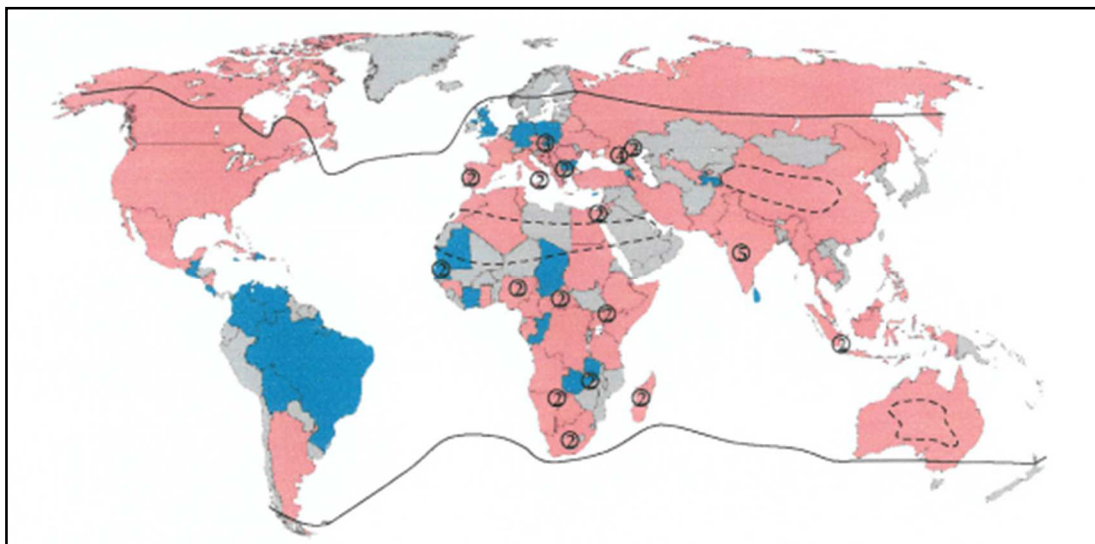


Fig. 1.4.2 Rappresentazione della distribuzione globale di WNV per paese. Rosa: paesi con casi umani o sieropositività umana. Blu paesi con casi di sieropositività animale o virus trovato in zanzare. Grigio: no dati o positività non segnalate. Le linee nere rappresentano la distribuzione a livello mondiale delle principali

specie di zanzare vettore di WNV. Le linee tratteggiate indicano zone a carattere climatico estremo come i deserti. I numeri cerchiati indicano la presenza segnalata di WNV in lineage diversi dal lineage 1 in quella zona specifica (da Chancey et al. 2014)

Diverse specie del genere *Culex*, sono i vettori principali nel ciclo di amplificazione di WNV, con notevole varietà di specie a seconda degli areali geografici. In Europa il vettore principale risulta essere il complesso *Culex*. WNV è trasmesso tramite la puntura di zanzare infette ma è stato documentato il suo ritrovamento anche in esemplari di zecche (Sidorova et al. 1973). Il ciclo biologico coinvolge gli uccelli selvatici come ospiti amplificatori, mentre i mammiferi infettati si comportano come ospiti accidentali a fondo cieco, in quanto la viremia non presenta un titolo tale da infettare nuovamente un vettore competente e contribuire così alla prosecuzione del ciclo di trasmissione. Il virus si mantiene nell'ambiente attraverso il continuo passaggio tra gli insetti ematofagi, che albergano il virus a livello delle ghiandole salivari, e gli uccelli che rappresentano il reservoir d'infezione.

L'ecologia di WNV è questione assai complessa per l'interazione di numerosi attori biotici e abiotici, col coinvolgimento di un numero imprecisato di specie di uccelli col ruolo di serbatoi amplificatori e di diffusori su lunghe distanze (migratori) e a breve-medio raggio (stanziali). WNV ha ampiamente dimostrato la capacità di superare l'inverno nei climi temperati mediterranei con ripresa del ciclo di trasmissione alla ricomparsa dell'attività vettoriale e di condizioni climatiche favorevoli.

Nell'uomo, l'infezione da WNV può decorrere in modo completamente asintomatico (80% circa dei casi), presentarsi come sindrome febbrile, con cefalea, dolori muscolari e possibile eruzione cutanea e linfadenopatia a risoluzione spontanea (20% circa dei casi) o manifestarsi come malattia neuro invasiva (<1% dei casi) anche a decorso fatale.

In Europa WNV continua a manifestare la sua presenza da più di 50 anni in molti Paesi (Figura 1.4.3), ma rilevanti epidemie sono state documentate principalmente dalla metà degli anni '90 come per esempio in Romania (Tsai et al. 1998).

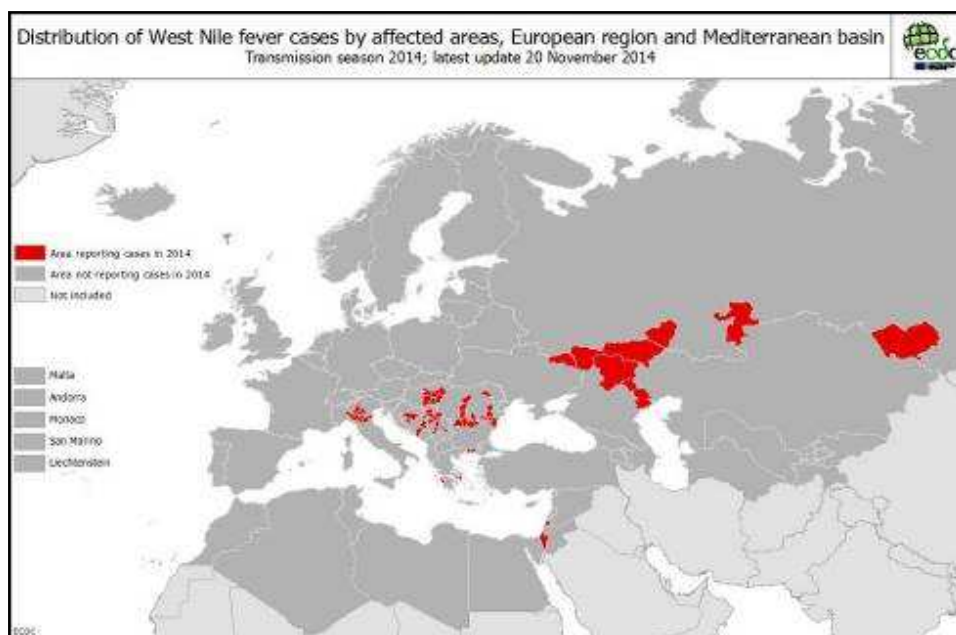


Fig. 1.4.3 Casi di febbre da WNV in Europa ed area mediterranea 2014 (da www.ecdc.europa.eu)

Il virus è responsabile della medesima sintomatologia clinica, riscontrabile nell'uomo, anche negli equidi e negli uccelli. Anche in questi casi la maggior parte delle infezioni decorre in modo asintomatico. Nei cavalli è stato stimato che circa il 10% degli animali infetti sviluppa la forma clinica caratterizzata da febbre, atassia, iperestesia, paresi, paralisi. I segni clinici possono risolversi con guarigione in 5-15 giorni oppure progredire rapidamente con morte dei soggetti.

Nell'uomo è documentata la trasmissione interumana mediante trasfusioni di sangue o di emocomponenti e trapianto di organi o tessuti. Ancora non è a disposizione un vaccino anche se sperimentazioni sono in corso (Brandler e Tangy 2013),

1.5 Piano regionale per la sorveglianza delle malattie trasmesse da vettori in Emilia-Romagna

Dal 2007 Il Servizio di Sanità Pubblica e il Servizio Veterinario e Igiene degli Alimenti della Regione, in attuazione al Piano Sanitario Regionale, hanno promosso un progetto per creare un sistema di sorveglianza in grado di rispondere adeguatamente a problematiche presenti, emergenti e potenziali. A questo progetto collaborano attivamente, attraverso il gruppo di coordinamento del progetto, il Centro Emiliano Romagnolo Epidemiologia Veterinaria (CEREV), la sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Emilia-Romagna, l'Università di Bologna Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, il Centro Agricoltura e Ambiente "G. Nicoli", il DSP dell'A. USL di Ravenna (ora ASL Romagna).

L'idea iniziale di progetto era di 3 anni, prorogati poi successivamente visti gli andamenti e i risultati delle indagini svolte. Il progetto affronta la problematica della sorveglianza delle malattie trasmesse da vettori, distinguendo tra problematiche emergenti, attualmente allo stato potenziale, e patologie presenti. Tra queste ultime, la Leishmaniosi Viscerale Zoonotica (LVZ), causata dal protozoo parassita *Leishmania infantum*, è stato il problema più concreto sul quale lavorare inizialmente come idea di progetto in quanto rappresentava, e rappresenta tuttora, una grave patologia riemergente in tutta l'area mediterranea, con aumento negli ultimi anni di incidenza e diffusione dei casi e ampliandosi geograficamente a "macchia di leopardo" da zone endemiche fino a aree collinari dell'Emilia Romagna. Altro ambito di primaria importanza d'indagine è il tema degli arbovirus trasmessi dalle zanzare.

Obiettivo del progetto è stato quello di creare in Emilia-Romagna un sistema di sorveglianza tramite una rete interdisciplinare che fornisca, da un lato, informazioni sulle popolazioni (presenza e dinamica di popolazione) dei vettori potenziali e riconosciuti di agenti patogeni e dall'altro controlli, attraverso opportune indagini di laboratorio, la presenza di agenti patogeni nella popolazione dei vettori e degli animali domestici e in quella umana. Sono stati proposti inoltre obiettivi specifici come la costituzione di una vera e propria task force preparata e organizzata alla gestione del piano, individuazione di priorità sulle quali operare in base alle risorse, approfondimento dell'aspetto della sorveglianza entomologica e sviluppo di mezzi e metodiche diagnostiche per la rilevazione degli insetti vettori.

La sorveglianza nei confronti di West Nile Virus

A livello nazionale, a seguito del focolaio toscano del 1998, è stato adottato nel tempo, tramite una serie di Ordinanze Ministeriali, un Piano di sorveglianza nazionale in ambito veterinario entomologico e umano con una serie di proroghe, giustificate dai risultati delle ricerche condotte. Il Piano è stato riconfermato anche per l'anno 2014 (<http://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/dettaglioAtto?id=49562&completo=true>).

In Emilia-Romagna un'indagine epidemiologica riguardante l'indice di sieroprevalenza (cioè la prevalenza di un determinato titolo anticorpale o quantità di anticorpi sviluppato verso un determinato antigene nel siero di una determinata popolazione di individui) sugli equidi svolta nel 2008 nelle provincie di Modena, Bologna Ferrara e Ravenna ha dato indicazioni importanti di presenza di WNV. Sono stati esaminati complessivamente 2.045 Equidi (1.910 cavalli, 123 asini, 11 bardotti, 1 mulo) e sono risultati positivi 499 Equidi (484 cavalli, 15 asini). I livelli di prevalenza osservati nell'area a rischio differiscono tra le provincie. In provincia di Ferrara la prevalenza rilevata è risultata più elevata e confrontabile con quella registrata nel 1998 a Fucecchio, in Toscana. Nelle altre Provincie invece la prevalenza è risultata più bassa, confrontabile con quella rilevata nel 2000 in Camargue (Francia). I valori di sieroprevalenza e i risultati delle indagini epidemiologiche hanno fatto supporre una introduzione del virus WN nel territorio regionale.

A seguito di tale indagine, che ha appurato una circolazione di WNV in alcune province regionali così come è stato riscontrato in altre province delle regioni Lombardia e Veneto, è stato predisposto, dai competenti Servizi della Direzione Generale Sanità e Politiche Sociali, un piano di sorveglianza e controllo di West Nile Disease in Emilia-Romagna per l'anno 2009, in raccordo e sinergia col Piano regionale di lotta alla zanzara tigre e di prevenzione della Chikungunya e della Dengue, successivamente in un unico piano nominato Piano sorveglianza arbovirosi (Bellini et al. 2014).

Sorveglianza entomologica

L'aspetto entomologico del Piano di sorveglianza ha subito un trend evolutivo. Nel corso degli anni, gli entomologi specializzati del CAA "G.Nicoli" hanno sviluppato un preciso e metodologico programma atto a espletare un'indagine sempre meglio approfondita e accurata attraverso miglie nelle istruzioni operative e affinando così la metodologia del monitoraggio.

Sia negli Stati Uniti che in Europa è stata dimostrata la fattibilità di gestire una rete di trappole attrattive che, posizionate sul territorio, producono stime della densità del/i vettore/i e mostrano il tasso di infezione da arbovirus (minimum infection rate-MIR e maximum likelihood estimation-MLE). La sensibilità del sistema di sorveglianza dipende dalla densità delle trappole e dalla loro efficacia di cattura. Il sistema sviluppato negli ultimi anni in Emilia-Romagna si è basato sull'uso combinato di trappole attrattive innescate ad anidride carbonica (CO₂) senza fonte luminosa (CAA-2004) e Gravid Trap. Le trappole sono state disposte su una griglia con maglie 11x11 km a coprire l'area in cui si è evidenziata circolazione di WNV considerata a maggior rischio, alla luce delle evidenze dello scorso anno e del passato. All'interno di ogni quadrante è stata scelta da un entomologo esperto una stazione di cattura fissa idonea per ottimizzare le catture di *Culex pipiens* e *Cx. modestus*, ritenuti i vettori di interesse nel territorio regionale sulla base dell'esperienza acquisita (Calzolari et al. 2010).

Le specie *Cx. pipiens* e *Cx. modestus* catturate sono state suddivise in pool da un minimo di 5 esemplari (catture da 1 a 4 individui sono registrate come "resto" e non conservate) a un massimo di 200 individui per specie-sito-data specifici. Le zanzare delle altre specie non sono state suddivise in pool ma sono state tenute in provette singole per specie-sito-data. Tutti i campioni sono stati conservati in provette da crioconservazione codificate.

I campioni *Cx. pipiens* e *Cx. modestus*, sono stati inviati ogni settimana, entro due-tre giorni dalla cattura, al laboratorio regionale di riferimento dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna – sezione di Reggio Emilia, utilizzando contenitori coibentati idonei al trasporto del ghiaccio secco. Le provette contenenti zanzare di altre specie sono state conservate in azoto per future analisi.

L'ultima rete di monitoraggio è stata composta da 72 trappole CO₂ e 16 Gravid Traps attive da fine maggio a fine settembre 2014; l'attuale configurazione della rete, osservabile, è il risultato di un'evoluzione nel tempo sulla base dell'esperienza e dei risultati.

Considerando quindi il complesso ciclo biologico che caratterizza la circolazione di WNV, al fine di un'efficace controllo delle forme neuro invasive d'infezione da questo virus è stato necessario attivare una sorveglianza integrata tra aspetti entomologici, veterinari e umani. Per far fronte al suddetto aspetto, il team del C.A.A. "G.Nicoli" (in particolare la figura del Dott. Albieri Alessandro) ha sviluppato un programma applicativo denominato ER-VEC 1.1 (Emilia-Romagna VECTOR) consultabile dal 2014 on-line dal personale autorizzato per la gestione dei dati entomologici della sorveglianza utile per tutti gli operatori coinvolti nel piano e operanti in diversi uffici e laboratori d'indagine (Figura 1.5.1).



ER-VEC 1.1, AN EMBRYONIC WEB APPLICATION FOR VECTOR-BORNE DISEASES DATA MANAGEMENT IN THE EMILIA-ROMAGNA REGION, ITALY

Alessandro Albieri, Romeo Bellini
Centro Agricoltura Ambiente "G.NICOLI", Medical & Veterinary Entomology Dept., Crevalcore (BO), Italy <http://www.caa.it/entomology>

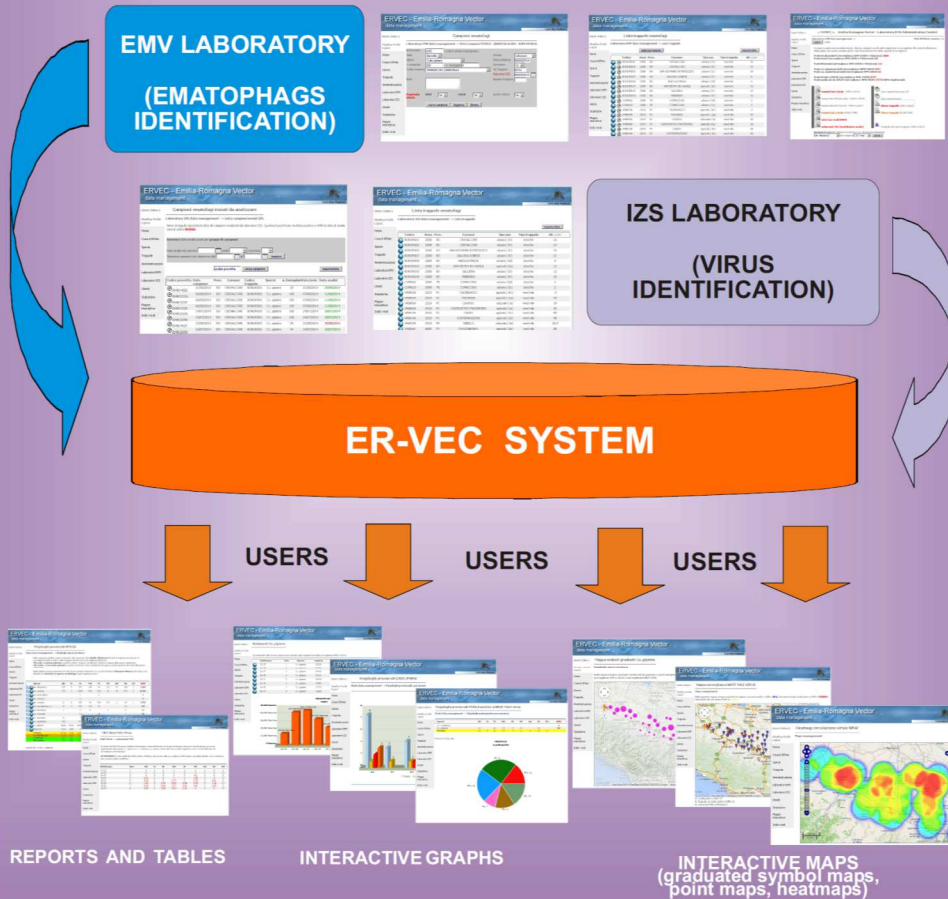
Introduction

The data management in Vector Borne Diseases (VBD) surveillance may take advantage from structured databases where to store information produced by different entities. For this purpose we are developing an application for entomological data management for West Nile (WNV) and Usutu virus (USUV) and Toscana Virus (TOSV) surveillance in Emilia-Romagna region, Italy.

The application ER-Vec 1.1 (Emilia-Romagna Vectors), on-line from 2014 (ervec.caa.it), allows real time data sharing between entomological laboratories that collect field data throughout the network of 72 CO₂ and 16 gravid traps regularly activated during the season such as: geographical data (station coordinates), collected vector species (mosquitoes and sandflies), trap type (CO₂ traps or gravid traps), and virus laboratory screening results such as: identification dates and virus type identified (e.g. WNV, USUV or TOSV, Virus).



ER-VEC features



All the data collected were entered in Er-Vec by specific forms to reduce errors. The web application was also integrated with interactive maps developed with Google Map APIs and OpenLayer, table statistics on species collected, pools analyzed, pools positive to WNV or USUV per province, vector species density trends, MIR (Minimum Infection Rate) and MLE (Maximum Likelihood Estimation) provincial trends for WNV and USUV and all these data, processed automatically, were shared with the surveillance involved institutions. The application is under development to improve statistics outputs, automatic virus circulation maps and species distribution maps creation.

Fig. 1.5.1 Poster esplicativo dell'applicazione web ER-VEC 1.1

Sorveglianza veterinaria

Uccelli

Gli uccelli sono i principali ospiti vertebrati del WNV. Alcuni studi sperimentali e le osservazioni di campo hanno identificato le specie appartenenti agli ordini dei Passeriformi, dei Coraciiformi e Strigiformi come i principali ospiti reservoir ed amplificatori del virus in considerazione dei livelli di viremia elevati e persistenti che si sviluppano in queste specie.

La sorveglianza sugli uccelli stanziali, finalizzata al rilevamento precoce della circolazione virale WN, dal 2006 è stata inserita nel piano regionale di monitoraggio della fauna selvatica svolto in accordo con gli Uffici faunistici provinciali e la Polizia provinciale e con consulenza di ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale). La programmazione e le modalità di esecuzione sono coerenti con quanto previsto dal piano di sorveglianza nazionale (O.M. 04/08/2011). Anche nel 2014 sono state campionate le cornacchie grigie (*Corvus cornix*) e le gazze (*Pica pica*), catturate o abbattute. Il campione è stato integrato da esemplari di ghiandaie (*Garrulus glandarius*). Periodo di monitoraggio maggio-settembre. Il piano è stato attuato nel territorio regionale classificato da ISTAT come di pianura e di collina. Il campionamento, sulla base dell'estensione del territorio, è stato stratificato per provincia. Per ciascuna zona gli uccelli sono stati prelevati ogni due settimane, secondo un calendario definito.

La sorveglianza attiva è stata integrata con una sorveglianza passiva effettuata sugli episodi di mortalità anomala nella fauna selvatica. Soggetti di altre specie (strigiformi, ardeidi, laridi) rinvenuti morti o deceduti nei Centri di Recupero Animali Selvatici (CRAS) sono stati conferiti, con le stesse modalità dei soggetti prelevati in sorveglianza attiva, alle sedi IZSLER competenti, che hanno provveduto al prelievo degli organi (cervello, fegato, rene e cuore) per le indagini virologiche biomolecolari (PCR).

Cavalli

Data la disponibilità e l'esteso utilizzo del vaccino (nel novembre 2008 la Commissione europea ha rilasciato un'autorizzazione, valida in tutta l'Unione europea, per l'immissione in commercio del vaccino inattivato da utilizzare nei cavalli di oltre 6 mesi di età. In Italia, in attuazione all'art 6 dell'O.M. del 4 agosto 2011 e successive modifiche, dal mese di luglio 2009 è possibile vaccinare gli equidi facoltativamente, e a carico del proprietario. Per l'anno 2014 in regione Emilia-Romagna è stata effettuata esclusivamente la sorveglianza clinica (passiva) basata sulla rilevazione della sintomatologia neurologica e non si sono usati cavalli sentinella come negli anni precedenti. Tale modalità, grazie anche alla fattiva collaborazione dei veterinari liberi professionisti e delle cliniche universitarie, si è dimostrata uno strumento precoce ed efficace per rilevare casi di malattia WN. La O.M. 11 agosto 2011 (art.1 comma 2 lettera a) definisce come sospetto di WN l'equide che, nel periodo di attività dei vettori, presenta atassia locomotoria o morte improvvisa in zona a rischio oppure almeno due dei seguenti sintomi:

- 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 del labbro inferiore, o paresi dei muscoli labiali o facciali;

- digrignamento dei denti.

Sorveglianza umana

La sorveglianza dei casi umani è basata sulle forme cliniche di malattia neuroinvasiva (WNND).

Il sospetto diagnostico di WNND va posto in qualunque persona ricoverata che presenti febbre alta (> 38,5 °C) e manifestazioni neurologiche di tipo encefalite, meningite a liquor limpido o poliradicoloneurite (simil Sindrome di Guillain Barré) o paralisi flaccida acuta.

Fermo restando che tale malattia può essere sospettata in qualsiasi periodo dell'anno in persone che hanno effettuato un viaggio recente in aree in cui la malattia è endemica o ha fatto la sua comparsa, la sorveglianza nell'ambito del territorio regionale andrà assicurata, in modo particolare, su tutte le forme sospette insorte nel periodo 15 giugno – 30 novembre corrispondente al periodo di maggiore attività del vettore – fatte salve eventuali proroghe qualora l'attività del vettore stesso sia ancora rilevante dopo il 30 novembre. (<http://www.epicentro.iss.it/problemi/westNile/documentazioneItalia.asp>).

Per tutti i dettagli e gli approfondimenti si possono consultare gli appositi bollettini redatti e pubblicati dal 2009 al 2014 comprensivi di dati inerenti ai diversi campi d'indagine presenti nel Piano di Sorveglianza della West Nile Disease in Emilia Romagna al seguente indirizzo internet:

http://www.izsler.it/pls/izs_bs/v3_s2ew_consultazione.mostra_pagina?id_pagina=736

1.6 Trappole utilizzate nell'ambito della sorveglianza entomologica

Trappole a CO₂

La trappola a CO₂ sfrutta la capacità delle zanzare femmina di percepire come attrattivo l'anidride carbonica (CO₂), per cui le attrae nei pressi della fonte di CO₂ dove la ventola le aspira in un sacchetto di tulle (Figura 1.6.1a-b) In questo modo è consentito il loro conteggio e la determinazione tassonomica.

La trappola utilizzata è costituita da diversi elementi:

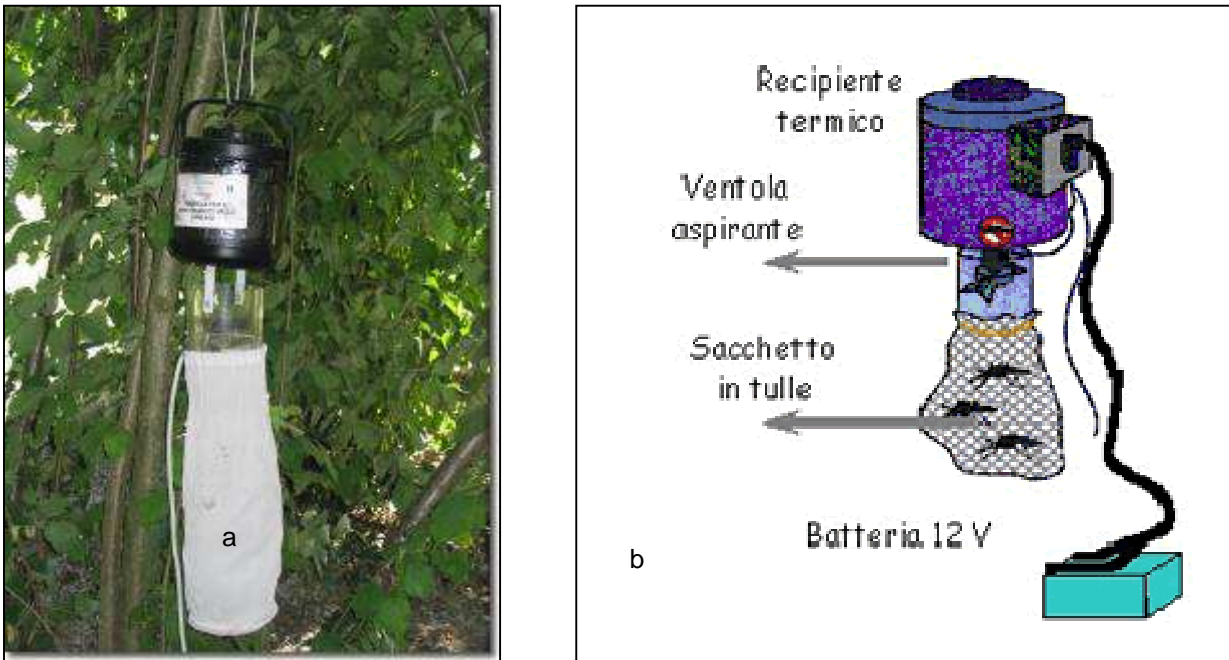


Fig. 1.6.1a-b Trappola a CO₂ (a) e disegno esplicativo del funzionamento (b)

- Serbatoio nero coibentato per il ghiaccio secco (CO₂ solida) con capacità in volume di 2.000 cc, provvisto di manico con gancio. Il serbatoio presenta 4 fori, ad un'altezza di circa 80 mm dal cilindro di aspirazione, per la fuoriuscita della CO₂ gassosa;
- Un cilindro di aspirazione in metacrilato fissato al serbatoio mediante due staffe di alluminio;
- Motorino (12V, 0,14-0,15 A) con ventola di aspirazione (Ø80 mm) a 7 palette;
- Sacchetto in tulle con intelaiatura, a maglia < di 1 mm;
- Batteria a secco ricaricabile 12 V, 7,5 A e filo elettrico ignifugo.

Ogni trappola riporta inciso un codice ID sul lato.

Prima di sistemare le trappole, è opportuno fare alcuni controlli:

- Assicurarsi che la batteria sia stata caricata;
- Verificare che il sacchetto di tulle sia integro, che non presenti buchi o scuciture;
- Verificare la solidità del manico e che esso sia ben attaccato al contenitore;
- Verificare che il motorino elettrico sia funzionante;
- Verificare che i faston rimangano saldamente infilati nei poli della batteria.

Una volta fatti i controlli si può riempire il serbatoio con il ghiaccio secco. Bisogna considerare circa 500 g di ghiaccio secco per trappola per una emissione di circa 12 ore (per la quantità regolarsi comunque sempre sulla base del tempo che trascorrerà per raggiungere la stazione di monitoraggio). Se il ghiaccio è in blocchi questo va diviso in porzioni con martello e scalpello in modo da ottenere dei piccoli pezzi del peso desiderato. In tutti i casi il ghiaccio secco va avvolto in un foglio di carta (es. di giornale) per evitare che sublimi troppo velocemente e messo nel serbatoio che verrà chiuso con il coperchio

Gravid Trap

La Gravid Trap è un modello studiato per la cattura di femmine di zanzare gravide (specialmente del genere *Culex*) che attratte dalla presenza di acqua e dalle sostanze volatili prodotte dal materiale vegetale in infusione, sono alla ricerca di un ristagno per ovideporre.

La trappola utilizzata è la CDC GRAVID TRAP — MODEL 1712 della John W.Hock Company (Gainesville, Florida). Questo dispositivo è stato progettato dal Dr. Paul Reiter del Centers for Disease Control (Reiter 1983). La trappola attrae le femmine mediante un liquido contenuto in una vaschetta sotto la trappola, interpretato dagli insetti come un adeguato sito dove ovideporre (Figura 1.6.2). La trappola funziona creando un flusso di corrente d'aria all'interno dei bordi della vaschetta, in modo tale che le zanzare vengono aspirate nella sacca di raccolta durante il volo di ispezione pre-deposizione. L'unità è composta un paio di staffe di alluminio alle quali è avvitato il tubo di aspirazione contenente il motore di aspirazione (ventolina) e un retino di tulle con manicotto e telaio rigido che si infila facendolo scorrere nel tubo centrale fino a che il "fondo" non sia appoggiato all'estremità superiore del sifone. Dopo aver immesso l'infuso nella vaschetta si collega la trappola ad una sorgente elettrica (batteria) da 6 Volt, facendo attenzione a rispettare la corretta polarità. Secondo la procedura standardizzata americana, l'infuso di erbe è preparato con fieno essiccato (0,5 Kg) in 114 litri di acqua circa facendolo fermentare 5 giorni. Ogni trappola necessita di una quantità di 4-5 litri di infuso.



Fig. 1.6.2 Gravid trap modello 1712 della John W. Hock

Per la preparazione dell'infuso usato da noi per questa tipologia di trappola nell'ambito della sorveglianza ai vettori di WNV in Emilia Romagna, si è seguito un iter operativo medesimo a prescindere dalla sede e dal luogo di preparazione dell'infuso attrattivo. Per i tecnici entomologi che hanno operato come sede logistica da Crevalcore (Bo) è stata utilizzata erba essiccata rimasta a terra dopo sfalcio prelevata nel prato della sede CAA dei Ronchi, in via Argini Nord 3351. Il prato dove si è prelevata l'erba si presenta in zona aperta, soleggiata, frequentemente avviene sfalcio meccanico e pertanto l'altezza dello strato erbaceo non raggiunge mai altezze considerevoli. Il prato non viene irrigato, e le specie erbacee si presume abbiano caratteristiche prevalentemente eliofile (Figura 1.6.3).



Fig. 1.6.3 Tratto di prato dove è stata prelevata l'erba secca

In prevalenza si tratta di erbe tipiche appartenenti a prati polifiti, costituiti da diverse specie appartenenti ad importanti e diffuse famiglie come *Graminaceae* e *Poaceae*, alcuni esempi sono: *Festuca arundinacea*, *Dactylis glomerata*, *Trifolium repens*, *Lotus corniculatus*, *Eleusine indica*, *Avena sterili*, *Hordeum murinum subsp. Leporinum*, *Poa compressa*, *Dactylis glomerata*, *Melica uniflora*, *Dactylis glomerata subsp. Lobata*, *Dactylis glomerata subsp. Lobata*, *Setaria viridis*, *Avenula pratensis*, *Schedonorus pratensis*, *Cynosurus cri status*,

Per la preparazione dell'infuso, si è prelevata una quantità di circa 30 grammi di erbe essiccate, l'equivalente di 3-4 pugni (Figura 1.6.4).



Fig. 1.6.4 30 grammi di erba secca, la quantità usata per l'infuso

Si è utilizzato un contenitore di plastica con tappo a vite e lo si è riempito con 5 litri di acqua di rubinetto (Figura 1.6.5).



Fig. 1.6.5 Contenitore di 5 litri di plastica con tappo a vite e bastone per mescolare l'infuso

In laboratorio si è preso del lievito di birra in polvere (secco) in una quantità di 2,5 grammi (Figura 1.6.6).



Fig. 1.6.6 Lievito di birra in polvere

Il lievito lo si è fatto sciogliere in un bicchiere di plastica con un piccolo volume (circa 50 cc) di acqua e poi lo si è introdotto insieme alle erbe secche e a 5 litri di acqua di rubinetto nel contenitore cilindrico di plastica. Il tutto lo si è lasciato fermentare nell'atrio del laboratorio a una temperatura di circa 26 °C in un ambiente di penombra per 3 giorni con il tappo del contenitore cilindrico aperto, almeno 1 volta al giorno si è girato il tutto con un bastone di legno. Tutto il contenuto è stato utilizzato nella vaschetta nera della gravid trap.

Nella zona del prato dove si è prelevata l'erba secca, si è recintata una zona di 3 metri x 3 metri con nastro segnaletico e apposito cartello onde evitare che gli operatori incaricati sfalcino il prato e quindi le erbe possano crescere a livello da poter essere classificate (Figura 1.6.7).



Fig. 1.6.7 Zona di prato recintata per il prelievo delle erbe di campo

2 SCOPO DELLA RICERCA

Nel corso degli ultimi anni le problematiche legate al ruolo vettore delle zanzare stanno emergendo sia per quanto riguarda l'uomo che gli animali allevati e selvatici (Macini et al. 2008).

Diversi arbovirus come West Nile, Chikungunya, Usutu e Dengue, possono facilmente spostarsi a livello planetario ed essere introdotti anche nei nostri territori dove possono dare avvio a episodi epidemici (Angelini et al. 2008, Dottori et al. 2008, Tamba et al. 2011).

Le tecniche di monitoraggio e sorveglianza dei Culicidi possono essere convenientemente utilizzate per il rilevamento precoce dell'attività virale sul territorio e per la stima del rischio di epidemie al fine dell'adozione delle opportune azioni di Sanità Pubblica (Angelini et al. 2010).

Lo scopo della ricerca del dottorato è inserito nel contesto dei temi di sviluppo del Piano regionale sorveglianza delle malattie trasmesse da vettori in Emilia Romagna. La ricerca condotta è inquadrata prevalentemente sotto l'aspetto entomologico applicativo di utilizzo di dispositivi (trappole) che possano catturare efficacemente possibili insetti vettori. In particolare questa ricerca è stata mirata allo studio comparativo in campo di diversi tipi di trappole per la cattura di adulti di zanzara, cercando di interpretare i dati per capire un potenziale valore di efficacia/efficienza nel rilevamento della circolazione virale e come supporto alla pianificazione della rete di sorveglianza dal punto di vista operativo mediante dispositivi adeguati alle finalità d'indagine. Si è cercato di trovare un dispositivo idoneo, approfondendone gli aspetti operativi/funzionali, ai fini di cattura del vettore principale del West Nile Virus, cioè la zanzara comune, da affiancare all'unica tipologia di trappola usata in precedenza.

Le prove sono state svolte sia in campo che presso il laboratorio di Entomologia Medica Veterinaria del Centro Agricoltura Ambiente "G. Nicoli" di Crevalcore, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali della Facoltà di Agraria dell'Università di Bologna.

3 MATERIALI E METODI

ATTIVITA' DI CAMPO

3.1 Studio comparativo sull'efficacia attrattiva di diversi modelli di trappole per zanzare

In ambito di sorveglianza, capire la trappola migliore per catturare le specie di zanzare vettori del virus che si vuole ricercare rappresenta un tema di primaria importanza per ottimizzare l'efficienza della sorveglianza stessa (Williams e Gingrich, 2007), questo può essere fatto mediante studi comparativi per valutarne l'efficacia (Surgeoner et al. 1978, Crans 1995, Allan et al. 2004, Kline et al. 2006, Unlu et al. 2009, White et al. 2009, Hoel et al. 2009, Roiz et al. 2012, Montarsi et al. 2015).

Fino al 2011, l'aspetto entomologico di cattura dei vettori di WNV in Emilia-Romagna inserito nell'apposito piano di sorveglianza era affidato solamente ad una tipologia di trappola funzionante a ghiaccio secco. Durante l'estate 2011, in Emilia-Romagna, sono state testate in uno studio comparativo, diverse tipologie di trappole per zanzare per verificarne l'efficacia di cattura. Scopo di questa prova è stata la valutazione di un dispositivo utile per implementare la metodologia di indagine di campo nell'ambito del sistema di sorveglianza dei vettori di arbovirus in Emilia Romagna, principalmente la cattura di culicidi vettori di WNV, cioè zanzare del genere *Culex*. Questo studio è stato realizzato individuando tre siti di carattere rurale come oasi o valli naturali con presenza di acquitrini nelle province di Bologna, Ferrara e Modena. In ogni sito sono state realizzate più repliche di catture. Dopo ogni notte i pool delle zanzare catturate sono stati raccolti e portati in laboratorio per essere determinati. Un'indagine particolarmente interessante ed importante, poiché inerente alla correlazione virus-vettore, ha riguardato l'osservazione dello stato fisiologico di alcuni esemplari di zanzare femmine catturate. In particolare si è cercato di concentrarsi sugli ovari, annotando eventuali stati gravidici con presenza acclarata di uova oppure annotando, mediante appositi metodi d'indagine, se siano stati effettuati o meno cicli di produzione di uova (cicli gonotrofici).

Area di studio

Lo studio ha coinvolto tre diversi siti in tre province dell'Emilia Romagna, Bologna, Ferrara e Modena (Figura 3.1.1).

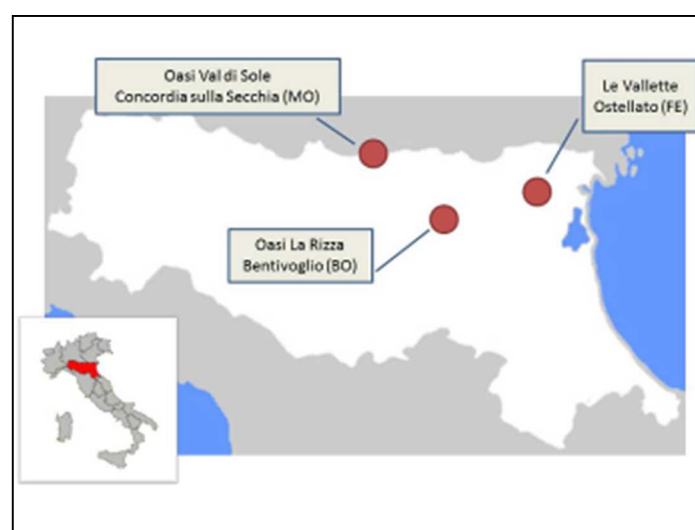


Fig. 3.1.1 Posizione dei siti dov'è stata effettuata la prova

Il primo sito coinvolto in questo studio è stata "L'Oasi La Rizza" situata all'interno del territorio comunale di Bentivoglio, in provincia di Bologna. Questo luogo naturalistico deve il suo nome ad un antico al podere, con fabbricato agricolo, che si trova nel centro della zona, edificio che è stato ristrutturato per ospitare il centro multifunzionale per i visitatori. Il Parco copre 1.500 ettari. In mezzo ci sono distese di canne (*Phragmites*), e molte specie vegetali idrofile; molte specie di uccelli acquatici come le anatre. La mappa comprende le zone umide permanenti, prati umidi, canneti, boschetti e siepi. E' presente anche un centro per la reintroduzione della cicogna bianca; serbatoi per zone umide, laghi per la pesca e l'allevamento di pesci rossi e due capanni di osservazione situati nella espansione del canale Navile canale, raggiungibile a piedi o in bicicletta.

Il secondo posto scelto per questo studio è situato in provincia di Ferrara, e in particolare nella valli acquatiche del comune di Ostellato. Si tratta di una zona umida di circa 300 ettari situati tra due canali, che ne rappresentano i confini. Almeno 150 specie di uccelli si possono osservare nelle valli, sono prevalentemente specie acquatiche. La vegetazione è rappresentata principalmente da canneti e vegetali idrofili, ma anche da numerose specie arboree come il pioppo, l'olmo e il salice.

L'ultimo sito ha coinvolto un'area naturale presente a Concordia sulla Secchia, un comune in provincia di Modena. Questa area circoscritta è chiamata "Oasi Val di Sole".

L'idea di formare questa oasi come zona di recupero e ripristino ambientale, è nata dalla necessità di recuperare i grandi serbatoi per la profondità di scavo di argilla di circa 4 metri iniziate intorno agli anni '80. L'oasi si estende su una superficie di circa 25 ettari situata tra il fiume Po e il fiume Secchia e si compone di 4 bacini principali, due stagni, argini e sopraelevate che compongono un'area di sosta e nidificazione di numerose specie di uccelli. Oggi ci sono oltre 200 specie che frequentano l'oasi, tra cui alcune molto rare come la moretta tabaccata, simbolo dell'Oasi Val di Sole.

Descrizione trappole scelte per lo studio

I tipi di trappole utilizzate per questo studio sono state 5: una Gravid Trap (Figura 3.1.2), una trappola CDC a ghiaccio secco nominata CAA2004 (Figura 3.1.3), una BG-Sentinel (Figura 3.1.4) e tre tipi di trappole sperimentali, denominate Resting Traps o Resting Box progettati e realizzati appositamente per questo studio nominati RT-001, RT-002 e RT003 (Figura 3.1.5).

La Gravid Trap utilizzata per lo studio è un modello commerciale, in particolare, è la TRAP CDC Gravid - MODEL 1712 prodotto dalla Società John W. Hock (Gainesville, Florida).

Nella vaschetta della gravid trap l'infuso viene introdotto in una quantità di 5 litri e precedentemente preparato come segue:

5 litri di acqua di rubinetto + 2,5 g di lievito di birra secco + 30 g di fieno di erbe polifite.

La preparazione viene lasciata fermentare a circa 26 ° C in condizioni di scarsa illuminazione all'interno di un serbatoio aperto per 3 giorni, mescolando una volta al giorno.

La trappola CAA2004, sfrutta la capacità delle zanzare femmine di percepire il biossido di carbonio (CO₂) come sostanza attrattiva, per cui vengono attratte vicino alla sorgente di CO₂, in cui un ventilatore le aspira in un sacchetto di tulle, per consentire poi la loro raccolta e la loro classificazione.

Ci sono molte parti che compongono nel loro insieme la trappola:

- Un serbatoio nero isolato per ghiaccio secco (CO₂ solida) con una capacità di 2.000 cc. con 4 fori, ad un'altezza di circa 80 mm dal cilindro di aspirazione, per la fuga di CO₂.
- Un cilindro metacrilato di aspirazione fissato al serbatoio per mezzo di due staffe in alluminio.
- Un motore (12V, 0,14 A) con una ventola di aspirazione (Ø80 mm) e implementato con una ventolina composta da 7 palette.

- Una retina di tulle con telaio a maglie di diametro inferiore di 1mm.
- Una batteria a secco ricaricabile da 12 V, 7,5 A.

La BG-Sentinel è una trappola prodotta e commercializzata da Biogents (www.biogents.com). Questa trappola per zanzare è essenzialmente un contenitore pieghevole in tessuto bianco con una garza bianca che copre la sua apertura. Il diametro è di 36 cm (14 pollici), altezza 40 cm (1,3 piedi). Al centro del coperchio-garza, l'aria viene aspirata nella trappola attraverso un tubo di cattura nero da un ventilatore elettrico, l'aria poi esce dalla trappola attraverso la garza bianca, generando correnti ascensionali. Queste correnti sono simili a correnti convettive prodotte da un ospite umano. Utilizzato in combinazione con il BG-Lure™, un erogatore che rilascia una combinazione di sostanze non tossiche che si trovano anche sulla pelle umana (ammoniaca, acido lattico e acido caproico), il BG-Sentinel è attrattiva per molte specie di zanzare. I tre tipi di trappole Resting Box sono stati progettati per prelevare campioni di zanzare semplicemente in base alla loro forma o al colore. Non è stato pensato alcun tipo di sostanza da aggiungere come elemento extra di attrattività della trappola. I contenitori utilizzati per simulare un sito di supporto e rifugio sono stati un bidone blu, e due tipi di cestini dei rifiuti. Il bidone blu è stato semplicemente rovesciato e lasciato aperto per tutta la notte, mentre i tre tipi di cestini sono stati implementati con un motore elettrico e ventolina di aspirazione alimentati da una batteria da 12 volt collegati a una rete per catturare le zanzare che si avvicinavano alla trappola. Durante lo studio, dopo poche sedute, si è deciso di abbandonare l'uso della trappola RT002 perché è risultata troppo poco attrattiva. In ciascuno dei tre siti sono stati individuati 5 punti in cui sono state piazzate, a rotazione, una notte alla settimana le diverse trappole, a una distanza di almeno 15 metri l'una dall'altra. La prima sessione di cattura è stata fatta il 17 giugno 2011 a Bentivoglio, l'ultima sessione di cattura è stata fatta il 19 settembre 2011 a Concordia sulla Secchia. Le trappole sono state collocate alle ore 18 e prese alle 9 del mattino successivo (Figura 3.1.6). I campioni di zanzare catturate durante la notte sono stati portati in laboratorio per essere contati e identificati e in parte analizzati.



Fig. 3.1.2 Gravid Trap



Fig. 3.1.3 CAA2004



Fig. 3.1.4 BG-Sentinel



Fig. 3.1.5 RT-001 (a), RT-002 (b) e RT003 (c)



Fig. 3.1.6 Posizionamento campo di una trappola. Oasi La Rizza, Bentivoglio (Bo)

3.2 Prova comparativa sull'efficacia di diversi infusi per Gravid Trap (2012 e 2014) e valutazione di un prototipo di trappola

Studio anno 2012

Obiettivo principale di questa prova è stato cercare di capire quale essenza potrebbe avere ancora maggior potere attrattivo rispetto all'infuso standardizzato perciò si è comparato al testimone (infuso di erbe essiccate di campo) altre 3 sostanze: caseina, brodo granulare vegetale (commercializzato dalla Knorr[®]) e galletta di riso (commercializzata dall'azienda agricola La Gallinella srl). Il test ha previsto 3 repliche (turni di cattura). Si sono piazzate, per turno di cattura, 4 trappole con i 4 infusi nel parco della villa dei Ronchi (Crevalcore) ad una distanza di circa 20 metri una dall'altra, tutti la stessa sera (piazamento circa alle 18 e ritiro circa alle 9 del mattino successivo). Per il primo turno di catture si sono preparati gli infusi e si sono utilizzati immediatamente, senza lasciare tempo di fermentazione. Nel secondo turno si sono piazzate le trappole con gli infusi che hanno fermentato per 24 ore mentre nella terza ed ultima replica sono state posizionate le 4 trappole con gli infusi che hanno riposato e fermentato per 48 ore. Si è cercato quindi di capire anche il fattore "tempo di fermentazione" quanto potesse incidere sul potenziale attrattivo degli infusi stessi. L'obiettivo è stato cercare di capire:

- Quale infuso può risultare di più facile preparazione.
- I poteri attraenti delle diverse sostanze.
- Se qualche infuso può necessitare di tempi di preparazione minori per l'utilizzo in campo rispetto all'infuso testimone (semplificando e ottimizzando un eventuale utilizzo in ambito di monitoraggio).
- Considerazioni tecniche, migliorie pratiche. Aspetti tecnologici applicativi.

Sempre nel contesto di questa prova si è testata anche una nuova trappola realizzata per emulare l'effetto attrattivo della Gravid Trap ma di forma differente, la trappola è stata nominata "Sombrero-CAA" (Figura 3.2.1). Questa trappola è costituita da un secchio cilindrico, di colore blu, che funge da supporto sopra al quale è appoggiato un coperchio di plastica nero di un bidone forato al centro dove è posizionata una ventolina di aspirazione che raccoglie gli insetti in un classico retino di tulle. Il funzionamento è garantito da una batteria da 12 V. L'infuso (realizzato con erbe essiccate e lievito di birra, secondo la tipologia usata per il monitoraggio con le Gravid Trap americane) viene versato sul cappello dato dal coperchio del bidone in una quantità di 2 litri (3 in meno rispetto alla Gravid Trap americana, ovviamente le dosi di lievito di birra e di erbe sono adeguate e proporzionate ai 2 litri di acqua). L'infuso così utilizzato si presentava diversamente rispetto alla vaschetta nera usata con la Gravid Trap, infatti si presentava come una "pellicola" liquida di circa 2 cm di altezza e ricopriva una superficie maggiore rispetto allo specchio d'acqua artificiale" ricreato con la vaschetta nera standard.



Fig.3.2.1 Trappola "Sombrero-CAA"

Materiale utilizzato

Come sostanze da utilizzare per la preparazione degli infusi da testare, oltre al classico infuso standard formato da lievito di birra essiccato e erbe di campo essiccate usato come testimone, si è deciso di concentrarsi su delle essenze o miscele di essenze che in qualche misura possano dare effetto attraente sulle zanzare, in particolare si è deciso di testare:

- Caseina, 12 grammi (Figura 3.2.2).
- Brodo granulare vegetale prodotto dalla Knorr[®], 12 grammi (Figura 3.2.3).
- 1 Galletta di riso, 7.250 grammi, prodotte dall'azienda agricola La Gallinella s.r.l. (Figura 3.2.4).

Per la preparazione degli infusi si è proceduto nella stessa maniera tramite la quale si prepara l'infuso utilizzato per il monitoraggio regionale, cioè mescolando le sostanze in 5 litri di acqua di rubinetto. Tutte e 3 le sostanze in esame sono state opportunamente ed adeguatamente pesate e dosate per ogni replica di cattura realizzata (Figura 3.2.5).



Fig. 3.2.1 Caseina



Fig.3.2.3 Brodo granulare vegetale Knorr[®]



Fig. 3.2.4 Galletta di riso

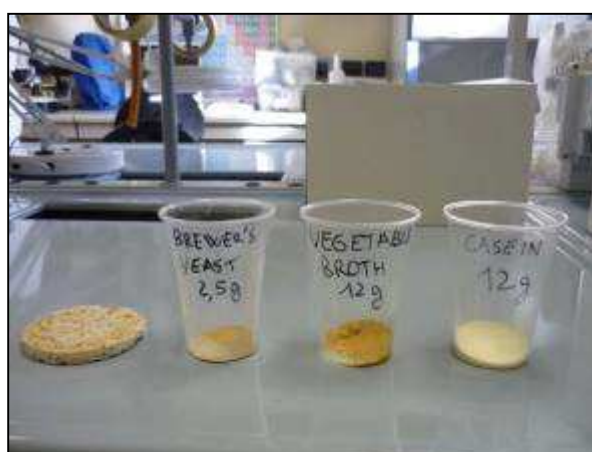


Fig.3.2.5 Le 3 Essenze testate e il testimone

Procedimento di cattura

Le repliche dei posizionamenti delle trappole sono state realizzate nel parco retrostante la sede del CAA a Ronchi di Crevalcore (Bo) in tre repliche differenti. Le trappole sono state posizionate nel pomeriggio, circa alle ore 18 e raccolte nella mattinata successiva, circa alle ore 9 (Figura 3.2.6).

Le condizioni ambientali all'interno del parco sono pressoché le medesime, cioè prato semi-soleggiato con presenza erbacea di polifite tipiche di pianura, con prevalenza di esemplari arborei sparsi di gelso. Le trappole sono state posizionate tutte alle medesime condizioni, alla base di un tronco di gelso, ad una distanza in linea d'aria di circa 20 metri una dall'altra (Figura 3.2.7 e 3.2.8).



Fig. 3.2.6 Trappole pronte per il posizionamento in campo



Fig. 3.2.7 Visione d'insieme delle stazioni di cattura



Fig. 3.2.8 Posizionamento della trappola “Sombrero-CAA”

Studio anno 2014

Le trappole per zanzare gravide sono comunemente utilizzate in diversi paesi, sia nell’ambito dei sistemi di sorveglianza degli arbovirus sia nell’ambito del semplice monitoraggio delle popolazioni di zanzare del genere *Culex*. Numerosi sono stati i tentativi di creare un buon infuso attraente, testando ingredienti di varia origine e natura come per esempio erba medica (Silver 2007), foglie di quercia (O’Meara et al. 1989) e letami di varia origine: di mucca (Leiser e Beier 1982) di cavallo (O’Gower 1963) e di gallina (Kramer e Mulla 1979). I substrati di ovideposizione, utilizzati come attrattivi in queste trappole, sono stati ampiamente testati nei confronti del genere *Culex* in condizioni sia di laboratorio che di campo (Allan et al. 2005, McPhatter e Debboun 2010). Gli infusi che si sono voluti valutare sono:

- A. Infuso con stallatico solido e acqua di rubinetto (200 g. in 5 litri).
- B. Infuso con concime biologico universale e acqua di rubinetto (un tappino dosatore di 30 ml. in 5 litri).

Lo stallatico solido usato per l’infuso A è uno stallatico umificato per orto/giardino preparato con le seguenti matrici: ammendante compostato misto, sostanza stallatiche equine + bovine mature e fermentate, substrato torboso e vegetale. Prodotto e confezionato da Geovital service srl, sacco da 20 litri circa 6 Kg Figura 3.2.9a-b.



Fig. 3.2.9 Sacco di stallatico solido, fronte (a) e retro (b)

Il concime biologico universale usato per l'infuso B è un concime organico azotato composto da Borlanda fluida NK 3-5 (derivante da melasso di barbabietola non estratta con sali ammoniacali, boro etanolamina, sale di ferro solfato, sale di manganese solfato e sale di zinco solfato) con microelementi per uso orticolo (azoto organico 3%, ossido di potassio solubile in acqua 5%, carbonio organico di origine biologica 14%, boro solubile in acqua 0,05%, ferro solubile in acqua 0,05%, manganese solubile in acqua 0,01% e zinco solubile in acqua 0,01%). Prodotto e distribuito da Orvital S.p.A. Via Darwin, 63 – 20019 Settimo Milanese (Mi). Flacone da 1000 grammi (Figura 3.2.10a-b).

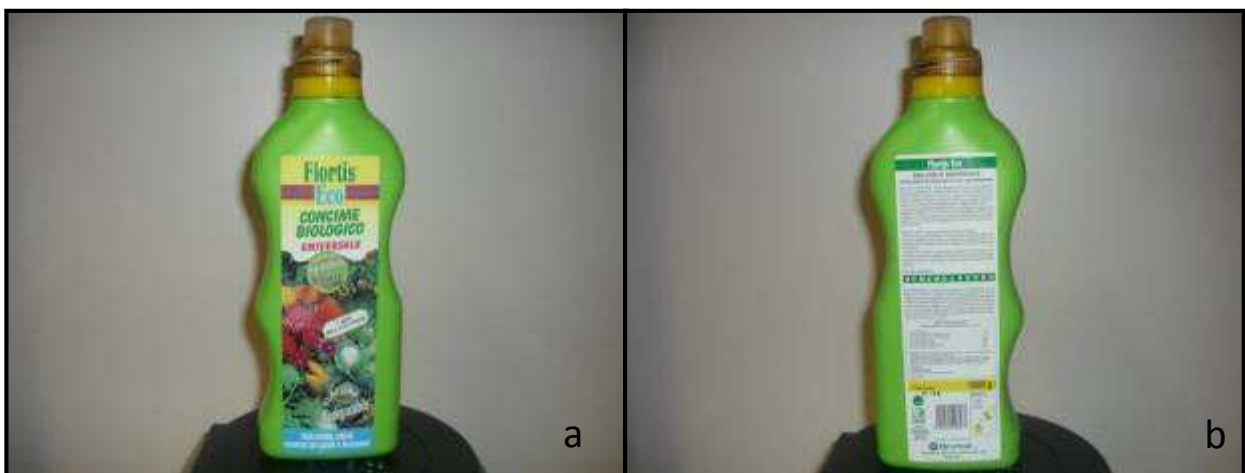


Fig. 3.2.10a-b Concime organico liquido, fronte (a) e retro (b)

I periodi di fermentazioni degli infusi sono decisivi per la formazione degli attrattivi e possono influenzare in modo significativo le risposte delle zanzare (Kramer e Mulla 1979, Brust 1990, Du e Millar 1999).

Una prima valutazione è stata effettuata preparando la mattina del 25/08/2014 5 litri di infuso con stallatico (A) e 5 litri di infuso con concime liquido (B) lasciandoli fermentare per 7 giorni all'aperto (Figura 3.2.11).



Fig. 3.2.11 Bidoncini di decantazione per gli infusi valutati nel test

Come sito di test è stata scelta l'area verde presente tra la villa dei Ronchi e la torre dei Ronchi. In data 01/09/2014 sono stati posizionati in 3 punti (posizione A, posizione B e posizione C, foto), dei piatti di plastica a fondo piano (capacità 500 ml) con l'infuso all'interno (Figura 3.2.12). La preparazione (Figura 3.2.13) ed il posizionamento (Figura 3.2.14) sono stati eseguiti alla stessa ora nei diversi giorni di test.



Fig. 3.2.12 Posizioni di prova degli infusi (da Google earth®)



Fig. 3.2.13 Preparazione dei piattini per la valutazione degli infusi



Fig. 3.2.14 Posizione in campo durante la prova di un piattino con infuso nella posizione b

ATTIVITA' DI LABORATORIO

3.3 Miglioria tecnica apportata alla Gravid Trap

Il retino in tulle fornito in dotazione alla Gravid Trap è provvisto di un telaio metallico che gli consente, a montaggio avvenuto, di restare in una tipica posizione a fungo in cui gli insetti vengono raccolti attraverso un "manicotto" incalzato attraverso il tubo di aspirazione (Figura 3.3.1). Quando si ritirano i retini, uno spinoso aspetto di questa tipologia di retino è il far fuoriuscire le zanzare raccolte, questa operazione in realtà, non risulta molto agevole, anzi, bisogna maneggiare il retino con cautela ed attenzione e non sempre la fuoriuscita degli insetti dal tulle risulta completa.



Fig. 3.3.1: Dettaglio del retino "a fungo" in dotazione alla Gravid Trap americana

Il numero di insetti catturati durante le sessioni notturne può risultare, a volte, di entità considerevole, anche di centinaia di individui. Un utile miglioramento tecnico a tale retino è stato quello di realizzare una tipologia di svuotamento alternativa a quella del semplice ribaltamento verticale. Si è pensato pertanto di modificare il retino nella sua porzione mediana, inserendo una cerniera a lampo in modo tale che possa avvenire più facilmente lo svuotamento del contenuto (Figura 3.3.2a-b-c-d).

Nel progettare tale modifica si è prestata attenzione all'aspetto di ermeticità del retino, non sono infatti presenti fessure attraverso le quali potrebbero uscire insetti catturati dal dispositivo.

Una serie di due sedute notturne di cattura avvenute nel mese di luglio 2014 all'interno del giardino della sede di CAA "G.Nicoli" situata a Ronchi di Crevalcore, ha permesso di appurare l'effettivo miglioramento (puramente pratico) della delicata operazione di svuotamento del retino con gli insetti catturati mediante la suddetta modifica tecnica.



Fig. 3.3.2a-b-c-d Quattro visuali del prototipo di retino per Gravid Trap con apertura modificata

3.4 Olfattometro a due vie: progettazione e costruzione

Uno strumento di indagine tipo olfattometro è uno strumento che permette di misurare e dare indicazioni sulle preferenze olfattive degli insetti, nell'ambito dei loro aspetti comportamentali, tramite l'esposizione di fonti di odori ai quali gli animali sono chiamati a scegliere. Numerosi sono stati i tentativi passati di cercare di capire scelte comportamentali degli insetti in prove di laboratorio e tentativi sono stati fatti anche per ciò che riguarda le zanzare (Gouck et al. 1965, Posey et al. 1998, Dogan et al. 1999, Omrani et al. 2010).

L'idea di pensare, progettare ed assemblare un dispositivo che funga da olfattometro nel contesto di questo progetto di ricerca, risiede nel fatto che gli odori sono fondamentali nella vita delle zanzare, sia nella complessa interazione tra insetto-animale ospite, vittima di punture, sia nella complessa interazione maschio-femmina (rapporto attrattivo-sessuale), sia nella complessa interazione insetto-ambiente per esempio nella scelta di un adeguato luogo per l'ovideposizione (Bentley 1989). Non bisogna però tralasciare l'importanza dei feromoni nelle attività comportamentali degli insetti, per esempio le zanzare non seguono solo gli odori per deporre in un sito idoneo ma anche particolari feromoni oviposizionali (McCall et al. 1995). Con questa prova si è cercato di costruire un congegno, cioè un meccanismo costituito da varie parti unite insieme che funzionano come struttura unitaria, in grado di fornire utili indicazioni comportamentali su quale tipo di supporto liquido preferiscono scegliere per ovideporre le zanzare comuni (*Culex pipiens*). Capire eventuali scelte preferenziali potrebbe essere un'utile informazione per ottimizzare l'uso della Gravid Trap come strumento d'indagine in ambito di sorveglianza entomologica per circolazione virale utilizzando un adeguato ed efficace infuso attrattivo.

Una prima fase progettuale, ha visto la realizzazione di schizzi e bozzetti fatti a mano su carta per capire come potesse essere assemblato l'apparecchio e che forma assegnarli (Figura 3.4.1).

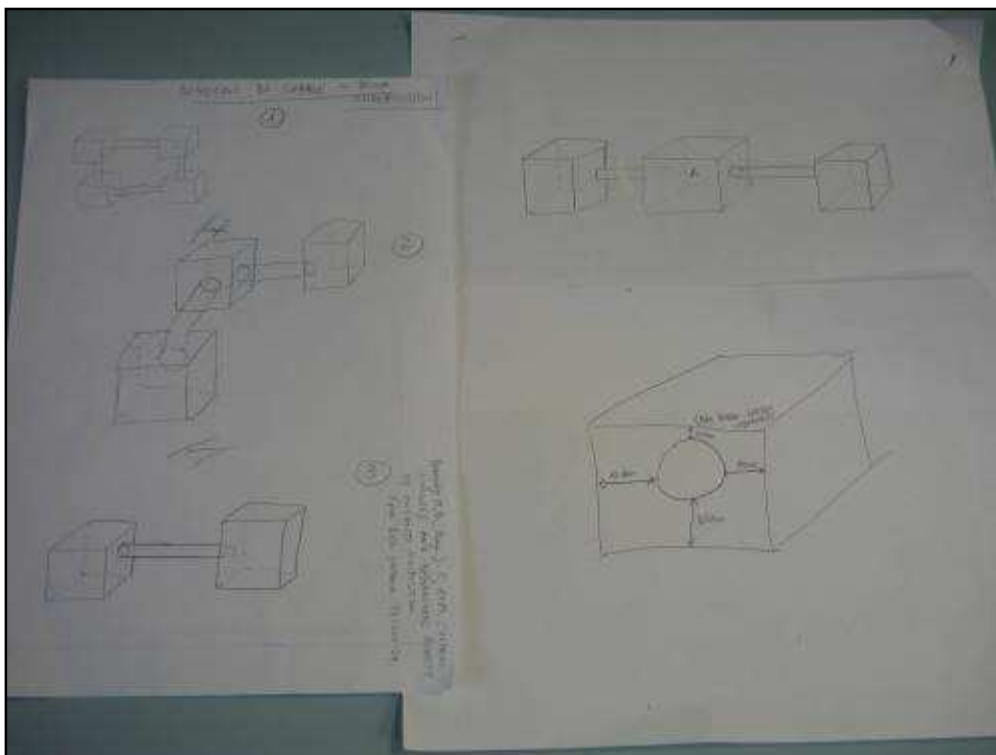


Fig. 3.4.1 Schizzi e bozzetti progettuali dell'olfattometro

Come versione finale, si è deciso di optare per una configurazione strutturale lineare del dispositivo, con la presenza di tre gabbie (A, B e C) costituite da box di materiale plastico (Polipropilene) (Figura 3.4.2), collegate tra di loro da due cilindri sempre di materiale plastico (Polimetilmetacrilato o Plexiglass) (Figura 3.4.3). Il dispositivo è stato assemblato e piazzato all'interno di una cella climatizzata sotto regime controllato con temperatura e umidità costanti (UR 80%, T°C 28°C, L:B 14:10) presso il laboratorio del settore di Entomologia Medica Veterinaria del Centro Agricoltura Ambiente "G.Nicoli.

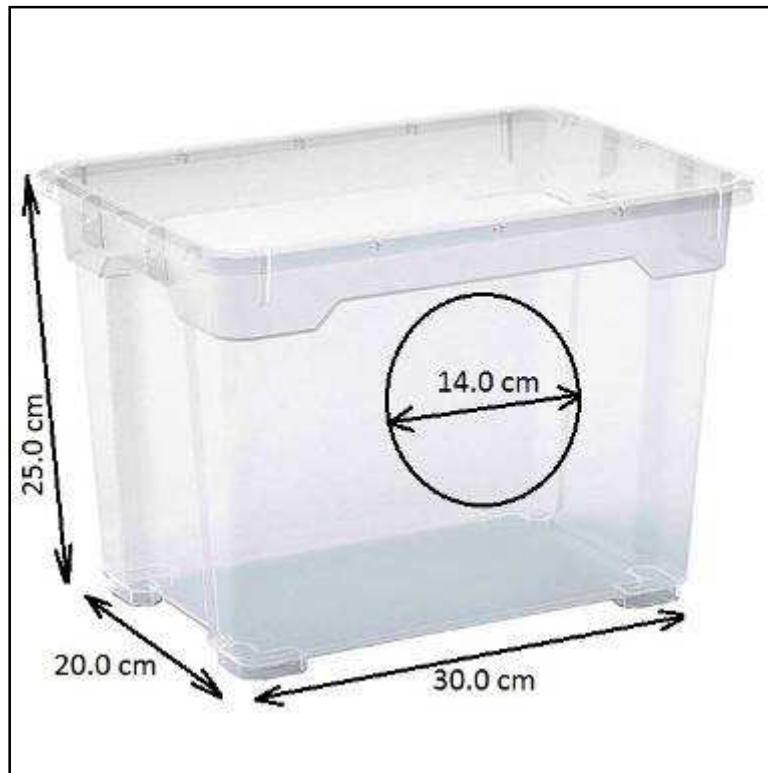


Fig. 3.4.2 Misure del box utilizzato come gabbia per le zanzare

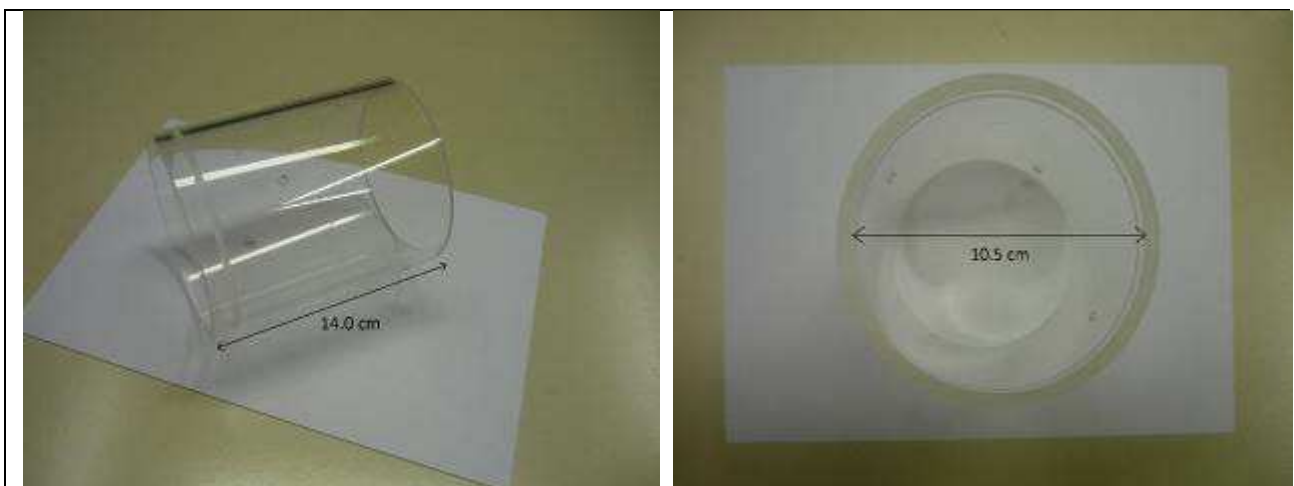


Fig.3.4.3 Dettagli cilindro di collegamento tra le gabbie

I cilindri sono stati inseriti nelle pareti delle gabbie dopo aver realizzato degli adeguati fori di invito entro i quali sono stati inseriti i bordi dei cilindri (Figura 3.4.4). Nella zona vicina alla gabbia centrale sono stati realizzati, su entrambi i cilindri di collegamento alle gabbie laterali, degli sportellini per creare un effetto isolante della gabbia centrale, necessario prima di iniziare ogni sessione di prova e di studio per evitare che gli adulti di zanzara potessero accedere alle due gabbie laterali prima di aver inserito gli infusi da testare (Figura 3.4.5).

La parte superiore delle gabbie è stata coperta con maglia di tulle a manicotto centrale per favorire l'inserimento del materiale prima e dopo le sessioni di studio e favorire l'estrazione e le varie operazioni durante le prove (Figura 3.4.6).

Ad ogni replica della prova, nella gabbia centrale C sono state inserite in una apposita vaschetta con imbuto di sfarfallamento, le pupe di *Culex pipiens* prelevate dal allevamento interno del laboratorio di settore del CAA cercando di ottenere, al momento dell'inizio del test, adulti di circa 3 giorni di età. Sempre nella gabbia centrale è stato inserito contemporaneamente all'inserimento delle pupe anche un bicchierino rovesciato con acqua e zucchero per la sussistenza degli adulti sfarfallati.

Gli infusi da saggiare sono stati inseriti nelle gabbie laterali (A e B), isolate dalla gabbia centrale per mezzo di sportellino a valvola ermetica fino al momento di inizio delle prove.

Il dispositivo si è deciso di mantenerlo "statico", senza cioè l'utilizzo di nessun meccanismo che possa forzare flussi d'aria direzionali, gli odori sono stati lasciati liberi di diffondersi passivamente. Inoltre si è deciso di non apportare nessuna tipologia di barriera visiva.



Fig. 3.4.4 Visione d'insieme dell'olfattometro all'interno della cella climatizzata

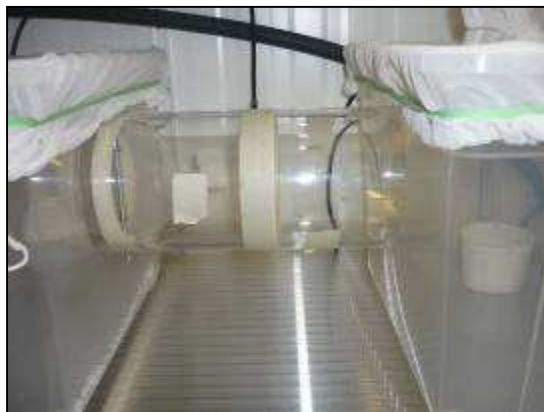


Fig. 3.4.5 Dettaglio del cilindro di collegamento tra le gabbie



Fig. 3.4.6 Dettaglio dell'inserimento di un campione di infuso durante lo studio

3.5 Prove preliminari per la standardizzazione dell'olfattometro

Come specie di interesse di studio, si sono utilizzate zanzare comuni (*Culex pipiens*) prelevando pool di pupe miste (sia maschi che femmine) da allevamento interno CAA per ogni replica delle fasi di indagine. I pool non sono stati numericamente uguali, ogni volta si sono prelevate pupe nuove e il relativo conteggio maschi/femmine è stato effettuato al termine di ogni prova mediante sex ratio sugli adulti aspirati e fatti morire per congelamento.

Un test per capire l'ordine di grandezza della sex ratio è stato effettuato come prova preliminare prima di iniziare l'indagine.

Terminato l'assemblaggio del dispositivo olfattometro, si è provveduto ad una fase preparatoria del suo utilizzo, cercando di capire la validità del suo funzionamento.

In questa fase di standardizzazione si è cercato di comprendere se il posizionamento in cella avesse potuto influire sulle scelte decisionali di dove deporre da parte delle zanzare femmine gravide, in particolare se i flussi d'aria presenti all'interno della cella climatizzata potessero in qualche modo alterare il comportamento creando flussi di odori prevalenti verso qualche direzione e quindi forzare le scelte degli insetti rispetto al luogo da preferire.

In via preliminare si è anche voluto vedere se effettivamente gli infusi potessero agire sulle zanzare pronte ad ovideporre anche in ambiente forzato e chiuso rappresentato dal volume interno del dispositivo olfattometro (gabbie e cilindri di collegamento). Per capire tale fatto si è provato l'olfattometro comparando semplice acqua di rubinetto con l'infuso standard usato in ambito di sorveglianza entomologica mediante utilizzo di Gravid Trap (fatto fermentare per questo studio 5 giorni), cioè acqua (5 l.), lievito di birra essiccato (2.5 g.), erbe di campo essiccate (30 g.).

Sono state realizzate due repliche preliminari, mettendo le vaschette singolarmente prima in una gabbia e poi nell'altra.

3.6 Prove comparative sull'efficacia di diversi infusi mediante l'uso dell'olfattometro

Terminate le fasi preliminari di progettazione, costruzione e standardizzazione si è proceduto con la parte sperimentale vera e propria, quella di un'indagine comparativa di capacità attrattiva di infusi per Gravid Trap realizzata in ambiente controllato.

Per realizzare questo studio si è voluto concentrarsi, per dare continuità di ricerca, sugli infusi prodotti e realizzati nell'ambito della prova comparativa di attrattività realizzata in campo nell'estate 2014.

I tre infusi che si sono voluti saggiare sono: l'infuso classico, l'infuso con stallatico solido e l'infuso con concime liquido.

Operativamente si è stilato un protocollo operativo giornaliero, comprensivo di tutte le operazioni da svolgere per ottenere un test di confronto che ha visto prima una fase comparativa tra infuso stallatico solido (200 g. in 5 litri di acqua) e infuso standard cioè acqua (5 l.), lievito di birra essiccato (2.5 g.), erbe di campo essiccate (30 g.) poi infuso con concime liquido (un tappino dosatore di 30 ml. in 5 litri di acqua) e infuso standard. Una seconda fase dello studio ha visto la realizzazione di altre due repliche, usando i medesimi confronti tra infusi, ma a gabbie invertite.

I dosaggi in ambito di preparazione sono stati quelli prestabiliti per quantitativi di utilizzo di 5 litri di infuso per trappola, anche se in realtà durante le repliche sono usate vaschette capaci con capacità di 150 ml.

E' stato effettuato un tentativo di replica durante l'indagine, in cui si è provato a produrre un infuso a "dosi ridotte" opportunamente proporzionate al quantitativo di acqua usata (0.5 l.).

4 RISULTATI

ATTIVITA' DI CAMPO

4.1 Dati studio comparativo sull'efficacia attrattiva di diverse trappole per zanzare.

Valutazione dello stato fisiologico ovarico

Un dato fisiologico di notevole rilevanza per l'aspetto di circolazione virale mediante il vettore zanzara è lo stato di cicli ovarici delle zanzare femmine (Hugo et al. 2009, Shin et al. 2014). Dissezioni di esemplari di zanzare sono state effettuate su dei sub-campioni di diverse specie di zanzare per valutare differenze morfologiche, ma solo per *Culex pipiens* si è indagato sullo stato ovarico dal momento che questo è il più importante vettore di West Nile Virus (WNV) in Emilia Romagna (Calzolari et al. 2010).

Per questa ragione è stata fatta un'indagine fisiologica su esemplari catturati durante lo studio. Dopo la classificazione, un campione da 30 a 70 femmine per data di cattura è stato separato e conservato in congelatore a -20 °C fino alla dissezione. Per le specie con meno di 30 femmine per data, tutti i campioni sono stati conservati per la dissezione.

Le analisi sono state fatte allo stereo microscopio con l'ausilio di pinze e aghi entomologici. Le zanzare sono state messe sopra un vetrino dopo aver rimosso le gambe e le ali. Una goccia di acqua deionizzata è stata posta alla fine dell'addome, una pinza è stata usata per tenere ferma la zanzara a livello del torace e un altro paio di pinze è stato utilizzato per estrarre gli organi interni dagli ultimi due segmenti dell'addome.

Seguendo questa procedura è stato possibile estrarre dal corpo i due ovari, collegati anatomicamente all'ultimo segmento addominale e a metterli in una goccia d'acqua deionizzata. Lo stato dello sviluppo ovarico è stato determinato seguendo le indicazioni delle fasi descritte da Christopher (Clements 1992) come segue (Figura 4.1.2):

- Ovari in stato gravido: stadio V.
- Ovari in uno stato fisiologico intermedio di sviluppo: stadi III-IV.
- Ovari nella fase iniziale di sviluppo: stadi I-II.

Un aspetto morfologico caratteristico per cercare di interpretare se un ovario ha svolto oppure no almeno un ciclo gonotrofico risulta essere l'aspetto delle tracheole presenti negli ovari. Una zanzara che non ha mai compiuto cicli gonotrofici risulterà avere tracheole con terminazioni arrotondate "a gomitolino" (stato nulliparous) mentre una zanzara che abbia fatto almeno un ciclo gonotrofico risulterà avere tracheole con terminazioni diramate (stato parous) (Figura 4.1.1a-b) (Corbet 1959, Detinova 1962, Jupp 1973, Hoc 1996). Quando non è stato possibile distinguere le condizioni fisiologiche di sviluppo ovarico si sono indicati gli individui in una terza categoria, ND: non determinato.

Sulla base della possibilità di essere infettate da un virus, le femmine sono state divise in due categorie come segue (Figura 4.1.3):

- A) potenzialmente infetta: tutte le zanzare gravide, le femmine che hanno realizzato almeno un ciclo gonotrofico e le femmine con sangue nello stomaco.
- B) non infetta: tutte le femmine nullipare senza sangue nello stomaco.

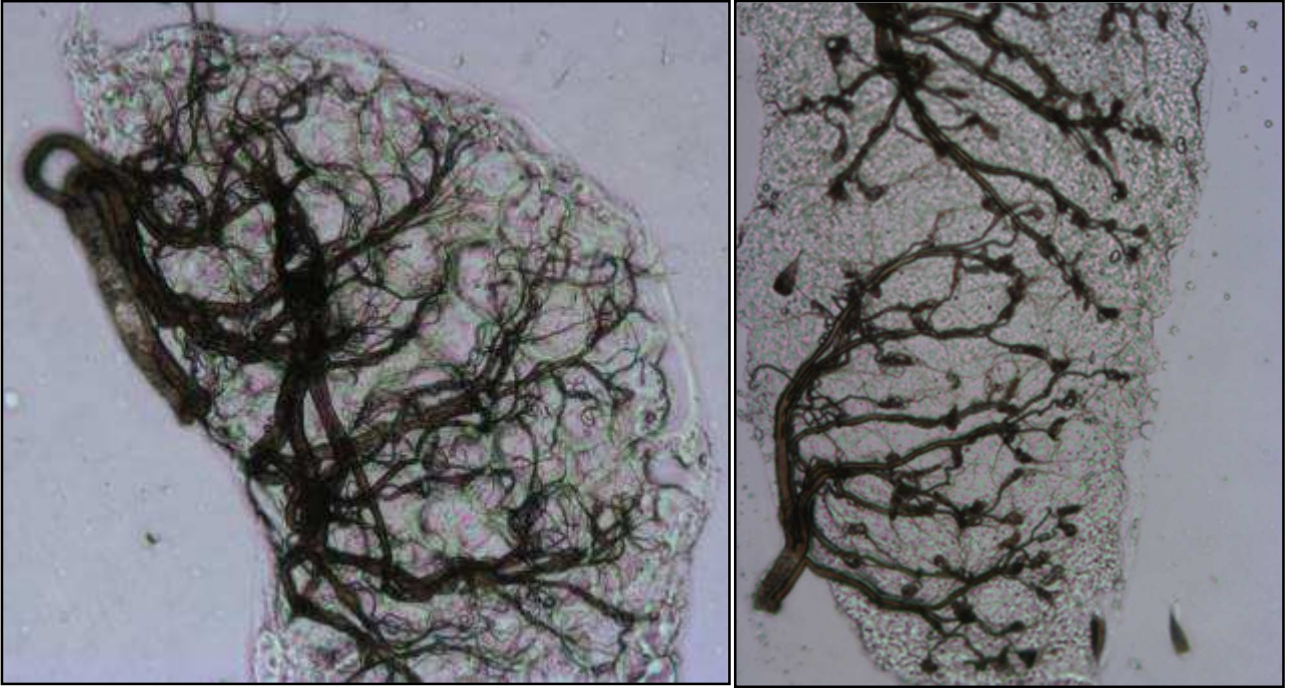


Fig. 4.1.1a-b Ovari di *Culex pipiens* (a) ovario di femmina parous, (b) ovario di femmina nulliparous.

Il riconoscimento di fasi intermedie è importante perché per entrare in fase III le femmine devono avere preso almeno un pasto di sangue, e di conseguenza c'è la possibilità per loro di essere infettate.

E' importante ricordare però un aspetto della genetica riproduttiva di *Culex pipiens* che può non chiarire l'effettiva potenzialità di una zanzara adulta di essere infetta per assunzione di sangue contagiato, cioè l'autogenia. Una zanzara può risultare pluripara (o para) avendo generato una progenie autogenica. Inoltre bisogna considerare la trasmissione verticale del WNV tra generazioni successive possibile all'interno del complesso *Culex* (Dohm et al. 2002, Goddard et al. 2003). Grazie alla trasmissione verticale il virus può rimanere negli insetti infetti e ripartire la successiva stagione favorevole causando focolai endemici e non solo presentandosi in un territorio potenzialmente idoneo dopo l'arrivo di animali serbatoi come gli uccelli migratori.

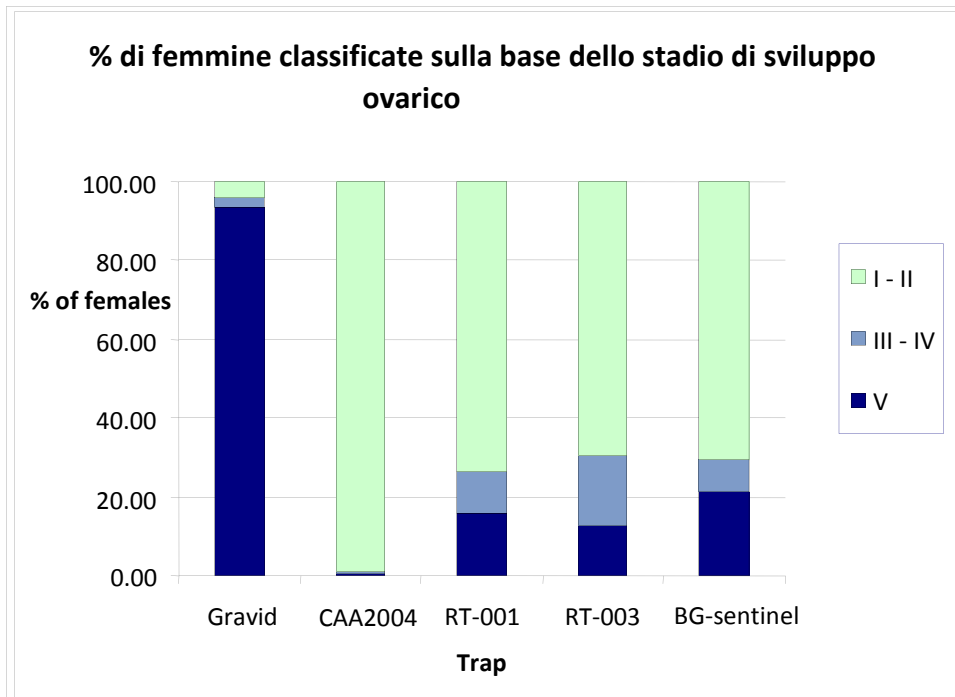


Fig. 4.1.2 Percentuali di femmine di *Cx. pipiens* appartenenti alle tre categorie fisiologiche ovariche

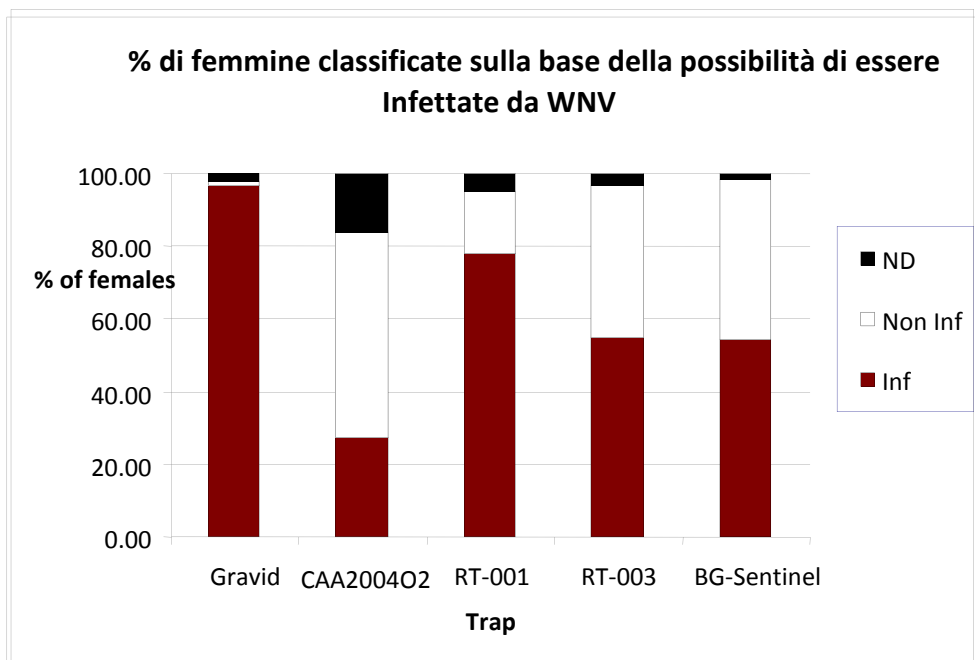


Fig 4.1.3 Percentuale di *Cx. pipiens* classificate in base alla possibilità di essere infettate con WNV

La gravid trap è stata la trappola più efficiente nel catturare *Cx. pipiens* femmine in linea teorica potenzialmente infettate dal virus (96,1%) .

Dati di cattura

Il numero totale di zanzare catturate nei tre siti d'indagine è stato 18.760, del totale 18.036 sono state femmine e 724 maschi. Considerando tutte le specie di zanzare, 6.204 femmine sono state catturate a La Rizza, 5.796 alle Vallette e 6.036 nell' Oasi Val di Sole. Le specie di zanzara catturate rientrano in quelle tipicamente presenti nelle aree rurali di pianura della zona geografica denominata del Po, ovvero *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. modestus*, *Aedes caspius*, *Ae. vexans*, *Ae. cinereus*, *Ae. albopictus* e *Anopheles maculipennis S.L.* La grande maggioranza dei campioni (85,0% dei maschi e il 86,7% delle femmine) apparteneva alla specie *Cx. pipiens*. In Tabella 1 per ogni sito di studio e per ciascuna trappola, viene riportato il numero medio di femmine per specie catturate a seduta. Nell' Oasi La Rizza le *Cx. pipiens* rappresentavano il 96,7%, mentre la *Ae. vexans* hanno raggiunto il 2,1%; tutte le altre specie citate erano presenti, ma con percentuali inferiori al 1%. Questo era l'unico luogo in cui *Ae. cinereus* è stata catturata, il 29/06/2011 con la trappola CO2-CAA 2004 (0,39%). Alle Vallette l'84,7% delle femmine erano *Cx. pipiens*, mentre *Ae. Caspius* ha rappresentato il 12,6%, e *An. maculipennis S.L.* 1,4%; *Ae. cinereus* non era presente nelle catture, mentre le altre specie citate erano inferiori all'1%. In Oasi Val di Sole il 78,4% delle femmine raccolte sono state *Cx. pipiens*, 5,0% erano *Ae. caspius* e il 16,1% erano *Cx. modestus*; tutte le altre specie erano presenti in percentuali inferiori all'1%. Di seguito sono riportate tabelle e figure con i dati riassuntivi dello studio (Tabella 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 e 4.1.5 e Figura 4.1.4 e 4.1.5).

specie	place	date	TRAP										
			BG Sentinel (attrattivo BG-Lure)		CO2 CAA		Resting bidone blu RT001		Resting cestino marrone RT003		Gravid trap		
			Fem	Male	Fem	Male	Fem	Male	Fem	Male	Fem	Male	
<i>Aedes albopictus</i>	La Rizza	17-giu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		24-giu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		29-giu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		01-lug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
		08-lug	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Le Vallette	15-lug	10	0	2	1	0	0	2	0	4	2	
		22-lug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		29-lug	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		05-ago	2	0	2	0	0	0	0	0	2	0	
		12-ago	3	0	1	0	0	0	0	0	2	0	
	Oasi Val di Sole	19-ago	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		26-ago	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		02-set	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		09-set	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		16-set	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		Total La Rizza		1	0	0	0	0	0	0	2	0	
	Total Le Vallette		19	0	5	1	0	0	2	0	8	2	
	Total Oasi Val di sole		1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
	Total Total		21	1	5	1	0	0	2	0	10	3	
<i>Aedes caspius</i>	La Rizza	17-giu	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0
		24-giu	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
		29-giu	0	0	8	0	1	0	0	0	0	0	0
		01-lug	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
		08-lug	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	Le Vallette	15-lug	0	0	571	0	1	0	0	0	0	0	0
		22-lug	0	0	57	0	0	0	0	0	0	0	0
		29-lug	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0
		05-ago	0	0	22	0	0	0	0	0	0	0	0
		12-ago	0	0	54	0	0	0	0	0	0	0	0
	Oasi Val di Sole	19-ago	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0
		26-ago	0	0	131	1	1	0	0	0	0	0	1
		02-set	1	0	27	0	1	1	0	0	0	0	0
		09-set	0	0	76	4	0	0	0	0	0	0	0
		16-set	0	0	48	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total La Rizza		0	0	33	0	1	0	0	0	0	0
	Total Le Vallette		0	0	729	0	0	0	0	0	0	0	
	Total Oasi Val di sole		1	0	297	5	2	1	0	0	0	1	
	Total Total		1	0	1059	5	3	1	0	0	0	1	
<i>Aedes cinereus</i>	La Rizza	17-giu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		24-giu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		29-giu	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0
		01-lug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		08-lug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Le Vallette	15-lug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		22-lug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		29-lug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		05-ago	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		12-ago	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Oasi Val di Sole	19-ago	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		26-ago	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		02-set	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		09-set	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		16-set	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total La Rizza		0	0	24	0	0	0	0	0	0	0
	Total Le Vallette		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Total Oasi Val di sole		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Total Total		0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Aedes vexans</i>	La Rizza	17-giu	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0
		24-giu	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0
		29-giu	0	0	93	0	0	0	0	0	0	0	0
		01-lug	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0
		08-lug	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0
	Le Vallette	15-lug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
		22-lug	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
		29-lug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		05-ago	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
		12-ago	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0
	Oasi Val di Sole	19-ago	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
		26-ago	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0
		02-set	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		09-set	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		16-set	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total La Rizza		0	0	130	0	0	0	0	0	3	0
	Total Le Vallette		0	0	18	0	0	0	0	0	3	0	
	Total Oasi Val di sole		0	0	4	0	0	1	0	0	2	1	
	Total Total		0	0	152	0	0	1	0	0	5	1	

specie	place	date	TRAP									
			BG Sentinel (attrattivo BG-Lure)		CO2 CAA		Resting bidone blu RT001		Resting cestino marrone RT003		Gravid trap	
			Fem	Male	Fem	Male	Fem	Male	Fem	Male	Fem	Male
<i>Anopheles maculipennis</i>	La Rizza	17-giu	0	0	0	0	0	0	1	0	Trap not used	
		24-giu	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		29-giu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		01-lug	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
		08-lug	0	0	4	0	0	0	0	1	0	1
	Le Vallette	15-lug	0	0	6	0	25	10	1	0	3	1
		22-lug	16	14	3	0	2	5	0	0	3	2
		29-lug	2	0	1	0	1	3	2	5	1	2
		05-ago	1	0	1	0	2	0	2	0	0	0
		12-ago	0	0	0	0	1	0	1	1	6	3
	Oasi Val di Sole	19-ago	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2
		26-ago	4	7	3	0	2	0	1	2	1	0
		02-set	1	0	0	0	0	0	5	0	2	2
		09-set	1	1	1	1	2	14	1	0	0	0
		16-set	0	1	0	0	0	2	0	5	1	0
		Total La Rizza		1	0	4	0	0	1	1	1	3
	Total Le Vallette		19	14	11	0	31	18	6	6	13	8
	Total Oasi Val di sole		6	9	4	1	4	16	7	7	8	4
	Total Total		26	23	19	1	35	35	14	14	24	15
<i>Culex modestus</i>	La Rizza	17-giu	0	0	1	0	0	0	0	0	Trap not	
		24-giu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		29-giu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		01-lug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		08-lug	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0
	Le Vallette	15-lug	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
		22-lug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		29-lug	2	0	3	0	0	0	1	0	0	0
		05-ago	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0
		12-ago	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
	Oasi Val di Sole	19-ago	1	0	41	1	0	0	0	0	2	0
		26-ago	0	0	315	0	0	0	0	0	0	0
		02-set	3	0	219	0	0	0	0	0	0	0
		09-set	2	0	198	0	0	0	0	0	0	0
		16-set	2	0	186	0	0	0	0	0	2	0
		Total La Rizza		1	0	4	0	0	0	0	0	0
	Total Le Vallette		2	0	21	0	0	0	1	0	0	0
	Total Oasi Val di sole		8	0	959	1	0	0	0	0	4	0
	Total Total		11	0	984	1	0	0	1	0	4	0
<i>Culex pipiens</i>	La Rizza	17-giu	4	4	892	0	1	0	20	13	Trap not used	
		24-giu	52	2	416	0	0	0	5	2	97	0
		29-giu	20	15	138	4	6	2	0	0	27	0
		01-lug	291	0	956	0	0	1	0	0	184	0
		08-lug	24	1	278	1	0	0	0	1	2588	1
	Le Vallette	15-lug	24	2	537	0	25	85	8	34	620	74
		22-lug	17	16	554	0	17	9	14	7	749	0
		29-lug	28	28	950	0	11	4	15	1	709	4
		05-ago	31	19	205	0	12	30	35	49	137	9
		12-ago	4	2	96	0	13	3	30	31	67	19
	Oasi Val di Sole	19-ago	6	1	135	0	0	4	0	2	1167	54
		26-ago	11	9	465	0	4	1	3	6	260	6
		02-set	11	2	382	0	2	1	11	26	223	3
		09-set	3	1	423	2	4	15	2	2	835	2
		16-set	1	4	318	0	0	1	2	6	461	0
		Total La Rizza		391	22	2680	5	7	3	25	16	2896
	Total Le Vallette		104	67	2342	0	78	131	102	122	2282	106
	Total Oasi Val di sole		32	17	1723	2	10	22	18	42	2946	65
	Total Total		527	106	6745	7	95	156	145	180	8124	172

Tab. 4.1.1 Dati di cattura totali suddivisi per data, luogo e specie

Catture totali di femmine di zanzara con le trappole testate					
Species	Gravid trap	CAA2004	Resting RT001	Resting RT003	BG Sentinel
<i>Aedes albopictus</i>	10	5	0	2	21
<i>Aedes caspius</i>	0	1059	3	0	1
<i>Aedes cinereus</i>	0	24	0	0	0
<i>Aedes vexans</i>	5	152	0	0	0
<i>Anopheles maculipennis</i>	24	19	35	14	26
<i>Culex modestus</i>	4	984	0	1	11
<i>Culex pipiens</i>	8124	6745	95	145	527
<i>Culex pipiens</i>	8124	6745	95	145	527
Other species	43	2243	38	17	59

Tab. 4.1.2 Catture esemplari femmina per trappola per specie

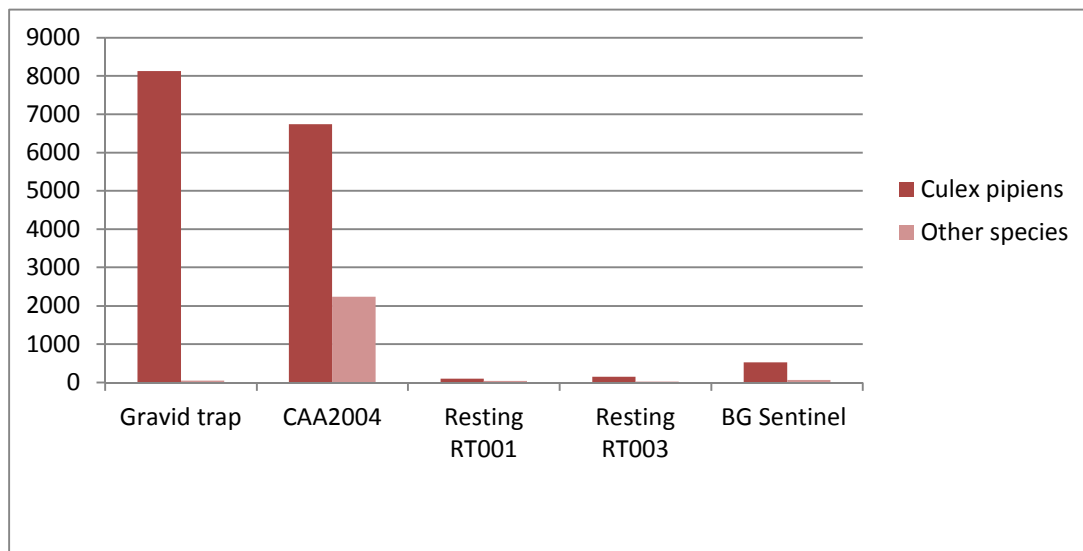


Fig. 4.1.4 Catture esemplari femmina per trappola per specie

	Catture totali di maschi di zanzara con le trappole testate				
	BG sentinel	CAA2004	Resting blu RT001	Resting cestino marrone RT003	Gravid trap
<i>Ae.albopictus</i>	1	1	0	0	3
<i>Ae.caspius</i>	0	5	1	0	1
<i>Ae.vexans</i>	0	0	1	0	1
<i>An.maculipennis s.l.</i>	23	1	35	14	15
<i>Cx.modestus</i>	0	1	0	0	0
<i>Cx.pipiens</i>	106	7	156	180	172
total	130	15	193	194	192

Tab. 4.1.3 Catture esemplari maschi per trappola per specie

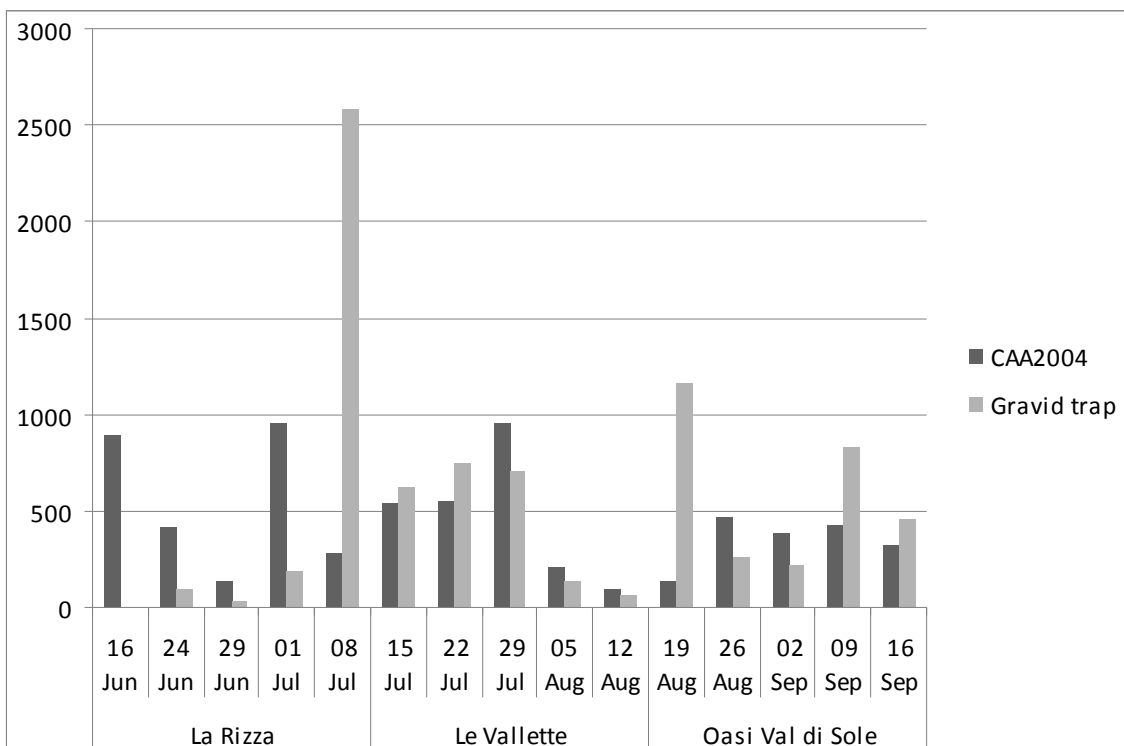


Fig. 4.1.5 Confronto andamento settimanale delle catture tra CAA2004 e Gravid Trap. I valori si intendono comprensivi di tutte le specie prese durante le singole sessioni.

Trap	All species of mosquitoes captured	catch percentages
Gravid trap	8167	45,30%
CAA2004	8988	49,80%
Resting RT001	133	0,70%
Resting RT003	162	0,90%
BG Sentinel	586	3,30%
Total mosquitoes	18036	100%

Tab. 4.1.4 Suddivisione percentuale per trappola del totale delle zanzare catturate

Trap	<i>Culex pipiens</i> captured	catch percentages
Gravid trap	8124	52,00%
CAA2004	6745	43,10%
Resting RT001	95	0,60%
Resting RT003	145	0,93%
BG Sentinel	527	3,40%
Total <i>Culex pipiens</i>	15636	100%

Tab. 4.1.5 Suddivisione percentuale per trappola del totale delle *Cx. pipiens* catturate

Attrattività delle trappole

Attrattività delle trappole nei confronti di *Cx.pipiens*

Analisi statistiche sono state realizzate considerando i luoghi di test ed i tipi di trappole. Le trappole più efficienti per attrarre *Cx. pipiens* femmine sono state CAA2004 (CO₂) e la Gravid Trap, mentre le altre sono risultate molto meno efficaci. In due siti su tre, la CAA2004 ha mostrato una minore variabilità del numero di femmine catturato rispetto alla trappola Gravid (Figura 4.1.6a-b-c). A La Rizza (Kruskal-Wallis: $H(4, N = 24) = P = 0.0013$ 17,91034), la trappola CO₂ ha catturato un numero significativamente più alto di zanzare rispetto a RT001 ($P = 0,0086$) e RT003 ($P = 0,0149$), mentre differenze statisticamente significative sono emerse solo dal confronto con le altre trappole. A Le Vallette (Kruskal-Wallis: $H(4, N = 25) = 17,72805, P = 0,0014$) la trappola CO₂ e la Gravid Trap hanno catturato un numero significativamente più elevati di femmine che la trappola RT001 (rispettivamente, $p = 0,0245$ e $p = 0,0213$), mentre non sono emerse differenze significative dagli altri paragoni. Nell' Oasi Val di Sole (Kruskal- Wallis: $H(4, N = 25) = 18,41856, P = 0,0010$) la Gravid Trap ha catturato un numero maggiore di femmine di *Cx. Papiens* rispetto sia a RT001 che a RT003 (rispettivamente $p = 0,0127$ e $P = 0,0282$), mentre l'efficacia della trappola CO₂ è risultata superiore a quello della trappola RT001 ($P = 0,0321$).

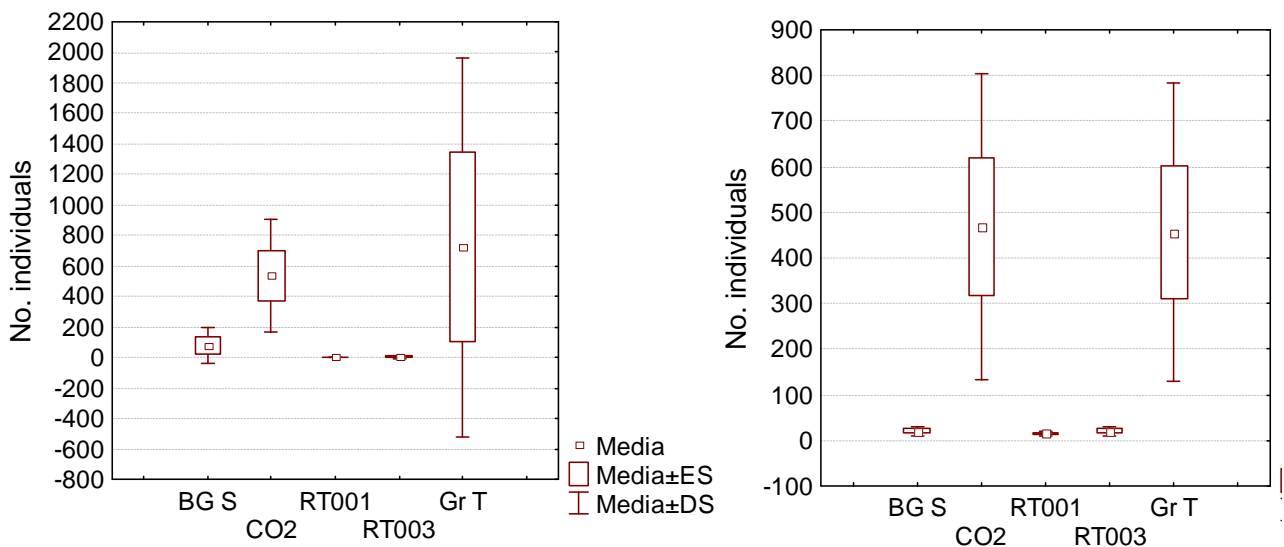


Fig. 4.1.6a-b Numero medio di *Cx. pipiens* per seduta di cattura per trappola nel sito de la Rizza (a) e le Vallette (b).

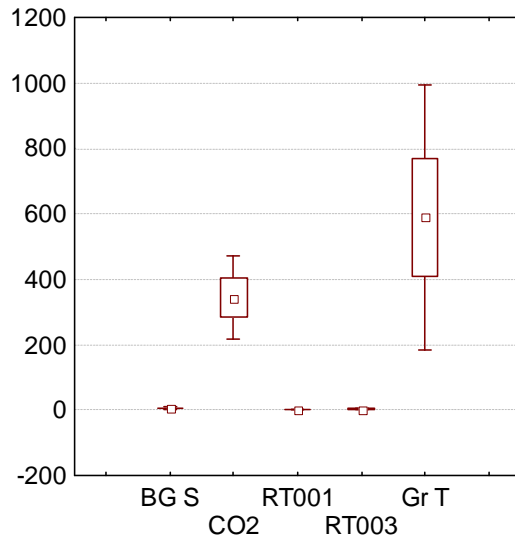


Fig. 4.1.6c Numero medio di *Cx. pipiens* per seduta di cattura per trappola nel sito di Oasi Val di Sole

Analisi delle femmine catturate in base allo stato fisiologico degli ovari

A questo scopo sono solo stati confrontate le prestazioni delle due trappole più efficienti (Gravid Trap e CAA2004). Le analisi statistiche hanno riguardato pools di zanzare catturate a Le Vallette e all'Oasi Val di Sole. Le zanzare catturate a La Rizza sono state escluse perché erano troppo secche e danneggiate per essere dissezionate. In totale, 1.117 femmine sono state analizzate, 583 catturate dalla Gravid Trap e 305 dalla trappola CAA2004.

La percentuale media di femmine gravide catturate dalla Gravid trap è stata significativamente superiore alle percentuali di esemplari appartenenti alle altre categorie di stato fisiologico (MS all'interno del gruppo = 4,5685, DF = 12, P = 0,000190). Una differenza statisticamente significativa è stata trovata tra la percentuale di femmine con ovari nella fase iniziale di sviluppo e le altre categorie catturate dalla trappola CAA2004 (MS all'interno del gruppo = 7,6148, DF = 12, P = 0,000190) (Figura 4.1.7a-b).

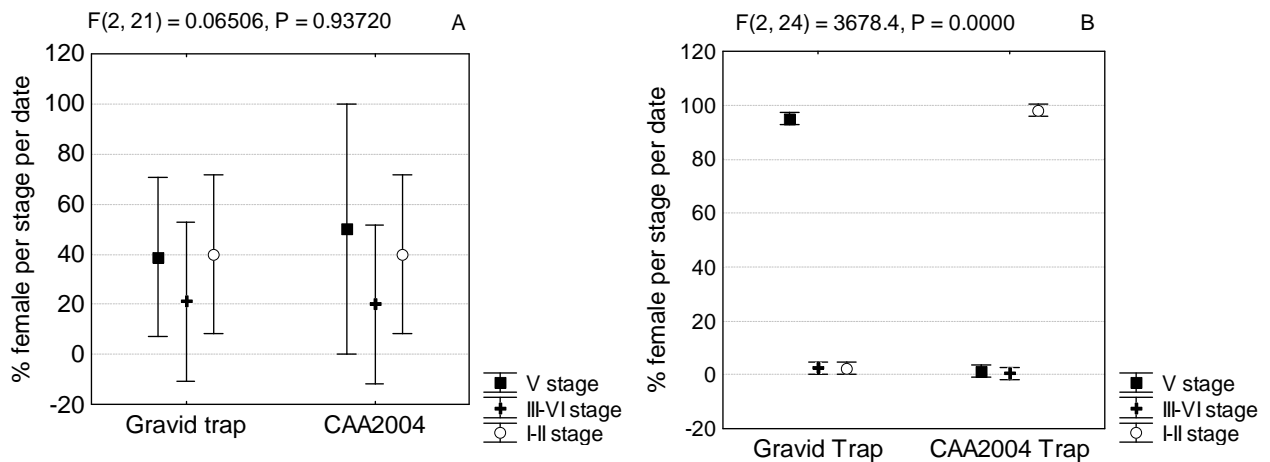


Fig. 4.1.7a-b Stadio di sviluppo delle ovari delle femmine in pool analizzati da catture da trappola CAA2004. (A) Le Vallette, (B) Oasi Val di Sole.

Efficacia della Gravid trap e della trappola CAA2004 per attirare zanzare potenzialmente infette

L'ANOVA a due vie (luogo e tipo di trappola) ha dimostrato che l'efficacia delle due trappole nell'attrarre femmine di *Cx. pipiens* potenzialmente infette (III, IV e V fase, più femmine con sangue nello stomaco) è risultata differente nei due siti ($F(3, 16) = 4,563,621$ mila, $P = 0,017,116$ mila). All'Oasi Val di Sole la percentuale di femmine potenzialmente infette catturate dalla Gravid Trap varia dal 98,4% al 100,0% nelle quattro date di campionamento, mentre a Le Vallette varia dal 0,0% al 77,8%, mostrando una grande variabilità. La CAA2004 ha mostrato minore variabilità tra i due siti, cioè 25,7-85,7% nell'Oasi Val di Sole, e tra il 47,2-78,6% a Le Vallette (Figura 4.1.8).

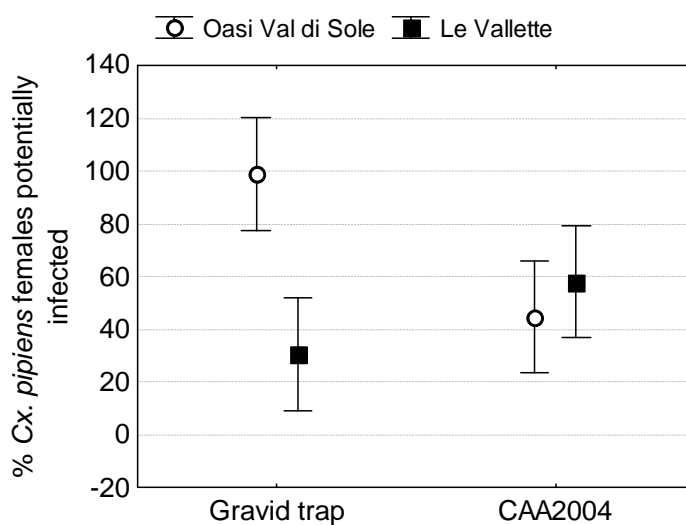


Fig. 4.1.8 Analisi di pool di zanzare potenzialmente infette catturati con Gravid Trap e CAA2004

4.2 Prova comparativa sull'efficacia di diversi infusi per Gravid Trap (anni 2012 e 2014) e dati prova in campo di un prototipo di trappola.

Studio anno 2012

Nelle tabelle 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3 sono riportati i dati inerenti le tre repliche di cattura effettuate.

Posizionamento trappole 18 settembre 2012 Infuso preparato e subito utilizzato.														
Essenza Infuso	Specie													
	Culex pipiens		Culex modestus		Anopheles maculipennis		Aedes caspius		Aedes vexans		Aedes albopictus		Altre specie	
	numero di esemplari		numero di esemplari		numero di esemplari		numero di esemplari		numero di esemplari		numero di esemplari		numero di esemplari	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Caseina	8	15	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0
Galletta di riso	35	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brodo Knorr®	40	40	0	0	1	2	2	0	0	1	3	0	0	0
Erbe secche+lievito di birra	22	15	0	0	0	0	1	2	0	0	2	0	0	0

Osservazioni varie: Nella prima sessione di catture non è stata piazzata la trappola "Sombrero-CAA". Nella trappola con l'infuso del brodo Knorr® sono state catturate 8 mosche.

Tab. 4.2.1 Dati prima replica

Posizionamento trappole 24 settembre 2012 Infuso preparato e fatto fermentare 24 ore.														
Essenza Infuso	Specie													
	Culex pipiens		Culex modestus		Anopheles maculipennis		Aedes caspius		Aedes vexans		Aedes albopictus		Altre specie	
	numero di esemplari		numero di esemplari		numero di esemplari		numero di esemplari		numero di esemplari		numero di esemplari		numero di esemplari	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Caseina	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Galletta di riso	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brodo Knorr®	21	12	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Erbe secche+lievito di birra	43	6	1	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0
"Sombrero-CAA"	17	12	0	0	0	0	6	1	0	0	4	1	0	0

Osservazioni varie: Nella trappola con l'infuso del brodo Knorr® sono state catturate 18 mosche. Nella trappola "Sombrero-CAA" sono state catturate 140 mosche.

Tab. 4.2.2 Dati seconda replica

Posizionamento trappole 15 settembre 2012 Infuso preparato e fatto fermentare 48 ore.														
Essenza Infuso	Specie													
	Culex pipiens		Culex modestus		Anopheles maculipennis		Aedes caspius		Aedes vexans		Aedes albopictus		Altre specie	
	numero di esemplari	numero di esemplari	numero di esemplari	numero di esemplari	numero di esemplari	numero di esemplari	numero di esemplari	numero di esemplari	numero di esemplari	numero di esemplari	numero di esemplari	numero di esemplari	numero di esemplari	numero di esemplari
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Caseina	28	13	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
Galletta di riso	16	16	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Brodo Knorr®	41	9	0	0	1	0	1	0	0	0	4	0	0	0
Erbe secche+lievito di birra	250	15	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
"Sombbrero-CAA"	113	20	0	0	0	0	8	6	3	0	1	0	0	0

Osservazioni varie: Nella trappola con l'infuso del brodo Knorr® sono state catturate 25 mosche. Nella trappola "Sombbrero-CAA" sono state catturate 238 mosche.

Tab. 4.2.3 Dati terza replica

Osservando i dati delle repliche di cattura, si può notare che le varie essenze hanno ottenuto risultati differenti per ciò che concerne il potere attrattivo (Figure 4.2.1 e 4.2.2).

	Totale zanzare catturate nelle repliche di cattura.	
	♀	♂
Caseina	46	35
Galletta di riso	56	40
Brodo Knorr®	115	64
Erbe secche+lievito di birra	326	46
"Sombbrero-CAA"	152	40
TOTALE	695	225

Fig. 4.2.1 Dati di cattura degli infusi e della "Sombbrero-CAA" nelle repliche di cattura

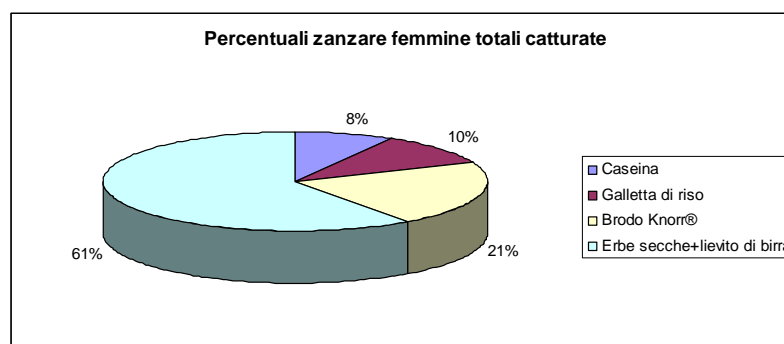


Fig. 4.2.2 Percentuali zanzare femmine catturate per i diversi infusi

Studio anno 2014

In data 02/09/2014 sono stati controllati i piattini e sono state contate le zattere di ovature nei piattini con infusi fermentati 7 giorni (Tabella 4.2.4).

N° ovature infuso con stallatico	N° ovature infuso con concime liquido	
0	0	Posizione A
0	0	Posizione B
0	2	Posizione C

Tab. 4.2.4 Ovature contate nei piattini utilizzando infuso maturato a 7 giorni di fermentazione

Una seconda fase della prova è stata impostata preparando gli infusi sempre alle stesse dosi e testando il potere attrattivo nei confronti delle zanzare ovideponenti posizionando i piattini con infusi a diversi giorni di fermentazione. In data 06/10/2014 sono stati preparati 5 litri di entrambi gli infusi e sono iniziati i posizionamenti in campo a notti successive partendo dal giorno di preparazione stesso (giorno di fermentazione 0, infuso fatto e subito utilizzato) e continuando poi, nei giorni successivi piazzando i piattini con gli infusi maturati con 1 giorno di fermentazione poi 2 giorni ed infine 3 giorni.

In data 07/10/2014 sono stati controllati i piattini e sono state contate le ovature nei piattini con infusi fatti e utilizzati subito (Tabella 4.2.5).

	N° ovature infuso con stallatico	N° ovature infuso con concime liquido	controllo 07/10/2014 (0 days fermentation)
Posizione A	0	0	
Posizione B	0	0	
Posizione C	0	0	

Tab. 4.2.5 Ovature contate nei piattini utilizzando infuso appena fatto

In data 08/10/2014 sono stati controllati i piattini e sono state contate le ovature nei piattini con infusi fermentati 1 giorno (Tabella 4.2.6).

	N° ovature infuso con stallatico	N° ovature infuso con concime liquido	controllo 08/10/2014 (1 day fermentation)
Posizione A	0	1	
Posizione B	0	0	
Posizione C	0	0	

Tab. 4.2.6 Ovature contate nei piattini utilizzando infusi fermentati 1 giorno

In data 09/10/2014 sono stati controllati i piattini e sono state contate le ovature nei piattini con infusi fermentati 2 giorni (Tabella 4.2.7).

	N° ovature infuso con stallatico	N° ovature infuso con concime liquido	controllo 09/10/2014 (2 days fermentation)
Posizione A	1	1	
Posizione B	0	0	
Posizione C	0	2	

Tab. 4.2.7 Ovature contate nei piattini utilizzando infusi fermentati 2 giorni

In data 10/10/2014 sono stati controllati i piattini e sono state contate le ovature nei piattini con infusi fermentati 3 giorni (Tabella 4.2.8).

	N° ovature infuso con stallatico	N° ovature infuso con concime liquido	controllo 10/10/2014 (3 days fermentation)
Posizione A	1	2	
Posizione B	0	0	
Posizione C	1	3	

Tab. 4.2.8 Ovature contate nei piattini utilizzando infusi fermentati 3 giorni

ATTIVITA' DI LABORATORIO

4.3 Dati prove preliminari per la standardizzazione dell'olfattometro

I dati delle prove preliminari si riferiscono a due repliche di un confronto fatto tra l'infuso standard (fermentato per 5 giorni) e acqua di rubinetto. Il parametro di valutazione è stato il numero di ovature deposte dalle zanzare gravide sulla superficie delle vaschette contenenti i liquidi infusi. Tali test hanno confermato una prevedibile preferenza delle femmine di zanzara gravide nei confronti dell'infuso standard rispetto alla semplice acqua di rubinetto come sito migliore per l'ovideposizione. Volendo testare anche l'ambiente della cella, si è deciso quindi di fare due repliche della prova invertendo le posizioni degli infusi nelle gabbie laterali rispetto alla gabbia centrale dove sono sfarfallate ogni volta le zanzare prima dei test. La prima replica ha visto l'infuso standard posizionato nella gabbia A contro la semplice acqua di rubinetto nella gabbia B. Dopo 24 ore l'infuso ha stimolato l'ovideposizione di 9 ovature mentre l'acqua solo una. Dopo 48 ore l'infuso standard ha continuato un trend crescente di stimolazione nei confronti delle zanzare gravide e si sono contate 16 ovature mentre l'acqua di rubinetto è rimasta sempre con una ovatura come dopo 24 ore. La seconda prova, a gabbie invertite, ha visto un risultato simile: infuso standard dopo 24 ore 15 ovature, dopo 48 ore 22 ovature. Acqua di rubinetto dopo 24 ore 1 ovatura, dopo 48 ore sempre 1 ovatura (Tabella 4.3.1).

Per il conteggio delle ovature si sono estratte momentaneamente le vaschette dalle gabbie per poi riporle nuovamente all'interno (Figura 4.3.1). Un interessante dato risulta dalle fasi preliminari realizzate tra il 07/11/2014 e il 18/11/2014 quando si è deciso di effettuare la seconda replica della fase preliminare creando però l'infuso standard a "dose ridotta" cioè non 5 litri, come da dose minima standard, ma solamente con 0.5 litri con dosaggi degli ingredienti adeguatamente proporzionati (0.25 g. di lievito di birra essiccato e 3 g. di erbe secche). Questa replica ha dato cattivi risultati in termini di ovature prodotte. Il numero delle zanzare adulte utilizzate in questa fase è stato di 484 maschi e di 96 femmine per un totale di 580 insetti.

	DATA	GABBIA A	GABBIA B	POST 24h GABBIA A	POST 24h GABBIA B	POST 48h GABBIA A	POST 48h GABBIA B	adulti prova
prova	04-05/11/2014	Infuso standard	H2O	9 ovature	1 ovatura	16 ovature	1 ovatura	♂=296 - ♀=26
preliminare	25-26/11/2014	H2O	Infuso standard	1 ovatura	15 ovature	1 ovatura	22 ovature	♂=188 - ♀=70

Tab.4.3.1 Ovature contate nelle repliche della prova

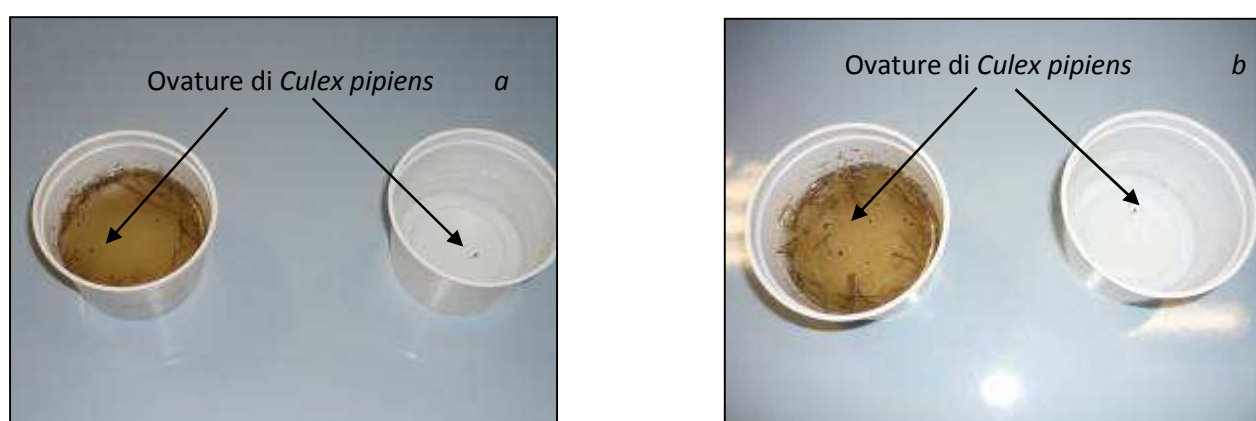


Fig. 4.3.1 Vaschette estratte dalle gabbie per conteggio ovature post 24 h (A) e medesime mostranti ovature post 48 h (B) durante una replica della fase preliminare

Di seguito viene riportata la versione originale del protocollo operativo giornaliero di tutte le fasi inerenti le prove preliminari per la standardizzazione dello strumento d'indagine usato per le successive prove comparative (Figura 4.3.2).

Prova olfattometro 2014 - protocollo operativo giornaliero		
Giorno di calendario	Giorno della settimana	NOTE OPERATIVE
29/10/2014	mercoledì	Messe pupe a sfarfallare in due sfarfallatoi per verifica di controllo sex ratio allo stereo-microscopio. Preparato 5 litri di infuso standard con acqua di rubinetto (5 L.), lievito di birra essiccato (2.5 g.) e erbe di campo secche (30g.). Sistemato il tanicotto di infuso a fermentare in cella 3 a T cost. 28°C+80% di umidità.
30/10/2014	giovedì	Raccolte pupe (miste) da allevamento interno di <i>Cx.pipiens</i> e messe in sfarfallatoio piccolo con imbuto anti-intrusione (prendere misure per dettagli tecnici) posizionato in box centrale (C). Controllo e conferma sex ratio pupe messe messe a sfarfallare in data 29/10/2014 (117♂ e 1♀). Preparato scatole con retina nella parte superiore.
31/10/2014	venerdì	Messa acqua e zucchero in gabbia centrale (C).
03/11/2014	lunedì	Messi infusi e aperti sportellini alle 11.40. Nella gabbia centrale (C) presenza di adulti sia maschi che femmine ma maggioranza di maschi (circa 2 giorni di età). Gabbia A infuso fermentato 5 giorni, gabbia B acqua di rubinetto (tap water).
04/11/2014	martedì	Ore 13: tolte le due vaschette per ovideposizione e controllato ovature. Gabbia A= 9 ovature, gabbia B= 1 ovatura. Rimesse le vaschette in gabbia per controllo giorno successivo.
05/11/2014	mercoledì	Tolta acqua e zucchero da gabbia C e vaschette da gabbia A e B per controllo ovature 2°giorno: gabbia A=16 ovature, gabbia B= 1 ovatura. Adulti in gabbia centrale lasciati morire per controllo sex ratio.
06/11/2014	giovedì	Aspirate zanzare, messe in freezer e contate: ♂=296 ♀=26. Non considerate le zanzare e le ovature trovate nel contenitore di sfarfallamento con imbuto.
07/11/2014	venerdì	Preparato infuso standard ma in dose minore (0.5 L) con adeguate proporzioni degli ingredienti: 0.5 L. acqua di rubinetto, 0.2 g. di lievito di birra essiccato e 3 g. di erbe di campo secche.
10/11/2014	lunedì	Raccolte pupe (miste) da allevamento interno di <i>Cx.pipiens</i> e messe in sfarfallatoio piccolo con imbuto anti-intrusione posizionato in box centrale (C).
11/11/2014	martedì	Messa acqua e zucchero in gabbia centrale (C).
12/11/2014	mercoledì	Pochi adulti in gabbia centrale (C) e ancora molte pupe → decis per cui di preparare nuovo infuso da usare x la prova in data 17/11/2014 dopo averlo fatto fermentare per 5 giorni (come nella prova preliminare). N.B. le zanzare avranno circa 7 giorni invece che circa 2 come nella prima prova valutativa preliminare. Non iniziata 2°parte della prova valutativa preliminare con utilizzo dell'infuso fatto in data 07/11/2014 perchè adulti troppo giovani e non ancora sfarfallati completamente.
17/11/2014	lunedì	Ore 15: messi infusi e aperti sportellini. Gabbia A: acqua di rubinetto, gabbia B: infuso standart fermentato 5 giorni. Adulti ♀ e ♂ di circa 7 gg di età.
18/11/2014	martedì	Contate ovature dopo inserimento infusi 24h prima, gabbia A (acqua) = 1 ovatura, gabbia B (infuso standard dose ridotta) = 2 ovature. Lasciati contenitori con infusi per conteggio ovature post 48h inserimento. N.B.: ipotizzato che l'infuso fatto in volume minore (0.5 L. con dosi in proporzione di lievito di birra e erbe) abbia meno efficacia. Rifare 2° prova preliminare con infuso alle erbe in 5 L. come nella prima prova preliminare (quantitativo standard per ogni GT).
19/11/2014	mercoledì	Preparato 5 litri di infuso standard con acqua di rubinetto (5 L.), lievito di birra essiccato (2.5 g.) e erbe di campo secche (30g.). Sistemato il tanicotto di infuso a fermentare in cella 1 a T cost. 28°C+80% di umidità. Tolta acqua e zucchero da gabbia C e vaschette da gabbia A e B. Tolto sfarfallatoio piccolo con imbuto anti-intrusione.
20/11/2014	giovedì	Prelevato pupe da allevamento e messe in gabbia centrale. Aspirate zanzare adulte.
21/11/2014	venerdì	Messa acqua e zucchero in gabbia centrale (C). Contate zanzare adulte aspirate il giorno precedente: 87♂ e 30♀.
24/11/2014	lunedì	Messo infusi alle ore 18.30: gabbia A acqua, gabbia B infuso standard.
25/11/2014	martedì	Contate ovature post 24 H: gabbia A: 1 ovatura, gabbia B: 15 ovature.
26/11/2014	mercoledì	Contate ovature post 48 H: gabbia A: 1 ovatura, gabbia B: 22 ovature. Si tratta di ovature piccole, ma numerose. Si notano già nate delle larve (L1) di buone dimensioni.
27/11/2014	giovedì	Aspirate zanzare, messe in freezer e contate
28/11/2014	venerdì	Contati adulti 2°prova preliminare: 188♂ e 70♀

Fig.4.3.2 Protocollo operativo giornaliero delle prove preliminari

4.4 Dati prove comparative sull'efficacia attrattiva di diversi infusi nei confronti di *Culex pipiens* mediante l'uso dell'olfattometro

Per questa prova sono stati condotte quattro repliche di confronti tra i due tipi di infusi scelti. Il numero delle zanzare adulte utilizzate in questa fase è stato di 688 maschi e di 266 femmine per un totale di 954 insetti (Figura 4.4.1).



Fig. 4.4.1 Una fase di controllo durante la prova

I dati riassuntivi della prova comparativa indicano che l'infuso standard garantisce buoni e costanti livelli di attrattività, mentre gli altri infusi non hanno mostrato altrettanta costanza di rendimento in termini di produttività di ovature (Tabella 4.4.1).

	DATA	GABBIA A	GABBIA B	POST 24h GABBIA A	POST 24h GABBIA B	POST 48h GABBIA A	POST 48h GABBIA B	adulti prova
prova comparativa	10-11/12/2014	stallatico solido	Infuso standard	7 ovature	13 ovature	7 ovature	17 ovature	♂=293 - ♀=63
	17-18/12/2014	concime liquido	Infuso standard	48 ovature	30 ovature	non riusciti a contare	non riusciti a contare	♂=156 - ♀=85
	26-27/1/2015	Infuso standard	stallatico solido	16 ovature	1 ovatura	40 ovature	2 ovature	♂=53 - ♀=80
	04-05/2/2015	Infuso standard	concime liquido	17 ovature	3 ovature	30 ovature	6 ovature	♂=186 - ♀=38

Tab. 4.4.1 Ovature contate nelle repliche della prova

Di seguito viene riportata la versione originale del protocollo operativo giornaliero di tutte le fasi inerenti lo studio comparativo (Figura 4.4.2).

PROVA COMPARATIVA INFUSI LABORATORIO 2014	04/12/2014	<i>giovedì</i>	Preparati gli infusi per prima sessione comparativa: infuso standard (5 L.) e infuso con stallatico solido (5 L. dosaggio secondo prova infusi 2014).
	05/12/2014	<i>venerdì</i>	Prelevato pupe da allevamento e messe in gabbia centrale. Inserito acqua e zucchero.
	09/12/2014	<i>martedì</i>	Messo infusi e aperti sportellini alle ore 17: gabbia A stallatico solido, gabbia B infuso standard.
	10/12/2014	<i>mercoledì</i>	Contate ovature post 24 H: gabbia A: 7 ovature ovature, gabbia B: 13 ovature.
	11/12/2014	<i>giovedì</i>	Contate ovature post 48 H: gabbia A: 7 ovature, gabbia B: 17 ovature. Aspirati adulti per conteggio ♂ e ♀. Preparati gli infusi per seconda sessione comparativa: infuso standard (5 L.) e infuso con concime liquido (5 L. dosaggio secondo prova infusi 2014).
	12/12/2014	<i>venerdì</i>	Prelevate pupe da allevamento e messe dentro imbutino nella gabbia centrale C. Messo acqua e zucchero in gabbia centrale C. Contati adulti aspirati in data 11/12/2014: 293♂ e 63♀.
	16/12/2014	<i>martedì</i>	Messo infusi nelle stesse posizioni della settimana scorsa (infuso concime liquido gabbia A, infuso standard gabbia B) e aperti sportellini alle ore 13.30.
	17/12/2014	<i>mercoledì</i>	Contate ovature post 24 H: gabbia A: 48 ovature , gabbia B: 30 ovature.
	18/12/2014	<i>giovedì</i>	Contate ovature posto 48 H ma non riuscito nell'operazione perché ovature molto numerose e parzialmente affondate da ieri. Più o meno stesso numero ovature conteggio post 24 H. Aspirati adulti per conteggio.
	19/12/2014	<i>venerdì</i>	Contati adulti aspirati in data 18/12/2014: 156♂ e 85♀.
	20/01/2015	<i>martedì</i>	Preparati gli infusi per seconda sessione comparativa (invertire le posizioni degli infusi nelle gabbie rispetto alla prima sessione comparativa): infuso standard (5 L.) e infuso con stallatico solido (5 L. dosaggio secondo prova infusi 2014).
	21/01/2015	<i>mercoledì</i>	prelevato pupe da allevamento e messe in gabbia centrale C con H ₂ O e zucchero.
	25/01/2015	<i>domenica</i>	Messo infusi in gabbia: A=infuso standard e B=stallatico solido.
	26/01/2015	<i>lunedì</i>	Contate ovature post 24h: A=16 e B=1.
	27/01/2015	<i>martedì</i>	Contate ovature post 48h: A=40 e B=2. Aspirati adulti per conteggio.
	28/01/2015	<i>mercoledì</i>	Contati adulti: 53♂ e 80♀.
	29/01/2015	<i>giovedì</i>	Preparati gli infusi per seconda sessione comparativa (invertire le posizioni degli infusi nelle gabbie rispetto alla prima sessione comparativa): infuso standard (5 L.) e infuso con concime liquido (5 L. dosaggio secondo prova infusi 2014).
	30/01/2015	<i>venerdì</i>	prelevato pupe da allevamento e messe in gabbia centrale C con H ₂ O e zucchero.
	03/02/2015	<i>martedì</i>	Messo infusi in gabbia: A=infuso standard e B=concime liquido.
	04/02/2015	<i>mercoledì</i>	Contate ovature post 24h: A= 17 e B=3.
05/02/2015	<i>giovedì</i>	Contate ovature post 48h: A=30 e B=6 . Aspirati adulti per conteggio.	
06/02/2015	<i>venerdì</i>	Contare adulti: 186 ♂ e 38 ♀.	

Fig. 4.4.2 Protocollo operativo giornaliero delle prove preliminari

5 CONCLUSIONI

ATTIVITA' DI CAMPO

La particolare situazione geografica e la conformazione stessa della penisola italiana consente la coesistenza di climi diversi a seconda delle regioni in cui ci si trova, a volte anche all'interno della stessa regione. Per esempio è presente, a carattere generale, un clima continentale a nord del paese e subtropicale nel sud. Questa situazione climatica riflette anche la distribuzione delle specie animali, in particolare le specie di artropodi. Questo fatto potrebbe spiegare l'elevato numero di tipi diversi di arbovirus (caratteristici sia di aree continentali che mediterranee) che sono stati dimostrati essere presenti in Italia (Verani et al. 1995) e che possono presentarsi, anche come nuove emergenze, sia nel presente che nel futuro prossimo.

Per quanto concerne il WNV, la maggior parte dei dati disponibili sui metodi di controllo vettoriale si riferiscono al Nord America, dove, a seguito dell'introduzione del virus nel 1999 e della sua rapida diffusione attraverso il paese, una quantità impressionante di indagini scientifiche nonché piani organizzativi nei diversi stati sono stati sviluppati (Sejvar 2003). Il motivo per cui, in contemporanea con gli Stati Uniti, un tale sforzo non è mai stato affrontato in Europa risiede nel fatto che questo virus ha avuto all'epoca, un minore impatto delle infezioni sulla salute pubblica con presenza sul territorio europeo a spot, intervalli di apparente silenzio (non riscontrata presenza) o dati di circolazione non evidenti. Tuttavia questa situazione sembra essere cambiata di recente in vari paesi dell'UE interessati da nuovi e sempre più insistenti focolai di malattie in anni consecutivi.

Gli effetti delle possibili infezioni del WNV, sia per ciò che concerne l'aspetto veterinario che umano, rappresentano dunque una preoccupazione crescente in Europa. Lo studio e la gestione dei potenziali vettori sono l'opzione principale per prevenire e controllare i focolai della malattia. La gestione del vettore è tuttavia complessa e deve essere sostenuta da appositi sistemi integrati di sorveglianza multidisciplinare e organizzati in specifici piani di risposta. Le misure di controllo dei vettori non sono facili poiché dipendono da molteplici fattori: organizzativi, logistici, operativi e comunicativi articolati in vere e proprie, spesso imponenti, "macchine strutturate" costituite da più elementi cooperanti insieme come uffici istituzionali, istituti privati, aziende sanitarie, centri di ricerca e ditte specializzate. L'esperienza degli Stati Uniti ha dimostrato che, se applicato con metodologie appropriate, il controllo degli insetti vettori nello stadio adulto può ridurre le dimensioni di un focolaio, ma gli ecosistemi europei sono diversi da quelli americani quindi, come anche per ciò che riguarda eventuali metodologie di controllo del vettore allo stadio larvale, ulteriori analisi e studi applicativi sono necessari, considerando anche differenze normative in termini di possibilità di intervento presenti nei due continenti (Bellini et al. 2014).

Il sistema di sorveglianza WNV sviluppato negli ultimi anni nella regione Emilia-Romagna ha dimostrato buoni risultati in termini di sensibilità di presenza (capacità di rilevare circolazione virale), di rilevamento precoce (capacità di individuare la circolazione del virus prima della comparsa di casi di malattia nelle persone) e specificità di zona (capacità di indicare la distribuzione spaziale del rischio di casi umani di malattia).

Il programma di sorveglianza integrato, che ha consentito di stimare preventivamente la circolazione del virus nell'ordine di tre-quattro settimane prima della comparsa del primo caso umano di malattia, ha permesso vantaggi economici in termini di analisi di sacche di sangue nell'ambito della donazione volontaria, evitando così screening di unità di sangue in caso di assenza di virus, anche in zone che sono state colpite nel corso dell'anno precedente.

Un valore aggiunto della sorveglianza attualmente impostata è la possibilità di rilevare la circolazione di altri arbovirus trasmessi sia da zanzare che altri ematofagi (come per esempio i flebotomi).

L'attività di campo proposta in questo dottorato di ricerca ha mostrato buoni risultati in termini di possibilità di affinare ancora meglio la capacità di individuare eventuale presenza virale sul territorio e quindi poter migliorare l'aspetto operativo della sorveglianza stessa. Parte degli studi effettuati hanno appurato la possibilità di implementare i metodi di indagine entomologica della sorveglianza inserendo la Gravid Trap come dispositivo ulteriore per la cattura delle zanzare potenzialmente infette.

Lo studio comparativo di diversi tipi di trappole ha sostanzialmente messo in luce interessanti risultati ai quali possono dare seguito importanti conclusioni:

1. La miglior prestazione, in termini di numero (percentuale) di individui catturati, è stata ottenuta dalla trappola CAA2004 ma considerando solo le catture di *Cx. pipiens*, la Gravid Trap ha mostrato il miglior risultato.
2. La CAA2004 è stata la sola trappola che ha raccolto tutte le specie rilevate nelle tre aree, e questo potrebbe essere considerato un aspetto importante in caso di necessità di condurre uno screening di ampio spettro d'indagine per arbovirus.
3. La BG-sentinel™ sembra essere più attraente, rispetto al resto delle trappole, per *Ae. albopictus*.
4. La RT001 è stata particolarmente attraente per *An. maculipennis s.l.*
5. Questo studio ha rivelato che la Gravid Trap può essere un efficace dispositivo per rilevare la circolazione virale (in particolare WNV) da campioni di zanzara per tre principali vantaggi rispetto alle altre trappole indagate: A) elevata selettività attrattiva nei confronti di *Cx.pipiens*. B) elevata capacità di attrarre zanzare femmine gravide grazie all'utilizzo dell'infuso che crea e simula le idonee condizioni per le ovideposizioni. C) la maggior parte di *Cx.pipiens* catturate apparteneva alla categoria "dopo pasto di sangue", quindi si possono ottenere campioni che hanno più probabilità di altri di essere vettori per WNV, ammettendo il fatto che comunque è presente l'autogenia nella specie e il virus abbia capacità di trasmissione verticale di generazione in generazione.
6. Nell'estate del 2012, dopo le evidenze di questo studio comparativo, è partita una fase sperimentale di implementazione d'indagine entomologica nel contesto della sorveglianza aggiungendo alla rete di monitoraggio regionale anche 8 Gravid Trap: in particolare sono state piazzate regolarmente in 9 turni di catture da giugno a settembre 2012 (ogni 2 settimane) 2 trappole in provincia di Ferrara, 2 in provincia di Modena, 2 in provincia di Bologna e 2 in provincia di Reggio Emilia.
7. Negli anni successivi (2013 e 2014) l'utilizzo delle Gravid Trap come metodo di indagine di circolazione virale in regione è aumentato portando il loro numero da 8 a 16 unità dislocate sempre nelle provincie di Ferrara (5 trappole), Modena (4 trappole), Bologna (3) e Reggio Emilia (4) a discapito di una diminuzione di trappole a ghiaccio secco ma mantenendo sempre un numero totale di trappole di 72 dispositivi.

Anche i test e le prove in campo riguardanti gli infusi attrattivi utilizzate per innescare il funzionamento delle Gravid Trap (e testando nel contempo una nuova tipologia di trappola), hanno fornito validi e rilevanti considerazioni conclusive:

1. Nei test del 2012, la sostanza che ha dato riscontro meno efficace è risultata essere la caseina, mentre si è avuta la conferma di ottima efficacia dell'infuso erbe secche + lievito di birra. Tra le essenze testate quella con più potere attrattivo si è dimostrato essere il brodo vegetale Knorr®.
2. Come si può notare dai dati nelle tabelle delle diverse repliche, si può osservare che c'è un trend crescente per ciò che concerne il numero di individui catturati man mano che gli infusi hanno potuto "maturare" fermentando, i numeri di cattura più elevati si osservano nella terza replica, ciò si traduce nel fatto che per queste tipologie di trappole la fermentazione per le sostanze utilizzate per gli infusi risulta indispensabile. Già comunque 48 ore invece delle standardizzate 72 ore di fermentazione possono garantire buoni risultati in termini quantitativi di insetti adulti catturati.
3. Durante le repliche di cattura la trappola con infuso realizzato con brodo Knorr® ha attirato diversi esemplari di mosche.
4. Soddisfacente è stato anche il test della trappola "Sombrero-CAA", questo tipo di dispositivo ha dato buoni numeri di esemplari catturati e l'aspetto interessante è che si sono usati solo 2 litri di soluzione invece di 5. Anche per quello che concerne la praticità di trasporto, montaggio e piazzamento il "Sombrero" è risultato di comodità maggiore rispetto la Gravid Trap americana ma un suo utilizzo in campo effettivo è ancora prematuro.
5. Nei test del 2014, la prima prova effettuata ha visto un utilizzo di infusi fermentati diversi giorni (7 giorni) seguendo indicazioni di preparazione degli infusi adoperati in prove e studi effettuati in altri paesi, come negli Usa lasciando fermentare i liquidi 7, 11, 12 o anche 14 giorni (Strickman 1988, Burkett et al. 2008). Come risultato si è ottenuta una debole risposta nei confronti delle femmine gravide, infatti sono state contate solo 2 ovature, forse il lungo periodo di fermentazione ha fatto disperdere le sostanze volatili prodotte in fase di fermentazione annullando un eventuale potere attraente degli infusi durante la permanenza in campo. Effettuando le repliche con gli infusi a diversi giorni di fermentazione si può notare, seppur nel numero limitato di ovature rilevate durante i controlli, un trend crescente nel numero di ovature deposte. Come si vede nelle tabelle dei risultati, l'infuso appena fatto e subito utilizzato non ha riscontrato interesse, mentre il numero maggiore di ovature si è riscontrato nell'infuso usato dopo 3 giorni di fermentazione.
6. E' importante considerare il periodo di prova, infatti nelle giornate di test (fine settembre-inizio ottobre) le temperature giornaliere hanno raggiunto nei valori massimi 24-25 °C, mentre nelle ore notturne la temperatura è scesa a 12-14 °C. Questo fattore (il fresco notturno) ha probabilmente agito sull'attività di volo di *Culex pipiens* rallentando il suo interesse nel cercare un luogo di sviluppo a favore di un comportamento di ricerca di un luogo di riparo, forse preparandosi a cercare un sito idoneo per svernare. Una considerazione comunque la si può trarre indicando che in fase di utilizzo di infusi (a prescindere dalla loro natura) un periodo di fermentazione è necessario per poter ottenere risultati di capacità attraente nei confronti delle zanzare gravide. Un infuso fatto e usato subito non presenta fattori e proprietà attraenti, viceversa un infuso fermentato troppi giorni produce fattori attraenti ma tende a disperderli se lo si lascia decantare troppo, annullando la sua efficacia. Un periodo di 2 o 3 giorni di fermentazione rappresenta la soluzione migliore da adottare nel caso di utilizzo di trappole adescanti esemplari di zanzare gravide mediante infusi attrattivi. Un filone interessante potrebbe essere quello riguardante lo studio e le analisi degli infusi attrattivi mediante fini metodi d'indagine come le gas cromatografie liquide, in tale maniera si potrebbero individuare quali sono, in termini di abbondanza relativa, le sostanze volatili semiochimiche principali prodotte dalla fermentazioni batteriche e che possono orientare la ricerca verso un range più

ristretto di molecole alle quali riferirsi per una prevalenza di produzione fermentativa oppure una produzione sintetica.

E' auspicabile quindi una prosecuzione degli studi degli aspetti tecnici e pratici dei dispositivi utili per catturare possibili vettori virali per migliorare sempre di più l'efficienza della sorveglianza e ottimizzare sempre di più il rapporto costi/benefici di un piano d'indagine.

ATTIVITA' DI LABORATORIO

Le attività degli studi in laboratorio hanno fornito interessanti considerazioni conclusive anche se, a causa del limitato numero di repliche realizzate, adeguati approfondimenti statistici, come per esempio la ricerca di significatività di dati attraverso ANOVA, non sono potuti essere stati realizzati.

Ciò nonostante si è intuito nella prova preliminare che i dosaggi degli ingredienti degli infusi sono molto importanti e incidono sulla fermentazione dell'infuso sotto l'aspetto di produzione di sostanze attrattive. Substrati realizzati a dosi ridotte non formano sufficienti sostanze volatili necessarie come stimolo e attrattività ovideposizionale. Questo fatto chiarisce il perché, per esempio, in altre realtà come negli USA quando si preparano gli infusi i protocolli prevedono grandi dosi di ingredienti, con adeguate proporzioni anche in cento litri di acqua.

I diversi studi testati hanno mostrato risultati differenti. In generale l'infuso standard ha mostrato risultati buoni e costanti durante le repliche effettuate, mentre gli altri due infusi studiati hanno mostrato una certa variabilità numerica delle ovature contate nelle diverse repliche (risultati incostanti). In una replica poi l'infuso con concime liquido ha mostrato un'inaspettata e sorprendente capacità attrattiva alla quale non si è saputo trovare una motivazione.

Come per le prove di campo, anche gli studi di laboratorio offrono spunti stimolanti per un'auspicabile prosecuzione delle indagini di ricerca, soprattutto cercando di puntare l'attenzione a possibili test effettuati con un numero elevato di repliche per poter esplorare i dati con possibili analisi statistiche adeguate a capire sempre meglio eventuali differenze significative sulle diverse attrattività. Un ulteriore filone d'indagine potrebbe essere quello di effettuare ricerche sugli infusi studiandone la composizione chimica attraverso analisi tipo gas-cromatografia liquida per capire che sostanze vengano prodotte dalle fermentazioni degli infusi, qual è la sostanza più attraente e cercare come poterla realizzare (attraverso reazioni apposite o anche sintetizzandola) per giungere ad un infuso dal potere attrattivo il più elevato possibile, ciò sempre considerando il contesto di una tale ricerca: una sorveglianza sempre più ottimizzata e attenta ad un rapporto costi/benefici il più positivo possibile.

6 BIBLIOGRAFIA

Allan, S. A., D. Kline. 2004. Evaluation of various attributes of gravid female traps for collection of *Culex* in Florida. *J. Vector Ecol.* 29:285-294.

Allan, S. A., U. R. Bernier, D. L. Kline. 2005. Evaluation of oviposition substrates and organic infusion on collection of *Culex* in Florida. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.:* 21(3):268-273.

Angelini, P., P. Macini, A. C. Finarelli, C. Po, C. Venturelli, R. Bellini, M. Dottori. 2008. Chikungunya epidemic outbreak in Emilia-Romagna (Italy) during summer 2007. *Parassitologia* 50: 97-98.

Angelini, P., M. Tamba, A. C. Finarelli, R. Bellini, A. Albieri, P. Bonilauri, F. Cavrini, M. Dottori, P. Gaibani, E. Martini, A. Mattivi, A. M. Pierro, G. Rugna, V. Sambri, G. Squintani, P. Macini. 2010. West Nile virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: the integrated surveillance system 2009. *Euro Surveill.*;15(16):pii=19547.

Barzon, L., M. Pacenti, E. Franchin, E. Lavezzo, G. Masi, L. Squarzon, S. Pagni, S. Toppo, F. Russo, M. Cattai, R. Cusinato, G. Palù. 2013. Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 1 and lineage 2 from human cases of infection, Italy, August 2013. *Euro Surveill.*;18(38).

Beaty, B. J., W. C. Marquardt. 1996. *The Biology of Disease Vectors.* University press of Colorado.

Becker, N. 1989. Life strategies of mosquitoes as an adaptation to their habitats. *Bull. Soc. Vector. Ecol.* 14(1):6-25.

Becker, N., A. Jost, T. Weitzel. 2012. The *Culex pipiens* complex in Europe. pp. 53.

Bentley, M. D. 1989. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. *Ann. Rev. Entomol.* 34:401-21.

Bellini, R., M. Calzolari, A. Mattivi, M. Tamba, P. Angelini, P. Bonilauri, A. Albieri, R. Cagarelli, M. Carrieri, M. Dottori, A.C. Finarelli, P. Gaibani, M.P. Landini, S. Natalini, N. Pascarelli, G. Rossini, C. Velati, C. Vocale, E. Bedeschi. 2014. The experience of West Nile virus integrated surveillance system in the Emilia-Romagna region: five years of implementation, Italy, 2009 to 2013. *Euro Surveill.*;19(44).

Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20953>.

Bellini, R., H. Zeller, W. Van Bortel. 2014. A review of the vector management methods to prevent and control outbreaks of West Nile virus infection and the challenge for Europe. *Parasites & Vectors* 7:323.

Brandler, S., F. Tangy. 2013. Vaccines in Development against West Nile Virus. *Viruses* 5, no. 10: 2384-2409.

Burkett, N.D. 2005. Comparative study of gravid trap infusion for capturing blood-fed mosquitoes (Diptera: Culicidae) of genera *Aedes*, *Ochlerotatus*, and *Culex*. Thesis, Auburn University, Alabama.

Burkett, N. D., G. R. Mullen. 2008. Comparison of infusions of commercially available garden products for collection of containerbreeding mosquitoes. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.* 24(2):236-243.

Calzolari, M., P. Bonilauri, R. Bellini, A. Albieri, F. Defilippo, G. Maioli. 2010. Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. *PLoS ONE.* 2010;5(12).

Chancey, C., A. Grinev, E. Volkova, M. Rios. 2014. The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. *BioMed Research International*, Article ID 376230.

Christophers, S. R. 1951. Note on morphological characters differentiating *Culex pipiens* L. from *Culex Molestus* Forskål and the status of these forms. Andrew Spielman Collection.

Clements, A. N. 1992. The Biology of Mosquitoes. Chapman & Hal.

Corbet, P. S. 1959. Recognition of Individuals Nulliparous and Parous Mosquitoes Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 53(3):297.

Crans, W. J. 1995. Resting boxes as mosquito surveillance tools. Proc. N. J. Mosq. Control Assoc.: 53-57.

Declich, S., A. O. Carter. 1996. Sorveglianza di sanità pubblica: origini storiche, metodi e valutazioni. Ann. Ist. Super. Sanità, vol.32 n.3:317-337.

Detinova, T. S. 1962. Age grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. Monograph Series, World Health Organization. 47:1-216.

Dogan, E. B., P. A. Rossignol. 1999. An Olfactometer for discriminating between attraction, inhibition, and repellency in mosquitoes (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 36(6):788-93.

Dohm, D. J., M. L. Sardelis, M. J. Turell. 2002. Experimental vertical transmission of West Nile Virus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 39 (4):640-644.

Dottori, M., P. Bonilauri, R. Bellini, P. Cordioli, M. Tamba, V. Sambri, M. Calzolari, P. Angelini, P. Macini, L. Venturi, R. Angelini, A. Lavazza, E. Martini, C. A. Finarelli, C. Venturelli, G. Vecchi. 2008. Primo focolaio europeo autoctono di malattia tropicale trasmessa da vettori in Romagna. Praxis Vet. 29:2-10.

Farajollahi, A., D. M. Fonseca, L. D. Kramer, K. A. Marm. 2011. "Bird biting" mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. Infect. Genet. Evol. 11:1577–1585.

- Gjullin, C. M., J. O. Johnsen, Plapp F. W. 1965.** The effect of odors released by various waters on the oviposition sites selected by two species of *Culex*. *Mosq. News* 25(3):268-71.
- Goddard, L. B., A. E. Roth, W. K. Reisen, T. W. Scott. 2003.** Vertical transmission of West Nile Virus by three California *Culex* (Diptera: Culicidae) species. *J. Med. Entomol.* 40(6):743-746.
- Gouck, H. K., C. K. Schreck. 1965.** An olfactometer for use in the study of mosquito attractants. *J. Econ. Entomol.* 58(3): pp. 589-90.
- Hazard, E. I., M. S. Mayer, K. E. Savage. 1967.** Attraction and oviposition stimulation of gravid female mosquitoes by bacteria isolated from hay infusions. *MOSQ. NEWS* 27 (2):133-36
- Hoc, T. Q. 1996.** A method for the rapid recognition of nulliparous and parous females of haematophagous Diptera. *Bull. Entomol. Res.* 86(2):137-41.
- Hoel, A. F., D. L. Kline, S. A. Allan. 2009.** Evaluation of six mosquito traps for collection of *Aedes albopictus* and associated mosquito species in a suburban setting in North Central Florida. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 25(1):47-57.
- Hugo, L. E., S. Quick-miles, B. H. Kay, P. A. Ryan. 2008.** Evaluations of mosquito age grading techniques based on morphological changes. *J. Med. Entomol.* 45:353-369.
- Jackson, B. T., S. L. Paulson, R. R. Youngman, S. L. Scheffel, B. Hawkins. 2005.** Oviposition preferences of *Culex restuans* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) for selected infusions in oviposition traps and gravid traps. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 21:360-365.
- Jupp, P. G. 1973.** Distinguishing nulliparous from parous females by the ovarian tracheation technique in four South African species of *Culex* (Diptera: Culicidae). *J Ent Soc Sth.* 36(2): 271-273.
- Kent, R. J., L. C. Harrington, D. E. Norris. 2007.** Genetic differences between *Culex pipiens molestus* and *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New York. *J. Med. Entomol.* 44 (1):50-59.

Kline, D., M. Patnaude, D. R. Barnard. 2006. Efficacy of four trap types for detecting and monitoring *Culex* spp. in North Central Florida. *J. Med. Entomol.* 43(6):1121-1128.

Kramer, W. L., M. S. Mulla. 1979. Oviposition attractants and repellents of mosquitoes: oviposition responses of *Culex* mosquitoes to organic infusions. *Environ. Entomol.* 8:1111-1117.

Leiser, B. L., J. C. Beier. 1982. A comparison of oviposition traps and New Jersey light traps for *Culex* population surveillance. *Mosq. News* 42:391-395.

Macini, P., G. Squintani, A. C. Finarelli, P. Angelini, E. Martini, M. Tamba, M. Dottori, R. Bellini, A. Santi, L. Loli Piccolomini, C. Po. 2008. Detection of West Nile virus infection in horses, Italy, September 2008. *Euro surveill.* 13(39):pii=18990.

McCall, P.J., M. M. Cameron. 1995. Oviposition pheromones in insect vectors. *Parasitol. Today* 11(9):352-55.

McPhatter, L. P., M. Debboun. 2010. Attractiveness of botanical infusions to ovipositing *Culex quinquefasciatus*, *Cx. nigripalpus*, and *Cx. erraticus* in San Antonio, Texas. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.* 25(4):508-510.

Millar, J. G., J. D. Chaney, M. S. Mulla. 1992. Identification of oviposition attractants for *Culex quinquefasciatus* from fermented bermuda grass infusions. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 8(1):11-17.

Montarsi, F., L. Mazzon, S. Cazzin, S. Ciocchetta, G. Capelli. 2015. Seasonal and Daily Activity Patterns of Mosquito (Diptera: Culicidae) Vectors of Pathogens in Northeastern Italy. *J. Med. Entomol.* 52(1):56–62.

O’Gower, A. K. 1963. Environmental stimuli and the oviposition behavior of *Aedes aegypti* var. *queenlandis*. *Anim. Behav.* 11:189-197.

O'Meara, G. F., F. E. Vose, D. B. Carlson. 1989. Environmental factors influencing oviposition by *Culex (Culex)* (Diptera: Culicidae) in two types of traps. *J. Med. Entomol.* 26:528-534.

Omrani, S. M., H. Vatandoost, M. A. Oshaghi, F. Shokri, P.M. Guerin, M. R. Yaghoobi Ershadi, Y. Rassi, S. Tirgari. 2010. Fabrication of an olfactometer for mosquito behavioural studies. *J Vector Borne Dis. Mar*;47(1):17-25.

Posey, K. H., D. R. Barnard, C. E. Schreck. 1998. Triple cage olfactometer for evaluating mosquito (Diptera: Culicidae) attraction responses. *J. Med. Entomol.* 35(3):330-34.

Reiter, P. 1983. A portable, battery-powered trap for collecting gravid *Culex mosquitoes*. *Mosq. News* 43:496-498.

Ritchie, S. A. 1984. Hay infusion and isopropil alcohol-baited CDC light trap; a simple, effective trap for gravid *Culex* mosquitoes. *Mosq. News* 44 (3):404-07.

Ritchie, S. A. 1989. Hay infusion and isopropyl alcohol-baited cdc light trap; a simple, effective trap for gravid *Culex* mosquitoes. *Mosq. News* 44(3):404-07.

Roiz, D., M. Roussel, J. Muñoz, S. Ruiz, R. Soriguer, J. Figuerola. 2012. Efficacy of mosquito traps for collecting potential West Nile mosquito vectors in a natural Mediterranean wetland. *Am. J. Trap. Med. Hyg.* 86(4):642-648.

Sejvar, J. J. 2003. West Nile Virus: an historical overview. *The Ochsner Journal.* 5(3):6-10.

Severini, F., L. Toma, M. Di Luca, R. Romi. 2009. Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti. *Fragmenta Entomologica, Roma* 41 (2), pp.23-372.

Shin, D., A. Civana, C. Acevedo, C. T. Smartt. 2014. Transcriptomics of differential vector competence: West Nile virus infection in two populations of *Culex pipiens quinquefasciatus* linked to ovary development. *BMC Genomics.* 15:513.

Sidorova, G. A., V. L. Groivtashevsky, O. V. Veselovskaya, V.M. Neronov, B. R. Rustamov, A. I. Musatova, V. P. Ipatov. 1973. Isolation of West Nile virus from ixodid and argasid ticks collected in arid regions of Uzbekistan. Sbom. Trud. Ekol. Virus. (I): 87-90.

Silver, J. B. 2007. Mosquito ecology. Springer Science & Business Media.

Smith, J. L., D. M. Fonseca. 2004. Rapid Assays for identification of members of the *Culex pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). Am. J. Trop. Med. Hyg., 70 (4):339-345.

Spielman, A. 1964. Study on autogeny in *Culex pipiens* populations in nature. Reproductive isolation between autogenous and anautogenous population. Amer. J. Hyg. 80:175-83.

Stern, G. 1980. Okologie der Hausschnake (*Culex pipiens*) und Möglichkeiten ihrer Bekämpfung. Staatsexamensarbeit, Universität Heidelberg.

Strickman, D. 1988. Rate of oviposition by *Culex quinquefasciatus* in San Antonio, Texas, during three years. J. Am. Mosq. Control Assoc. 4:339-344.

Surgeoner, G. A., B. V. Helson. 1978. An oviposition trap for arbovirus surveillance in *Culex* sp. mosquitoes (Diptera: Culicidae). Can. Entomol. 110(10):1049-52.

Tamba, M., P. Bonilauri, R. Bellini, M. Calzolari, A. Albieri, V. Sambri, M. Dottori, P. Angelini. 2011. Detection of Usutu virus within a West Nile virus surveillance program in Northern Italy. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 11(5): 551-557.

Tsai, T. F., F. Popovici, C. Cernescu, G. L. Campbell, N. I. Nedelcu. 1998. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. Lancet.;352(9130):767-71.

Unlu, I., A. F. Roy, M. Yates, D. Garrett, H. Bell, T. Harden, L. D. Foil. 2009. Evaluation of surveillance methods for detection of West Nile virus activity in East Baton Rouge Parish. J. Am. Mosq. Control Assoc. 25(2):126-133.

Verani, P., M. G. Ciufolini, L. Nicoletti. 1995. Arboviru surveillance in Italy. Parassitologia 37:105-108.

Vinogradova, Y. E. B. 1966. Blood-sucking mosquitoes of the *Culex pipiens* L. complex, their practical importance taxonomy and biology. Ent. Rev. 45:131 - 40.

Weber, R. G., C. Tipping. 1990. Drinking as a pre-oviposition behavior of wild *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Entomol. News 101(5):257-65.

White, S. L., M. P. Ward, C. M. Budke, T. Cyr, A. R. Bueno JR. 2009. A Comparison of Gravid and Under-House CO₂-Baited CDC Light Traps for Mosquito Species of Public Health Importance in Houston, Texas. J. Med. Entomol. 46(6):1494-1497.

Williams, G., J. Gingrich. 2007. Comparison of light traps, gravid traps, and resting boxes for West Nile virus surveillance. J. Of Vector Ecology, 32(2):285-291.

6 ALLEGATO

Title: Comparative study on the effectiveness of different mosquito traps in arbovirus surveillance with a focus on WNV detection.

Authors: Alex Pezzin¹, Victoria Sy¹, Arianna Puggioli¹, Rodolfo Veronesi¹, Marco Carrieri¹, Bettina Maccagnani¹, Romeo Bellini¹

Affiliation: ¹ Centro Agricoltura Ambiente "G. Nicoli", Department of Medical and Veterinary Entomology

Via Argini Nord 3351, 40014 - Crevalcore, Italy.

Corresponding Author: Bettina Maccagnani

Email: bmaccagnani@caa.it

Phone number: +39 051 6871757

Postal address: Via Argini Nord 3351

Short title: Mosquito traps effectiveness comparison

ABSTRACT

The selection of the most efficient trap for arbovirus surveillance is an issue of primary importance to increase the sensitivity and the cost/effectiveness ratio of the entomological surveillance. During the summer 2011, in the Emilia-Romagna Region (Northern Italy), five types of mosquito traps (CDC gravid trap, CO₂ baited trap, BG-Sentinel™ and two experimental prototypes) were compared to assess their effectiveness in attracting gravid mosquito females of WN vector species, and thus their usefulness for arbovirus surveillance. The study was carried out in three natural wetland sites in Bologna, Ferrara and Modena provinces, using a Latin square scheme. Single night collections of adult females were performed and determination of species and physiological state (gravid, nulliparous or parous) was made upon return to the laboratory. The species most frequently collected in the gravid trap was *Culex pipiens* L. and the large majority of the females were gravid. Species diversity was much more pronounced in CO₂ baited traps, which may therefore enable a more comprehensive description of the vector species composition and of their role in arboviruses circulation in the target area. Our findings indicate that gravid trap could be a valid tool to be integrated in the actual West Nile surveillance system in the Emilia-Romagna region, mainly based on CO₂ baited traps.

KEY WORDS: Culex pipiens, mosquito trap, West Nile, arbovirus surveillance, ovary developmental stage.

1. Introduction

The increasing international trade and tourism and the work world globalization are rapidly changing the distribution of arboviruses worldwide and pose new concerns of public health due to the increasing risk of mosquito-transmitted arboviruses. In Europe, the most dangerous mosquito-borne viruses are the four serotypes of DENV causing the dengue fever, the West Nile virus (WNV) that can cause lethal encephalitis, like also the Usutu (USUV) and Bagaza viruses (BAGV) can do (Agüero et al. 2011; Kuno et al. 1998; Roiz et al. 2012a; Vazquez et al. 2011). All these viruses belong to the Flaviviridae family, that includes also species that infect only insects, and species that infects mammals whose vector is not known (Roiz et al. 2012a). In 2007, in Northern Italy the flavivirus DNA sequences integrated in *Aedes albopictus* populations were found by Roiz et al. (2009) while in 2008 they detected a new insect flavivirus in one pool of *Aedes cinereus/geminus* mosquitoes (Roiz et al. 2012). Recently an outbreak of Chikungunya virus (CHIKV) (Togaviridae family, Alphavirus genus) vectored by *Ae. albopictus* occurred in Emilia-Romagna (Northern Italy) by a traveller returning from India (Rezza et al. 2007). This scenario requires the development of cost benefit effective surveillance programs in which entomological surveillance is an important tool for detecting emerging viruses in field-collected mosquitoes. The issue of costs is an essential aspect of the arbovirus surveillance efforts, because scarce economic resources must be used as effectively as possible, requiring a thorough analysis of the strategies that a surveillance program wants to use (Phillips et al. 1993, Scott et al. 2001). Depending on the arboviruses under surveillance, different systems exploiting non-human hosts, vector species or at risk human categories may conveniently be chosen (Brownstein et al. 2004, Edison et al. 2005). Our study was mainly oriented to the surveillance of WNV circulation, being by far the most widely distributed arbovirus in Northern Italy, without excluding the possibility to monitor other mosquito vector species.

WNV is transmitted in an avian cycle by ornithophilic mosquitoes, chiefly of the genus *Culex*, and Mammals, that can also be infected, are considered dead end hosts because viraemia is generally too low to infect mosquitoes (Reiter 2010). It has been demonstrated, both in the US and Europe (Dennet 2007, Glaser 2004, Hoel et al. 2009, Hubálek et al. 2010, Romi et al. 2004), that it is possible to organize regular mosquito surveillance programs with the aim to detect virus circulation some weeks before the appearance of human cases (Unlu et al. 2009). However, WNV can spread very quickly and easily, and may threaten human's health before its detection (Kramer et al. 2008). Bustamante and Lord (2010), using a model that simulated the

process of mosquito sampling, pooling, and virus testing, found that mosquito infection rates commonly underestimate the prevalence of arbovirus infection in a mosquito population. They conclude that other factors, like mosquito population size, age structure, weather and historical baseline data has to be considered to assess the risk of arbovirus transmission. According to Bellini et al. (2014a), as many data on arbovirus' surveillance and vector control are produced in North America, the extrapolation of information and their use to develop surveillance programs and vector control strategies in the European regions is not fully correct (and also not feasible due to different legislative frameworks). The diversity of the susceptible bird fauna and of the vector species involved in the enzootic and tangential transmission in Europe makes WNV transmission remarkably different with the US (Bellini et al. 2014a). The improvement of entomological surveillance instruments and programs can increase the reliability of the risk assessment and contribute to reduce the gap between the estimate of the infection rate and the risk of arbovirus transmission to humans and animals (Kline et al. 2006, White et al. 2009, Roiz et al. 2012b).

Mosquitoes of the genus *Culex* have been reported as the most important bridge vectors in the United States, Europe, Australia, and South Africa (Chancey et al. 2014), and to develop an efficient entomological surveillance system a deep knowledge about the following issues is necessary: i. which areas present characteristics that make them prone to virus amplification; ii. biology and ecology of the main vector species in the target areas; iii. the efficiency of the different kinds of traps in attracting the vector species, iv. the physiological status of the captured females (i.e. ratio between nulliparous and gravid females). According to Clements (1992), females can be classified based on the ovarian development as described by Christopher stages. Females can be considered gravid if their ovaries are in stage V, in an intermediate state if the ovaries are in the stages III-IV, and at the initial stage of development if the ovaries are in the stages I-II. Recognition of intermediate stages is important because, in order to enter in stage III, the female has to take a blood meal, with the chance to be infected in case the host is viraemic. Females at initial development stages I-II are mostly blood seeking females at their first blood meal, and only few of them already had one gonotrophic cycle (parous).

Concerning the efficiency of different models of traps in attracting mosquito females, Kesavaraju et al. (2011) and Allan and Kline (2004) compared some commercial models of gravid traps that presented structural differences. They found that several characteristics of the gravid traps significantly affect the mosquito collection efficacy. Commercial gravid traps models differ in basic design, color and size of the tank that contains the infusion (Allan and Kline 2004, Dennet 2007). Researches carried out on the attractiveness of different substances used to create the substrate for oviposition showed that different infusions can get different capture results. Different kinds of macerated substances are used: aquatic grass (eg *Juncus effusus*, *Rhynchospora corniculata* and *Typha latifolia*), cow manure, mix of grass clippings, wheat straw (hay) and

rabbit chow. The infusions are attractive to different mosquito species and different infusions seem to work better in certain periods than others (Burkett and Mullen 2008, Jackson et al. 2005, McPhatter 2009).

The carbon dioxide trap is widely used in Italy for vector's monitoring and surveillance. This kind of trap allows to collect large numbers of mosquitoes and appear to be highly attractive to a wide variety of mosquito species (Bellini et al. 2002, Calzolari et al. 2010).

Artificial traps called 'resting boxes' have been used to sample mosquito populations since the time of the malaria's control programs. These passive devices that function as shelters for mosquitoes during the day, seem to show different performances depending on the technical aspects of construction.

According to Williams and Gingrich (2007) the use of gravid traps could give better results for West Nile virus surveillance over light traps or resting boxes. Among the ten positive pools (all consisted of *Cx. pipiens*, *Cx. restuans*, or *Cx. salinarius*) seven were from gravid traps and three were from light traps despite testing almost 14 times as many pools from light traps. The overall infection rate from gravid traps was nearly 33 times greater than the infection rate from light traps, 2.29 and 0.07 infected mosquitoes per 1,000, respectively.

Recently Hurk et al. (2014), in Northern Australia developed CO₂-baited traps where the insects expectorate virus on honey-baited nucleic acid preservation cards. The cards can be then submitted for flaviviruses and alphaviruses detection using molecular assays. Overall, 20/144 (13.9%) of traps from different weeks contained at least one virus-positive card.

Our study was designed to test the potential effectiveness of five mosquito traps in sampling mosquito species composition in wetland habitats in the perspective of entomological surveillance programs, with a focus on the detection of WNV circulation.(Gu et al. 2008), by analyzing the attractiveness towards females in different physiological stages.

2. Materials and methods

2.1 Study period and study areas

The study was run from June, 14 to September, 16, 2011 in three wetland sites in the Emilia-Romagna region: La Rizza (44°39'41.82"N - 11°26'19.55"E), Le Vallette (44°44'33.18"N - 11°57'19.95"E) and Oasi Val di Sole (44°56'28.09"N - 11° 2'24.44"E) (Fig. 1).

La Rizza is situated in the municipality of Bentivoglio (BO); it is a natural protected area of about 1,500 hectares. The dense vegetation hosts many aquatic bird species, such as ducks, cormorants and herons. This area includes permanent wetlands, wet meadows, reed beds, copses and hedges, but also wetland tanks, fishing lakes and two observation sheds located in an expansion of the Navile canal, accessible by foot or by bicycle. A white stork (*Ciconia ciconia*) conservation centre is also present.

Le Vallette is in the municipality of Ostellato (FE). It is a wetland area of approximately 300 hectares located between two canals, which act as its boundaries. At least 150 bird species can be observed, mainly aquatic ones. Reeds are the predominant species, but trees like poplar, elm and willow are also present.

Oasi Val di Sole is a natural area located in Concordia sulla Secchia (MO), this natural protected area was derived from the excavation of clay which began in the '80s. It extends for an area of approximately 25 hectares between the Po and the Secchia rivers and consists of four main basins, two ponds, ridges and canyons that make up a rest and nesting area for several bird species. More than 200 bird species have been observed, including some quite rare species like the ferruginous duck (*Aythya nyroca*), which is the symbol of the oasis.

2.2 Mosquito traps

Five types of traps were compared in this study: the CDC gravid trap (John W. Hock Company, Gainesville, Florida, model 1712) (Fig. 2A), the CO₂ baited trap (CAA, Crevalcore, Italy, model CAA2004) (Fig. 2B), BG-S trap (BG-Sentinel™, Biogents GmbH, Regensburg, Germany) (Fig. 2C), and two experimental prototypes specifically designed and manufactured for this study by the authors (Fig. 2D-E). The infusion we used to bait the gravid trap was prepared as follows: 5 liters of tap water with 2.5 g of dry brewer yeast and 30 g of dry grass hay. The preparation was kept at 26 ± 1°C in dim light inside a wide mouth open tank for 3 days. The infusion was stirred once a day to enhance the fermentation (Burkett 2005, Irish et al. 2012, Reiter 1983, 1987). The CAA2004 trap was baited with 500 g dry ice in a single block and was hung on a tree branch at 1.5 m from the ground (Bellini et al. 2002). The BG trap was baited with the BG-Lure attractant supplied by the manufacturer. This trap is widely used in many parts of the world and is especially effective in collection of *Aedes* mosquitoes, many of which carry virus (Bhalala and Arias 2009, Bhalala et al. 2010, Farajollahi et al. 2009, Maciel-de-Freitas et al. 2006). The two experimental prototypes traps were designed as resting traps to draw mosquito samples without any kind of attractant. The containers used were a blue plastic drum of 200 L capacity lying horizontally and left open overnight (resting trap RT001); we can consider this trap as a prototype of resting box (Crans 1995) and a cylinder-shaped brown plastic basket 31 cm tall with a 30 cm diameter opening and a downward-directed 12V fan to suck approaching mosquitoes into its interior (resting trap RT003).

2.3 Mosquito collection and classification

The trial was conducted in 2011, and in each of the three study areas five stations were established at a distance of at least 15 meters one from each other. One station hosted one trap, and every week the position of the traps was changed according to a Latin square scheme. Five rotations were done in 5 consecutive weeks, so that each station hosted the five trap kinds one time. Collections were performed according to the experimental scheme reported in Table 1 one night per week, (5 collections in total). In the five stations the traps were simultaneously activated at 6:00 PM and stopped on the next morning at 9:00 AM. The collected mosquitoes were taken to the laboratory to be counted and prepared for analyses. Mosquito species determination was performed using the taxonomic keys of Schaffner et al. (2001) and Becker et al. (2010).

2.4 Assessment of *Culex pipiens* parity status

Trap types were evaluated by their effectiveness in collecting mosquitoes of differing physiological status. *Culex pipiens* females is considered the main vector of West Nile virus (WNV) in the Emilia-Romagna region (Calzolari et al. 2010). To assess its physiological status (nulliparous or parous), thirty to 70 females per collection date were sampled and stored at -20 °C until dissection. In instances where collections were less than 30 *Cx. pipiens* females, all the specimens were stored for dissection.

Mosquito dissection was performed using stereomicroscope following the method described by Detinova (1962). Ovaries were separated from the rest of the surrounding tissues using entomological needle, and placed in a drop of clean de-ionized water. When the drop dried, the ovaries were observed under the stereomicroscope. Females were assigned to three categories depending on the Christopher development stage of their ovaries, as described in Clements (1992), and classified (Corbet 1959, Hoc 1996, Jupp 1973) as follows:

- ovaries at the initial stage of development (stages I-II): these females could be either parous or nulliparous (Fig. 3B), and they were suspected of seeking a blood meal.
- ovaries in an intermediate physiological status (stages III-IV): these were parous females that had already taken a blood meal and were looking for a place to rest;
- ovaries in stage V: parous (Fig. 3A) gravid females, probably seeking a place to lay eggs.

In addition, we considered the presence of blood in the stomach as an indication of the occurrence of mating and blood feeding, and these females were classified as parous independently on their ovary stage of development.

Only females with ovaries at the initial stage of development without blood in the stomach were considered nulliparous.

When it was not possible to distinguish the parous conditions in females at an early stage of ovarian development (I-II), they were included in a third category, ND: non-determined.

Based on the possibility to be infected with a virus, females were divided into two categories:

- A) potentially infected: all the gravid and parous females, and the females with blood in the stomach.
- B) not infected: all the nulliparous females without blood in the stomach.

2.5 Descriptive analysis and statistics

In each of the three sites, the number of females and males of the most frequent species for each of the five kinds of traps were counted and percentages were calculated. To assess traps' attractiveness to different mosquito species, data were then compared by means of non parametric ANOVA (Kruskal Wallis test). In order to evaluate the capture efficiency of Gravid trap and CAA2004 of females with ovaries at different physiological status, comparisons were performed by means of 2-way ANOVA considering the site (Le Vallette and Oasi Val di Sole) and the physiological status as main factors, and the Tukey's test was used for means' separation.

3 Results

3.1 Species composition in the three study sites

The total number of mosquitoes collected in the three sites was 18,760, 18,036 of which were females and 724 males. Considering all the mosquito species, 6,204 mosquito females were captured in La Rizza, 5,796 in Le Vallette, 6,036 in Oasi Val di Sole. The mosquito species were those typically found in the Po plain rural areas: *Cx. pipiens*, *Cx. modestus* Ficalbi, *Aedes caspius* Pallas, *Ae. vexans* Meigen, *Ae. cinereus* Meigen, *Ae. albopictus* Skuse and *Anopheles maculipennis* s.l. Meigen. The large majority of the specimens (85.0 % of the males and 86.7 % of the females) belonged to the species *Cx. pipiens*. In Table 1, for each site of study and for each trap, the mean number of females per species per day is reported. In La Rizza *Cx. pipiens* accounted for 96.7 %, while *Ae. vexans* was 2.1 %; all the other species cited above were present, but with percentages well below 1%. This was the only site in which *Ae. cinereus* was captured, on 29/06/2011 with the CO2 trap

CAA2004 (0.39 %). In Le Vallette 84.7 % of the females were *Cx. pipiens*, while *Ae. caspius* accounted for 12.6 %, and *An. maculipennis* s.l. for 1.4 %; *Ae. cinereus* was not present, while the other cited species were below 1%. In Oasi Val di Sole 78.4 % of the collected females were *Cx. pipiens*, 5.0 % were *Ae. caspius* and 16.1 % were *Cx. modestus*; all the other species were present at percentages below 1%.

3.2 Trap attractiveness

Attractiveness to *Cx. pipiens*. The most efficient traps in attracting *Cx. pipiens* females were the CAA2004 (CO₂) trap and the Gravid trap, while the other ones were much less effective. In two sites out of three, the CAA2004 trap showed a lower variability in the number of females captured with respect to the Gravid Trap (fig. 4A-C). In La Rizza (Kruskal-Wallis: $H(4, N = 24) = 17.91034$, $P = 0.0013$), the CO₂ trap captured significantly higher numbers of females with respect to RT001 ($P = 0.0086$) and RT003 ($P = 0.0149$), while no statistically significant differences were detected with other traps. In Le Vallette (Kruskal-Wallis: $H(4, N = 25) = 17.72805$, $P = 0.0014$) the CO₂ trap and the Gravid trap captured significantly higher numbers of females than RT001 trap (respectively, $P = 0.0245$ and $P = 0.0213$), while no other differences were seen from the other trap comparisons. In Oasi Val di Sole (Kruskal-Wallis: $H(4, N = 25) = 18.41856$, $P = 0.0010$) the Gravid trap captured higher numbers of *Cx. pipiens* females compared to either RT001 or RT003 (respectively, $P = 0.0127$ and $P = 0.0282$), while the CO₂ trap effectiveness was higher than that of RT001 trap ($P = 0.0321$). In none of the sites there was a statistically significant difference between the efficacy of the CO₂ trap and of the Gravid trap.

Attractiveness to females according to ovary physiological status. To this aim, only the performances of the two most efficient traps (Gravid trap and CAA2004 trap) were compared. A pool of mosquito females captured in Le Vallette and in Oasi Val di Sole was made; females collected in La Rizza were excluded because they were too dry and damaged to be dissected. In total 1,117 females were analyzed, 583 had been captured in Gravid traps and 305 in CAA2004 traps. The performances of the two traps are reported in Figure 5(A-B). In Le Vallette, no statistically significant difference between the two kinds of trap was found in the percent distribution of the females according to their physiological status ($F(2, 21) = 0.06506$, $P = 0.93720$) (Fig. 5A). On the contrary, in Oasi Val di Sole the two traps performed differently ($F(2, 24) = 3678.4$, $P < 0.0001$), and the Gravid trap captured mainly gravid females (95.02 ± 3.55 %), while the CAA2004 captured mainly females with ovaries at the initial stage of development (98.04 ± 2.89 %). As depicted in figure 5B, the mean percentage of gravid females captured by the gravid trap was significantly higher than the percentages of females in the other physiological status' categories (MS within group = 4.5685, DF = 12, $P = 0.000190$). Conversely, a statistically significant difference was found between the percentage of females with ovaries at the initial stage of development and the other categories captured by the CAA2004 trap (MS within group = 7.6148, DF = 12, $P = 0.000190$).

Efficacy of Gravid trap and CAA2004 trap in attracting potentially infected *Cx. pipiens* females. The two-way ANOVA (site and kind of trap as main factors) showed that the efficacy of the two traps in attracting *Cx. pipiens* potentially infected females (III, IV and V stage plus females with blood in the stomach) was different in the two sites, as showed in figure 6 ($F(3, 16) = 4.563621, P = 0.017116$). In Oasi Val di Sole the percentage of potentially infected females captured by the Gravid trap ranged from 98.4 % to 100.0 % in the four sampling dates, while in Le Vallette it ranged from 0.0 % to 77.8 %, showing a wide variability. On the contrary, the CAA2004 trap showed much less variability between the two sites, ranging from 25.7 to 85.7 % in Oasi Val di Sole, and from 47.2 to 78.6 % in Le Vallette.

4. Discussion

The entomological surveillance may play an important role in vector-borne disease surveillance and timely precocious risk assessment thanks to the possibility to early detect arboviruses circulation (Almeida et al. 2008, 2010; Calzolari et al. 2010, Bellini 2014a, 2014b). A number of different mosquito collecting traps have been developed to survey/monitor vector mosquito species (Service 1993), that should accomplish two main trait: i) early detection capacity when focused on one specific arbovirus which is known to occur in the area; ii) large spectrum investigation effectiveness when oriented to the surveillance of all the known possible arboviruses that could be present in the area. In the first case, when the vector species is/are well known, the selection criteria for the choice of the trap should conveniently be the performance in capturing the target vector species. In the second case, it might be convenient to rely on traps that collect a larger number of mosquito species (Hubálek et al. 2010, Roiz et al. 2012b).

Our study was designed i) to increase the efficiency of the entomological surveillance plan in the Emilia-Romagna region, which currently relies on CO₂ baited traps and is mainly targeted to the WNV surveillance (Calzolari et al. 2010, Carrieri et al. 2014, Bellini et al. 2014a, 2014b); ii) to increase the efficacy of the plan in detecting the vector mosquito species composition, standing the risk of other vector-borne human diseases, like Chickungunya, Dengue and Usutu fever. According to our results, the best performing trap in terms of absolute number of captured mosquitoes was the Gravid trap, while the CAA2004 trap was more efficient in attracting a wider spectrum of species. In fact, five mosquito species were detected by Gravid traps, (only two species at noticeable percentages) in comparison to the seven mosquito species captured by the CAA2004 CO₂-baited trap. CAA2004 trap performed very well either on *Culex* sp. or *Aedes* sp., and it was the only one capturing *Ae. cinereus*, while it was less efficient in attracting *Anopheles* sp.. The Gravid trap showed low efficiency towards *Aedes* species as well as towards *Cx. modestus*. All of the three other kinds of trap -

the BG Sentinel and the two prototypes of resting trap - showed much lesser performances in comparison to the previous ones. RT001 was somewhat attractive to *An. maculipennis* s.l., while BG-S seemed to be more attractive than the other traps for *Ae. albopictus* as expected, being this trap designed to catch *Aedes Stegomyia* mosquitoes. As a conclusion, to the aim of improving the surveillance program on WNV circulation in the region, Gravid traps and CAA2004 were the most performing traps in attracting *Cx. pipiens* females, while BG S, and the non-activated resting boxes RT001 and RT003 proved to be not suitable for wide area monitoring plans.

Regarding to species composition, *Cx. pipiens* was the dominant species in all of the three sites. *Aedes cinereus* was captured only in La Rizza, while in Le Vallette *Ae. caspius* showed a much higher percentage than in the other sites. The presence of *An. maculipennis* s.l. was fairly homogeneously distributed among the three sites at low percentages (below 1.0 %), while *Cx. modestus* was captured at noticeable numbers in Oasi Val di Sole. The number of specimens of *Ae. albopictus* was low in all of the three sites, as expected on the basis of the bioecology of the species, but in Le Vallette it was somewhat higher than in the other places, probably because of the presence of factories nearby, with potentially active breeding sites, likely catch basins.

The physiological status of the ovaries of *Cx. pipiens* females showed a relevant difference between the pools captured in Le Vallette and in Oasi Val di Sole. In Le Vallette no statistically significant difference was found in the percent distribution by stage of ovary development between Gravid trap and CAA2004 trap. On the contrary, in Oasi Val di Sole the Gravid trap captured almost exclusively females with ovaries in the V stage, while CAA2004 trap attracted at the same level females with ovaries at the initial stage of development. When also the presence of blood in the stomach is considered an indication that the female has got in contact with the virus, the interaction between kinds of trap and study areas was somewhat reduced (Fig. 6), and the difference in attractiveness between Gravid trap and CAA2004 trap to potentially infected females between the two sites was less meaningful. This findings lead to two considerations: the first is that ecological factors can affect species diversity and abundance of the mosquito collections by different kinds of trap. In particular, it is likely that Gravid trap attractiveness to females ready to lay eggs can be influenced by local factors; this means that a number of traps placed in diverse ecological situations should be used to ensure a realistic picture of mosquito population. Secondly, the analysis of the presence of blood in the stomach showed that also CAA2004 CO₂ traps attract potentially infected females, and the more constant functioning of the CAA2004 trap in comparison to Gravid trap make the former a reliable tool for mosquito surveillance programs. Despite the difficulty in standardizing their performance, Gravid traps can be considered an effective additional tool to increase the fraction of collected females suitable for being analyzed for of WNV

and other arboviruses, as they can increase the probability to detect infected females, in agreement with other authors (Godsey et al. 2005, Reiter 1983).

In the Emilia-Romagna region, since 2009 a system integrating environmental (mosquitoes and birds) and human surveillance has been implemented and progressively improved. The monitoring plan relies mainly on CO₂- baited traps with the addition in 2013 and 2014, respectively, of 7 and 9 Gravid traps. The system has shown highly satisfactory results in terms of early detection capacity (the environmental surveillance component allowed detection of WNV circulation 3–4 weeks before human cases of WN Neuroinvasive Disease occurred) (Chancey et al. 2014, Bellini et al. 2014b), sensitivity (capacity to detect virus circulation even at the enzootic level) and area specificity (capacity to indicate the spatial distribution of the risk for WNND) (Bellini et al. 2014b). No data are available on the different contribution of CO₂ traps and Gravid traps to virus detection, thus further effort should be made to systematically extend the comparison between the two kinds of trap in different habitats on the large scale.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by the Health Department, Emilia-Romagna region, DGR N. 2113/2010 “Experimental program for the integrated medical & veterinary monitoring of arthropod transmitted diseases”.

The study is part of the PhD research program of Alex Pezzin “Development of tools and methods for the surveillance and monitoring of Culicid species of sanitary importance” at the Department of Agroenvironmental Sciences and Technologies of the University of Bologna.

REFERENCES CITED

Agüero, M., J. Fernández-Pinero, D. Buitrago, A. Sánchez, M. Elizalde, E. San Miguel, R. Villalba, F. Llorente, M.A. Jiménez-Clavero, 2011. Bagaza Virus in Partridges and Pheasants, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 17(8), 1498–501.

Allan, S.A. and D. Kline, 2004. Evaluation of various attributes of gravid female traps for collection of *Culex* in Florida. *J. Vector Ecol.* 29, 285-294.

Almeida, A.P.G., Galão R.P., Sousa C.A., Novo M.T., Parreira R., Pinto J., Piedade J., Esteves A., 2008. Potential mosquito vectors of arboviruses in Portugal: species, distribution, abundance and West Nile infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102(8), 823-832.

Almeida, A.P.G., Freitas F.B., Novo M.T., Sousa C.A., Rodrigues J.C., Alves R., A. Esteves, 2010. Mosquito surveys and West Nile Virus screening in two different areas of Southern Portugal, 2004-2007. *Vec. Bor. Zoon. Dis.* 10(7), 673-680.

Becker, N., Petrić D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C., 2010. *Mosquitoes and their control*. Heidelberg, Dordrecht, New York: Springer.

Bellini, R., Veronesi R., Gentile G., Pandolfi N., 2002. Optimization of carbon dioxide traps for mosquito monitoring in Italy. 68th Ann. Meet. Am. Mosq. Control Assoc., Denver, Colorado, February 16-21.

Bellini, R., Zeller H., Van Bortel W., 2014.a A review of the vector management methods to prevent and control outbreaks of West Nile virus infection and the challenge for Europe. *Parasites & Vectors.* 7, 323 <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/323>

Bellini, R., Calzolari M., Mattivi A., Tamba M., Angelini P., Bonilauri P., Albieri A., Cagarelli R., Carrieri M., Dottori M., Finarelli A.C., Gaibani P., Landini M.P., Natalini S., Pascarelli N., Rossini G., Velati C., Vocale C., Bedeschi E.. The experience of West Nile virus integrated surveillance system in the Emilia-Romagna region: five years of implementation, Italy, 2009 to 2013, . 2014b. Euro Surveill;19(44):pii=20953. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20953>

Bhalala, H.V., Arias J.R., 2009. The Zumba™ mosquito trap and BG-Sentinel™ trap: novel surveillance tools for host-seeking mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 25, 134-139.

Bhalala, H.V., Smith J.D., O’Dea B.A., Arias J.R., 2010. The efficacy of the BG-Sentinel™ CO2 nozzle in collecting host-seeking mosquitoes in Fairfax County, Virginia. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 26(2), 226-228.

Brownstein, J.S., Holford T.R., Fish D., 2004. Enhancing West Nile virus surveillance, United States Emerg. Infect. Dis. 10(6), 1129-1133.

Burkett, N.D., 2005. Comparative study of gravid trap infusion for capturing blood-fed mosquitoes (Diptera: Culicidae) of genera *Aedes*, *Ochlerotatus*, and *Culex*. Thesis, Auburn University, Alabama. http://etd.auburn.edu/bitstream/handle/10415/771/BURKETT_NATHAN_18.pdf?sequence=1

Burkett, N.D., Mullen G.R., 2008. Comparison of infusions of commercially available garden products for collection of container breeding mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 24 (2), 236-243. doi: <http://dx.doi.org/10.2987/5597.1>

Calzolari, M., Bonilauri P., Bellini R., Caimi M., Defilippo F., Maioli G., Albieri A., Medici A., Veronesi R., Pilani R., Gelati A., Angelini P., Parco V., Fabbi M., Barbieri I., Lelli D., Lavazza A., Cordioli P., Dottori M., 2010.

Arboviral survey of mosquitoes in two Northern Italy regions in 2007 and 2008. *Vec. Borne Zoon. Dis.* DOI: 10.1089=VBZ.2009.0176.

Carrieri, M., Fariselli P., Maccagnani B., Angelini P., Calzolari M., Bellini R., 2014. Weather factors influencing the population dynamic of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): analysis of the period 1997-2011 in the Po Plain Valley, Italy. *Environ. Entomol.* 43(2), 482-90. doi: 10.1603/EN13173.

Chancey, C., Grinev A., Volkova E., M. Rios., 2014. The global ecology and epidemiology of West Nile Virus. Hindawi Publishing Corporation, *BioMed. Res. Int.*, Article ID 376230.

Clements, A.N., 1992. The biology of mosquitoes. Vol. 1. Chapman and Hall..London.

Corbet, P.S., 1959. Recognition of individuals nulliparous and parous mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 53(3), 297.

Crans, W.J., 1995. Resting boxes as mosquito surveillance tools. Proceedings of the 82nd Annual Meeting of the New Jersey Mosquito Control Association; Atlantic City, NJ. 7-10 March 1995; New Brunswick, NJ: New Jersey Mosquito Control Association Inc. pp. 53–57.

Dennet, J.A., 2007. Description and use of the Harris county gravid trap for West Nile virus surveillance 2003-06. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23(3), 359-362.

Detinova, T.S., 1962. Age grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. Monograph Series, World Health Organization 47, 1-216.

Dulce, M., Bustamante, Lord C.C., 2010. Sources of error in the estimation of mosquito infection rates used to assess risk of arbovirus transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82(6), 1172–1184.

Edison, M., K. Schmit, Y. Hagiwara, M. Anand, P.B. Backenson, I. Gotham, Kramer L., 2005. Dead crow density and West Nile virus monitoring, New York. *Emerg. Infect. Dis.* 11(9), 1370-1375.

Farajollahi, A., Kesavaraju B., Prince D.C., Williams G.M., Healy S.P. Gaugler R., Nelder M.P., 2009. Field efficacy of BG-Sentinel and industry-standard traps for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and West Nile Virus surveillance. *J. Med. Entomol.* 46(4), 919-925.

Glaser, A., 2004. West Nile virus and North America: an unfolding story. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 23(2), 557-568.

Godsey, J.R., 2005. West Nile Virus-infected mosquitoes, Louisiana, 2002. *Emerg. Infect Dis.* 11(9), 1399-1404.

Gu, W., Unnascha T.R., Katholib C.R., Lampman R., Novak R.J., 2008. Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. and Hyg.* 102, 817-822....DOI:10.1016/j.trstmh.2008.03.019.

Hoc, T.Q., 1996. A method for the rapid recognition of nulliparous and parous females of haematophagous Diptera. *Bull. Entomol. Res.* 86(2), 137-41.

Hoel, A.F., Kline D.L., Allan S.A., 2009. Evaluation of six mosquito traps for collection of *Aedes albopictus* and associated mosquito species in a suburban setting in North Central Florida. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 25(1), 47-57.

Hubálek, Z., Rudolf I., Bakonyi T., Kazdová K., Halouzka J., Šebesta O., Šikutová S., Juřicová Z., Nowotny N., 2010. Mosquito (Diptera: Culicidae) surveillance for arboviruses in an area endemic for West Nile (Lineage Rabensburg) and Tahyia Viruses in Central Europe. *J. Med. Entomol.* 47(3), 466-472.

Hurk, van den A. F., Hall-Mendelin S., Townsend M., Kurucz N., Edwards J., Ehlers G., Rodwell C., Moore F.A., McMahon J.L., Northill J.A., Simmons R.J., Cortis G., Melville L., Whelan P. I., Ritchie S. A., 2014. Applications of a sugar-based surveillance system to track arboviruses in wild mosquito populations. *Vec. Borne Zoon. Dis.* 14 (1), 66-73.

Irish, S.R., Moore S.J., Bruce J., Cameron M.M., 2012. Effect of the volume of organic infusion used in gravid traps for collecting *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 49(5), 1118-1123.

Jackson, B.T., Paulson S.L., Youngman R.R., Scheffel S.L., Hawkins B., 2005. Oviposition preferences of *Culex restuans* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) for selected infusions in oviposition traps and gravid traps. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 21:360-365.

Jupp, P.G., 1973. Distinguishing nulliparous from parous females by the ovarian tracheation technique in four South African species of *Culex* (Diptera: Culicidae). *J. Ent Soc. Sth.* 36(2), 271-273.

Kesavaraju, B., Kiyoguchi, D. Dickson, S., 2011. Efficacy of Gravid Traps in Trapping *Culex pipiens*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 27, 320-322.

Kline, D., Patnaude M., Barnard D.R., 2006. Efficacy of four trap types for detecting and monitoring *Culex* spp. in North Central Florida. *J. Med. Entomol.* 43(6), 1121-1128.

Kramer, L.D., Styer L.M., Gregory D.E., 2008. A global perspective on the epidemiology of West Nile Virus. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 61-81.

Kuno, G., Chang G.J., Tsuchiya K.R., Karabatsos N., Cropp C.B., Phylogeny of the genus Flavivirus., 1998. *J. Virol.* 72(1),73–83.

Maciel de-Freitas, R., Eiras A.E., de-Oliveira R.L., 2006. Field evaluation of effectiveness of the BG-sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 101(3), 321-325.

McPhatter, L.P., Olsen C.H., Debboun M., 2009. Comparison of the attractiveness of organic Infusions to the standard CDC Gravid mosquito trap. *US Army Med. Dep. J.* Jul-Sep:91-6.

Phillips, M., Mills A., Dye C., 1993. Guidelines for cost effective analysis of vector control. PEEM Secretariat, World Health Organization. Geneva. WHO/CWS/93.4.

Reiter, P., 1983. A portable, battery-powered trap for collecting gravid *Culex* mosquitoes. *Mosq. News* 43, 496-498.

Reiter, P., 1987. A revised version of the CDC gravid mosquito trap. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 3, 325-327.

Reiter, P., 2010. West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future. *Euro Surveill.* 15(10):pii= 19508. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19508>

Rezza, G., Nicoletti L., Angelini R., Romi R., Finarelli A.C., Panning M., Cordioli P., Fortuna C., Boros S., Magurano F., Silvi G., Angelini P., Dottori M., Ciufolini M.G., Majori G.C.:Cassone A., 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*, 370(9602), 1840–1846

Roiz, D., Vazquez A., Seco M.P., Tenorio A., Rizzoli A., 2009. Detection of novel insect flavivirus sequences integrated in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Northern Italy. *Virology J.* 6, 93.

Roiz, D., Vázquez A., Rosso F, Arnoldi D., Girardi M., Cuevas L., Perez-Pastrana E., Sánchez-Seco M.P., Tenorio A., Rizzoli A., 2012a. Detection of a new insect flavivirus and isolation of *Aedes flavivirus* in Northern Italy. *Parasites & Vectors*, 5, 223. doi:10.1186/1756-3305-5-223.

Roiz, D., Roussel M., Muñoz J., Ruiz S., Soriguer R., Figuerola J., 2012b. Efficacy of mosquito traps for collecting potential West Nile mosquito vectors in a natural Mediterranean wetland. *Am. J. Trap. Med. Hyg.* 86(4): 642-648.

Romi, R., Pontuale G., Ciuffolini, M.G. Fiorentini G., Marchi A., Nicoletti L., Cocchi M., Tamburro A., 2004. Potential vectors of West Nile Virus following an equine disease outbreak in Italy. *Med. Vet. Entomol.* 18(1),14-19.

Scott, T.W., Wright S.A., Eldridge B.F., Brown D.A., 2001. Cost effectiveness of three Arbovirus surveillance methods in Northern California. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 17(2), 118-123.

Schaffner, F., Angel G., Geoffrey B., JHervy-P., Rhaïem A., Brunhes J., 2001. *The mosquitoes of Europe*. Montpellier: IRD & EID Méditerranée; CD-ROM.

Service, M.W., 1993. *Mosquito ecology: field sampling methods*. 2nd ed. Elsevier, London.

Unlu, I., Roy A.F., Yates M., Garrett D., Bell H., Harden T., Foil L.D., 2009. Evaluation of surveillance methods for detection of West Nile virus activity in East Baton Rouge Parish. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 25(2), 126-133.

Vazquez A., Jimenez-Clavero M., Franco L., Donoso-Mantke O., Sambri V., Niedrig M., Zeller H., Tenorio A., 2011. Usutu virus - potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveill.* 31,16.

White, S.L., Ward M.P., Budke C.M., Cyr T., Bueno R. Jr., 2009. A Comparison of gravid and under-house CO₂-baited CDC light traps for mosquito species of public health importance in Houston, Texas. *J. Med. Ent.* 46(6), 1494-1497.

Williams, G. M., Gingrich J. B., 2007. Comparison of light traps, gravid traps, and resting boxes for West Nile virus surveillance. *J. Vector Ecol.* 32, 285–291.

Table 1. Experimental scheme

Site	Period	Frequency of collection	No. collections	Details
La Rizza	June 24 – July 8	Once per week	5	CO ₂ trap was not working on June 29
Le Vallette	July 15 – August 5	Once per week	5	-
Oasi Val di Sole	August 19 – September 16	Once per week	5	

Table 2.

Site	Species	CO2		Gr T		BG S		RT001		RT003	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
La Rizza	<i>Aedes albopictus</i>	0,00	0,00	0,50	1,00	0,20	0,45	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>Aedes caspius</i>	6,60	3,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,45	0,00	0,00
	<i>Aedes cinereus</i>	4,80	10,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>Aedes vexans</i>	27,80	36,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>Anopheles maculipennis</i>	0,80	1,79	0,00	0,00	0,20	0,45	0,00	0,00	0,20	0,45
	<i>Culex modestus</i>	0,80	1,30	0,00	0,00	0,20	0,45	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>Culex pipiens</i>	536,00	368,27	724,00	1244,32	78,20	120,21	1,40	2,61	5,00	8,66
Le Vallette	<i>Aedes albopictus</i>	1,00	1,00	1,60	1,67	3,80	3,77	0,00	0,00	0,40	0,89
	<i>Aedes caspius</i>	145,80	238,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,45	0,00	0,00
	<i>Aedes cinereus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>Aedes vexans</i>	3,60	3,36	0,60	0,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>Anopheles maculipennis</i>	2,20	2,39	2,60	2,30	3,80	6,87	6,20	10,52	1,20	0,84
	<i>Culex modestus</i>	4,20	4,09	0,00	0,00	0,40	0,89	0,00	0,00	0,20	0,45
	<i>Culex pipiens</i>	468,40	336,17	456,40	327,81	20,80	10,76	15,60	5,73	20,40	11,50
Oasi Val di Sole	<i>Aedes albopictus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,45	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>Aedes caspius</i>	59,40	46,24	0,00	0,00	0,20	0,45	0,40	0,55	0,00	0,00
	<i>Aedes cinereus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>Aedes vexans</i>	0,80	1,30	0,40	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>Anopheles maculipennis</i>	0,80	1,30	1,60	1,52	1,20	1,64	0,80	1,10	1,40	2,07
	<i>Culex modestus</i>	191,80	98,40	0,80	1,10	1,60	1,14	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>Culex pipiens</i>	344,60	129,11	589,20	404,10	6,40	4,56	2,00	2,00	3,60	4,28

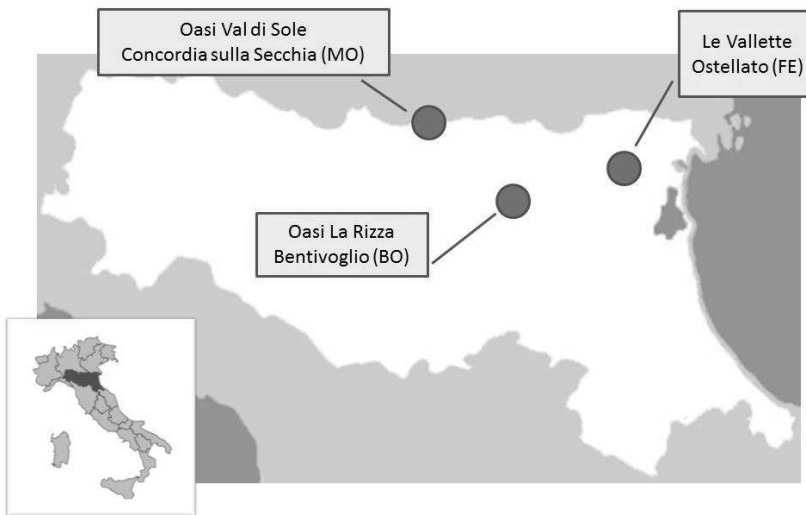


Fig. 1. Map of the study sites.



Figure 2. the five kinds of traps. (A) Gravid trap, (B) CO₂-baited trap, (C) BG Sentinel trap, Resting trap 1 RT001, Resting Trap 3 RT003

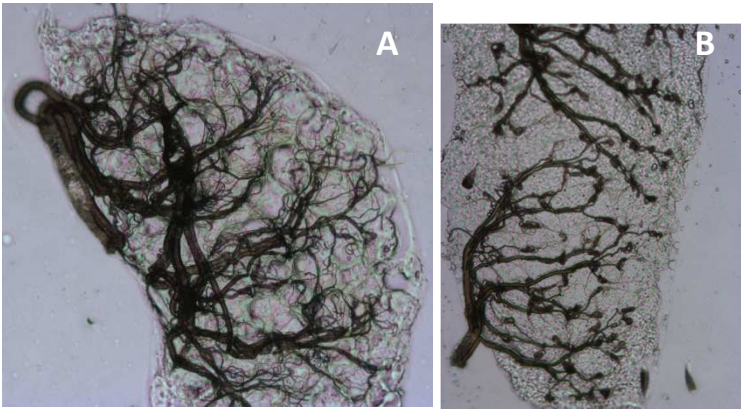


Fig. 3. Ovaries of *Culex pipiens*. (A) parous female's ovary, (B) nulliparous female's ovary.

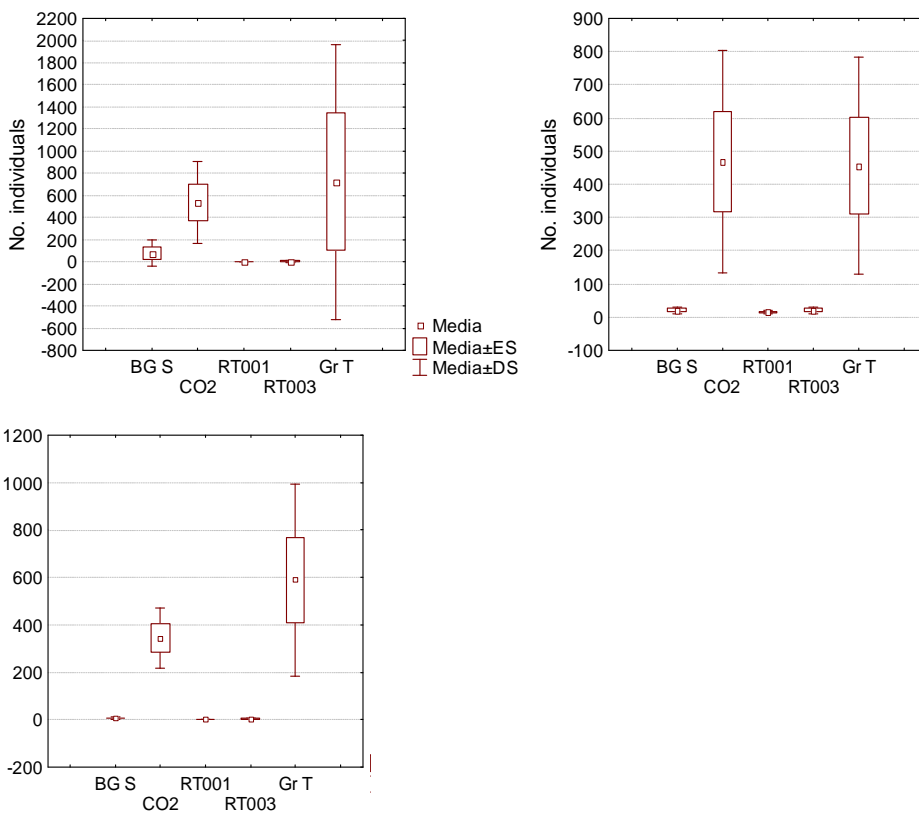


Fig. 4A-C. Mean number of *Cx. pipiens* females per trap per night in the three study sites. (A) La Rizza, (B) Le Vallette, (C) Oasi Val di Sole.

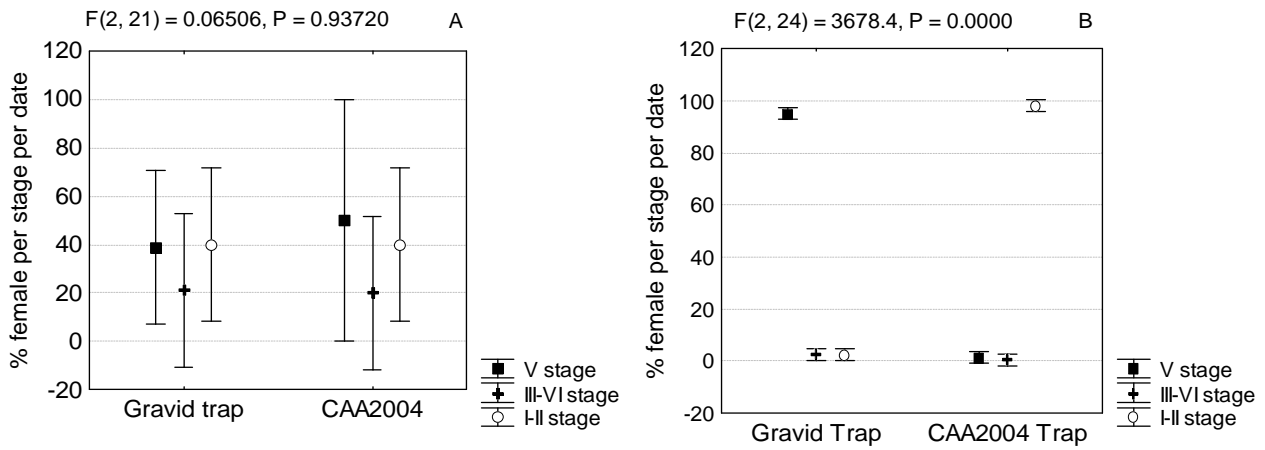


Fig. 5A-B. Developmental stage of female ovaries in the pools formed from the captures of the Gravid trap and of the CAA2004 trap. (A) Le Vallette, (B) Oasi Val di Sole.

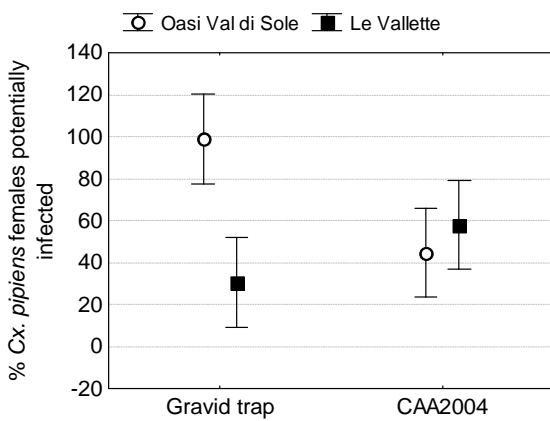


Fig. 6. Potentially infected females in the pools formed from the captures of the Gravid trap and of the CAA2004 trap. For this calculation, the following categories were considered: females with ovaries in the III-V developmental stages, females with ovaries at the initial stages of development or non-determined one if blood was found in their stomach. (A) Le Vallette, (B) Oasi Val di Sole.