

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e
Ambiente**

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie
per l'Ambiente e il Territorio

Ottimizzazione delle strategie di campionamento delle caditoie nella lotta antilarvale ai culicidi

Relatore:

Prof. ssa Roberta Masin

Correlatori:

Prof. Luca Mazzon

Dott.ssa Laura Carretta

Dott. Simone Martini

Laureando

Davide Bonetto

Matricola n.

1211079

ANNO ACCADEMICO

2021/2022

Abstract

Questa tesi intende integrare alle attuali conoscenze della vigilanza entomologica dei culicidi un approccio statistico che possa supportare le linee operative per il monitoraggio delle caditoie pubbliche in Veneto.

La tesi è articolata in sei capitoli e un'appendice finale dove sono raccolte le chiavi entomologiche, i dati dei monitoraggi del periodo di Vigilanza 2020 e uno schema riassuntivo dei risultati ottenuti.

Nel primo capitolo viene spiegata la biologia e i rischi sanitari relativi alle due specie registrate più frequentemente nel monitoraggio delle caditoie nei Comuni del Veneto: *Culex pipiens* (zanzara comune) e *Aedes albopictus* (zanzara tigre).

Nel secondo capitolo viene illustrato l'attuale sistema di vigilanza nei confronti delle zanzare in Veneto messo in opera da Entostudio: dal primo focolaio di zanzara tigre fino agli attuali prodotti utilizzati per controllare le infestazioni.

Nel terzo capitolo viene spiegato l'obiettivo della tesi, ovvero determinare la dimensione campionaria rappresentativa da considerare durante una verifica d'efficacia in un intervento larvicida.

Nel quarto capitolo viene dunque spiegata la scelta dell'analisi statistica, le condizioni di contorno e i risultati che si vogliono ottenere. Verranno poi illustrati i diversi casi di studio, ovvero i comuni presi in considerazione: Alonte, Cona e Vigodarzere. In questo capitolo viene anche riportata l'analisi statistica effettuata per valutare i diversi obiettivi della tesi.

Nel quinto capitolo vengono illustrati e discussi i risultati ottenuti che riguardano la dimensione campionaria, le simulazioni dei casi di studio (fattori significativi e confronto fra criterio random e criterio operatore) e il confronto fra uno scenario reale ed uno simulato.

In conclusione, il capitolo sei cerca di mettere insieme le varie informazioni ottenute per fornire spunti che possano così ottimizzare il campionamento, applicabili non solo nella realtà della regione Veneto, ma estendibili anche ad altri contesti che presentano trattamenti larvicidi di caditoie pubbliche.

Indice

| | |
|--|-----------|
| ABSTRACT | 3 |
| INDICE | 4 |
| 1. INTRODUZIONE: CULICIDI E RISCHI SANITARI | 6 |
| 1.1 <i>CULEX PIPIENS</i> , LINNAEUS, 1758 | 9 |
| 1.1.1 <i>Cenni di biologia</i> | 9 |
| 1.1.2 <i>Morfologia</i> | 10 |
| 1.1.3 <i>Diffusione</i> | 11 |
| 1.1.4 <i>Interesse sanitario</i> | 12 |
| 1.2 <i>AEDES ALBOPICTUS</i> , SKUSE, 1984 | 13 |
| 1.2.1 <i>Cenni di biologia</i> | 13 |
| 1.2.2 <i>Morfologia</i> | 14 |
| 1.2.3 <i>Diffusione</i> | 14 |
| 1.2.4 <i>Interesse sanitario</i> | 15 |
| 1.3 LE ZANZARE COME VETTORI DI MALATTIE | 17 |
| 1.3.1 <i>Arbovirosi autoctone</i> | 18 |
| 1.3.2 <i>Arbovirosi da specie invasive</i> | 20 |
| 2. LA VIGILANZA ENTOMOLOGICA DEI CULICIDI | 23 |
| 2.1 ENTI E ORGANI RESPONSABILI DELLA VIGILANZA IN ITALIA | 24 |
| 2.2 LE MISURE DI CONTROLLO IN VENETO | 27 |
| 2.3 LO STATO ATTUALE DELLA VIGILANZA: LA LINEA OPERATIVA DI ENTOSTUDIO | 29 |
| 2.3.1 <i>Il criterio dell'operatore e la definizione di positività di una caduta</i> | 33 |
| 2.3.2 <i>Tipologia di verifica per un comune monitorato</i> | 34 |
| 2.3.3 <i>Verifiche nei fossati</i> | 35 |
| 2.4 I PRODOTTI UTILIZZATI NEGLI INTERVENTI ANTILARVALI CONTRO I CULICIDI | 37 |
| 3. OBIETTIVO DELLA TESI | 39 |
| 4. MATERIALI E METODI | 40 |
| 4.1 LE CONDIZIONI DA VALUTARE DURANTE IL MONITORAGGIO | 41 |
| 4.2 SCHEMA OPERATIVO DELLE ELABORAZIONI ESEGUITE | 43 |
| 4.2.1 <i>Determinazione della numerosità campionaria</i> | 45 |
| 4.2.2 <i>Basi statistiche dei due criteri di campionamento testati</i> | 46 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.3 | DISTRIBUZIONE DEI TOMBINI NEI COMUNI DEL VENETO | 48 |
| 4.4 | I CASI DI STUDIO | 52 |
| 4.4.1 | <i>Vigodarzere</i> | 52 |
| 4.4.2 | <i>Cona</i> | 52 |
| 4.4.3 | <i>Alonte</i> | 52 |
| 4.5 | ANALISI STATISTICA | 54 |
| 5. | RISULTATI E DISCUSSIONE | 56 |
| 5.1 | CALCOLO DELLA SAMPLE-SIZE | 56 |
| 5.2 | LE SIMULAZIONI DEI CASI DI STUDIO | 58 |
| 5.2.1 | <i>I risultati delle simulazioni</i> | 58 |
| 5.2.2 | <i>I risultati dell'ANOVA</i> | 62 |
| 5.3 | DETTAGLIO DEI RISULTATI DEI CASI DI STUDIO | 63 |
| 5.3.1 | <i>Vigodarzere</i> | 64 |
| 5.3.2 | <i>Cona</i> | 69 |
| 5.3.3 | <i>Alonte</i> | 75 |
| 5.4 | CONFRONTO DI CAMPIONAMENTI IN UNO SCENARIO SIMULATO E IN UNO REALE | 77 |
| 5.5 | OSSERVAZIONI | 81 |
| 6. | CONCLUSIONI | 83 |
| 7. | APPENDICE | 85 |
| 7.1 | IDENTIFICAZIONE MORFOLOGICA DELLE SPECIE | 85 |
| 7.2 | DATI DEL PERIODO DI VIGILANZA 2020 | 87 |
| 7.3 | RISULTATI LIVELLI DI SIGNIFICATIVITÀ PER CATEGORIA | 88 |
| 7.4 | RISULTATI CONFRONTO CRITERIO RANDOM E CRITERIO OPERATORE | 89 |
| 8. | BIBLIOGRAFIA | 90 |
| 9. | RINGRAZIAMENTI | 95 |

1. Introduzione: culicidi e rischi sanitari

I Culicidae (culicidi), noti come zanzare, sono una famiglia di insetti ematofagi dell'ordine dei ditteri, sottordine Nematocera (Culicomorpha). La particolarità di questa famiglia è l'apparato boccale pungente-succhiante: esso, presente solo nelle femmine adulte, è in grado di prelevare sangue da altri animali, un alimento ricco di proteine utile per la maturazione delle uova. La puntura della zanzara è pericolosa poiché può trasmettere patogeni pericolosi a livello sanitario per l'uomo o altri animali. A questo proposito sulla base della mutata situazione epidemiologica, la Commissione Europea ha di recente aggiornato l'elenco di malattie da incorporare nella rete di sorveglianza epidemiologica estendendolo a diverse arbovirosi quali Chikungunya, Dengue e Zika (Conduto A. D. et al., 2017). Queste si aggiungono alle già note West Nile e Usutu: tutte queste patologie verranno illustrate nei paragrafi successivi.

La famiglia dei culicidi viene ulteriormente suddivisa in due sottofamiglie: le Anophelinae, a cui appartiene il solo genere *Anopheles*, e le Culicinae, dove fra i vari generi principali vi sono *Aedes*, *Culex*, *Ochlerotatus* e *Culiseta*. Le zanzare sono ditteri dai caratteri primitivi: infatti la loro comparsa si ha circa 150 milioni di anni fa dopo il Giurassico e sono riuscite nel corso dei secoli a colonizzare quasi ogni ambiente acquatico grazie alla loro capacità adattativa, divenendo così uno dei gruppi di insetti dal maggior successo evolutivo (Bates, 1945). La maggior parte delle specie di zanzare vivono in zone umide tropicali e subtropicali, dove le alte temperature sono ottimali per gli adulti. L'unico ambiente dove ad oggi non sono state rilevate zanzare sono i poli.

Le zanzare sono insetti ometaboli, ovvero presentano un ciclo biologico a metamorfosi completa. La zanzara adulta depone le uova sulla superficie dell'acqua o in prossimità di essa, alla schiusa la larva (apode, cilindrica e vermiforme) presenta un capo grande, torace globoso e addome allungato, sul capo si distinguono occhi, antenne e apparato boccale masticatore, caratterizzato da mandibole denticolate e da spazzole boccali. L'addome è suddiviso in dieci segmenti di cui gli ultimi due fusi insieme, nell'ottavo è presente un sifone respiratorio costituito da un'appendice sub-cilindrica dotata di stigmi in grado di catturare l'ossigeno dell'atmosfera (Romi et al., 2012). La larva attraversa quattro stadi larvali: Larval stage 1 (L1), Larval stage 2 (L2), Larval stage 3 (L3) e Larval stage 4 (L4). I caratteri morfologici di quest'ultimo stadio sono utilizzati convenzionalmente per la diagnosi di genere e specie (Romi et al., 2012)

Al raggiungimento dello stadio L4, la larva si impupa per poi sfarfallare come adulto dopo 12/24 ore. La pupa è costituita da un cefalotorace particolarmente sviluppato ed un addome ricurvo formato anch'esso, come quello della larva, da dieci segmenti (di cui otto ben visibili). Nella parte dorsale sono presenti un paio di organi respiratori detti trombette, sub-cilindriche nelle Culicinae; l'ultimo segmento addominale termina con due processi appiattiti (palette) con funzione natatoria (Romi et al., 2012). Una volta matura, la pupa si mette in prossimità del pelo dell'acqua per dar inizio allo sfarfallamento dell'adulto. Le zanzare adulte sono insetti di piccole dimensioni, presentano un corpo esile ed allungato, un paio di ali e tre paia zampe. Il dimorfismo sessuale è spiccato, con maschi che presentano antenne piumate e palpi lunghi. Il capo sferoidale è quasi completamente coperto da due grandi occhi composti e porta un paio di antenne; sono inoltre presenti due organi di senso detti palpi mascellari, ornati di lunghe setole nel maschio (Romi et al., 2012). La femmina presenta una struttura boccale pungente-succhiante, mentre nel maschio l'apparato boccale è solo succhiante. La proboscide ha forma allungata e funzionale a penetrare la cute degli animali per effettuare il pasto di sangue, vedi figura 1 (Romi et al., 2012).

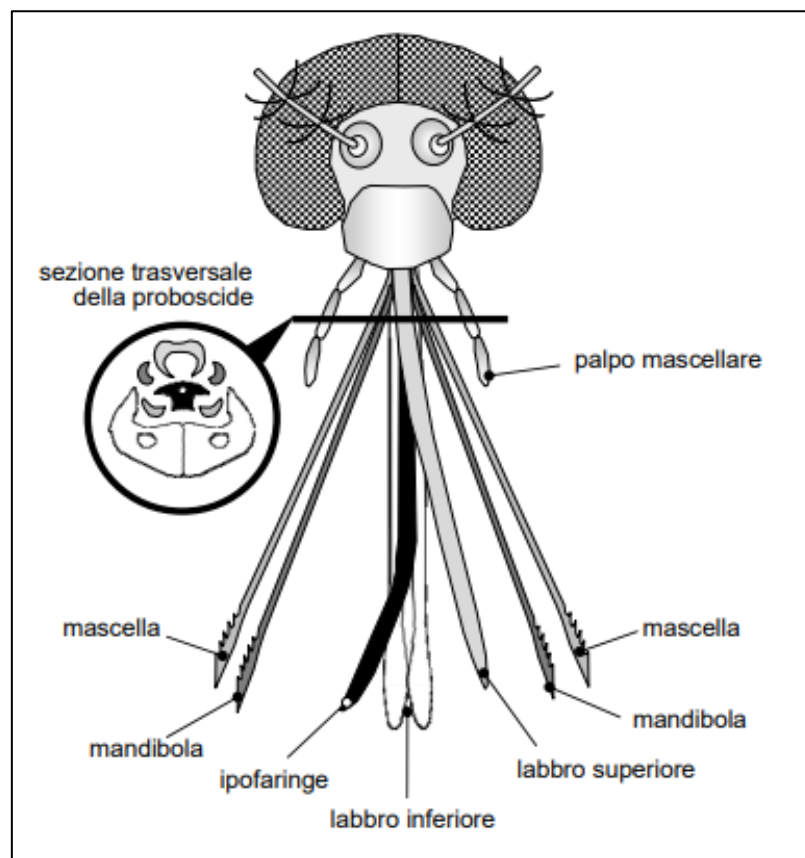


Figura 1: schema di una proboscide di zanzara (Romi et al. 2012)

Al capo segue un collo corto e sottile ed il torace composto dorsalmente da una placca sclerotizzata detta mesonoto (o scuto), il cui margine posteriore, detto scutello, è trilobato nelle Culicinae. Le ali sono strette e lunghe, sovrapposte sull'addome in fase di riposo: le nervature delle ali e le scaglie le ricoprono vengono utilizzate in sistematica per differenziare generi e specie. L'addome lungo e sottile è formato da dieci segmenti (come la larva e la pupa) con placche sclerotizzate dorsali (tergiti) e ventrali (sterniti). I due segmenti addominali nel maschio sono trasformati in un complesso apparato copulatore detto ipopigio, la cui struttura ha valore tassonomico per l'identificazione di specie. Nella femmina l'addome termina con due appendici dette cerci, particolarmente sviluppate nel genere *Aedes*, atte alla deposizione delle uova (Romi et al., 2012).

La durata del ciclo vitale differisce tra maschi e femmine. In natura, durante il periodo estivo, le femmine possono vivere fino a due mesi, mentre la durata di vita di un maschio è limitata a pochi giorni.

Per quanto riguarda l'accoppiamento, il maschio, per mezzo dell'organo di Johnston, riconosce la femmina attraverso l'intercettazione della frequenza di volo prodotta dal partner (Dutto, 2008).

La frequenza del ronzio varia a seconda dell'età della femmina, questo consente al maschio di captare solo femmine fisiologicamente pronte per l'accoppiamento. Una volta fecondata la femmina, effettua un pasto di sangue, utile alla maturazione delle uova. L'ospite su cui viene eseguito il pasto può essere un animale (zanzare zoofile) o l'uomo (zanzare antropofile). L'individuazione dell'ospite avviene per via olfattiva grazie ai caïromoni (nel caso dell'uomo sono rappresentati ad esempio dall'acido lattico prodotto dal metabolismo muscolare), dall'anidride carbonica e dalla temperatura corporea (Dutto, 2008). Successivamente alla puntura avviene la digestione: nel caso di specie zoofile, la zanzara digerisce il pasto ematico a riposo fra la vegetazione o in ambienti aperti (esofilia), mentre le specie antropofile prediligono gli ambienti chiusi (endofilia). A questo punto la femmina è pronta per la deposizione delle uova: si conta che per ogni ovideposizione una femmina può deporre da quindici a venti volte, dalle cento ad oltre trecento uova (Dutto, 2008).

Fra i vari luoghi di deposizione vi sono le caditoie stradali, andremo perciò ad analizzare in dettaglio le due specie oggetto di questa tesi: *Culex pipiens* e *Aedes albopictus*.

1.1 *Culex pipiens*, Linnaeus, 1758

1.1.1 Cenni di biologia

La zanzara comune, cui come scientifico è *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) è una specie ubiquitaria diffusa in tutta Europa. Il genere *Culex* è presente in Italia con 12 specie, di cui 4 considerate di interesse sanitario: *Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. theileri* e *Cx. univittatus* (Busani et al., 2012). Le zanzare appartenenti al genere *Culex* sp., si contraddistinguono poiché presentano un addome arrotondato nella parte terminale con cerci pressoché invisibili. Il corpo dell'adulto è lungo dai 5 ai 7 mm: le ali si estendono leggermente fuori dall'addome e sono coperte con squame. Nella femmina durante il pasto di sangue l'addome si ingrossa deformandosi e raggiungendo notevoli dimensioni. La femmina adulta rappresenta la forma svernante nella gran parte delle specie e dopo esser stata fecondata va incontro ad un lungo periodo di diapausa. Con l'aumento delle temperature primaverili, avviene la deposizione delle uova (circa 150-240 uova) sulla superficie dell'acqua con la caratteristica forma a barchetta (vedi figura 2). Alla schiusa fuoriesce la larva di zanzara che è dotata di un sifone respiratorio lungo e sottile, ricco di ciuffi di setole.

I focolai di questo genere di zanzare sono molto eterogenei: solitamente frequenta acque stagnanti, ma si può altresì trovare in ambienti forestali ombrosi, fossi ricchi di sostanza organica e pozze d'acqua, sia permanenti che temporanee (Romi et al., 1997). Esistono inoltre due sottospecie che non presentano differenze morfologiche, ma si differenziano per l'ecotipo: *Culex pipiens pipiens*, specie rurale e ornitofila, e *Culex pipiens molestus* (Forsk., 1775), specie urbana ed antropofila (Busani et al., 2012). Biologicamente la forma antropofila si differenzia per caratteristiche sviluppate adattandosi ad ambienti chiusi: accoppiamento in spazi ristretti (stenogamia), compimento del primo ciclo gonotrofico senza pasto di sangue (autogenia) e assenza di diapausa invernale (omodinamia), grazie alle temperature semicostanti (Senevet & Andarelli, 1959). Le larve della forma antropofila



Figura 2: uova di *Cx. pipiens* con la classica forma “a barchetta” (Romi et al., 2012).

prediligono raccolte d'acqua ad elevato carico organico, ad esempio tombini, cisterne, depuratori o anche contenitori piccoli derivanti dall'attività umana. Gli stadi preimmaginali della forma ornitofila invece si riproducono solitamente in acque limpide e poco fredde. Con le alte temperature estive, *Cx. pipiens* completa il ciclo biologico in meno di due settimane, dando luogo a numerose generazioni. È importante poi che la femmina adulta di *Cx. pipiens pipiens* prima dell'inverno effettui un abbondante pasto di sangue che le consente di sopravvivere fino alla stagione successiva entrando in uno stato di diapausa (Busani et al, 2012)

1.1.2 Morfologia

Le zanzare appartenenti al genere *Culex* sp. si distinguono per la parte terminale dell'addome tondeggiante, in particolare per riconoscere *Cx. pipiens* è bene tenere a mente i seguenti dettagli da valutare al microscopio. La femmina raggiunge dimensioni del corpo medie e ha solitamente un colore giallastro ed un tegumento marroncino o marrone scuro. Le antenne sono scure, mentre il pedicello ha minuscole scaglie bianche. I palpi sono prevalentemente neri e la proboscide presenta ventralmente scaglie color crema; invece, la testa ha squame più chiare lateralmente. Sono assenti squame postspiracolari e prealari. Tale assenza fornisce una caratteristica per distinguere questa specie all'interno del suo genere (Becker et al., 2010). Le coxe hanno una piccola macchia di scaglie scure, il femore ha un bordo apicale giallastro e il restante ricoperto di squame scure, mentre i femori anteriori sono biancastri. La venatura alare è scura, come anche i terga addominali. Gli sterni sono a scala giallastra: i terga addominali sono (Becker et al, 2010).

La larva invece ha invece una testa più lunga che larga, e rispetto all'adulto le antenne sono più molto più corte. Le setole protoraciche sono lunghe e singole ed il sifone è sottile e

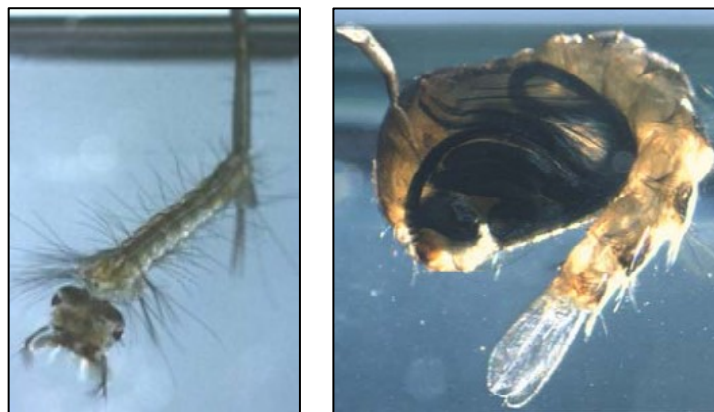


Figura 3: da sinistra verso destra sono mostrate e pupa di *Cx. pipiens* (Romi et al., 2012).

allungato. Le squame del VIII segmento sono circa 40, ogni singola scaglia è corta e allargata all'apice e orlata. Le papille anali sono anch'esse allungate ben riconoscibili sotto il sifone (Becker, 2010).

Durante un campionamento, non è semplice riconoscere le larve delle due sottospecie *molestus* e *pipiens*, nonostante sia stato osservato che la sottospecie *molestus* occupa spazi sotterranei con accesso limitato, come le caditoie (Mattingly, 1952, Vinogradova 2000). Anche a livello genetico non è stato chiaro stabilire due forme geneticamente distinte *Culex* spp., tantoché ancora oggi sono in corso studi per stabilirne le differenze (Kent et al, 2007).

1.1.3 Diffusione

Cx. pipiens pipiens e *Cx. pipiens molestus*, facenti parte del complesso di specie *Culex pipiens*, sono distribuite in tutto il mondo ad eccezione delle aree permanentemente ghiacciate.

Cx. pipiens pipiens è diffusa in tutta Europa (vedi figura 4). I suoi confini non sono chiari e devono essere analizzati, a causa dell'impossibilità di distinguerla facilmente da *Cx.*

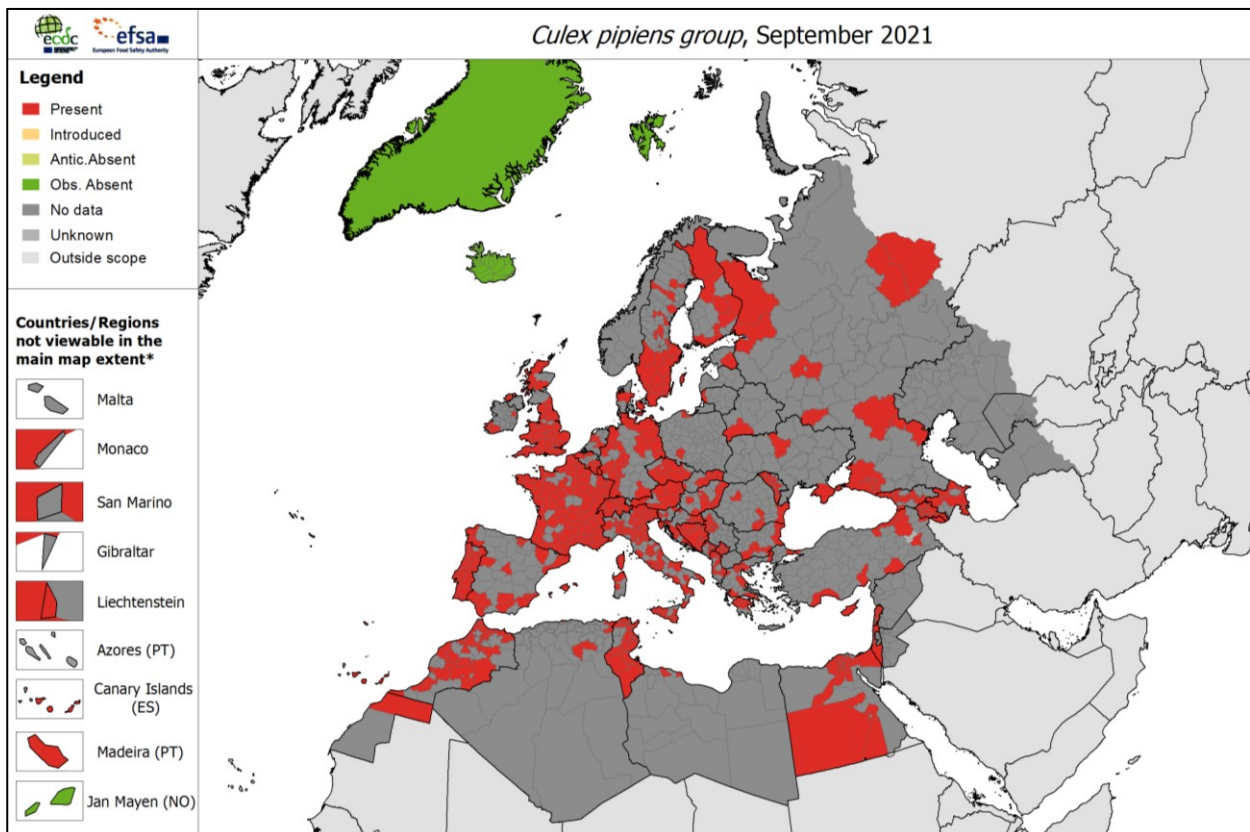


Figura 4: areale di distribuzione di *Cx. pipiens* in Europa. In rosso sono quei territori dove la zanzara comune è stabilmente insediata. Attualmente solo in Islanda, Norvegia e in Groenlandia i monitoraggi non ne hanno riscontrato la presenza (ECDC, 2021).

torrentium (Becker et al., 2010). È presente in Portogallo, Spagna, Francia, Italia, Romania, Svizzera, Austria, Germania, Regno Unito, Polonia, Repubblica Ceca, Slovacchia, Bulgaria, Ungheria, Creta, Malta, Lituania, Lettonia, Estonia, Bielorussia, Ucraina e Russia. *Cx. pipines pipiens* è stata trovata in Corea del Sud. È comune in Georgia, Armenia, Azerbaigian, Kazakistan, Uzbekistan, Turkmenistan e Tagikistan. Inoltre, ne è stata riscontrata la presenza in Iran e nel sud-ovest dell'Arabia Saudita, oltre che in Africa, principalmente nella parte nord e sud. In Sud America la sua presenza è stata registrata in Argentina (Vinogradova, 2000).

Per quanto riguarda *Cx. pipiens molestus*, data la sua endofilia, ha fatto registrare la sua presenza in molte delle più grandi città d'Europa e nelle regioni temperate del mondo. Risulta presente anche nelle città più a nord della parte Europea della Russia (Becker et al., 2010). La sua distribuzione sembra essere molto più irregolare sul territorio (Vinogradova, 2020)

1.1.4 Interesse sanitario

La zanzara comune in Italia riveste perlopiù il ruolo di ectoparassita, è attiva durante le ore notturne ed è coinvolta nella trasmissione del virus West Nile dagli uccelli (serbatoi naturali) ad alcuni mammiferi. L'uomo in questo caso è un ospite accidentale a fondo cieco del virus. *Cx. pipiens* può infettare l'uomo solo se precedentemente ha punto un uccello infetto (Romi et al., 2009), tuttavia non può avvenire lo scambio virale uomo-zanzara-uomo. Il virus è arrivato in Veneto nel 2008 tramite un uccello migratore proveniente dall'Africa e da allora ha trovato le condizioni tali per il suo mantenimento, ovvero un clima caldo umido che favorisce sia le zanzare che gli uccelli soprattutto in prossimità delle aree umide. Diversi focolai si sono sviluppati fra Rovigo e Bologna coinvolgendo i primi casi umani (Severini et al, 2009). Nei mammiferi l'infezione è generalmente asintomatica (oltre 80% dei casi) mentre in persone più anziane si possono presentare sintomi neurologici, come encefalite o meningoencefalite (Regione del Veneto, 2008).

Si rimanda al paragrafo 1.3 per un maggior approfondimento sulle malattie trasmesse dalle zanzare.

1.2 *Aedes albopictus*, Skuse, 1984

1.2.1 Cenni di biologia

Le zanzare appartenenti al genere *Aedes* sono diffuse in tutto il mondo e sono note per il grado di molestia provocato all'uomo e per la loro pericolosità legata al fatto di essere vettori di malattie. Fino al 2012 in Italia vi erano 6 specie appartenenti a questo genere, di cui 4 di interesse sanitario: *Ae. albopictus*, *Ae. vexans* e *Ae. vittatus* (Busani et al., 2012); gli ultimi monitoraggi condotti in Veneto e in Friuli-Venezia-Giulia hanno individuato due nuove specie aliene in diffusione, *Ae. koreicus* e *Ae. japonicus* (Gradoni et al., 2021).

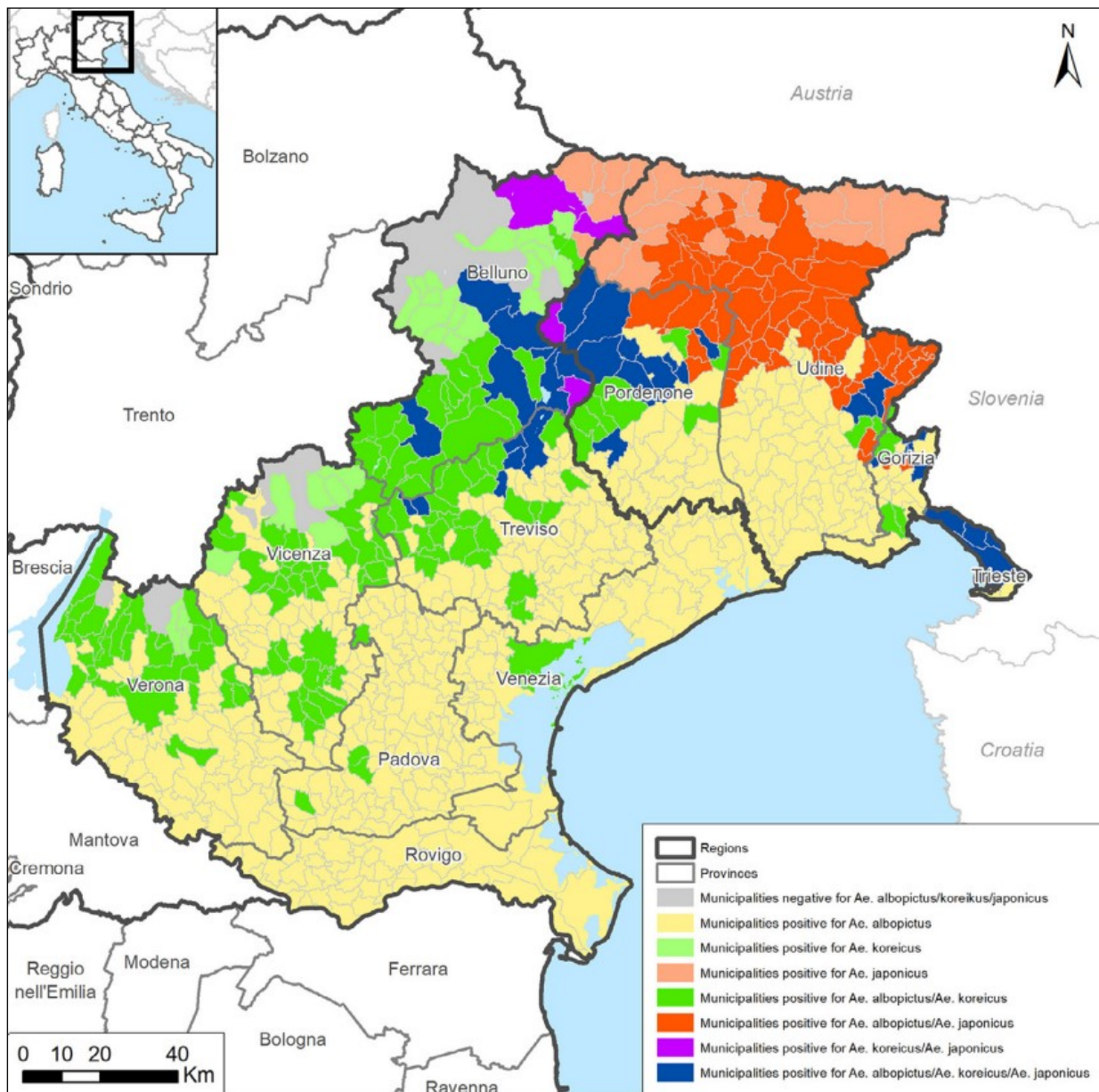


Figura 5: distribuzione di *Ae. albopictus*, *Ae. japonicus* e *Ae. koreicus* nelle regioni del Veneto e del Friuli-Venezia-Giulia (Gradoni et al, 2021).

Come si può notare dalla figura 5, nella maggior parte del territorio del Veneto la zanzara tigre si è stabilmente insediata nella maggior parte delle municipalità. La capacità di adattamento che caratterizza questa specie le ha permesso non solo di colonizzare habitat differenti legati ad aree urbane e peri-urbane, ma anche di insediarsi in zone rurali, nonché aree ritenute sfavorevoli al suo sviluppo per il clima, la latitudine o l'altitudine, (zona pedemontana e zona del bellunese). Le abbondanti precipitazioni estive che interessano queste zone hanno favorito la riproduzione e lo sviluppo dell'adulto (Romi et al., 2012)

1.2.2 Morfologia

Per quanto riguarda la zanzara tigre adulta, sia la femmina che il maschio hanno il corpo ricoperto di scaglie nere: il mesonoto presenta una stretta banda medio-longitudinale di scaglie bianco-argenteo, nella metà posteriore dello stesso sono visibili due sottili strisce bianche. I femori sono scuri e presentano un anello apicale di scaglie bianche, mentre le tibie sono completamente scure. Sulle zampe anteriori e medie il tarso presenta stretti anelli di scaglie bianche alla base dei primi segmenti. L'addome presenta macchie di scaglie bianche ai lati di ciascuna tergite e una banda trasverso-basale di scaglie bianche molto sottile o addirittura interrotta nel mezzo. L'ipopigio è caratterizzato da un gonoxite che presenta un lobo apicale ricoperto di setole. Il nono tergite presenta sul margine posteriore due piccoli lobi naturali (Severini et al 2009)

1.2.3 Diffusione

La zanzara tigre è una specie aliena originaria delle foreste tropicali del sud-est asiatico dove i focolai larvali sono rappresentati da cavità nel tronco degli alberi (Caputo et al., 2012). La zanzara tigre si è diffusa in tutto il mondo grazie al commercio di pneumatici usati: le femmine depongono le uova nei copertoni lasciati all'aperto e contenenti piccole quantità di acqua, in genere di origine piovana. Numerosi focolai sono stati registrati attualmente in molti paesi europei (vedi figura 6) Le uova sono in grado di resistere a lunghi periodi di disseccamento, coincidenti con il tempo del viaggio nei containers, e una volta giunti a destinazione i copertoni vengono accatastati all'aperto dove una nuova pioggia permetterà alle uova di schiudersi (Romi & Majori, 1998). L'infestazione è perciò legata in un primo momento al commercio: questo non è sufficiente a garantire l'insediamento duraturo nel tempo, in quanto è necessario che la zanzara trovi un ambiente favorevole. La chiave della sua diffusione, oltre alla capacità di quiescenza delle uova durante i periodi asciutti, è dovuta al fatto che bastano piccole raccolte d'acqua per la deposizione delle uova. Nel suo ambiente originario di foresta queste sono rappresentate da cavità negli alberi, ascelle di

foglie o buchi nella roccia, mentre negli ambienti urbani delle nostre città possono essere sottovasi, tombini, bottiglie, barattoli e altri contenitori (Bonizzoni et al., 2013)

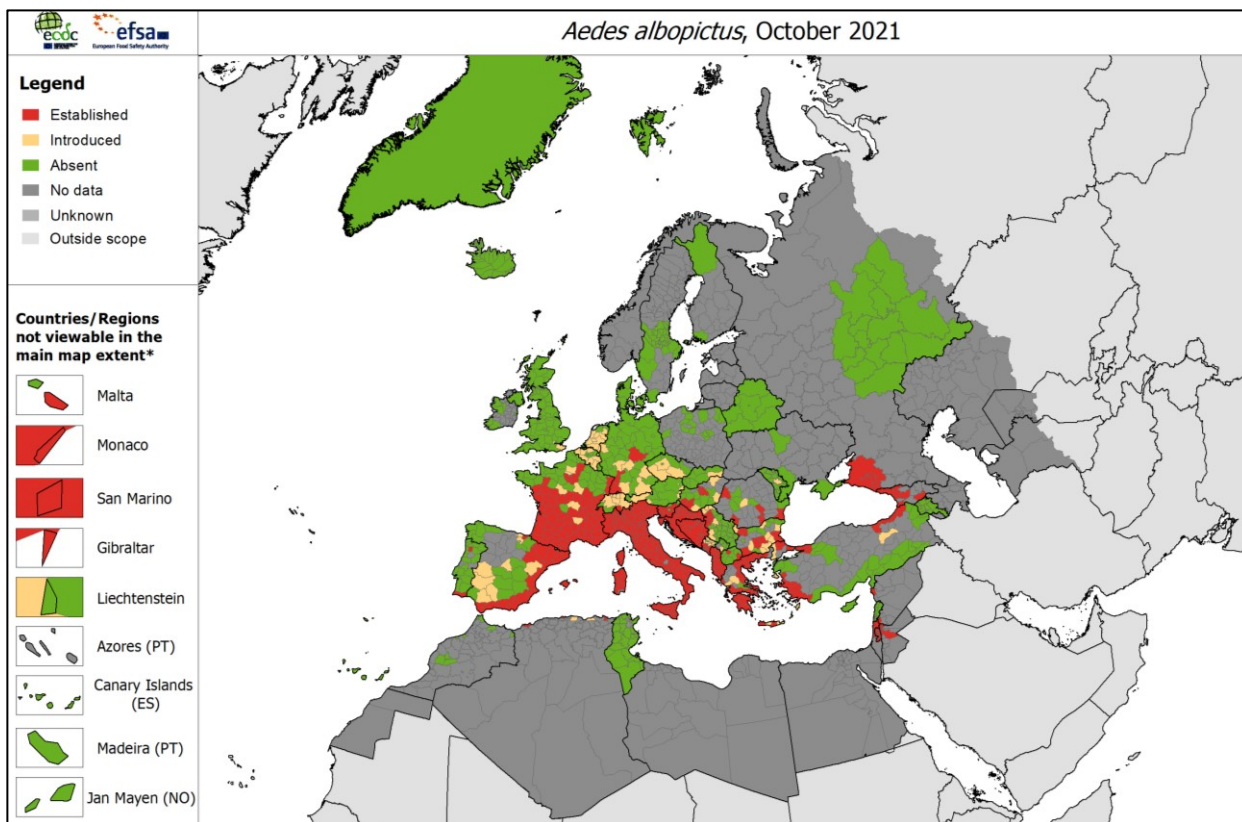


Figura 6: areale di distribuzione di *Ae. albopictus* in Europa. In rosso sono quei territori dove la zanzara tigre si è stabilmente insediata, in giallo dove è stata rilevata e in verde dove nessun monitoraggio ne ha rilevato la presenza (ECDC, 2021).

1.2.4 Interesse sanitario

Ae. albopictus è una zanzara estremamente aggressiva verso l'uomo. Le sue punture possono provocare l'insorgenza di ponfi pruriginosi, spesso dolorosi e facilmente ulcerabili. Tuttavia, la gravità della reazione cutanea alla puntura dipende, in larga misura, dalla sensibilità del singolo individuo. In aree ad elevata densità di *Ae. albopictus*, il continuo disturbo causato dalla loro attività ectoparassitaria può essere talmente intollerabile da indurre gli abitanti del luogo a modificare abitudini e attività svolte all'aperto (Busani et. Al., 2020). Il principale problema relativo ad *Ae. albopictus* è legato alla sua competenza nella trasmissione di almeno 26 arbovirus (Paupy et al., 2009). In Italia, la zanzara tigre è stata considerata essenzialmente una zanzara molesta fino al 2007, quando si è rivelata competente nella trasmissione in natura del virus Chikungunya in un paese ben al di fuori dall'area di endemia, innescando nella provincia di Ravenna la prima epidemia di

Chikungunya mai avvenuta in Europa (Rezza et al., 2007). Un ulteriore motivo di preoccupazione è legato, in particolar modo, alla sua competenza vettoriale per il virus della Dengue emorragica e, considerando il crescente numero di infezioni importate da aree endemiche, non è da escludersi l'eventualità che episodi epidemici causati da questo virus possano verificarsi anche in Italia (Busani et al., 2012).

Nel paragrafo successivo verranno illustrate più nel dettaglio le due patologie sopracitate assieme ad altre arbovirosi presenti oggi in Italia.

1.3 Le zanzare come vettori di malattie

Negli ultimi anni, sia fattori correlati ai cambiamenti climatici (l'alterazione di habitat, l'alterazione dei depositi d'acqua e delle precipitazioni) che alla globalizzazione (viaggi e turismo) hanno favorito la diffusione di malattie e vettori al di fuori delle zone endemiche (Genchi et al., 2009). Parallelamente si sta verificando anche un ampliamento dell'areale di distribuzione di artropodi indigeni (zanzare comune, artropodi e zecche), vettori di malattie endemiche nel nostro paese (Regione del Veneto, 2018).

Le malattie trasmesse da vettori come zanzare costituiscono un importante problema di sanità pubblica: secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità causano oltre 1 miliardo di casi e un milione di morti, inoltre sono portatori del 17% circa di malattie trasmissibili (Takken & van den Berg 2019).

Fra le malattie trasmesse da vettori, un importante gruppo è costituito dalle arbovirosi, ossia dalle infezioni virali trasmesse da artropodi. Esistono infatti oltre cento virus classificati come arbovirus in grado di causare malattia umana. In Italia sono presenti sia arbovirosi autoctone (West Nile e Usutu), sia arbovirosi prevalentemente di importazione (Chikungunya, Zika, Dengue). Sempre più spesso, tuttavia, sia a livello nazionale che internazionale, si assiste ad eventi epidemici, anche di dimensioni rilevanti (Ministero della Salute, 2019).

Nell'estate 2007 si sono verificati per la prima volta in Italia, e in particolare nella Regione Emilia-Romagna, casi autoctoni di malattie infettive tipiche di un Paese con un clima tropicale (197 casi di Chikungunya). Nel corso del 2008 su un vasto territorio del Nord-Est (province di Bologna, Ferrara, Mantova, Modena, Ravenna, Rovigo, Padova e Venezia) sono stati identificati casi di malattia neuro invasiva da West-Nile virus in animali e sono stati segnalati i primi casi umani in Emilia-Romagna e Veneto. Nel 2015 la diffusione nelle Americhe dello Zika virus, con casi importati rilevati anche in Europa, ha acceso l'attenzione su questo problema e sulle conseguenze dovute alla trasmissione del virus dalla madre al feto (Regione del Veneto, 2018).

Le malattie qui descritte sono solo una piccola parte di quelle che potrebbero venire influenzate dai cambiamenti che stanno avvenendo nel nostro pianeta: qui di seguito verranno brevemente presentate solo le patologie presenti nel continente europeo, in particolare l'Italia.

1.3.1 Arbovirosi autoctone

- La West Nile Disease (WND) è una malattia infettiva virale trasmessa attraverso la puntura di una zanzara, appartenente al genere *Culex*. La WND può interessare i cavalli, molte specie di uccelli e l'uomo (vedi fig. 7); più raramente altri mammiferi. Questa malattia, un tempo ritenuta esotica, ha fatto la sua comparsa in Italia nel 1998 (Padule di Fucecchio, Toscana); è poi scomparsa fino al 2008, quando è riemersa con numerosi casi in Emilia-Romagna, Veneto e Lombardia e non ha più lasciato il nostro Paese. Attualmente è diffusa in vari continenti a clima temperato e in Europa è presente in diversi paesi, soprattutto del bacino del mediterraneo. Dal 2008 la WND è una malattia soggetta a denuncia ai sensi del DPR 320/54 (Regolamento di Polizia Veterinaria) e prossimamente del Regolamento (UE) 2016/429 (Animal Health Law) che è entrato in vigore il 21 aprile 2021. Attualmente, le regioni italiane interessate maggiormente dalla circolazione virale sono Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli-Venezia Giulia, Emilia-Romagna e Sardegna, ma focolai sono presenti localmente anche in altre parti d'Italia (vedi figura 8). Nel 2018 l'Italia è stato il paese più colpito: la malattia ha fatto registrare un numero di casi mai visto prima pari a 595, molti fatali sia per l'uomo che per gli animali (Ministero della Salute, 2019; Montarsi & Capelli, 2020).
- Il virus Usutu (USUV) è un Flavivirus che infetta soprattutto uccelli e zanzare (principalmente *Culex pipiens*), la cui circolazione è documentata in numerosi paesi europei e spesso avviene in concomitanza con il virus West-Nile. (Gaibani & Rossini, 2017). Il suo potenziale patogeno è stato riconosciuto nel 2001 per la sua elevata mortalità negli uccelli in occasione di un focolaio in Austria. L'infezione da USUV nell'uomo è stata individuata sia in Africa che in Europa e decorre spesso paucisintomatica con febbre, rash ed ittero, mentre forme neuroinvasive, segnalate per la prima volta proprio in Italia nel 2009 (Pecorari, 2009), si sono limitate a casi sporadici in Emilia-Romagna e Lombardia. L'RNA virale di USUV è comunque oggetto di sorveglianza specifica nei donatori di sangue, in cui è stato identificato in pazienti asintomatici in diverse regioni italiane. Uno studio retrospettivo condotto a Modena e pubblicato recentemente ha però evidenziato come fino ad ora l'infezione da Usutu nell'uomo possa essere stata in realtà sottostimata, soprattutto in pazienti con sintomatologia sospetta per encefalite o meningoencefalite virale; anche per

questo motivo è importante incrementare l'attenzione dei sistemi di sorveglianza e la capacità diagnostica per le infezioni da questo virus. (Grottola et al., 2017)

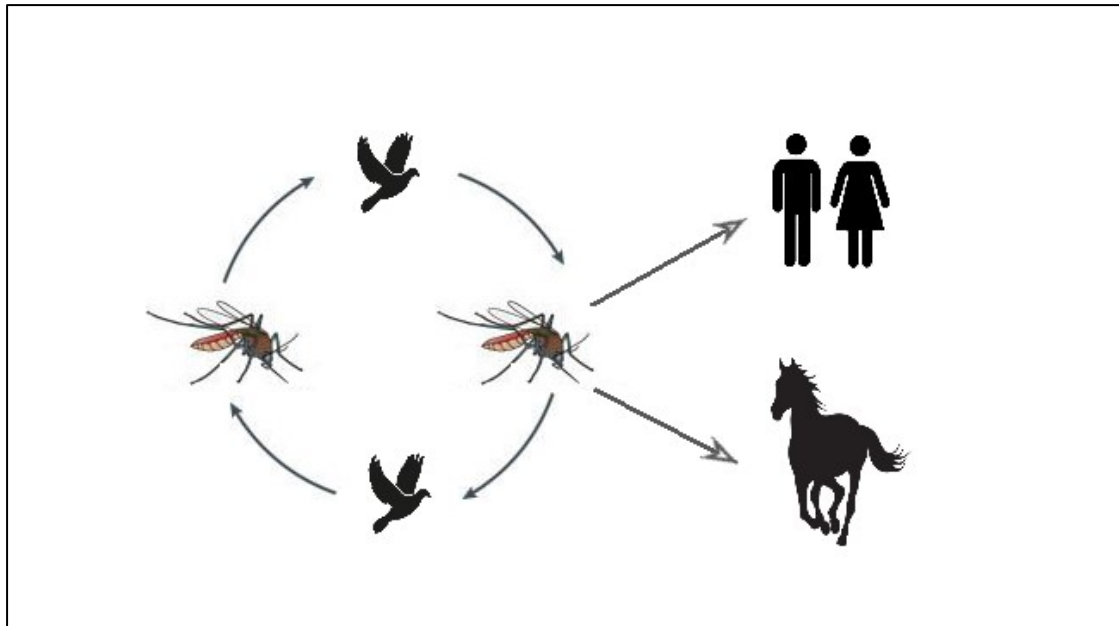


Figura 7: ciclo di trasmissione del virus WND e Usutu. I vettori (zanzare) trasmettono il virus fra gli uccelli, trovando poi degli ospiti cechi nell'uomo e nei cavalli.

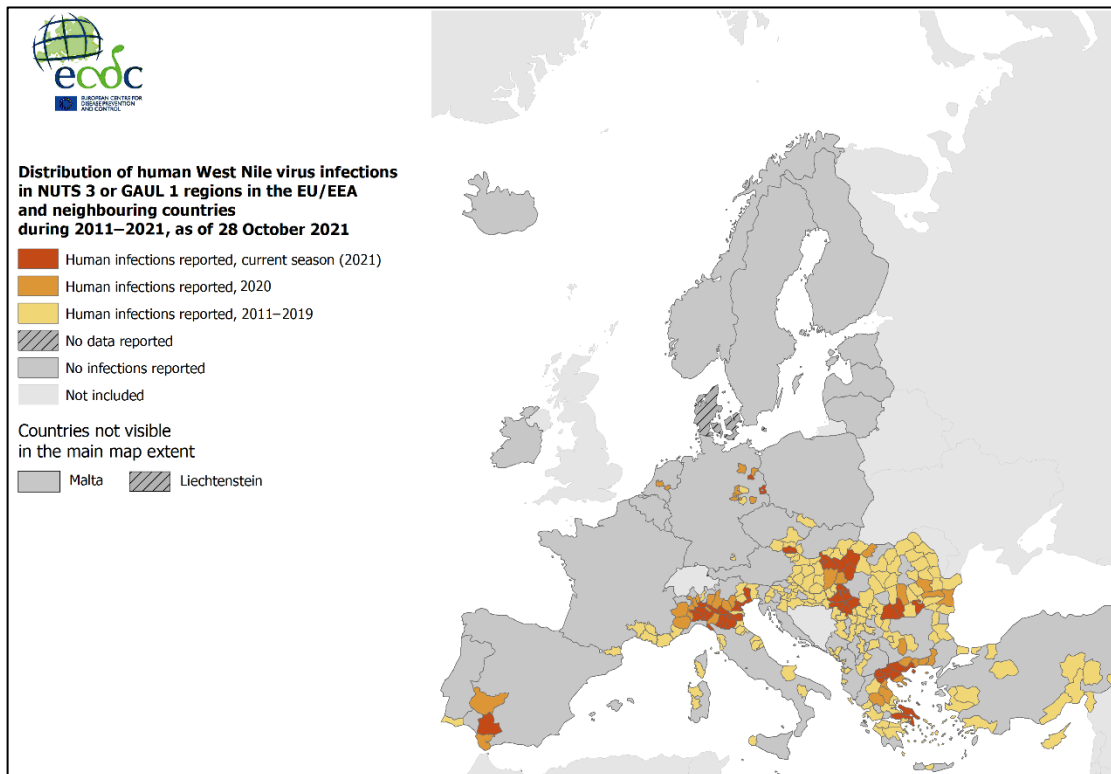


Figura 8: focolai di WND registrati dal 2011 al 2021 in Europa (ECDC, 2021)

1.3.2 Arbovirosi da specie invasive

- La febbre Chikungunya è una malattia febbrile acuta virale, trasmessa dalle punture di zanzare del genere *Aedes* (vedi figura 9). Nel nostro Paese il vettore di potenziale diffusione della malattia è *Aedes albopictus* (zanzara tigre). Il virus responsabile della malattia è il Chikungunya virus (CHIKV), appartenente alla famiglia delle Togaviridae, del genere alphavirus. Il periodo di incubazione del virus responsabile della malattia è breve, solitamente di 3-7 giorni, raramente di più e si manifesta con sintomi simil-influenzali quali: febbre, cefalea, nausea, vomito e soprattutto artralgie importanti. La persona infetta può inoltre manifestare un esantema maculopapulare pruriginoso su tutto il corpo. Le complicanze più gravi sono rare e possono essere di natura emorragica o neurologica. La diagnosi della malattia è sierologica, con il test ELISA o altre metodiche, tra cui test rapidi. La conferma si basa su PCR, isolamento virale e/o aumento del titolo anticorpale. La terapia è sintomatica e si basa sul controllo delle artralgie. La mortalità della Chikungunya è bassa, ma risulta maggiore nei bambini al di sotto dell'anno d'età e negli anziani già affetti da altre patologie (Romi et al., 2009).

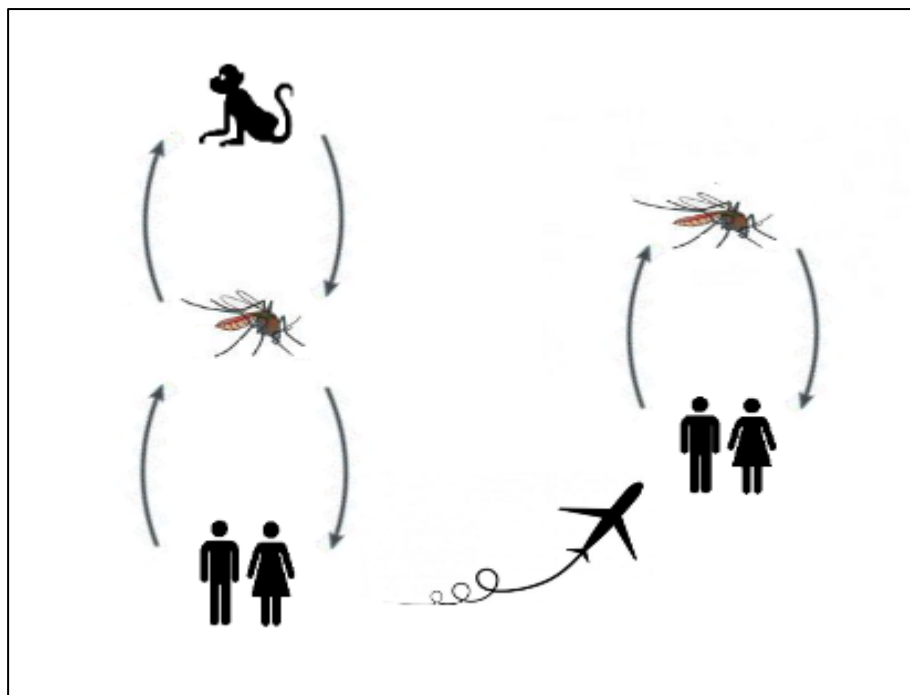


Figura 9: ciclo di trasmissione della CHIKV. Si nota come il vettore (zanzara genere *Aedes*) trasmetta il virus fra primati, coinvolgendo dunque uomo e scimmie. Inoltre, un individuo infetto da tale virus può importarlo in un altro paese qualora venisse punto da un vettore "sano", che a quel punto ne diventa portatore costituendo quindi una nuova minaccia.

- La febbre Dengue è una malattia infettiva tropicale causata dal Dengue virus. La malattia si trasmette tramite le zanzare del genere *Aedes sp* (vedi figura 10), in particolar modo la specie *Aedes aegypti*, non presente in Italia, e *Aedes albopictus*. Esistono quattro differenti sierotipi di virus. La malattia ha un'incubazione di 3-7 giorni e si manifesta con febbre, cefalea, dolore muscolare e articolare, nausea e vomito, oltre al caratteristico rash cutaneo sulla maggior parte del corpo dopo 3-4 giorni dall'insorgenza della febbre. In una piccola percentuale di casi, in generale in soggetti che avevano contratto in precedenza l'infezione con un diverso sierotipo virale, si sviluppa una febbre emorragica con trombocitopenia, emorragie e perdita di liquidi, che può evolvere in uno shock circolatorio e portare alla morte. La diagnosi dei casi di Dengue è solitamente clinica durante un'epidemia, basata sui sintomi riferiti e sull'esame obiettivo; la diagnosi di laboratorio è simile a quella della Chikungunya (Romi et al., 2009).

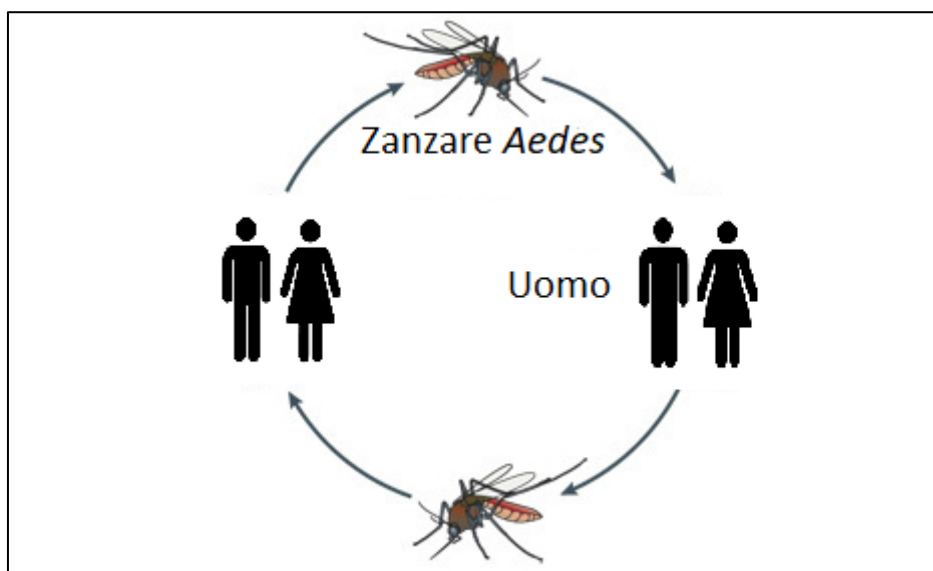


Figura 10: ciclo di trasmissione del virus Dengue. Il virus viene trasmesso da uomo a uomo tramite il vettore (zanzara *Aedes*) che può essere infetto o può infettarsi se punge un individuo infetto.

- L'infezione umana da Virus Zika è una malattia virale trasmessa dalla puntura di zanzare infette del genere *Aedes* (vedi figura 11), che comprendono l'*Aedes aegypti* (vettore originario, nota anche come zanzara della febbre gialla) e l'*Aedes albopictus* (più conosciuta come zanzara tigre e diffusa anche in Italia). Queste zanzare sono responsabili anche della trasmissione della Dengue, della Chikungunya e della febbre gialla. Si stima che nell'80% dei casi l'infezione sia asintomatica. I sintomi, quando presenti, compaiono a distanza di 3-13 giorni dalla puntura della zanzara

vettore e sono simili a quelli di una sindrome simil influenzale autolimitante, della durata di circa 4-7 giorni, a volte accompagnata da rash maculo papulare, artralgia, mialgia, mal di testa e congiuntivite (Zorzut, 2016). Raramente è necessario il ricovero in ospedale. Nelle regioni colpite dall'infezione è stato osservato un aumento dei casi di sindrome di Guillain-Barré, una poliradicolonevrite acuta (neuropatica, sindrome del sistema nervoso) sostenuta da meccanismi autoimmuni che si manifesta con paralisi progressiva agli arti (in genere prima le gambe e poi le braccia) e che spesso fa seguito a un'infezione batterica o virale. Inoltre, è stato registrato un aumento delle nascite di bambini con microcefalia congenita. Per quanto la relazione sia forte (il virus è stato isolato nel liquido amniotico di alcuni neonati con microcefalia), il nesso causale degli episodi di sindrome di Guillain-Barré e dei casi di microcefalia con l'infezione da virus Zika è ancora in corso di ulteriore verifica e approfondimento (Ministero della Salute, 2018).

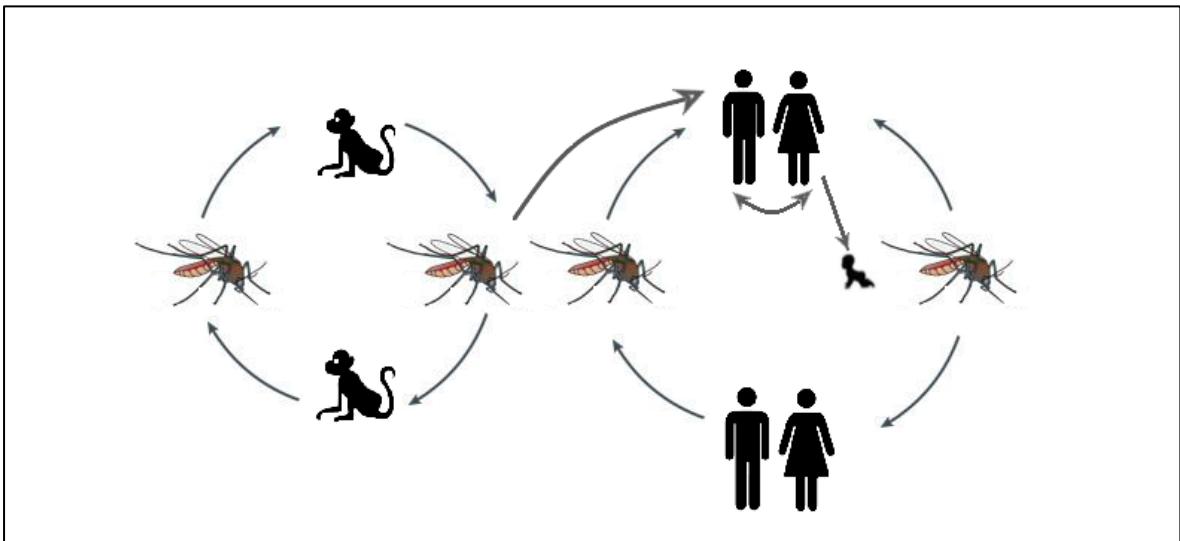


Figura 11: ciclo di trasmissione del virus Zika. Il ciclo segue lo stesso meccanismo di quello della CHIKV, con la differenza che essendo una malattia virale, i figli di individui infetti nascono manifestando il virus.

2. La vigilanza entomologica dei culicidi

Fino agli anni '80 le zanzare non sono state un problema di interesse pubblico. Nonostante vi fossero appalti pubblici volti ad aggiudicare il servizio di disinfestazione antilarvale nelle caditoie, mancavano i controlli che valutassero l'efficacia dei prodotti applicati negli interventi. L'interesse per l'attività di vigilanza nei confronti dei culicidi in Veneto è cresciuto all'inizio degli anni '90 con l'avvento di *Ae. albopictus*: il primo focolaio fu segnalato nell'agosto nel 1991 in provincia di Padova (Dalla Pozza & Majori, 1992). L'arrivo di tale specie fu imputato all'importazione di pneumatici usati, infestati da uova, dal sud degli Stati Uniti (Reiter, 1998). Negli anni seguenti divenne sempre più evidente come la zanzara tigre fosse in grado di superare le rigide stagioni invernali italiane, radicandosi sul territorio di varie regioni (vedi figura 12). La preoccupazione crebbe da subito in quanto questa specie esotica era conosciuta per essere vettore di numerose arbovirosi (Shroyer, 1986). I primi documenti tecnici sulla sorveglianza della zanzara tigre vennero prodotti da un gruppo di lavoro di consulenza tecnico scientifica presso l'Istituto Superiore di Sanità (1994-1996), dove vengono formati annualmente medici del Servizio Sanitario Nazionale coinvolti delle attività di vigilanza di tale insetto (Romi, 2001).

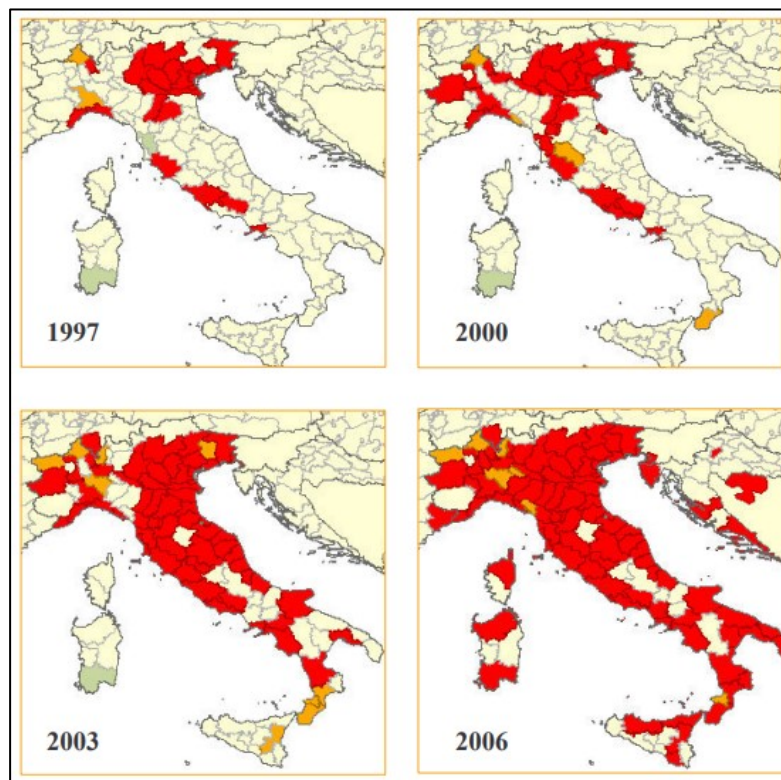


Figura 12: in rosso si nota l'evoluzione di *Ae. Albopictus* in Italia dal 1997 al 2006. In arancio invece sono quei territori provinciali dove allora la specie era solamente rilevata (Regione del Veneto, 2008).

2.1 Enti e organi responsabili della vigilanza in Italia

La sorveglianza entomologica è un'attività ormai consolidata che viene gestita da una rete di enti ed istituzioni, che hanno l'obiettivo comune di prevenire i rischi sanitari derivanti da artropodi. Fra i principali troviamo:

- Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS): è un istituto specializzato delle Nazioni Unite (ONU) per la salute e ha come obiettivo il raggiungimento da parte delle popolazioni del più alto livello possibile di salute. Fra i diversi ambiti si occupa di contrastare le malattie trasmesse da vettori, sia assicurando sostegno e pareri tecnici ai paesi soggetti a casi endemici, sia a migliorare i sistemi di controllo dei vettori presso i vari centri di collaborazione sparsi nel mondo per aumentare la prevenzione e quindi l'eliminazione di malattie importate (Ministero della Salute, 2014).
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): è un'agenzia indipendente dell'Unione Europea che ha il compito di rafforzare le difese dei paesi membri nei confronti delle malattie infettive. Dal 2007 annualmente pubblica un rapporto denominato "Eurosorveillance" riguardante l'epidemiologia, la prevenzione e la sorveglianza e il controllo di vettori di malattie infettive, con l'obiettivo di accorpare i vari bollettini e report sotto un unico giornale di divulgazione scientifica. Difatti, ogni anno produce delle mappe tematizzate per descrivere l'andamento degli areali delle zanzare invasive e delle malattie.
- Istituto superiore di sanità (ISS): è un ente di diritto pubblico che, come organo tecnico-scientifico del Servizio sanitario nazionale in Italia svolge funzioni di ricerca, sperimentazione, controllo, consulenza, documentazione e formazione in materia di salute pubblica.
- Servizio sanitario nazionale (SSN): è un sistema di strutture e servizi che hanno lo scopo di garantire a tutti i cittadini, in condizioni di uguaglianza, l'accesso universale all'erogazione equa delle prestazioni sanitarie. Forniscono assistenza a tutti i cittadini che sono oggetto di malattie portate da culicidi.
- Ministero della Salute (MiS): è un dicastero del governo italiano che ha compiti in materia sanitaria, di profilassi e raccordo con le istituzioni internazionali ed europee nel campo della sanità. È l'organo centrale del SSN e a cui sono attribuite le funzioni

in materia di tutela della salute umana, coordinamento del SSN, sanità veterinaria, tutela della salute nei luoghi di lavoro, igiene e sicurezza degli alimenti. Predispone il Piano sanitario nazionale e il Piano nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi. Il MiS è anche l'elemento di raccordo con l'OMS.

- Azienda Unità Sanitaria Locale (AUSL o Ulss): è un ente pubblico della pubblica amministrazione italiana, deputato all'erogazione di servizi sanitari in un territorio di competenza. Assolve ai compiti del SSN e delle altre incombenze previste dalla legge in uno specifico ambito territoriale. Nel Veneto sono presenti nove Ulss che corrispondono sommariamente al territorio provinciale: Ulss 1 Dolomiti (provincia di Belluno), Ulss 2 Marca Trevigiana (provincia di Treviso), Ulss 3 Serenissima e Ulss 4 Veneto Orientale (provincia di Venezia), Ulss 5 Polesana (provincia di Rovigo), Ulss 6 Euganea (provincia di Padova), Ulss 7 Pedemontana e Ulss 8 Berica (provincia di Vicenza) e Ulss 9 Scaligera (provincia di Verona). Il personale in servizio presso i dipartimenti di prevenzione delle Ulss costituito da medici dirigenti, veterinari, assistenti sanitari e tecnici della prevenzione, esplica funzioni di ispezione e vigilanza.
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe): è un ente sanitario di diritto pubblico che svolge attività di prevenzione, controllo e ricerca nell'ambito del benessere animale, della sicurezza alimentare e della tutela ambientale. Inoltre, è un centro specializzato in medicina veterinaria e sicurezza alimentare per il Ministero della Salute, le Aziende Sanitarie Locali, gli operatori del settore zootecnico, le aziende alimentari, i veterinari liberi professionisti, i privati cittadini. L'ente ricopre inoltre il ruolo di centro di riferimento nazionale e internazionale per specifiche tematiche di sanità animale e sicurezza alimentare per il Ministero della Salute, l'Organizzazione Mondiale per la Sanità Animale (OIE) e l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO). Negli ultimi vent'anni ha condotto molte ricerche nell'ambito della sorveglianza entomologica e monitoraggio delle zanzare invasive. L'IZSVe svolge un'intensa attività di sorveglianza sul territorio di competenza, unitamente ad attività di ricerca scientifica per conoscere meglio la biologia e l'ecologia di questi insetti. Collabora con le Aziende Sanitarie Locali nell'attuazione del "Piano Nazionale di sorveglianza e risposta alle arbovirosi trasmesse da zanzare (*Aedes spp*) con particolare riferimento ai virus Chikungunya, Dengue e Zika", attivato dal Ministero della Salute fin dal 2015 (Montarsi et al., 2018).

- Il Comune: la Pubblica Amministrazione locale ha un ruolo non marginale per il trattamento delle aree da disinfestare, quali la partecipazione al Gruppo Tecnico di coordinamento degli Enti ed Amministrazioni, il censimento delle aree di infestazione da zanzare in collaborazione con le Aziende ULSS, l'approvazione del capitolato d'appalto ed il finanziamento degli interventi di disinfestazione delle zanzare. Vi è quindi la necessità, onde garantire un intervento uniforme di qualità sul territorio, che tali operazioni si estendano almeno a tutto l'ambito territoriale dell'Azienda ULSS sul quale è competente la locale Conferenza dei Sindaci. Per quanto attiene agli interventi di prevenzione ambientale sarebbe di fondamentale importanza elaborare un documento finalizzato ad una corretta gestione del territorio, pubblico e privato, per la riduzione dei focolai di vettori da proporre alle autorità locali per l'assunzione sotto forma di ordinanza o/e di articolo del Regolamento Comunale. E' estremamente necessario interagire con il privato per la prevenzione e la disinfestazione, offrendo informazioni capillari a tutti i cittadini. Considerata come attività minore dai Comuni, la disinfestazione del territorio è comunque un'attività importante dal punto di vista strategico per garantire una miglior qualità della vita ed evitare il diffondersi di patologie. Non si tratta solo di essere infastiditi da animali che infestano il territorio, ma di svolgere con attenzione le funzioni di autorità sanitaria che la legge pone in capo al Sindaco (Lustro et al., 2005).

2.2 Le misure di controllo in Veneto

Dall'approvazione della DRGV 324/2006, la quale recepiva "Le Linee Guida per l'organizzazione e la gestione delle attività di disinfestazione", la Regione Veneto ha avviato un percorso, attualmente basato sul "Piano regionale di sorveglianza integrata e misure di lotta ai vettori 2018", che ha come obiettivo la messa a punto di protocolli standardizzati di intervento, i quali definiscono le competenze dei diversi enti coinvolti, stabilendo una strategia di controllo e di verifica delle attività di disinfestazione operate dalle amministrazioni Comunali.

Risulta, quindi, importante il controllo dei vettori attraverso lo stretto coordinamento tra gli organi competenti e la stesura di procedure specifiche di verifica, in funzione della tipologia di prodotto applicato. In questo modo vengono recepiti rapidamente i cambiamenti sulle tipologie di insetticidi a disposizione determinati dal Regolamento Biocidi (528/2012).

Con la Delibera n. 174 del 22 febbraio 2019, prorogata con l'approvazione della DGR n. 12 del 12/01/2021, si è stabilito che ogni Azienda Ulss debba dotarsi di un Piano Aziendale di Attività entro il 30 marzo, considerato come "documento strategico di programmazione e monitoraggio" nel quale programmare, tra le varie azioni, la valutazione dell'efficienza delle ditte di disinfestazione e dell'efficacia dei trattamenti.

Il "Piano regionale di sorveglianza integrata e misure di lotta ai vettori 2018" stabilisce i ruoli e le metodologie relative alle attività di sorveglianza sulle azioni di disinfestazione svolte dai comuni, recependo quanto riportato nel "Piano nazionale di sorveglianza e risposta alle arbovirosi trasmesse da zanzare invasive (*Aedes spp.*) con particolare riferimento ai virus Chikungunya, Dengue e Zika – 2018" e nel "Piano nazionale integrato di sorveglianza e risposta ai virus West Nile e Usutu – 2018" il quale è stato aggiornato, in seguito, all'anno 2019. In questo documento si stabilisce che "la Regione e le ASL competenti per il territorio, sono responsabili della valutazione e gestione locale del rischio sanitario. La programmazione, l'esecuzione e la valutazione degli interventi di controllo dei potenziali vettori vanno disposti e adattati localmente dal Dipartimento di Prevenzione della Ulss che, supportato da una struttura Regionale di competenza, decide l'azione da intraprendere, avvalendosi delle competenze entomologiche disponibili sul territorio e dei Comuni ai quali è demandata l'attività di controllo del vettore".

Inoltre, con DGR n. 207 del 18/02/2020, la Regione Veneto ha recepito "Il Piano Nazionale di Prevenzione e Sorveglianza delle Arbovirosi 2020-2025", documento che individua azioni

strategiche che devono essere attuate: i punti fondamentali sono l'implementazione delle azioni di sorveglianza delle specie invasive quali potenziali vettori di arbovirosi ed il monitoraggio della resistenza agli insetticidi al fine di evidenziare precocemente l'insorgenza e la diffusione del fenomeno.

2.3 Lo stato attuale della vigilanza: la linea operativa di Entostudio

Attualmente è in vigore il “Piano Nazionale di Prevenzione, Sorveglianza e Risposta alle Arbovirosi 2020-2025”; ogni regione poi recepisce il piano a livello locale dove sottoscrive le linee guida per quanto riguarda sia i capitolati d'appalto, sia la vigilanza entomologica, ovvero il controllo dell'azione del larvicida applicato ed eventuali monitoraggi in merito a casi di interesse sanitario.

L'attività di vigilanza oggi si svolge nel periodo da aprile ad ottobre in stretta collaborazione con il Dipartimento di Prevenzione delle Ulss della provincia oggetto di monitoraggio, il quale fornisce la documentazione relativa ai calendari di intervento ed ai prodotti insetticidi applicati nel territorio di competenza.

In Veneto esistono diverse realtà che si occupano di disinfestazione e controllo degli artropodi infestanti: come anticipato sopra, per aggiudicarsi tale servizio è necessario partecipare ad una gara d'appalto dove verrà selezionata una ditta vincitrice; la durata dell'incarico viene stabilita nel capitolato.

I dati utilizzati per l'elaborazione di questa tesi sono stati raccolti e poi messi a disposizione da parte della ditta Entostudio che si è occupata della sorveglianza entomologica delle caditoie pubbliche durante il periodo di Vigilanza estiva 2020. I monitoraggi in questione hanno interessato i territori di competenza di sette Ulss del Veneto (Ulss 2 Marca Trevigiana, Ulss 3 Serenissima, Ulss 5 Polesana, Ulss 6 Euganea, Ulss 7 Pedemontana, Ulss 8 Berica e Ulss 9 Scaligera), areale che Entostudio monitora tutt'oggi.

Entostudio nasce nel 1999 come studio professionale associato che si occupava di consulenza entomologica per conto delle Ulss e delle pubbliche amministrazioni. I due soci, difatti, avevano fatto esperienza negli anni precedenti presso l'Università degli Studi di Padova dove, per mezzo di borse di ricerca, hanno partecipato a progetti nell'ambito dell'entomologia urbana: nello specifico nei monitoraggi dei primi focolai di zanzara tigre. Nel 2004, Entostudio diventa a tutti gli effetti una società e i due soci per alcuni anni aprono anche una ditta di disinfestazione che consentirà loro di accumulare ulteriore esperienza sia nel pest management che nell'impiego dei prodotti insetticidi. Nel 2011 i due soci aprono il laboratorio che attualmente ha sede nel comune di Ponte San Nicolò (PD) dove oggi sono allevate 17 specie di insetti per test di laboratorio. Mentre l'attività di testing di prodotti biocidi è riferita al solo ultimo decennio, l'attività di Vigilanza è stata costante da sempre. Tuttavia, nei primi anni era condotta in piccoli territori (comuni singoli), lo sviluppo dei report era lento e l'accesso ai dati era unicamente cartaceo.

Dal 2019 l'attività di monitoraggio è stata resa più celere grazie all'ausilio di dispositivi elettronici mobili, forniti agli entomologi, dotati di una Progressive Web App VecTrax® (Penazzo, 2019), la quale ha permesso di:

- avere in tempo reale i dati raccolti dagli operatori in campo;
- trasmettere velocemente i dati relativi alle diverse richieste/attività svolte;
- redigere i report delle verifiche di efficacia effettuate nei territori fornendo in tempi rapidi una panoramica completa del monitoraggio e del valore di positività riscontrato
- fornire nelle emergenze sanitarie dei casi importati di Dengue, Chikungunya e Zika virus, un report entro poche ore dalla conclusione della verifica, permettendo la rapida informazione sulla situazione dell'infestazione di zanzare e la conseguente necessità di avviare o meno il protocollo di emergenza.

La nuova metodologia ha semplificato, quindi, le attività di controllo, permettendo di generare la reportistica rapidamente, riducendo così i tempi di attesa, il rischio di errori e le ore di lavoro impiegate. La schermata iniziale dell'applicazione è rappresentata in figura 13, mentre in figura 14 è raffigurata la schermata principale di inserimento dei dati relativi al monitoraggio della singola caditoia, nella quale sono preinserite le specie più comuni che possono essere ritrovate nel nostro territorio (per esempio la sigla "Aa" è riferita alla specie *e. albopictus*, "Cp" è riferita a *Cx. pipiens*, "Ak" ad *Ae. koreicus*...). Ciascuna delle specie è associata ad una percentuale di abbondanza: qualora la stessa specie coesista all'interno di una caditoia assieme ad una o più specie è possibile indicare un valore rappresentativo relativo alla presenza; per ciascuna specie è possibile inserire gli stadi larvali rilevati (L1-L2-L3-L4), uova, pupe e/o adulti.

Al termine del monitoraggio del territorio comunale interessato, si otterranno i seguenti dati:

- Nome ed identificazione del luogo campionato (via, piazza, etc.) e relativo numero civico a cui viene associata ogni singola caditoia;
- Elenco delle coordinate GPS e relativa mappatura delle caditoie campionate con marcature diverse che distinguono le caditoie riscontrate positive da quelle negative;
- N° tombini osservati: numero totale dato dai tombini con acqua e secchi monitorati;
- N° tombini secchi: tombini privi di acqua che possono ospitare adulti;
- N° tombini con acqua: tombini con acqua che possono ospitare larve di zanzara, uova e/o adulti;

- N° tombini con larve (positivi) e privi di larve (negativi);
- Positività del comune: data dal rapporto percentuale fra il numero di tombini positivi ed il numero di tombini con acqua (descritta al paragrafo successivo)
- Specie presenti con relativi stadi riscontrati (uova, larve, pupe, adulti);
- Livello di densità di infestazione:
 - classe A: da 1 a 10 larve per mezzo litro d'acqua
 - classe B: da 11 a 50 larve per mezzo litro d'acqua
 - classe C: da 51 a 100 larve per mezzo litro d'acqua
 - classe D: oltre le 101 larve per mezzo litro d'acqua
- N° campioni eseguiti (riferito a quando si campiona un fossato, solitamente si fanno 2 campioni ogni 5 metri);
- Temperatura dell'acqua
- pH dell'acqua;
- Percentuale di sfarfallamento che indica l'efficacia o meno di un trattamento (dato ottenuto attraverso il controllo in laboratorio di campioni in cui viene osservato il completamento o meno del ciclo di sviluppo delle larve raccolte).

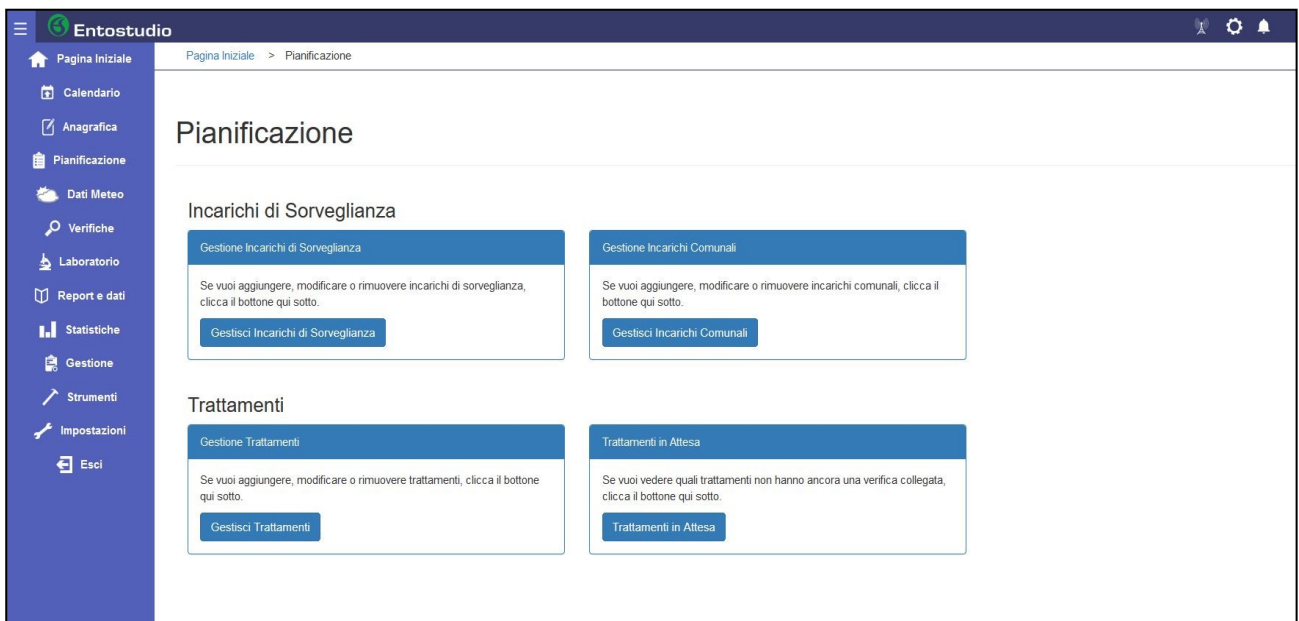


Figura 13: schermata iniziale della Progressive Web App VecTrax®. Da qui si possono vedere le varie voci principali: incarichi di sorveglianza (dove sono elencati tutti i comuni da campionare e la relativa Ulss di competenza) e trattamenti (dove sono registrati i vari trattamenti in programma), che poi verranno verificati con tempistiche differenti (Penazzo, 2019).

Entostudio

Aggiungi un nuovo campionamento

Longitudine Latitudine Precisione Rilevata: -m.

N. Civico

No Acqua No Zanzare Densità

| | <input type="button" value="Aa"/> | <input type="button" value="Cp"/> | <input type="button" value="Ak"/> |
|----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| u | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No |
| L1 | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No |
| L2 | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No |
| L3 | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No |
| L4 | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No |
| p | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No |
| a | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No |

Percentuale Aa Percentuale Cp Percentuale Ak

No Specie Sconosciute temp °C pH

Note

Entostudio - versione 1.1.4 Copyright © 2019 - Daniele Penaz

Figura 14: schermata principale di inserimento dei dati del campionamento della Progressive Web App VecTrax® per come si mostra una volta selezionata la voce “aggiungi nuovo campione” (Penazzo, 2019).

2.3.1 Il criterio dell'operatore e la definizione di positività di una caditoia

Per campionare una caditoia, e valutare quindi la presenza di larve di zanzara in essa, oltre ad una buona conoscenza entomologica, sono necessari due strumenti: un piccone (utilizzato per aprire la caditoia) e un dipper (trattasi di un bastone telescopico dotato di un becker avente capienza di 500 ml posto ad una estremità; vedi figura 15). Secondo il criterio operativo adottato da Entostudio, l'operatore, con l'ausilio dello stradario, sceglie preliminarmente le vie da campionare in modo da disegnare i punti di campionamento in maniera omogenea nel territorio comunale. Per ogni via vengono dunque selezionate quattro caditoie vicine, e ognuna viene valutata con la seguente modalità: si individua la caditoia con acqua e la si solleva con l'ausilio del piccone. Scoperta la grata, si attende una decina di secondi in modo da lasciar stabilizzare l'acqua da eventuali detriti caduti. Dopodiché, lentamente con il dipper si vanno a fare delle pescate sui tre dei quattro angoli della caditoia (Regione del Veneto, 2018) e si osserva quante larve e di quale specie sono raccolte ad ogni rilevamento (il sifone è un elemento chiave per tale riconoscimento della specie, vedi appendice 7.1). Al termine della terza pescata, la caditoia può definirsi "negativa" qualora si dovesse riscontrare l'assenza di larve o la presenza di una singola larva su tre pescate, oppure "positiva" qualora venisse riscontrata la presenza di larve. In questo caso, si fa una stima mediando i vari risultati, assegnando una classe di infestazione, e si indica l'età degli stadi presenti. Qualora non fosse impossibile eseguire le pescate per via di una quantità di acqua insufficiente, o assente totalmente, alla caditoia viene assegnato lo stato "secca". Al termine del monitoraggio, si possono osservare i punti monitorati attraverso l'interfaccia grafica della WebApp VecTrax® visualizzando così le caditoie monitorate e le eventuali positività riscontrate (vedi figura 16).



Figura 15: immagine che raffigura il dipper, ovvero lo strumento utilizzato per campionare le caditoie. Si può notare il becker saldato su un'estremità che consente di prelevare un volume d'acqua dove poter osservare l'eventuale presenza di larve di zanzara.



Figura 16: interfaccia dell'applicazione VecTrax dove vengono mostrate le diverse caditoie monitorate durante una verifica di efficacia ordinaria (Cona, 13 agosto 2020). Gli indicatori in verde corrispondono le caditoie che non presentano larve di zanzara, mentre quelli in rosso corrispondono alle caditoie positive (Penazzo, 2019).

Durante un campionamento, la scelta delle vie e delle caditoie da monitorare è esclusivamente a scelta dell'operatore secondo le linee guida di Entostudio. Durante la stagione 2020, nelle verifiche di efficacia e di infestazione è stato campionato un numero di vie compreso fra sei e otto e per ogni via sono state monitorate tre o quattro caditoie (in alcuni casi anche cinque). Le vie scelte dovevano appartenere a zone vicine a case abitate o centri ad alta densità abitativa poiché è interesse tutelare da focolai di culicidi la maggior parte dei cittadini. Ciò non da meno importanza alle strade rurali, infatti è auspicabile che in zona comunale i trattamenti delle caditoie vengano eseguiti in modo omogeneo e che il campionamento sia in grado di determinare con affidabilità se l'azione larvicida sia stata efficace o meno.

2.3.2 Tipologia di verifica per un comune monitorato

Il monitoraggio dei culicidi viene eseguito seguendo le indicazioni operative contenute nel "Piano Regionale di Sorveglianza Integrata e Misure di Lotta ai Vettori Anno 2018" al paragrafo "Metodi di stima dell'efficacia dei prodotti antilarvali applicati per il controllo delle zanzare".

A seconda delle informazioni disponibili relative ai trattamenti effettuati in un territorio comunale, verrà definita una tipologia di verifica con relativi obiettivi. Esistono dunque:

1. Verifiche di efficacia ordinaria: queste sono le più comuni e servono appunto a verificare che il trattamento larvicida sia stato efficace. Devono necessariamente rispettare i tempi di azione dei prodotti applicati, pertanto, è necessario sapere data e principio attivo impiegato. Verranno inoltre fatte considerazioni sulle eventuali precipitazioni.
2. Verifiche di infestazione: queste verifiche possono essere effettuate per valutare la presenza di focolai larvali presenti in quelle municipalità che non hanno fatto pervenire nessuna comunicazione o nessun calendario relativo agli interventi larvicidi.
3. Verifica sanitaria: queste verifiche sono le più importanti poiché avvengono correlate al manifestarsi di uno dei casi sanitari descritti nel paragrafo 1.3. L'operatore deve recarsi presso l'abitazione della persona infetta e monitorare l'area attorno ad essa per verificare la presenza o l'assenza di larve e adulti di zanzara. Qualora il risultato del monitoraggio dovesse essere critico, si predispongono una serie di procedure di emergenza e trattamenti larvicidi straordinari come indicato dal "Piano Nazionale di Prevenzione e Sorveglianza delle Arbovirosi 2020-2025".
4. Verifica straordinaria: queste verifiche seguono la stessa metodica delle verifiche di efficacia ordinaria, ma sono relative a quei trattamenti eseguiti a seguito di una verifica sanitaria.

Al fine della valutazione dell'efficacia, il parametro di riferimento da considerare è la percentuale di caditoie positive riferite al numero di caditoie con acqua. Un trattamento larvicida risulta, quindi, efficace se tale percentuale è inferiore o uguale al 10.0%, limite previsto dal "Piano Regionale di Sorveglianza Integrata e Misure di Lotta ai Vettori Anno 2018".

2.3.3 Verifiche nei fossati

Congiuntamente alle verifiche effettuate nelle caditoie, sono effettuati inoltre campionamenti nei fossati per constatare il livello di infestazione, considerata la loro importanza come potenziali focolai di *Culex pipiens*.

In particolare, sono monitorati i fossati, in prossimità di centri urbani o in aree peri-urbane, aventi le seguenti caratteristiche: forte inerbimento, a basso scorrimento di flusso di portata, elevata carica organica e vicinanza a scarichi di acque nere e/o grigie.

Per il campionamento si opera nel seguente modo:

- individuazione dei fossati nelle aree extraurbane attraverso lo spostamento in loco e stima della loro lunghezza;
- verifica della presenza di acqua e campionamenti con dipper ripetuti a distanza di circa 4-5 metri e/o in funzione delle caratteristiche del focolaio (scorrimento dell'acqua, presenza di vegetazione fitta lungo le sponde, profondità dell'alveo);
- trasferimento delle larve su di una vaschetta con fondo bianco per l'individuazione del genere e/o della specie e la stima della densità.

Va da sé che vi sono alcuni territori che nel capitolato d'appalto prevedono il trattamento dei fossati. Pertanto, una volta fornita la documentazione necessaria, verranno monitorati anch'essi e trattati come una verifica di efficacia. D'altro canto, rispetto alle caditoie, per i fossati non esiste una soglia limite che determina se il trattamento antilarvale sia stato efficace o meno.

2.4 I prodotti utilizzati negli interventi antilarvali contro i culicidi

I larvicidi contro i culicidi più comunemente utilizzati nelle aree monitorate da Entostudio (vedi tabella 2.1) sono i seguenti:

- Diflubenzuron: molecola insetticida appartenente ai prodotti IGR (Insect Growth Regulator – Regolatore di Crescita degli Insetti). Tale prodotto viene impiegato nella lotta larvicida come regolatore di crescita in quanto agisce per contatto ed ingestione inibendo la formazione dell'esoscheletro di chitina, impedendo così il regolare compimento delle mute ed il corretto sviluppo dell'embrione. Se applicato correttamente non dovrebbe consentire di rinvenire alcun stadio larvale di lì ad almeno due settimane dalla sua applicazione.
- Vectomax™ FG: insetticida biologico composto dal batterio *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in associazione ad un secondo batterio *Bacillus sphaericus*, che agisce sulle larve per ingestione. L'attività biologica è svolta dalle Delta-endotossine dei due bacilli, presenti sotto forma di cristalli o inclusioni parasporali, le quali, una volta ingerite dalle larve, provocano il rigonfiamento, la distorsione ed infine la rottura delle cellule epiteliali causando una paralisi del tratto digerente che determinerà la morte delle larve entro pochi giorni.
- Pyriproxyfen: molecola insetticida appartenente ai prodotti IGR che agisce per contatto ed ingestione con azione ormosimile, ovvero, generando uno squilibrio tra la concentrazione dell'ormone della crescita (ecdisone) e l'ormone giovanile (neotenina). Il risultato dello squilibrio è l'impossibilità della zanzara di giungere al regolare completamento del proprio ciclo biologico, poiché il meccanismo si attiva al momento della metamorfosi, quindi al passaggio dallo stadio di pupa allo stadio adulto. Le larve, invece, non subiscono danni e pertanto continuano ad apparire vitali. Il particolare meccanismo d'azione rende così necessaria la raccolta di larve e la loro osservazione in laboratorio per una successiva verifica dello sfarfallamento.
- Aquatain AMF®: film silconico che agisce con un'azione fisico-meccanica creando un sottilissimo strato sulla superficie dell'acqua che impedisce alle larve di respirare morendo per soffocamento. Inoltre, questa "pellicola" impedirebbe alle femmine adulte di *Culex spp.* la deposizione delle uova in quanto rimangono intrappolate nel

film siliconico. L'alta biodegradabilità e l'elevata sensibilità alle piogge sono due criticità che non lo rendono uno dei prodotti maggiormente utilizzati nel Veneto.

| Prodotti utilizzati | Ulss monitorate nel periodo di Vigilanza 2020 | | | | | | |
|---------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Ulss 2 | Ulss 3 | Ulss 5 | Ulss 6 | Ulss 7 | Ulss 8 | Ulss 9 |
| Diflubenzuron | si | si | si | si | si | si | si |
| Vectomax™ FG | si | si | si | si | si | si | si |
| Pyriproxyfen | no | si | no | si | si | si | si |
| Aquatain AMF® | no | si | no | no | no | no | no |

Tabella 1: elenco dei prodotti utilizzati nei territori delle Ulss monitorate da Entostudio durante il periodo di vigilanza 2020.

3. Obiettivo della tesi

In Italia la lotta ai culicidi nelle caditoie pubbliche è attualmente gestita dai Comuni sotto la sorveglianza dell'Ulss di competenza. I comuni appaltano il servizio ad una ditta di disinfestazione che tratta le caditoie pubbliche ed eventualmente anche i fossati, indicati nel capitolato d'appalto presente al momento della pubblicazione del bando di gara. A sua volta, l'Ulss appalta il servizio di sorveglianza entomologica ad una azienda che ha il compito di verificare l'efficacia dei prodotti applicati nelle caditoie. L'interesse che condividono sia le Ulss che i Comuni è quello di controllare la popolazione di zanzare nel territorio ed impedire la pullulazione di focolai di zanzara. La costante presenza di acqua nelle caditoie rende queste ultime il principale habitat per le zanzare dove riprodursi in un contesto urbano.

Il campionamento delle caditoie pubbliche allo stato attuale è gestito in maniera autonoma dalle aziende che si aggiudicano l'appalto, senza tuttavia avere uno strumento che supporti la qualità del monitoraggio e giustifichi in modo solido la scelta operativa effettuata. Gli obiettivi di questa tesi sono tre:

1. quello principale è di determinare la dimensione del campione per stimare, entro un margine di errore specificato, la proporzione di caditoie di un Comune positive alla presenza di larve di zanzare in base alla percentuale di positività attesa;
2. in secondo luogo, simulare e mettere a confronto due criteri di campionamento: il campionamento random (utilizzato come punto di partenza) e il campionamento secondo il criterio dell'operatore (ovvero quello che rispecchia le scelte adottate da Entostudio);
3. in terzo luogo, valutare se l'esclusione delle caditoie secche durante un monitoraggio consentirebbe una stima più affidabile e precisa del valore di positività.

4. Materiali e metodi

Durante la stagione di vigilanza entomologica 2020, Entostudio si è occupato delle verifiche di efficacia ordinaria in sette Ulss su nove presenti nella regione Veneto: Ulss 2 Marca Trevigiana, Ulss 3 Serenissima, Ulss 5 Polesana, Ulss 6 Euganea, Ulss 7 Pedemontana, Ulss 8 Berica e Ulss 9 Scaligera. La grande copertura del territorio ha garantito una buona raccolta di dati da elaborare per ottenere informazioni utili sul monitoraggio dei culicidi in Veneto (figura 17).

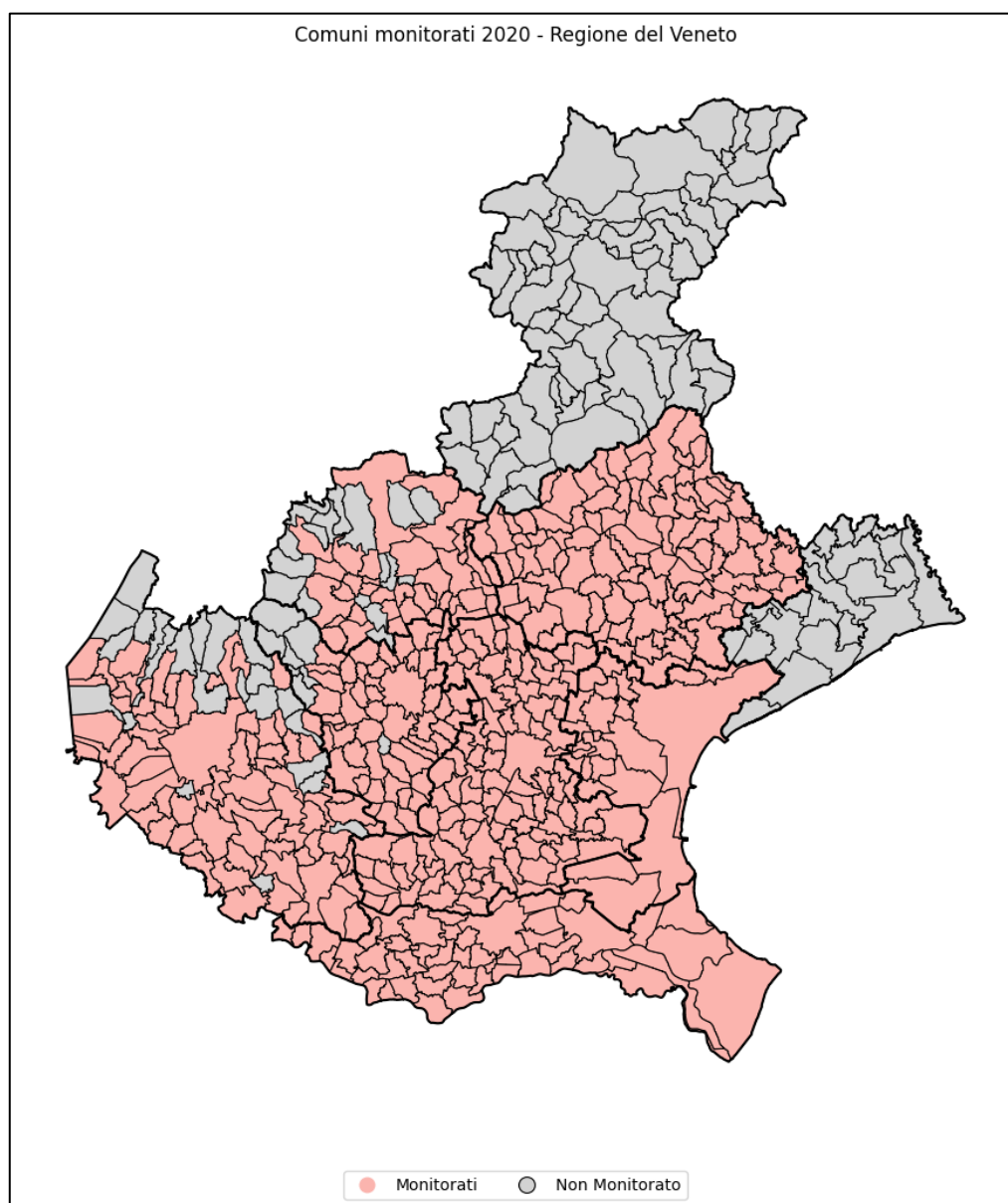


Figura 17: elenco dei comuni monitorati da Entostudio nel periodo di Vigilanza 2020 nella regione del Veneto. Si notano le due macchie grigie riferite rispettivamente all'Ulss 1 Dolomiti (nord) e Ulss 4 Veneto Orientale (est) non presenti negli incarichi ricevuti da Entostudio (Entostudio, elaborazione VecTrax®, 2021).

4.1 Le condizioni da valutare durante il monitoraggio

Raramente è possibile campionare l'intera municipalità, soprattutto per i comuni con elevati numeri di caditoie (oltre le diecimila) dove i trattamenti vengono distribuiti in diversi periodi del mese con diverse circoscrizioni. Per questo è stato messo a punto da Entostudio uno schema operativo di monitoraggio delle caditoie per far fronte alle diverse situazioni. Sia nelle verifiche di efficacia ordinaria, sia nelle verifiche di infestazione, l'operatore procede alla stessa maniera: se presente lo stradario fornito dall'Ulss di competenza, sceglie fra sei e otto vie tra quelle presenti nell'elenco cercando di fare dei rilievi omogeneamente distribuiti nel territorio comunale. Per ogni via l'operatore campiona tre o quattro caditoie una consecutiva all'altra e ne determina l'eventuale stato di infestazione (vedi sezione 2.3.1 Definizione della positività di una caditoia). Qualora non fosse disponibile lo stradario, l'operatore sceglie le vie con l'ausilio di una mappa satellitare, valutando poi alla maniera sopra descritta lo stato delle caditoie presenti. Le verifiche di infestazione vengono perlopiù valutate senza l'ausilio di stradario: questa tipologia di verifica riguarda infatti i monitoraggi riferiti a quelle municipalità che non hanno trasmesso alcuna informazione relativa ai trattamenti larvicidi eseguiti. Dunque, è facile trovare vie prive di caditoie, poiché l'operatore sceglie le vie senza sapere la localizzazione delle caditoie.

Il metodo adottato da Entostudio durante il campionamento nel periodo di vigilanza 2020 ha considerato un numero di tombini totale per Comune compreso tra 20 e 30, fatta eccezione per la Ulss 8 Berica dove da capitolato d'appalto, il numero da considerare era 40. I primi monitoraggi sono stati effettuati alla fine di marzo e gli ultimi nella metà di ottobre: in media è stata fatta una verifica di efficacia per comune monitorato, fatta eccezione per le municipalità di competenza della Ulss 3 Serenissima che prevedevano da capitolato un numero di verifiche fra le tre e le quattro complessive. Dai dati raccolti da Entostudio nel 2020, nei Comuni monitorati il numero medio di caditoie osservate a verifica è stato di 29, di cui in media 24 caditoie con acqua e 5 caditoie secche. Una volta valutato lo stato di tutte le caditoie osservate (positivo o negativo), è stata calcolata la positività del Comune monitorato calcolando il rapporto percentuale delle caditoie positive sulle caditoie con acqua. Tuttavia, le caditoie secche influiscono molto nel risultato finale di positività: più caditoie secche vengono considerate nel monitoraggio, meno caditoie con acqua ci sono per poter determinare il valore di positività, penalizzando la precisione del campionamento. Va da sé che a seconda della morfologia del terreno (ambiente più o meno collinare) e dalle

condizioni meteo (siccità o eventi piovosi), il numero di caditoie secche è molto eterogeneo fra le diverse municipalità campionate.

4.2 Schema operativo delle elaborazioni eseguite

Il lavoro qui di seguito riportato è stato sviluppato in tre passaggi diversi: in un primo momento c'è stata la selezione dei comuni da considerare come casi di studio sulla base dei dati raccolti nella stagione di vigilanza 2020 nei Comuni del Veneto: sono stati osservati i vari stradari (200) con gli elenchi delle caditoie trattate e i diversi valori di positività rilevati durante le verifiche di infestazione e di efficacia ordinaria. I criteri secondo i quali sono stati selezionati i tre comuni su cui eseguire le simulazioni sono illustrati nella sezione 4.4. In un secondo momento è si è proceduto all'organizzazione dei dataset di partenza; per ciascuno dei tre comuni selezionati è stato reperito dallo stradario (fornito dall'Ulss) l'elenco delle vie e delle caditoie di ciascuna via numerate progressivamente.

Si è passato poi all'assegnazione dello stato delle caditoie tramite il software di analisi statistica RStudio Version 1.4.171 (R Core Team, 2021). In base allo stato delle caditoie, per ciascun comune, sono stati simulati 9 scenari, come illustrato in figura 18, derivanti dalla combinazione dei livelli dei seguenti due fattori:

- Il fattore "percentuale di positività nella popolazione di partenza" con 3 livelli: 10%, 30% e 50%;
- Il fattore "percentuale di caditoie secche" con 3 livelli: 0%, 30% e 60%;

A ciascun dataset comunale contenente tutte le caditoie e le rispettive vie è stata perciò aggiunta una variabile categorica denominata "stato della caditoia". A questa variabile sono assegnabili i valori "positiva", "negativa" e "secca". L'attribuzione dello stato a ciascuna caditoia è stata eseguita utilizzando un generatore casuale di valori in modo da assegnare casualmente ad ogni caditoia lo stato "positiva", "negativa" o "secca" con una data probabilità, e ripetendo ogni assegnazione tre volte in modo da avere tre repliche per ciascuno scenario.

Successivamente, per ciascuno scenario e relative repliche, sono state stabilite diverse dimensioni campionarie da testare e per ciascuna di esse sono stati estrapolati 1000 campioni, prima campionando in maniera random e poi con il criterio dell'operatore. Per ciascuno dei 1000 campionamenti è stata calcolata la % di positività ed è stata determinata la deviazione standard sui 1000 valori di positività, la quale fornisce una stima della variabilità del valore di positività nelle condizioni testate.

Per uno dei tre comuni scelti come caso di studio sono state monitorate tutte le caditoie presenti (monitoraggio dell'11 settembre 2020, vedi figura 24) La scelta del comune da monitorare è stata dettata da ragioni di praticità dal momento che il comune scelto è quello con il minor numero di caditoie fra i tre comuni oggetto della tesi. Il monitoraggio di tutte le 432 caditoie di questo comune ha rilevato un quadro caratterizzato da una positività del 65% e una percentuale di tombini secchi pari al 40%. Successivamente, prendendo come base lo stradario del comune selezionato, si è proceduto a simulare un dataset alternativo attraverso il software R studio. Il dataset alternativo è stato costruito in modo da presentare le stesse condizioni osservate al momento del rilievo (positività del 65% e percentuale di caditoie secche pari al 40%), ma l'assegnazione dello stato dei tombini è stata eseguita in maniera casuale, producendo perciò una differente distribuzione spaziale dei tombini positivi, negativi e secchi rispetto a quanto rilevato nel monitoraggio. Per entrambi i dataset, monitorato e simulato, stati estrapolati 1000 campioni, campionando in maniera random e con il criterio dell'operatore. Ogni estrapolazione di 1000 campioni è stata replicata tre volte utilizzando un comando nel software R studio che permette di eseguire la simulazione estraendo ogni volta in maniera casuale combinazioni diverse di caditoie, producendo così un risultato diverso ogni volta che si esegue la simulazione. Questo ha permesso di ottenere tre repliche per ciascuno dei due metodi di campionamento per ognuno dei due dataset. Per ciascuna replica è stata determinata la deviazione standard in maniera analoga alle simulazioni svolte per tutti i casi di studio.

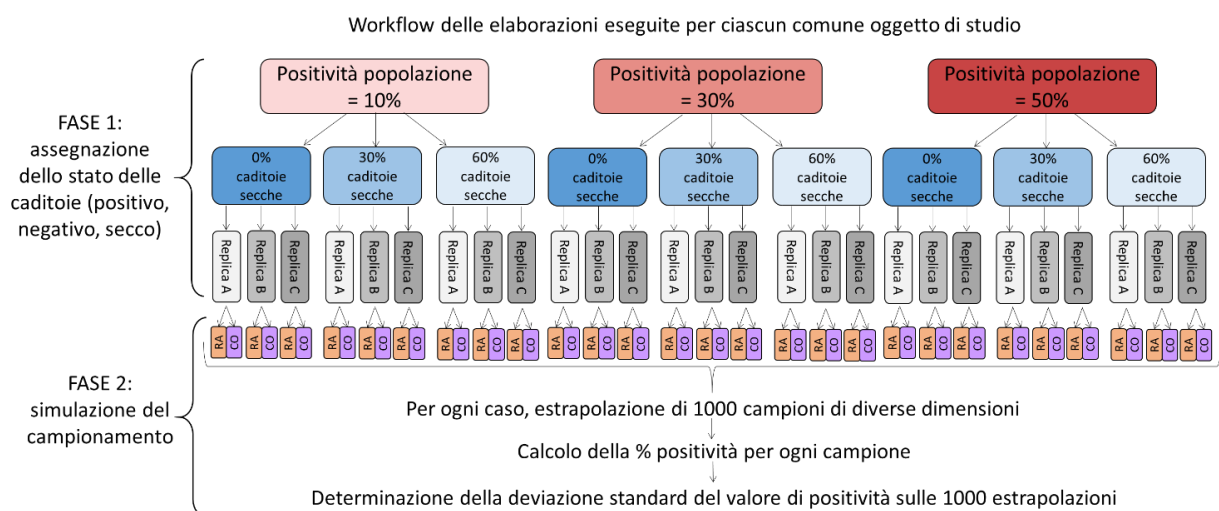


Figura 18: illustrazione dello schema operativo adottato per analizzare le varianze dei valori di positività delle diverse estrapolazioni. Si notano i tre gruppi relativi alle diverse positività attese e i tre casi di caditoie secche per ciascuno. Per ognuno si confronterà il campionamento casuale (RA) e il criterio operatore (CO).

4.2.1 Determinazione della numerosità campionaria

Definito lo schema operativo, è necessario approfondire il concetto della “sample size” di una popolazione. La dimensione del campione è una caratteristica significativa di qualsiasi studio empirico in cui l'obiettivo è quello di fare inferenze su una popolazione da un campione. Al fine di generalizzare da un campione casuale ed evitare errori di campionamento o distorsioni, un campione casuale deve essere di dimensioni adeguate (Taherdoost, 2017). Questa caratteristica aiuta a definire il numero di tombini ideale da considerare per il monitoraggio su un numero noto di tombini. La formula della sample size (vedi Eq. 1) è data dal rapporto di vari fattori: n è la sample size, ovvero quanti tombini dobbiamo considerare per valutare il nostro intervento larvicida. Tale valore dipende dai seguenti parametri:

- N è la dimensione della popolazione di tombini trattati durante il trattamento larvicida, essa è molto eterogenea e in genere varia in base alla grandezza del territorio Comunale.
- P è la percentuale di tombini positivi che ci aspettiamo di trovare nel nostro campione: in genere, se il trattamento fosse efficace dovrebbe risultare 0% o leggermente superiore. Tuttavia, spesso questo valore è superiore a 5% (valore osservabile dai dati raccolti durante il periodo di vigilanza 2020, vedi in appendice 7.2) e perciò è necessario considerare diverse casistiche per i valori di P . Secondo uno studio di Bartlett et al. (2001) è opportuno considerare un valore di P pari 0,5 quando non si hanno informazioni pregresse. Nel nostro caso, valuteremo sia questo fattore ($P = 0,5$), un fattore P intermedio ($P = 0,3$) sia il caso in cui $P = 0,1$, ovvero una positività attesa del 10%, preso come limite di positività massima consentito nei controlli anti-larvali per determinare se un trattamento risulta efficace o meno (Regione del Veneto, 2018).
- E è il margine d'errore, ovvero la semi-ampiezza dell'intervallo di confidenza, che nel nostro caso abbiamo scelto come 8%. Questo intervallo è stato scelto per rappresentare l'incertezza del valore di positività riscontrato da un monitoraggio. Considerando una positività attesa del 10% (Regione del Veneto, 2018) è possibile ottenere dei valori inferiori a questa soglia (trattamento efficace) o valori leggermente superiori, fino a 18%, che indicherebbero la presenza di isolate criticità e non di una chiara inefficacia del trattamento oggetto di verifica.

- Z invece è lo z-score ovvero un parametro statistico noto sulla base del grado di confidenza che abbiamo considerato, nel nostro caso è 95% ($z = 1.96$). Di seguito è illustrata la formula della sample size utilizzata per ricavare i valori di n .

Prima di tutto verranno quindi calcolate le varie “sample size” teoriche riferite al numero di caditoie del comune scelto.

Nelle simulazioni poi verranno successivamente valutate, oltre alle dimensioni campionarie adottate nei monitoraggi della vigilanza 2020 da parte di Entostudio, un maggior numero di caditoie per comprendere quale numero ideale di caditoie è sufficiente campionare in determinate le condizioni di campionamento (positività attesa, caditoie secche e criterio operatore o campionamento casuale).

$$n = \frac{\frac{z^2 \times P(1 - P)}{E^2}}{1 + \left(\frac{z^2 \times p(1 - P)}{E^2 N}\right)} \quad \text{Eq. [1]}$$

4.2.2 Basi statistiche dei due criteri di campionamento testati

Al fine di valutare se il metodo operativo di Entostudio sia valido ed affine alle valutazioni delle verifiche di efficacia, è stato scelto di confrontare questa tipologia di campionamento (definita come criterio operatore) con una tipologia di campionamento diversa, ovvero un campionamento casuale semplice senza reinserimento (definito come criterio random). Quest’ultimo è stato utilizzato come punti di partenza dello studio e, sebbene nella realtà sia poco conveniente, rappresenta uno scenario limite per il quale si vuole osservare a livello statistico se vi siano differenze significative o meno con il criterio operatore. Da una parte, le caditoie considerate possono infatti appartenere alla stessa via (o poche vie), mentre nel criterio operatore vi è un numero di caditoie costanti appartenenti per via.

Se N_{cc} è il numero di caditoie in un Comune, nel campionamento casuale semplice senza reinserimento la probabilità di ciascuna caditoia di essere campionata alla prima estrazione sarà $P_{cc}(1) = 1/N_{cc}$, la probabilità di ciascuna caditoia di essere campionata alla seconda estrazione sarà $P_{cc}(2) = 1/(N_{cc} - 2)$, la probabilità di ciascuna caditoia di essere campionata alla terza estrazione sarà $P_{cc}(3) = 1/(N_{cc} - 3)$, e così via, fino a una probabilità $P_{cc}(n) = 1/(N_{cc} - n + 1)$ alla n -esima estrazione.

Il campionamento secondo il criterio dell’operatore è un piano di campionamento complesso che rientra nella categoria del campionamento multistadio. Si campiona in un primo stadio

fra le vie di un Comune, con un campionamento casuale semplice senza reinserimento. Se N_v è il numero di vie in un Comune, la probabilità di ciascuna via di essere campionata alla prima estrazione sarà $P_v(1) = 1/N_v$, la probabilità di ciascuna via di essere campionata alla seconda estrazione sarà $P_v(2) = 1/(N_v - 2)$, la probabilità di ciascuna via di essere campionata alla terza estrazione sarà $P_v(3) = 1/(N_v - 3)$, e così via, fino a una probabilità $P_v(n) = 1/(N_v - n + 1)$ alla n-esima estrazione. Successivamente, al secondo stadio, si campionano 4 caditoie consecutive all'interno di ciascuna via estratta, scegliendo la prima caditoia delle 4 in modo casuale. In questo caso, dal momento che le vie di un Comune hanno un numero di caditoie diverso tra loro, non c'è modo di calcolare a priori la probabilità di ogni singola caditoia di venire estratta su N_{cc} . La probabilità che una data caditoia sia estratta è condizionata dalla probabilità che la via a cui appartiene sia estratta e dalla posizione della caditoia nella via (le prime tre e le ultime tre caditoie di una via hanno probabilità inferiore di essere estratte rispetto alle altre caditoie della stessa via). Nel caso particolare di una via con solo 4 caditoie, la probabilità di ciascuna caditoia di essere estratta è pari alla probabilità della rispettiva via di essere estratta su N_v . Nel caso più generale di vie aventi un numero di caditoie maggiore di 4, la probabilità che una data caditoia sia estratta si ottiene moltiplicando la probabilità che una data via sia estratta per la probabilità che una data caditoia di questa via sia estratta; tuttavia, la casistica è troppo ampia e complessa perché possa essere illustrata in dettaglio in questa tesi. In ogni caso, per vie aventi numero di caditoie maggiore o uguale a 7, può essere fatto un ragionamento di carattere generale.

Una volta estratta una via, se definiamo N_{cv} il numero di caditoie della via estratta, il numero di possibili combinazioni di gruppi di 4 caditoie consecutive che possono essere estratte è pari a $N_{cv} - 3$. La prima e l'ultima caditoia della via hanno probabilità di essere estratte pari a $P_{cv}(\text{prima}; \text{ultima}) = P_v(n) * 1/(N_{cv} - 3)$, perché possono essere presenti in 1 combinazione su $N_{cv} - 3$ possibili combinazioni. La seconda e la penultima caditoia della via hanno probabilità di essere estratte pari a $P_{cv}(\text{seconda}; \text{penultima}) = P_v(n) * 2/(N_{cv} - 3)$, perché possono essere presenti in 2 combinazioni su $N_{cv} - 3$ possibili combinazioni. La terza e la terzultima caditoia della via hanno probabilità di essere estratte pari a $P_{cv}(\text{terza}; \text{terzultima}) = P_v(n) * 3/(N_{cv} - 3)$, perché possono essere presenti in 3 combinazioni su $N_{cv} - 3$ possibili combinazioni. Dalla quarta fino alla quart'ultima caditoia della via, la probabilità di essere estratte è pari a $P_{cv}(\text{quarta-quartultima}) = P_v(n) * 4/(N_{cv} - 3)$, perché possono essere presenti in 4 combinazioni su $N_{cv} - 3$ possibili combinazioni.

4.3 Distribuzione dei tombini nei comuni del Veneto

Sono stati individuati tre Comuni del Veneto che potessero essere rappresentativi per l'indagine. Questi sono stati selezionati osservando i dati del numero di caditoie per comune riportati negli stradari comunali e rappresentandone la distribuzione in un box-plot (figura 19). Per costruire tale grafico, innanzitutto, sono stati raccolti i vari documenti che le Ulss hanno inoltrato ad Entostudio, dove viene indicato il numero di caditoie interessate dai trattamenti antilarvali nei diversi Comuni. I comuni che non hanno trasmesso informazioni alle Ulss sono stati esclusi da questa indagine preliminare.

Durante una verifica di efficacia, l'operatore è tenuto quanto più a seguire le caditoie elencate in stradario. Avere dunque una panoramica generale degli stradari pervenuti può aiutare a comprendere meglio quante caditoie vengono trattate in media nei territori delle Ulss nel Veneto. Inoltre, due casi di casi di studio sono stati poi scelti con un numero di caditoie corrispondente al limite del primo quartile e alla mediana del grafico presente in figura 19. Osservando invece i diagrammi a torta (figura 20 e figura 21) si possono riscontrare i valori delle positività rilevate durante la stagione di Vigilanza 2020 nelle rispettive verifiche di efficacia e verifiche di infestazione: si osserva come vi sia una diversa distribuzione dei valori di positività: nel caso delle verifiche di infestazione più di due terzi delle positività rilevate sono superiori al 10%, mentre nelle verifiche di efficacia meno di un terzo delle positività rilevate sono superiori al 10%. Da questo confronto emerge che è opportuno simulare diversi scenari variando la positività attesa finale.

È altresì interessante osservare la distribuzione delle caditoie secche monitorate durante la stagione di Vigilanza 2020. Come si nota dalle figure 22 e 23, nelle verifiche effettuate è stata considerata una percentuale di caditoie con acqua elevata; infatti, più del 70% delle verifiche hanno registrato al massimo un 20% di caditoie secche. Questo dato ci suggerisce come sia opportuno considerare la probabilità di avere nel nostro dataset un differente numero di caditoie secche per poter osservare come influiscono nel campionamento.

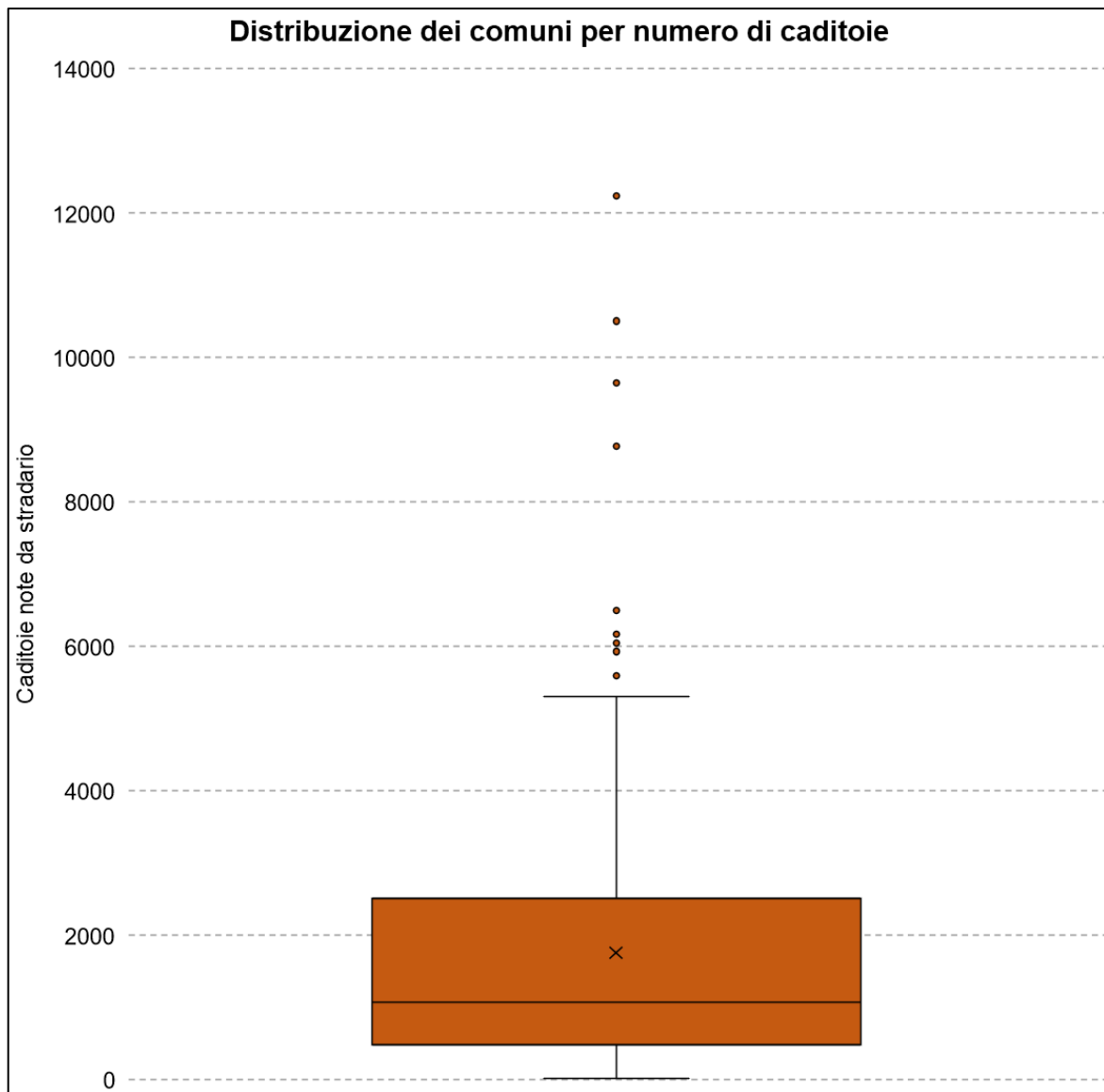


Figura 19: distribuzione dei comuni per numero di caditoie note presenti nello stradario inviato dal Ulss di competenza ad Entostudio (numero di comuni considerati = 200). Il valore medio risulta 1761 e la mediana 1079. Per quanto riguarda i quartili i valori corrispondono a 487 per il I° quartile, 1079 per il II° quartile, 2509 per il III° quartile e 12243 per il IV° quartile (Entostudio, 2020).

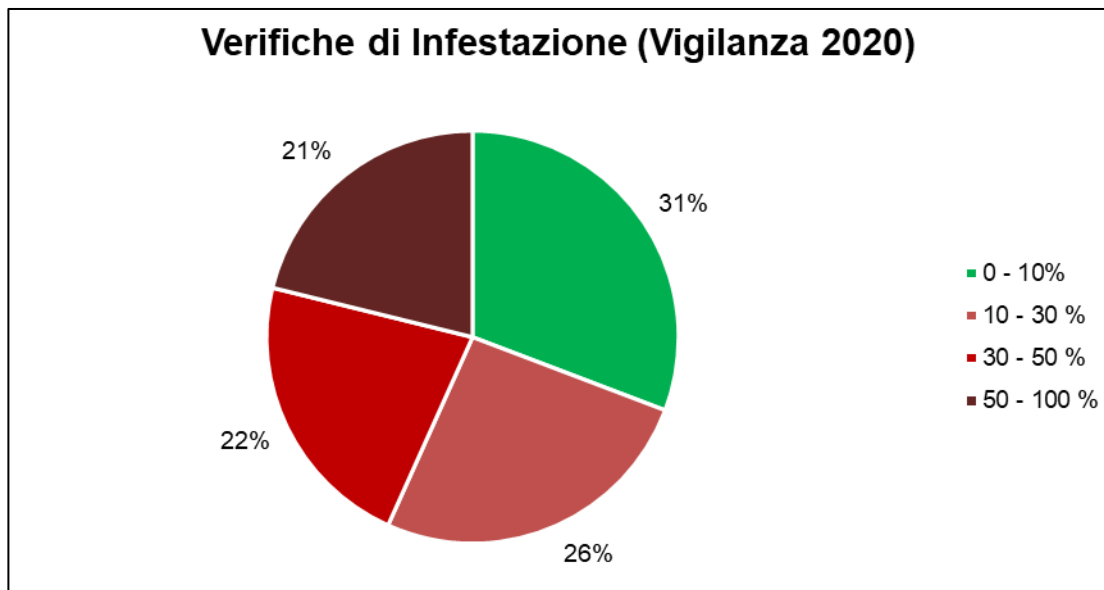


Figura 20: risultati delle positività riscontrate in 104 verifiche di infestazione (Entostudio, 2020)

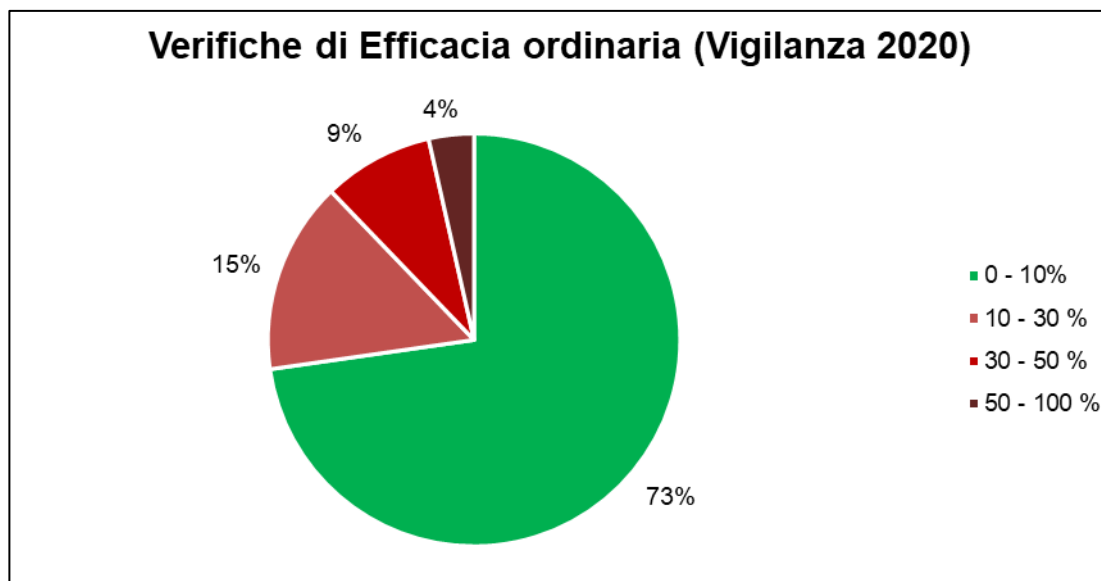


Figura 21: risultati delle positività riscontrate in 451 verifiche di efficacia ordinaria (Entostudio, 2020)

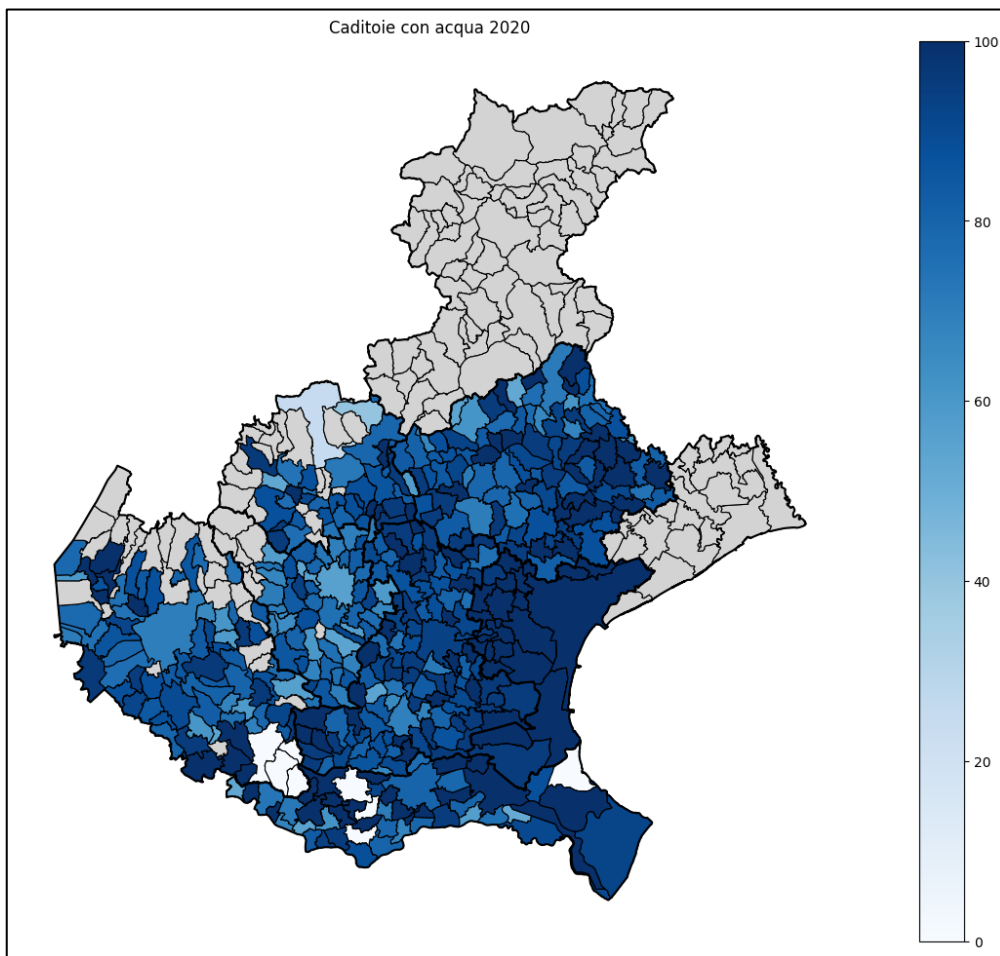


Figura 22: distribuzione delle caditoie con acqua registrate nel periodo di Vigilanza 2020 nei comuni monitorati nel Veneto (Entostudio, elaborazione VecTrax®, 2020).

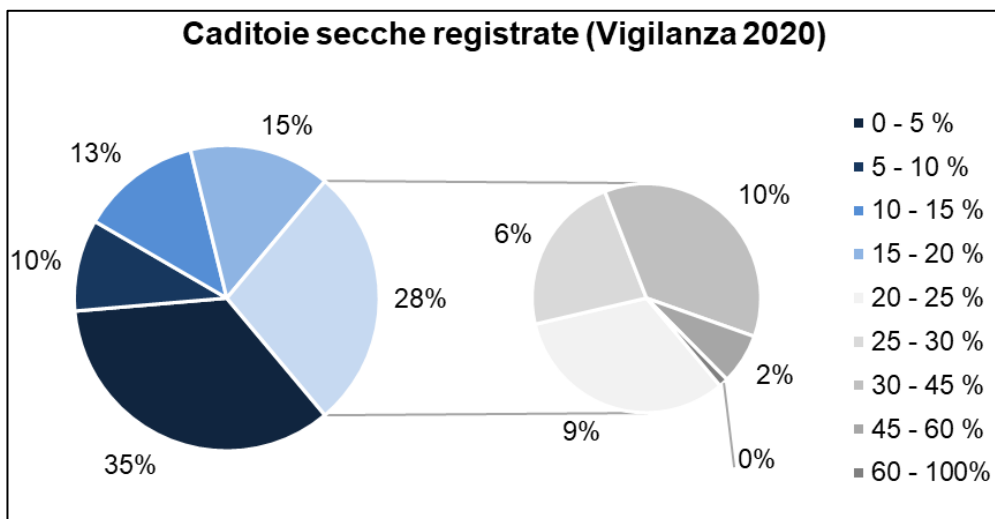


Figura 23: distribuzione delle caditoie secche registrate in 555 verifiche complessive effettuate nel periodo di Vigilanza 2020. Il colore più scuro rappresenta un range con poche caditoie secche (Entostudio, 2020)

4.4 I casi di studio

I comuni scelti come oggetto di studio sono: Alonte (433 caditoie), Cona (1059 caditoie) e Vigodarzere (3070 caditoie). L'analisi statistica si è concentrata in un primo momento sul valutare diversi scenari per Vigodarzere, estendendo poi le diverse simulazioni ai comuni di Alonte e Cona. Come anticipato nel paragrafo precedente, i comuni sono stati scelti osservando il grafico riguardante la distribuzione delle caditoie rilevata dagli stradari (vedi figura 18). Il comune di Alonte cade nel limite fra il I° e il II° quartile, mentre Cona cade nel limite fra II° e il III° quartile (tale valore corrisponde anche alla mediana). Il caso di Vigodarzere è stato volutamente preso nel IV° quartile, cade infatti nell'83° percentile, per osservare come un comune con molte caditoie rispondesse all'analisi statistica.

4.4.1 Vigodarzere

Vigodarzere è un comune di 19,92 km² ubicato nel centro della provincia di Padova e facente parte dell'Ulss 6 Euganea. Le caditoie pubbliche sono situate nel centro storico del paese e nelle tre frazioni: Saletto, Terraglione e Vigodarzere. Dallo stradario è stato rilevato che in questa municipalità sono presenti 3070 caditoie, distribuite in 90 diverse vie. Nella simulazione sono state considerate 16 sample size diverse (340, 300, 248, 220, 248, 220, 200, 168, 144, 120, 100, 80, 64, 52, 40, 32, 24 e 20).

4.4.2 Cona

Cona è un comune di 65,11 km² ubicato nella parte meridionale della provincia di Venezia e facente parte dell'Ulss 3 Serenissima. Le caditoie pubbliche sono situate per la maggior parte nella frazione di Pegolotte (sede municipale) e nelle frazioni di Conetta, Cantarana e Monsole oltre al centro di Cona. Dallo stradario è stato rilevato che in questa municipalità sono presenti 1049 caditoie distribuite in 44 diverse vie. In questo caso, i dati per valutare lo stato dei tombini sono stati simulati con l'ausilio del software R. Nella simulazione sono state considerate 10 sample size diverse (144, 120, 100, 80, 64, 52, 40, 32, 24 e 20).

4.4.3 Alonte

Alonte è un comune di 11,15 km² ubicato nella parte meridionale della provincia di Vicenza e facente parte della Ulss 8 Berica. Le caditoie pubbliche sono situate nel centro storico del paese, nella frazione di Corlanzone e nella strada che collega le due zone residenziali. Non era presente nello stradario un definito numero di caditoie; perciò, il dato è stato raccolto sul campo: in data 11 settembre 2020 sono state campionate 432 caditoie (distribuite in 14

diverse vie) di cui 257 con acqua (59,5%) e di queste 167 sono risultate positive (65%). Nella simulazione sono state considerate 5 sample size diverse (52, 40, 32, 24 e 20). Per tale comune è stato eseguito un campionamento in data 11 settembre 2020 per ottenere una fotografia (vedi figura 24) dello stato delle caditoie: in seguito questo viene definito come scenario reale che verrà confrontato con uno scenario simulato alle medesime condizioni di positività e di caditoie secche (vedi paragrafo 4.2 “Schema operativo delle elaborazioni eseguite”).

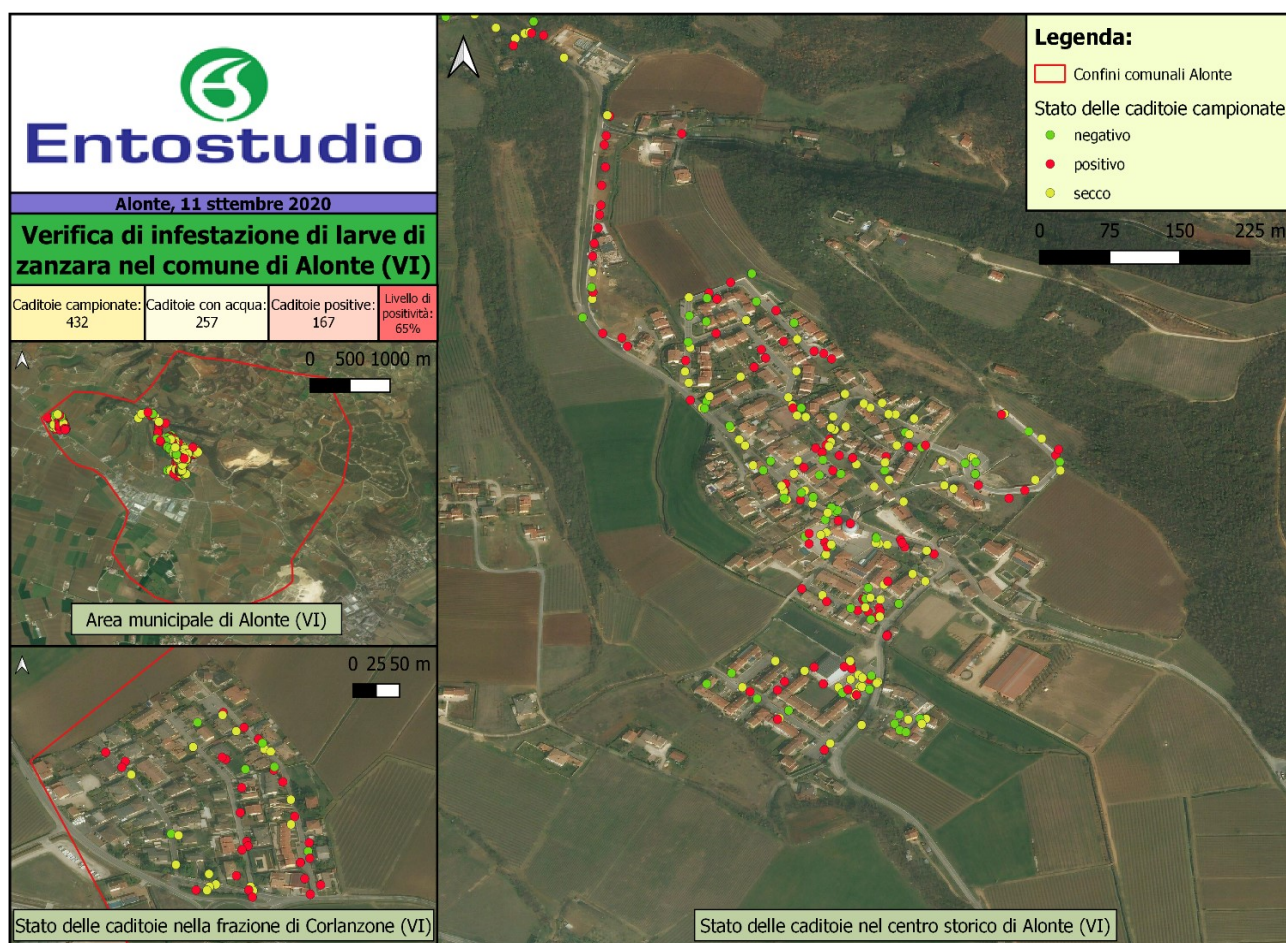


Figura 24: illustrazione dei risultati del monitoraggio di Alonte dell'11 settembre 2020 elaborati con QGIS. Si notano i vari colori che rappresentano lo stato di ogni caditoia assegnato secondo il criterio operatore (dati Entostudio 2020, elaborazione Davide Bonetto).

4.5 Analisi statistica

Una volta eseguite le simulazioni di tutti e tre i casi di studio, per ogni sample-size con le definite condizioni al contorno di positività e caditoie secche, sono stati raccolti i risultati, ovvero i valori delle deviazioni standard (*sd*; vedi paragrafo “Schema operativo delle elaborazioni eseguite 4.2”). La deviazione standard rappresenta la variabilità del valore di positività su 1000 estrazioni effettuate per un determinato numero di caditoie considerate nelle simulazioni di monitoraggio

A questo punto si è proceduto all’indagine statistica: per Vigodarzere e Cona sono state definite quattro categorie (*i*, *ii*, *iii* e *iv*) di confronto:

- i.* per una positività del 10%, sample size 52
- ii.* per una positività del 30%, sample size 120
- iii.* per una positività del 50%, sample size 144
- iv.* tutte le positività, sample size 144

Per le categorie di confronto *i*, *ii*, e *iii* è stata eseguita l’ANOVA a due vie allo scopo di comparare gli effetti principali della percentuale di tombini secchi e del criterio di campionamento e il loro effetto di interazione sulla deviazione standard di 1000 campionamenti, adottando una data sample size e avendo la popolazione di partenza una data percentuale di positività. Per la categoria di confronto *iv* è stata eseguita l’ANOVA a tre vie allo scopo di comparare gli effetti principali della percentuale di tombini secchi, del criterio di campionamento, e della percentuale di positività della popolazione di partenza e il loro effetto di interazione sulla deviazione standard di 1000 campionamenti, adottando una sample size di 144 caditoie. Per Alonte dato il basso numero di vie non è stato possibile simulare oltre ad una sample size di 52 caditoie.

Successivamente per ogni categoria di ogni caso di studio sono state verificate le assunzioni dell’ANOVA tramite i test di Saphiro-Wilk e di Levene. Il primo è servito per vedere se i dati seguissero una distribuzione normale. L’ipotesi nulla testata infatti è la seguente: i valori campionari sono distribuiti come una variabile casuale normale; per non rigettare questa ipotesi, il p-value del test doveva essere maggiore di 0.05. Il secondo test invece è servito per testare l’ipotesi che le varianze fossero omogenee; per non rigettare questa ipotesi il valore F calcolato (*Pr*) deve essere maggiore di F tabulato. In alcuni casi, visti i valori delle deviazioni standard delle simulazioni prossimi a zero come valore, è stato opportuno prima

trasformare i dati con la funzione logaritmo e poi ripetere il test di Levene (Salvan et al., 2020). Dunque, una volta accertato che entrambe le assunzioni erano state rispettate, si è proceduto con il test ANOVA di tipo fattoriale: per le categorie *i*, *ii* e *iii* sono state messe a confronto le diverse percentuali di tombini secchi (0%, 30% e 60%) per le due modalità di campionamento (criterio random e criterio operatore). In più per la categoria *iv*, assieme agli altri fattori, sono state messe a confronto anche i diversi valori di positività attesa (10%, 30% e 50%). Infine, per determinare quali differenze fossero significative fra i diversi fattori si è proceduto con il test di Tukey.

Per ogni caso di studio, nelle diverse categorie, sono state testate le seguenti ipotesi:

- a) la deviazione standard ottenuta dal campionamento secondo criterio operatore non presenta differenza significativa rispetto valore della deviazione standard ottenuta secondo criterio random.
- b) considerare solo caditoie con acqua in un monitoraggio produce un diverso risultato, in termini di deviazione standard, rispetto ad un monitoraggio dove vengono considerate anche caditoie secche.

Per il confronto fra scenario reale e simulato, è stata eseguita l'ANOVA a due vie, in questo caso lo scopo era quello di comparare gli effetti delle due tipologie di scenario considerate (reale e simulato) e del criterio di campionamento applicato (random e criterio operatore) e l'effetto della loro interazione sulla deviazione standard di 1000 campionamenti (sample size considerata 52 caditoie). Successivamente, come per le precedenti operazioni, sono state prima verificate le assunzioni dell'ANOVA e poi si è proceduto con il test. Per determinare quali differenze fossero significative fra i diversi fattori si è proceduto con il test di Tukey.

In questo caso ci interessava osservare se vi fossero differenze significative, in termini di deviazione standard, fra lo scenario reale e lo scenario simulato con i rispettivi criteri di campionamento (criterio operatore e random).

5. Risultati e discussione

5.1 Calcolo della sample-size

Per comprendere quale numero di caditoie è necessario considerare durante una verifica di efficacia, è necessario dunque adattare la formula della sample-size [Eq.1] al valore di positività per il quale si vuole indagare. Come si nota dalla figura 25, emerge che all'aumentare del numero totale di caditoie presenti in un comune, il numero di caditoie da campionare si stabilizza in una sorta di asintoto. Viceversa, al decrescere della popolazione di caditoie, la sample-size varia nettamente ($N < 500$).

Osservando i diversi casi di studio, dalla tabella 2 emerge che all'aumentare della positività attesa (p), aumenta la differenza fra i valori della sample size a parità di dimensione della popolazione

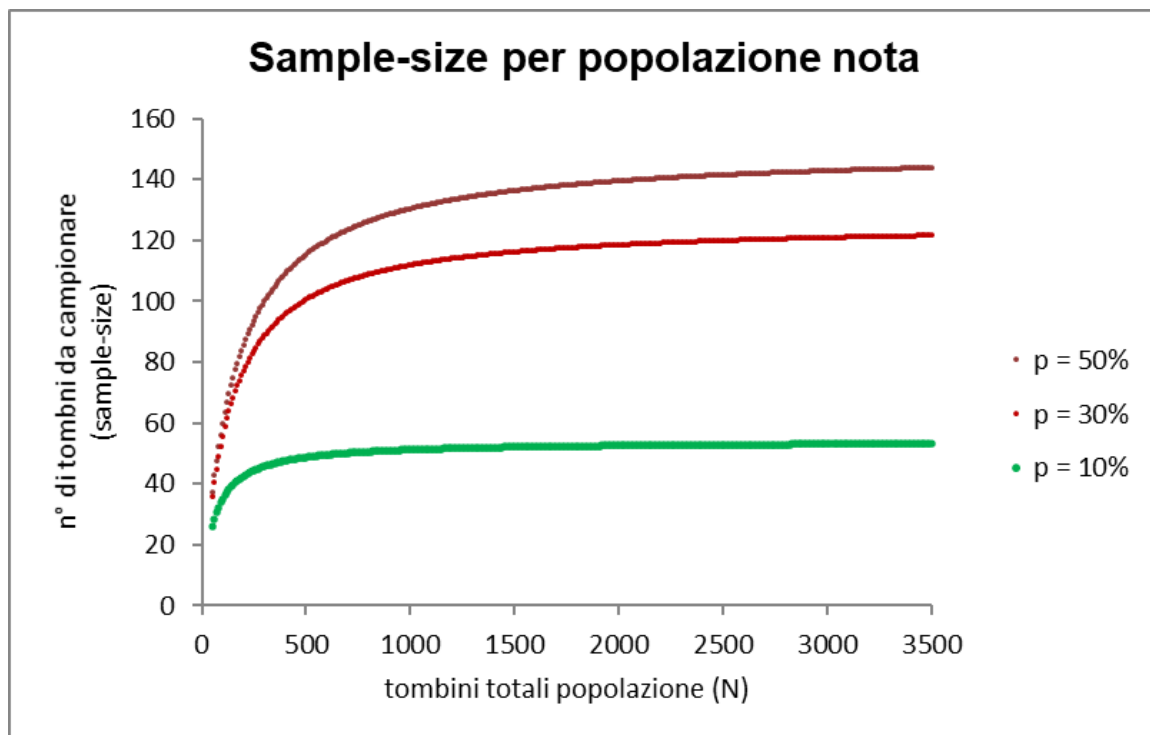


Figura 25: per ogni popolazione di tombini (N) vi è un relativo valore di sample-size (n) che aumenta al crescere del valore di positività attesa (p).

| Comuni | Caditoie totali (N) | Sample size (n) | | |
|--------------------|---------------------|-----------------|---------|---------|
| | | p = 10% | p = 30% | p = 50% |
| Vigodarzere | 3070 | 53 | 121 | 143 |
| Cona | 1049 | 51 | 113 | 131 |
| Alonte | 432 | 48 | 98 | 112 |

Tabella 2: sample size calcolata per ciascun Comune in base alla dimensione della popolazione e alle diverse positività attese.

5.2 Le simulazioni dei casi di studio

5.2.1 I risultati delle simulazioni

Una volta eseguite le simulazioni, sono state raccolte le *sd* ottenute e correlate graficamente alle corrispondenti sample-size (*n*) per le diverse positività percentuali (*p*) per ogni caso di studio (vedi figure 26, 27 e 28).

Osservando i risultati, si nota per ogni caso di studio il ripetersi di due effetti:

- al crescere della *p* della popolazione di partenza, la *sd* aumenta;
- al crescere della *n* in ogni simulazione, la *sd* decresce.

Emerge quindi che, a parità di altre condizioni, all'aumentare della percentuale di tombini secchi nella popolazione di partenza utilizzata per le simulazioni, la *sd* aumenta in maniera considerevole.

Inoltre, osservando i grafici riportati nelle figure 26, 27 e 28, si nota che nei casi in cui la percentuale di tombini secchi sia 0%, la *sd* stimata dalle simulazioni sia per il campionamento random (RA) sia per il criterio dell'operatore (CO) non si discosta dalla *sd* teorica calcolata secondo la formula empirica riportata in Eq. 2 (i parametri contenuti nella formula sono i medesimi dell'Eq.1). Perciò in un'ipotetica situazione ideale, con 0% di tombini secchi, risulta corretto utilizzare la formula per determinare la sample-size [Eq.1], anche nel caso in cui il campionamento venga fatto secondo il criterio dell'operatore.

$$s_p = \sqrt{\frac{P \times (1 - P)}{n - 1} \times \left(1 - \frac{n}{N}\right)} \quad [\text{Eq. 2}]$$

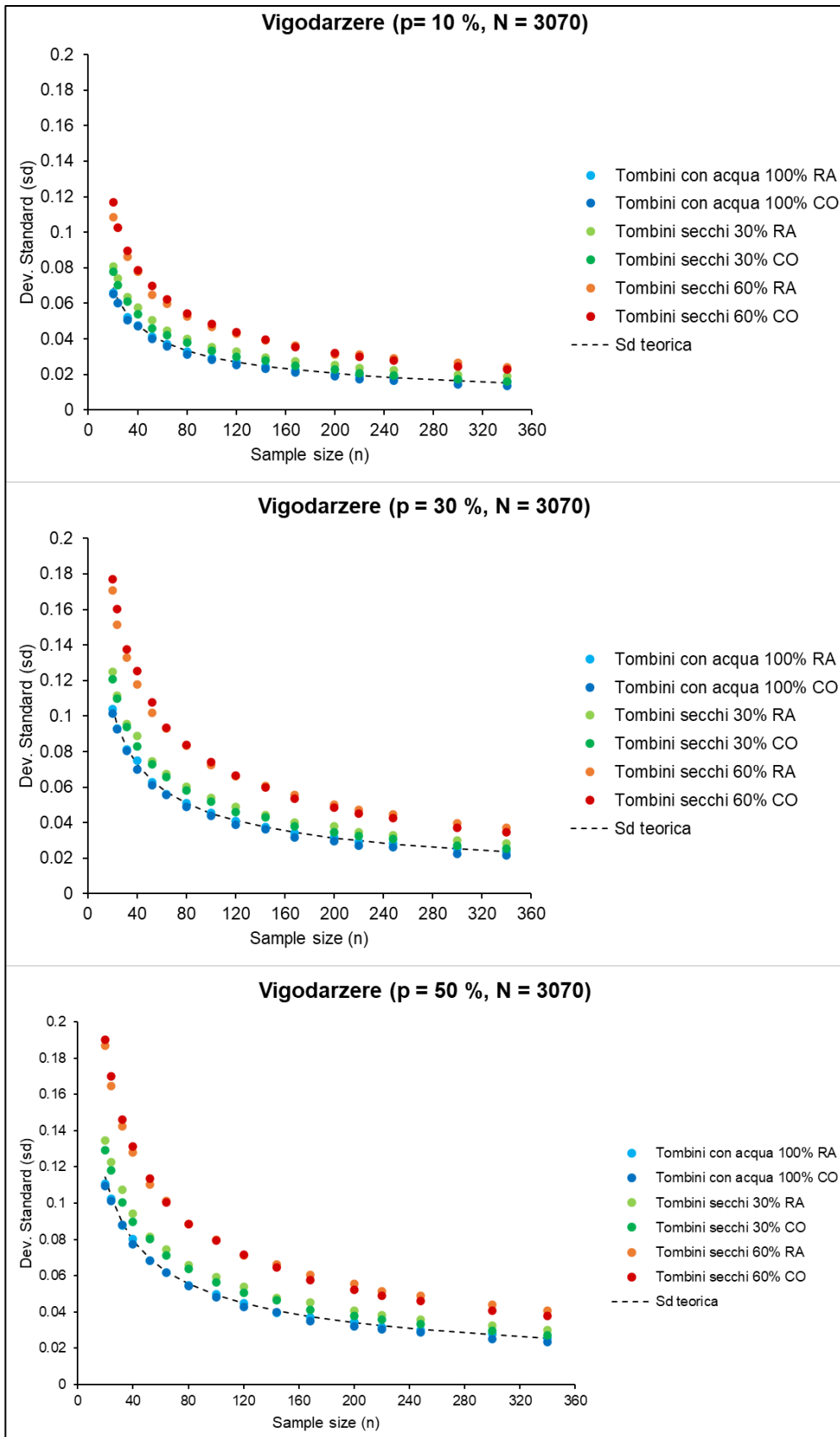


Figura 26: *sd* ottenute dalla media delle tre repliche per ogni criterio di campionamento correlate alle diverse sample size (n) per il caso di studio di Vigodarzere.

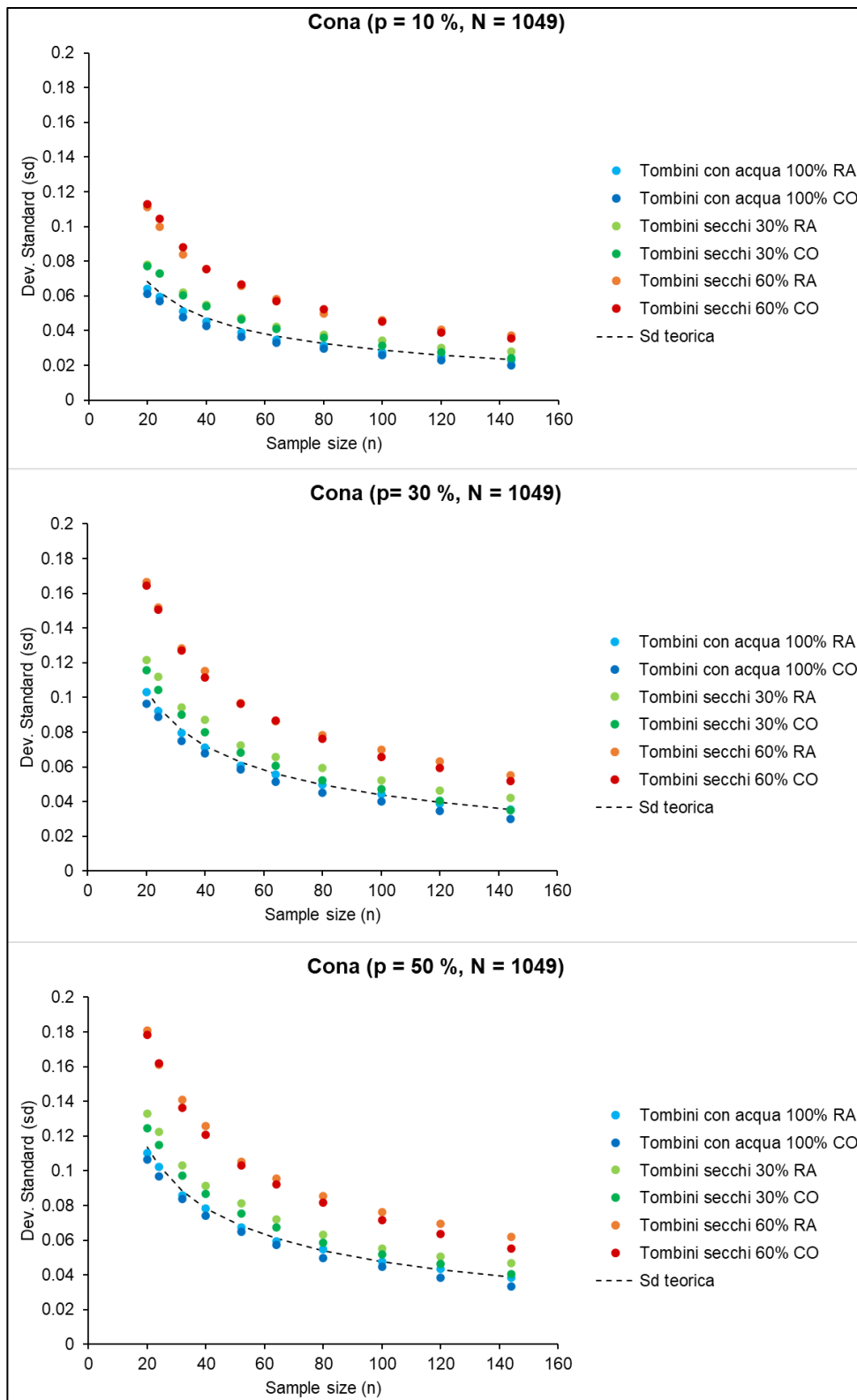


Figura 27: *sd* ottenute dalla media delle tre repliche per ogni criterio di campionamento correlate alle diverse sample size (*n*) per il caso di studio di Cona.

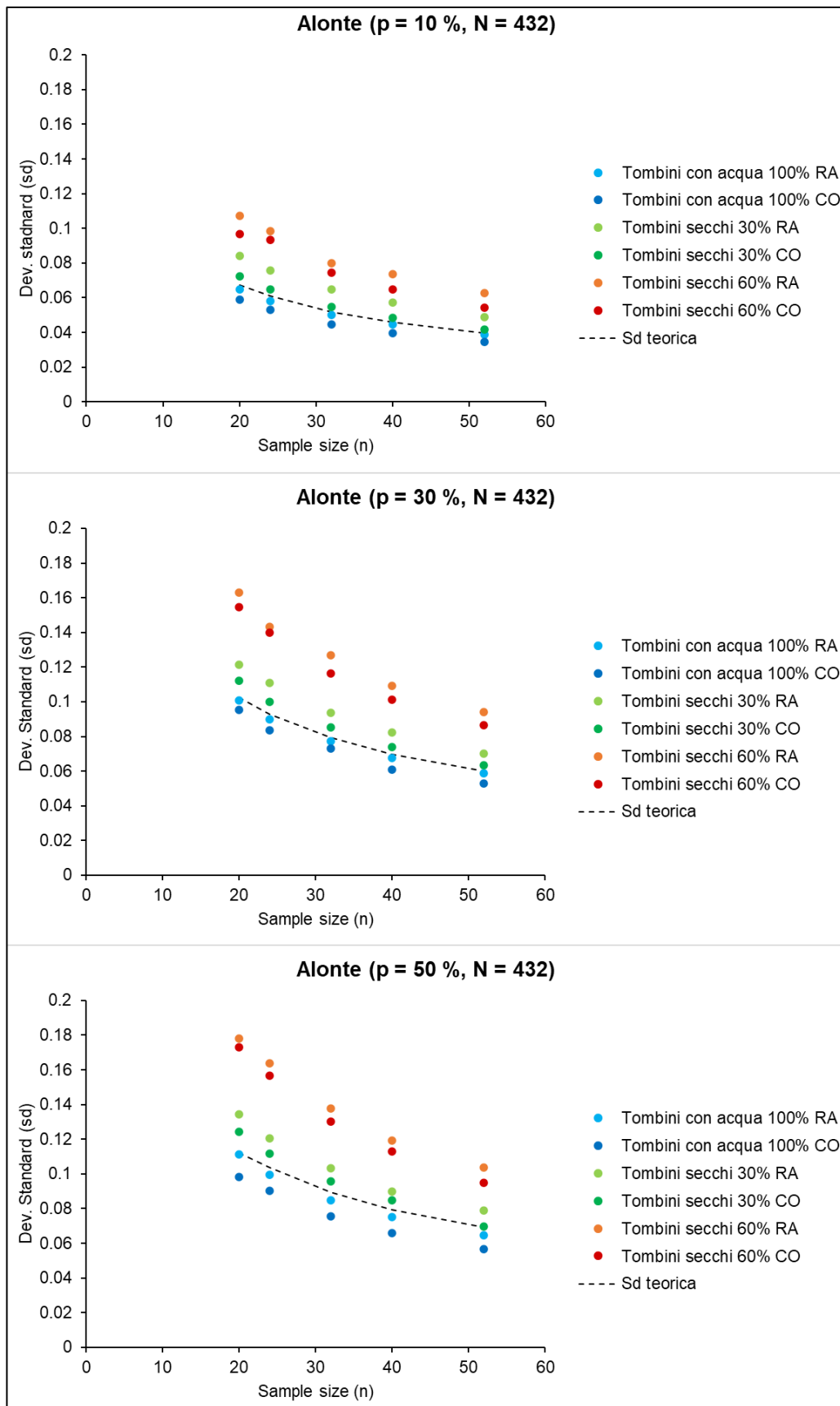


Figura 28: sd ottenute dalla media delle tre repliche per ogni criterio di campionamento correlate alle diverse sample size (n) per il caso di studio di Alonte.

5.2.2 I risultati dell'ANOVA

Sono state quindi verificate le assunzioni dell'ANOVA (per mezzo dei test di Saphiro-Wilk e Levene) per poi procedere con il test di analisi della varianza. In quelle situazioni dove le condizioni non erano rispettate, si è proceduto a trasformare i dati con la funzione logaritmo per poi testare nuovamente le assunzioni. Dove le assunzioni non sono rispettate nonostante la trasformazione, non è stato possibile eseguire il test statistico. I risultati ottenuti dall'ANOVA sulle deviazioni standard si possono osservare in tabella 3 e tabella 4:

| <i>numero</i> | Categorie | | Comuni | | |
|---------------|------------------|--------------------|--------------------|-------------|---------------|
| | <i>p %</i> | <i>sample size</i> | <i>Vigodarzere</i> | <i>Cona</i> | <i>Alonte</i> |
| <i>i</i> | 10 | 52 | AR | ART | ART |
| <i>ii</i> | 30 | 120* | AR | AR | AN |
| <i>iii</i> | 50 | 144* | AN | AR | AN |
| <i>iv</i> | tutte | 144* | AR | AR | AN |

Tabella 3: esiti della verifica delle assunzioni dell'ANOVA per i diversi casi di studio. Gli acronimi degli esiti sono AR (assunzioni rispettate), ART (assunzioni rispettate dopo la trasformazione dei dati) e AN (assunzioni non rispettate, ovvero ANOVA non eseguibile). Il simbolo * in questa tabella indica che la sample size considerata per Alonte è sempre stata 52 anche per le categorie *ii*, *iii* e *iv*.

| <i>numero</i> | Categorie | | Comuni | | |
|---------------|------------------|--------------------|--|--|---------------------|
| | <i>p %</i> | <i>sample size</i> | <i>Vigodarzere</i> | <i>Cona</i> | <i>Alonte</i> |
| <i>i</i> | 10 | 52 | secchi; secchi × criterio | secchi | secchi; criterio |
| <i>ii</i> | 30 | 120 | secchi | secchi; criterio | n/a |
| <i>iii</i> | 50 | 144 | n/a | secchi; criterio | n/a |
| <i>iv</i> | tutte | 144 | positività; secchi; criterio; positività × criterio | positività; secchi; criterio; positività × secchi; positività × criterio | n/a |

Tabella 4: dettaglio dei risultati ottenuti dall'ANOVA dove si possono notare i diversi fattori con differenza significativa analizzati per ogni categoria dei casi di studio. Dove presente la sigla "n/a" significa che non è stato possibile eseguire l'ANOVA.

5.3 Dettaglio dei risultati dei casi di studio

Di seguito sono riportati i risultati per quelle categorie che hanno rispettato le condizioni dell'ANOVA nei vari casi di studio.

Nelle tabelle 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19 sono riportati i diversi esiti dell'ANOVA; l'ultima colonna (Signif.) riporta il livello di significatività dei vari fattori analizzati sulla base del valore p-value, espresso dal simbolo:

- *** quando il valore di p-value è compreso fra 0 e 0.001;
- ** quando il valore di p-value è compreso fra 0.001 e 0.01;
- * quando il valore di p-value è compreso fra 0.01 e 0.05.

Dove non compare nessun "*" non è presente alcuna significatività.

Nelle tabelle 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 sono invece riportati gli esiti del test di Tukey eseguito per ogni categoria su cui è stata testata l'ANOVA. Nell'ultima colonna (Group), sono presenti delle lettere che indicano quali fattori presentano o meno differenze significative. Lettere diverse indicano differenze significative per $p < 0,05$. Dove compaiono le stesse lettere non c'è differenza, in caso contrario invece sì.

Gli acronimi che si trovano nelle restanti colonne delle tabelle sono:

- "Gdl" (gradi di libertà)
- "Dev" (devianza, correlata al fattore prescelto)
- "Var" (varianza, correlata al fattore prescelto)
- "F value" (valore di F calcolato)
- "Limite inf" e "Limite sup" (rispettivamente il limite inferiore e superiore dei valori di sd per il fattore specifico).

Per ogni categoria sono inoltre riportati i rispettivi grafici box-plot che rappresentano la variabilità fra i diversi fattori (figure 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36).

5.3.1 Vigodarzere

I risultati dell'ANOVA e del Tukey test per le categorie di Vigodarzere si possono osservare nelle tabelle 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Per la categoria *iii* non è stato possibile eseguire il test poiché le assunzioni non sono state rispettate nonostante la trasformazione dei dati.

Per la categoria *i* risultano significativi i fattori “secchi” (***) e “secchi-criterio” (**). Emerge che non vi sono differenze significative fra il campionamento random (RA) e il campionamento secondo criterio operatore (CO) in nessuna delle tre casistiche di tombini secchi considerati.

Per la categoria *ii* risulta significativo solo il fattore “secchi” (***). Anche in questo caso emerge che non vi sono differenze significative fra il campionamento RA e il campionamento CO.

Per la categoria *iv* risultano significativi i fattori positività (***), secchi (***), criterio (*) e positività-secchi (***). In questo caso, emerge chiaramente come non vi siano differenze significative fra il campionamento RA e CO per i diversi fattori al variare della positività attesa e del numero dei tombini secchi considerati.

| <i>Fattori</i> | Gdl | Dev | Var | F value | P value | Signif |
|--------------------------|------------|------------|------------|----------------|----------------|---------------|
| Secchi | 2 | 2.29E-03 | 1.14E-03 | 232.04 | 2.56E-10 | *** |
| Criterio | 1 | 2.75E-07 | 2.75E-07 | 0.06 | 8.17E-01 | |
| Secchi × Criterio | 2 | 7.66E-05 | 3.83E-05 | 7.77 | 6.84E-03 | ** |
| Residui | 12 | 5.91E-05 | 4.93E-06 | | | |

Tabella 5: esito dell'ANOVA per la categoria *i* di Vigodarzere che prevedeva una $p = 10\%$ e una $n = 52$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportati i valori di significatività dei diversi fattori.

| Secchi | Criterio | Media | SE | Gdl | Limite inf. | Limite sup. | Gruppo |
|---------------|-----------------|--------------|-----------|------------|--------------------|--------------------|---------------|
| 0 | operatore | 0.0399 | 0.00128 | 12 | 0.0371 | 0.0427 | a |
| 0 | random | 0.0411 | 0.00128 | 12 | 0.0383 | 0.0439 | a |
| 30 | operatore | 0.0459 | 0.00128 | 12 | 0.0431 | 0.0486 | ab |
| 30 | random | 0.0506 | 0.00128 | 12 | 0.0478 | 0.0534 | b |
| 60 | random | 0.0647 | 0.00128 | 12 | 0.0619 | 0.0675 | c |
| 60 | operatore | 0.0699 | 0.00128 | 12 | 0.0671 | 0.0727 | c |

Tabella 6: esito del test di Tukey per la categoria *i* di Vigodarzere che prevedeva una $p = 10\%$ e una $n = 52$ caditoie. Nella colonna "gruppo", lettere diverse indicano differenze significative per $p < 0.05$.

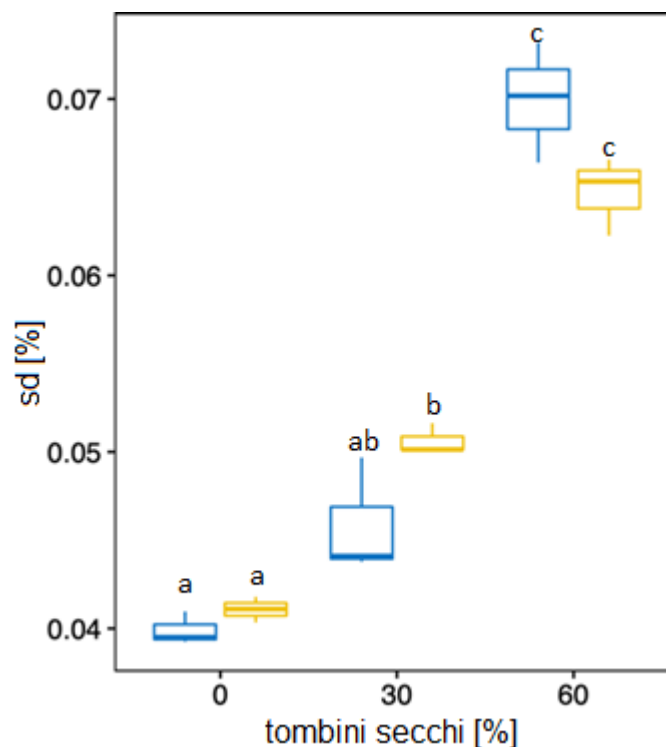


Figura 29: illustrazione grafica tramite box-plot delle *sd* ottenute dalle simulazioni della categoria *i* di Vigodarzere per le diverse percentuali di tombini secchi presenti. In blu vi sono le *sd* riferite al criterio operatore, mentre in giallo le *sd* riferite al criterio random. Sopra ogni box sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

| <i>Fattori</i> | Gdl | Dev | Var | F value | P value | Signif. |
|--------------------------|------------|------------|------------|----------------|----------------|----------------|
| Secchi | 2 | 2.23E-03 | 1.11E-03 | 307.60 | 4.90E-11 | *** |
| Criterio | 1 | 1.04E-05 | 1.04E-05 | 2.87 | 1.15E-01 | |
| Secchi × Criterio | 2 | 1.03E-05 | 5.14E-06 | 1.41 | 2.80E-01 | |
| Residui | 12 | 4.35E-05 | 3.62E-06 | | | |

Tabella 7: esito dell'ANOVA per la categoria *ii* di Vigodarzere che prevedeva una $p = 30\%$ e una $n = 120$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportati i valori di significatività dei diversi fattori.

| Secchi | Criterio | Media | SE | Gdl | Limite inf. | Limite sup. | Gruppo |
|---------------|-----------------|--------------|-----------|------------|--------------------|--------------------|---------------|
| 0 | operatore | 0.0389 | 0.0011 | 12 | 0.0365 | 0.0413 | a |
| 0 | random | 0.0410 | 0.0011 | 12 | 0.0386 | 0.0434 | ab |
| 30 | operatore | 0.0459 | 0.0011 | 12 | 0.0435 | 0.0483 | bc |
| 30 | random | 0.0489 | 0.0011 | 12 | 0.0465 | 0.0513 | c |
| 60 | random | 0.0661 | 0.0011 | 12 | 0.0637 | 0.0685 | d |
| 60 | operatore | 0.0667 | 0.0011 | 12 | 0.0643 | 0.0691 | d |

Tabella 8: esito del test di Tukey per la categoria *ii* di Vigodarzere che prevedeva una $p = 30\%$ e una $n = 120$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

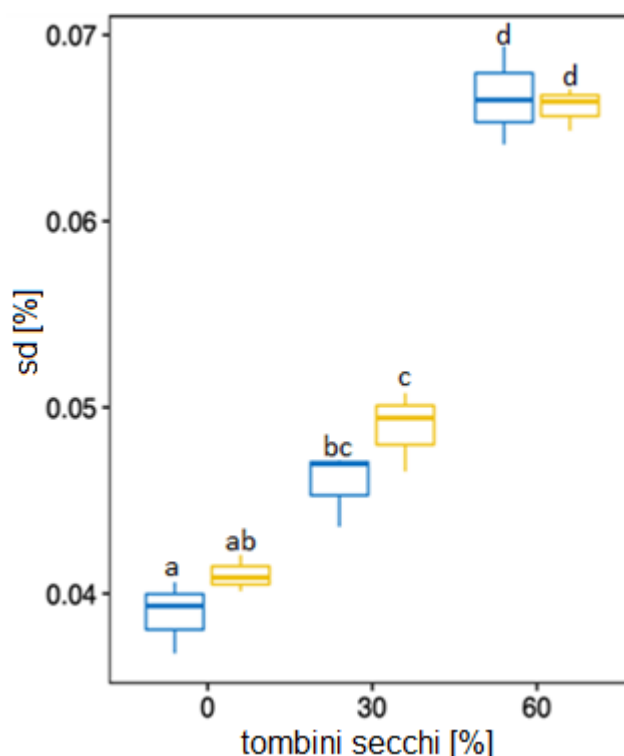


Figura 30: illustrazione grafica tramite box-plot delle *sd* ottenute dalle simulazioni della categoria *ii* di Vigodarzere per le diverse percentuali di tombini secchi presenti. In blu vi sono le *sd* riferite al criterio operatore, mentre in giallo le *sd* riferite al criterio random. Sopra ogni box sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

| Fattori | Gdl | Dev | Var | F value | P - value | Signif. |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|----------------|------------------|----------------|
| Positività | 2 | 4.13E-03 | 2.06E-03 | 1.19E+03 | 1.38E-33 | *** |
| Secchi | 2 | 4.42E-03 | 2.21E-03 | 1.27E+03 | 4.04E-34 | *** |
| Criterio | 1 | 1.15E-05 | 1.15E-05 | 6.60E+00 | 1.45E-02 | * |
| Positività × Secchi | 4 | 1.87E-04 | 4.68E-05 | 2.69E+01 | 2.21E-10 | *** |
| Positività × Criterio | 2 | 2.12E-07 | 1.06E-07 | 6.10E-02 | 9.41E-01 | |
| Secchi × Criterio | 2 | 1.66E-06 | 8.28E-07 | 4.76E-01 | 6.25E-01 | |
| Positività × Secchi × Criterio | 4 | 5.17E-06 | 1.29E-06 | 7.43E-01 | 5.69E-01 | |
| Residui | 36 | 6.26E-05 | 1.74E-06 | | | |

Tabella 9: esito dell'ANOVA per la categoria *iv* di Vigodarzere che prevedeva uno scenario con le diverse positività a confronto e una $n = 144$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportati i valori di significatività dei diversi fattori.

| Positività | Secchi | Criterio | Media | SE | Gdl | Limite inf. | Limite sup. | Gruppo |
|-------------------|---------------|-----------------|--------------|-----------|------------|--------------------|--------------------|---------------|
| 10 | 0 | operatore | 0.0231 | 0.000761 | 36 | 0.0216 | 0.0247 | a |
| 10 | 0 | random | 0.0245 | 0.000761 | 36 | 0.0230 | 0.0261 | ab |
| 10 | 30 | operatore | 0.0278 | 0.000761 | 36 | 0.0263 | 0.0294 | bc |
| 10 | 30 | random | 0.0293 | 0.000761 | 36 | 0.0277 | 0.0308 | c |
| 10 | 60 | operatore | 0.0396 | 0.000761 | 36 | 0.0381 | 0.0412 | de |
| 10 | 60 | random | 0.0391 | 0.000761 | 36 | 0.0375 | 0.0406 | de |
| 30 | 0 | operatore | 0.0363 | 0.000761 | 36 | 0.0347 | 0.0378 | d |
| 30 | 0 | random | 0.0376 | 0.000761 | 36 | 0.0360 | 0.0391 | d |
| 30 | 30 | operatore | 0.0429 | 0.000761 | 36 | 0.0414 | 0.0445 | ef |
| 30 | 30 | random | 0.0442 | 0.000761 | 36 | 0.0426 | 0.0457 | fg |
| 30 | 60 | operatore | 0.0599 | 0.000761 | 36 | 0.0583 | 0.0614 | h |
| 30 | 60 | random | 0.0605 | 0.000761 | 36 | 0.0589 | 0.0620 | h |
| 50 | 0 | operatore | 0.0398 | 0.000761 | 36 | 0.0382 | 0.0413 | de |
| 50 | 0 | random | 0.0397 | 0.000761 | 36 | 0.0381 | 0.0412 | de |
| 50 | 30 | operatore | 0.0463 | 0.000761 | 36 | 0.0447 | 0.0478 | fg |
| 50 | 30 | random | 0.0477 | 0.000761 | 36 | 0.0462 | 0.0492 | g |
| 50 | 60 | operatore | 0.0648 | 0.000761 | 36 | 0.0633 | 0.0664 | i |
| 50 | 60 | random | 0.0663 | 0.000761 | 36 | 0.0648 | 0.0679 | i |

Tabella 10: esito del test di Tukey per la categoria *iv* di Vigodarzere che prevedeva tutte le positività a confronto e una $n = 144$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

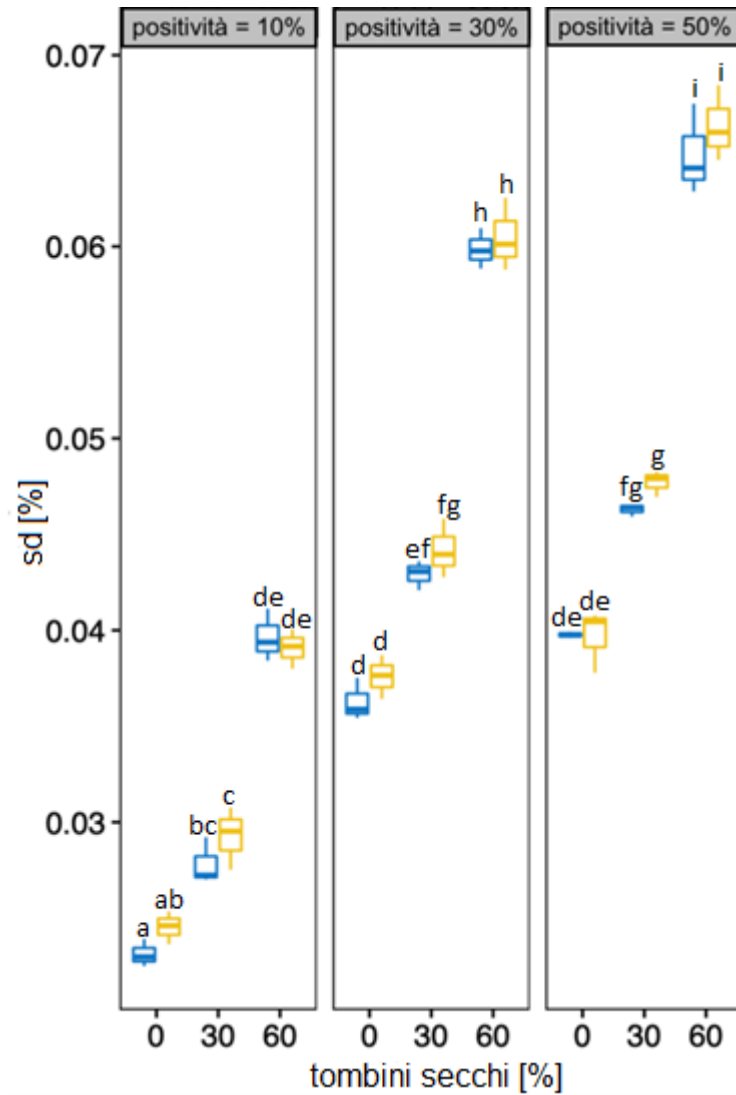


Figura 31: illustrazione grafica tramite box-plot delle *sd* ottenute dalle simulazioni della categoria *iv* di Vigodarzere per le diverse percentuali di positività attesa e le diverse percentuali di tombini secchi presenti. In blu vi sono le *sd* riferite al criterio operatore, mentre in giallo le *sd* riferite al criterio random. Sopra ogni box sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

5.3.2 Cona

I risultati dell'ANOVA per le categorie di Cona si possono osservare in tabella 11, 12, 13, 14, 15 e 10. Tutte le categorie di questo caso di studio hanno rispettato le condizioni dell'ANOVA, e solo per la categoria *i* è stato necessario utilizzare la funzione logaritmo

Per la categoria *i* risulta significativo il fattore "secchi" (***). Emerge che non vi sono differenze significative fra il campionamento random (RA) e il campionamento secondo criterio operatore (CO) in nessuna delle tre percentuali di tombini secchi considerati.

Per la categoria *ii* risultano significativi i fattori "secchi" (***), e criterio (***). In questo caso, emerge che vi sono differenze significative fra il campionamento RA e CO solo nel caso con 30% di tombini secchi considerati.

Per la categoria *iii*, risultano significativi i fattori "secchi" (***), e criterio (***). In questo caso vi sono differenze significative fra il campionamento RA e CO per ogni percentuale di tombini secchi considerata.

Per la categoria *iv* risultano significativi i fattori positività (***), secchi (***), criterio (***), positività-secchi (***), e positività-criterio. Al contrario della categoria *iv* di Vigodarzere, in questo caso non vi sono differenze significative fra il campionamento RA e CO solo nei casi in cui la positività è 10% e nel caso dove la positività è 30% e secchi = 60%.

| Fattori | Gdl | Dev | Var | F value | P - value | Signif. |
|--------------------------|------------|------------|------------|----------------|------------------|----------------|
| Secchi | 2 | 0.955 | 0.477 | 115.88 | 1.42E-08 | *** |
| Criterio | 1 | 0.002 | 0.002 | 0.70 | 4.16E-01 | |
| Secchi × Criterio | 2 | 0.003 | 0.001 | 0.46 | 6.42E-01 | |
| Residui | 12 | 0.049 | 0.004 | | | |

Tabella 11: esito dell'ANOVA, a seguito della trasformazione dei dati con funzione logaritmo, per la categoria *i* di Cona che prevedeva una $p = 10\%$ e una $n = 52$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportati i valori di significatività dei diversi fattori.

| Secchi | Criterio | Media | SE | Gdl | Limite inf. | Limite sup. | Gruppo |
|---------------|-----------------|--------------|-----------|------------|--------------------|--------------------|---------------|
| 0 | operatore | -3.31 | 0.0371 | 12 | -3.39 | -3.23 | a |
| 0 | random | -3.25 | 0.0371 | 12 | -3.33 | -3.17 | a |
| 30 | operatore | -3.07 | 0.0371 | 12 | -3.15 | -2.99 | b |
| 30 | random | -3.05 | 0.0371 | 12 | -3.13 | -2.97 | b |
| 60 | operatore | -2.72 | 0.0371 | 12 | -2.80 | -2.63 | c |
| 60 | random | -2.72 | 0.0371 | 12 | -2.81 | -2.64 | c |

Tabella 12: esito del test di Tukey, a seguito della trasformazione dei dati con funzione logaritmo, per la categoria *i* di Cona che prevedeva una $p = 10\%$ e una $n = 52$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

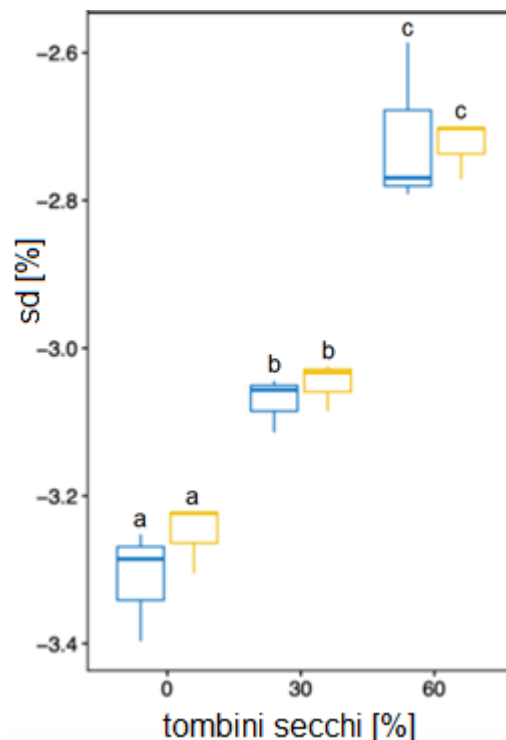


Figura 32: illustrazione grafica tramite box-plot dei valori delle *sd* ottenute dalle simulazioni della categoria *i* di Cona, a seguito della trasformazione dei dati con funzione logaritmo, per le diverse percentuali di tombini secchi presenti. In blu vi sono le *sd* riferite al criterio operatore, mentre in giallo le *sd* riferite al criterio random. Sopra ogni box sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

| Fattori | Gdl | Dev | Var | F value | P - value | Signif. |
|-------------------|-----|----------|----------|---------|-----------|---------|
| Secchi | 2 | 1.96E-03 | 9.79E-04 | 279.77 | 8.57E-11 | *** |
| Criterio | 1 | 8.99E-05 | 8.99E-05 | 25.71 | 2.75E-04 | *** |
| Secchi × Criterio | 2 | 2.32E-06 | 1.16E-06 | 0.33 | 7.24E-01 | |
| Residui | 12 | 4.20E-05 | 3.50E-06 | | | |

Tabella 13: esito dell'ANOVA per la categoria *ii* di Cona che prevedeva una $p = 30\%$ e una $n = 120$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportati i valori di significatività dei diversi fattori.

| Secchi | Criterio | Media | SE | Gdl | Limite inf. | Limite sup. | Gruppo |
|--------|-----------|--------|---------|-----|-------------|-------------|--------|
| 0 | operatore | 0.0300 | 0.00108 | 12 | 0.0323 | 0.0370 | a |
| 0 | random | 0.0400 | 0.00108 | 12 | 0.0363 | 0.0410 | ab |
| 30 | operatore | 0.0407 | 0.00108 | 12 | 0.0383 | 0.0431 | b |
| 30 | random | 0.0462 | 0.00108 | 12 | 0.0438 | 0.0485 | c |
| 60 | operatore | 0.0594 | 0.00108 | 12 | 0.0571 | 0.0618 | d |
| 60 | random | 0.0633 | 0.00108 | 12 | 0.0610 | 0.0657 | d |

Tabella 14: esito del test di Tukey per la categoria *ii* di Cona che prevedeva una $p = 30\%$ e una $n = 120$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

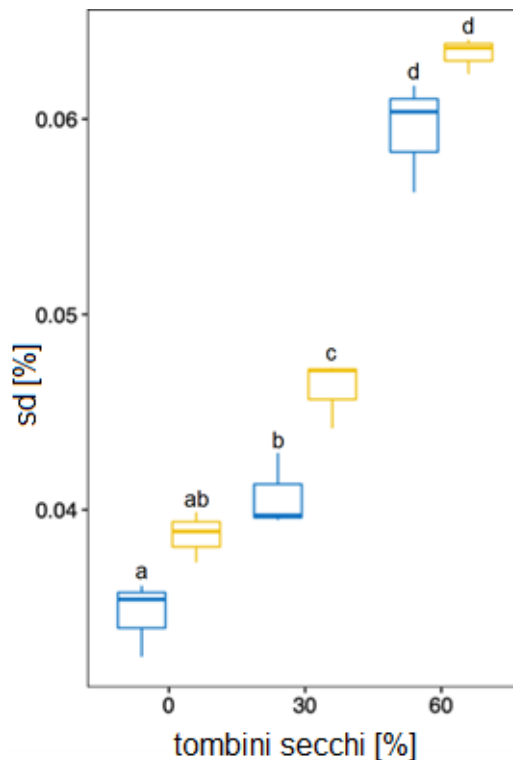


Figura 33: illustrazione grafica tramite box-plot delle *sd* ottenute dalle simulazioni della categoria *ii* di Cona per le diverse percentuali di tombini secchi presenti. In blu vi sono le *sd* riferite al criterio operatore, mentre in giallo le *sd* riferite al criterio random. Sopra ogni box sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

| Fattori | Gdl | Dev | Var | F value | P - value | Signif. |
|-------------------|-----|----------|----------|---------|-----------|---------|
| Secchi | 2 | 1.62E-03 | 8.08E-04 | 439.69 | 5.95E-12 | *** |
| Criterio | 1 | 1.57E-04 | 1.57E-04 | 85.57 | 8.26E-07 | *** |
| Secchi × Criterio | 2 | 2.67E-06 | 1.34E-06 | 0.72 | 5.04E-01 | |
| Residui | 12 | 2.21E-05 | 1.84E-06 | | | |

Tabella 15: esito dell'ANOVA per la categoria *iii* di Cona che prevedeva una $p = 50\%$ e una $n = 144$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportati i valori di significatività dei diversi fattori.

| Secchi | Criterio | Media | SE | Gdl | Limite inf. | Limite sup. | Gruppo |
|--------|-----------|--------|----------|-----|-------------|-------------|--------|
| 0 | operatore | 0.0335 | 0.000783 | 12 | 0.0318 | 0.0352 | a |
| 0 | random | 0.0384 | 0.000783 | 12 | 0.0367 | 0.0401 | b |
| 30 | operatore | 0.0406 | 0.000783 | 12 | 0.0389 | 0.0423 | b |
| 30 | random | 0.0467 | 0.000783 | 12 | 0.0450 | 0.0484 | c |
| 60 | operatore | 0.0554 | 0.000783 | 12 | 0.0537 | 0.0571 | d |
| 60 | random | 0.0621 | 0.000783 | 12 | 0.0604 | 0.0638 | e |

Tabella 16: esito del test di Tukey per la categoria *iii* di Cona che prevedeva una $p = 50\%$ e una $n = 144$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

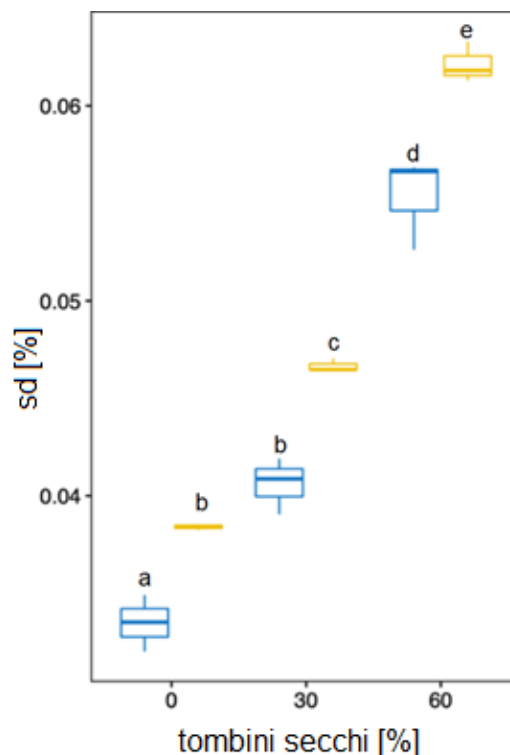


Figura 34: illustrazione grafica tramite box-plot delle *sd* ottenute dalle simulazioni della categoria *iii* di Cona per le diverse percentuali di tombini secchi presenti. In blu vi sono le *sd* riferite al criterio operatore, mentre in giallo le *sd* riferite al criterio random. Sopra ogni box sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

| Fattori | Gdl | Dev | Var | F value | P value | Signif. |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|----------------|----------------|----------------|
| Positività | 2 | 3.24E-03 | 1.62E-03 | 823.81 | 8.73E-31 | *** |
| Secchi | 2 | 3.59E-03 | 1.80E-03 | 913.26 | 1.42E-31 | *** |
| Criterio | 1 | 3.01E-04 | 3.01E-04 | 152.98 | 1.59E-14 | *** |
| Positività × Secchi | 4 | 1.06E-04 | 2.64E-05 | 13.41 | 8.68E-07 | *** |
| Positività × Criterio | 2 | 2.54E-05 | 1.27E-05 | 6.45 | 4.04E-03 | ** |
| Secchi × Criterio | 2 | 7.25E-06 | 3.63E-06 | 1.84 | 1.73E-01 | |
| Positività × Secchi × Criterio | 4 | 9.80E-06 | 2.45E-06 | 1.24 | 3.09E-01 | |
| Residui | 36 | 7.08E-05 | 1.97E-06 | | | |

Tabella 17: esito dell'ANOVA per la categoria *iv* di Cona che prevedeva una $p = 10\%$ e una $n = 52$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportati i valori di significatività dei diversi fattori.

| Positività | Secchi | Criterio | Media | SE | Gdl | Limite inf. | Limite sup. | Gruppo |
|-------------------|---------------|-----------------|--------------|-----------|------------|--------------------|--------------------|---------------|
| 10 | 0 | operatore | 0.0200 | 0.00081 | 36 | 0.0184 | 0.0217 | a |
| 10 | 0 | random | 0.0229 | 0.00081 | 36 | 0.0212 | 0.0245 | a |
| 10 | 30 | operatore | 0.0240 | 0.00081 | 36 | 0.0224 | 0.0257 | ab |
| 10 | 30 | random | 0.0278 | 0.00081 | 36 | 0.0261 | 0.0294 | bc |
| 10 | 60 | operatore | 0.0355 | 0.00081 | 36 | 0.0338 | 0.0371 | ef |
| 10 | 60 | random | 0.0372 | 0.00081 | 36 | 0.0356 | 0.0389 | efg |
| 30 | 0 | operatore | 0.0300 | 0.00081 | 36 | 0.0283 | 0.0316 | cd |
| 30 | 0 | random | 0.0355 | 0.00081 | 36 | 0.0338 | 0.0371 | ef |
| 30 | 30 | operatore | 0.0350 | 0.00081 | 36 | 0.0333 | 0.0366 | ef |
| 30 | 30 | random | 0.0424 | 0.00081 | 36 | 0.0407 | 0.0440 | h |
| 30 | 60 | operatore | 0.0518 | 0.00081 | 36 | 0.0502 | 0.0534 | j |
| 30 | 60 | random | 0.0553 | 0.00081 | 36 | 0.0536 | 0.0569 | j |
| 50 | 0 | operatore | 0.0335 | 0.00081 | 36 | 0.0318 | 0.0351 | de |
| 50 | 0 | random | 0.0384 | 0.00081 | 36 | 0.0367 | 0.0400 | fgh |
| 50 | 30 | operatore | 0.0406 | 0.00081 | 36 | 0.0390 | 0.0423 | gh |
| 50 | 30 | random | 0.0467 | 0.00081 | 36 | 0.0450 | 0.0483 | i |
| 50 | 60 | operatore | 0.0554 | 0.00081 | 36 | 0.0537 | 0.0570 | j |
| 50 | 60 | random | 0.0621 | 0.00081 | 36 | 0.0605 | 0.0638 | k |

Tabella 18: esito del test di Tukey per la categoria *iv* di Cona che prevedeva tutte le positività a confronto e una $n = 144$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

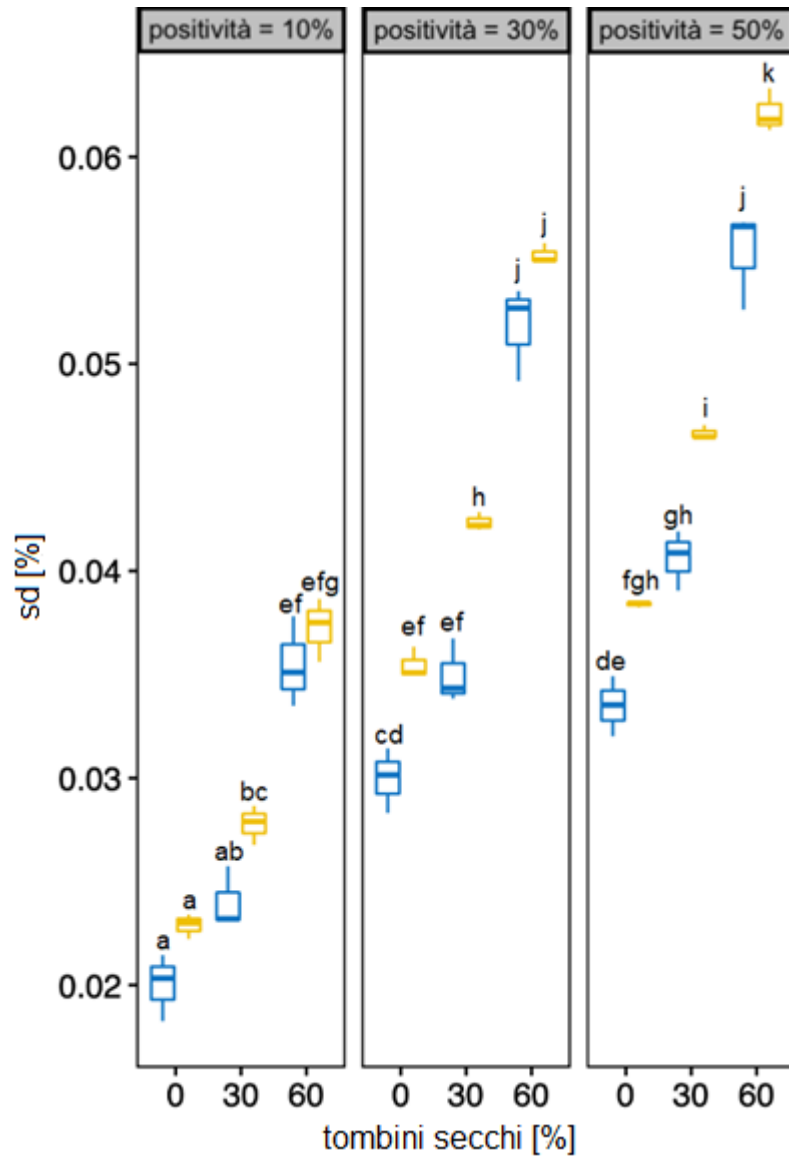


Figura 35: illustrazione grafica tramite box-plot delle deviazioni standard (*sd*) ottenute dalle simulazioni della categoria *iv* di Cona per le diverse percentuali di positività attesa e le diverse percentuali di tombini secchi presenti. In blu vi sono le *sd* riferite al criterio operatore, mentre in giallo le *sd* riferite al criterio random. Sopra ogni box sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

5.3.3 Alonte

I risultati dell'ANOVA per la categoria *i* di Alonte si possono osservare in tabella 19 e 20. Per le categorie *ii*, *iii* e *iv* non è stato possibile eseguire il test poiché le assunzioni non sono state rispettate nonostante la trasformazione dei dati. Solo la categoria *i* ha rispettato le assunzioni dell'ANOVA dopo trasformazione dei dati tramite la funzione logaritmo.

Per la categoria *i* risultano significativi i fattori secchi (***) e criterio (*). Emerge che non vi sono differenze significative fra il campionamento random (RA) e il campionamento secondo criterio operatore (CO) in nessuna delle tre percentuali di tombini secchi considerati.

| Fattori | Gdl | Dev | Var | F value | P - value | Signif. |
|--------------------------|------------|------------|------------|----------------|------------------|----------------|
| Secchi | 2 | 0.6018 | 0.3009 | 20.47 | 1.35*E-04 | *** |
| Criterio | 1 | 0.0759 | 0.0759 | 5.16 | 4.22*E-02 | * |
| Secchi × Criterio | 2 | 0.0058 | 0.0029 | 0.19 | 0.82 | |
| Residui | 12 | 0.1763 | 0.0146 | | | |

Tabella 19: esito dell'ANOVA, a seguito della trasformazione dei dati con funzione logaritmo, per la categoria *i* di Alonte che prevedeva una $p = 10\%$ e una $n = 52$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportati i valori di significatività dei diversi fattori.

| Secchi | Criterio | Media | SE | Gdl | Limite inf. | Limite sup. | Gruppo |
|---------------|-----------------|--------------|-----------|------------|--------------------|--------------------|---------------|
| 0 | operatore | -3.34 | 0.07 | 12 | -3.49 | -3.18 | a |
| 0 | random | -3.26 | 0.07 | 12 | -3.41 | -3.11 | ab |
| 30 | operatore | -3.18 | 0.07 | 12 | -3.33 | -3.03 | ab |
| 30 | random | -3.02 | 0.07 | 12 | -3.17 | -2.87 | abc |
| 60 | operatore | -2.93 | 0.07 | 12 | -3.08 | -2.77 | bc |
| 60 | random | -2.77 | 0.07 | 12 | -2.93 | -2.62 | c |

Tabella 20: esito del test di Tukey, a seguito della trasformazione dei dati con funzione logaritmo, per la categoria *i* di Alonte che prevedeva una $p = 10\%$ e una $n = 52$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

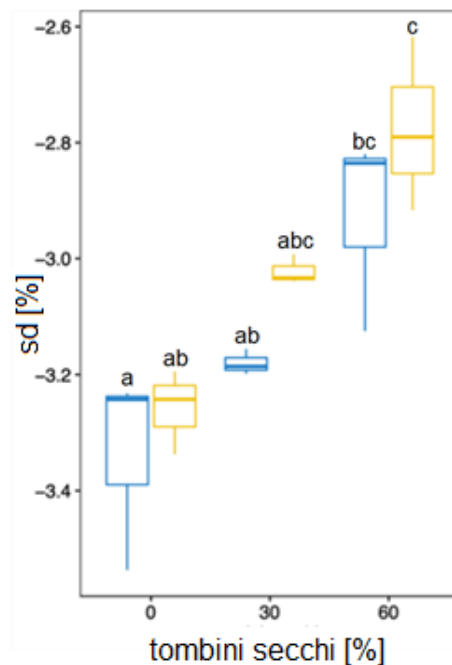


Figura 36: illustrazione grafica tramite box-plot dei valori delle deviazioni standard (*sd*) ottenute dalle simulazioni della categoria *i* di Alonte, a seguito della trasformazione dei dati con funzione logaritmo, per le diverse percentuali di tombini secchi presenti. In blu vi sono le *sd* riferite al criterio operatore, mentre in giallo le *sd* riferite al criterio random. Sopra ogni box sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

5.4 Confronto di campionamenti in uno scenario simulato e in uno reale

L'ultima analisi svolta prevede il confronto fra uno scenario simulato (con l'ausilio di R studio) e uno scenario reale (ottenuto dai dati raccolti da Entostudio). Quindi è stato simulato uno scenario aggiuntivo che avesse le stesse condizioni in termini di positività percentuale e tombini secchi del risultato del monitoraggio di tutte le caditoie di Alonte dell'11 settembre 2020 ($p = 65\%$ e tombini secchi = 40%).

Sono state poi raccolte le diverse sd prodotte dalle simulazioni (vedi figura 37), selezionando poi i valori di sd relativi alla sample size di 52 caditoie per impostare poi il test ANOVA fra i due scenari. A questo punto si è poi proceduto a verificare che fossero rispettate le assunzioni dell'ANOVA (vedi paragrafo 4.4 "Analisi Statistica"): una volta accertato questo, è stato osservato dove si evidenziava significatività e successivamente dove emergevano differenze fra i vari fattori con l'ausilio del Tukey test. In questo caso, i fattori analizzati sono lo scenario, il criterio e l'interazione scenario \times criterio.

I risultati si possono osservare nelle tabelle 21 e 22 e in figura 38. Tutti i fattori risultano significativi con diversi livelli: scenario (**), criterio (***) e scenario-criterio (*). In particolare, si nota che per il campionamento secondo criterio operatore vi sono differenze significative fra lo scenario simulato e lo scenario reale. Tuttavia, non vi sono differenze significative fra i due scenari per quanto riguarda il campionamento random.

Osservando poi le mappe dello stato delle caditoie in figura 39 e 40, si nota come nello scenario reale non vi sia un'omogenea distribuzione delle caditoie nello spazio: vi sono infatti delle aree che hanno caditoie o solamente positive o solamente secche.

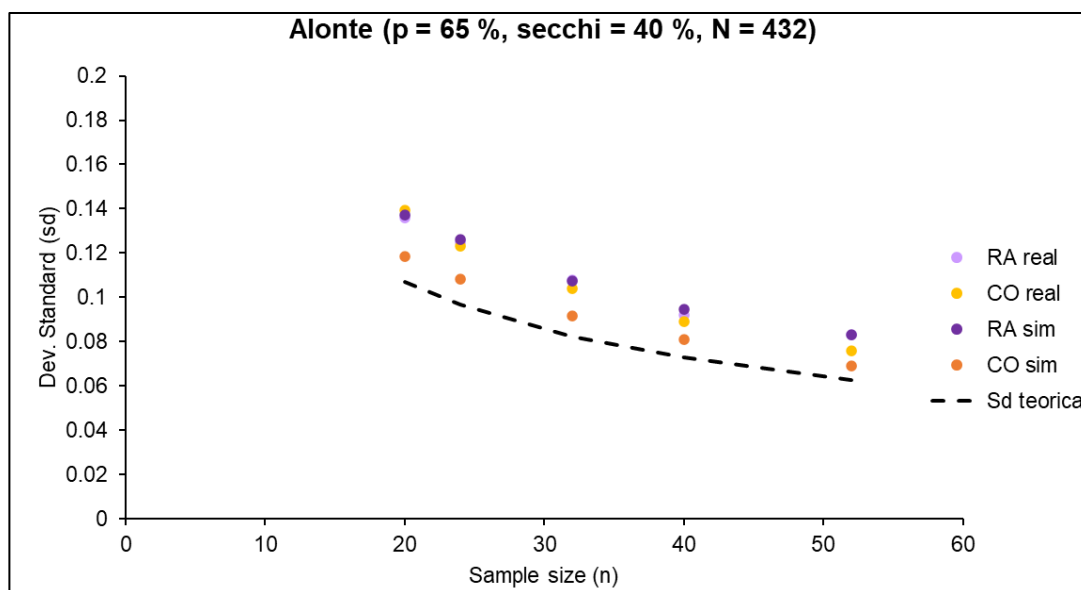


Figura 37: *sd* ottenute dalla media delle tre repliche per ogni criterio di campionamento correlate alle diverse sample size (*n*) nel confronto fra scenario simulato e scenario reale di Alonte per i due metodi di campionamento (RA e CO).

| Fattori | Gdf | Dev. | Var. | F value | P value | Signif. |
|----------------------------|------------|-------------|-------------|----------------|----------------|----------------|
| Scenario | 1 | 3.67E-05 | 3.67E-05 | 112.64 | 0.01 | ** |
| Criterio | 1 | 3.41E-04 | 3.41E-04 | 1.04*E+03 | 7.21E-03 | *** |
| Scenario × Criterio | 1 | 2.85E-05 | 2.85E-05 | 87.45 | 0.02 | * |
| Residui | 8 | 2.61E-05 | 3.26E-06 | | | |

Tabella 19: esito dell'ANOVA del confronto fra scenario simulato e scenario reale di Alonte con una $p = 65\%$, secchi = 40% e una $n = 52$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportati i valori di significatività dei diversi fattori.

| Scenario | Criterio | Media | SE | Gdf | Limite inf. | Limite sup. | Gruppo |
|-----------------|-----------------|--------------|-----------|------------|--------------------|--------------------|---------------|
| simulato | operatore | 0.0692 | 0.00104 | 8 | 0.0668 | 0.0716 | a |
| reale | operatore | 0.0758 | 0.00104 | 8 | 0.0734 | 0.0782 | b |
| simulato | random | 0.0829 | 0.00104 | 8 | 0.0805 | 0.0853 | c |
| reale | random | 0.0833 | 0.00104 | 8 | 0.0809 | 0.0857 | c |

Tabella 20: esito del test di Tukey del confronto fra scenario simulato e scenario reale di Alonte che prevedeva una $p = 65\%$, secchi = 40% e una $n = 52$ caditoie. Nell'ultima colonna sono riportate le lettere che descrivono se vi sono differenze significative o meno fra le medie per $p < 0.05$.

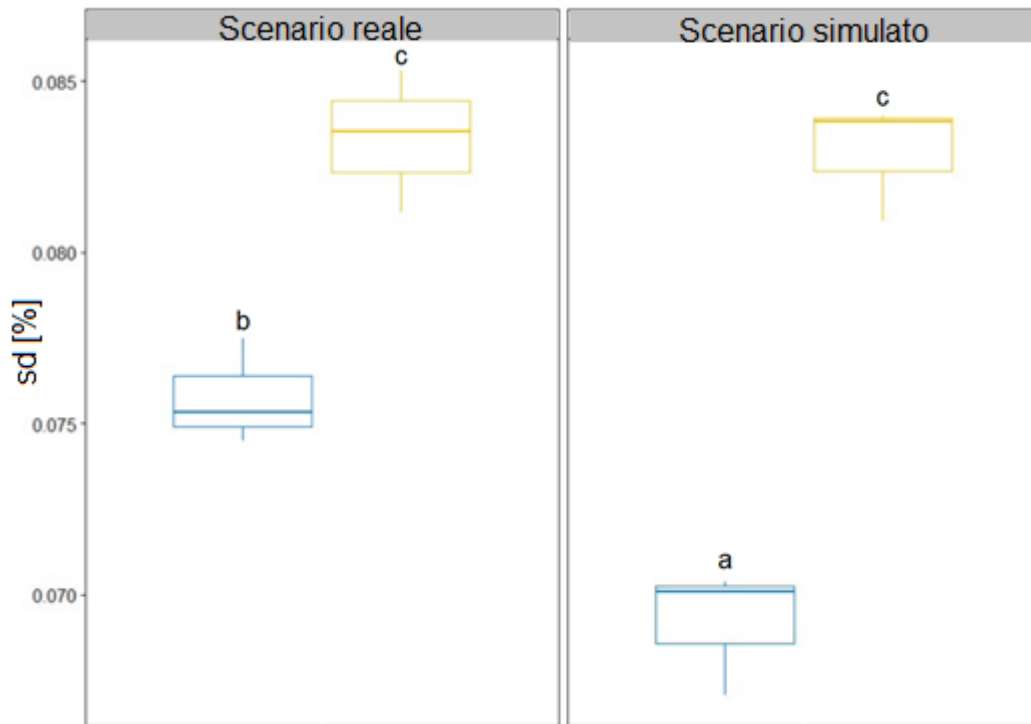


Figura 38: illustrazione grafica tramite box-plot delle *sd* ottenute dalle simulazioni del confronto fra scenario reale e scenario simulato di Alonte ($p = 65\%$ e tombini secchi = 40%). In blu vi sono le *sd* riferite al campionamento secondo criterio operatore, mentre in giallo le *sd* riferite al campionamento secondo criterio random.

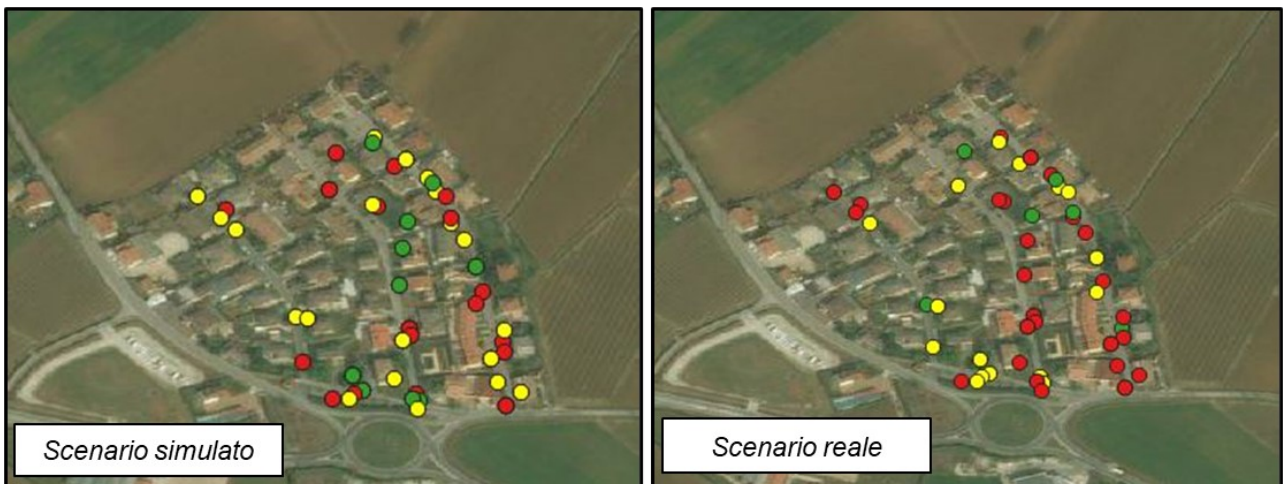


Figura 39: elaborazione con Q-GIS del confronto fra lo scenario simulato e lo scenario reale della frazione di Corlanzone. I colori indicano il diverso stato dei tombini: rosso (positivo), verde (negativo) e giallo (secco).

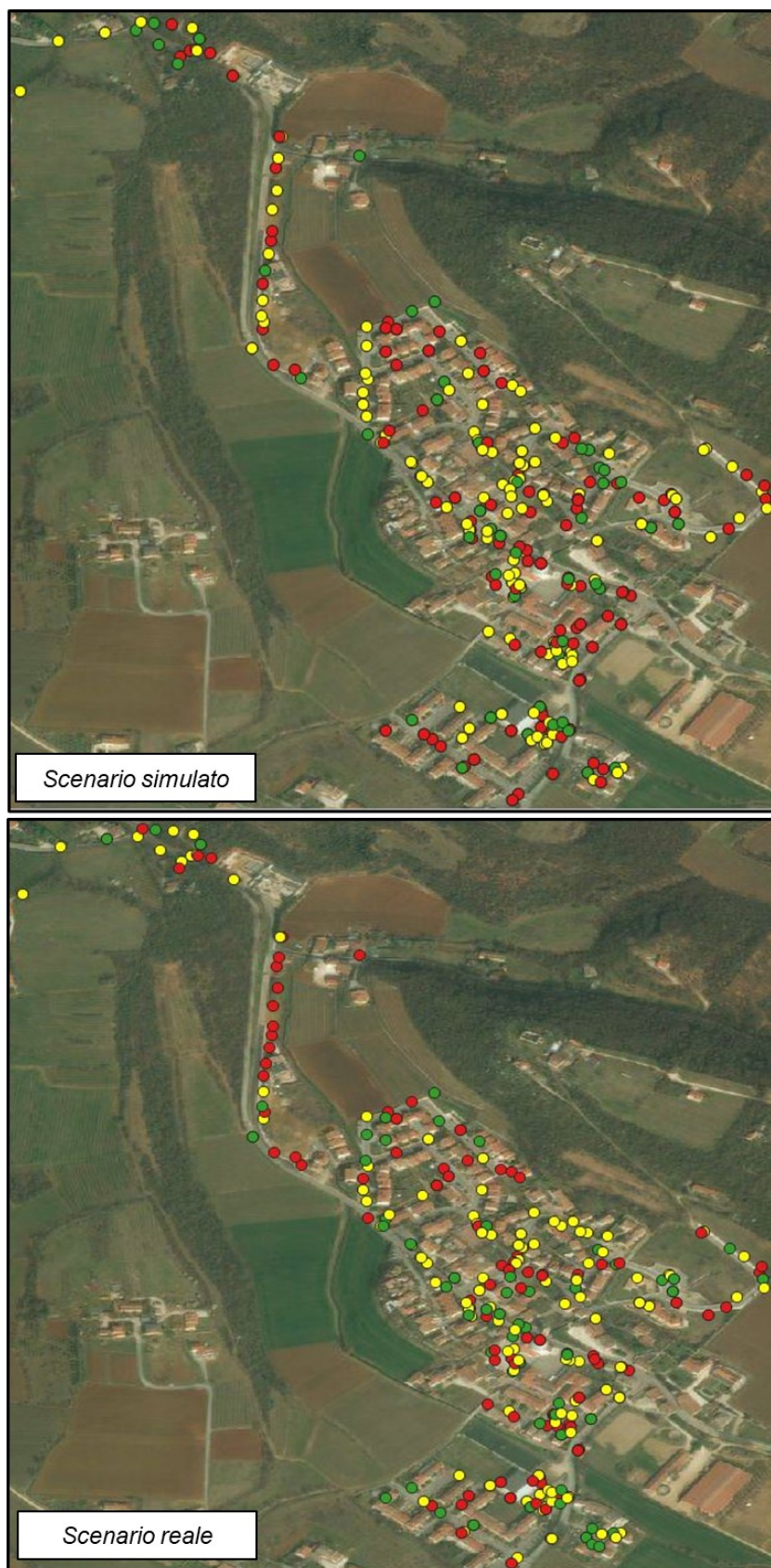


Figura 40: elaborazione con Q-GIS del confronto fra lo scenario simulato e lo scenario reale del centro storico di Alonte. I colori indicano il diverso stato dei tombini: rosso (positivo), verde (negativo) e giallo (secco).

5.5 Osservazioni

I risultati della tesi hanno portato i seguenti punti:

Considerando una positività percentuale del 10.0% (limite di tolleranza dei tombini positivi riscontrabili durante un campionamento generico in un intero comune), applicando la formula della sample-size viene considerato rappresentativo un numero di caditoie pari a 53 caditoie per Vigodarzere, 51 per Cona e 48 per Alonte (tabella 2).

Dai risultati delle deviazioni standard (*sd*) ottenute dalle simulazioni (figure 26, 27 e 28) si nota, che i valori più bassi di *sd* si hanno nei casi in cui non vengono considerati tombini secchi durante un monitoraggio. In tutte le categorie dove è stato possibile eseguire l'ANOVA è stato riscontrato significativo il fattore "secchi" (vedi risultati in appendice 7.3). Pertanto, per ottenere una stima più precisa del valore di positività durante una verifica di efficacia, è opportuno che tutte le caditoie osservate contengano acqua, indipendentemente dal numero di caditoie totali presenti in un comune.

Il confronto fra i metodi di campionamento secondo criterio random (RA) e secondo criterio operatore (CO) ha portato alla luce che nei diversi casi di studio, per la maggior parte delle categorie testate non vi sono differenze significative soprattutto per la categoria *i* (positività = 10%). Le categorie *ii* hanno dato un medesimo risultato eccezione fatta per Cona dove in un caso si è osservata una differenza significativa fra i due criteri (secchi = 30%). La categoria *iii* di Cona ha mostrato una differenza significativa fra i due criteri in tutti i casi. Per quanto riguarda la categoria *iv*, non ci sono state differenze per i casi dove la positività era pari al 10%. Perciò, considerando che i due criteri di campionamento testati con ANOVA nei diversi casi di studio non hanno mostrato differenze significative nelle categorie con $p = 10\%$ (vedi risultati in appendice 7.4), si suggerisce di considerare tale valore come parametro di positività attesa di riferimento per definire il numero di caditoie da campionare durante una verifica di efficacia.

Dal confronto fra lo scenario simulato e lo scenario reale di Alonte emerge come possano esserci risultati diversi (in termini di *sd*) a seconda del metodo di campionamento impiegato. Per una $p = 65\%$ e tombini secchi = 40%, il metodo RA non presenta differenze significative fra i due scenari in termini di *sd*. In entrambi gli scenari, il campionamento RA risulta in una *sd* significativamente maggiore rispetto al metodo CO. Si nota inoltre che, per il

campionamento con metodo CO, si osserva una *sd* significativamente minore nel caso del dataset simulato rispetto a quello reale. Come è possibile osservare nelle mappe riportate in Fig. 39 e 40, in una situazione reale lo stato le caditoie (positivo, negativo e secco) può avere una distribuzione non omogenea nello spazio, con intere vie o zone caratterizzate da sole caditoie positive o solo caditoie secche. Su questo possono influire fattori come l'eventuale presenza di infestazioni localizzate, la densità abitativa, la destinazione d'uso del suolo e la topografia. Si può quindi ipotizzare che, in uno scenario simulato, dove la distribuzione dei tombini è casuale, un campionamento CO potrebbe rischiare di sottostimare la *sd* rispetto al corrispondente scenario reale. Tuttavia, dato che questo tipo di prova è stata eseguita in un solo Comune, il risultato osservato è da considerarsi come un risultato preliminare in quanto necessita di ulteriori verifiche da svolgersi prendendo in esame un numero più ampio di comuni con diverso numero di caditoie.

6. Conclusioni

Il campionamento delle caditoie è un'operazione complessa che deve tenere conto di vari fattori a partire dalla piovosità intercorsa e soprattutto dalla corretta applicazione del larvicida a tutte le caditoie del comune interessato.

Questo studio ha cercato di raccogliere le informazioni dei trattamenti delle caditoie pubbliche pervenute a Entostudio da parte delle diverse Ulss (e comuni) del Veneto per cercare di ottimizzare l'attività di monitoraggio dell'azione dei larvicidi. Sulla base dei risultati conseguiti e delle osservazioni apportate da questo studio, un approccio utile per i monitoraggi durante le verifiche di efficacia è il seguente:

- Tutte le caditoie monitorate devono contenere acqua per ottenere una stima più precisa del valore di positività di un determinato territorio.
- La determinazione della dimensione campionaria è un fattore fondamentale che non va trascurato durante il monitoraggio delle caditoie. Esso, infatti, deve essere adeguato al livello di positività percentuale atteso sul territorio esaminato, al fine di fare una valutazione reale dell'efficacia del prodotto larvicida applicato nell'intera area comunale. Nel caso in cui si svolga una verifica di efficacia a seguito di un'applicazione di prodotto larvicida effettuata in modo corretto, è ragionevole assumere una positività percentuale attesa del 10%. Con questo valore di positività attesa la dimensione campionaria adeguata è pari a 52 caditoie con acqua per i comuni aventi numero di tombini maggiore di 300 (ovvero la maggior parte dei comuni di competenza di Entostudio). Inoltre, se si hanno a disposizione dati pregressi di valutazioni di positività per una certa Ulss, il modello della sample-size prevede l'eventuale possibilità di rimodulare il numero di caditoie per i comuni competenti di quel determinato territorio.
- Nel caso in cui si vada ad eseguire una verifica in infestazione, e non siano disponibili informazioni pregresse che consentano di stimare la positività attesa, si rende necessario attuare un approccio cautelativo assumendo quindi una positività attesa del 50%. In questo modo la dimensione campionaria risulterà

essere più elevata, ma ciò consente di limitare il rischio di sottostimare l'infestazione presente.

- Nel caso di verifiche di efficacia, in cui si assume una positività attesa del 10%, è stato osservato che il metodo di campionamento secondo criterio operatore non presenta significative criticità rispetto al campionamento random. Pertanto, per ragioni di praticità e convenienza, può essere applicato al posto del metodo di campionamento random.
- Nel caso in cui si svolgano verifiche di infestazione, con positività attesa ignota, il campionamento random risulta essere preferibile. Tuttavia, laddove non sia fattibile o conveniente svolgere un campionamento random, si consiglia di procedere con il campionamento secondo il criterio dell'operatore aumentando però la dimensione campionaria del 5% rispetto alla dimensione campionaria calcolata.

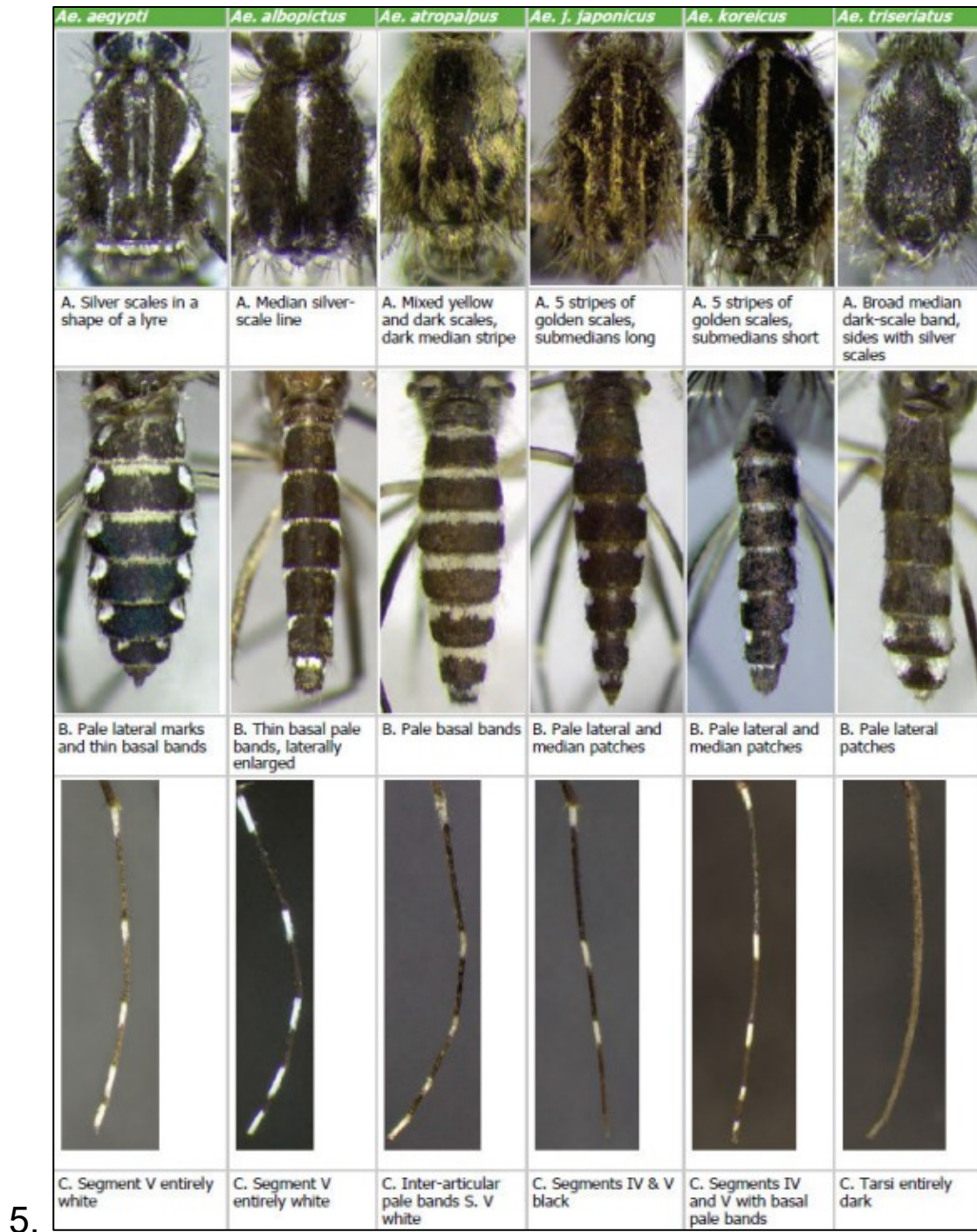
Le indicazioni fornite da questo studio non sono definitive, e possono essere soggette ad ulteriori approfondimenti. In merito a monitoraggi per comuni in cui si contano un numero di caditoie superiore a 3000, un suggerimento per facilitare il monitoraggio è di suddividere il territorio comunale in aree rappresentative (ad esempio quartieri o frazioni), in modo tale da semplificare l'attività di controllo dell'intervento eseguito ad una sola zona trattata rappresentativa per l'intera area municipale.

Ulteriori studi in futuro potrebbero essere utili per indagare se, ad esempio, il metodo di campionamento secondo criterio operatore, dovrebbe considerare tre o due caditoie per via (anziché quattro) al fine di ottenere un risultato migliore in termini di positività percentuale.

Infine, un ultimo aspetto interessante su cui si dovrebbe indagare in futuro è l'influenza delle precipitazioni piovose nell'azione del larvicida. Durante il periodo di Vigilanza 2020 sono state osservate positività oltre la soglia del 10% in occasioni in cui venivano registrate precipitazioni piovose nell'intervallo fra l'applicazione del larvicida e la verifica di efficacia. Dunque, uno studio per capire quale quantità di pioggia (mm piovuti) possa compromettere l'azione del larvicida potrebbe essere d'aiuto per interpretare i risultati dei monitoraggi.

7. Appendice

7.1 Identificazione morfologica delle specie



5.

Figura 41: a partire dall'alto, sono illustrati i dettagli morfologici di torace, addome e zampe utilizzati per distinguere la specie fra gli adulti del genere *Aedes* sp. (Becker et al., 2010)

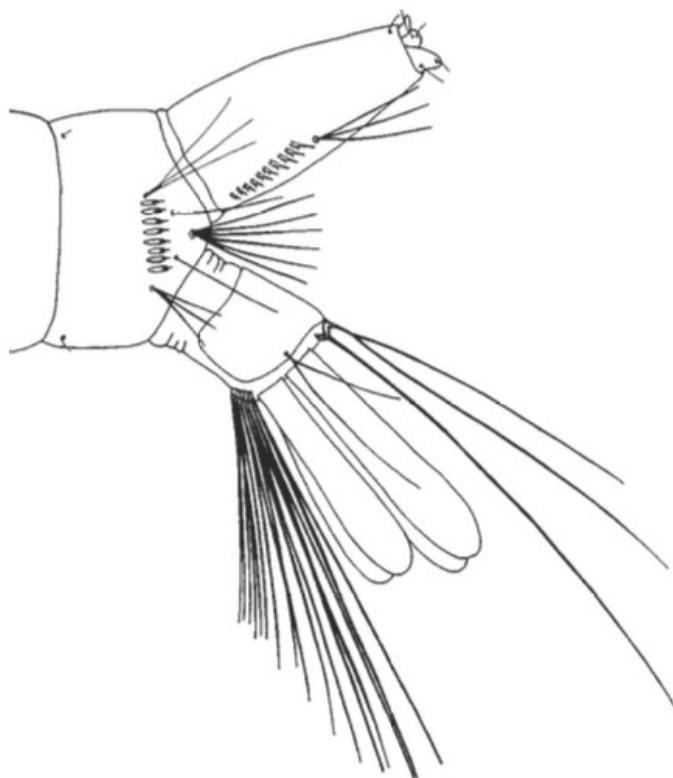


Figura 42: dettaglio parte terminale dell'addome di una larva di *Ae. albopictus* (Becker et al., 2010)

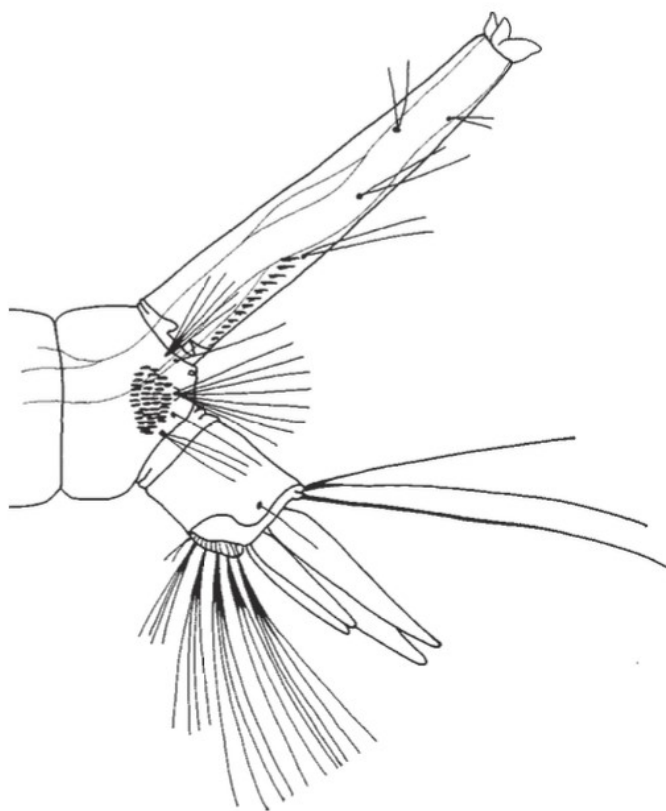


Figura 43: dettaglio parte terminale dell'addome di una larva di *Cx. Pipiens* (Becker et al., 2010)

7.2 Dati del periodo di Vigilanza 2020

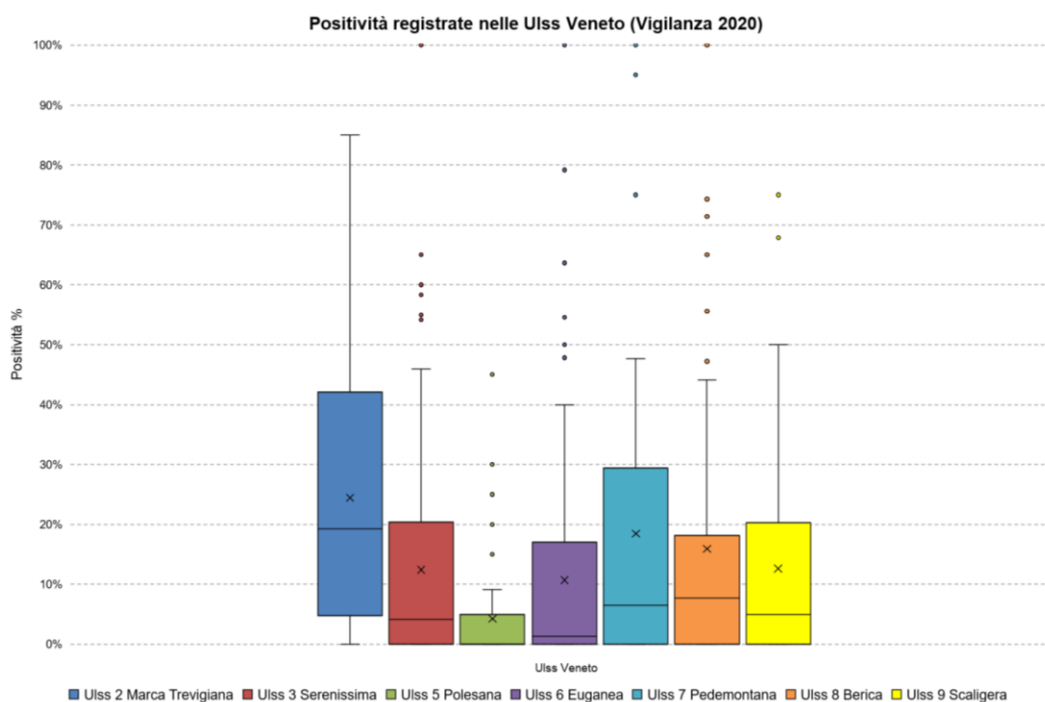


Figura 44: positività percentuali registrate nei monitoraggi effettuati da Entostudio nelle diverse Ulss durante il periodo di Vigilanza 2020

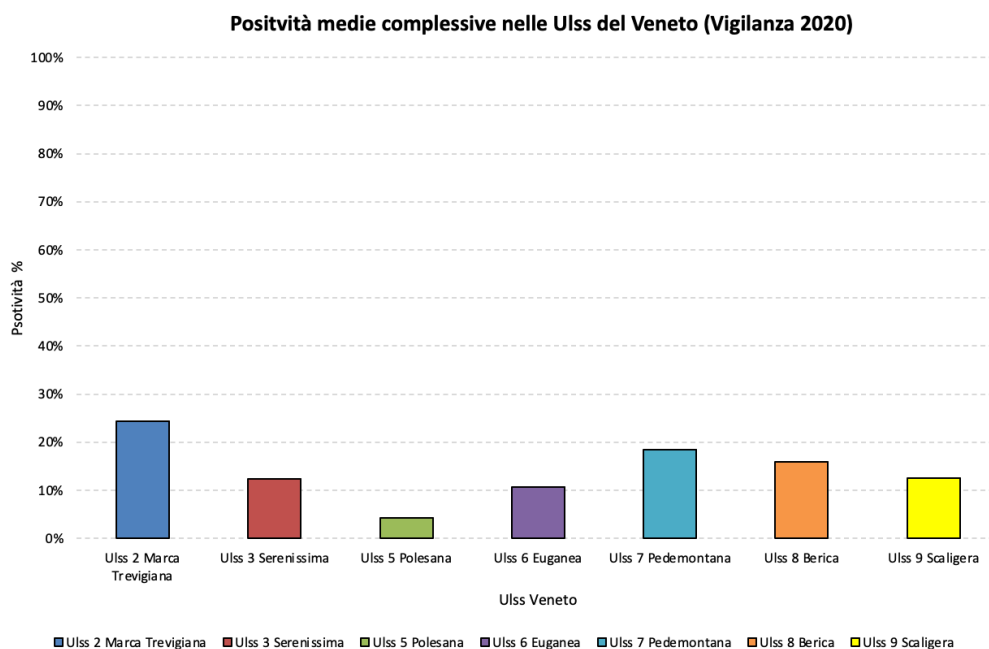


Figura 45: positività percentuali medie complessive di tutti i monitoraggi effettuati da Entostudio nelle diverse Ulss durante il periodo di Vigilanza 2020.

7.3 Risultati livelli di significatività per categoria

| CATEGORIA <i>i</i> | | Comuni | | |
|--------------------|-------------------|--------------------|-------------|---------------|
| | | <i>Vigodarzere</i> | <i>Cona</i> | <i>Alonte</i> |
| Fattori | Secchi | *** | *** | *** |
| | Criterio | | | * |
| | Secchi × Criterio | ** | | |

| CATEGORIA <i>ii</i> | | Comuni | | |
|---------------------|-------------------|--------------------|-------------|---------------|
| | | <i>Vigodarzere</i> | <i>Cona</i> | <i>Alonte</i> |
| Fattori | Secchi | *** | *** | N/A |
| | Criterio | | *** | |
| | Secchi × Criterio | | | |

| CATEGORIA <i>iii</i> | | Comuni | | |
|----------------------|-------------------|--------------------|-------------|---------------|
| | | <i>Vigodarzere</i> | <i>Cona</i> | <i>Alonte</i> |
| Fattori | Secchi | N/A | *** | N/A |
| | Criterio | | *** | |
| | Secchi × Criterio | | | |

| CATEGORIA <i>iv</i> | | Comuni | | |
|---------------------|--------------------------------|--------------------|-------------|---------------|
| | | <i>Vigodarzere</i> | <i>Cona</i> | <i>Alonte</i> |
| Fattori | Positività | *** | *** | N/A |
| | Secchi | *** | *** | |
| | Criterio | * | *** | |
| | Positività × Secchi | *** | *** | |
| | Positività × Criterio | | ** | |
| | Secchi × Criterio | | | |
| | Positività × Secchi × Criterio | | | |

Tabella 21: riassunto dei livelli di significatività dei fattori e per ogni categoria analizzata. I valori del simbolo “*” sono descritti nel paragrafo 5.3 “Dettaglio dei risultati dei casi di studio”.

7.4 Risultati confronto criterio random e criterio operatore

| CONFRONTO CRITERIO RA - CO | | Comuni | Vigodarzere | | | Cona | | | Alonte | | |
|-------------------------------|--|------------|-------------|----|----|------|----|----|--------|----|----|
| | | Secchi | 0 | 30 | 60 | 0 | 30 | 60 | 0 | 30 | 60 |
| Categorie (i, ii, iii) | | <i>i</i> | = | ≠ | = | = | = | = | ≠ | ≠ | ≠ |
| | | <i>ii</i> | ≠ | ≠ | = | ≠ | ≠ | = | N/A | | |
| | | <i>iii</i> | N/A | | | ≠ | ≠ | ≠ | N/A | | |

| CONFRONTO CRITERIO RA - CO | | Comuni | Vigodarzere | | | Cona | | | Alonte | | |
|-------------------------------|-----------------|--------|-------------|----|----|------|----|----|--------|----|----|
| | | Secchi | 0 | 30 | 60 | 0 | 30 | 60 | 0 | 30 | 60 |
| Categoria (iv) | Positività % | 10 | ≠ | ≠ | = | = | ≠ | ≠ | N/A | | |
| | | 30 | = | = | = | ≠ | ≠ | = | | | |
| | | 50 | = | ≠ | = | ≠ | ≠ | ≠ | | | |

Tabella 21: riassunto dei confronti dei due metodi di campionamento secondo criterio random (RA) e secondo criterio operatore (CO) per le diverse categorie analizzate. Dove è presente il simbolo “=” significa che i due criteri non presentavano differenze significative, viceversa dove è presente il simbolo “≠” i due criteri presentavano differenze significative.

8. Bibliografia

- Bates M. (1945). *"The Natural History of Mosquitoes"*. Jama.
- Bartlett J. E., Kotrlik J. W. & Higgins C. C. (2001), *"Organizational Research: Determining Appropriate Sample Size in Survey Research"*. Learning And performance Journal, 10, 43-50.
- Becker N., Petrić D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C. & Kaiser A. (2010), *"Mosquitoes and Their Control"*, Springer.
- Bonizzoni M., Gasperi G., Chen X. & James A.A. (2013) *The invasive mosquito species Aedes albopictus: current knowledge and future perspectives*. Trends in Parasitology, 29, 460-468.
- Busani L., Gras Mughini L., Romi R., Boccolini D., Severini F., Bongiorno G., Khoury C., Bianchi R., Gradoni L. & Capelli G. (2012). *"Zanzare, flebotomi e zecche: atlante bibliografico delle specie d'interesse sanitario in Italia (1985-2009)"*. Istituto Superiore di Sanità – Rapporti ISTISAN 12/22.
- Caputo B., Ienco A., Cicci D., Pombi M., Petrarca V., Baseggio A., Devine G.J. & Della Torre A. (2012). *The "auto-dissemination" approach: a novel concept to fight Aedes albopictus in urban areas*. PLOS Neglected Tropical Diseases, 6, 1793.
- Chinelo B. O. & Chioma A. A. (2019). *Research Sampling and Sample Size Determination: A practical Application*. Federal University Dutsin-Ma Journal of Educational Research (Fudjer), 2 (1): 47-56
- Conduto A. D., Sanseverino I., Pozzoli L. & Lettieri T. 2017). *"Toward Climate Change Impact: Vectors carrying viral infection, what we should know"*. JRC Technical Reports, European Commission.
- Dalla Pozza G. & Majori G. (1992) *"First record of Aedes albopictus establishment in Italy."* Journal of the American Mosquito Control Association, 8:1-3.
- Dutto M. (2008). *"Lineamenti di Entomologia Medica."* C. & G. Edizioni Medico Scientifiche.

- Gaibani P. & Rossini G. (2017). *An overview of Usutu virus. Microbes and infection*, 19(7-8), 382-387.
- Genchi C., Rinaldi L., Mortarino M., Genchi M. & Cringoli G., (2009) *Climate and Dirofilaria immitis infection in Europe. Veterinary Parasitology* 163:286–292.
- Gradoni F., Bertola M., Carlin S., Accordi S., Toniolo F., Visentin P., Patergnani T., Adami S., Terzo L., Dal Pont M., Candela G., Qualizza D., Mulas A., Landini P., Olivo G., Palei M., Russo F., Martini S. & Michelutti A. (2021) “*Geographical data on the occurrence and spreading of invasive Aedes mosquito species in Northeast Italy*”. Data in Brief.
- Grottola A., Marcacci M., Tagliazucchi S., Gennari W., Di Gennaro A., Orsini M., Monaco F., Marchegiano P., Marini V., Meacci M., Rumpianesi F., Lorusso A., Pecorari M., & Savini G. (2017). “*Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy.*” *Clinical Microbiology and Infection*, 23(1), 33-37.
- Kent R J., Harrington L. C. & Norris D.E. (2007). “*Genetic Differences Between Culex pipiens f. molestus and Culex pipiens pipiens (Diptera: Culicidae) in New York.*” *Journal Medical Entomology*.
- Lustro G., Fabbro A., Ferro A., Cavallini R., Gallo L., Marchioni G. & Martini S. (2005), *Linee guida per l'organizzazione e la gestione delle attività di disinfezione e disinfestazione da ratti e zanzare*. Servizio Igiene e Sanità Pubblica, Regione del Veneto.
- Mattingly P.F. (1952). “*The problem of biological races in the Culex pipiens complex, Proceedings of Lineean Society of London*”.
- Ministero della Salute (2014). *Malattie trasmesse da vettori: informativa dell'Organizzazione Mondiale della Sanità*. Dipartimento della sanità pubblica e dell'innovazione. Direzione generale dei rapporti europei ed internazionali.
- Ministero della Salute (2018), *Zika virus. Zika: informazioni per il personale sanitario*. URL <https://www.salute.gov>

- Ministero della Salute (2019), *Piano nazionale integrato di prevenzione, sorveglianza e risposta ai virus West Nile e Usutu – 2019*.
- Ministero della Salute (2019). “*Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA 2020-2025)*.”
- Montarsi F., Carlin S. & Capelli G. (2018). *La zanzara tigre*. Laboratorio di parassitologia IZSve.
- Montarsi F. & Capelli G. (2020). “*West Nile Disease ... una malattia esotica?*” Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie,
- Paupy C., Delatte H., Bagny L., Corbel V. & Fontenille D. (2009) *Aedes albopictus, an arbovirus vector: from the darkness to the light. Microbes and Infection*;11(14-15):1177-85.
- Pecorari, M., Longo G., Gennari W., Grottola A., Sabbatini A., Tagliazucchi S., Savini G., Monaco F., Simone M., Lelli R & Rumpianesi F. (2009). “*First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009.*” *Eurosurveillance* 14.50: 19446.
- Penazzo D. (2019). *VecTrax, software per il tracciamento di vettori*. URL <https://www.penaz.it/projects/vectrax/>.
- R Core Team (2021). “*R: A language and environment for statistical computing.*” R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reiter P. (1998). “*Aedes albopictus and the world trade in used tires, 1988- 1995: the shape of things to come*”. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14:83-94.
- Rezza G., Nicoletti L., Angelini R., Romi R., Finarelli AC., Panning M., Cordioli P., Fortuna C., Boros S., Magurano F., Silvi G., Angelini P., Dottori M., Ciufolini MG., Majori G.C.& Cassone A., CHIKV Study Group (2007). *Infection with Chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region*. *The Lancet*; 370:1840-6.

- Regione del Veneto (2008). "*Piano Regionale di Sorveglianza di West Nile Disease (WND)*", Assessorato alle politiche Sanitarie.
- Regione del Veneto (2018). "*Piano Regionale di Sorveglianza Integrata e Misure di Lotta ai Vettori Anno 2018*". Direzione Prevenzione, Sicurezza Alimentare, Veterinaria; U. O Prevenzione e Sanità Pubblica.
- Regione del Veneto (2021). "*Linee operative per la sorveglianza delle Arbovirosi nella Regione del Veneto Anno 2021*." Direzione Prevenzione, Sicurezza Alimentare, Veterinaria; Area Sanità e Sociale.
- Romi R. & Majori G. (1998) *Commercio di copertoni usati e importazione di zanzare: un aggiornamento di Ae. albopictus e Ae. atrapalpus in Italia*. Italian Journal of Tropical Medicine and Global Health, 4, 69-73.
- Romi R. (2001). "*A. albopictus in Italia: un problema sanitario sottovalutato*". Istituto Superiore di Sanità.
- Romi R., Toma L., Severini F., Di Luca M., Boccolini D., Ciufolini M.G., Nicoletti L. & Majori G. (2009). "*Linee guida per il controllo di Culicidi potenziali vettori di arbovirus in Italia*". Istituto Superiore di Sanità, Rapporti ISTISAN 09/11.
- Romi R., Khoury C., Bianchi R. & Severini F. (2012). "*Artropodi di interesse sanitario in Italia e in Europa*." Rapporti ISTISAN 12/41, Istituto Superiore di Sanità.
- Salvan A., Sartori N & Pace L, (2020). *Modelli Lineari Generalizzati*. Springer.
- Severini F., Toma L., Di Luca M. & Romi R. (2009). "*Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti*".
- Senevet G. & Andarelli L. (1959). "*Les moustiques de l’afrique du nord et du basin mediterraneen: le genre Culex, Uranotaenia, Theobaldia, Orthopodomya et Mansonia. Encyclopediè entomologique*". Série A., Paris Ed. Paul Lechevalier.
- Shroyer D.A. (1986). "*Aedes albopictus and arboviruses: a concise review of the literature*". Journal of the American Mosquito Control Association, 2:424-8.

- Taherdoost H. (2017). *“Determining Sample Size: How to Calculate Survey Sample Size”*. International Journal of Economics and Management Systems.
- Takken W. & Van den Berg H. (2019). *“Manual on prevention of establishment and control of mosquitoes of public health importance in the WHO European Region (with special reference to invasive mosquitoes)”*. WHO.
- Vinogradova E.B. (2000). *“Culex pipiens mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control”*. Pensoft.
- Zorzut Fulvio (2016), *Zika virus*. S.S tutela Salute Ambienti di Vita. Azienda Sanitaria Universitaria Integrata di Trieste.

9. Ringraziamenti

Vorrei ringraziare il personale dell'Università di Padova e di Entostudio per avermi aiutato a svolgere questo lavoro: la prof.ssa Roberta Masin e la dott.ssa Laura Carretta per il costante aiuto nello sviluppo dello studio e nell'analisi dei dati; il prof. Luca Mazzon, il dott. Simone Martini e i miei colleghi Stefano e Patrizia per il supporto tecnico per quanto riguarda la parte introduttiva sui culicidi e sulla vigilanza entomologica nel Veneto. Ringrazio inoltre il mio collega Matteo con il quale ho passato una giornata a monitorare tutte le 432 caditoie di Alonte. Ringrazio poi i miei amici Thomas e Matteo che mi hanno aiutato ad ottimizzare alcune operazioni con l'utilizzo dei software R e QGIS.

Un ulteriore ringraziamento importante va ai miei genitori, a mia nonna, a Giulia, a parenti ed amici che mi hanno supportato in questi mesi dove ho condiviso il mio percorso finale da studente con l'esperienza lavorativa presso Entostudio.