UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea a ciclo unico in Medicina Veterinaria

Preferenze alimentari di *Aedes koreicus*, una nuova zanzara invasiva e implicazioni nella trasmissione di patogeni.

Relatore
Prof. Marco Martini
Correlatore
Dott. Fabrizio Montarsi

Laureando
Luca Tripepi
Matricola n. 594603/MV

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

Preferenze alimentari di *Aedes koreicus*, una nuova zanzara invasiva e implicazioni nella trasmissione di patogeni.

Riassunto pag. 3

Abstract pag. 5

1. Introduzione pag. 7

1.1. Le malattie trasmesse da vettori pag. 7
1.2. Le zanzare come vettori di zoonosi pag. 10
1.3. Generalità sui culicidi pag. 12
1.4. La specie in studio: *Aedes koreicus* pag. 17

2. Scopo della tesi pag. 19

3. Materiali e metodi pag. 19

3.1. Modalità di campionamento di zanzare replete pag. 20
3.2. Alimentazione di *Aedes koreicus* in condizioni sperimentali pag. 24
3.3. Analisi molecolari dei pasti di sangue pag. 25

4. Risultati pag. 31

4.1. Campionamento e preferenze alimentari di *Aedes koreicus* pag. 31
4.2. Preferenze alimentari di *Aedes koreicus* in condizioni sperimentali pag. 32

5. Conclusioni pag. 34

6. Bibliografia pag. 39

Riassunto

Background: *Aedes koreicus* [sin. *Hulecoeteomyia koreica*] è una nuova specie di zanzara invasiva la cui presenza è stata recentemente riscontrata nel nord-est dell'Italia (provincia di Belluno, 2011) (Capelli *et al.*, 2011; Montarsi *et al.*, 2013a). Questa specie è nativa del sud-est asiatico (Tanaka *et al.*, 1979) e la sua presenza in Europa (Belgio) è già stata segnalata una prima volta in passato (Versteirt *et al.*, 2012a). Sono disponibili solo poche informazioni riguardanti il comportamento alimentare e la competenza vettoriale di *Ae. koreicus* (Cameron *et al.*, 2010; Capelli *et al.*, 2011). Alcuni autori riportano l'uomo, gli animali domestici e gli uccelli marini come possibili specie ospite (Miles *et al.*, 1964; Tanaka *et al.*, 1979), tuttavia è necessario precisare che questa zanzara è stata spesso confusa con *Aedes japonicus* in passato (Miyagi, 1979). Lo scopo di questo studio è quello di accertare le preferenze alimentari e lo spettro d'ospite di *Ae. koreicus* in laboratorio e in campo.

Materiali e metodi: Tutti gli stadi larvali di *Ae. koreicus* sono stati allevati in laboratorio e le zanzare sono state alimentate artificialmente con l'utilizzo del sistema Hemotek (Discovery Workshops, Lancashire, United Kingdom) (Cosgrove *et al.*, 1994) utilizzando vari tipi di sangue (uomo, pollo, tacchino, pecora). Il campionamento di zanzare replete è stato condotto in nove comuni della regione Veneto (provincie di Belluno e Treviso). La raccolta si è svolta da Giugno a Settembre 2013 in diversi siti di riposo (vegetazione, muri, tombini) collocati in cimiteri, vivai, zone industriali, giardini privati positivi per *Ae. koreicus* (Montarsi *et al.*, 2013a). Le zanzare sono state campionate per aspirazione utilizzando un aspiratore Handheld (Hausherr's Machine Works, Toms River, NJ) ed un aspirapolvere a mano modificato, con trappole sticky, e con trappole BG-sentinel. Dopo l'identificazione morfologica degli esemplari (Tanaka *et al.*, 1979; Versteirt *et al*., 2012a; Montarsi *et al*., 2013a), le femmine adulte di *Ae. koreicus* sono state stoccate individualmente in provette Eppendorf® a -20° C. Tutti i campioni sono stati testati utilizzando la PCR per identificare l'ospite seguendo il protocollo suggerito da Alcaide *et al*. (2009). Le sequenze sono state comparate con le sequenze depositate nel database Barcode of Life Data Systems (BOLD), (www.barcodinglife.org).

Risultati: Le zanzare si sono alimentate su sangue di pollo, tacchino e pecora, fornito col sistema di alimentazione artificiale, e su sangue umano fornito sia col sistema di alimentazione artificiale sia da persone volontarie. Le maggiori percentuali di zanzare replete sono state raggiunte con sangue di uomo (76,5%), e di pollo (65,4%). In campo sono state raccolte in totale 239 zanzare adulte femmine. Il sequenziamento dei prodotti della PCR ha identificato sangue umano (*Homo sapiens)*

in 23 campioni, un campione positivo per sangue di cane (*Canis lupus*) ed uno di sangue bovino (*Bos taurus).*

Conclusioni: I risultati di laboratorio hanno mostrato che *Ae. koreicus* è in grado di alimentarsi su diversi ospiti con una preferenza per il sangue di uomo e di pollo, mentre in natura *Ae. koreicus* sembra preferire l'uomo. In ogni caso, sono necessari altri studi per verificare la natura opportunistica o antropofila di questo comportamento. Indagare sulla preferenza d'ospite delle zanzare e sul loro potenziale comportamento antropofilo è fondamentale per valutare il rischio di trasmissione di malattie animali e zoonosi trasmesse da vettori (Takken & Verhulst, 2013). Questi studi preliminari costituiscono la base per futuri studi di competenza vettoriale, sia per importanti parassiti di animali, quali *Dirofilaria immitis,* che per virus di grande interesse per la salute pubblica come Chikungunya, Dengue e West Nile.

Abstract

Background: *Aedes koreicus* [syn. *Hulecoeteomyia koreica*] is a new invasive mosquito species recently detected in North-eastern Italy (Belluno province, 2011) (Capelli *et al*, 2011; Montarsi et al, 2013a). The species is native of the South-east Asia area (Tanaka *et al*., 1979) and represents the second invasion to Europe, after a report in Belgium (Versteirt *et al*., 2012a). Little information on the feeding behaviour and the related vector competence status of *Ae. koreicus* is available (Cameron *et al*, 2010; Capelli *et* al, 2011). Some authors report humans, domestic mammals and sea birds as possible feeding target of this species (Miles, 1964; Tanaka *et al*., 1979), however this mosquito has been often confused with *Aedes japonicus* in the past (Miyagi, 1971). This study aimed to assess the feeding preference and the host range of *Ae. koreicus* in laboratory and in field conditions.

Materials and methods: All *Ae. koreicus* life stages were reared in laboratory and artificial feeding was performed using the Hemotek feeding system (Discovery Workshops, Lancashire, United Kingdom) (Cosgrove *et al.*, 1994) using different blood types (human, chicken, turkey and sheep).
Sampling on field was carried out in nine municipalities of the Veneto region (Belluno and Treviso provinces). Collection was made from June to September 2013 in different resting sites (vegetation, walls and manholes) located in cemeteries, garden centres, industrial areas and private gardens positive for *Ae. koreicus* (Montarsi *et al*., 2013a). Mosquitoes were collected by aspiration using a Handheld aspirator (Hausherr's Machine Works, Toms River, NJ) and a modified hand vacuum, and by trapping by sticky traps and BG-sentinel traps. After morphological identification of the specimens (Tanaka *et al.*, 1979; Versteirt *et al*., 2012a; Montarsi *et al*., 2013a) adult females of *Ae. koreicus* where stored individually in Eppendorf® tubes at -20 °C. All samples were tested using a host identification PCR following the protocol suggested by Alcaide *et al*. (2009). The sequences were compared with the sequences deposited in the Barcode of Life Data Systems (BOLD) database, (www.barcodinglife.org).

Results: Mosquitoes fed on blood from chicken, turkey and sheep, provided with the artificial feeding system, and on human blood provided with both the artificial system and human volunteers. The highest rates of engorgement were achieved with human (76.5%) and chicken (65.4%) blood. Females engorged were able to complete their life cycles, laying fertile eggs, regardless the host blood provided. From field collection a total of 239 adult female mosquitoes were sampled. Sequencing of the PCR products identified human (*Homo sapiens*) blood in 23 positive samples, dog (*Canis lupus*) blood and cattle (*Bos taurus*) blood in one positive sample.

Conclusions: The laboratory results showed that *Ae. koreicus* is able to feed efficiently on blood from different hosts, with a preference for human and chicken blood, while in nature *Ae. koreicus* seems to prefer humans. However, further studies are needed to asses the opportunistic or anthropophilic nature of this behaviour. To investigate host preference of mosquitoes and their potential anthropophilic behaviour is pivotal to evaluate transmission risk of animal and zoonotic vector-borne diseases (Takken & Verhulst, 2013). These preliminary results lay the basis for future vector competence studies, both for significant animal parasites such as *Dirofilaria immitis*, and viruses of major concern in Public Health as Chikungunya, Dengue and West Nile Viruses.

1. Introduzione

1.1. Le malattie trasmesse da vettori

Le malattie trasmesse da vettori sono associate ad organismi appartenenti al phylum *Arthropoda*, quali zecche, zanzare, o altri ditteri ematofagi, definiti vettori ed aventi un ruolo attivo nella trasmissione di patogeni da un ospite ad un altro. Si tratta in questo caso di vettori biologici, e per ruolo attivo si intende la partecipazione dell'artropode al compimento di uno o più stadi del ciclo vitale del patogeno. Diversamente accade invece nel caso dei vettori meccanici, come ad esempio artropodi non ematofagi, che trasportano passivamente (intrappolato nella peluria, nelle zampe o nell'apparato buccale) il patogeno, nei quali cioè il patogeno non replica né compie alcuna fase del proprio ciclo vitale. Quando il patogeno può essere trasmesso da animale a uomo tramite un vettore biologico, si parla di zoonosi trasmesse da vettori. In generale, zoonosi o non, l'agente patogeno può essere un virus (es. arbovirosi), un batterio (es. malattia di Lyme), un protozoo (es. malaria), od un nematode (es. filariosi).

Le malattie trasmesse da vettori rappresentano uno tra i maggiori problemi inerenti la sanità pubblica in tutto il mondo; indicativo è il caso della malaria, importante malattia parassitaria trasmessa da zanzare. Secondo una recente pubblicazione della World Health Organization, nel 2010 i casi di malaria documentati sono stati 219 milioni, con un numero di morti compreso tra 660000 e 1,2 milioni (Nadjm & Behrens, 2012; World Health Organization, 2012). Si stima che la maggior parte delle ultime pandemie sia stata di origine zoonosica e che un quarto degli episodi di zoonosi su larga scala dell'ultimo secolo siano stati a trasmissione vettoriale (Jones *et al.,* 2008). Il commercio su scala globale, l'aumento dei viaggi internazionali, insieme con i cambiamenti climatici ed ambientali, aumentano il rischio di introduzione ed adattamento di vettori artropodi in nuovi ambienti prima indenni, e della trasmissione di diversi e numerosi patogeni (Tatem *et al.*, 2006). Di conseguenza, negli ultimi anni si è assistito ad un aumento del numero degli episodi riferiti alle malattie trasmesse da vettori sia in campo medico che medico-veterinario; oltre alle nuove patologie emerse dagli anni settanta ad oggi e prima sconosciute (Dottori *et al*., 2008), sono in aumento i casi di malattie di origine tropicale in zone temperate, compresa l'Europa, trasmesse da insetti vettori all'uomo e agli animali (Gubler, 2002; Koopmans *et al.*,2007).

In un simile contesto, è chiaro che lo studio degli insetti ematofagi come vettori di malattie zoonosiche e non riveste un ruolo di fondamentale importanza nella prevenzione, nel controllo e nel monitoraggio delle stesse.

Tra gli artropodi vettori di patogeni, oltre alle zanzare, ricordiamo brevemente i seguenti gruppi tassonomici:

Le zecche (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) sono ectoparassiti obbligati che si nutrono di sangue. Le zecche giocano un ruolo essenziale nella trasmissione di numerosi agenti infettivi di interesse sia medico che medico-veterinario (Tab. 1).

Tab. 1: Le più frequenti malattie infettive associate al morso di zecca presenti in Europa e nell'America Settentrionale. Modificata da Calza *et al.*, 2004.

Zecca	Agente eziologico	Malattia
Ixodes scapularis, I. ricinus	*Borrelia burgdorferi*	Malattia di Lyme
Ornithodorus erraticus, O. turicata, O. parkeri	*Borrelia hispanica, B. turicatae, B. parkeri*	Febbre ricorrente da zecche
Dermacentor andersoni, D. variabilis	*Rickettsia rickettsii*	Febbre purpurica delle Montagne Rocciose
Rhipicephalus sanguineus	*Rickettsia conori*	Febbre bottonosa o tifo da zecche mediterraneo
Rhipicephalus sanguineus, Dermacentor variabilis, Amblyomma americanum	*Ehrlichia chafeensis, Neorickettsia E. sennetsu*	Ehrlichiosi
Rhipicephalus sanguineus, Dermacentor variabilis, D. andersoni	*Coxiella burnetii*	Febbre Q
Dermacentor andersoni, D. variabilis	*Francisella tularensis*	Tularemia
Ixodes scapularis, I. ricinus	*Babesia microti, B. divergens, B.bovis*	Babesiosi
Ixodes ricinus, I. persulcatus	*Flavivirus*	Encefalite trasmessa da zecche ("Tick-borne encephalitis" o TBE)

Tra questi i più diffusi sono batteri appartenenti ai generi *Anaplasma, Bartonella, Borrelia, Coxiella, Ehrlichia, Francisella e Rickettsia* (Brouqui *et al.,* 2004), protozoi appartenenti ai generi *Babesia e Theileria* (Kjemtrup, 2000; Florin-Christensen *et al,* 2009) ed infine virus (oltre 60 Arbovirus, ovvero Arthropods Borne Viruses), di cui circa 20 sono causa di malattie nell'uomo e negli animali (Hoogstraal, 1973).
Tra i principali agenti infettivi ricordiamo *Borrelia burgdorferi,* agente eziologico della malattia di Lyme, attualmente considerata la più frequente infezione trasmessa da artropodi vettori in Europa e negli Stati Uniti, la cui incidenza è in costante aumento (Steere, 2001; Singh-Behl, 2003) e la TBE, un Flavivirus (famiglia Flaviviridae), agente eziologico della meningoencefalite da zecche, considerata la più importante e diffusa arbovirosi da zecche in Europa (WHO Europe, 2004).

Le pulci (Siphonaptera) possono essere vettori di batteri patogeni come *Yersinia pestis, Rickettsia typhi, Rickettsia felis* e *Bartonella henselae* (David, 2002; Mullen *et al.,* 2009), virus (*Myxoma* virus) (Krasnov, 2008), protozoi (tripanosomi del subgenere *Herpetosoma)* (Krasnov, 2008) ed elminti (*Hymenolopis nana, Hymenoplepis diminuta)* (Stein, 2003).

I pidocchi (Anoplura) del genere *Pediculus* possono essere vettori di *Bartonella quintana* (Fournier *et al.,* 2002; Brouqui, 2011; Veracx *et al.,* 2012), *Rickettsia prowazekii*, (Robinson *et al.,* 2003) *Borrelia recurrentis, Salmonella typhi, Serratia marcescens, Acinetobacter baumannii, Yersinia pestis* (La Scola *et al.,* 2001; Houhamdi *et al*., 2006 Bouvresse *et al.,* 2011).

I flebotomi (Diptera: Psychodidae) sono responsabili della trasmissione della Leishmaniosi in tutto mondo. Nel vecchio mondo il patogeno è trasmesso da flebotomi appartenenti al genere *Phlebotomus,* mentre nel nuovo mondo il vettore appartiene al genere *Lutzomia* (Grimaldi & Tesh, 1993; Zeledón, 1996). La leishmaniosi è un'importante malattia di interesse sia medico che medico-veterinario causata da diverse specie di protozoi appartenenti al genere *Leishmania,* e si manifesta con diverse sindromi morbose a seconda delle caratteristiche della specie responsabile dell'infezione (Matassa, 2007). Oltre alla leishmaniosi, I flebotomi possono essere vettori di altre malattie virali e batteriche: sandfly fever o pappataci fever (causata da diversi *Phlebovirus,* fam. Bunyaviridae*)*; stomatite vescicolare (*vesicular stomatitis indiana virus,* gen. *Vesiculovirus,* fam. Rabdhoviridae), Chandipura virus encephalitis (*Chandipura virus,* gen. *Vesiculovirus,* fam. Rhabdoviridae), malattia di Carrion o verruga peruana o Oroya fever (*Bartonella bacilliformis*) (Maroli *et al.,* 2013).

I culicoidi (Diptera: Ceratopogonidae, genere *Culicoides*) sono vettori di diversi virus di interesse veterinario; tra questi i più importanti sono quelli della Bluetongue e della Peste Equina (famiglia Reoviridae, genere *Orbivirus*), insieme a Schmallenberg (fam. Bunyaviridae, gen. *Orthobunyavirus*) ed alcuni Rhabdoviridae (gen. *Ephemerovirus*:). Sono inoltre vettori di alcune specie di nematodi del genere *Mansonella* ed *Onchocerca;* infine possono essere vettori anche di protozoi quali *Leucocytozoon* spp., *Plasmodium* spp. e *Leishmania* spp. (Slama *et al.*,2014).

1.2. Le zanzare come vettori di zoonosi

I Culicidi (Diptera: Culicidae), comunemente chiamati zanzare, rivestono una rilevante importanza medico-sanitaria in quanto alcune specie sono vettori di numerosi agenti di malattia nell'uomo e negli animali, primo tra tutti il protozoo *Plasmodium falciparum,* agente eziologico della malaria, la parassitosi umana più diffusa al mondo, trasmessa da zanzare del genere *Anopheles*.

Oltre ai protozoi, i Culicidi sono in grado di trasmettere anche altri organismi, patogeni sia per l'uomo che per gli animali, quali arbovirus e filarie, per cui possono essere considerati a buona ragione il gruppo più importante tra gli artropodi di interesse sanitario. Nello specifico, le specie d'interesse appartengono ai generi *Culex*, *Aedes* e *Anopheles*, (Beaty & Marquardt, 1996; Robinson, 2005).

Tra i virus trasmessi dai culicidi rientrano diversi *Bunyavirus* e *Phlebovirus* (fam. Bunyaviridae), *Alphavirus* (fam. Togaviridae) e *Flavivirus* (fam. Flaviviridae). Alcune arbovirosi sono infezioni che interessano esclusivamente diverse specie animali, altre si trasmettono tra serbatoi animali e l'uomo (zoonosi), come la West Nile Disease (WND), mentre poche, ma più importanti per la salute umana, sono trasmesse esclusivamente da uomo a uomo, come la Dengue e la Febbre gialla (Endy & Nisalak, 2002; Barret & Monath, 2003; Shope, 2003; Komar, 2003; Medlock *et al*., 2006; Weissenbock *et al*., 2010), alla cui infezione sono sensibili anche altri primati (Vasilakis & Weaver, 2008).

In Italia sono state classificate circa settanta specie di zanzare, ma solo una frazione minoritaria è da considerare nociva e quindi idonea a diventare bersaglio di lotta. In linea di massima le specie che per comportamento e densità di popolazione vengono considerate nocive per l'uomo sono: *Aedes albopictus*, *Aedes vexans*, *Anopheles messeae*, *Anopheles labranchiae*, *Culex modestus*, *Culex pipiens*, *Ochlerotatus caspius*, *Ochlerotatus detritus*, *Ochlerotatus mariae/zammitii*. Altre specie possono raggiungere livelli di nocività consistenti solamente per brevi periodi od in ambiti delimitati (Bellini, 2003).

Fig. 1: *Aedes albopictus*. (Foto: F. Montarsi)

Aedes albopictus o zanzara tigre (Fig.1) è una specie di origine asiatica, segnalata per la prima volta nel 1990 a Genova (Sabatini *et al*., 1990) e che si è poi rapidamente diffusa in tutta Italia (Romi, 2001). La segnalazione suscitò subito notevole preoccupazione in quanto è un noto vettore di almeno 23 Arbovirus, fra cui numerosi Flavivirus, Bunyavirus e Alphavirus, inclusi West Nile, Sindbis, Febbre Gialla, Chikungunya, Dengue ed altri (Dohm *et al*., 1995; Gratz, 2004; Vazeille *et al*., 2010; Bonizzoni et al. 2013).

Nell'agosto del 2007 un focolaio di Chikungunya con più di 250 casi umani confermati in due paesi nella provincia di Ravenna (Castiglione di Cervia e Castiglione di Ravenna), rappresentò il primo caso di trasmissione autoctona in Europa (Rezza *et al*., 2007; Bonilauri *et al*., 2008). In Europa, Italia compresa, il virus Chikungunya è stato diagnosticato in molti viaggiatori provenienti da Paesi in cui l'infezione è endemica (alcune aree dell'Africa, del sud-est asiatico e del subcontinente indiano) ma la trasmissione in loco da parte delle zanzare non era mai stata riscontrata (Angelini *et al*., 2007). Questi due episodi hanno fatto crescere l'attenzione nei confronti di un possibile aumento di diffusione di Arbovirus in Europa, dove *Ae. albopictus* si è diffusa dalla sua prima segnalazione in Albania nel 1979 (Adhami & Murati, 1987). La competenza vettoriale di *Aedes albopictus* per alcuni *Alphavirus* (Mayoro, Ross River, Encefalomielite Equina dell'Est, Sindbis), *Flavivirus* (Dengue, Encefalite Giapponese, Febbre Gialla, West Nile) e *Bunyavirus* (Jamestown Canyon, Rift Valley Fever, Keystone) è dimostrata inoltre da diversi esperimenti eseguiti sul campo (Shroyer, 1986; Mitchell, 1995). *Aedes albopictus* è anche vettore di *Dirofilaria immitis* e *D. repens*, i due principali agenti della filariosi canina; la sua competenza vettoriale per filaria è stata dimostrata in laboratorio ed in campo (Cancrini *et al*., 2003a; Cancrini *et al*., 2003b).

Fig.2: *Culex pipiens*. (Foto: F. Montarsi, IZSVe)

Più di 40 sottospecie di *Culex pipiens* (Fig.2) (quali *Culex pipiens pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens molestus*) sono vettori di West Nile. Oltre a questo virus, alcune specie sono vettori di altre malattie: *Cx. quinquefaciatus*, ad esempio, è vettore di filariosi e Sant Luis Encephalitis, mentre *Cx. tarsalis* è il principale vettore di Western Equine Encephalitis (Robinson, 2005; Hayes, 2005). La prima comparsa del West Nile virus in Italia risale al 1998,

in Toscana, e fu riscontrata su alcuni cavalli ma non sull'uomo (Autorino *et al*., 2002). Nel 2008 il virus riemerse, provocando un'epidemia nell'area del Delta del Po coinvolgendo, oltre gli equidi, anche gli uccelli e l'uomo (Calistri *et al*., 2010; Barzon, 2009; Rossini, 2008) . Da allora il virus circola in tutta l'area del Nord-Est Italia (Barzon *et al.*, 2013; Gobbi *et al.*, 2014). Nel resto del mondo la WND è diffusa negli Stati Uniti, in Asia, in Africa, in Europa e in Australia (Paz and Semenza, 2013; Roehrig 2013; Sambri *et al.*, 2013).

Fig. 3: *Anopheles gambiae*. (Foto: Simon Fellous. http://www.sindhsalamat.com/threads/30910)

Al genere *Anopheles* (Fig. 3) appartengono specie vettori di patologie parassitarie che colpiscono l'uomo, tra le quali la malaria e il virus della febbre chiamata O'nyong'nyong (Afrane *et al.*, 2012).
La malaria è certamente la malattia più importante trasmessa da zanzare: ogni anno la malaria colpisce più di 500 milioni di persone e causa più di un milioni di morti (Breman *et al*. 2001). La malaria è diffusa in Africa, Sudamerica, Asia e Oceania; in Italia venne eradicata negli anni all'inizio degli anni '50, ma da 1985 si è assistito ad una crescita dei casi di importazione da paesi stranieri fino a raggiungere un picco di oltre 1000 casi nel 1999, per poi diminuire dal 2000 (Boccolini et al., 2007; Majori, 2012). Ad ogni modo questa malattia continua ad essere uno dei maggiori problemi per i viaggiatori in zone tropicali e sub-tropicali (Romi *et al*., 2010).

1.3. Generalità sui culicidi

Conosciuti più comunemente con il termine zanzare, i Culicidi (Diptera: Culicidae) sono artropodi appartenenti alla classe Insecta, all'ordine Diptera, e alla famiglia Culicidae, la quale comprende circa 3500 specie. Di queste circa tre quarti vivono nelle zone tropicali, mentre il resto si è diffuso nelle zone temperate (Harbach & Howard, 2007); in Italia sono presenti 65 specie (Severini et al., 2009).
Le zanzare sono insetti la cui sopravvivenza non può prescindere dalla presenza di acqua; oltre a siti naturali ricchi d'acqua, nuovi siti di riproduzione vengono continuamente messi a disposizione dalle

profonde modificazioni ambientali indotte dall'uomo: opere di urbanizzazione (tombini e caditoie), creazione di bacini artificiali privi di pesce (risaie), bacini di fitodepurazione, ecc. Esistono numerose specie di culicidi antropofili, ciascuna con una propria peculiare biologia, in grado di sfruttare ambienti diversi, dalle minuscole raccolte d'acqua piovana alle risaie, dalle aree litorali alle golene dei fiumi.

I Culicidi si dividono in due sottofamiglie: Anophelinae e Culicinae. Alle Anophelinae appartengono i generi *Anopheles*, *Bironella*, *Chagasia*, mentre alle Culicinae appartengono 26 generi fra i quali *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Culex* e *Culiseta* (Harbarch, 2007; Reinert, 2001).

Negli adulti, le Anophelinae hanno palpi lunghi in entrambi i sessi e a riposo mantengono il loro corpo inclinato rispetto alla superficie di appoggio; le Culicinae invece le femmine hanno palpi molto corti e a riposo mantengono il corpo parallelo alla superficie (Fig. 4).

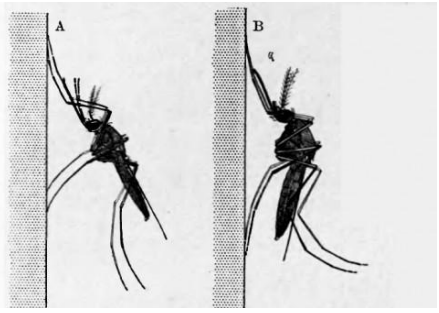

Fig. 4: Differenza tra Anophelinae e Culicinae a riposo.
A: *Anopheles maculipennis*, femmina.
B: *Culex pipiens* , femmina.
(Foto: British Museum, Public Domain via Wikimedia Commons. http://jerileewei.hubpages.com/hub/Mosquitoes-and-Flies)

Le zanzare sono insetti di piccole dimensioni, dai 3 mm a poco più di 1 cm, con il corpo diviso in tre parti (capo, torace, addome), con zampe lunghe, sono ricoperte di scaglie sul corpo e sulle ali e possiedono un apparato buccale molto allungato (Fig. 5) (Robinson, 2005; Chinery, 2004).

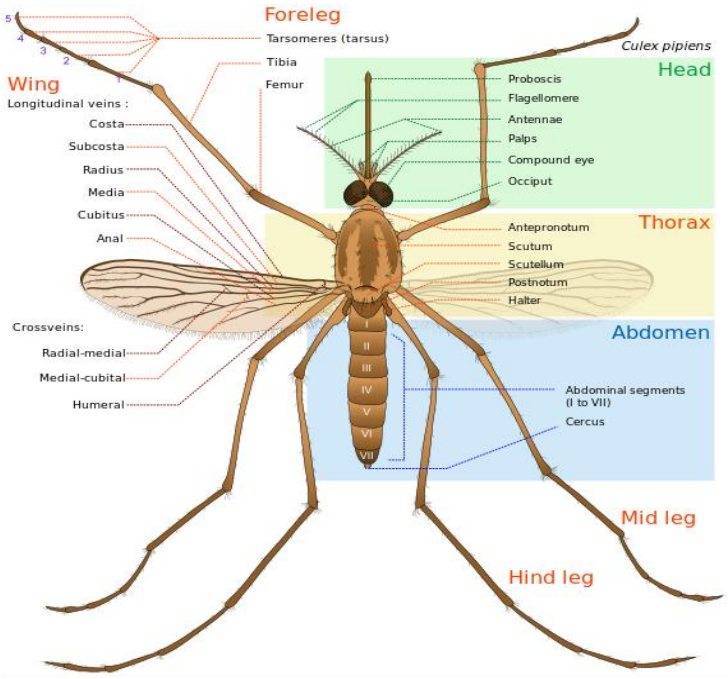

Fig. 5: Anatomia generale di una zanzara adulta femmina. (Mariana Ruiz Villarreal LadyofHats. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Culex_pipiens_diagram_en.svg)

Sul capo sono presenti l'apparato buccale, pungente-succhiante nelle femmine e lambente-succhiante nei maschi, gli occhi composti ed un paio di antenne, molto piumose nei maschi e con poche setole nelle femmine; un altro dimorfismo sessuale è a carico dei palpi mascellari, che sono piumati nel maschio e poco pelosi nelle femmine. Sul torace, diviso in tre segmenti (pro-, meso- e metatorace),

sono attaccate le ali e le tre paia di zampe. Le ali, ricoperte di scaglie, sono strette e lunghe e solo le anteriori sono sviluppate per il volo, mentre le posteriori sono ridotte a bilancieri. Sulle ali sono presenti nervature utili per l'identificazione. Le tre paia di zampe sono sottili e lunghe, con i tarsi divisi in 5 segmenti. L'addome, ricoperto da grosse scaglie, è formato da 10 segmenti di cui gli ultimi 2 sono incastrati dentro l'ottavo; l'ultimo segmento porta due cerci nella femmina e l'apparato copulatore nel maschio.

Il ciclo vitale dei Culicidi è caratterizzato da una fase acquatica in cui si distinguono uova, 4 stadi larvali, uno stadio di pupa ed una fase terrestre ed aerea tipica della forma adulta (Fig. 6) (Becker, 1989b). Il ciclo può essere, secondo la specie e l'ambiente, univoltino o multivoltino (una o più generazioni l'anno). In questo secondo caso il numero di generazioni può variare notevolmente: nelle comuni zanzare notturne, come ad esempio *Cx. pipiens*, si possono avere 15 generazioni l'anno (Vinogradova, 2000). Negli ambienti tropicali, l'avvicendamento delle generazioni è continuo mentre nelle regioni temperate si osserva una fase di svernamento rappresentata, secondo la specie, da differenti stati di sviluppo; ad esempio le *Aedes* svernano per la maggior parte allo stadio di uovo, *Culiseta* allo stadio di larva, *Culex* e *Anopheles* allo stadio di adulto. In generale la durata del ciclo biologico varia da pochi giorni ad alcuni mesi ed è subordinata alle condizioni climatiche, soprattutto di temperatura, alimentari e all'eventuale attraversamento di una fase di quiescenza invernale (Crans, 2004). Ogni femmina depone ogni 2-5 giorni da poche decine a qualche centinaio di uova; queste sono di colore bianco appena deposte ma scuriscono rapidamente, sono lunghe circa 1 mm e di forma allungata. Possono essere deposte direttamente sulla superficie dell'acqua (tutti i generi ad esclusione di *Aedes*), riunite in formazioni galleggianti a "zattera" (Fig. 7) contenenti dalle 100 alle 400 uova (*Culex*), che schiudono in pochi giorni, oppure isolate sulla superficie umida del terreno attorno alle raccolte d'acqua

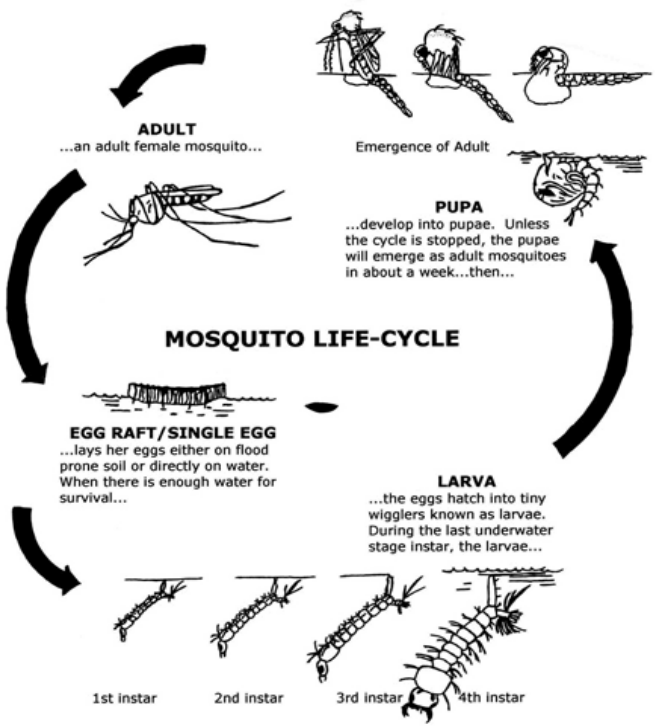

Fig.6: Ciclo vitale dei Culicidi.
(http://www.wumcd.org/mosquito/lifecycle.html)

(*Aedes/Ochlerotatus)* (Fig. 8). Quest'ultime resistono per mesi all'essiccamento e schiudono non appena vengono sommerse (Romi *et al*., 1997).

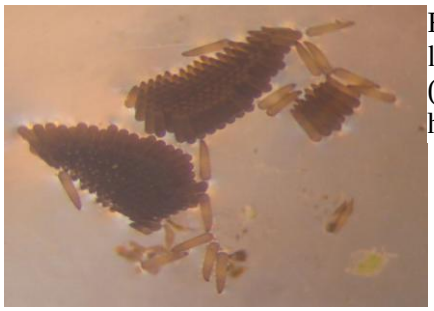

Fig. 7 (a sinistra): Uova di *Culex*, con la tipica disposizione a 'zattera'. (Foto: Steffen Dietzel, http://it.wikipedia.org/wiki/File:Gele

Fig. 8 (a destra): Uova di *Ae. albopictus.* (Foto F. Montarsi)

Un aspetto interessante associato all'ovideposizione è l'esistenza di relazioni chemiotropiche fra adulti e uova o fra adulti e larve, probabilmente finalizzato a ottimizzare le condizioni di sopravvivenza della specie. Le larve e talvolta le uova (es. *Cx. pipiens*) emettono feromoni aggreganti che attirano le femmine feconde e le inducono a deporre altre uova (Vinogradova, 2000; Clements, 1999).

La fase larvale comprende quattro stadi di sviluppo; al quarto ed ultimo stadio esse sono lunghe fino a poco più di un centimetro. Le larve sono apode, di forma cilindrica e allungata, con un corpo diviso in capo (dotato di antenne), torace e addome diviso in 9 segmenti; si muovono molto velocemente in acqua e respirano l'ossigeno atmosferico tramite un sifone presente sull'VIII segmento (Culicinae) oppure attraverso due aperture (Anophelinae) (Fig. 9). A queste fanno eccezione le larve di Coquilettidia, che ottengono l'ossigeno dai tessuti degli alberi. Sul sifone si trovano due strutture dentate, il pettine e la striglia, che nella larva di IV stadio sono utilizzate per il riconoscimento (Romi *et al*., 1997). Si nutrono di corpuscoli organici presenti in acqua attraverso dei filtri boccali, mentre altre sono predatrici di larve di altri insetti (Harbarch, 2007). Le larve si possono trovare in una vasta gamma di ambienti acquatici sia di acqua salata che di acqua dolce, corpi idrici superficiali come stagni, pozzanghere, ruscelli, cavi di alberi e rocce ed habitat artificiali come tombini e copertoni usati (Harbarch, 2007).

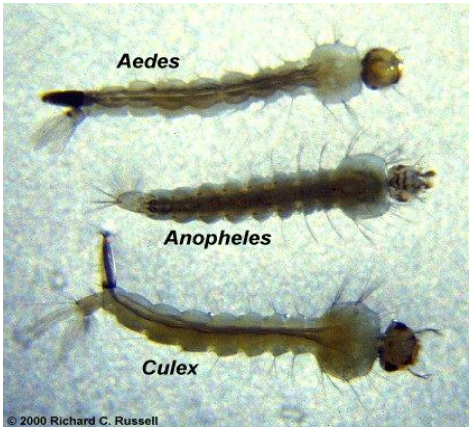

Fig. 9: Larve di diverse specie di zanzara a confronto. (http://medent.usyd.edu.au/arbovirus/mosquit/photos/various_larvae.jpg)

La durata del ciclo larvale varia in base alla specie, alla temperatura e alla disponibilità di cibo: *Cx. pipiens* completa il ciclo preimmaginale in circa 10 giorni a 28 ºC, altre specie riescono a vivere a

temperature molto più basse e lo sviluppo è favorito dalla presenza di un alto carico organico (Romi *et al*., 1997).

La pupa (Fig. 10) ha aspetto rotondeggiante, sulla parte dorsale si notano due "trombette" respiratorie mobili e sul torace sono presenti gli abbozzi delle ali. Salgono in superficie solo per respirare (escluse quelle del genere *Coquillettidia*) e non si nutrono. Lo stadio di pupa dura pochi giorni (Chinery, 2004; Romi *et al*., 1997).

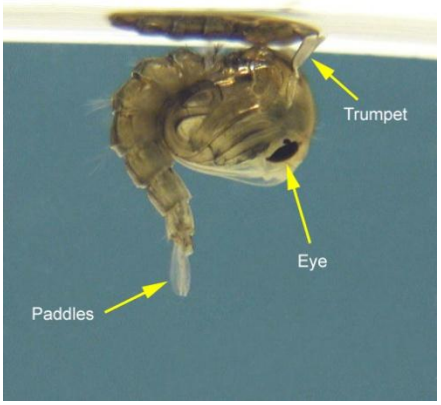

Fig. 10: Pupa. (http://fmel.ifas.ufl.edu/key/anatomy/pupal.shtml)

Lo sfarfallamento dei maschi precede di 24 ore quello delle femmine; lo scopo biologico è quello di preparare il maschio all'accoppiamento in quanto in tale intervallo temporale si svolge la torsione di 180° dell'ipopigio. Nei primi 1-2 giorni, gli adulti manifestano una sostanziale inattività, poi iniziano ad alimentarsi di sostanze zuccherine; questa fase della nutrizione è essenziale per l'acquisizione dell'energia necessaria per l'attività di volo, fondamentale per la riproduzione (Clements, 1963). La durata di vita degli adulti è variabile ma caratterizzata da una maggiore longevità delle femmine. In genere i maschi hanno una vita di 10-15 giorni, mentre le femmine vivono per un periodo variabile da un mese (nelle generazioni estive) a 4-5 mesi (nel caso di femmine svernanti).

Gli adulti si nutrono di sostanze zuccherine vegetali, ma le femmine necessitano di un pasto di sangue per poter maturare le uova e per questo motivo pungono diverse specie di animali compreso l'uomo. Dopo il pasto di sangue restano a riposo alcune ore per la digestione, in ambienti chiusi (zanzare endofile) o in ambienti aperti nascosti dalla vegetazione (zanzare esofile) (Harbach, 2007; Clements, 1992).

Nei Culicidi l'attrazione dell'ospite è principalmente chemiotropica e basata sull'emissione di cairomoni, con il concorso di altri fattori di natura fisica, associati alla percezione del calore e dei colori. I meccanismi con cui la zanzara rileva la presenza dell'ospite umano sono alquanto complessi e tuttora oggetto di studio. Nella specie umana, il cairomone principale è rappresentato dall' acido lattico prodotto dall'attività muscolare, più l'azione sinergica da parte dell'anidride carbonica e del vapore acqueo emessi con la respirazione. Un'azione attrattiva accessoria è svolta da sostanze volatili presenti nel sudore e nel sebo. Studi più recenti ipotizzano una possibile azione attrattiva anche da parte di sostanze prodotte dalla microflora fisiologicamente presente sulla cute. È stato inoltre riscontrato che le zanzare rilasciano, sull'ospite, feromoni di aggregazione che hanno effetto di attrazione su altre femmine (Sutcliffe, 1987).

Il comportamento delle zanzare è molto diversificato a seconda delle specie: alcune sono attive al crepuscolo o di notte (*Cx. pipiens*), altre di giorno (*Ae. albopictus*). Tra le zanzare che si sviluppano in acqua dolce, alcune la preferiscono limpida (*Cx. modestus*) mentre altre fortemente inquinata (*Cx. pipiens*); altre specie accettano vari gradi di salinità (*Ochlerotatus caspius*), passando dal salmastro fino al fortemente salato (*Oc. mariae*). I maschi si spostano molto poco dai loro focolai di origine, mentre per le femmine la distanza varia in base alla specie.

1.4. La specie in studio: *Aedes koreicus*

Aedes koreicus o Zanzara coreana (Fig. 11) è una zanzara presente in Corea, Giappone, Cina e Russia orientale introdotta accidentalmente in Europa. È stata segnalata per la prima volta in Belgio nel 2008 e successivamente in Italia nel 2011 (Capelli *et al.* ,2011). Mentre in Belgio è rimasta confinata entro pochi chilometri dalla zona d'introduzione (Versteirt *et al.*, 2012b) in Italia si è diffusa rapidamente ed è attualmente presente in quattro province (Belluno, Trento, Treviso e Vicenza) del Nord-Est Italia (Montarsi *et al.*, 2013a). Data la sua ampia diffusione, non è stato possibile tracciare la sua via d'introduzione anche se si ipotizza che sia stata introdotta con il commercio di piante ornamentali (Montarsi *et al.*, 2013a). Non sono disponibili molte informazioni relative alla biologia ed all'attività di questa specie.

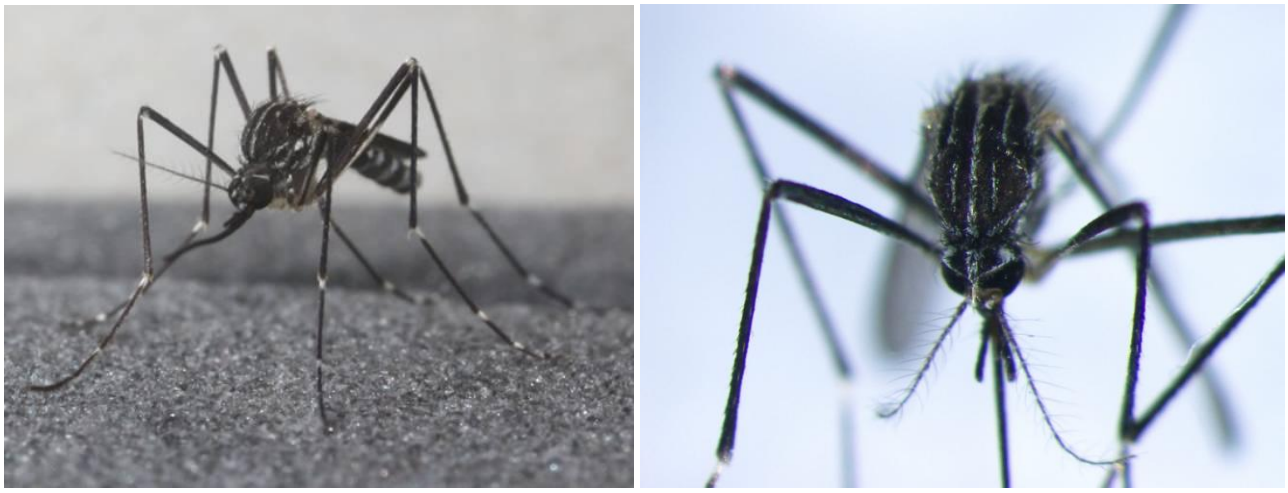

Fig. 11: Adulto (a sinistra) e particolare del mesonoto (a destra) di *Ae. koreicus*. (Foto: A. Drago (adulto) e F. Montarsi (mesonoto))

È riportato che si alimenta su uomo ed animali domestici e sembra essere ben adattata all'ambiente urbano (Tanaka *et al.*, 1979). Le larve si sviluppano in ogni tipo di contenitore artificiale prossimo alle abitazioni, ed anche in raccolte d'acqua su rocce o nei buchi degli alberi. Come altre specie del genere *Aedes*, la zanzara coreana sverna allo stadio di uovo e la schiusa delle uova avviene in primavera con lo scioglimento delle nevi (Knight, 1947; Myiagi, 1971). *Aedes koreicus* sembra essere più tollerante ad un clima freddo rispetto ad *Ae. albopictus* e ciò rende questa specie capace di sopravvivere e stabilizzarsi in zone montane-pedemontane quali le zone delle Prealpi (Capelli *et al.*, 2011). *Aedes koreicus* è considerata un potenziale vettore di Arbovirus (Medlock *et al*., 2012) ebbene le evidenze pubblicate riguardo il suo stato di vettore siano molto scarse. Studi di laboratorio dimostrano che può trasmettere il virus dell'encefalite giapponese (Takashima & Rosen, 1989), non presente in Europa, e *Dirofilaria immitis*, agente eziologico della filariosi canina (Feng, 1930; Myiagi, 1971).

2. Scopo del lavoro

Dopo la prima segnalazione della presenza di *Ae. koreicus* in Italia sono stati compiuti i primi studi riguardanti la distribuzione la caratterizzazione dell'habitat di questa specie (Montarsi *et al.*, 2013a). Nonostante la sua stretta relazione con *Aedes japonicus* Theobald, sono disponibili solo poche informazioni riguardo la sua biologia e tra l'altro riferite alla specie nel paese d'origine (Sud-Est Asiatico). Uno degli aspetti più importanti della biologia che deve essere chiarito è quale sia il suo ospite preferito. Indagare sulle preferenze d'ospite delle zanzare e sul loro potenziale comportamento antropofilo è fondamentale per valutare il rischio di trasmissione di malattie trasmesse da vettore sia in campo animale che umano (Takken & Verhulst, 2013). Lo scopo di questo studio è quello di accertare le preferenze alimentari e lo spettro d'ospite di *Ae. koreicus* in laboratorio e in campo. Questi studi preliminari costituiscono la base per futuri studi di competenza vettoriale, sia per importanti parassiti di interesse prettamente veterinario come *D. immitis*, sia per virus causa di malattie umane come Chikungunya, Dengue and West Nile Disease.

3. Materiali e metodi

3.1. Modalità di campionamento di zanzare replete

La raccolta di zanzare si è svolta da Giugno a Settembre 2013 nella province di Belluno e Treviso nelle località riportate in tabella 2.

Come punti di campionamento sono stati scelti diversi siti di riposo (vegetazione, muri, tombini, contenitori d'acqua piovana,) collocati in cimiteri, vivai, zone industriali, spazi verdi pubblici e privati già risultati positivi per *Ae. koreicus* in precedenti monitoraggi (Montarsi *et al.*, 2013a).

Tab. 2: Comuni e località di campionamento.

Comune (Prov.)	Località
Belluno	
Belluno	Castion
Belluno	Cusighe
Limana (BL)	
Longarone (BL)	Pirago-Muda
Mel (BL)	Bardies
Ponte nelle alpi (BL)	Polpet
Quero (BL)	
Santa Giustina(BL)	
Soverzene (BL)	
Follina (TV)	Valmareno
Miane (TV)	

Le zanzare sono state campionate con diverse modalità: per aspirazione diretta, con trappole a colla (sticky traps) e con trappole ad attrattivo (BG-sentinel).

Per le aspirazioni sono stati utilizzati due tipi di aspiratori: un aspiratore manuale in vendita on-line in un sito specializzato (www.bioquip.com) chiamato Handheld (Fig.12) ed un aspiratore di dimensioni maggiori "homemade" (Fig. 13).

L'aspiratore Handheld, prodotto da Hausherr's Machine Works, Toms River, NJ è costituito da una ventola aspiratrice, una ''cannuccia'' di transito ed un contenitore di raccolta. L'aspiratore è alimentato da batterie. La ventola aspira le zanzare che finiscono nel contenitore di raccolta. L'estremità esterna della cannuccia veniva ogni volta richiusa con un tappo in cotone per evitare la fuoriuscita delle zanzare. Le zanzare raccolte con l'aspiratore Handheld sono state anestetizzate inserendole in un contenitore con ghiacchio secco (CO_2), trasferite poi in provette tipo Falcon® e conservate refrigerate durante il trasporto.

L'aspiratore homemade (Fig. 13a) è costituito da un aspirapolvere modificato alimentato da una batteria da 12 V e 7 Ah. Le zanzare che venivano aspirate rimanevano confinate in una retina, costituita da un tessuto di rete morbida a maglia stretta chiudibile con un elastico (Fig. 13b), interposta prima del motore aspirante (Fig. 13c).

Le zanzare raccolte e contenute nel sacchetto sono state conservate con le stesse modalità descritte

Fig. 12: Aspiratore manuale Handheld.

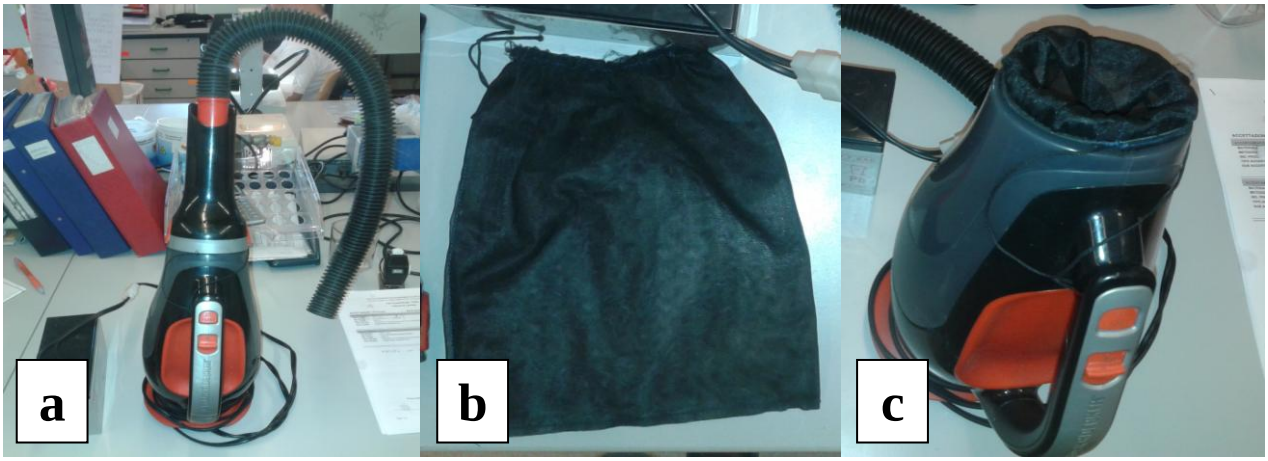

Fig. 13: Aspiratore homemade. a) aspiratore montato; b) sacchetto di cattura; c) vano di raccolta campione.

per quelle catturate con l'altro tipo di aspiratore. L'aspirazione veniva effettuata sui potenziali siti di riposo delle zanzare come all'interno dei tombini o tra la vegetazione (Fig. 14).

Fig. 14: Aspirazione in campo di zanzare fed in tipici siti di resting. A sinitra: in tombini ; a destra: tra la vegetazione .

Le trappole sticky sono costituite da un vaso di piccole dimensioni (13 x 9 cm), da un coperchio e da 2 setti disposti perpendicolarmente tra loro cosi da formare 8 superfici (Fig. 15a). Il vaso veniva parzialmente riempito d'acqua e aderenti alle superfici sono stati collocati dei fogli cosparsi di colla (Fig. 15b). In questo modo vengono catturate le zanzare che, dopo essersi alimentate, cercano un sito di riposo in cui sia disponibile anche dell'acqua per deporre. Quindi le zanzare che hanno effettuato un pasto di sangue e che si sono posate sulle superfici perpendicolari delle sticky rimanevano incollate (Fig. 15c). Il coperchio evita che la pioggia riempia completamente la trappola.

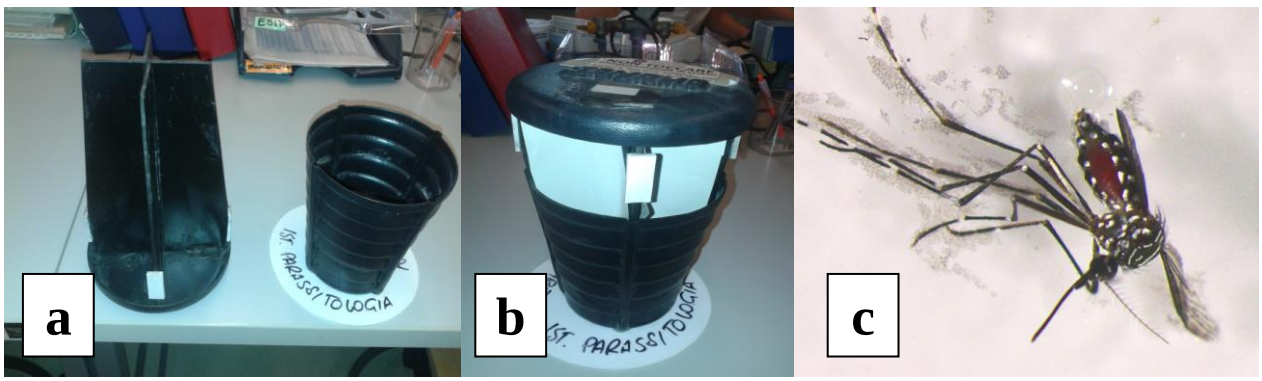

Fig. 15: Sticky trap. a) parti che compongono la trappola; b) fogli adesivi nella trappola; c) zanzara (*Ae. koreicus*) sul foglio adesivo.

Il secondo tipo di trappola impiegato è la BG-sentinel. Consiste in un sistema di attrazione per le zanzare ed un aspiratore. Le zanzare vengono attratte da un contenitore di ghiaccio secco che rilascia CO_2 (Fig. 16a) e da un attrattivo odoroso, da collocare all'interno della trappola, che contiene una combinazione brevettata di sostanze odorose che vengono emanate dalla pelle umana (acido lattico, ammoniaca ed acidi grassi, in particolare l'acido capronico) (Fig. 16b). Una volta attratte, le zanzare vengono aspirate e convogliate in un contenitore di rete a maglia stretta (Fig. 16c) uguale a quello descritto con il primo sistema di aspirazione.

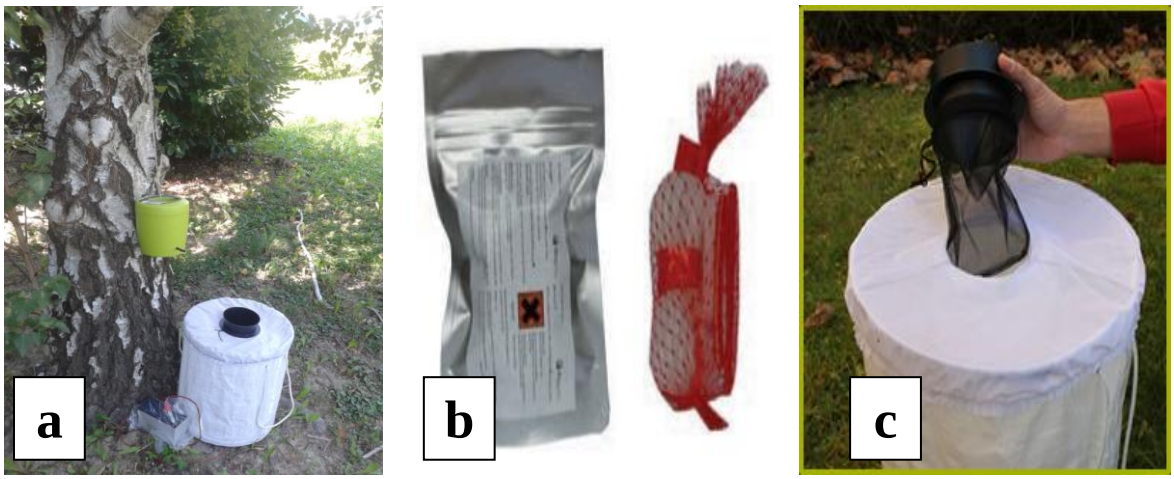

Fig. 16: BG Sentinel. a) trappola completa in funzione; b) attrattivo odoroso; c) retina di raccolta del campione.

Tutti i campioni sono stati trasportati refrigerati al laboratorio. Dopo l'identificazione morfologica degli esemplari (Montarsi *et al*., 2013; Tanaka *et al.*, 1979; Versteirt *et al*., 2012a), le femmine adulte di *Ae. koreicus* che avevano effettuato un pasto di sangue o che dubbie sono state stoccate individualmente in provette eppendorf® a -20° C, ciascuna con i propri dati di riferimento (data, luogo, sito, modalità di campionamento e operatore). Tutti i campioni sono stati testati con metodiche diagnostiche molecolari per la determinazione del tipo di sangue; la metodica verrà descritto in seguito.

3.2. Alimentazione di *Aedes koreicus* in condizioni sperimentali

Tutti gli stadi larvali di *Ae. koreicus* sono stati allevati in laboratorio ad una temperatura di 25 ± 1° C ed ad una umidità relativa di 65 ± 5%, con un ciclo luce-buio di 16-8 ore, senza periodi crepuscolari (Williges *et* al, 2008). Le zanzare sono state alimentate artificialmente con l'utilizzo del sistema Hemotek (Discovery Workshops, Lancashire, United Kingdom) (Cosgrove et al. 1994). Lo strumento consiste in cinque diverse camere riscaldate (piatti di alluminio concavi) da 3.7 cm di diametro che venivano coperti da una membrana consistente in budello (usato comunemente per produrre salsicce) (Fig. 17a) e riempite con sangue (Fig. 17b) mantenuto ad una temperatura costante di 38 ± 0.5 °C da un sistema di riscaldamento elettrico (Fig. 17c). Le singole unità di alimentazione dell'Hemotek sono state riempite ad ogni prova con sangue di diverse specie animali e lasciate in ogni gabbia per trenta minuti. Ad ogni prova è stato annotato il numero delle zanzare che si sono appoggiate sulla membrana senza compiere il pasto si sangue ed il numero di quelle che invece si sono alimentate (Fig. 17d).

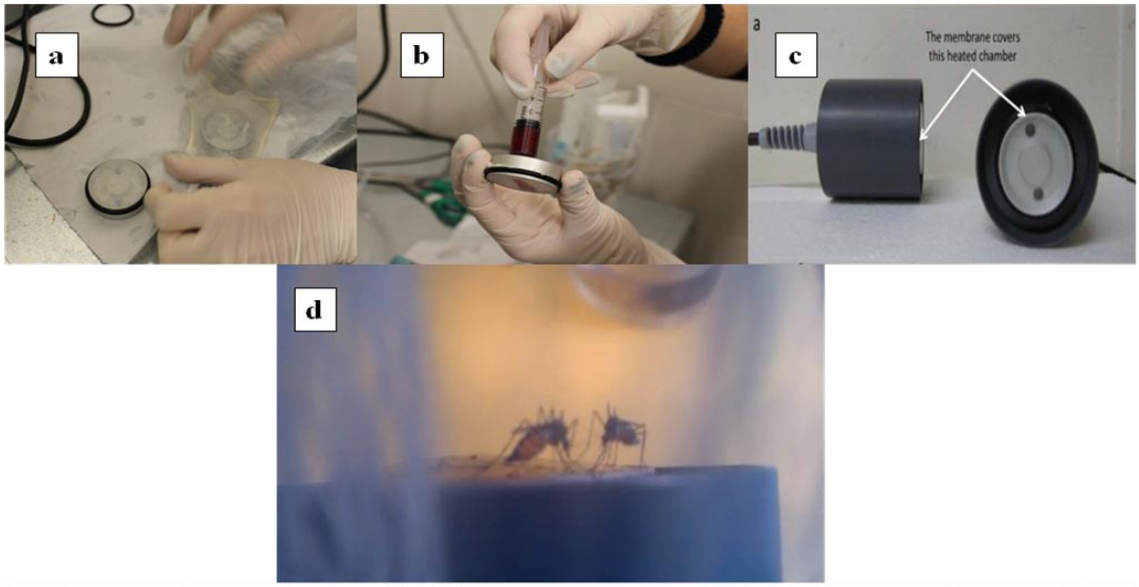

Fig. 17: Alimentazione artificiale con Hemotek.. a) posizionamento del budello; b) riempimento della camera con sangue; c) camera di alimentazione; d) due adulti mentre si alimentano.

I tipi di sangue utilizzati sono stati: uomo, pollo, tacchino, pecora (montone). È stato anche utilizzato sangue con diversi tipi di anticoagulante (soluzione di Alsever in sospensione 50% v/v, EDTA e Citrato di Sodio 9NC 3,8%9) e sangue defibrinato per valutare l'eventuale effetto dell'anticoagulante sulla vitalità delle zanzare. Sono state testate colonie di *Ae. koreicus* della stessa generazione, con diverse densità e con diverso rapporto maschi:femmine.

Alcune colonie sono state alimentate tramite il sistema di alimentazione con membrana artificiale sia fornendo un solo tipo di sangue per volta che in combinazione di due tipi diversi contemporaneamente (Fig. 18) per valutare l'effettiva preferenza avendo a disposizione più di una scelta.

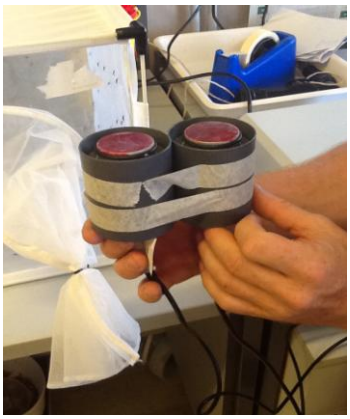

Fig. 18: Alimentazione artificiale con due tipi di sangue in contemporanea.

3.3. Analisi molecolari dei pasti di sangue

Tutte le zanzare ingorgate catturate durante il monitoraggio sono state analizzate singolarmente mediante PCR convenzionale seguendo il protocollo di Alcaide *et al*., (2009). I campioni positivi per il pasto di sangue sono stati sequenziati e le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle depositate in GeneBank e nel database Barcode of Life Data Systems (BOLD) (www.barcodinglife.org).

3.3.1. Preparazione del campione

Ogni zanzara è stata posta in una piastra Petri sterile e l'addome è stato separato con l'ausilio di pinzette e bisturi sterili. L'addome isolato è stato posto in provetta sterile da 2 mL e sono stati aggiunti 150 µL di un tampone fosfato salino, PBS (Phosphate buffered saline) e una biglia da 3 mm di tungsteno (Tungsten Carbide Beads, 3 mm, Qiagen) (Fig. 19). Si è proceduto con l'omogeneizzazione con l'ausilio dello strumento Tissue Lyser II (Qiagen) (Fig. 20) impostato a 25 Hz per 30 secondi. L'omogenato è stato trasferito in una provetta da 1,5 mL sterile per procedere con l'estrazione del DNA.

Fig. 19: Piastra Petri con biglie di tungsteno da 3mm (Qiagen).

Fig. 20: TissueLyser II (Qiagen).

3.3.2. Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata con il kit DNeasy® Blood and Tissue (Quiagen) seguendo il protocollo di estrazione per i tessuti animali (Purification of Total DNA from Animal Tissues, Spin – Column Protocol).

3.3.3. Amplificazione del DNA

Per l'amplificazione del DNA è stato utilizzato il protocollo di Alcaide *et al*. (2009), modificato in seguito ai risultati ottenuti dalle prove preliminari che sono state eseguite per testare la metodica e i primer. Il kit utilizzato per l'amplificazione del DNA è l'AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystem). In ogni PCR è inserito un controllo positivo di amplificazione (C+), costituito da DNA estratto da sangue di gallo (*Gallus gallus*). Sono stati inseriti anche un controllo negativo di estrazione (Be) e un controllo negativo di PCR (B) per valutare che in fase di estrazione e di amplificazione non ci fossero problemi di contaminazione. Per la reazione di amplificazione è stato utilizzato un termociclatore Veriti® (Applied Biosystems) (Fig. 21).

Il protocollo è costituito da una PCR convenzionale che amplifica un segmento di 758 bp (paia di basi) del gene che codifica la subunità 1 della citocromo ossidasi c mitocondriale dei vertebrati (COI-gene).

I primer utilizzati sono riportati in tabella 3.

Fig. 21: Termociclatore Veriti® utilizzato per l'amplificazione del DNA (Applied Biosystems).

Tab. 3 : Primer utilizzati per la prima PCR.

M13BC-FW 5': **TGT AAA ACG ACG GCC AGT HAA YCA YAA RGA YAT YGG** - 3'
BCV-RV1 5'- **GCY CAN ACY ATN CCY ATR TA** 3'

In tabella 4 sono riportati le concentrazioni dei reagenti e il ciclo di amplificazione della prima PCR.

Tab. 4: Concentrazioni dei reagenti e ciclo di amplificazione della prima PCR.

Reagente	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per campione	Ciclo di amplificazione
H_2O DEPC			29.1	
DMSO			2.5	
Buffer	10x	1x	5	
$MgCl_2$	25mM	2.5mM	5	
dNTPs	10mM	0.2mM	1	
Primer BCFW-M13 1 :10	10µM	0.2µM	1	95° PER 10 minuti
Primer BCRV1 1 :10	10µM	0.2µM	1	94° PER 40 secondi 45° PER 40 secondi 72° PER 1 minuto } 40 cicli
Taq Gold	5U/µl	2U	0,4	
Volume totale mix			45 µl	72° PER 7 minuti
DNA			5	8° PER ∞

Nel caso in cui sia presente una banda all'altezza attesa nella prima PCR è possibile sequenziare direttamente l'amplificato; in caso di negatività si procede con una seconda PCR, (nested touchdown). I primer utilizzati per la seconda PCR sono riportati in tabella 5 mentre le concentrazioni dei reagenti e il ciclo di amplificazione sono riportati rispettivamente in tabella 6 e 7.

Tab.5: Primer utilizzati per la seconda PCR

M13 5' **GTA AAA CGA CGG CCA GTG**
BCV-RV2 5'- **ACY ATN CCY ATR TAN CCR AAN GG**

Tab. 6: Concentrazioni dei reagenti della seconda PCR.

Reagente	Conc. Iniziale	Conc. Finale	µl per campione
H_2O DEPC			32.1
DMSO			2.5
Buffer	10x	1x	5
$MgCl_2$	25mM	2.0 mM	4
dNTPs	10mM	0.2 mM	1
Primer M13 1:10	10µM	0.4 µM	2
Primer BCRV2 1:10	10µM	0.4 µM	2
Taq Gold	5U/µl	2U	0,4
Volume totale mix			49 µl
DNA			1 µl

Tab. 7: Ciclo di amplificazione della seconda PCR

Ciclo di amplificazione della nested PCR touchdown
95° per 10 minuti
94° per 40 secondi Da 60° a 45° per 40 secondi (touchdown con 1° in meno ogni ciclo) } 16 cicli 72° per 1 minuto
94 per 40 secondi 45° per 40 secondi } 30 cicli 72° per 1 minuto
72° PER 7 minuti
8° PER∞
Banda attesa di circa 730 bp

Diversamente dalla prima PCR nel protocollo 'touchdown' ad ogni ciclo si abbassa la T° di annealing dei primer. In questo caso si abbassa la t° da 60° a 45° diminuendola di un grado ad ogni ciclo; in questo modo è possibile aumentare la specificità dei primer nei confronti del DNA target in quanto questo potrebbe essere più o meno digerito.

3.3.4. Rilevazione dei prodotti di amplificazione

I prodotti di amplificazione sono stati caricati in gel di poliacrilammide al 7% [(5 ml di acrilammide al 40% (BIO-RAD), 20 µl di APS (BIO-RAD) e 10 µl di Temed (tetrametiletilendiammina) (Sigma)]. La corsa elettroforetica è stata effettuata a 200 V per 50 minuti in TBE 1X (BIO-RAD) e visualizzati con la colorazione con nitrato d'argento.

Per la valutazione delle dimensioni del prodotto di amplificazione è stato utilizzato un marker a 100 bp (EZ Load™ 100 bp molecular Rouler, BIO-RAD). Un campione viene considerato positivo se ha una banda all'altezza del C+, negativo in assenza di bande (Fig. 22).

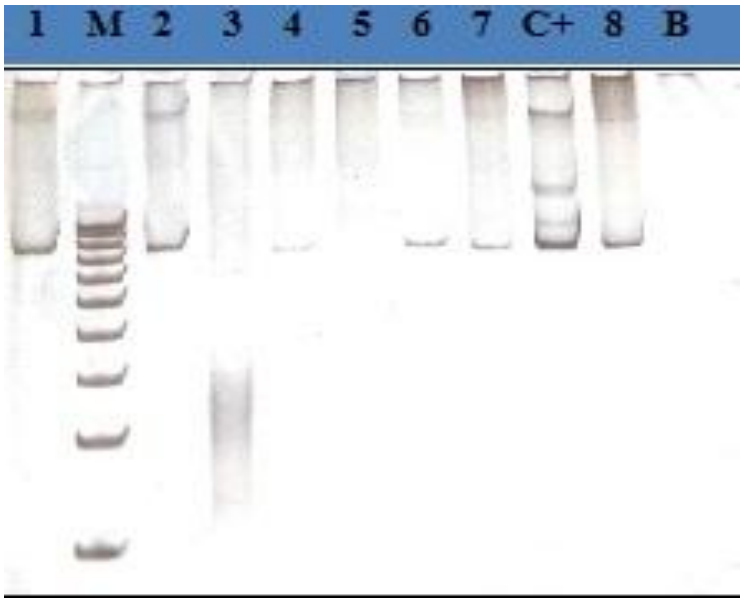

Fig. 22: Gel di poliacrilammide al 7% di alcuni campioni positivi per il pasto di sangue.

3.3.5. Sequenziamento

I campioni risultati positivi alle pcr sono stati inviati al Laboratorio Ricerca e Sviluppo dell'IZSve per il sequenziamento.

L'analisi di omologia è stata effettuata confrontando le sequenze ottenute con quelle depositate nella banca dati GenBank (Blast del NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e nel database Barcode of Life Data Systems (BOLD) (www.barcodinglife.org). Tutte le sequenze sono state inoltre allineate con il software Mega 4.0 per confrontarle con le sequenze di riferimento depositate (Fig. 23).

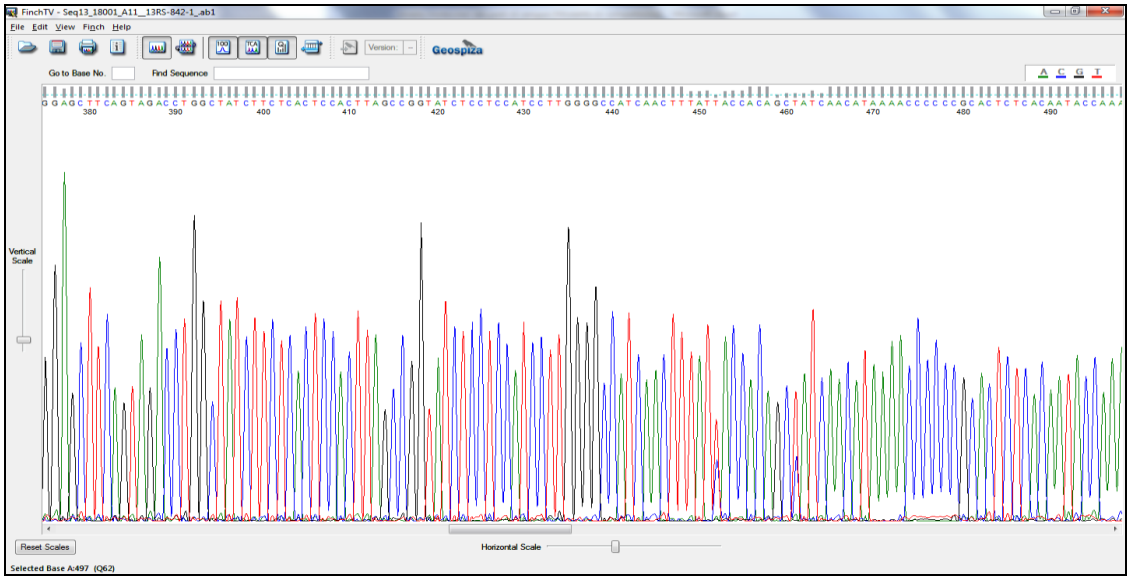

Fig. 23: Elettroferogramma di una sequenza visualizzata con il programma FinchTV 1.4.0, (Geospiza).

4. Risultati

4.1. Campionamento e preferenze alimentari di *Aedes koreicus*

In campo sono state raccolte in totale 239 zanzare adulte femmine, di cui 234 tramite aspirazione, 4 con trappola BG-sentinel ed una con trappola sticky. I siti di campionamento ed i dettagli sulle modalità di cattura sono riportati nella tabella 8.

Tab. 8: Siti di campionamento, tipi di ambienti, modalità di campionamento e zanzare catturate.

Provincia	Comune	Frazione	Sito	Sito di cattura	Codice sito	Sedute di cattura	Tipo di cattura	Range temperatura (°C)	Range umidità relativa (%)	*Ae. koreicus* femmine catturate
Belluno	Belluno		Vivaio	Tombini, vegetazione, anfratti	BL01	3	Aspirazione	26-37	36-57	28
Belluno	Belluno		Spazio verde privato		BL02	2	Aspirazione, BG sentinel	25-36	34-63	5
Belluno	Belluno	Castion	Strada pubblica	Tombini	BL03	1	Aspirazione	n.p.	n.p.	1
Belluno	Belluno	Cusighe	Cimitero	Tombini, vegetazione, anfratti	BL04	6	Aspirazione, sticky trap	15,6-34	41-58	111
Belluno	Limana		Cimitero	Tombini, vegetazione, anfratti	BL05	4	Aspirazione	24-33	39-57	35
Belluno	Longarone	Pirago-Muda	Cimitero	Tombini, vegetazione, anfratti	BL06	3	Aspirazione	13,3-33	38-66	8
Belluno	Mel	Bardies	Spazio verde privato	contenitori vegetazione, anfratti	BL07	1	Aspirazione	34	36	2
Belluno	Ponte nelle alpi	Polpet	Piazza pubblica	Tombini, vegetazione, contenitori	BL08	3	Aspirazione	18-33	31-67	37
Belluno	Quero		Cimitero	Tombini, vegetazione, anfratti	BL09	3	Aspirazione	25-33	31-52	7
Belluno	Santa Giustina		Piazza pubblica		BL10	1	BG sentinel	n.p.	n.p.	2
Belluno	Soverzene		Piazza pubblica	Tombini, vegetazione, contenitori	BL11	1	aspirazione	31,7	49	1
Treviso	Follina	Valmareno	Cimitero	Tombini, vegetazione, anfratti	TV01	1	Aspirazione	23,5	69	1
Treviso	Miane		Cimitero	Tombini, vegetazione, anfratti	TV02	1	Aspirazione	32	31	1

In 25 su 239 campioni (10,4%) è stato possibile amplificare con PCR la sequenza target (Tab. 4). Il sequenziamento dei prodotti della PCR ha identificato sangue umano (*Homo sapiens)* in 23 campioni positivi (92,0%), sangue di cane (*Canis lupus*) e sangue bovino (*Bos taurus)* in un campione positivo ciascuno (4,0%).

Dei 23 campioni positivi per sangue umano, 15 (65,2%) sono state raccolti in cimiteri, 4 (17,4%) provengono da una piazza pubblica, 2 (8,7%) da uno spazio verde privato in una zona residenziale e 2 (8,7%) da un vivaio. La maggioranza delle zanzare sono state raccolte in cimiteri, e di queste l'86,7% (13/15) sono state raccolte nel cimitero di Cusighe (BL), sito che ha fornito la maggior parte degli esemplari utilizzati nel lavoro (13/23) (Tab. 9).

Il campione risultato positivo per sangue di cane è stato raccolto nella piazza antistante la stazione di Santa Giustina (sito BL10), mentre quello appartenente a bovino (*Bos taurus*) è stato raccolto in un vivaio (sito BL01).

Tab. 9: Zanzare catturate e zanzare analizzate in ciascun sito.

Codice sito	*Ae. koreicus* catturate	*Ae. koreicus* analizzate
BL01	28	3
BL02	5	0
BL03	1	0
BL04	111	13
BL05	35	1
BL06	8	1
BL07	2	2
BL08	37	3
BL09	7	0
BL10	2	2
BL11	1	0
TV01	1	0
TV02	1	0

4.2. Preferenze alimentari di *Aedes koreicus* in condizioni sperimentali

I risultati di laboratorio hanno mostrato che *Ae. koreicus* è in grado di alimentarsi su diversi ospiti, incluso l'uomo. Il sistema di alimentazione Hemotek si è rivelato essere un valido strumento per l'alimentazione artificiale delle zanzare e per mantenere le colonie in laboratorio.

Le zanzare si sono alimentate su sangue di pollo, tacchino e pecora, fornito col sistema di alimentazione artificiale, e su sangue umano fornito sia col sistema di alimentazione artificiale sia da persone volontarie. Per quanto riguarda le prove di preferenza fornendo due tipi diversi di sangue contemporaneamente i dati sono riportati nella tabella 10.

Tab. 10: Numero di zanzare che si sono alimentate in prove con due tipi di sangue forniti contemporaneamente.

pollo	tacchino	pollo	pecora	pecora	uomo	uomo	uomo
14	19	8	4	2	13	6	10

In generale, le maggiori percentuali di zanzare replete sono state raggiunte con sangue di uomo (76,5%), e di pollo (65,4%) (Tab. 11). Le femmine replete hanno completato il loro ciclo vitale, depositato uova fertili, indipendentemente dal tipo di sangue e di anticoagulante utilizzato.

Tab. 11: Percentuale di zanzare alimentatesi su sangue di diversi ospiti.

	Gabbia 1	**Gabbia 12**	**Gabbia2**	**Gabbia 3**	**Gabbia 6**	**Gabbia 10**
Sangue di:	dal 23/04/13 al 27/06/13	dal 12/08/13 al 04/09/13	dal 27/05/13 al 05/09/13	Dal 03/06/13 al 04/09/13	dal 10/07/13 al 28/08/13	dal 23/04/13 al 27/06/13
	min-max (%)	min-max (%)	min-max (%)	min-max (%)	min-max (%)	min-max (%)
Uomo (braccio)	4.5-36.4	3.7-17.3	3.3-19.7	3.9-4.9	17.6-76.5	n. t.
Uomo (hemotek)	4.5-31.8	n. t.	19.7-57.4	7.8-15.7	31.4*	n. t.
Pollo (hemotek)	n. t.	38.3-65.4	0	0.98-14.7	17.6*	18.2*
Tacchino (hemotek)	n. t.	n. t.	8.2-8.2	18.6-18.6	n. t.	n. t.
Pecora (hemotek)	4.5-4.5	n. t.	3.3-3.3	0-0	n. t.	9.1*
Totale femmine	22	81	61	102	51	44

n.t .= non testate; * = gabbia in cui uno specifico tipo di sangue è stato testato solo una volta.

5. Conclusioni

Aedes koreicus risulta ormai essersi stabilizzata con successo in vari comuni del Nord-Est italiano (Capelli *et al,* 2011; Montarsi et al, 2013a). Le specie invasive hanno bisogno di tempo per adattarsi ai nuovi ambienti colonizzati e tale processo è divisibile in 3 diverse fasi: arrivo, radicazione (crescita della popolazione) e diffusione (espansione in nuove aree) (Liebhold & Tobin, 2008; Medlock *et al,* 2012). Lo scenario corrente di *Ae. koreicus* in Italia sembra rappresentare la terza fase, caratterizzata da diffusioni occasionali a lunga distanza e formazione di nuove colonie isolate (Liebhold & Tobin, 2008; Kot *et al,* 1996). Purtroppo non è stato possibile determinare la via d'introduzione e l'area da dove è arrivata questa specie proprio perchè al momento del suo ritrovamento risultava ormai presente in un territorio troppo esteso. Basandosi su osservazioni morfologiche, la specie trovata in Italia sembra appartenere ad una varietà presente in un isola della Corea del Sud (Versteirt *et al,* 2012a; 2012b). Il Nord-est Italia tra l'altro, presenta un clima simile a quello della Corea del Sud, che avrebbe favorito il suo insediamento (Montarsi *et al,* 2013a).

Sono disponibili poche informazioni sulla biologia ed il comportamento di *Ae. koreicus* al di fuori del suo ambiente nativo dove colonizza una gran varietà di contesti sia naturali che artificiali. Può tollerare inverni freddi e le prime larve si possono trovare già all'inizio della primavera (Miyagi, 1971). Diversamente da *Ae. albopictus,* il freddo non sembra essere un fattore limitante per l'insediamento e la diffusione di *Ae. koreicus,* estendendo così il rischio di invasione in tutta l'Europa centrale. *Aedes koreicus* è anche ben adattata ad ambienti urbani. I principali siti colonizzati sono vivai, aree urbane (strade, piazze, parcheggi) e giardini privati, dove si riproduce in diversi tipi di contenitori artificiali (Montarsi *et al,* 2013a). *Aedes koreicus* è arrivata in un'area in parte occupata da zanzare indigene, soprattutto *Cx. pipiens, Cx. hortensis, Ae. geniculatus* ed *Ae. albopictus,* ma nella maggior parte dei casi le larve sono state trovate in siti di sviluppo non utilizzati dalle altre specie, dimostrando la tendenza ad occupare preferibilmente nicchie vuote (Williamson, 1996).

Questi dati dimostrano la grande capacità di adattamento di questa specie, con tutte le possibili conseguenze. La prima considerazione che può essere fatta è che una nuova specie di zanzara è attualmente presente in un ampia area montana-pedemontanea che non conosceva il "problema zanzara". Prima di trarre conclusioni dai dati raccolti in questo studio sulla preferenza d'ospite, possiamo ritenere questa specie un problema nuovo per le persone in quanto sicuramente punge l'uomo, come risulta da molte segnalazioni attendibili dei residenti nella provincia di Belluno. Di seguito verrà discusso il suo grado di antropofilia e le implicazioni sanitarie che potrebbero

emergere, ma intanto è evidente che *Ae. Koreicus* è una zanzara molesta che punge l'uomo anche di giorno causando fastidio e disagi in aree che prima non avevano problemi legati alla presenza delle zanzare.

Dai nostri dati di campo risulta che in natura *Ae. koreicus* sembra preferire nettamente l'uomo. È bene però sottolineare il fatto che la maggior parte delle zanzare analizzate nel lavoro (56, 5%) sono state catturate in un solo sito (Belluno, cimitero di Cusighe (sito BL04)). In tale sito, oltre all'ovvia presenza di persone, vi è un'elevata presenza di piccioni ed uccelli selvatici e presumibilmente anche di ungulati selvatici e piccoli mammiferi data la vicinanza del cimitero ad una zona boschiva di discrete dimensioni. Anche gli altri siti di campionamento avevano un'elevata disponibilità di ospiti umani, ma anche una discreta presenza di altri animali. Per esempio nel sito BL07 nonostante le zanzare fossero state catturate in un pollaio, sono risultate positive a sangue umano. Sulla base di queste osservazioni di campo sembra che *Ae. koreicus* prediliga l'uomo come ospite, vista comunque la disponibilità di altri potenziali ospiti nelle zone di raccolta. Tuttavia non è possibile determinare con certezza il reale grado di antropofilia di questa zanzara e dimostrare che tale comportamento non sia piuttosto dovuto ad un'eventuale opportunismo legato all'abbondanza di uomini piuttosto che di altri possibili ospiti nei siti di campionamento. Per questi motivi, sono necessari altri studi per verificare con maggior accuratezza la natura opportunistica o antropofila di questa specie estendendo le catture di zanzare in aree dove sono predominanti altre specie animali rispetto all'uomo (allevamenti, canili, aree boschive, ecc.).

I risultati di laboratorio hanno evidenziato che *Ae. koreicus* accetta diversi tipi di sangue. Anche in condizioni sperimentali ha mostrato una preferenza per il sangue umano, seguita da quella per il sangue di pollo. La prima implicazione sanitaria di questo dato riguarda West Nile Virus e Usutu Virus, endemici nella regione Veneto (Rezza *et al.*, 2007; Busani *et al.*, 2011). Il ciclo biologico di questi due virus a carattere zoonosico è infatti legato a diverse specie avicole, sia selvatiche che domestiche, che svolgono il ruolo di reservoir del virus mantenendone la circolazione sia in ambiente selvatico che urbano, rispettivamente. Tuttavia, per il momento non esistono dati riguardanti il ruolo di *Ae. koreicus* nel ciclo biologico di queste malattie. Un'altra importante zoonosi virale il cui ciclo biologico include gli avicoli come reservoir, e che può colpire l'uomo in forma clinica anche grave, è l'Encefalite Giapponese, non presente in Europa. La competenza vettoriale di *Ae. koreicus* per questo virus viene discussa in seguito.

Riguardo alla competenza vettoriale di *Ae. koreicus* esistono poche informazioni. Essa è considerata un potenziale vettore di arbovirus (Cameron *et al.*, 2010) sebbene le evidenze pubblicate riguardo il suo ruolo come vettore siano molto scarse. Alcuni autori (Knight, 1947; Tanaka *et al.*, 1979)

sostengono che questa specie sia stata probabilmente confuse con *Ae. japonicus* in passato, confondendo cosi la competenza vettoriale tra queste due zanzare. *Aedes koreicus* è stata comunque considerata una specie coinvolta nella trasmissione del virus dell'encefalite giapponese (Takashima & Rosen, 1989), non presente in Europa, e nella trasmissione di *Dirofilaria immitis* (Feng, 1930; Myiagi, 1971) agente eziologico delle filariosi cardiopolmonare del cane e del gatto. Per quanto riguarda il virus dell'encefalite giapponese è stata dimostrata la sua trasmissione in condizioni sperimentali (Miles, 1964; Gutsevich & Monchadskii, 1971), ma il virus non è mai stato isolato da zanzare catturate in campo (Kim *et al.*, 2005). Esistono inoltre evidenze, da vecchi studi di laboratorio, del coinvolgimento di *Ae. koreicus* nel ciclo biologico di *D. immitis* (Feng, 1930; Myagi, 1971).

In concomitanza con lo svolgimento di questa tesi è stato condotto presso il Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie uno studio sulla capacità di trasmissione di *D. immitis* da parte di A*e. Koreicus* proveniente dalla provincia di Belluno. Dalle indagini condotte in condizioni sperimentali è emerso che questa specie è in grado di infettarsi con le microfilarie e che gli stadi infettivi (stadio larvale L3) riescono a raggiungere la proboscide della zanzara (Montarsi *et al*,. 2014b).

Attualmente il Veneto è una regione endemica per *D. immitis* ed il vettore più competente risulta essere *Cx. pipiens* (Capelli *et al.*, 2013). E' interessante ricordare che dopo il suo arrivo anche la zanzara tigre (*Ae. Albopictus*) (Dalla Pozza, 1992) è diventata un vettore della filariosi, estendendo il rischio di contagio per gli animali anche durante le ore diurne (Cancrini *et al.*, 2003). L'aggiungersi di una nuova specie competente per la trasmissione di *D. immitis* costituirebbe un importante fattore nell'aumentare l'incidenza di una malattia che, in alcune aree, risulta essere già in aumento (Giangaspero *et al*., 2013). In aggiunta, dalle ultime osservazioni (agosto 2014) condotte da esperti dell'IZS delle Venezie, dell'IZS di Emilia Romagna e Lombardia e della Fondazione E. Mach (Trento), l'area di presenza della *Ae. Koreicus* (Fig. 24) è in rapida espansione (dati non pubblicati). In particolare in Veneto, la sua espansione è diretta verso sud ed è attualmente presente anche nei comuni di Marostica e Romano d'Ezzelino (VI). Perciò il rischio che possa raggiungere le aree endemiche per Dirofilaria (Capelli *et al.*, 2013) è molto concreto. Inoltre, dai risultati di campo è emerso che la specie canina rientra tra i possibili ospiti, il che rafforza la necessità di inquadrare con più precisione il ruolo di *Ae. koreicus* nel ciclo biologico di *D. immitis*.

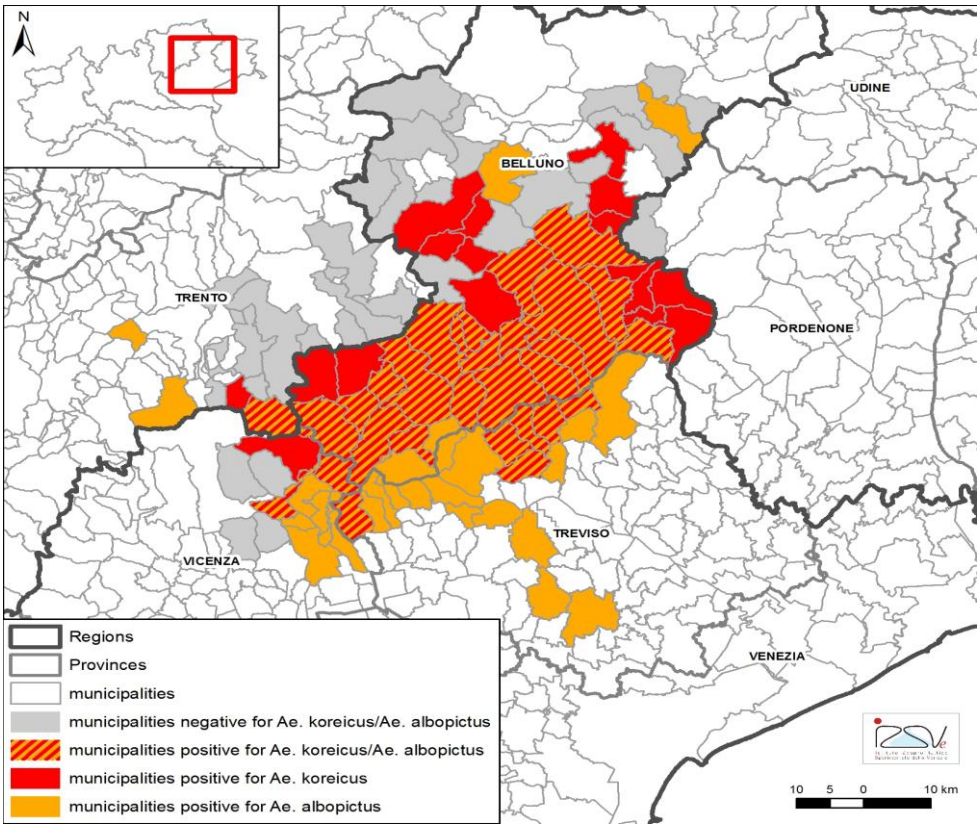

Fig. 24: mappa dei comuni monitorati nel nord-est dell'Italia dal 2011 al 2013. (mappa fornita dal IZS delle Venezie).

Alcuni arbovirus, quali West Nile virus ed Usutu virus, sono endemici nella regione Veneto (Rezza *et al.*, 2007; Busani *et al.*, 2011), ed altri, quali Chikungunya e Dengue, vengono regolarmente introdotti nel nostro Paese da persone infette (Gobbi *et al.*, 2012). Al momento non esistono dati a riguardo, ma se *Ae. koreicus* si dimostrasse un vettore competente per la trasmissione di questi virus, il rischio di trasmissione verrebbe esteso in queste nuove aree colonizzate ed in quelle zone precedentemente ritenute a rischio trascurabile per l'uomo e gli animali, come le aree ad altitudini elevate. La sua presenza potrebbe quindi potenzialmente aumentare la trasmissione di patogeni trasmessi da zanzare nelle zone endemiche, dove altre specie rappresentano già dei vettori competenti, ma soprattutto favorire la diffusone di tali patogeni in zone in cui non erano presenti altre specie di zanzare prima dell'arrivo di *Ae. koreicus*. Questi dati sono importanti per valutare il rischio di invasione in altre parti dell'Italia o dell'Europa e per pianificare futuri controlli considerando che l'eradicazione di una specie così diffusa è ormai impossibile (Montarsi *et al.*, 2013a).

Indagare sulla preferenza d'ospite delle zanzare e sul loro potenziale comportamento antropofilo è quindi fondamentale per valutare il rischio di trasmissione di malattie animali e zoonosi trasmesse

da vettori (Takken & Verhulst, 2013). Questi studi preliminari costituiscono la base per futuri studi di competenza vettoriale, oltre che per importanti parassiti per gli animali, quali *D. immitis*, soprattutto per virus di grande interesse per la salute umana quali Chikungunya, Dengue e West Nile.

6. Bibliografia

Adhami J, Murati N, 1987. **Presence of the mosquito Aedes albopictus in Albania.** Revista Mjekesore 1:13-16

Afrane YA, Lawson BW, Brenya R, Kruppa T, Yan G, 2012. **The ecology of mosquitoes in an irrigated vegetable farm in Kumasi, Ghana: abundance, productivity and survivorship.** Parasit Vectors 5:233.

Alcaide M, Rico C, Ruiz S, Soriguer R, Muñoz J, Figuerola J, 2009. **Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals.** PLoS One 4(9):e7092.

Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, Po C, Petropulacos K, Macini P, Fiorentini C, Fortuna C, Venturi G, Romi R, Majori G, Nicoletti L, Rezza G, Cassone A**,** 2007. **An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy.** Euro Surveill 12(36):pii=3260.

Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A *et al.*, 2002. **West Nile virus Epidemic in horses, Tuscany Region, Italy**. Emerg Infect Dis 8(12):1372-1378.

Barrett ADT, Monath TP, 2003. **Epidemiology and ecology of Yellow fever virus**. Adv Virus Res 61:291–315.

Barzon L, Squarzon L, Cattai M, Franchin E, Pagni S, Cusinato R *et al.,* 2009a. **West Nile virus infection in Veneto region, Italy, 2008-2009.** Euro Surveill 14(31):pii=19289.

Barzon L, Franchin E, Squarzon L, Lavezzo E, Toppo S,Martello T *et al*., 2009b. **Genome sequence analysis of the first human West Nile virus isolated in Italy in 2009**. Euro Surveill 14(44):pii= 19384.

Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Pagni S, Lavezzo E, Squarzon L, Martello T, Russo F, Nicoletti L, Rezza G, Castilletti C, Capobianchi MR, Salcuni P, Cattai M, Cusinato R, Palù G, 2013. **Large human outbreak of West Nile virus infection in north-eastern Italy in 2012.** Viruses 5(11):2825-39.

Beaty JB, Marquardt WC, 1996. **The Biology of Disease Vectors. 1st edition**. Univ Pr of Colorado, Denver, 632pp.

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

Bellini R, 2003. **Comportamento e biologia delle principali specie italiane di zanzara e strategie di lotta**. Snop 61:21-22.

Boccolini D, Romi R, D'Amato s, Pompa MG, Majori G, 2007. **Sorveglianza della malaria in Italia e analisi della casistica del quinquennio 2002 - 2006**. It J Trop Med 12:5-13.

Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Angelini R, Venturi L, Fallacara F, Cordioli P, Angelini P, Venturelli C, Merialdi G, Dottori M, 2008. **Chikungunya Virus in *Aedes albopictus*, Italy**. Emerg Infect Dis 14(5):852–854.

Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, James AA, 2013. **The invasive mosquito species Aedes albopictus: current knowledge and future perspectives.** Trends Parasitol 29(9):460-8.

Bouvresse S, Socolovshi C, Berdjane Z, Durand R, Izri A *et al.*, 2011. **No evidence of *Bartonella quintana* but detection of *Acinetobacter baumannii* in head lice from elementary schoolchildren in Paris**. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 34:475–477.

Breman JG, Egan A, Keusch GT, 2001. **The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers**. Am J Trop Med Hyg 64(1-2 Suppl):iv-vii.

Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoërsdorff A, Blanco JR, Caruso G, Cinco M, Fournier PE, Francavilla E, Jensenius M, Kazar J, Laferl H, Lakos A, Lotric Furlan S, Maurin M, Oteo JA, Parola P, Perez-Eid C, Peter O, Postic D, Raoult D, Tellez A, Tselentis Y, Wilske B, ESCMID Study Group on Coxiella, Anaplasma, Rickettsia and Bartonella; European Network for Surveillance of Tick-Borne Diseases, 2004. **Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe**. Clin Microbiol Infect 10(12):1108-132.

Brouqui P, 2011. **Arthropod-borne diseases associated with political and social disorder**. Annu Rev Entomol 56:357–374.

Busani L, Capelli G, Cecchinato M, Lorenzetto M, Savini G, Terregino C, Vio P, Bonfanti L, Pozza MD, Marangon S, 2011. **West Nile virus circulation in Veneto region in 2008-2009**. Epidemiol Infect 139(6):818-25.

Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z, Ionescu A, Monaco F, Savini G, Lelli R, 2010. **Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean Basin.** Open Virol J 4:29-37.

Calza L, Manfredi R, Chiodo F, 2004. **Le infezioni trasmesse dal morso di zecca.** Recenti Prog Med 95(9):403-413.

Cameron EC, Wilkerson RC, Mogi M, Miyagi I, Toma T, Kim HC, Fonseca DM, 2010. **Molecular phylogenetics of *Aedes japonicus*, a disease vector that recently invaded Western Europe, North America, and the Hawaiian islands.** J Med Entomol 47(4):527-35.

Cancrini G, Frangipane di Regalbono A, Ricci I, Tessarin C, Gabrielli S, Pietrobelli M, 2003a. ***Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy**. Vet Parasit 118:195-202.

Cancrini G, Romi R, Gabrielli S, Toma L, Di Paolo M, Scaramozzino P, 2003b. **First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Aedes albopictus***. Med Vet Entomol 17:448-451.

Capelli G, Drago A, Martini S, Montarsi F, Soppelsa M, Delai N, Ravagnan S, Mazzon L, Schaffner F, Mathis A, Di Luca M, Romi R, Russo F, 2011. **First report in Italy of the exotic mosquito species *Aedes (Finlaya) koreicus*, a potential vector of arboviruses and filariae**. Parasit Vectors 4:188.

Capelli G, Frangipane Di Regalbono A, Simonato G, Cassini R, Cazzin S, Cancrini G, Otranto D, Pietrobelli M, 2013. **Risk of canine and human exposure to Dirofilaria immitis infected mosquitoes in endemic areas of Italy**. Parasit Vectors 6:60.

Chinery M, 2004. **Guida degli insetti d'Europa. Atlante illustrato a colori. 3ª edizione.** Franco Muzzio Editore, Roma, 431pp.

Clements AN, 1963. **The physiology of mosquitoes**. Pergamon Press, Oxford, 395pp.

Clements AN, 1992**. Biology of mosquitoes. Development, nutrition and reproduction**. **Vol. 1.** Chapman & Hall, London, 360pp.

Clements AN, 1999. **Biology of mosquitoes. Sensory reception and behaviour**. **Vol. 2**. Chapman & Hall, London, 509pp.

Cosgrove JB, Wood RJ, Petric D, Evans DT, Abbott RHR, 1994. **A convenient mosquitoe membrane feeding system.** J Am Mosq Control Assoc 10(3):434-436.

Crans WJ, 2004. **A classification system for mosquito life cycles: life cycle types for mosquitoes of the northeastern United States.** J Vector Ecol 29(1):1-10.

Dalla Pozza G, Majori G, 1992. **First record of Aedes albopictus establishment in Italy.** J Am Mosq Control Assoc. 8(3):318-20.

Dohm DJ, Logan TM, Barth JF, Turell MJ, 1995. **Laboratory transmission of Sindbis virus by *Aedes albopictus, Ae. aegypti*, and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae)**. J Med Entomol 32:818-21.

Dottori M, Bonilauri P, Rellini R, Cordioli P, Tamba M, Sambri V, Calzolari V, Angelini P, Macini P, Venturi L, Angelini R, Lavazza A, Martini E, Alba C, Venturelli C, Vecchi G, 2008. **Primo focolaio europeo autoctono di malattia tropicale trasmessa da vettori in Romagna**. Praxis Vet 2008, 29(1):2-9.

Endy TP, Nisalak A, 2002. **Japanese encephalitis virus: ecology and epidemiology**. Curr Top Microbiol Immunol 267:11–48.

Filice G, 1998. **Malattie infettive. 2ª edizione.** McGraw-Hill, Milano, 518pp.

Feng LC, 1930. **Experiments with Dirofilaria immitis and local species of mosquitoes in Peiping, North China**. Ann Trop Med Parasit 24:347–366.

Florin-Christensen M, Schnittger L, 2009. **Piroplasmids and ticks: a long-lasting intimate relationship**. Front Biosci 14(14):3064–3073.

Fournier PE, Ndihokubwayo JB, Guidran J, Kelly P, Raoult D, 2002. **Human pathogens in body and head lice**. Emerg Inf Dis 8:1515–1518.

Giangaspero A, Marangi M, Latrofa MS, Martinelli D, Traversa D, Otranto D, Genchi C, 2013. **Evidences of increasing risk of dirofilarioses in southern Italy.** Parasitol Res 112(3):1357-61.

Gobbi F, Barzon L, Capelli G, Angheben A, Pacenti M, Napoletano G, Piovesan C, Montarsi F, Martini S, Rigoli R, Cattelan AM, Rinaldi R, Conforto M, Russo F, Palù G, Bisoffi Z, Veneto Summer Fever Study Group, 2012. **Surveillance for West Nile, dengue, and chikungunya virus infections, Veneto Region, Italy, 2010**. Emerg Infect Dis 18(4):671–673.

Gobbi F, Capelli G, Angheben A, Giobbia M, Conforto M, Franzetti M, Cattelan AM, Raise E, Rovere P, Mulatti P, Montarsi F, Drago A, Barzon L, Napoletano G, Zanella F, Pozza F, Russo F, Rosi P, Palù G, Bisoffi Z, Summer Fever Study Group, 2014. **Human and entomological**

surveillance of West Nile fever, dengue and chikungunya in Veneto Region, Italy, 2010-2012. BMC Infect Dis 14:60.

Gratz NG, 2004. **Critical review of the vector status of *Aedes albopictus***. Med Vet Entomol 18(3):215-27.

Grimaldi G, Tesh RB, 1993. **Leishmaniases of the New-World - Current Concepts and Implications for Future Research**. Clin Microbiol Rev 6:230–250.

Gubler DJ, 2002. **The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems**. Arch Med Res 33:330–342.

Gutsevich AV, Monchadskii Stackel'berg AA, 1971. **Mosquitoes, family culicidae.** In: Fauna of the U.S.S.R.-Diptera**.** Vol. 3, No. 4, ed. Bykhovskii BE, Acad. Sci. SSSR, Zool. Inst, Leningrad, 1971. pp73–405.

Harbach RE, 2007. **The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny**. Zootaxa 1668:591–638.

Harbach RE, Howard TM, 2007. **Index of currently recognized mosquito species (Diptera: Culicidae**). JEMCA 23:1-66.

Hayes E, Komar N, Nasci R, Montgomery S, O'Leary D, Campbell G, 2005. **Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease**. Emerg Infect Dis 11(8):1167-73.

Hoogstraal H, 1973. **Viruses and ticks. In Viruses and invertebrates**. Ed Gibbs AJ, North-Holland Pub Co, Amsterdam, pp349–417.

Houhamdi L, Lepidi H, Drancourt M, Raoult D, 2006. **Experimental model to evaluate the human body louse as a vector of plague**. J Infect Dis 194:1589–1596.

Huebner RJ, Stamps P, Armstrong C, 1946. **Rickettsialpox.** A **newly recognized rickettsial disease. 1. isolation of the etiological agent**. Public Health Rep 61:1605.

Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeyard A, Balk D *et al*., 2008. **Global trends in emerging infectious diseases**. Nature 451:990–994.

Kent RJ, West AJ, Norris DE, 2004. **Molecular differentiation of colonized human malaria vectors by 28S rDNA polymorphisms**. Am J Trop Med Hyg 71:514–51.

Kim HC, Wilkerson RC, Pecor JE, Lee WJ, Lee JS, O'Guinn ML, Klein TA, 2005. **New records and reference collection of mosquitoes (Diptera: Culicidae) on Jeju Island, Republic of Korea**. Entomol Res 35(1):55–66.

Kjemtrup AM, Conrad PA, 2000. **Human babesiosis: an emerging tick-borne disease**. Int J Parasitol 30(12-13):1323-1337.

Knight KL, 1947. **The *Aedes (Finlaya) chrysolineatus* group of mosquitoes (Diptera: Culicidae).** Ann Entomol Soc Am 40(4):624-649.

Komar N, 2003. **West Nile virus: epidemiology and ecology in North America**. Adv Virus Res 61:185–234.

Krasnov BR, 2008. **Functional and evolutionary ecology of fleas: a model for ecological parasitology**. Cambridge University Press, New York, 593pp:72-74.

Koopmans M, Martina B, Reusken C, van Maanen K, 2007. **West Nile virus in Europe: waiting for the start of the epidemic?** In: Emerging Pests and Vector-borne Diseases in Europe**.** Ecology and control of vector-borne diseases, eds. Takken, W, Knols BGJ, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2007. 501pp:123–151

Kot M, Lewis MA, Van den Driessche P, 1996. **Dispersal data and the spread of invading organisms**. Ecology 77:2027–2042.

La Scola B, Fournier PE, Brouqui P, Raoult D, 2001. **Detection and culture of Bartonella *quintana, Serratia marcescens, and Acinetobacter spp*. from decontaminated human body lice**. J Clin Microbiol 39: 1707–1709.

Latrofa MS, Montarsi F, Ciocchetta S, Annoscia G, Dantas-Torres F, Ravagnan S, Capelli G, Otranto D, 2012. **Molecular xenomonitoring of Dirofilaria immitis and Dirofilaria repens in mosquitoes from north-eastern Italy by real-time PCR coupled with melting curve analysis**. Parasit Vectors 5:76.

Liebhold AM, Tobin PC, 2008. **Population ecology of insect invasions and their management**. Annu Rev Entomol 53:387–408.

Majori G, 2012. **Short history of malaria and its eradication in Italy with short notes on the fight against the infection in the mediterranean basin.** Mediterr J Hematol Infect Dis 4(1):e2012016.

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L, 2013. **Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern**. Med Vet Entomol 27(2):123-47.

Matassa E, 2007. **Zoonosi e sanità pubblica. Un approccio interdisciplinare per un problema emergente**. Springer, Milano, 231pp:122-135.

Medlock JM, Snow KR, Leach S, 2007. **Possible ecology and epidemiology of medically important mosquito-borne arboviruses in Great Britain**. Epidemiol Infect 135:466–482.

Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, Versteirt V, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W, 2012. **A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options**. Vector Borne Zoonotic Dis 12(6):435–447.

Miles JAR, 1964**. Some ecological aspects of the problem of arthropod-borne animal viruses in the Western Pacific and South-East Asia regions.** Bull World Health Organ 30(2):197–210.

Mitchell CJ, 1995a**. Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the Mediterranean basin.** J Vector Ecol 20: 44-58.

Moore CG, Mithchell CJ, 1997. ***Aedes albopictus* in the United States: Ten-Year Presence and Public Health Implications**. Emerg Infect Diseases 3:329-334.

Montarsi F, Martini F, Dal Pont M, Delai N, Ferro Milone N, Mazzucato M, Soppelsa F, Cazzola L, Cazzin S, Ravagnan S, Ciocchetta S, Russo F, Capelli G, 2013a. **Distribution and habitat characterization of the recently introduced invasive mosquito *Aedes koreicus* [*Hulecoeteomyia koreica*], a new potential vector and pest in north-eastern Italy.** Parasit Vectors 6:292.

Montarsi F, Ciocchetta S, Ravagnan S, Simonato G, Mutinelli F, Camuffo S, Frangipane di Regalbono A, Capelli G. 2014b. **Laboratory evidence on vector competence of the invasive mosquito *Aedes koreicus* [*Hulecoeteomyia koreica*] for *Dirofilaria immitis*.** Parasit Vectors 7(Suppl 1):O34.

Myiagi I, 1971. **Notes on the *Aedes (Finlaya) chrysolineatus* Subgroup in Japan and Korea (Diptera: Culicidae).** Tropical Medicine 13(3):141-151.

Mullen GR, Mullen G, Durden, L, 2009. **Medical and Veterinary Entomology**. Academic Press, Waltham, 637pp:124.

Nadjm B & Behrens RH, 2012. **Malaria: An update for physicians**. Infect Dis Clin North Am 26(2):243–59.

Nash D, Mostashari F, Fine A *et al*., 2001. **Outbreak of West Nile virus infection, New York City area**. N Engl J 14:344-1807.

Paz S, Semenza JC, 2013. **Environmental drivers of West Nile fever epidemiology in Europe and Western Asia--a review.** Int J Environ Res Public Health 10(8):3543-62.

Pham XD, Otsuka Y, Suzuki H, Takaoka H, 2001. ***Detection of Orientia tsutsugamushi* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in unengorged chiggers (Acari: Trombiculidae) from Oita Prefecture, Japan, by nested polymerase chain reaction**. J Med Entomol 38(2):308–311.

Reinert JF, 2001. **Revised list of abbreviations for genera and subgenera of Culicidae (Diptera) and notes on generic and subgeneric changes**. J Am Mosq Control Assoc 17(1):51-55.

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 GC, Cassone A, CHIKV study group, 2007. **Infection with CHIKV in Italy: an outbreak in a temperate region**. Lancet, 370:1840–1846.

Robinson D, Leo N, Prociv P, Barker SC, 2003. **Potential role of head lice, *Pediculus humanus capitis*, as vectors of *Rickettsia prowazekii***. Parasitol Res 90:209–211.

Robinson WH, 2005. **Urban Insects and Arachnids. A Handbook of Urban Entomology**. Cambridge University Press, New York, 472pp.

Roehrig JT, 2013. **West nile virus in the United States - a historical perspective.** Viruses 5(12):3088-108.

Romi R, Pontuale G, Sabatinelli G, 1997. **Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli stadi preimmaginali (Diptera, Culicidae)**. Fragm entomol 29(suppl.):1-141.

Romi R, 2001. ***Aedes albopictus*** **in Italia: un problema sottovalutato**. Annali Ist Sup Sanità 37(2):241-248.

Romi R, Boccolini D, D'Amato S, Cenci C, Pompa MG, Majori G, 2010. **Malaria surveillance in Italy: the 2000-2008 national pattern of imported cases**. Giorn It Med Trop 15:1-4.

Rossini G, Cavrini F, Pierro A, Macini P, Finarelli AC, Po C, Peroni G, Di Caro A, Capobianchi M, Nicoletti L, Landini MP, Sambri V, 2008. **First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy, September 2008 – case report**. Euro Surveill 13(41):pii=19002.

Sabatini A, Ranieri V *et al.*, 1990. ***Aedes albopictus*** **in Italia e possibile diffusione della specie nell'area mediterranea**. Parassitologia 23:245-249.

Sambri V, Capobianchi M, Charrel R, Fyodorova M, Gaibani P, Gould E, Niedrig M, Papa A, Pierro A, Rossini G, Varani S, Vocale C, Landini MP, 2013. **West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention.** Clin Microbiol Infect 19(8):699-704.

Severini F, Di LucaM, Toma L, Romi R, 2009. **Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti (Diptera, Culicidae)**. Fragmenta Entomologica 41(2):213-372.

Sherman, DM, 2002. **Tending animals in the global village: a guide to international veterinary medicine.** Wiley-Blackwell, Hoboken, 495pp:209.

Shope, RE, 2003. **Epidemiology of other arthropod-borne flaviviruses infecting humans**. Adv Virus Res 61:373–391.

Shroyer D, 1986. ***Aedes albopictus*** **and arboviruses: A concise review of the literature**. J Am Mosq Contr Assoc 2:424-428.

Singh-Behl D, La Rosa SP, Tomecki KJ, 2003. **Tick-borne infections**. Dermatol Clin 21:237-44.

Slama D, Chaker E, Mathieu B, Babba H, Depaquit J, Augot D, 2014. **Biting midges monitoring (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides Latreille) in the governate of Monastir (Tunisia): species composition and molecular investigations.** Parasitol Res 113(7):2435-43.

Steere AC, 2001. **Lyme disease**. NEJM 345:115-25.

Stein E, 2003. **Anorectal and colon diseases: textbook and color atlas of proctology.** Springer, New York, 531pp:478

Sutcliffe JF, 1987. **Distance orientation of biting files to their hosts**. Insect Sci Appl 8:611-616.

Takashima I, Rosen L, 1989. **Horizontal and vertical transmission of Japanese encephalitis virus by *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae)**. J Med Entomol 26(5):454-8.

Takken W, Verhulst NO, 2013. **Host preferences of blood-feeding mosquitoes**. Annu Rev Entomol 58:433-53.

Tanaka K, Mizusawa K, Saugstad ES, 1979. **A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara islands) and Korea (Diptera: Culicidae).** Contrib Am Entomol Inst 16:1-987.

Tatem AJ, Hay SI, Rogers DJ, 2006. **Global traffic and disease vector dispersal**. Proc Natl Acad Sci USA 103:6242–6247.

Thiboutot M, Kannan S, Kawalekar OU, Shedlock DJ, Khan AS *et al*., 2010. **Chikungunya: A Potentially Emerging Epidemic?** PLoS Negl Trop Dis 4(4):e623.

Vasilakis N, Weaver SC, 2008. **The history and evolution of human dengue emergence.** Adv Virus Res 72:1-76.

Vazeille M, Jeannin C, Martin E *et al*.,2008. **Chikungunya: A risk for Mediterranean countries?** Acta Tropica 105:200–202.

Veracx A, Raoult D, 2012. **Biology and genetics of human head and body lice**. Trends Parasitol 28:563–571.

Versteirt V, Pecor JE, Fonseca DM, Coosemans M, Van Bortel W, 2012. **Confirmation of *Aedes koreicus* (Diptera: Culicidae) in Belgium and description of morphological differences between Korean and Belgian specimens validated by molecular identification.** Zootaxa 3191:21-32.

Versteirt V, De Clercq EM, Fonseca DM, Pecor JE, Schaffner F, Coosemans M, Van Bortel W, 2012. **Bionomics of the established exotic mosquito species *Aedes koreicus* in Belgium. Europe**. J Med Entomol, 49(6):1226–1232.

Vinogradova EB, 2000. ***Culex pipiens* pipiens mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control**. Ed. Golovatich SI, Pensoft, Sofia-Moscow, 250pp

Weissenbock H, Hubalek Z, Bakonyi T, Nowotny N, 2010. **Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: Worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases**. Vet Microbiol 140:271-280.

WHO Europe, 2004. **The vector borne human infections of Europe-Their distribution and burden on public haelth.** 154pp.

World Health Organization, 2012. **World Malaria Report.** 195pp.

Williamson M, 1996. **Biological invasion**. Springer, London, 244pp.

Williges E, Farajollahi A, Scott JJ, McCuiston LJ, Crans WJ, Gaugler R, 2008. **Laboratory colonization of *Aedes japonicus japonicus.*** J Am Mosq Control Assoc 24(4):591-593.

Zeledón RA, 1996. **Hemoflagellates: Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis**. In: Medical Microbiology 4th ed, chapter 82, ed. Baron S, Univ of Texas Medical Branch, Galveston, 1996.