

## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Corso di laurea in Scienze e tecnologie agrarie

### **Relazioni tra pasto di sangue e struttura genetica di popolazioni di zanzare del complesso *Culex pipiens* nel nord est italiano**

Linking blood-feeding patterns to the population genetic structure of the *Culex pipiens* complex  
in Northern East of Italy

Relatore:

Prof. Luca Mazzon

Correlatori:

Dott.essa Isabel Sañudo Martinez

Dott.essa Elisabetta Viale

Dott.essa Silvia Ravagnan

Laureanda

Federica Manfrin

Matricola n. 1007249

ANNO ACCADEMICO 2012 - 2013

*A mia nonna Angelina*

## Indice generale

Riassunto.....	4
Abstract.....	5
1. Introduzione.....	6
1.1 Difficoltà e caratteristiche del complesso <i>Cx. pipiens</i> .....	6
1.2 Ciclo vitale.....	7
1.3 Morfologia.....	8
1.4 Identificazione genetica.....	9
1.5 Importanza sanitaria.....	10
2. Scopi del lavoro.....	12
3. Materiali e metodi.....	13
3.1 Zone di prelievo.....	13
3.2 CORINE Land Cover.....	22
3.3 Materiale biologico.....	23
3.4 Analisi genetica.....	25
3.4.1 Estrazione del DNA della zanzara con il pasto di sangue.....	25
3.4.2 Amplificazione del DNA mitocondriale.....	26
3.4.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	27
3.4.4 Amplificazione del DNA del pasto di sangue.....	27
4. Risultati.....	28
4.1 Presenza di <i>Cx. molestus</i> e <i>Cx. pipiens</i> nel territorio.....	28
4.2 Determinazione del pasto di sangue.....	33
4.3 Analisi del pasto di sangue nel complesso <i>Cx. pipiens</i> .....	35
4.4 Catture per sito di campionamento.....	37
5. Discussione.....	52
6. Appendice.....	54
7. Bibliografia.....	60
8. Ringraziamenti.....	62

## Riassunto

I culicidi appartenenti al genere *Culex* sono tra i più importanti vettori della West Nile Disease (WND) e di altri pericolosi patogeni. Il complesso *Culex pipiens* in *sensu lato* indica un complesso di specie la cui composizione tassonomica è argomento controverso e ancora oggetto di studio e discussione. In Europa si distinguono due forme ecologiche: *Cx. pipiens pipiens* (forma rurale) e *Cx. pipiens molestus* (forma urbana). Le due forme sono su base morfologica di difficilissima ed incerta distinzione.

Il presente lavoro si inserisce in un più esteso programma di monitoraggio di focolai di West Nile Virus della regione Veneto e condotto dal Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Il lavoro è avvenuto in collaborazione con il Lab di Entomologia (DAFNAE) dell'Università di Padova e il Lab di Parassitologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSvenezie).

In questo lavoro si è tentata di valutare l'entità delle due forme ecologiche del complesso *Cx. pipiens* nel territorio con approccio molecolare ossia mediante l'impiego degli enzimi di restrizione HaeIII (RFLP). Successivamente l'abbondanza delle due forme è stata messa in relazione con il loro pasto di sangue determinato, presso l'IZS, mediante sequenziamento (COI) del contenuto del tratto intestinale. I campioni, forniti dall'IZS, sono stati raccolti in diversi siti, dislocati nella pianura veneta e friulana, mediante trappole CDC innescate con CO<sub>2</sub>.

Dal contingente totale di zanzare catturato nel corso del 2012 sono stati considerati esclusivamente gli esemplari con pasto di sangue (feed) appartenenti al complesso *Cx. pipiens* (n=365). Complessivamente, la RFLP ha evidenziato una netta prevalenza della forma *Cx. molestus* (n=330; 90%), sulla forma *Cx. pipiens* (n=35; 10%) in tutti i siti d'indagine.

Dall'analisi delle caratteristiche del territorio, nel raggio di 2 Km, nel sito in cui era dislocata la trappola grazie al programma CORINE Land Cover (COOrdination of INformation on the Environnement) la forma *Cx. pipiens* apparirebbe maggiormente legata ad habitat costieri o comunque costituiti da paludi salmastre e zone intertidali scarsamente urbanizzate o industrializzate. Al contrario, *Cx. molestus* si confermerebbe legata ad habitat maggiormente urbanizzati e antropizzati e tenderebbe a divenire esclusiva procedendo nell'entroterra Veneto.

Per quanto riguarda l'identificazione dell'ospite, delle 365 zanzare feed sono stati identificati i pasti di sangue di 122 esemplari (33,4%). Nel totale 99 zanzare hanno punto uccelli e 22 hanno punto mammiferi. Delle specie di uccelli, *Turdus merula* è risultata una delle specie preferite da entrambe le forme. Inaspettatamente non ci sono stati esemplari che abbiano punto l'uomo. Complessivamente l'indagine avrebbe evidenziato una preferenza verso gli uccelli della forma *Cx. molestus* e verso i mammiferi della forma *Cx. pipiens* contrariamente a quanto viene comunemente riportato in letteratura. Allo stato attuale sono in corso ulteriori analisi allo scopo di incrementare il campione.

## Abstract

The culicidae of the genus *Culex* are important vectors of West Nile Disease(WND)and other dangerous pathogens. A heated scientific debate regarding the possibility that *Culex pipiens* complex could represent a group of different species and ecological forms is still ongoing but in Europe are generally distinguished two ecological forms : *Culex pipiens pipiens*( the rural forms) and *Culex pipiens molestus*( the urban form). The two forms are very similar and it's very hard to distinguish them even if compared with other species generally considered part of the complex.

This project is part of a Veneto Region WNV Program and lead from the Parasitology Laboratory of Zooprofilattico Sperimentale Venetian Institute (IZSvenezie). This project has been realised with the collaboration of Entomology Laboratory and Parasitology Laboratory of IZS Venezia on the north-east of Italy. With this collaboration it has been studied the relation of two ecological forms of *Culex pipiens* complex and the presence of a relation between blood meal and ecological form.

For the genetic analysis has been used the RFLP to distinguish the two forms of *Culex pipiens* and the method of nested PCR on the COI gene has been used to observe the blood meals.

RFLP analysis have shown a prevalence of *Cx. molestus* (n=330) than *Cx. pipiens* (n=35) The sampling sites have been characterized using the software CORINE (COOrdination of INformation on the Environment ) and the statistical analysis has revealed a connection of the *Culex pipiens* form with the coast while the *Cx molestus* seems to be connected with the urban habitat.

The blood meal of 122 feed mosquitoes has been analyzed. 99 of this mosquitoes have bitten birds and 22 mammals. The *Turdus Merula* ,this is the one of prefer species in both forms of the *Culex pipiens* complex. Unexpectedly, no blood meals of human origin have been found. To conclude the form *Cx. molestus* has shown a preference to birds than *Cx. pipiens* form. Further analysis are still on going in order to extend the number of the samples.

## 1. Introduzione

### 1.1 Difficoltà e caratteristiche del complesso *Cx. Pipiens*

Il complesso *Culex pipiens* è costituito da un insieme di specie di nematoceri appartenenti alla famiglia Culicidae. Attualmente è aperto un dibattito sul complesso, basato soprattutto sulle differenze biologiche tra i diversi individui e sulle diverse sottospecie che costituiscono il complesso. Le principali entità considerate appartenenti a questo complesso sono *Culex quinquefasciatus* Say, *Culex pipiens* L. e *Culex torrentium* Martini (Becker et al., 2012). La prima si sviluppa nelle regioni a clima tropicale e subtropicale, mentre la seconda e la terza si sviluppano nelle regioni temperate. Al complesso fanno parte altre specie minoritarie : *Culex pipiens pallens* e *Culex australicus* (Smith e Fonseca, 2004).

#### ***Culex pipiens* L.**

In Europa vengono normalmente distinte due sottospecie di *Culex pipiens* : *Cx. pipiens pipiens* (successivamente *Cx. pipiens*) in *sensu strictu* definita “forma rurale” e *Cx. pipiens molestus* (successivamente *Cx. molestus*) definita “forma urbana”. Queste due forme si sono originate in seguito all’adattamento di *Cx. pipiens* in ambienti fortemente antropizzate. Entrambe le forme non si spostano a grandi distanze (da qualche centinaio di metri a un massimo di circa 3 Km) e sono attive dal crepuscolo alla notte in prossimità dei focolai larvali da cui provengono. Possono entrare nelle abitazioni attratte dalla luce e dalle persone, rimanendo attive per tutta la notte. La forma rurale (*Cx. pipiens*) è rappresentata da popolazioni che prediligono per riprodursi acque limpide con sostanza organica di origine vegetale in ampi spazi (eurigamia), per questo negli ambienti fortemente urbanizzati non trovano ambiente ottimale per il loro sviluppo; inoltre necessitano di un pasto di sangue per lo sviluppo delle uova (anautogenia) e sono principalmente ornitofile (pungono prevalentemente gli uccelli) e presentano una diapausa invernale (eterodinamia). La forma urbana (*Cx. molestus*) si è fortemente adattata agli ambienti antropizzati e le sue popolazioni si riproducono prevalentemente in acque luride con forte carica organica che possono anche essere fortemente inquinate, in spazi ristretti (stenogamia) come tombini e caditoie stradali, non necessitano di un pasto di sangue per lo sviluppo delle uova dopo il periodo invernale (autogenia), sono principalmente antropofile (pungono prevalentemente l’uomo) e non presentano una diapausa invernale, anche se generalmente non si nutrono (omodinamia). A fronte di una facile distinzione delle due sottospecie per il comportamento biologico, è complicato differenziarle morfologicamente.

## 1.2 Ciclo vitale

Il ciclo vitale di un individuo di *Cx. pipiens* è composto da una fase acquatica costituita da tutti gli stadi immaturi (uovo, larva e pupa) e da una fase aerea che corrisponde allo stadio adulto. Normalmente la *Cx. pipiens* sverna a marzo come femmina feconda rifugiandosi in luoghi nascosti e tranquilli, spesso costruiti dall'uomo come stalle e cantine; mentre la *Cx. molestus* è in grado di passare l'inverno in qualsiasi stadio vitale, compreso quello di maschio adulto.

La femmina adulta ovidepone posandosi sulla superficie dell'acqua e sfruttando la tensione superficiale, depone parecchie centinaia di uova in gruppi, una di fianco all'altra, perpendicolari alla superficie dell'acqua a costituire aggregati galleggianti a forma di "zattera". Dopo la schiusura delle uova escono le larve che si mantengono in posizione obliqua presso la superficie dell'acqua; quest'ultime tengono l'estremità anteriore (il capo) rivolta all'ingiù e comunicano con l'aria atmosferica grazie ad un'apertura posteriore (sifone posteriore). Le larve si nutrono con le spazzole boccali, le quali con il proprio movimento creano un vortice con lo scopo di filtrare le particelle e microrganismi presenti nell'acqua (Severini et al. 2009). La larva attraversa 4 stadi di sviluppo separati da tre mute. La durata del ciclo preimmaginale è variabile ed è condizionato dalla temperatura dell'acqua e dalla disponibilità di cibo. Al termine del quarto stadio, la larva si impupa. La pupa è molto mobile, non si nutre ed è stazionaria nei pressi della superficie dell'acqua per respirare. Una volta terminato lo stadio di pupa, l'adulto già completamente sviluppato sfarfalla. Durante i mesi estivi il ciclo di sviluppo può completarsi in meno di due settimane dando origine a elevate densità di specie. *Cx. pipiens* è una specie multivoltina, cioè in grado di sviluppare più di una generazione all'anno (fino a 15) (Service, 2004).

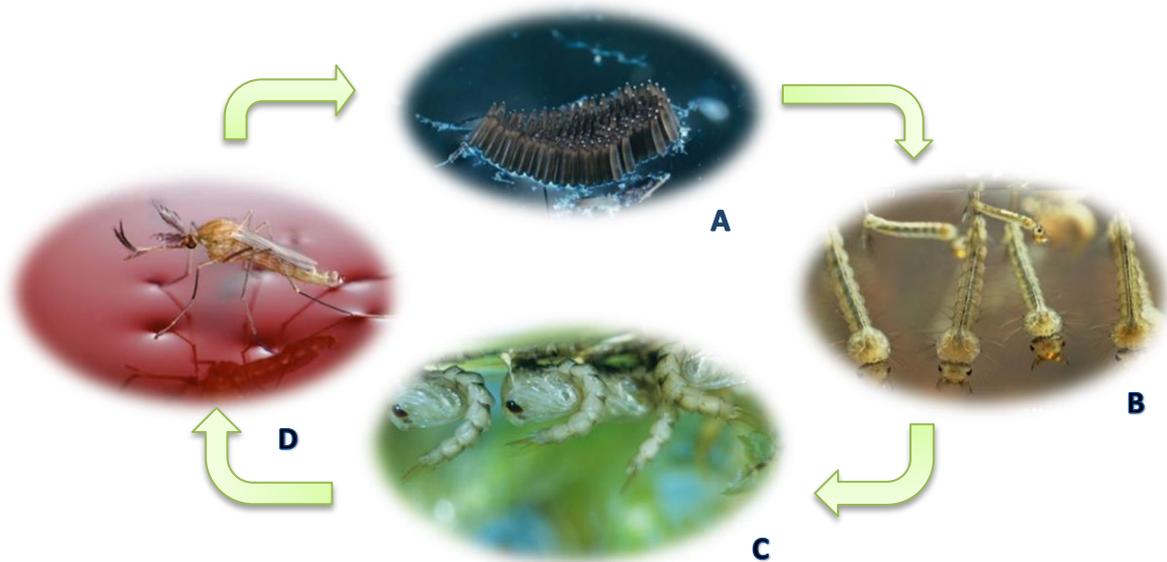


Figura 1: Ciclo vitale di *Culex pipiens*. **A** = gruppo di uova, **B** = larve, **C** = pupe, **D** = adulto (www.arkiwe.org).

### 1.3 Descrizione morfologica

La larva si caratterizza per l'assenza di un apparato locomotore e per le dimensioni del torace, visibilmente più largo della testa e dell'addome. Non possiede strutture di origine subacquea, ma è in grado di sfruttare l'ossigeno atmosferico tramite il sifone respiratorio: un tubo sclerificato sviluppato sul VIII segmento addominale al cui apice si trova l'apparato spiracolare (Severini et al. 2009). La larva può misurare da meno di un millimetro (primo stadio) a poco più di un centimetro (quarto stadio). La larva di IV stadio è l'unica utilizzata per l'identificazione della specie. Per il riconoscimento tra *Cx. molestus* e *Cx. pipiens* viene utilizzato l'indice sifonico e la lunghezza delle antenne della larva di IV stadio (Vinogradova, 2000).

La pupa presenta una forma "a virgola". È costituita dal cefalotorace (torace e testa sono fusi) e dall'addome. Le trombette (strutture respiratorie) sono due e sono poste sulla regione dorsale del cefalotorace. La pupa è in grado di spostarsi nell'ambiente acquatico grazie a un paio di palette natatorie presenti al termine dell'addome (Severini et al. 2009).

L'adulto presenta un corpo allungato e diviso in capo, torace e addome. Sulla testa presenta due occhi composti, due antenne (piumose nel maschio e arisate nella femmina) e un apparato boccale pungente-succhiante. Le femmine di zanzara sono ematofaghe (si nutrono di sangue) per la maturazione delle uova usano le proteine del sangue, mentre i maschi sono glicifaghi (si nutrono di liquidi zuccherini). Il torace è suddiviso in protorace, mesotorace e metatorace, ognuno dei quali ospita una coppia di zampe. Sul mesotorace è presente una coppia di ali funzionali mentre sul metatorace è presente un paio di bilancieri dotate di sensilli essenziali per il mantenimento dell'equilibrio e la stabilizzazione in volo (Severini et al. 2009). L'addome è costituito da 10 segmenti dei quali gli ultimi due sono modificati nell'apparato riproduttore. Nei maschi di zanzara la struttura riproduttiva è a forma di pinza e viene chiamata ipopigio. L'osservazione di questa struttura è fondamentale per l'identificazione tra *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*, in particolare vengono considerate differenze quantitative di alcune strutture del fallosoma (una delle forme dell'ipopigio) (Vinogradova, 2003).

## 1.4 Identificazione genetica

Le specie del complesso *Culex pipiens* sono riconosciute facilmente per il diverso comportamento biologico, mentre è molto difficile distinguerle morfologicamente. Essenziale è la loro identificazione attraverso analisi genetiche. Shaikevich (2007) ha messo a punto un metodo che permette di distinguere le due forme con gli enzimi di restrizione HaeIII. Prima di compiere la restrizione con gli enzimi HaeIII è stata fatta l'amplificazione del gene che codifica per il Citocromo Ossidasi I (COI), che fa parte del DNA mitocondriale, noto come "barcode". La regione mitocondriale della Citocromo Ossidasi I di *Cx. pipiens* differisce di una base nucleotidica rispetto a *Cx. molestus*: nello specifico una guanina (G) è presente al posto di una adenina (A) nella terza posizione del codone 68. L'enzima di restrizione HaeIII è in grado di riconoscere il sito contenente la base nucleotidica diversa, ovvero la G presente in *Cx. pipiens*, ma non presente in *Cx. molestus*. In questo modo, dopo la restrizione, il DNA dei campioni appartenenti a *Cx. pipiens* producono due frammenti di 206 e 397 coppie di basi in quanto l'enzima di restrizione ha riconosciuto la base nucleotidica e ha tagliato il DNA, mentre dai campioni di *Cx. molestus* si ottiene un unico frammento (poiché l'enzima di restrizione non è stato in grado di riconoscere il sito e non ha tagliato). L'uso di questo enzima di restrizione permette di velocizzare il riconoscimento delle due forme ecologiche.

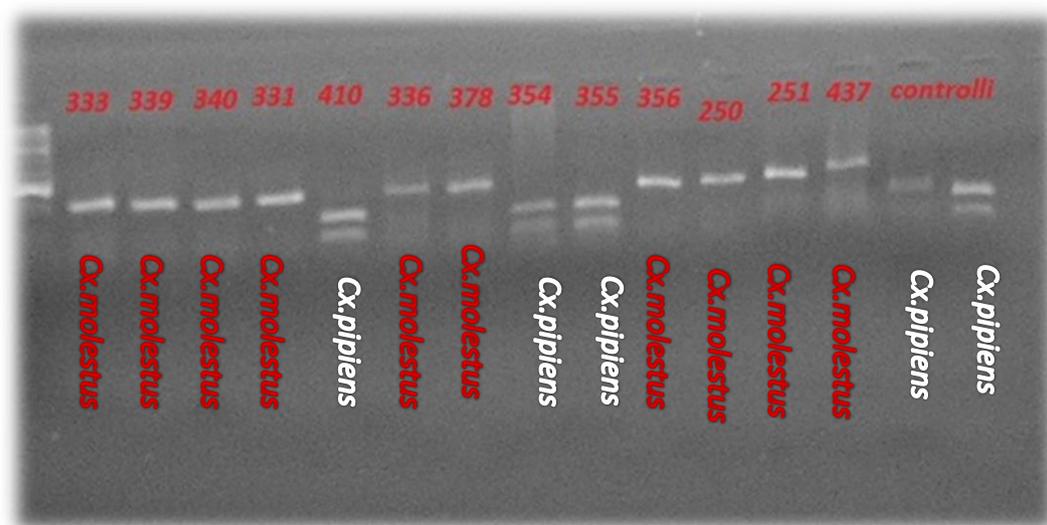


Figura 2: Frammenti risultati dalla restrizione HaeIII. Il singolo frammento permette di identificare la forma biologica *Cx.molestus*, mentre il doppio frammento è il risultato della restrizione dell'enzima e permette il riconoscimento della sottospecie *Cx. pipiens*.

## 1.5 Importanza sanitaria

Il complesso *Cx.pipiens* ha un'elevata importanza sanitaria: è il principale vettore della malattia infettiva virale chiamata West Nile Disease (WND); è in grado di trasmettere sei specie di *Plasmodium* incluso *P. gallinaceum* agente patogeno responsabile della malaria degli uccelli e del pollame (Hewitt 1940; Bates 1949; Eichler 1980).

La WND è una malattia che, causa forme di meningo-encefalite negli uccelli, negli equini e nell'uomo; più raramente negli altri mammiferi e rettili.

Il virus, appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, è stato isolato per la prima volta nel 1937 da una donna residente nella provincia West Nile dell'Uganda, da tale località deriva il nome della patologia. Questa malattia da sempre ritenuta esotica, negli ultimi anni si è diffusa anche nei territori con clima temperato. Attualmente il virus è presente in vaste aree dell'Africa, in Asia Occidentale, Medio Oriente, Europa, Stati Uniti e Canada.

Il virus viene trasmesso agli animali e all'uomo, in seguito alla puntura di una zanzara infetta che costituisce il vettore della malattia. Un ruolo importante nella diffusione della malattia sono gli uccelli selvatici e domestici, che fanno da serbatoio della malattia: grazie a questi animali l'infezione può mantenersi e amplificarsi attraverso un ciclo zanzara – uccello – zanzara. La malattia ha un'incidenza stagionale legata al ciclo vitale delle zanzare.

Nell'uomo sono state accertate anche altre vie d'infezioni minori, come trasfusione di sangue infetto, il trapianto di organi e la via transplacentare.

Nella maggior parte dei casi la WND si inserisce in un territorio tramite gli uccelli migratori in fase viremica, che possono trasmettere l'infezione ad uccelli stazionali grazie alle zanzare, favorendo un ciclo locale della malattia (Andrighetto et al. 2004). Considerando la diversa biologia delle due forme del complesso *Cx. pipiens* è possibile osservare tra queste due popolazioni un diverso modo di trasmissione della West Nile Disease, la forma rurale maggiormente ornitofila farebbe da ponte della WND tra uccelli migratori infetti e fauna aviaria locale, mentre la forma urbana maggiormente antropofila è responsabile della trasmissione tra fauna aviaria staziale ai mammiferi e all'uomo (Toma et al., 2008; Di Luca et al., 2011).

L'infezione da WND è stata segnalata per la prima volta in Italia nel 1998, quando la malattia fu trovata in Toscana su alcuni cavalli. Il virus ricomparve nel 2008, quando sono stati riportati casi d'infezione della malattia virale su umani ed equini nelle regioni del Veneto e dell'Emilia-Romagna. Nel 2009 in seguito all'aumento del verificarsi di casi umani di WND e al crescente numero di province interessate, la regione Veneto ha attivato un piano di sorveglianza integrato clinico,

entomologico e veterinario per la sorveglianza attiva e il monitoraggio della circolazione di questa malattia infettiva nell'uomo, nelle zanzare e negli animali (Capelli et al. 2012).

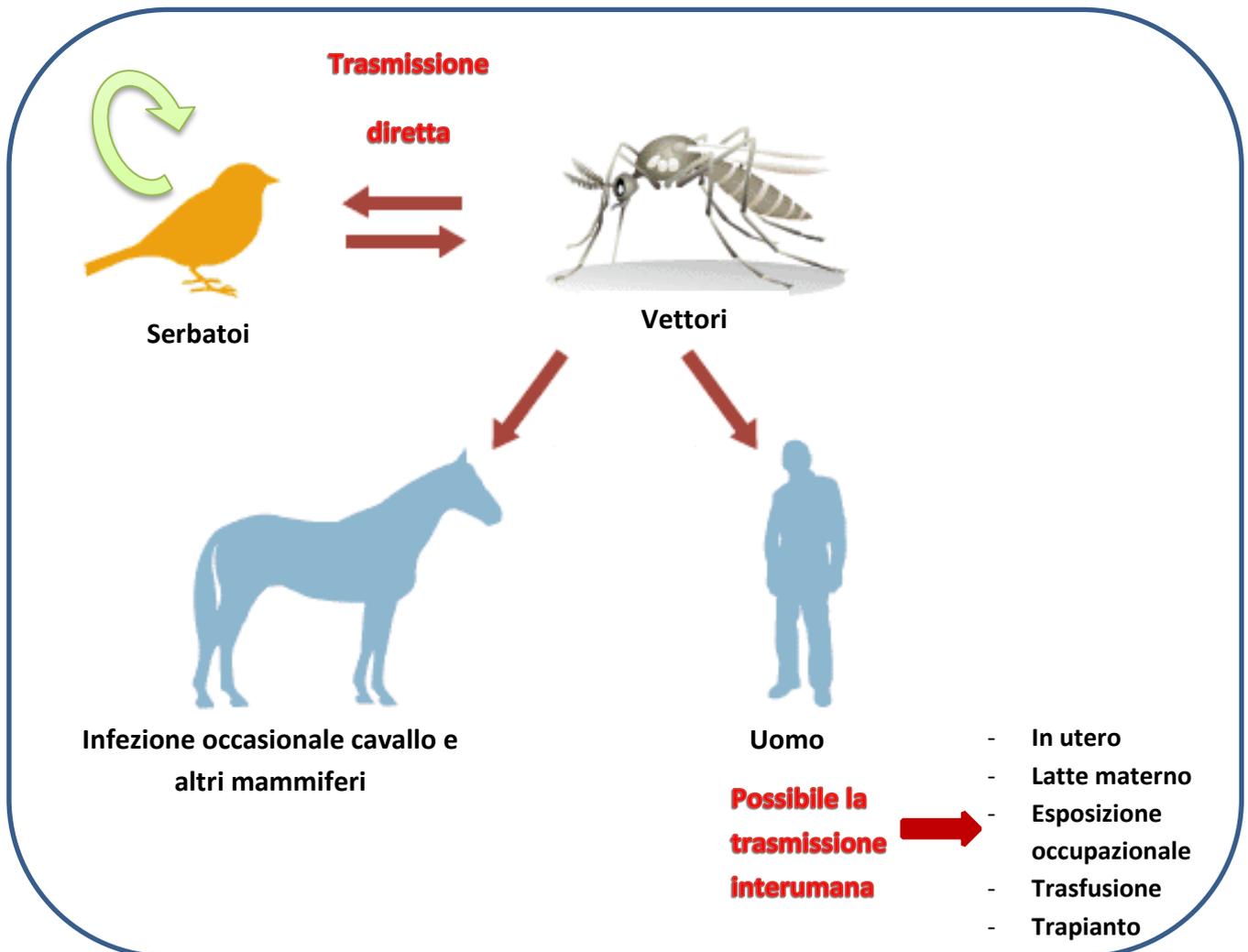


Figura 3 : Ciclo di trasmissione della West Nile Disease ( adattato da msm encarta – ©Microsoft).

## 2. Scopi del lavoro

Il presente lavoro si inserisce in un più esteso programma di monitoraggio di nuovi focolai di West Nile Disease della regione Veneto e condotto dal Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

Gli scopi di questo lavoro di ricerca sono stati:

- Valutare il rapporto tra le due forme ecologiche del complesso *Culex pipiens* (*Cx. pipiens pipiens* e *Cx. pipiens molestus*) nei siti d'indagine mediante l'applicazione della tecnica dell'analisi degli enzimi di restrizione (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism) messa a punto in Russia da Shaikevic (2007).
- Valutare la presenza di una relazione tra forma ecologica identificata e habitat.
- Valutare la presenza di una relazione tra pasto di sangue e forma ecologica. L'identificazione del pasto di sangue ottenuta mediante sequenziamento della COI è stata eseguita presso il laboratorio di parassitologia dell'IZSvenezie.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Zone di prelievo

I campioni analizzati sono stati raccolti in 21 siti di campionamento dislocati nel nord est d'Italia. In particolare alcune provincie appartenenti alle regioni del Veneto e del Friuli Venezia Giulia.

Le località di campionamento sono state scelte considerando parametri ambientali, ecologici ed epidemiologici. I siti sono stati scelti in base alle seguenti caratteristiche :

- aree con elevata presenza di raccolta d'acqua stagnante favorevole allo sviluppo delle zanzare, come lagune, stagni, aree irrigue, risaie, ecc.;
- aree con elevata presenza di uccelli; in particolare uccelli migratori che frequentano le aree umide;
- aree con presenza di allevamenti equini dove è stata precedentemente segnalata la circolazione virale;
- aree a biotopo diverso usate come controllo.

Nella Tabella che segue vengono elencati i diversi siti di campionamento; per ogni luogo è stato specificato: il numero di identificazione della località di campionamento (ID SITO); il nome del comune; il nome della provincia d'appartenenza del comune; le coordinate cartesiane ( latitudine e longitudine ) e le caratteristiche del sito (es. area agricola; zona industriale ecc.). Le caratteristiche di ciascun sito sono state determinate mediante il programma CORINE (COoRdination of INformation on the Environnement).

ID-SITO	COMUNE	PROVINCIA	COORDINATE	CARATTERISTICHE SITO
1	Caorle	Venezia	Lat: 45,6062923412472 Long: 12,8770891263046	Area industriale
3	Quarto D'Altino	Venezia	Lat: 45,5589201764633 Long: 12,4293676691296	Area agricola
4	Venezia	Venezia	Lat: 45,5193996545932 Long: 12,2135788742086	Area urbana
6	Campagna Lupia	Venezia	Lat: 45,3612494916435 Long: 12,1390379965439	Laguna
9	Papozze	Rovigo	Lat: 44,9861460360422 Long: 12,0495864728656	Area agricola
14	Trecenta	Rovigo	Lat: 45,0100257533902 Long: 11,4615382211061	Area agricola
18	Brugine	Padova	Lat: 45,2837604463551 Long: 11,9995911709607	Area agricola

162	Ficarolo	Rovigo	Lat: 44,9639144422975 Long: 11,4550278123559	Area agricola
163	Castelnovo Bariano	Rovigo	Lat: 45,0513823375177 Long: 11,3488551723893	Area agricola
165	Casaleone	Verona	Lat: 45,1571350876077 Long: 11,2102490766052	Area agricola
179	Salgareda	Treviso	Lat: 45,6930421812408 Long: 12,5506960250013	Area agricola
184	Vicenza	Vicenza	Lat: 45,5194056413934 Long: 11,5850812612342	Oasi
193	Erbè	Verona	Lat: 45,2347709955983 Long: 11,0024980462595	Area agricola
202	Villaga	Vicenza	Lat: 45,40480511 Long: 11,54181172	Area agricola
210	Palazzolo dello Stello	Udine	Lat: 45,7858634968623 Long: 13,0851029998056	Area agricola
211	Bagnaria Arsa	Udine	Lat: 45,8937106257217 Long: 13,295942639471	Area agricola
217	Fiume Veneto	Pordenone	Lat: 45,9118521440148 Long: 12,7220052750156	Area agricola
218	San Vito al Tagliamento	Pordenone	Lat : 45,9146237649142 Long: 12,8945051938065	Area agricola
227	Ceneselli	Rovigo	Lat: 45,005233 Long: 11,378950	Area agricola
228	Ariano nel Polesine	Rovigo	Lat: 44,944259 Long: 12,126829	Area Urbana
229	Taglio di Po	Rovigo	Lat: 45,001155 Long: 12,202418	Area Urbana

Tabella 1 : Caratteristiche generali dei siti di campionamento



Figura 4 : Localizzazione geografica dei siti di campionamento. I numeri rappresentano i codici identificativi di ciascun sito.

Di seguito vengono presentate le foto satellitari dei 21 siti di campionamento. Viene indicato il luogo preciso di posizionamento della trappola attraverso un cerchio rosso.

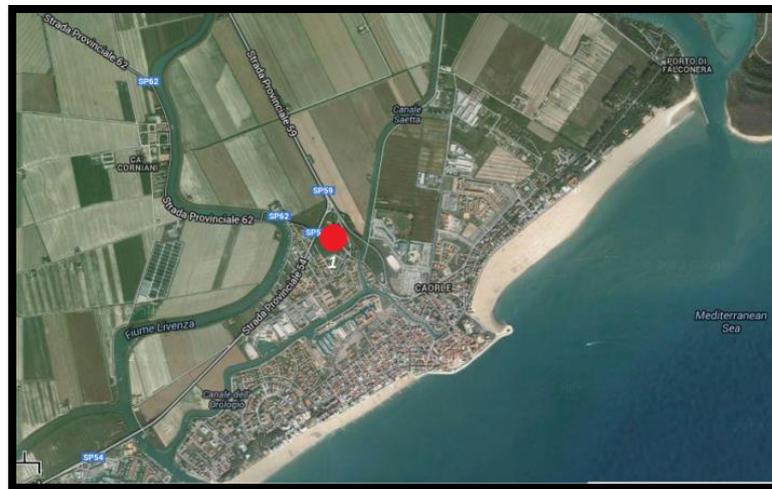


Figura 5: Foto satellite del sito di campionamento di Caorle (VE).

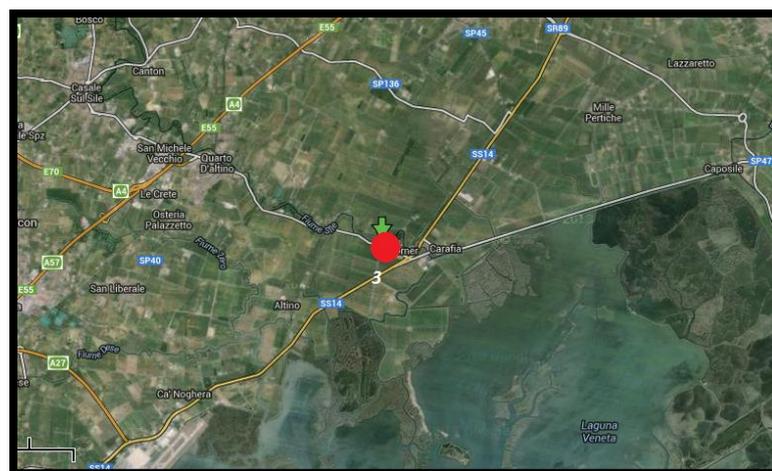


Figura 6: Foto satellite del sito di campionamento di Quarto d'Altino (VE).

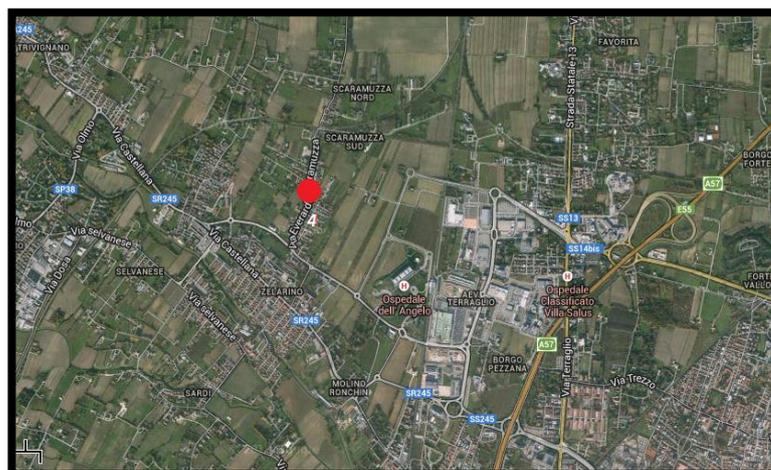


Figura 7: Foto satellite del sito di campionamento di Venezia.

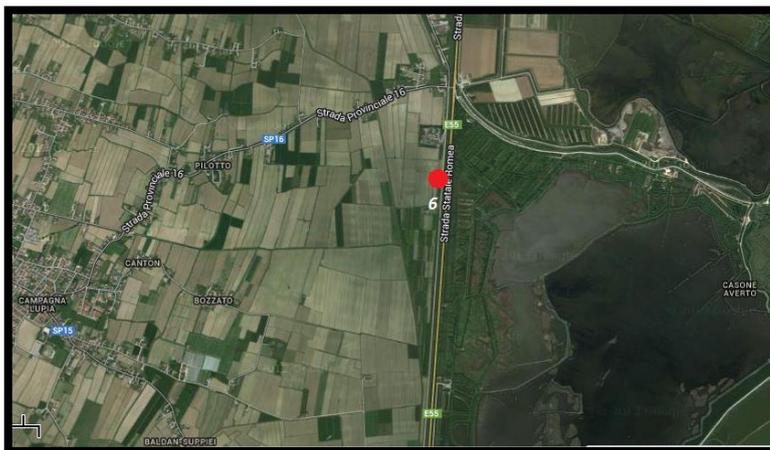


Figura 8: Foto satellite del sito di campionamento di Campagna Lupia (VE).

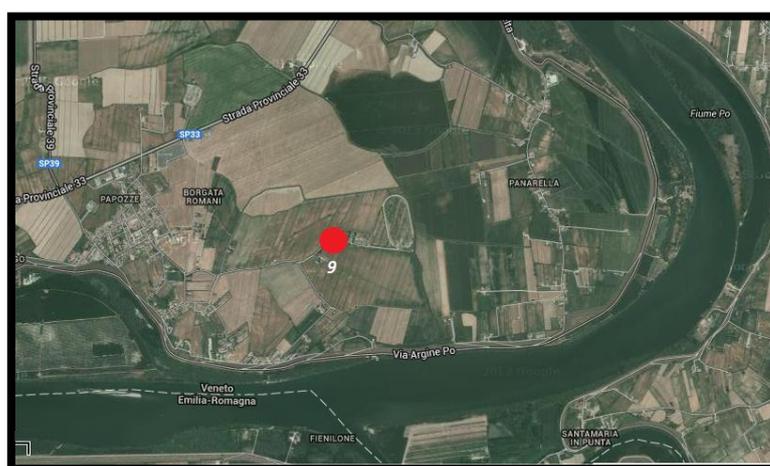


Figura 9: Foto satellite del sito di campionamento di Papozze (RO).

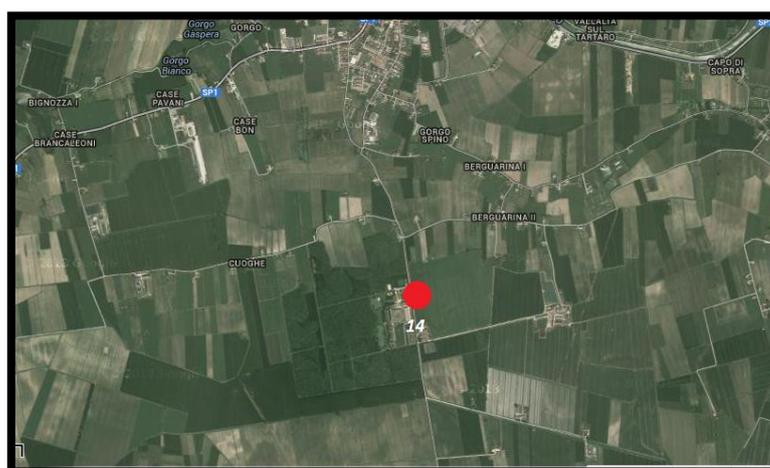


Figura 10: Foto satellite del sito di campionamento di Trecenta (RO).

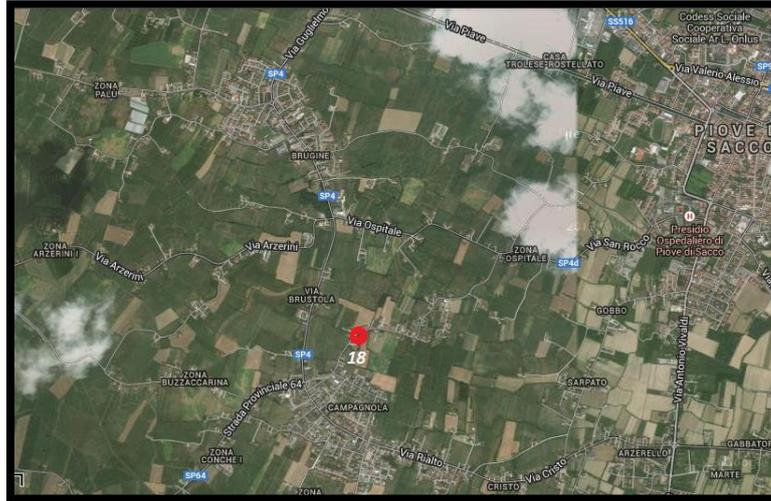


Figura 10: Foto satellite del sito di campionamento di Brugine (PD).

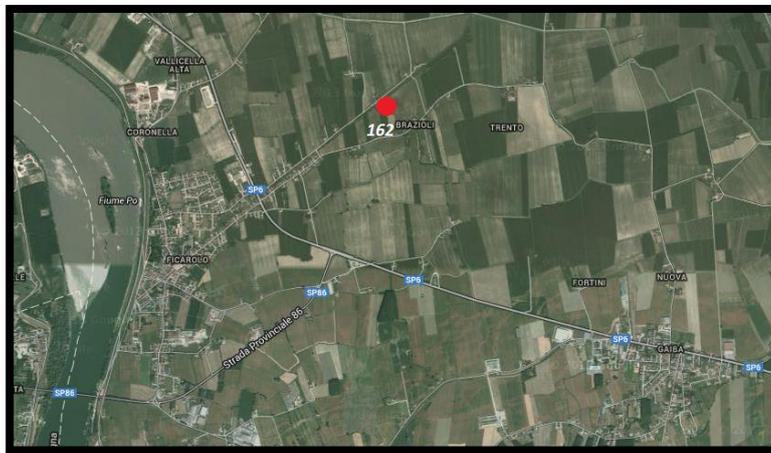


Figura 11: Foto satellite del sito di campionamento di Ficarolo (RO).

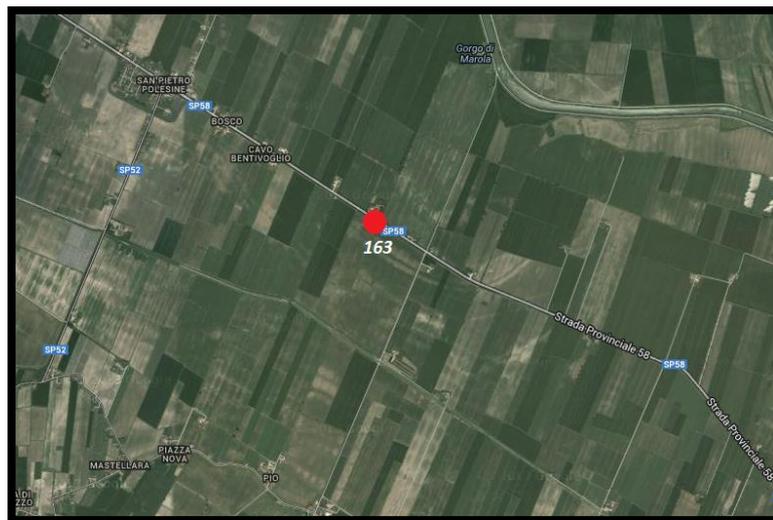


Figura 12: Foto satellite del sito di campionamento di Castelnovo Bariano (RO).

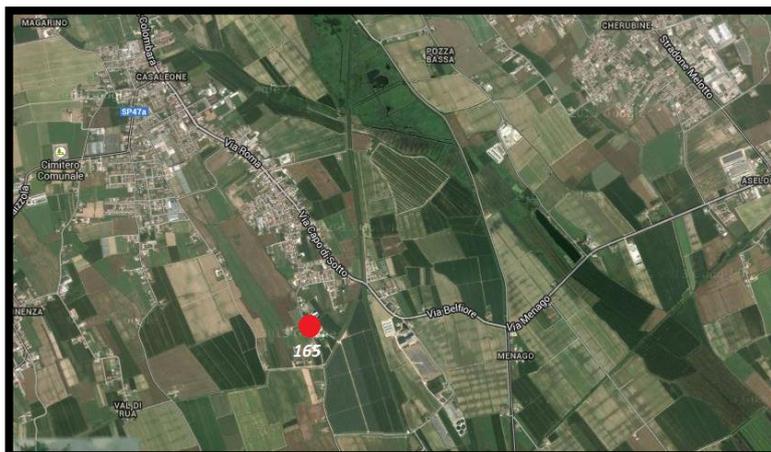


Figura 13: Foto satellite del sito di campionamento di Casaleone (VR).

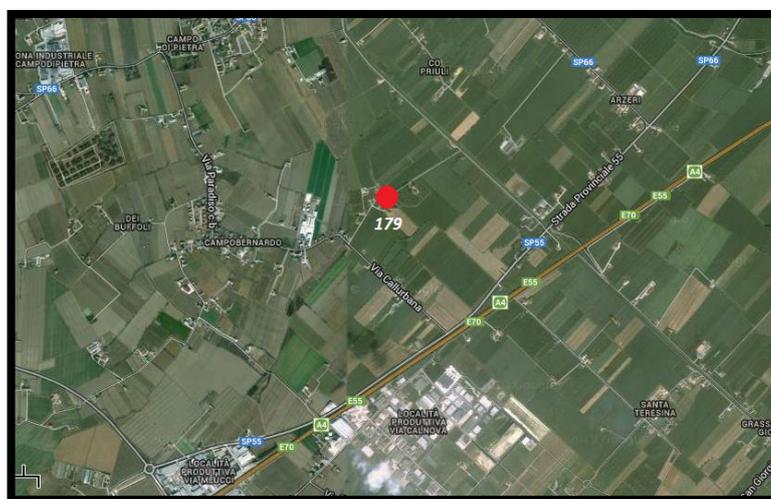


Figura 14: Foto satellite del sito di campionamento di Salgareda (TR).

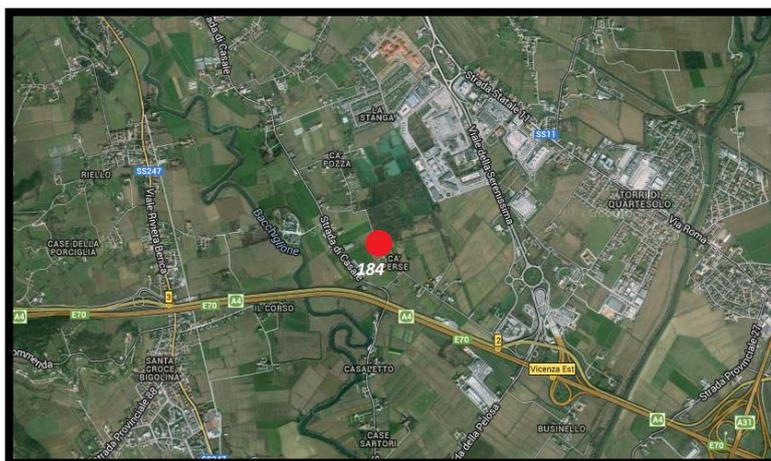


Figura 15: Foto satellite del sito di campionamento di Vicenza.

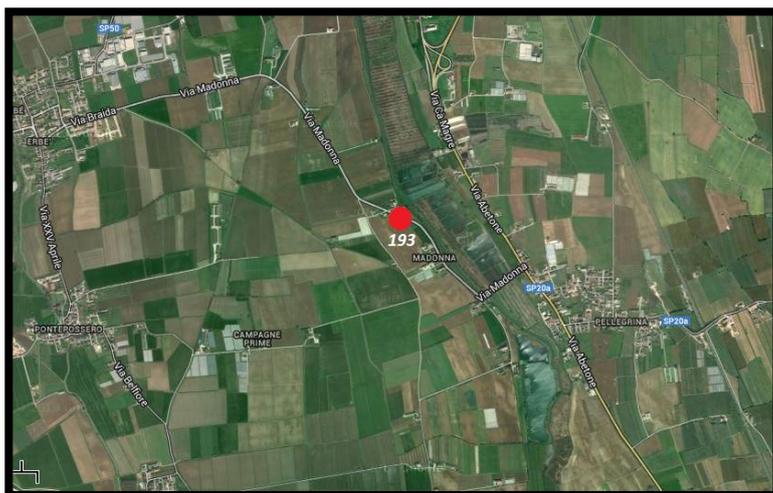


Figura 16: Foto satellite del sito di campionamento di Erbè (VR).

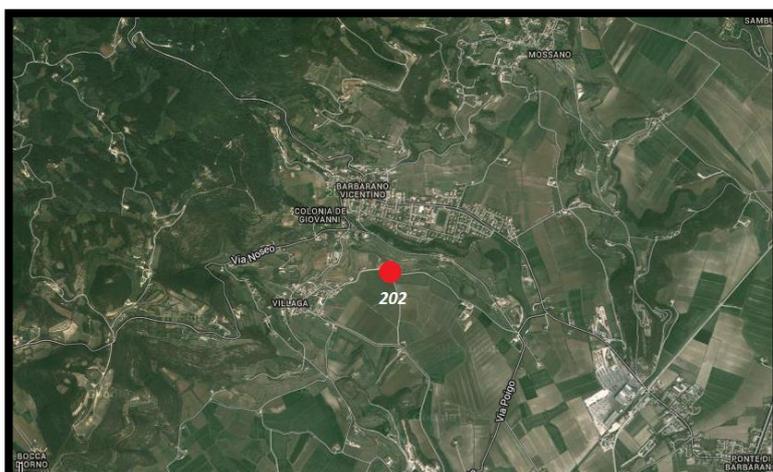


Figura 16: Foto satellite del sito di campionamento di Villaga (VI).

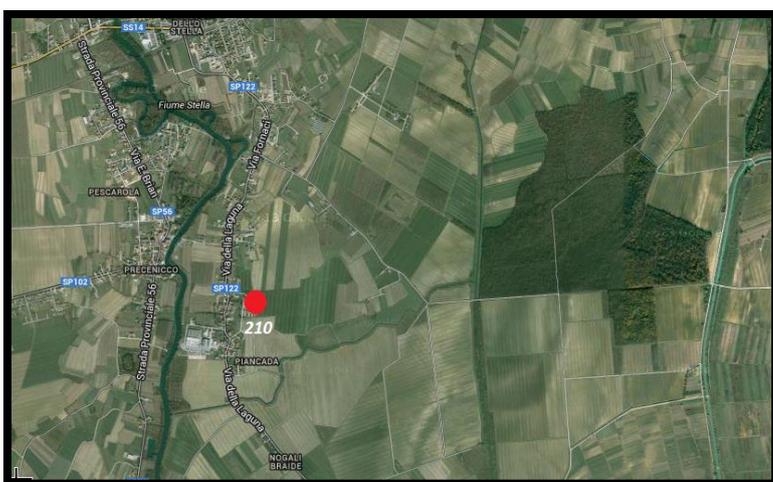


Figura 17: Foto satellite del sito di campionamento di Palazzolo dello Stella (UD).

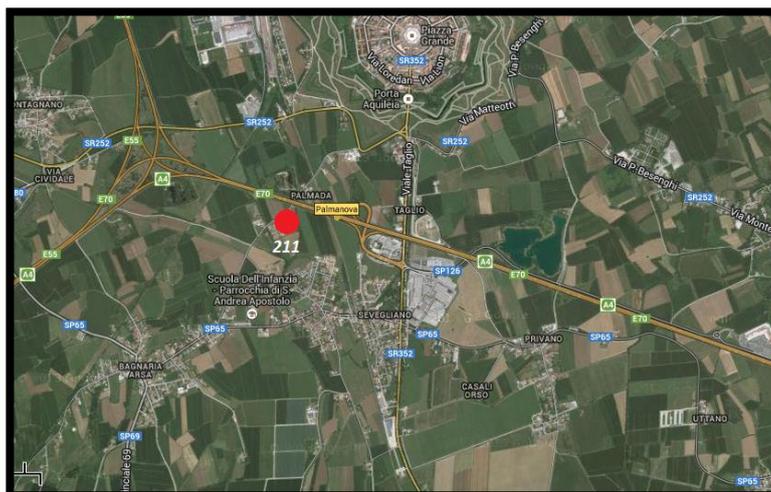


Figura 18: Foto satellite del sito di campionamento di Bagnaria Arsa (UD).

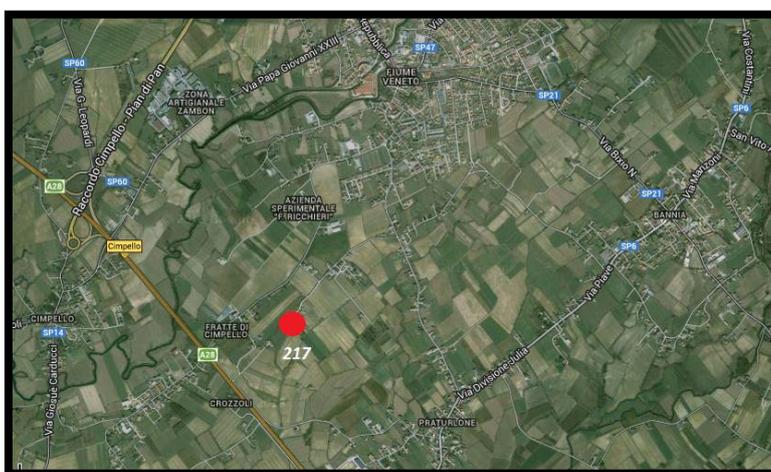


Figura 19: Foto satellite del sito di campionamento di Fiume Veneto (PN).

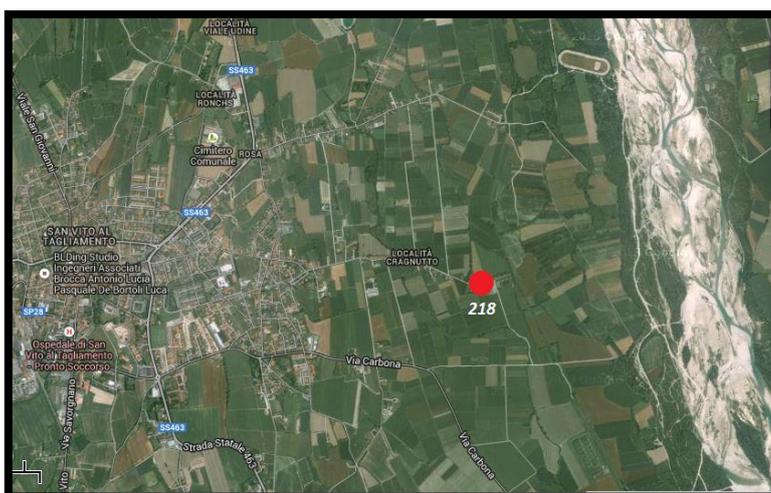


Figura 19: Foto satellite del sito di campionamento di San Vito al Tagliamento (PN).

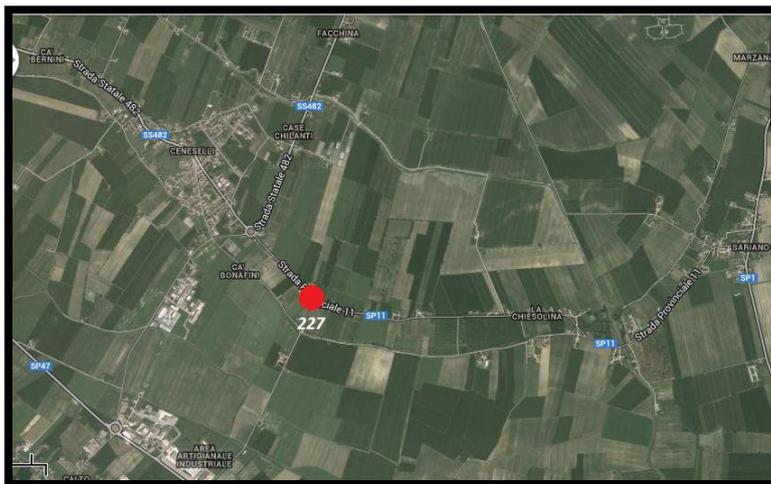


Figura 20: Foto satellite del sito di campionamento di Ceneselli (RO).

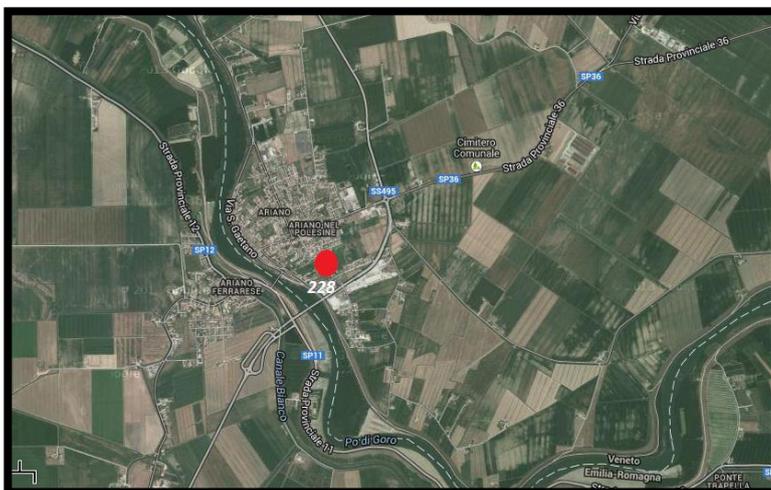


Figura 21: Foto satellite del sito di campionamento di Arino nel Polesine (RO).

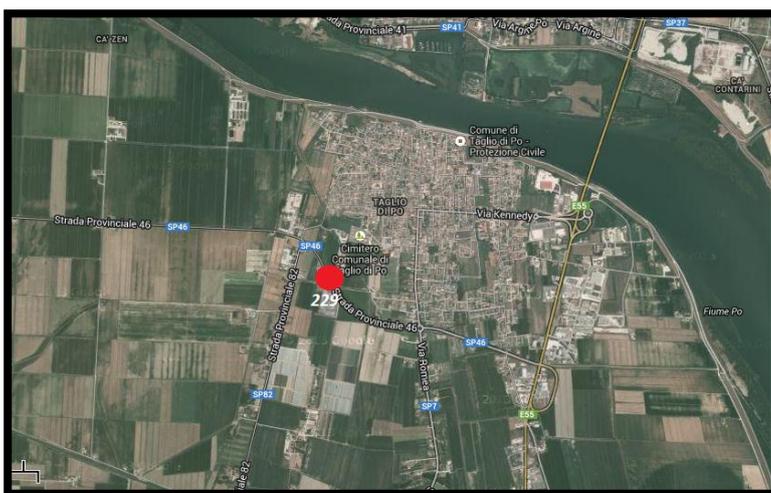


Figura 22: Foto satellite del sito di campionamento di Taglio di Po (RO).

### 3.2 CORINE Land Cover

Il progetto CORINE-Land Cover fa parte del programma CORINE (COoRdination de l' INformation sur l' Environnement), varato dal Consiglio delle Comunità Europee nel 1985. Il progetto CORINE Land Cover ha permesso la realizzazione di una cartografia della copertura del suolo alla scala di 1:100.000, con una legenda di 44 voci su 3 livelli gerarchici, e fa riferimento ad unità spaziali omogenee o composte da zone elementari appartenenti ad una stessa classe, di superficie significativa rispetto alla scala, nettamente distinte dalle unità che le circondano e sufficientemente stabili per essere destinate al rilevamento di informazioni più dettagliate.

Le tipologie ambientali utilizzate per la caratterizzazione dei siti di campionamento sono state desunte dalle categorie CORINE Land Cover (<http://dataservice.eea.eu.int/dataservice/>). Tali categorie sono suddivise in più livelli gerarchici; al primo corrispondono categorie ambientali molto generali (1. Superfici artificiali; 2. Zone agricole; 3. Boschi aree seminaturali; 4. Zone umide; 5. Corpi d'acqua). All'aumentare del livello la caratterizzazione dell'ambiente diviene più specifica (ad esempio, la categoria di secondo livello 3.1 rappresenta i "Boschi", la categoria di terzo livello 3.1.1 rappresenta i "Boschi di latifoglie" e la categoria di quarto livello 3.1.1.1 rappresenta i "Boschi a prevalenza di leccio o/e sughera"). Le variabili ambientali CORINE di secondo livello sono in tutto 15 e includono al loro interno 45 variabili di terzo livello e 18 variabili di quarto livello (Tabella 2).

Livello 1	Livello 2	Livelli successivi
1. Superfici artificiali	1.1 Zone edificate	2 categorie livello 3
	1.2 Infrastrutture	3 categorie livello 3
	1.3 Terreni artefatti	3 categorie livello 3
	1.4 Aree di verde attrezzato	2 categorie livello 3
2. Zone agricole	2.1 Seminativi	3 categorie livello 3 2 categorie livello 4
	2.2 Colture permanenti	4 categorie livello 3
	2.3 Pascoli e prati permanenti	1 categoria livello 3
	2.4 Aree agricole eterogenee	4 categorie livello 3
3. Boschi e aree seminaturali	3.1 Boschi	3 categorie livello 3 12 categorie livello 4
	3.2 Associazioni arbustive od erbacee	4 categorie livello 3 4 categorie livello 4
	3.3 Aree aperte con vegetazione scarsa o nulla	5 categorie livello 3
4. Zone umide	4.1 Zone umide interne	2 categorie livello 3
	4.2 Zone umide costiere	3 categorie livello 3
5. Corpi d'acqua	5.1 Acque interne	2 categorie livello 3
	5.2 Acque marine	3 categorie livello 3

Tabella 2: Suddivisione delle categorie *CORINE Land Cover* in livelli successivi. Per ogni variabile di secondo livello e indicato il numero di variabili di terzo e, ove presenti, di quarto livello.

### 3.3 Materiale biologico

Nel 2012 sono stati raccolti gli esemplari di culicidi dal personale autorizzato del Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSvenezie), per la sorveglianza entomologica del virus della West Nile (WNV).

Gli individui analizzati sono stati catturati attraverso le trappole ad anidride carbonica ("CDC-CO<sub>2</sub>"). Tali trappole attraggono nella maggior parte dei casi zanzare femmine in ricerca di ospiti per compiere il pasto di sangue. Vengono innescate con una quantità prestabilita di ghiaccio secco contenuto in un recipiente adiabatico, il ghiaccio sublimando produce una nube di anidride carbonica che si propaga all'esterno del contenitore, perché provvisto di fori. Le zanzare sono attratte dal gradiente del gas e finiscono per entrare nel raggio d'azione di una ventola che le aspira attraverso un imboccatura, spingendole all'interno di un sacchetto di tulle. Le trappole sono state attivate dalle ore 17:00 alle ore 8:00 del giorno seguente. La frequenza di campionamento è stata di ogni 7-15 giorni. Le zanzare catturate sono state trasportate al Laboratorio di Parassitologia dell'IZSvenezie in un frigo portatile a +4°C nel più breve tempo possibile. Arrivate al laboratorio sono state identificate dal personale incaricato, sono state suddivise le zanzare con il pasto di sangue da quelle senza. Le zanzare con il pasto di sangue sono state riconosciute osservandole allo stereoscopio, il loro addome è risultato ingrossato e di colore rosso scuro. La trappola a CO<sub>2</sub> non è il principale metodo di cattura delle zanzare con pasto di sangue, comunque durante l'annata 2012 sono state riconosciute 458 zanzare con il pasto di sangue per l'elevata densità di tali insetti. Ogni zanzara con il pasto di sangue è stata inserita singolarmente all'interno di un microtubo di 2ml, gli è stato dato un numero identificativo ed è stata conservata in frigo a una temperatura di -20°C, la quale permette la conservazione del DNA della zanzara e del pasto di sangue.



Figura 24: Zanzara con l'addome ingrossato e rosso perché contenente il pasto di sangue (©Martin Dohrn, [www.arkive.org](http://www.arkive.org)).



Figura 25: Trappola all'anidride carbonica utilizzata per la sorveglianza entomologica della WND.

ID-SITO	COMUNE	CAMPIONI TOTALI
1	Caorle	7
3	Quarto D'Altino	7
4	Venezia	14
6	Campagna Lupia	11
9	Papozze	7
14	Trecenta	10
18	Brugine	7
162	Ficarolo	20
163	Castelnovo Bariano	39
165	Casaleone	14
179	Salgareda	26
184	Vicenza	22
193	Erbè	12
202	Villaga	13
210	Palazzolo dello Stella	31
211	Bagnaria Arsa	12
217	Fiume Veneto	7
218	San Vito al Tagliamento	9
227	Ceneselli	10
228	Ariano nel Polesine	28
229	Taglio di Po	59
<b>TOTALE</b>		<b>365</b>

Tabella 3 : Siti di campionamento con il proprio codice identificativo (ID SITO ) e i campioni analizzati per ogni sito.

### 3.4 Analisi genetica

Il lavoro di analisi genetica è stato compiuto in due diversi laboratori di ricerca. L'estrazione del DNA delle zanzare con il pasto di sangue è stato fatto nel Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, mentre l'amplificazione del DNA mitocondriale dell'insetto e l'impiego degli enzimi di restrizione sono stati fatti nel Laboratorio di Entomologia del DAFNAE.

#### 3.4.1 Estrazione del DNA della zanzara con pasto di sangue



Figura 26 : Cappa biologica del Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie dove sono state fatte tutte le estrazioni.



Figura 27 : Incubatrice e centrifughe del Laboratorio di Parassitologia dell'istituto Zooprofilattico della Venezie.

L'estrazione delle 365 zanzare con il pasto di sangue "feed" è stata svolta nel laboratorio di parassitologia dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie. E' stato utilizzato il kit DNeasy Blood & tissue QUIAGEN.

L'addome di ogni singola zanzara è stato separato dal resto del corpo in condizioni microbiologicamente controllate all'interno di una cappa biologica con l'aiuto di due pinzette precedentemente sterilizzate . L'addome è stato trasferito in un microtubulo da 2 ml, dove sono stati aggiunti 150µl di buffer ATL. Il tessuto è stato omogenizzato con un pestello sterile. Successivamente sono stati aggiunti 20µl di proteasiK, ed il tutto è stato lasciato in incubazione a 56°C per 30 minuti, periodo sufficiente alla completa lisi del campione. Dopo che l'incubazione è stata terminata sono stati aggiunti 200µl di buffer AL e 200µl di etanolo assoluto ed è stato agitato con un vortex per 15 secondi. In un secondo tempo è

stata trasferita la miscela nella colonnina filtrante posta su un tubo di raccolta da 2ml e centrifugato a 8000 rpm per un minuto. Il filtrato è stato eliminato e la colonnina filtrante è stata

posta in un nuovo tubo. Nel filtro è stato fissato il DNA della zanzara e del pasto di sangue. Sono stati aggiunti 500µl di Buffer AW1 ed è stato centrifugato a 8000rpm per 1 minuto, è stato eliminato il filtrato ed è stata posta la colonnina filtrante in un nuovo tubo. Sono stati aggiunti 500µl di Buffer AW2 ed è stato centrifugato a 8000rpm per 1 minuto, è stato eliminato il filtrato ed è stata posta la colonnina filtrante in un nuovo tubo. Questi due passaggi permettono di pulire il filtro da sostanze diverse del DNA. Per asciugare bene il filtro dall'etanolo che potrebbe inibire l'amplificazione del DNA è stato centrifugato a 12000rpm per 2 minuti; è stato eliminato il filtrato ed è stata posta la colonnina su un microtubulo da 1,5ml. Poi sono stati aggiunti 100µl di buffer AE, il tutto è stato centrifugato a 8000rpm per 1 minuto. Il buffer AE è fondamentale per permettere la discesa del DNA fino a prima intrappolato nel filtro. Infine è stato eliminato il filtro, in quanto il DNA si trovava nell'eluato. Una parte del DNA estratto è stata prelevata per amplificare il DNA dell'insetto presso il Laboratorio di Entomologia. Il DNA restante è stato usato per l'analisi del pasto di sangue. Il DNA è stato conservato a -20°C.

### 3.4.2 Amplificazione del DNA mitocondriale



Figura 28 : Termociclatore PTC – 100 utilizzato per l'amplificazione del DNA mitocondriale.

E' stato amplificato una regione del DNA mitocondriale che comprendeva parte del Citocromo Ossidasi I. La PCR è stata effettuata in un volume totale di 20µl con:

- 4,0µl di Buffer IX (Promega)
- 2,0µl di MgCl<sub>2</sub>;
- 1,0µl di dNTP 2mM;
- 1,0µl di *primer forward*;
- 1,0µl di *primer reverse*;
- 0,2µl di Taq polimerasi (Promega);
- 8,8µl di H<sub>2</sub>O;
- 2µl di DNA.

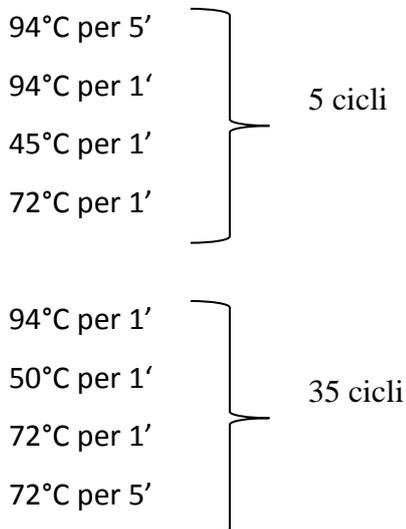
Sono state moltiplicate queste dosi per il numero di campioni da amplificare, il tutto è stato messo in un microtubulo da 1,5ml e poi sono stati prelevati 18µl per ogni strip in cui successivamente sono stati aggiunti 2µl di DNA.

Sono stati utilizzati i primer consigliati dal sito Bold System:

LCO1490 (forward): GGTCACAAATCATAAAGATATTG

HCO2198 (reverse): TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA

Tutte le reazioni di amplificazione sono state condotte secondo il seguente profilo:



I prodotti amplificati sono stati separati in gel d'agarosio 1% e osservati sotto UV con il colorante SYBR® Safe.

### 3.4.3 RFLP ( Restriction Fragment Length Polymorphism )



Figura 29 : Termociclatore utilizzato per la RFLP degli amplificati.

I 365 amplificati sono stati digeriti usando l'enzima HaeIII (Euroclone). Le restrizioni sono state condotte in un volume finale di 10µl. La mix di digestione è stata costituita da:

- 1,5µl del prodotto di PCR COI
- 0,25µl di enzima;
- 1µl di buffer
- 7,25µl di ddH<sub>2</sub>O

La reazione di restrizione è stata condotta incubando per 3 ore a 37°C. I prodotti di digestione sono stati visualizzati in un gel di agarosio al 2% e osservati sotto UV con il colorante SYBR® Safe.

### 3.4.4 Amplificazione del DNA del Pasto di sangue

Per l'amplificazione e rilevazione del pasto di sangue è stata utilizzata una metodica di nestedPCR (Alcaide et al. 2009), che permette di amplificare 758 paia di basi del gene COI.

## 4. Risultati

### 4.1 Presenza di *Cx. molestus* e *Cx. pipiens* nel territorio

Per ciascun sito si sono considerate solo gli esemplari appartenenti al complesso *Cx. pipiens* in senso lato che hanno sempre comunque rappresentato la grande maggioranza delle catture. Nell'ambito di queste si sono considerate solo le zanzare "feed" che nel totale delle catture hanno sempre rappresentato una percentuale ristrettissima (circa lo 0.46%).

Complessivamente sono state catturate con la sorveglianza entomologica per la West Nile Disease del 2012: 365 individui con pasto di sangue (feed) appartenenti al complesso *Cx. pipiens*. Le analisi genetiche (RFLP) hanno permesso di identificare la forma biologica di tali feed. 330 (90%) sono risultate avere un profilo tipico di *Cx. pipiens molestus* e 35(10%) di *Cx. pipiens pipiens*. La forma *Cx.molestus* è risultata predominante in tutti i siti di indagine (n=15) ed in alcuni esclusiva (n=6) (Figura 30).

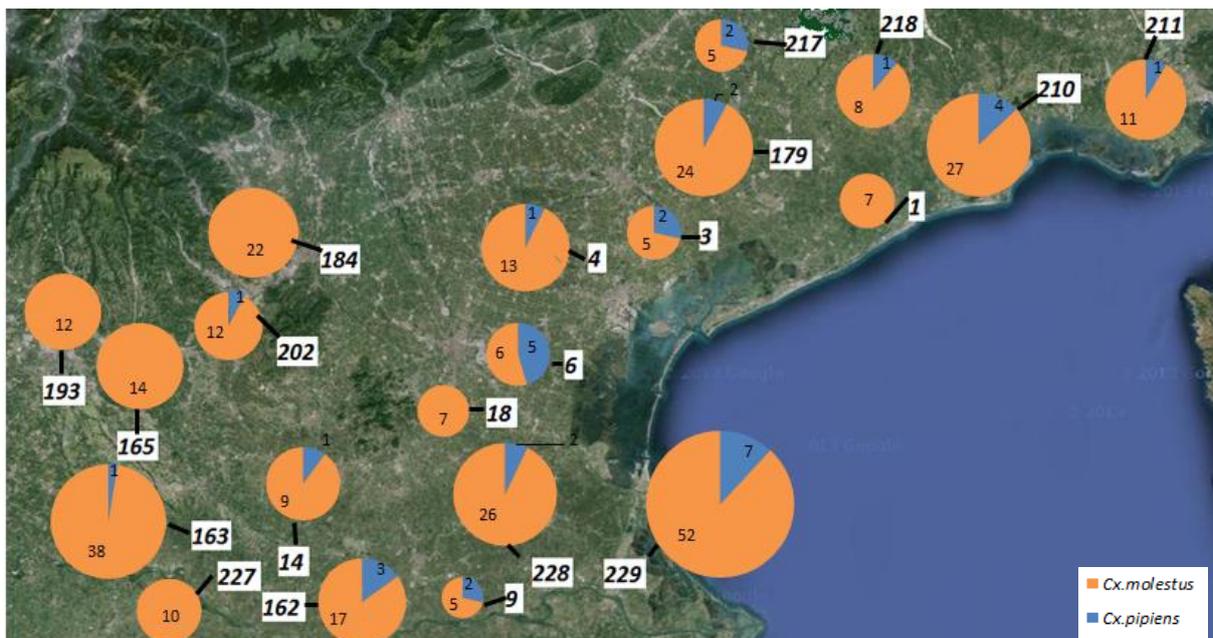


Figura 30 : Rappresentazione grafica dei risultati della RFLP nei 21 siti di campionamento.

Al fine di verificare se le differenze osservate nella proporzione di *Cx. molestus* e *Cx. pipiens* tra i vari siti di indagine siano statisticamente significative è stata costruita una tabella di contingenza e calcolate le frequenze attese ( Tabella 4).

Sito di campionamento	Variabili	Osservati	Attesi	Chi-quadrato
Quarto	<i>Cx.pipiens</i>	2	0,7	2,6
d'Altino	<i>Cx.molestus</i>	5	6,3	0,3
Brugine	<i>Cx.pipiens</i>	1	2,7	1,1
Venezia	<i>Cx.molestus</i>	27	25,3	0,1
Caorle				
Campagna	<i>Cx.pipiens</i>	5	1,1	14,8
Lupia	<i>Cx.molestus</i>	6	9,9	1,6
	<i>Cx.pipiens</i>	2	0,7	2,6
Papozze	<i>Cx.molestus</i>	5	6,3	0,3
Castelnovo	<i>Cx.pipiens</i>	1	3,7	2,0
Bariano	<i>Cx.molestus</i>	38	35,3	0,2
	<i>Cx.pipiens</i>	0	1,3	1,3
Casaleone	<i>Cx.molestus</i>	14	12,7	0,1
	<i>Cx.pipiens</i>	2	2,5	0,1
Salgareda	<i>Cx.molestus</i>	24	23,5	0,0
	<i>Cx.pipiens</i>	0	2,1	2,1
Vicenza	<i>Cx.molestus</i>	22	19,9	0,2
	<i>Cx.pipiens</i>	0	1,2	1,2
Erbè	<i>Cx.molestus</i>	12	10,8	0,1
	<i>Cx.pipiens</i>	1	1,2	0,0
Villaga	<i>Cx.molestus</i>	12	11,8	0,0
Bagnaria Arsa	<i>Cx.pipiens</i>	5	4,1	0,2
Palazzolo dello Stella	<i>Cx.molestus</i>	38	38,9	0,0
San Vito al Tagliamento	<i>Cx.pipiens</i>	3	1,5	1,4
Fiume Veneto	<i>Cx.molestus</i>	13	14,5	0,1
Trecenta	<i>Cx.pipiens</i>	4	3,8	0,0
Ficarolo	<i>Cx.molestus</i>	36	36,2	0,0
Ceneselli				
Ariano nel Polesine	<i>Cx.pipiens</i>	2	2,7	0,2
	<i>Cx.molestus</i>	26	25,3	0,0
	<i>Cx.pipiens</i>	7	5,7	0,3
Taglio di Po	<i>Cx.molestus</i>	52	53,3	0,0

Tabella 4: Tabella di contingenza e frequenze delle proporzioni tra *Cx. pipiens* e *Cx. molestus*.

A causa di alcune basse frequenze attese, per quanto possibile, alcuni siti sono stati aggregati cercando di scegliere siti tra di loro vicini e omogenei dal punto di vista delle caratteristiche del territorio (Brugine, Caorle, Venezia; Bagnaria Arsa, Palazzolo dello Stella; San Vito al Tagliamento, Fiume Veneto; Trecenta, Ficarolo, Ceneselli) riducendo in questo modo i gradi di libertà da 20 a 14. Dall'analisi dei dati è emersa una relazione statisticamente molto significativa tra la presenza di *Cx. molestus* e *Cx. pipiens* e i vari siti di indagine (chi-quadrato=33.09; P=0.003). Andando ad esaminare i componenti individuali del chi-quadrato nella tabella emerge che i maggiori valori sono di 14,8 (*Cx. pipiens* nel sito Campagna Lupia) e 2,6 (*Cx. pipiens* nel sito Quarto d'Altino e nel sito Papozze). Inoltre, esaminando tali caselle nella tabella si nota che nel sito di Campagna Lupia, Quarto d'Altino e Papozze è stato catturato un numero di *Cx. pipiens* maggiore di quello atteso (Tabella 4).

Dall'analisi del territorio nel raggio di due chilometri dal luogo in cui è stata sistemata la trappola per il campionamento, emerge che tra tutti i siti di indagine solo i siti di Campagna Lupia e Quarto d'Altino presentano "Zone umide marittime" (ID 4.2.) così come definite dalle categorie del programma CORINE Land Cover ( Tabella 5).

Sito di campionamento	0	1.1.	1.2.	1.3.	1.4.	2.1.	2.2.	2.3.	2.4.	3.1.	3.2.	3.3.	4.1.	4.2.	5.1. A	5.2. A
Caorle	0,10	0,12	0,09	0,01	0,04	0,45	0,02	0,04	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,04	0,05
Quarto d'Altino	0,00	0,04	0,04	0,01	0,00	0,81	0,02	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,04	0,00
Venezia	0,00	0,20	0,13	0,05	0,02	0,46	0,05	0,06	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
Campagna Lupia	0,00	0,01	0,02	0,00	0,00	0,48	0,05	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,38	0,02	0,00
Papozze	0,10	0,05	0,02	0,00	0,01	0,63	0,05	0,02	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00
Trecenta	0,00	0,03	0,03	0,00	0,01	0,83	0,06	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
Brugine	0,00	0,15	0,03	0,00	0,00	0,77	0,02	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ficarolo	0,00	0,05	0,03	0,01	0,00	0,86	0,01	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
Castelnuovo Bariano	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,93	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
Casaleone	0,00	0,09	0,07	0,00	0,00	0,72	0,04	0,04	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
Salgareda	0,00	0,06	0,10	0,00	0,00	0,46	0,35	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Vicenza	0,00	0,13	0,18	0,01	0,01	0,54	0,02	0,07	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
Erbè	0,00	0,04	0,05	0,01	0,00	0,77	0,03	0,06	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
Villaga	0,00	0,05	0,00	0,02	0,00	0,28	0,05	0,00	0,34	0,12	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ceneselli	0,00	0,06	0,03	0,00	0,00	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ariano polesine	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,77	0,00	0,00	0,09	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
Taglio di Po	0,21	0,00	0,00	0,00	0,02	0,46	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,067	0

Tabella 5: Rappresentazione percentuale delle tipologie ambientali dei siti di campionamento della regione Veneto. I valori percentuali sono stati calcolate in un raggio di 2Km dal sito di campionamento.

In particolare il sito di Campagna Lupia che ha fatto registrare il maggior rapporto tra le catture di *Cx. pipiens* e *Cx. molestus*, risulta essere occupato da tali zone umide marittime per ben il 38% (Figura 31 e 32).

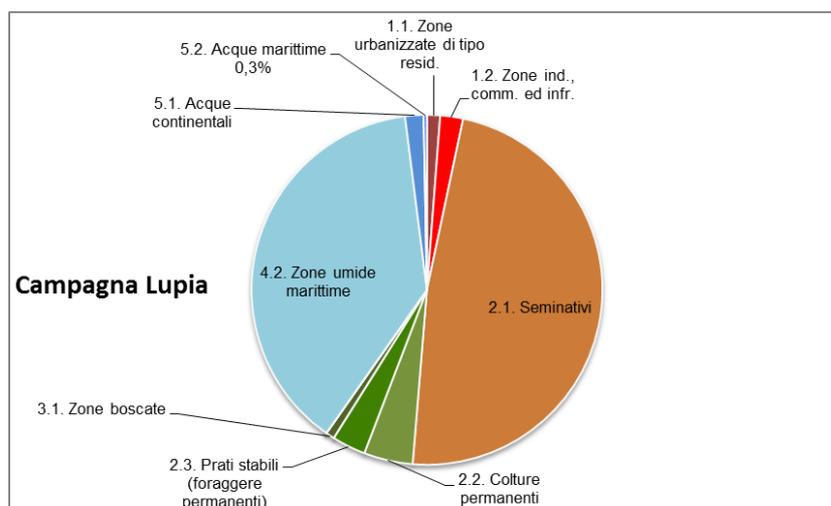


Figura 31: Rappresentazione grafica del territorio nel raggio di 2Km dal sito di campionamento di Campagna Lupia (VE).

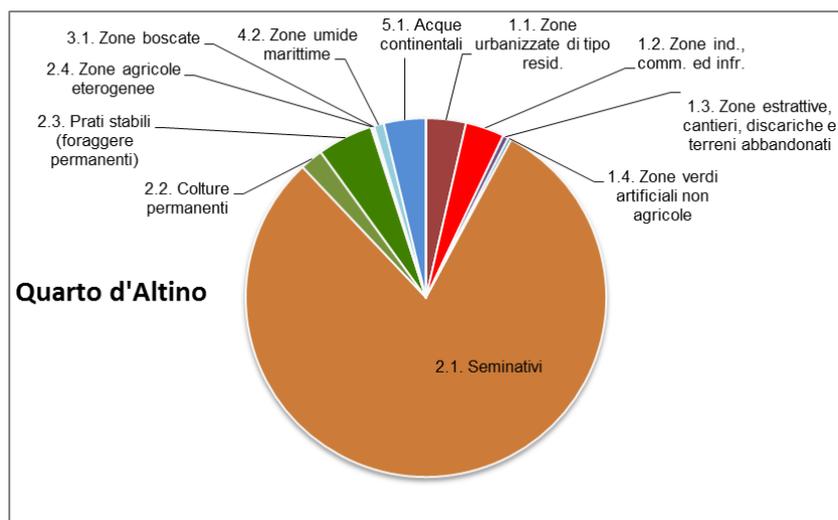


Figura 32: Rappresentazione grafica del territorio nel raggio di 2Km dal sito di campionamento di Quarto d’Altino (VE).

Per quanto riguarda il sito di Papozze dall’analisi del territorio è emerso che presenta la maggior percentuale di acque continentali ( Figura 33).

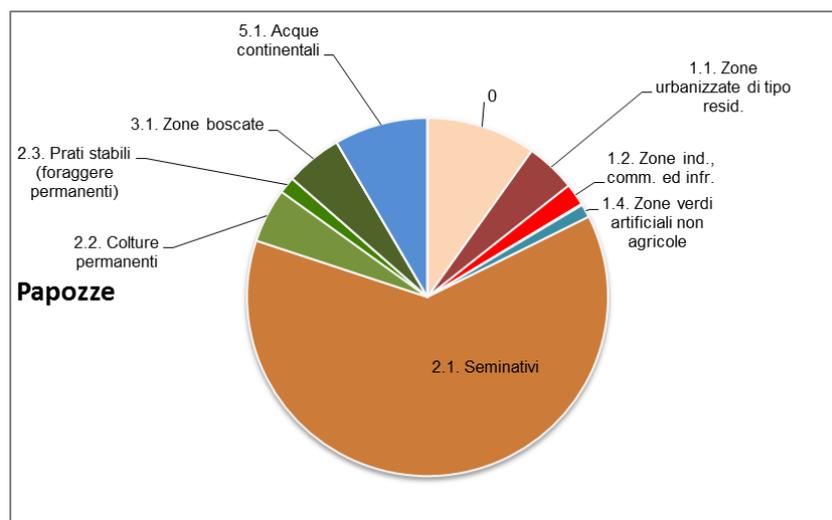


Figura 33: Rappresentazione grafica del territorio nel raggio di 2Km dal sito di campionamento di Papozze (RO).

Al contrario alcuni siti quali Vicenza (oltre il 31% del sito caratterizzato da aree urbane e industriali) e Castelnuovo Bariano (ben il 93% del territorio indagato costituito da seminativi) (Figura 34 e 35) hanno fatto rilevare un numero di catture di *Cx. pipiens* inferiore a quello atteso (Tabella 4).

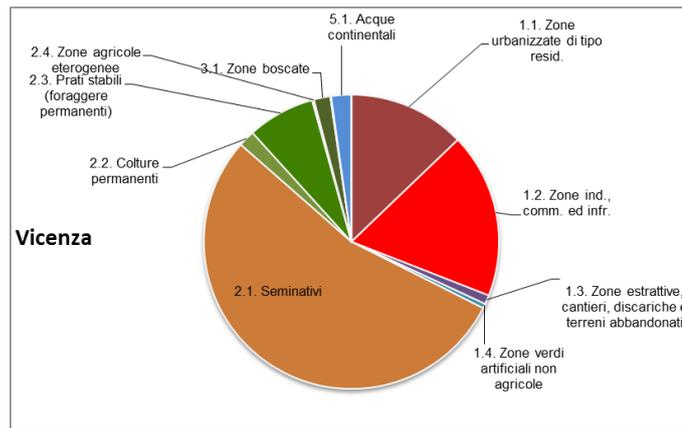


Figura 34: Rappresentazione grafica del territorio nel raggio di 2Km dal sito di campionamento di Vicenza.

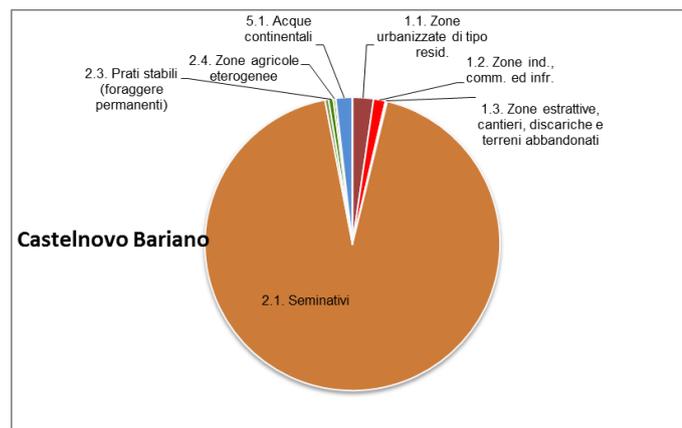


Figura 35: Rappresentazione grafica del territorio nel raggio di 2Km dal sito di campionamento di Castelnuovo Bariano (RO).

Dal confronto tra le catture dei siti posizionati in un raggio inferiore ai 50Km dalla costa e quelle dei siti dell'entroterra veneto e friulano è emerso in quest'ultimi un numero significativamente superiore di *Cx. molestus* rispetto a *Cx. pipiens* (chi-quadrato con correzione di Yates = 4.11;  $P=0,042$ ) ( Figura 36) .

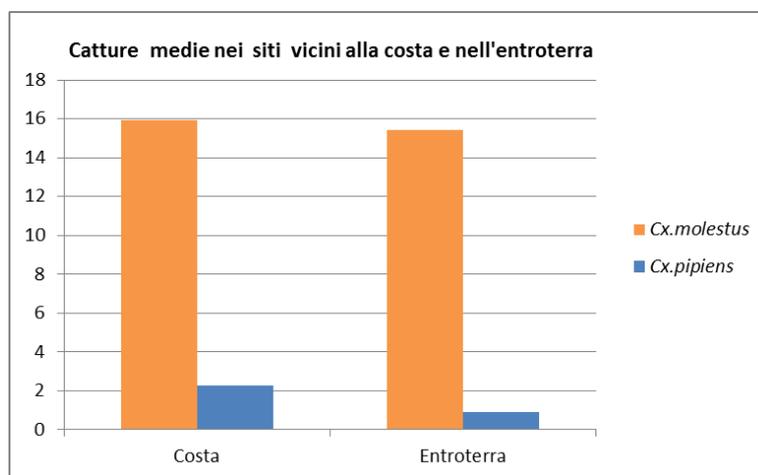


Figura 36: Catture medie del complesso *Cx. pipiens* nei siti di campionamento vicino alla costa e nell'entroterra.

Per quanto riguarda l'andamento medio di catture di zanzare feed nel tempo (dai primi di maggio ai primi di ottobre) dall'analisi dei dati emerge che solo in tre momenti tutti posizionati a fine stagione (tra fine agosto e primi di ottobre) il numero di *Cx. pipiens* supera quello di *Cx. molestus*. Tale fenomeno è dovuto più che a un aumento di *Cx. pipiens* ad una diminuzione delle catture di *Cx. molestus*. Il picco delle catture di *Cx. molestus* si è verificato nella seconda metà di luglio (Figura 37).

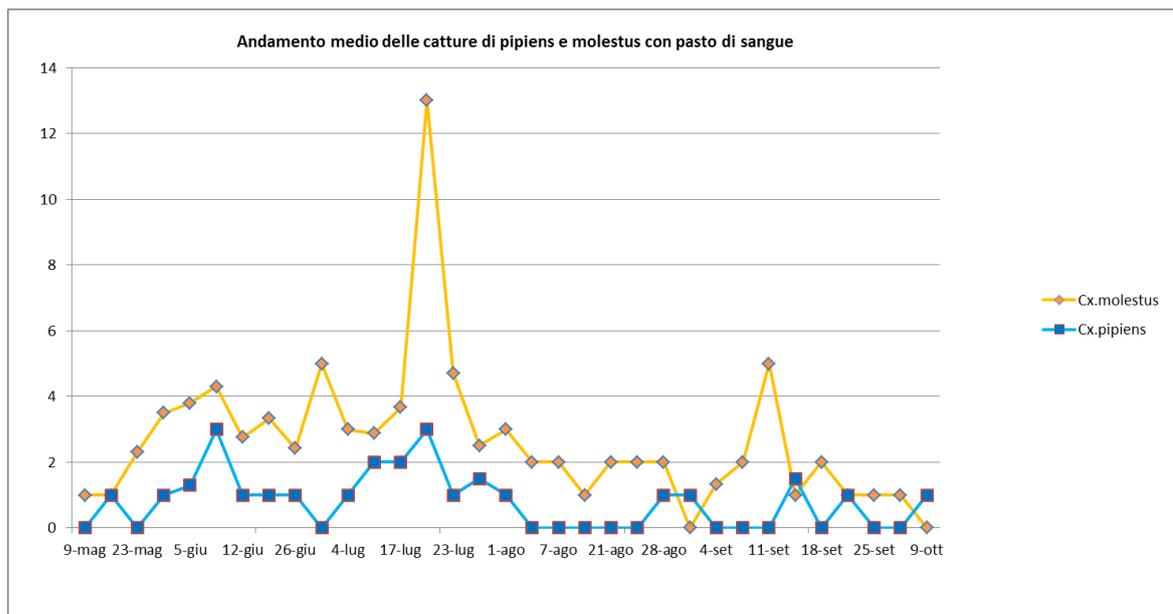


Figura 37 : Andamento temporale medio delle catture del complesso *Cx.pipiens*.

#### 4.2 Determinazione del pasto di sangue

Oltre al riconoscimento delle due sottospecie, l'analisi della COI ha consentito di identificare l'ospite su cui si è nutrita la zanzara. Con questa tecnica delle 365 zanzare feed catturate sono stati identificati i pasti di sangue di 122 esemplari (33,4%). Complessivamente sono state identificate 28 specie di animali diversi tra uccelli(n=21) e mammiferi(n=7). In un caso il pasto di sangue è risultato appartenere a un rettile (*Podarcis muralis*) (Figura 38). Nel totale 99 zanzare hanno punto uccelli e 22 hanno punto mammiferi. Inaspettatamente non ci sono state zanzare che hanno punto l'uomo.

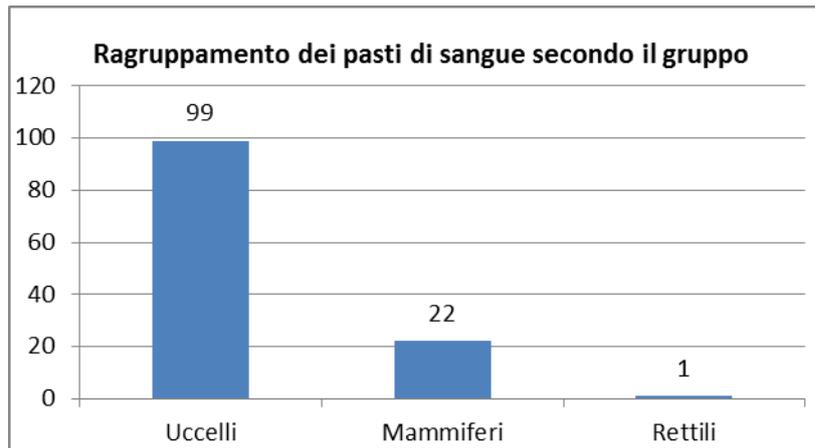


Figura 38: Raggruppamento dei pasti di sangue noti sulla base del gruppo animale.

Negli uccelli sono state riscontrate 21 specie diverse, tra queste il più frequente è risultato essere *Turdus merula* (26.3%; n=24), seguito dalla *Pica pica* per il 19% (n=19) e dal *Passer domesticus* per il 14,1%(n=14). Dieci specie di uccelli sono state rilevate un'unica volta (Figura 39). Sono disponibili anche pasti di sangue di specie di uccelli appartenenti allo stesso genere ( *Corvus* e *Columba*).

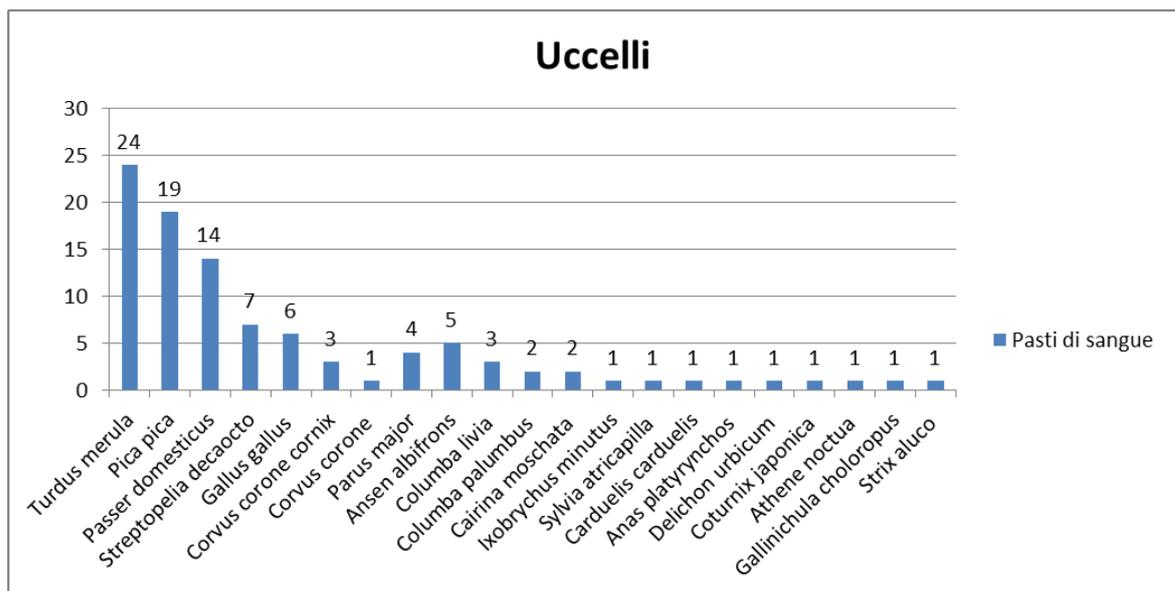


Figura 39: Pasti di sangue di specie di uccelli riscontrate nel complesso *Cx. pipiens*.

Nei mammiferi sono stati individuati 7 specie diverse, il più frequente è stato il *Equus caballus* per il 31,8% (n=14), seguito dal *Canis lupus* per il 27,2% (n=6). Sono stati riscontrati con la stessa frequenza del 9% il *Rattus norvegicus*, la *Lepus europeus*, il *Felix silvestris silvestris* e il *Pipistrellus nathusii* (Figura 40).

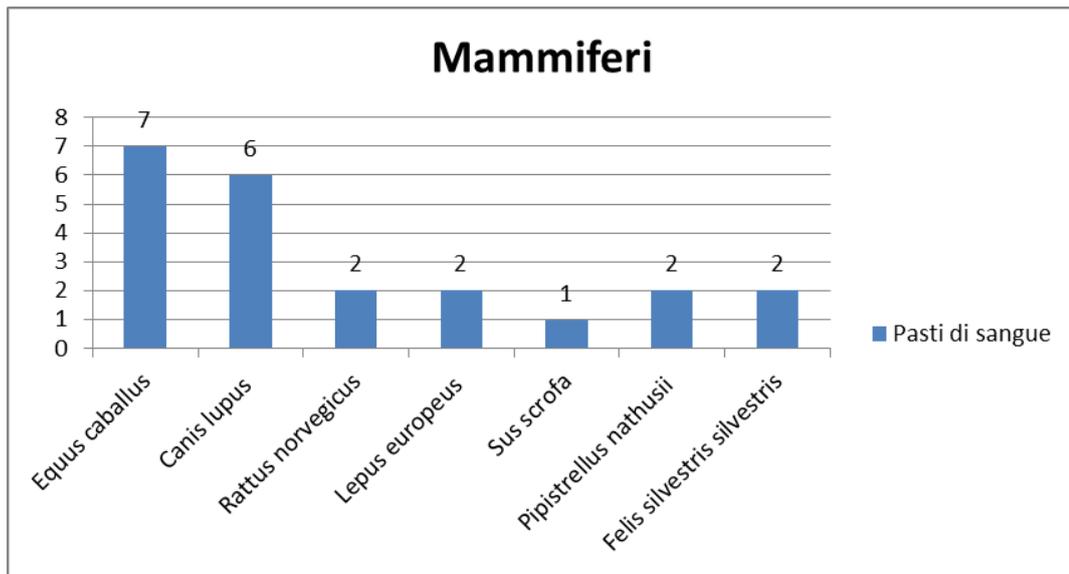


Figura 40: Pasti di sangue di specie di mammiferi riscontrate nel complesso *Cx. pipiens*.

#### 4.3 Analisi dei pasti di sangue nel complesso *Culex pipiens*

Sono state confrontate le preferenze di alimentazione delle due forme biologiche (*Cx. pipiens* e *Cx. molestus*). In *Cx. molestus* in 85 casi (69,7%) i pasti di sangue sono risultati appartenere a uccelli, 14 (11,5%) a mammiferi e per un caso a un rettile. In *Cx. pipiens* in 14 casi (11,4%) i pasti di sangue sono risultati appartenere a uccelli e 8 (6,5%) a mammiferi (Figura 41).

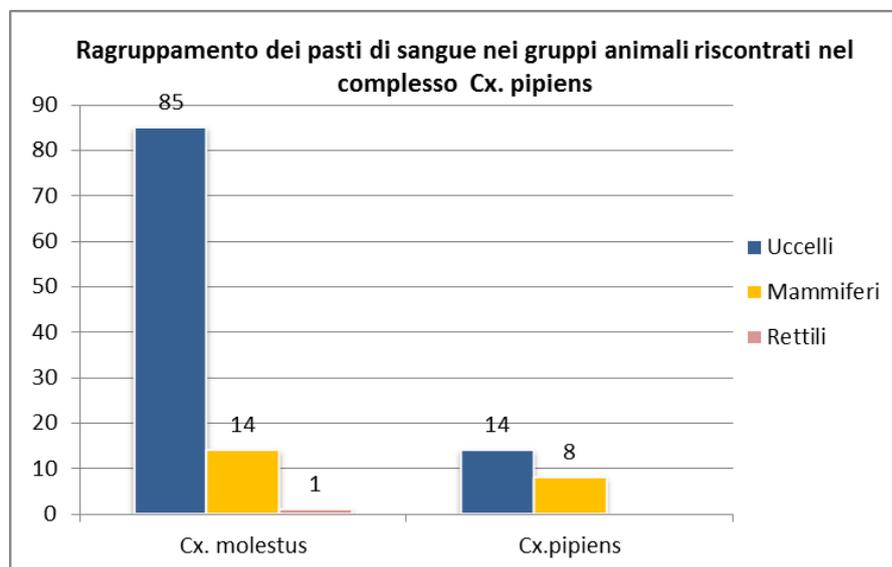


Figura 41 : Pasti di sangue riscontrati nel complesso *Cx. pipiens* raggruppati in gruppi animali.

Dall'analisi del chi-quadrato di questi valori emergono differenze statisticamente significative nella scelta dell'ospite delle due forme biologiche di *Cx. pipiens* (chi-quadrato con correzione di Yates = 4,57; P = 0,03). In particolare *Cx. pipiens* sembrerebbe preferire i mammiferi contrariamente a quanto risulterebbe dalla letteratura (Figura 41).

Esaminando le preferenze dei pasti di sangue di uccelli è emerso in *Cx. molestus* che: 22 (22,2%) esemplari hanno punto *Turdus merula*, 17 (17,1%) hanno punto *Pica pica* e 12 (12,1%) il *Passer domesticus*. Mentre la specie di uccello preferita da *Cx. pipiens* è stato *Gallus gallus* punto da 3 esemplari (0,03%). Otto specie di uccelli sono state preferite da entrambe le forme, mentre 12 specie di uccelli sono state riscontrate unicamente in *Cx. molestus* (Figura 42).

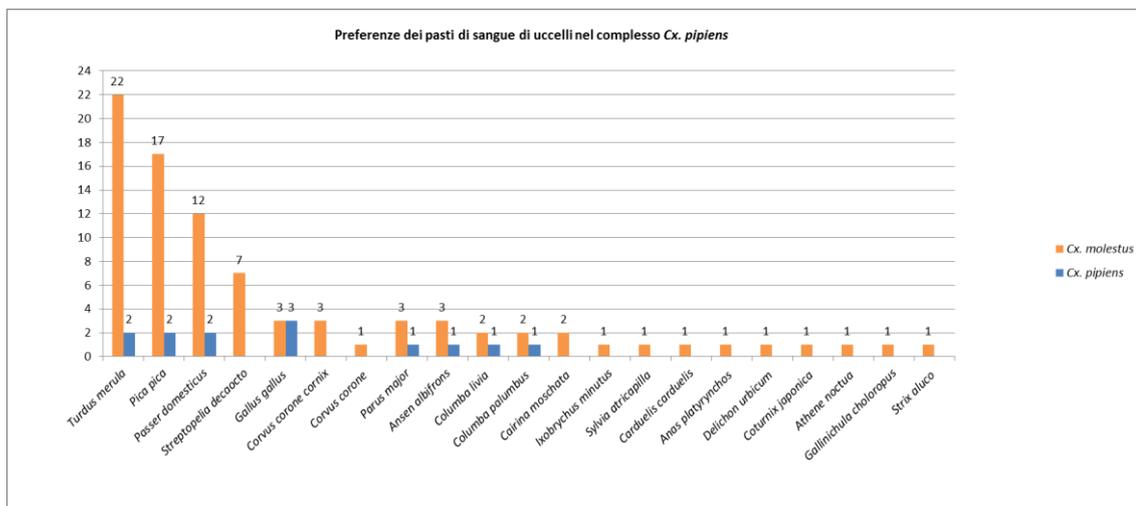


Figura 42: Preferenze delle specie di uccelli nel complesso *Cx. pipiens*.

Per i mammiferi le specie più frequenti nei pasti di sangue di *Cx. molestus* sono stati *Equus caballus* e *Canis lupus* riscontrati entrambi in 5 esemplari (22,7%), seguiti dal *Rattus norvegicus* punto da 2 esemplari (0,09%). Per *Cx. pipiens* le specie di mammiferi preferiti sono stati *Equus caballus*, *Pipistrellus nathusii* e *Felis silvestris silvestris* punti da due esemplari (0,09%). Tre specie di mammiferi sono stati riscontrati in entrambe le forme ecologiche, mentre quattro specie sono state punte unicamente da una forma ecologica. Nel dettaglio *Sus scrofa* e *Rattus norvegicus* sono stati riscontrati in *Cx. molestus* mentre *Pipistrellus nathusii* e *Felis silvestris silvestris* in *Cx. pipiens*.

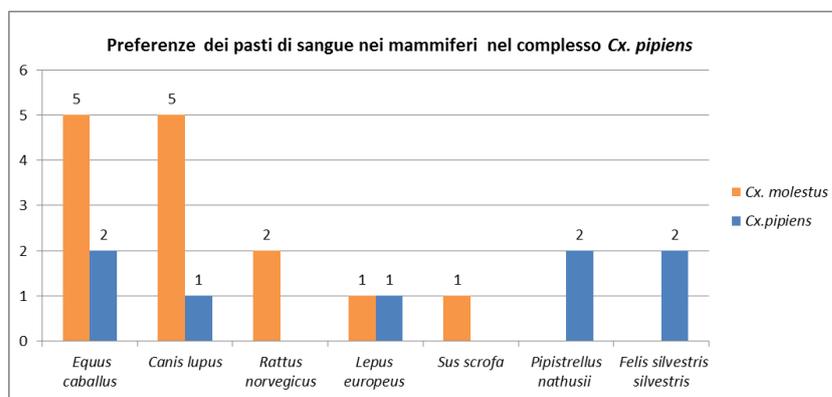


Figura 43: Preferenze delle specie di mammifero nel complesso *Cx. pipiens*.

#### 4.4 Catture per sito di campionamento

Di seguito vengono esposti per ogni sito di campionamento i risultati delle RFLP che ha permesso di identificare le due forme ecologiche, i risultati delle nested PCR che ha permesso di rilevare la specie del pasto di sangue della zanzara e la dimostrazione grafica delle caratteristiche ambientali in un raggio di due chilometri dalla trappola di cattura.

##### Caorle (VE)

Nel sito di campionamento di Caorle sono state catturate 7 zanzare con pasto di sangue, tutte erano *Cx. molestus* (Figura 44). Non sono disponibili dati sui pasti di sangue in quanto non sono stati ancora rilevati tramite la nested PCR.

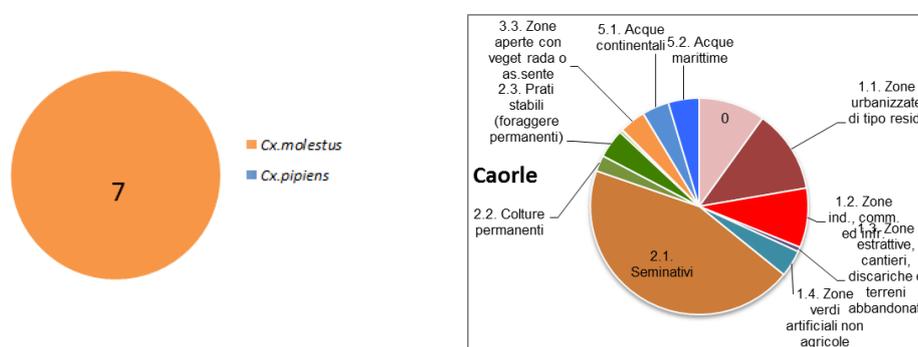


Figura 44 : Risultato della RFLP nel sito di Caorle (a destra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a sinistra).

##### Quarto d'Altino (VE)

Nel sito di campionamento di Quarto d'Altino sono state catturate 7 zanzare con pasto di sangue: 5 *Cx. molestus* e 2 *Cx. pipiens* (Figura 45). Sono disponibili tre pasti di sangue noti appartenenti a tre diverse specie di animale: una *Pica pica* (gazza), un *Felix silvestris silvestris* (gatto) e una *Lepus europea* (lepre) (Figura 46). Dei pasti di sangue mancanti uno è risultato negativo (non è stato rilevato nessun pasto di sangue), mentre per gli altri sono ancora in corso le analisi.

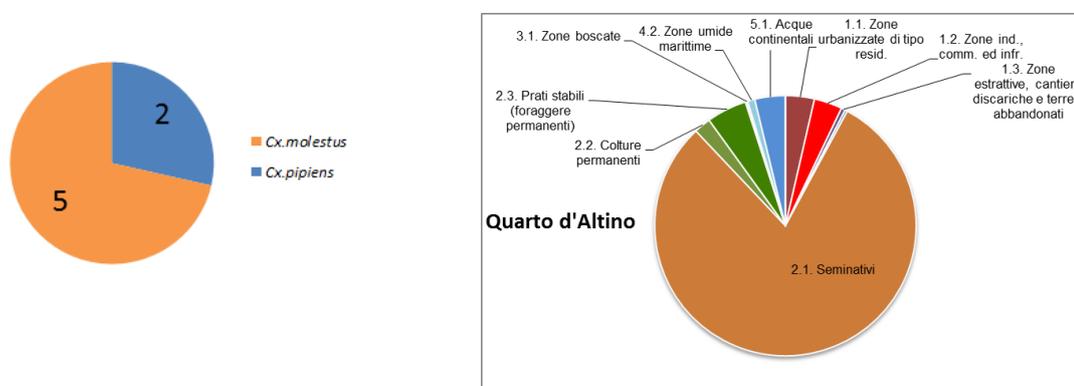


Figura 45 : Risultato della RFLP nel sito di Quarto d'Altino (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

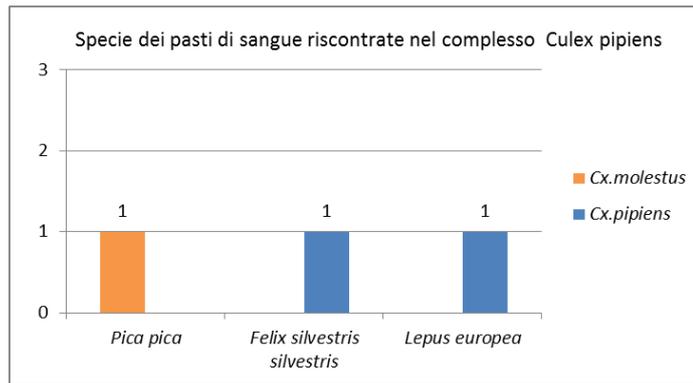


Figura 46: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Quarto d'Altino (VE).

## Venezia

Nel sito di campionamento di Venezia sono state catturate 14 zanzare con il pasto di sangue :13 *Cx. molestus* e 1 *Cx. pipiens* (Figura 47). E' disponibile un pasto di sangue noto di un *Passer domesticus* (passero domestico) (Figura 48). Dei pasti di sangue mancanti due sono risultati negativi, mentre per gli altri sono ancora in corso le analisi.

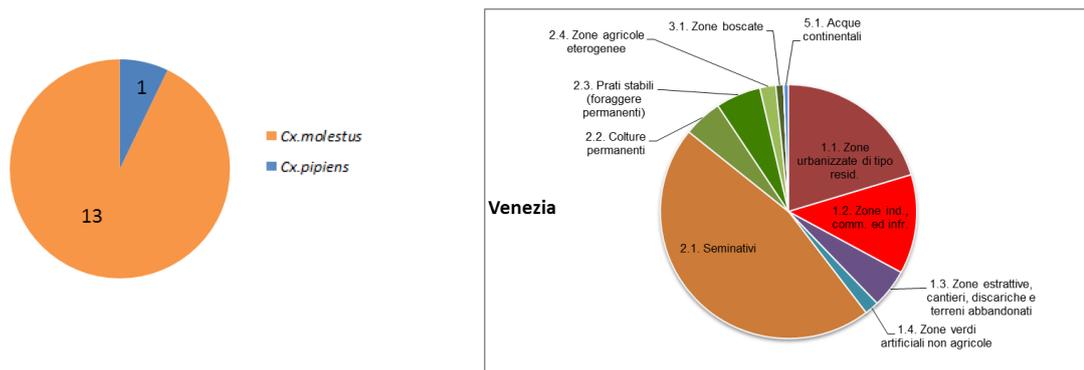


Figura 47 : Risultato della RFLP nel sito di Venezia (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

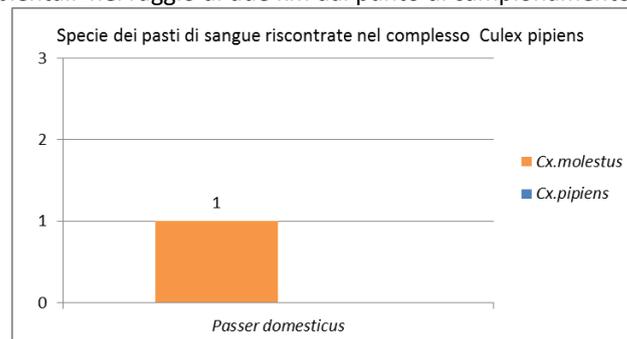


Figura 48: : Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Venezia.

## Campagna Lupia (VE)

Nel sito di campionamento di Campagna Lupia sono state catturate 11 zanzare con il pasto di sangue: 6 *Cx. molestus* e 5 *Cx. pipiens* (Figura 49). Sono disponibili quattro pasti di sangue di tre specie diverse: *Parus major* (cinciallegria); due *Turdus merula* (merlo); un *Pipistellus nathusii*

(pipistrello) (Figura 50). Dei pasti di sangue mancanti tre sono risultati negativi, mentre per gli altri sono ancora in corso le analisi.

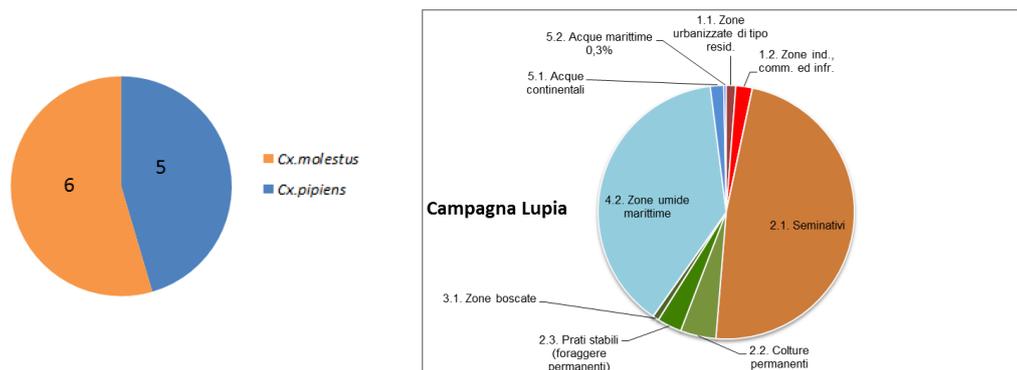


Figura 49 : Risultato della RFLP nel sito di Campagna Lupia (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

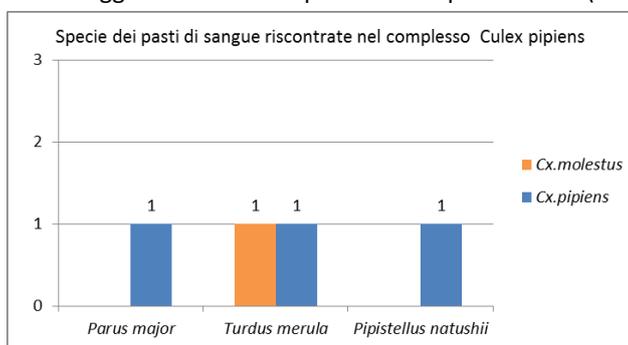


Figura 50: : Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Campagna Lupia.

### Papozze (RO)

Nel sito di campionamento di Papozze sono state catturate 7 zanzare, di cui 5 *Cx. molestus* e 2 *Cx. pipiens* (Figura 51). Sono disponibili 6 pasti di sangue di 4 specie di animali diversi: 3 *Corvus corone cornix* (cornacchie grigie); una *Columba livia* (piccione selvatico occidentale); una *Coturnix japonica* (quaglia giapponese) e una *Pica pica* (Figura 52). Il pasto di sangue mancante è risultato negativo.

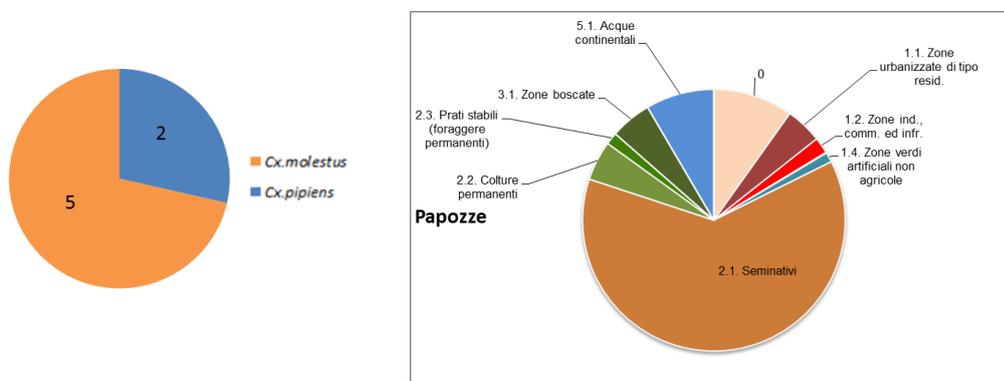


Figura 51: Risultato della RFLP nel sito di Papozze (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

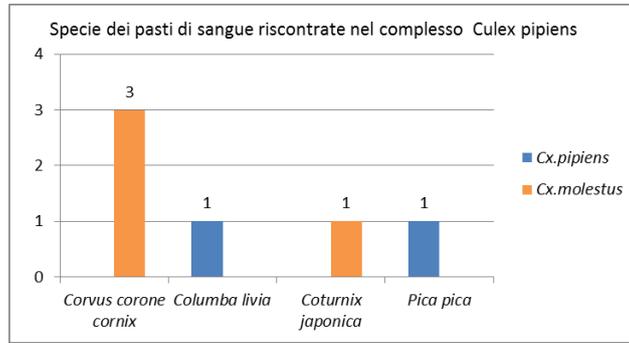


Figura 52: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Papozze.

### Trecenta (RO)

Nel sito di campionamento di Trecenta sono state catturate 10 zanzare con il pasto di sangue, di cui 9 *Cx. molestus* e 1 *Cx. pipiens* (Figura 53). Sono disponibili 7 pasti di sangue noti di 4 specie di animali diversi : 4 *Passer domesticus*; 1 *Carduelis carduelis* (cardellino); 1 *Lepus europea* (lepre) e un *Pipistrellus nathusii* (Figura 54). Dei pasti di sangue mancanti sono ancora in corso le analisi.

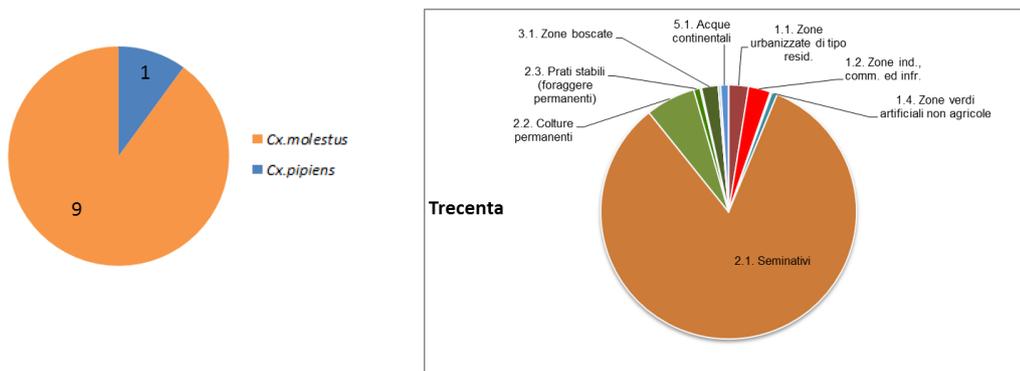


Figura 53: Risultato della RFLP nel sito di Trecenta (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

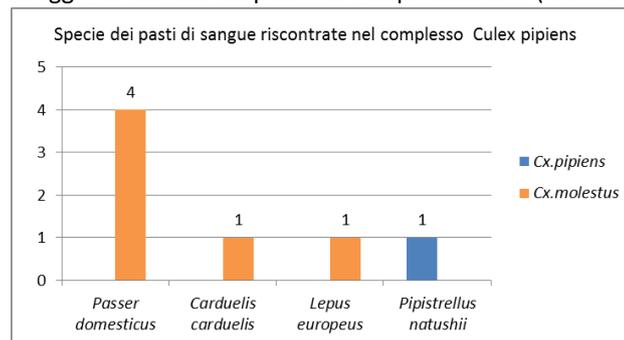


Figura 54: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Trecenta.

### Brugine (PD)

Nel sito di campionamento di Brugine sono state catturate 7 zanzare con il pasto di sangue, tutte erano *Cx. molestus* (Figura 55). Sono disponibili due pasti di sangue noti di una specie di uccello : due *Turdus merula* (Figura 56). Dei pasti di sangue mancanti: due sono risultati negativi, mentre per gli altri sono ancora in corso le analisi.

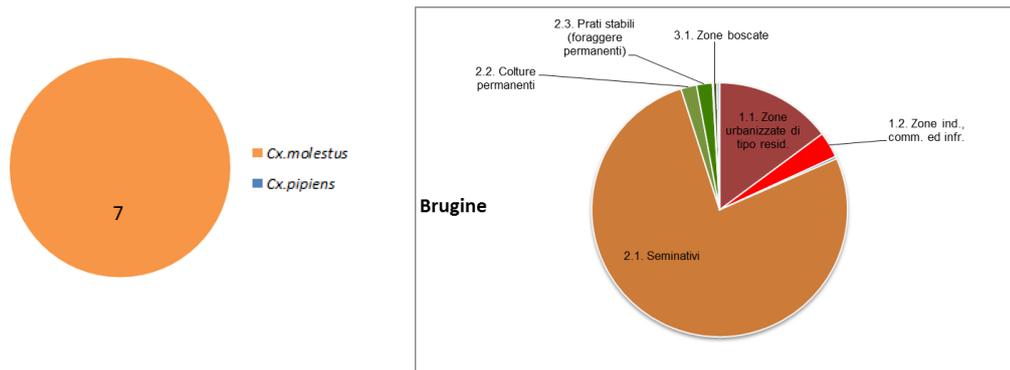


Figura 55: Risultato della RFLP nel sito di Brugine (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

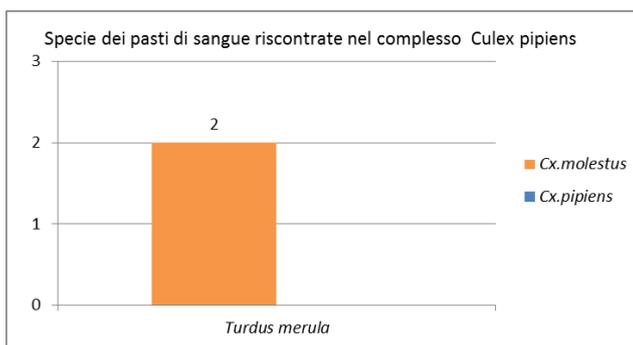


Figura 56: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Brugine.

### Ficarolo (RO)

Nel sito di campionamento di Ficarolo sono state catturate 20 zanzare con pasto di sangue di cui: 17 *Cx. molestus* e 3 *Cx. pipiens* (Figura 57). Sono disponibili 12 pasti di sangue di 4 specie di animali diversi: 7 *Equus caballus* (cavalli); 2 *Streptopelia decaocto* (tortore occidentali); 1 *Sus scrofa* (maiale) e 2 *Gallus gallus* (galli) (Figura 58). Dei pasti di sangue mancanti sono ancora in corso le analisi.

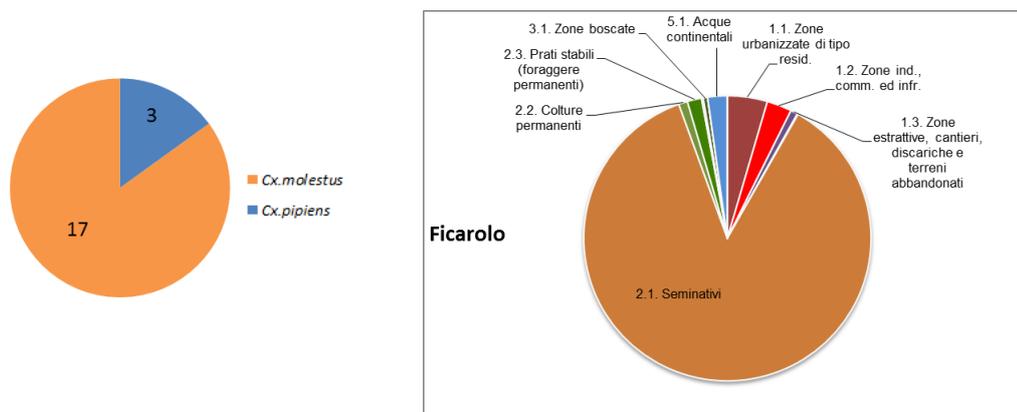


Figura 57: Risultato della RFLP nel sito di Ficarolo (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

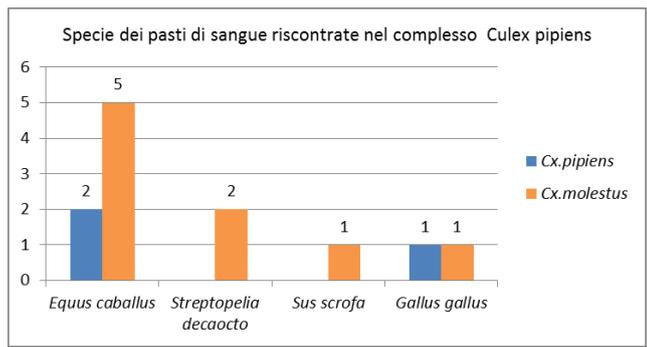


Figura 58: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Ficarolo.

### Castelnovo Bariano (RO)

Nel sito di campionamento di Castelnovo Bariano sono state catturate 39 zanzare con il pasto, di cui 38 *Cx. molestus* e 1 *Cx. pipiens* (Figura 59). Sono disponibili 24 pasti di sangue di 7 specie di animali diverse: 13 *Pica pica*; 6 *Turdus merula*; 1 *Columba palumbus* (colombaccio), 1 *Corvus corone*(cornacchia); 1 *Cairina moschata* (oca muschiata), 1 *Canis lupus* (cane) e 1 *Gallinichula chloropus* (gallinella d'acqua) ( Figura 60). Dei pasti di sangue mancanti: quattro sono risultati negativi, mentre per gli altri sono ancora in corso le analisi.

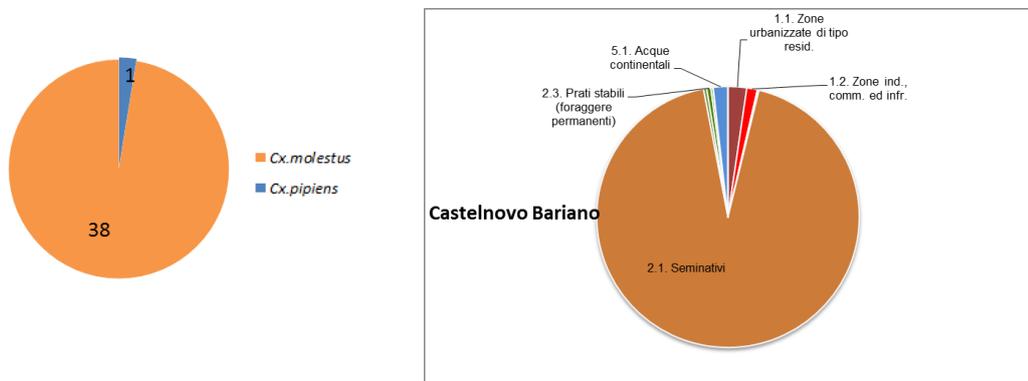


Figura 59: Risultato della RFLP nel sito di Castelnovo Bariano (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

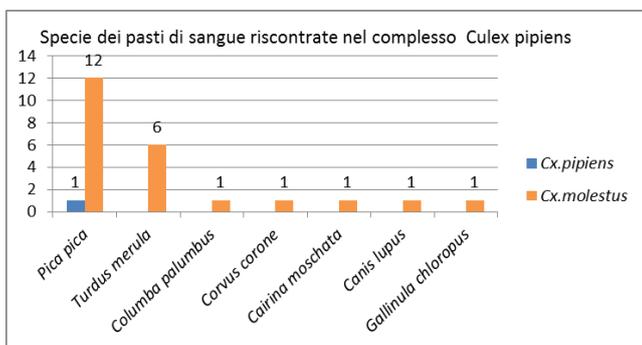


Figura 60: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Castelnovo Bariano.

## Casaleone ( VR )

Nel sito di campionamento di Casaleone sono state catturate 14 zanzare con il pasto di sangue, tutte *Cx. molestus* (Figura 61). Sono disponibili 10 pasti di sangue di 6 specie di animali diversi: 3 *Streptopelia decaocto*; 1 *Passer domesticus*, 3 *Turdus merula*, 1 *Canis lupus*, 1 *Columba palumbus* e 1 *Athene noctua* (civetta) ( Figura 62). Dei pasti di sangue mancanti sono ancora in corso le analisi.

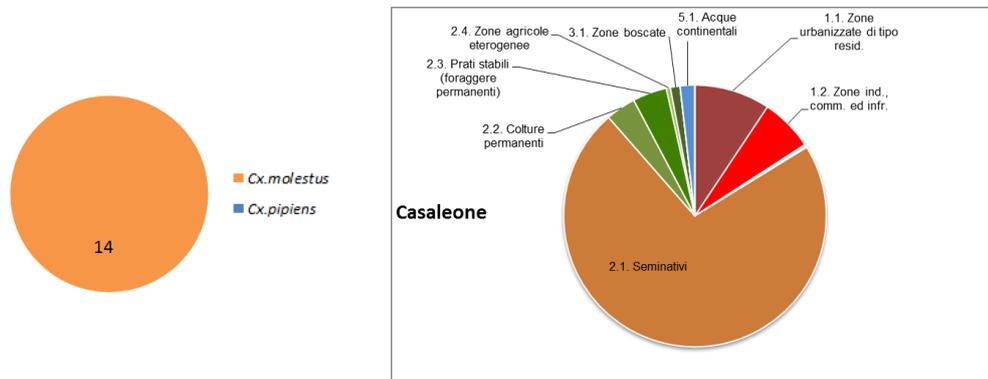


Figura 61: Risultato della RFLP nel sito di Casaleone (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

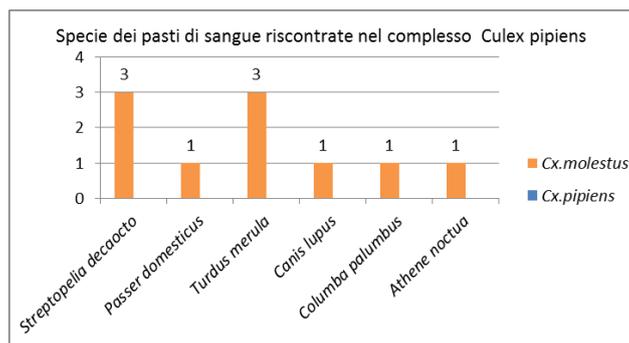


Figura 62: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Casaleone.

## Salgareda ( TR )

Nel sito di campionamento di Salgareda sono state catturate 26 zanzare con il pasto di sangue, di cui 24 *Cx. molestus* e 2 *Cx. pipiens* (Figura 63). Sono disponibili 4 pasti di sangue di 4 specie diverse di animali: 1 *Parus major*; 1 *Gallus gallus*; 1 *Turdus merula*; e 1 *Rattus norvegicus* (ratto) ( Figura 64). Dei pasti di sangue mancanti: 3 sono risultati negativi, mentre per gli altri sono ancora in corso le analisi.

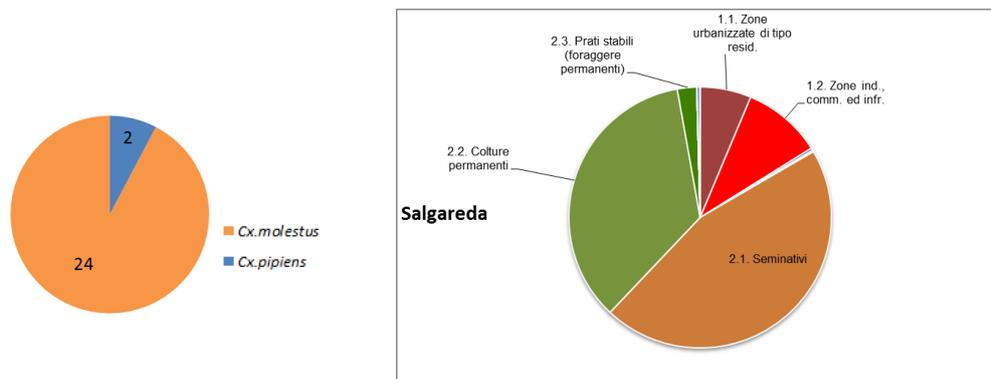


Figura 63: Risultato della RFLP nel sito di Salgareda (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

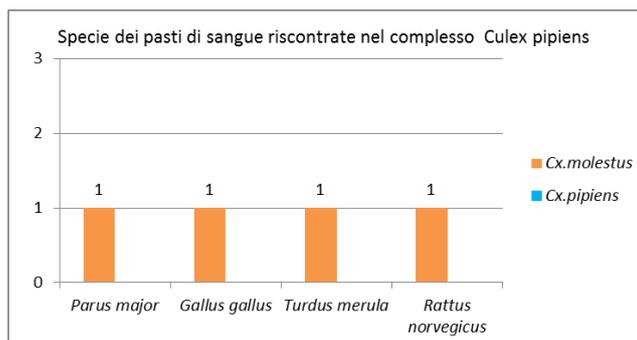


Figura 64: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Salgareda.

## Vicenza

Nel sito di campionamento di Vicenza sono state catturate 22 zanzare con il pasto di sangue, tutte *Cx. molestus* (Figura 65). Sono disponibili 3 pasti di sangue di 3 diverse specie di uccello: 1 *Passer domesticus*; 1 *Parus major* e 1 *Turdus merula* (Figura 66). Dei pasti di sangue mancanti: due sono risultati negativi, mentre per gli altri sono ancora in corso le analisi.

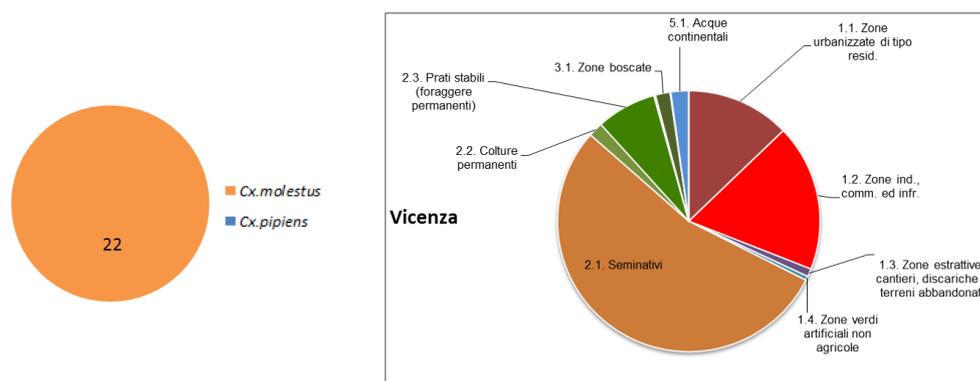


Figura 65: Risultato della RFLP nel sito di Vicenza (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

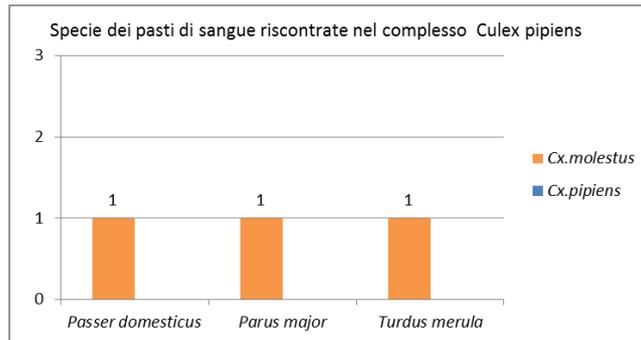


Figura 66: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Vicenza.

### Erbè ( VR)

Nel sito di campionamento di Erbè sono state catturate 12 zanzare con il pasto di sangue, tutte *Cx. molestus* (Figura 67). Sono disponibili 6 pasti di sangue di 5 specie di animali diversi: 1 *Turdus merula*; 1 *Ixobrychus minutus* (tarabusino); 2 *Passer domesticus*; 1 *Cairina moschata* (anatra muschiata); 1 *Rattus norvegicus* (Figura 68). Dei pasti di sangue mancanti sono ancora in corso le analisi.

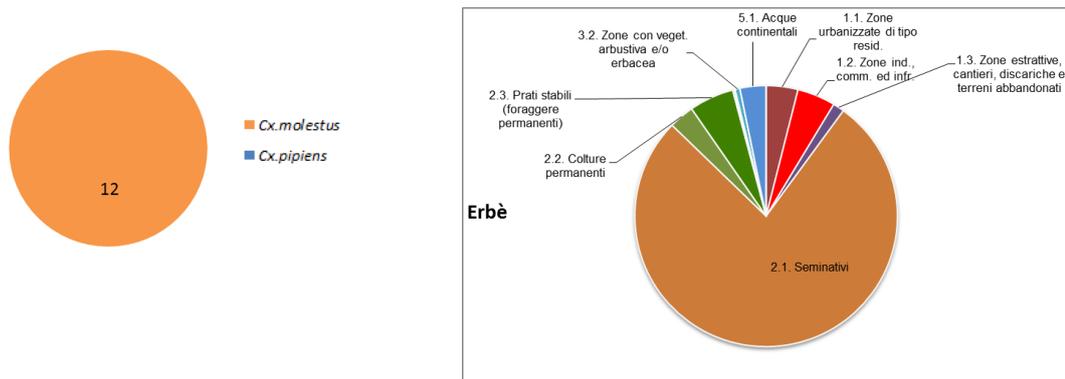


Figura 67: Risultato della RFLP nel sito di Erbè (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

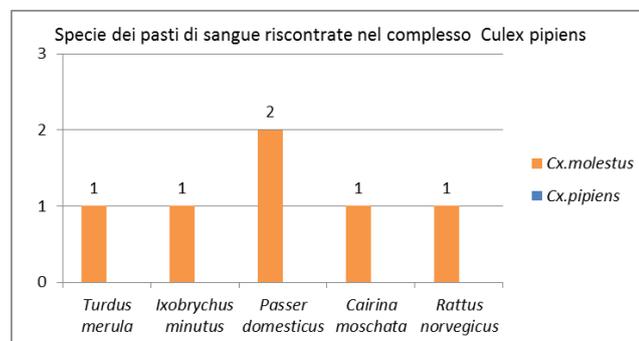


Figura 68: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Erbè.

## Villaga (VI)

Nel sito di campionamento di Villaga sono state catturate 13 zanzare con il pasto di sangue, tutte *Cx. molestus* (Figura 69). Sono disponibili 3 pasti di sangue di 3 specie diverse: 1 *Sylvia atricapilla* (caprinera); 1 *Pica pica* e 1 *Podoris muralis* (lucertola) (Figura 70). Dei pasti di sangue mancanti: uno è risultato negativo, mentre gli altri devono ancora essere analizzati.

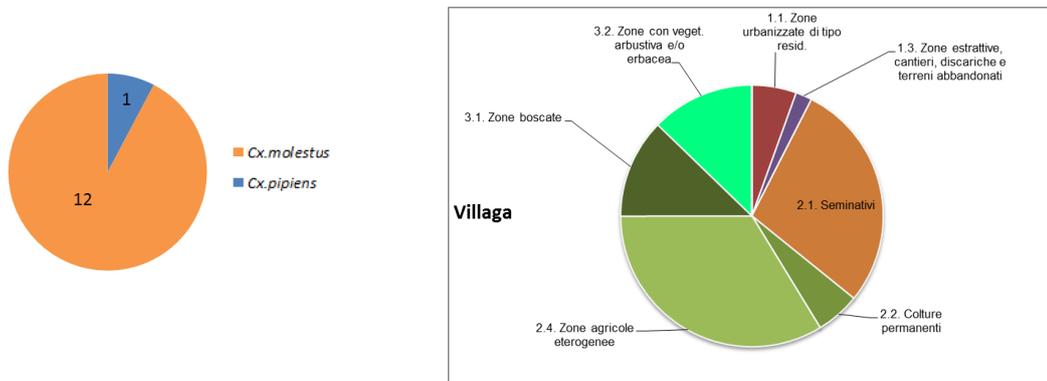


Figura 69: Risultato della RFLP nel sito di Villaga (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

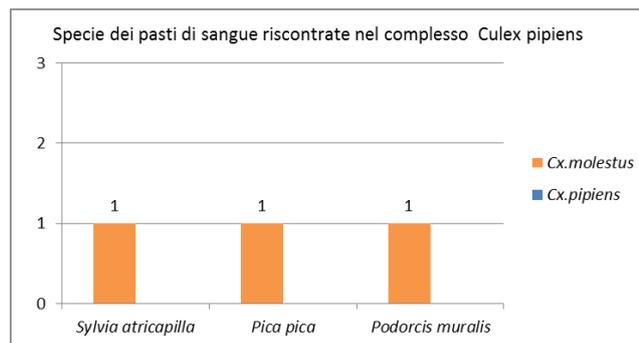


Figura 70: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Villaga.

## Palazzolo dello Stella ( UD )

Nel sito di campionamento di Palazzolo dello Stella sono state catturate 31 zanzare con il pasto di sangue; di cui 27 *Cx. molestus* e 4 *Cx. pipiens* (Figura 71). In questa località sono disponibili 8 pasti di sangue di 5 specie di animali diversi : 1 *Anas platyrhynchos* (germano reale); 1 *Delichon urbicum* (baldestruccio); 1 *Streptopelia decaocto*; 4 *Turdus merula* e 1 *Strix aluco* (allocco) ( Figura 72). Dei pasti di sangue mancanti: sei sono risultati negativi, mentre per gli altri sono ancora in corso le analisi.

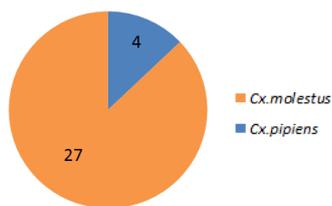


Figura 71: Risultato della RFLP nel sito di Palazzo dello Stella ( UD).

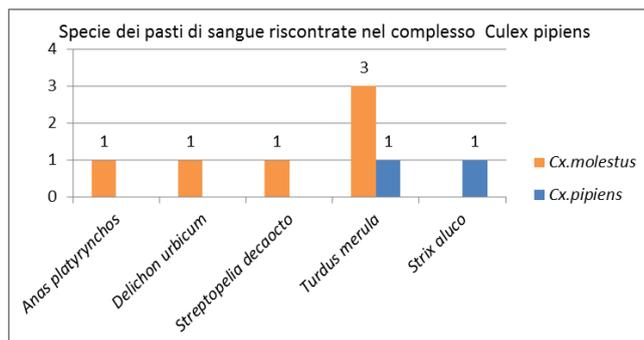


Figura 72: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Villaga (VI).

### Bagnaria arsa ( UD )

Nel sito di campionamento di Bagnaria Arsa sono state catturate 12 zanzare con il pasto di sangue, di cui 11 *Cx. molestus* e 1 *Cx. pipiens* (Figura 73). In questa località sono disponibili 4 pasti di sangue di 2 specie di uccelli diversi: 3 *Passer domesticus* e 1 *Pica pica* (Figura 74). Dei pasti di sangue mancanti: un è risultato negativo, mentre per gli altri sono in corso le analisi.

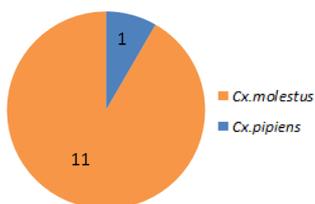


Figura 73: Risultato della RFLP nel sito di Palazzo dello Stella.

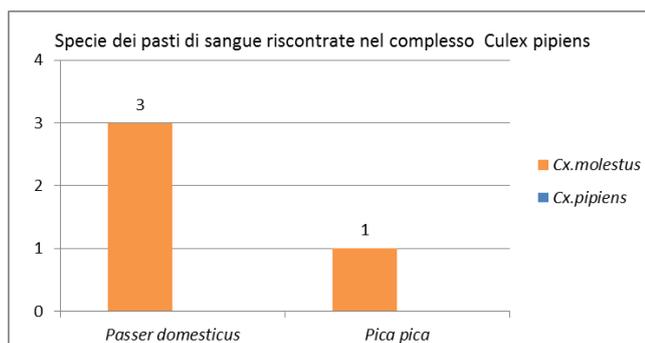


Figura 74: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Palazzo dello Stella.

### Fiume Veneto (PN)

In questo sito di campionamento sono state catturate 7 zanzare con il pasto di sangue, di cui 5 *Cx. molestus* e 2 *Cx. pipiens* (Figura 75). Sono disponibili 3 pasti di sangue di 2 specie di uccelli diverse: 1 *Gallus gallus* e 2 *Columba livia* (piccioni selvatici occidentali) (Figura 76). Dei pasti di sangue mancanti sono ancora in corso le analisi.

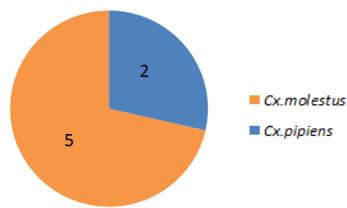


Figura75: Risultato della RFLP nel sito di Fiume Veneto.

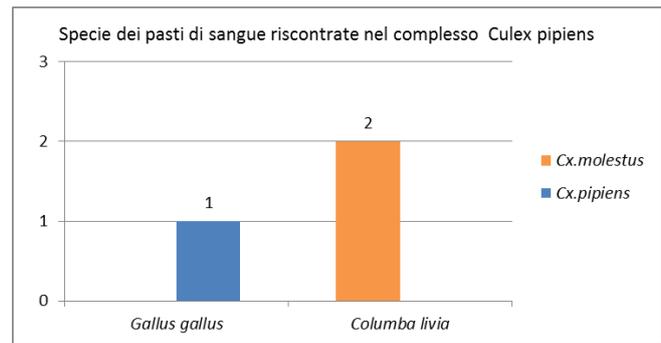


Figura 76: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Fiume Veneto.

### San Vito al Tagliamento ( PN )

In questo sito di campionamento sono state catturate 10 zanzare con il pasto di sangue, di cui 9 *Cx. molestus* e 1 *Cx. pipiens* ( Figura 77). In questa località è disponibile un pasto di sangue di un *Gallus gallus* (Figura 78). Dei pasti di sangue mancanti: uno è risultato negativo, mentre per gli altri sono ancora in corso le analisi.

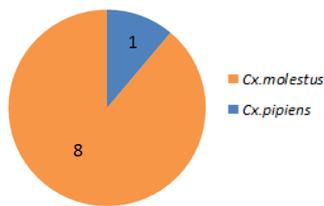


Figura 77: Risultato della RFLP nel sito di San Vito al Tagliamento.

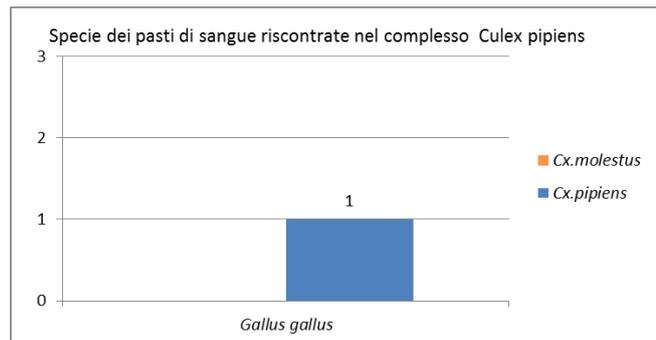


Figura 78: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di San vito al Tagliamento.

### Ceneselli ( RO )

In questo sito di campionamento sono state catturate 10 zanzare con il pasto di sangue, tutte *Cx. molestus* (Figura 79). Sono disponibili 4 pasti di sangue di 3 diverse specie di animali: 1 *Parus major*, 1 *Turdus merula* e 2 *Pica pica* (Figura 80). Dei pasti di sangue mancanti: cinque sono risultati negativi, mentre per l'ultimo è ancora in corso l'analisi.

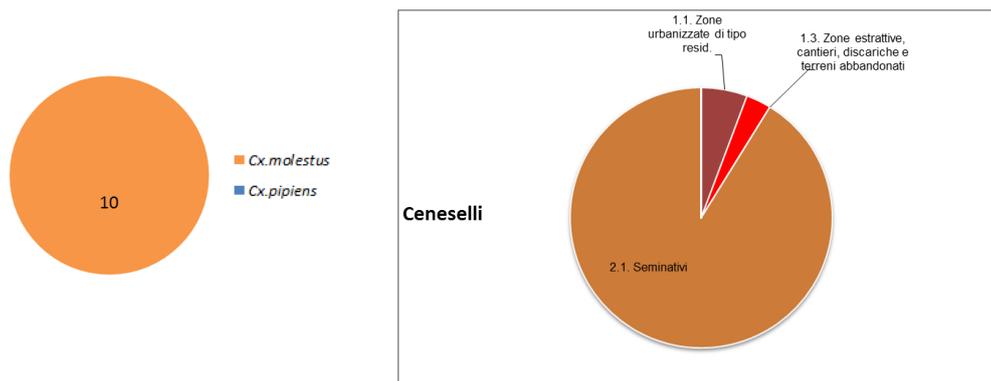


Figura 79: Risultato della RFLP nel sito di Ceneselli(a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

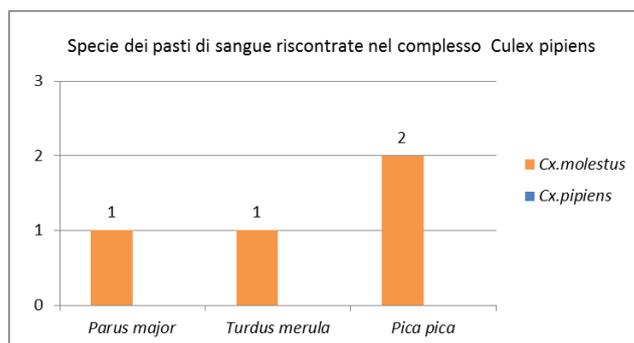


Figura 80: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Ceneselli.

### Ariano nel Polesine (RO)

In questo sito sono state catturate 28 zanzare con il pasto di sangue, di cui 26 *Cx. molestus* e 2 *Cx. pipiens* (Figura 81). Sono disponibili 10 pasti di sangue di 6 specie di animali diversi: 3 *Canis lupus*, 3 *Turdus merula*, 1 *Streptopelia decaocto*, 1 *Gallus gallus*, 1 *Ansen albifrons* (oca lombardella) e 1 *Felis silvestris silvestris* (Figura 82). Dei pasti di sangue mancanti: uno è risultato negativo, mentre per gli altri sono ancora in corso le analisi.

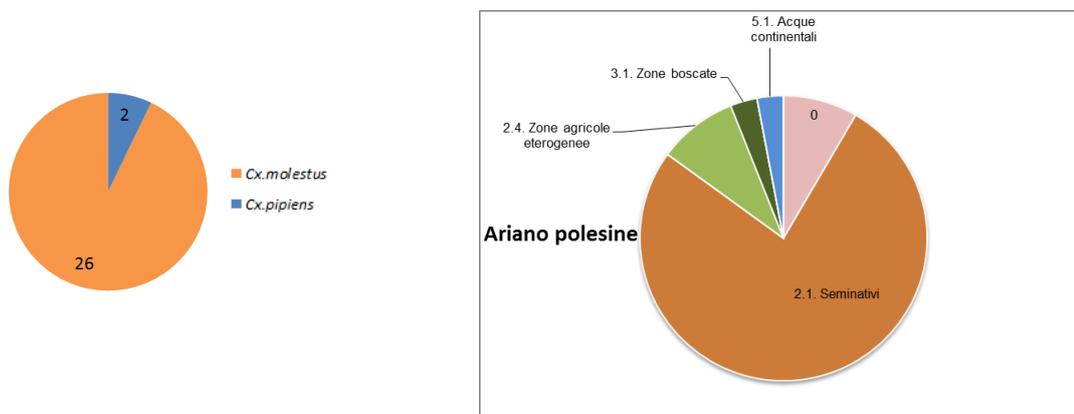


Figura 81: Risultato della RFLP nel sito di Ariano nel Polesine (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

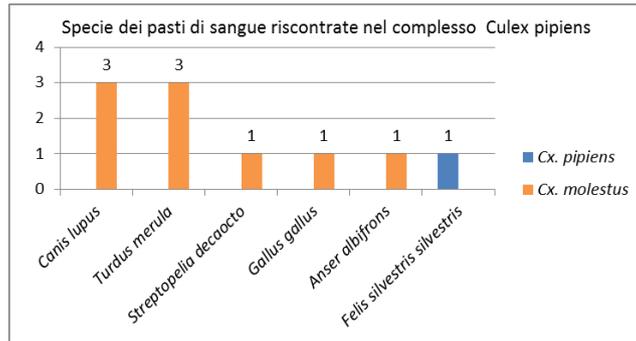


Figura 82: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Ariano nel Polesine.

### Taglio di Po (RO)

Nel sito di campionamento di Taglio di Po sono state catturate 59 zanzare con il pasto di sangue, di cui 52 *Cx. molestus* e 7 *Cx. pipiens* (Figura 83). Sono disponibili 7 pasti di sangue di 3 diverse specie di animali: 4 *Ansen albifrons*, 2 *Passer domesticus* e 1 *Canis Lupus* (Figura 84). Dei pasti di sangue mancanti: tre sono risultati negativi, mentre per gli altri sono ancora in corso le analisi.

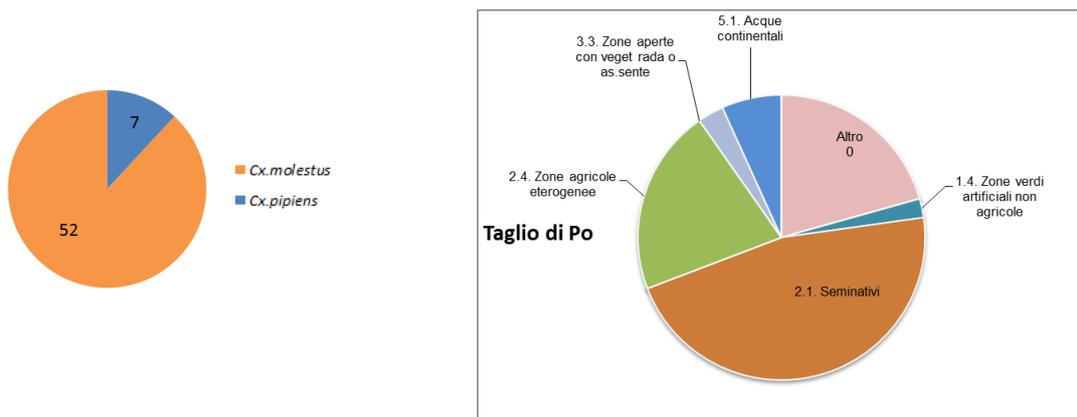


Figura 83: Risultato della RFLP nel sito di Taglio di Po (a sinistra) e rappresentazione grafica dei siti ambientali nel raggio di due km dal punto di campionamento (a destra).

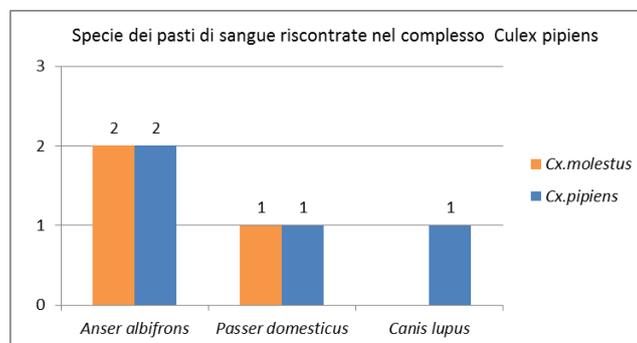


Figura 84: Specie dei pasti di sangue identificate mediante nested PCR nel sito di Taglio di Po.

N°SITO	SITO	N° CAMPIONI	RFLP		Pasto di sangue noto		Turdus merula	Pica pica	Passer domesticus	Streptopelia decaocto	Gallus gallus	Corvus corone cornix	Parus major	Ansen albifrons	Columba livia	Columba palumbus	Cairina moschata	Ixobrychus minutus	Sylvia atricapilla	Carduelis carduelis	Anas platyrhynchos	Delichon urbicum	Coturnix japonica	Athene noctua	Gallinichula choropus	Strix aluco	Pipistrellus nathusii	Felis silvestris silvestris	Equus caballus	Canis lupus	Rattus norvegicus	Lepus europaeus	Sus scrofa	Corvus cornix	Podoris muralis			
			Cx.pipiens	Cx. molestus	Cx.pipiens	Cx.molestus																																
1	Caorle	7	0	7	0	0																																
3	Quarto d'Altino	7	2	5	2	1		1																			1											
4	Venezia	14	1	13	0	1			1																													
6	Campagna Lupia	11	5	6	3	1	2					1														1												
9	Papoze	7	2	5	2	4		1				3											1															
14	Treenta	10	1	9	1	6		4																		1												
18	Brugine	7	0	7	0	2	2																															
162	Ficarolo	20	3	17	3	9			2	2																			7									
163	Castelnuovo Bariano	39	1	38	1	23	6	13						1	1											1									1			
165	Casaleone	14	0	14	0	10	3		1	3																												
179	Salgareda	26	2	24	0	4	1					1																										
184	Vicenza	22	0	22	0	3	1																															
193	Erbè	12	0	12	0	6	1		2																													
202	Villaga	13	1	12	0	3		1																														1
210	Palazzo dello Stella	31	4	27	2	6	4			1																												
211	Bagnaria Arsa	12	1	11	0	4		1	3																													
217	Fiume Veneto	7	2	5	1	2				1																												
218	San Vito al Tagliamento	9	1	8	1	0					1																											
227	Ceneselli	10	0	10	0	4	1		2																													
228	Ariano polesine	28	2	26	1	9	3			1	1																											
229	Taglio di Po	59	7	52	4	3			2				4																									
	TOTALE	365	35	330	21	101	24	19	14	7	6	3	4	5	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	7	6	2	2	1	1	1	1		

Tabella 6 : Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti dalla RFLP e dalla nested PCR per ogni sito di campionamento.

## 5. Discussione

Le indagini condotte mediante la tecnica RFLP su esemplari del complesso *Culex pipiens* catturate nel corso della stagione estiva 2012 in 21 siti dislocati nella pianura veneta e friulana hanno evidenziato una netta prevalenza della forma *Cx. molestus* su *Cx. pipiens* in tutti i siti d'indagine. L'analisi statistica ha tuttavia evidenziato presenza della forma *Cx. pipiens* superiore ai valori attesi in alcuni siti d'indagine (Campagna Lupia, Quarto d'Altino e Papozze). In tali, siti l'analisi del territorio (effettuata grazie alla Banca dati della Copertura del suolo della regione Veneto), condotta considerando un raggio di 2Km dal punto di cattura, ha evidenziato un'abbondante presenza di "Zone umide marittime" (ID 4.2.) in particolare per il sito di Campagna Lupia. Da tali dati preliminari quindi la forma *Cx. pipiens* apparirebbe maggiormente legata ad habitat costieri o comunque costituiti da paludi salmastre e zone intertidali scarsamente urbanizzate o industrializzate.

Al contrario, nonostante sia risultata presente in modo abbondante più o meno in tutti i siti di indagine, *Cx. molestus* si confermerebbe legata ad habitat maggiormente urbanizzati e antropizzati e tenderebbe a divenire esclusiva procedendo nell'entroterra Veneto (es. Vicenza, Castelnuovo Bariano ). L'analisi del chi-quadrato ha evidenziato infatti differenze significative ( $P < 0,005$ ) tra il rapporto *Cx. molestus*-*Cx. pipiens* dei siti d'indagine dell'entroterra e lo stesso rapporto nei siti d'indagine situati a una distanza inferiore ai 50Km dalla costa (Figura 36). Tali risultati evidenzerebbero la plasticità della forma *Cx. molestus* e la sua tendenza a sostituire la più esigente *Cx. pipiens* relegandola in stazioni limitate con precise caratteristiche e di scarso disturbo antropico.

L'applicazione della RFLP messa a punto da Shaikevich (2007) si dimostrerebbe quindi uno strumento valido, anche sul nord est italiano, al fine di una accurata differenziazione tra le due forme simpatriche di *Cx. pipiens* di difficilissima identificazione morfologica. Sono auspicabili tuttavia verifiche volte ad applicare tale tecnica molecolare su popolazioni del complesso *Cx. pipiens* identificate su base morfologica e/o per una o più caratteristica ecologica (es. presenza di autogenia e anautogenia). Si prevede inoltre di procedere al sequenziamento del DNA mitocondriale (COI e COII) al fine di verificare la variabilità genetica sulla base degli aplotipi che saranno riscontrati.

Per quanto riguarda l'analisi delle preferenze per l'ospite l'indagine ha evidenziato la tendenza nettamente ornitofila del complesso *Cx. pipiens*. Infatti i pasti di sangue attribuiti agli uccelli sono risultati maggioritari in entrambe le forme. Sorprende tuttavia che, contrariamente a quanto

emerge dalla letteratura, la forma *Cx. molestus* presenti un rapporto tra i pasti di sangue uccelli-mammiferi significativamente più alto rispetto a quello della forma *Cx. pipiens* (Figura 41). Per quanto riguarda le specie di uccelli il *Turdus merula* è risultato una delle specie preferite in entrambe le forme. Indagini simili, pur tuttavia non considerando le due forme ecologiche di *Cx. pipiens*, sono stati condotti negli Stati Uniti evidenziando l'importanza degli uccelli nell'alimentazione del complesso *Cx. pipiens* (Savage et al. 2007).

Dai risultati del presente lavoro emerge che le punture all'uomo sono un evento occasionale da parte del complesso *Cx. pipiens*. Come prospettive future si intende aumentare il numero di campioni analizzati al fine di poter disporre di un quadro più completo sulle preferenze per l'ospite delle due forme anche nei confronti dell'uomo. Tali informazioni saranno di notevole importanza dato il ruolo di principale vettore nella trasmissione della West Nile Disease di questo gruppo di culicidi.

Va evidenziata la difficoltà di poter disporre di zanzare feed dato che il metodo di cattura, mediante trappole CDC-CO<sub>2</sub>, tende ad attirare femmine alla ricerca dell'ospite piuttosto di quelle con pasto di sangue nell'addome. Tuttavia, non essendo attualmente disponibili tecniche che consentano la cattura esclusiva di zanzare "feed", la tecnica adottata rimane il sistema più efficace in quanto, catturando elevati numeri di zanzare, all'interno di tali quantitativi vi è sempre una percentuale seppur molto limitata di zanzare feed.

## 6. Appendice

ID	COMUNE	Data di raccolta	RFLP	Sequenziamento pasto di sangue	
				Specie	Nome comune
2	Venezia	09/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
3	Papozze	09/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
4	Palazzolo dello Stella	09/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
7	Campagna Lupia	22/05/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Parus major</i>	Cinciallegra
9	Salgareda	22/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
10	Bagnaria arsa	22/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
11	Papozze	23/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Corvus corone cornix</i>	Cornacchia grigia
12	Ariano Polesine	23/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Canis lupus</i>	Cane
13	Ariano Polesine	23/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
14	Ariano Polesine	23/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Canis lupus</i>	Cane
15	Ariano Polesine	23/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Canis lupus</i>	Cane
16	Taglio di Po	23/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
17	Taglio di Po	23/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Anser albifrons</i>	Oca lombardella
18	Trecenta	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
19	Trecenta	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
20	Trecenta	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Carduelis carduelis</i>	Cardellino
21	Trecenta	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
22	Trecenta	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
23	Brugine	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
24	Brugine	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
25	Brugine	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
28	Castelnovo Bariano	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
29	Castelnovo Bariano	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
30	Castelnovo Bariano	29/05/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
31	Castelnovo Bariano	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
32	Castelnovo Bariano	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
33	Castelnovo Bariano	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
34	Castelnovo Bariano	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Columba palumbus</i>	Colombaccio
35	Castelnovo Bariano	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
36	Castelnovo Bariano	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
43	Casaleone	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Streptopelia decaocto</i>	Tortora orientale
44	Casaleone	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
45	Vicenza	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
46	Vicenza	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Parus major</i>	Cinciallegra
47	Vicenza	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
48	Erbè	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
49	Erbè	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Ixobrychus minutus</i>	Tarabusino
50	Erbè	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
51	Villaga	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Sylvia atricapilla</i>	Capinera
52	Villaga	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
53	Villaga	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Podorcis muralis</i>	Lucertola muraiola
54	Fiume veneto	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Columba livia</i>	Piccione selvatico occidentale
55	Fiume veneto	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Columba livia</i>	Piccione selvatico occidentale
56	Ceneselli	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Parus major</i>	Cinciallegra
57	Ceneselli	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
58	Ceneselli	29/05/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
60	Quarto d'Altino	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
61	Venezia	05/06/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	Negativo	
62	Campagna Lupia	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
63	Campagna Lupia	05/06/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
64	Campagna Lupia	05/06/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	Negativo	
65	Campagna Lupia	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
66	Salgareda	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
67	Salgareda	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Parus major</i>	Cinciallegra
68	Salgareda	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Gallus gallus</i>	Gallo
69	Salgareda	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
70	Salgareda	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Ratto

71	Salgareda	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
73	Palazzolo dello Stella	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Anas platyrhynchos</i>	Germano reale
74	Palazzolo dello Stella	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
75	Palazzolo dello Stella	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Delichon urbicum</i>	Balestruccio
76	Palazzolo dello Stella	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Streptopelia decaocto</i>	Tortora orientale
77	Palazzolo dello Stella	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
78	Palazzolo dello Stella	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
79	Palazzolo dello Stella	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
80	Palazzolo dello Stella	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
81	Palazzolo dello Stella	05/06/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
83	Bagnaria arsa	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
84	Bagnaria arsa	05/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
85	Papozze	06/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Corvus corone cornix</i>	Cornacchia grigia
86	Papozze	06/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Corvus corone cornix</i>	Cornacchia grigia
87	Ariano Polesine	06/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
88	Ariano Polesine	06/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
89	Ariano Polesine	06/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Streptopelia decaocto</i>	Tortora orientale
90	Ariano Polesine	06/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
91	Ariano Polesine	06/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
92	Ariano Polesine	06/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Gallus gallus</i>	Gallo
93	Taglio di Po	06/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
94	Taglio di Po	06/06/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
95	Taglio di Po	06/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Anser albifrons</i>	Oca lombardella
96	Taglio di Po	06/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
97	Taglio di Po	06/06/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Anser albifrons</i>	Oca lombardella
98	Taglio di Po	06/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
99	Taglio di Po	06/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
100	Taglio di Po	06/06/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Anser albifrons</i>	Oca lombardella
101	Trecenta	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Lepus europeus</i>	Lepre
102	Castelnuovo Bariano	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
103	Castelnuovo Bariano	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Corvus corone</i>	Cornacchia
104	Castelnuovo Bariano	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
105	Castelnuovo Bariano	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
106	Castelnuovo Bariano	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
107	Casaleone	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
108	Casaleone	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Canis lupus</i>	Cane
109	Casaleone	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Columba palumbus</i>	Colombaccio
110	Casaleone	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
111	Casaleone	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
112	Vicenza	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
113	Vicenza	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
114	Erbè	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Cairina moschata</i>	Anatra muschiata
115	Fiume veneto	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
116	Fiume veneto	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
117	Fiume veneto	12/06/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Gallus gallus</i>	Gallo
118	Fiume veneto	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
119	San Vito al Tagliamento	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
120	San Vito al Tagliamento	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
121	San Vito al Tagliamento	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
122	Ceneselli	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
123	Ceneselli	12/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
124	Quarto d'Altino	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
125	Campagna Lupia	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
126	Campagna Lupia	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
127	Salgareda	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
128	Salgareda	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
129	Salgareda	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
130	Salgareda	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
132	Palazzolo dello Stella	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
133	Palazzolo dello Stella	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
134	Palazzolo dello Stella	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
135	Palazzolo dello Stella	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		

136	Palazzolo dello Stella	19/06/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Strix aluco</i>	Allocco
137	Palazzolo dello Stella	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
138	Ariano Polesine	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Anser albifrons</i>	Oca lombardella
139	Ariano Polesine	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
140	Ariano Polesine	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
141	Taglio di Po	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
142	Taglio di Po	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
143	Taglio di Po	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
144	Taglio di Po	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
145	Taglio di Po	19/06/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Canis lupus</i>	Cane
148	Taglio di po	19/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
149	Trecenta	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
150	Trecenta	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
151	Trecenta	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
152	Brugine	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
153	Brugine	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
154	Ficarolo	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
155	Castelnuovo Bariano	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Cairina moschata</i>	Anatra muschiata
160	Vicenza	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
161	Vicenza	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
162	Vicenza	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
163	Vicenza	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
164	Vicenza	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
165	Villaga	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
166	Villaga	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
168	San Vito al Tagliamento	26/06/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Gallus gallus</i>	Gallo
169	San Vito al Tagliamento	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
170	San Vito al Tagliamento	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
171	San Vito al Tagliamento	26/06/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
174	Salgareda	03/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
175	Salgareda	03/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
176	Salgareda	03/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
177	Salgareda	03/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
178	Salgareda	03/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
184	Quarto d'Altino	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
185	Venezia	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
186	Papozze	04/07/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Columba livia</i>	Piccione selvatico occidentale
187	Papozze	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Coturnix japonica</i>	Quaglia giapponese
188	Bagnaria arsa	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
189	Bagnaria arsa	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
190	Bagnaria arsa	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
191	Bagnaria arsa	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
192	Bagnaria arsa	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
193	Bagnaria arsa	04/07/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
194	Bagnaria arsa	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
195	Ariano pol	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
196	Ariano pol	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
197	Taglio di Po	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
198	Taglio di Po	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
199	Taglio di Po	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
200	Taglio di Po	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
201	Taglio di Po	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
202	Taglio di Po	04/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
205	Brugine	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
206	Brugine	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
207	Ficarolo	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Equus caballus</i>	Cavallo
208	Ficarolo	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
209	Ficarolo	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
210	Ficarolo	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Equus caballus</i>	Cavallo
211	Ficarolo	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
212	Ficarolo	10/07/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Equus caballus</i>	Cavallo
213	Ficarolo	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Equus caballus</i>	Cavallo
214	Ficarolo	10/07/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Equus caballus</i>	Cavallo
217	Castelnuovo Bariano	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Canis lupus</i>	Cane
218	Castelnuovo Bariano	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza

219	Castelnovo Bariano	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
220	Castelnovo Bariano	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
221	Casaleone	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Athene noctua</i>	Civetta
222	Casaleone	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Streptopelia decaocto</i>	Tortora orientale
223	Vicenza	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
224	Vicenza	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
225	Vicenza	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
229	Erbè	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Ratto
230	Erbè	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
231	Erbè	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
233	Villaga	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
234	Villaga	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
235	San Vito al Tagliamento	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
236	San Vito al Tagliamento	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
237	Ceneselli	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
238	Ceneselli	10/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Pica pica</i>	Gazza
240	Quarto d'Altino	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
241	Venezia	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
242	Venezia	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
243	Venezia	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
244	Venezia	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
246	Campagna Lupia	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
247	Salgareda	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
250	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
251	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
252	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
253	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
254	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
255	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
256	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
257	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
258	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>		
259	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
260	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
261	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
262	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
263	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
264	Palazzolo dello Stella	17/07/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	Negativo	
265	Bagnaria arsa	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
266	Bagnaria arsa	17/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
268	Caorle	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
269	Ariano Polesine	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
270	Ariano Polesine	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
271	Ariano Polesine	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
272	Ariano Polesine	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
273	Ariano Polesine	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
274	Ariano Polesine	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
275	Ariano Polesine	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
277	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
278	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
279	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
280	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
281	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
282	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>		
283	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
284	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
285	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
286	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
287	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
288	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
289	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
290	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
291	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
292	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
293	Taglio di Po	18/07/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>		

294	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
295	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
296	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
297	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
298	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
299	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
300	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
301	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
302	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
303	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
304	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
305	Taglio di Po	18/07/2012	Cx. p. f. pipiens		
306	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
307	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
308	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
309	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
310	Taglio di Po	18/07/2012	Cx.p. f. molestus		
311	Ficarolo	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
312	Ficarolo	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
313	Ficarolo	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
314	Ficarolo	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
315	Ficarolo	23/07/2012	Cx.p. f. molestus	<i>Streptopelia decaocto</i>	Tortora orientale
316	Ficarolo	23/07/2012	Cx.p. f. molestus	<i>Sus scrofa</i>	Maiale
317	Ficarolo	23/07/2012	Cx.p. f. molestus	<i>Equus caballus</i>	Cavallo
318	Ficarolo	23/07/2012	Cx. p. f. pipiens	<i>Gallus gallus</i>	Gallo
320	Castelnovo Bariano	23/07/2012	Cx.p. f. molestus	<i>Turdus merula</i>	Merlo
321	Castelnovo Bariano	23/07/2012	Cx.p. f. molestus	<i>Turdus merula</i>	Merlo
322	Castelnovo Bariano	23/07/2012	Cx.p. f. molestus	Negativo	
323	Castelnovo Bariano	23/07/2012	Cx.p. f. molestus	Negativo	
324	Castelnovo Bariano	23/07/2012	Cx.p. f. molestus	<i>Pica pica</i>	Gazza
325	Castelnovo Bariano	23/07/2012	Cx.p. f. molestus	<i>Turdus merula</i>	Merlo
326	Castelnovo Bariano	23/07/2012	Cx.p. f. molestus	<i>Gallinula chloropus</i>	Gallinella d'acqua
327	Castelnovo Bariano	23/07/2012	Cx.p. f. molestus	<i>Pica pica</i>	Gazza
328	Castelnovo Bariano	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
329	Castelnovo Bariano	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
330	Castelnovo Bariano	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
331	Casaleone	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
332	Vicenza	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
333	Vicenza	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
335	Vicenza	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
336	Ficarolo	22/06/2012	Cx.p. f. molestus	<i>Gallus gallus</i>	Gallo
339	Erbè	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
340	Erbè	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
341	Erbè	23/07/2012	Cx.p. f. molestus	<i>Passer domesticus</i>	Passero domestico
342	Erbè	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
343	Villaga	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
344	Villaga	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
345	Villaga	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
346	Villaga	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
347	Villaga	23/07/2012	Cx.p. f. molestus		
348	Villaga	23/07/2012	Cx. p. f. pipiens		
349	Ceneselli	23/07/2012	Cx.p. f. molestus	<i>Pica pica</i>	Gazza
350	Venezia	31/07/2012	Cx.p. f. molestus		
351	Venezia	31/07/2012	Cx.p. f. molestus		
352	Venezia	31/07/2012	Cx.p. f. molestus		
353	Venezia	31/07/2012	Cx.p. f. molestus		
354	Campagna Lupia	31/07/2012	Cx. p. f. pipiens		
355	Campagna Lupia	31/07/2012	Cx. p. f. pipiens	<i>Pipistrellus nathusii</i>	Pipistrello
356	Campagna Lupia	31/07/2012	Cx.p. f. molestus		
364	Salgareda	31/07/2012	Cx. p. f. pipiens		
367	Papozze	01/08/2012	Cx. p. f. pipiens	<i>Pica pica</i>	Gazza
368	Ariano Polesine	01/08/2012	Cx.p. f. molestus		
369	Ariano Polesine	01/08/2012	Cx.p. f. molestus		
370	Ariano Polesine	01/08/2012	Cx.p. f. molestus		
375	Vicenza	06/08/2012	Cx.p. f. molestus		
376	Vicenza	06/08/2012	Cx.p. f. molestus		
378	Ficarolo	07/08/2012	Cx.p. f. molestus	<i>Equus caballus</i>	Cavallo

382	Castelnovo Bariano	07/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
383	Castelnovo Bariano	07/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
384	Castelnovo Bariano	07/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
385	Casaleone	07/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Turdus merula</i>	Merlo
386	Casaleone	07/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
387	Casaleone	07/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
389	Erbè	07/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
390	Salgareda	08/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
394	Caorle	05/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
399	Vicenza	21/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
400	Vicenza	21/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
401	Vicenza	21/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
404	Ceneselli	21/07/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
405	Caorle	22/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
406	Caorle	22/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
407	Caorle	22/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
408	Taglio di Po	22/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
410	Trecenta	28/08/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Pipistrellus nathusii</i>	Pipistrello
411	Venezia	28/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
412	Venezia	28/08/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
435	Ariano Polesine	29/08/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>		
437	Ficarolo	04/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Streptopelia decaocto</i>	Tortora orientale
438	Castelnovo Bariano	04/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	Negativo	
439	Castelnovo Bariano	04/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
440	Vicenza	04/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
442	Caorle	06/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
443	Caorle	06/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
444	Salgareda	11/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
445	Salgareda	11/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
446	Salgareda	11/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
447	Salgareda	11/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
448	Salgareda	11/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
451	Quarto d'Altino	12/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
452	Quarto d'Altino	12/09/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Felis silvestris silvestris</i>	Gatto
453	Quarto d'Altino	12/09/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Lepus europeus</i>	Lepre
456	Venezia	12/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
457	Ariano Polesine	12/09/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>	<i>Felis silvestris silvestris</i>	Gatto
458	Ariano Polesine	12/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
459	Taglio di Po	12/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
467	Castelnovo Bariano	18/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
468	Castelnovo Bariano	18/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
469	Castelnovo Bariano	18/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
470	Castelnovo Bariano	18/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
471	Fiume veneto	18/09/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>		
475	Ceneselli	19/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
479	Salgareda	25/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
480	Taglio di Po	25/09/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>		
481	Casaleone	02/10/2012	<i>Cx.p. f. molestus</i>	<i>Streptopelia decaocto</i>	Tortora orientale
486	Salgareda	09/10/2012	<i>Cx. p. f. pipiens</i>		

Tabella 7: Dati riassuntivi per ogni campione. In ordine da sinistra: codice identificativo dell'esemplare, località di provenienza, data di raccolta, risultato RFLP e risultati nested PCR.

## 7. Bibliografia

- 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.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990 – “ Basic local alignment search tool” J.Mol.Biol.215:403-410.
- Andrighetto I. 2004 – Appunti di scienze: West Nile Disease...una malattia esotica?.Pp 1-16.
- Bahnck C.M., Fonseca D.M.2006 – Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex (Culex)pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. Am. J. Trop. Med. Hyg., 75(2), Pp.251-255.
- Becker N., Jost A., Weitzel T., 2012 – The *Culex pipiens* complex in Europe . Pp. 53.
- Busani L., Capelli G., Cecchinato M., Lorenzetto M., Savini G., Terregino G., Vio P., Bonfanti L., Dalla Pozza M., Marangon S. 2010 – West Nile virus circulation in Veneto region in 2008 -2009. Epidemiol. Infect. Pp.1-8.
- Calistri P., Monaco F., Savini G., Guercio A., Purpari G., Vicari D., Cascio S., Lelli R. 2010 – Ulteriore diffusione del virus della West Nile in Italia. Veterinaria Italiana , 46 (4). Pp, 467-470.
- Capelli G., Montarsi F., Martini S., Bisoffi Z., Bonfanti L., Barzon L., Breda A. 2012 – Relazione sulle malattie trasmesse da vettori anno 2012 e piano di sorveglianza entomologica e misure di lotta ai vettori anno 2013. Pp. 1 - 43.
- Chillemi G., Gallo L., Sbrongìo G.L., Mosca A., Piazzì M., Vietti Niclot M.M., Bozzolan M., Saltarin A., Chiarion M., Mazzon L., Marani M. – Il progetto Pilota di Lotta alle Zanzare nella provincia di Rovigo. Pp. 1 – 64.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. 2000 – TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol Ecol 9, 1657 – 1659.
- Di Luca M., Toma D., Boccolini F., Severini F., Romi R. 2011 – Le specie del complesso *Culex pipiens* ( Diptera, Culicidae ) in Italia XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Genova 13 – 16 Giugno, pp.246 .
- Fonseca D.M., Keyghodadabi N., Malcolm C.A., Mehmet C., Schaffner F., Mogi M., Fleischer R.C., Wilkerson R.C., 2004 – Emerging Vectors in the *Culex pipiens* Complex. Science 33. Pp. 1535 – 1538.
- Hemmerter S., Slapeta J., Beebe N.W. 2009 – Resolving genetic diversity in Australasian *Culex* mosquitoes : Incongruence between the mitochondrial cytochrome c oxidase I and nuclear acetylcholine esterase 2. Molecular Phylogenetics and Evolution 50. Pp. 317 – 325.
- Huang S., Molai G., Andreadis TG. 2011 – Reexamination of *Culex pipiens* hybridization zone in Eastern United States by Ribosomal DNA – Based Single Nuocleotide Polymorphism Markers. American journal of Tropical Medicine & Hygiene; 85 (3): 434 – 441.
- Kasai S., Komagata O.Tominata T., Sawabe K., Tsuda Y., Kurahashi H., Ishikawa T., Motoki M.2008 – PCR-based identification of *Culex pipiens* complex collected in Japan. Jpn.J.Infect.Dis., 61,pp 184-191.

- 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. J. Med.Entomol. 44(1): 50-59.
- Savage H.M., Aggarwal D., Apperson C.S., Katholi C.R., Gordon E., Hassan H.K., Anderson M., Charnertzky D., Larry M., Millen C., Unnasch E.A., Unnasch T.R. 2007 – Host Choice and West Nile Virus Infection Rates in Blood – Fed Mosquitoes, Including Member of the *Culex pipiens* Complex, from Memphis and Shelby County, Tennessee, 2002 – 2003. Vector Borne Zoonotic Dis.; 7(3) pp.365 – 387.
- Romi R., Pontuale G., Sabatinelli G. 1997 – Le zanzare italiane : generalità ed identificazione degli stadi preimmaginali ( Diptera, Culicidae). Fragmenta Entomologica, Roma 29 (1997 ), pp. 1 – 141.
- Romi R., Toma L., Severini F., Di Luca M., Boccolini D., Ciuffolini M.G., Nicoletti L., Majoiri G. 2009 – Linee guida per il controllo dei Culicidi potenziali vettori di arbovirus in Italia. Rapporti ISTISAN 09/11.
- Roth L.M. 1943 – A key to the *Culex* ( Diptera, Culicidae ) of the southeastern United States, by male terminalia. Journal Kans. Ent.Soc.16:117-125.
- Shaikevich E.V. 2007 – PCR – RFLP of the COI gene reliably differentiates *Cx.pipiens*, *Cx.pipiens f.molestus* and *Cx.torrentium* of the Pipiens complex. Europran Mosquito Bulletin, 23 (2007), 25 – 30.
- Severini F., Toma L., Di Luca M., Romi R. 2009 – Le zanzare italiane : generalità e identificazione degli adulti. Fragmenta Entomologica, Roma 41 (2), pp.23-372.
- Shaikevich V.E., Zakharow I.A. 2010 – Polymorphism of mitochondrial COI and nuclear ribosomal ITS2 in the *Culex pipiens* complex and in *Culex torrentium* ( Diptera : Culicidae ). Comparative Cytogenetics. Vol.4. Pp. 161 – 174.
- Smith J.L., Fonseca D.M. 2004 – Rapid Assays for identification of members of the *Culex* ( *Culex* ) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species ( Diptera : Culicidae ). Am. J. Trop. Med. Hyg., 70 (4), pp.339 – 345.
- Talbalaghi A., Shaikevich E. 2001 – Molecular approach for identification of mosquito species ( Diptera : Culicidae ) in Province of Alessandria, Piedmont, Italy. Eur. J. Entomol. 108. Pp. 35 – 40.
- Toma L., Cipriani M., Goffredo M., Romi R., Lelli R. 2009 – Primo report sull'attività entomologica condotta nell'ambito dei piani nazionale per la sorveglianza della West Nile Disease in Italia. Veterinaria italiana, 44, pp. 483 -497.
- Urbanelli S., Villani F., Bullini L. 1986 – Ricerche elettroforetiche nel complesso *Culex pipiens Culex pipiens* ( Diptera, Culicidae ). In : andreone F.et al., "Population biology " Italian Journal of Zoology, 53: S1, pp.61 – 69.
- Vinogradova E.B., 2003 – Ecophysiological and morphological variations in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex ( Diptera : Culicidae ). Acta Soc. Zool. Bohem. 67: 41 – 50, 2003.
- Vinogradova E.B., Shaikevich E. 2007 – Morphometric, physiological and molecular characteristics of underground populations of the urban mosquito *Culex pipiens* Linnaeus f. *molestus* Forskål ( Diptera : Culicidae ) from several areas of Russia. European Mosquito bulletin, 22, pp. 17 – 24.

## **8. Ringraziamenti**

Un doveroso ringraziamento a tutto il personale del Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie e del Laboratorio di Entomologia Agraria dell'Università di Padova. Ringrazio il professor Mazzon e le Dott.sse Martinez, Viale e Ravagnan che mi hanno permesso di concludere la stesura della tesi nel più breve tempo possibile. Un grazie al professor Girolami e al Dott. Montarsi per i preziosi consigli. Infine ringrazio Federica per l'importante aiuto con l'inglese.