

PRIMO FOCOLAIO EUROPEO AUTOCTONO DI MALATTIA TROPICALE TRASMESSA DA VETTORI IN ROMAGNA

Un'ulteriore conferma che non esistono più malattie "esotiche" in senso stretto: la globalizzazione investe anche la salute. Il successo della collaborazione interdisciplinare tra medicina e veterinaria.

M. DOTTORI*, P. BONILAURI*, R. BELLINI**, P. CORDIOLI***, M. TAMBA****, V. SAMBRI*****,
 M. CALZOLARI*, P. ANGELINI*****, P. MACINI*****, L. VENTURI*****, R. ANGELINI*****,
 A. LAVAZZA*****, E. MARTINI*****, C. ALBA*****, C. VENTURELLI*****, G. VECCHI****

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Reggio Emilia

**Centro Agricoltura Ambiente "G.Nicoli", Bologna

***Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Virologia, Sezione di Brescia

****Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Bologna

***** Università di Bologna - Alma Mater Studiorum - Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale, Sezione di Microbiologia

***** Regione Emilia Romagna, Servizio di Sanità Pubblica

***** AUSL Ravenna, Dipartimento di Sanità Pubblica

***** Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Elettromicroscopia Sezione di Brescia

***** AUSL Cesena, Dipartimento di Sanità Pubblica

E-mail: michele.dottori@bs.izs.it

RIASSUNTO

La globalizzazione e le modificazioni climatiche in atto preannunziano da tempo lo sconfinamento di patologie considerate prettamente esotiche. Il virus Chikungunya da anni fa capolino in Europa con numerosi casi umani importati, costituiti da viaggiatori ed emigranti; quello dell'estate del 2007 descritto dagli autori è il primo caso europeo di focolaio autoctono di una patologia tropicale trasmessa da vettori (zanzare). Gli autori descrivono l'episodio, nonché i suoi aspetti epidemiologici, eziologici e diagnostici, in un ambito interdisciplinare che vede il contributo di medici, veterinari e biologi.

A metà del mese di agosto 2007, a partire da una segnalazione telefonica proveniente da un cittadino residente nella frazione di Castiglione di Cervia e contattando poi i medici del territorio e quelli ospedalieri, il Servizio Igiene Pubblica dell'AUSL Ravenna rileva un numero elevato di persone con sintomatologia febbrile residenti a Castiglione di Cervia e a Castiglione di Ravenna, due piccole località contigue, ma separate da un fiume.



foto 1. *Aedes albopictus* (foto R. Bellini).

(English summary p. 10)

PAROLE CHIAVE: *Aedes albopictus*, *Virus Chikungunya*, *malattie trasmesse da vettori*.

Si avvia immediatamente un'inchiesta epidemiologica, costruendo una prima lista (n. 47 casi) già a partire dal 14 agosto.

Contemporaneamente il Servizio Igiene Pubblica dell'AUSL Ravenna predispose un sistema di sorveglianza attiva finalizzato ad accertare l'effettiva numerosità dei casi, definiti sulla base di una sintomatologia descritta con febbre elevata, associata a dolori ossei e/o muscolari diffusi, di durata superiore alle 24 ore. Alle persone con sintomi viene sottoposto un questionario standardizzato per rilevare informazioni tra cui data di esordio sintomi ed eventuali viaggi.

L'analisi dei primi dati raccolti fa pensare a una febbre di origine arbovirale per cui il 17 agosto sono posizionate in loco, in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZSLER) Sezione di Reggio Emilia, il Centro Agricoltura Ambiente "G. Nicoli" e il Dipartimento di Sanità Pubblica dell'AUSL di Cesena, delle trappole entomologiche per la cattura di insetti ematofagi; tra gli esemplari catturati si evidenzia una decisa predominanza di *Aedes albopictus* (zanzara tigre). Si organizza un primo intervento di lotta adulticida nelle aree pubbliche dei due paesi il 18 agosto e successivamente, dal 23 al 28 agosto, ancora in attesa dell'identificazione dell'agente eziologico, ma convinti del ruolo di Zanzara Tigre quale vettore del patogeno, vengono ripetuti gli interventi adulticidi per 5 notti consecutive, attivati interventi larvicidi su suolo pubblico e si procede a una disinfestazione straordinaria "porta-porta" di tutte le aree private, eseguendo trattamenti larvicidi e rimuovendo tutti i focolai larvali attivi e potenziali.

Viene attivata una raccolta di sangue sulle persone colpite per gli esami sierologici e virologici volti a identificare l'agente eziologico. Analizzando i dati raccolti tramite il questionario standardizzato si è risaliti al primo caso che risulta essere un uomo proveniente dall'India e sulla base dei sintomi prende piede l'ipotesi che si tratti di una febbre da virus *Chikungunya* (CHIKV), ipotesi robustamente sostenuta dalla forte densità di *Ae. albopictus* nell'area. Alla fine di agosto giunge la conferma di laboratorio e i campioni di siero di alcuni pazienti risultano positivi sierologicamente e alla PCR (ISS-Roma). Il 29 agosto viene attivato dalla Regione Emilia - Romagna un sistema di sorveglianza attiva su tutto il territorio regionale per identificare casi di ma-

lattia così definiti: febbre alta (38,5-39,5 °C e oltre) accompagnata da forti dolori articolari, astenia marcata, associata o meno a manifestazioni cutanee. Il picco più alto della curva epidemica si è avuto nella terza settimana di agosto. Fino a questo periodo la maggior parte dei casi ha riguardato Castiglione di Cervia e di Ravenna. In seguito dopo gli interventi di disinfestazione straordinaria i casi a Castiglione sono rapidamente diminuiti e l'ultimo caso in quella zona si è verificato il 6 settembre.

Nel mese di settembre si sono originati 4 focolai secondari dell'epidemia e per 3 di questi, Cervia, Ravenna e Cesena, è stato possibile mettere in relazione il primo caso identificato con il focolaio primario. Nel quarto focolaio secondario, Rimini, invece, non si è riusciti a ricostruire la catena epidemiologica.

A oggi il totale dei casi confermati in laboratorio è pari a 214, dei quali 142 fra residenti delle piccole frazioni di Castiglione di Cervia e di Ravenna. L'ul-

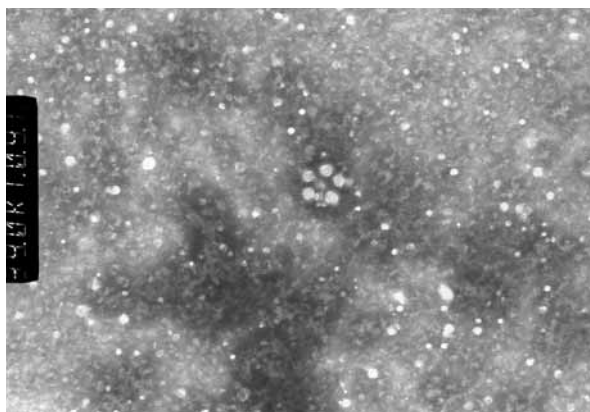


foto 2. CHIKV al microscopio elettronico (foto A. Lavazza)

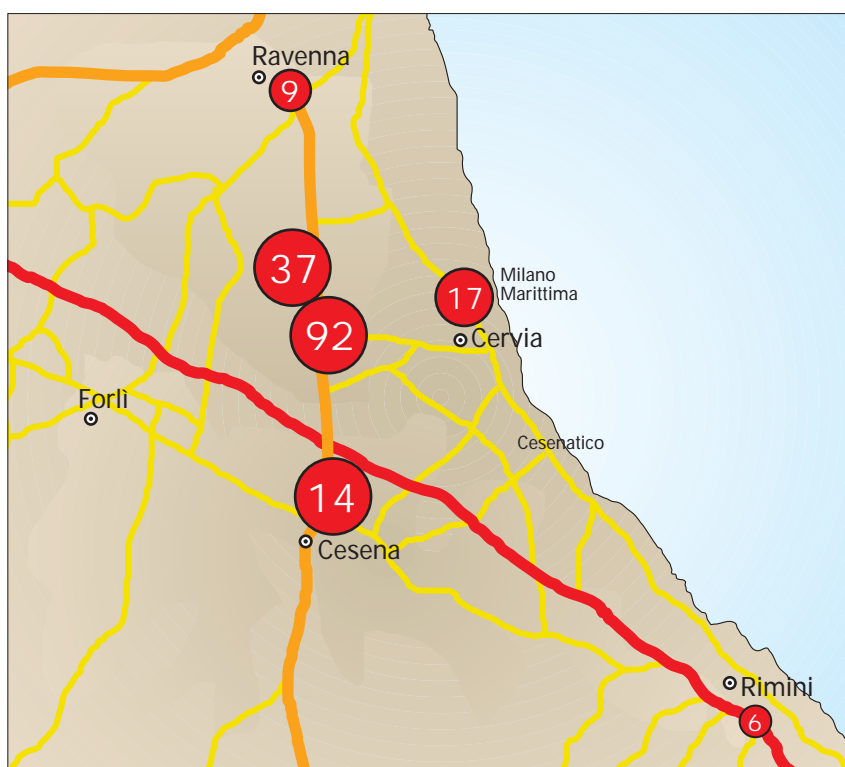


foto 3. Immagine del focolaio romagnolo (P. Angelini)

timo caso si è manifestato il 28 settembre. Analizzando la frequenza dei sintomi riportati si osserva che praticamente in tutti casi si è avuto febbre alta e gravi dolori articolari e in circa il 50% si è presentato un rash cutaneo. Il decorso della malattia è stato prevalentemente benigno con una remissione spontanea dei sintomi. Si è presentato un unico decesso in un soggetto ultraottantenne con delle gravi patologie concomitanti.

CHE COS'È IL VIRUS CHIKUNGUNYA

Il virus *Chikungunya* (CHIKV) fu isolato per la prima volta nel 1953 da un paziente con una sintomatologia simile a quella della Dengue in Tanganyika (attuale Tanzania). Il nome di questo virus è proprio della lingua della popolazione Makonde (provincia di Newala) e significa "ciò che curva", a causa dei forti dolori articolari e muscolari provocati dallo stesso. Il virus *Chikungunya*, è un virus a RNA che appartiene alla famiglia *Togaviridae* e al genere *Alphavirus*, che comprende anche i virus causa della encefalite equina dell'Est e dell'Ovest, encefalite equina venezuelana e altri virus meno famosi e meno diffusi come Mayaro, O'nyong nyong e Sindbis. Questo virus è presente in buona parte dell'Africa sub-Sahariana, dal Senegal fino all'Etiopia a Nord, ad Angola, Zimbabwe, Mozambico e Sud Africa a Sud. È inoltre presente in India, Sri Lanka e nel Sud-Est Asiatico (Cambogia, Indonesia, Malesia, Myanmar, Filippine, Tailandia e Vietnam). Indagini sierologiche hanno mostrato che il 20 - 90% delle popolazioni che abitano questi paesi sarebbero immunizzate al CHIKV.

Dopo la prima epidemia riconosciuta di *Chikungunya* nel '52-'53 in Tanzania, una seconda è scoppiata nel '56 in Sud Africa; negli anni si sono quindi susseguite diverse epidemie, anche di grandi dimensioni. Fra le più note ricordiamo quella che dal 2005 al 2007 ha colpito almeno 300.000 persone, partendo probabilmente dalle coste del Kenya nel 2004, attraversando le Comore, La Reunion, Madagascar, Mauritius e Seychelles, arrivando successivamente in Sri Lanka e Maldive. Ancora più imponente è l'epidemia che dal 2006 colpisce l'India, producendo fino a ora, assieme alla Dengue, almeno 1.500.000 casi. A seguito di queste epidemie fra il 2005 e il 2007 sono stati segnalati casi importati in numerosi paesi: Australia, Belgio, Canada, Repubblica Ceca, Danimarca, Francia, Germania, Hong Kong, Giappone, Norvegia, Spagna, Svizzera, Regno Unito, USA e anche in Italia. I casi importati sono quei casi relativi a individui che contraggono l'infezione all'estero e manifestano i sintomi una volta rientrati in patria, mentre i focolai autoctoni sono

quelli in cui il virus, seppur importato da altri paesi, dove è endemico, riesce a circolare e ad infettare altri soggetti sensibili.

Il virus è trasmesso ai vertebrati dalle zanzare che sono vettori biologici. Le specie incriminate appartengono al genere *Aedes*, in particolare *Ae. aegypti* (non presente in Italia) e *Ae. albopictus*, la Zanzara "Tigre" ormai stabilmente presente nel nostro paese. Anche diverse specie di *Culex* asiatiche sembrano in grado di trasmettere il virus. Mentre in Africa sono i primati non umani i principali serbatoi del CHIKV, in Asia l'infezione persiste con un ciclo uomo - uomo mantenuto da *Ae. aegypti*. Non va inoltre trascurato il ruolo di serbatoio che potrebbero avere alcuni roditori e pipistrelli, che sviluppano una viremia ad alto titolo senza necessariamente mostrare sintomi.

GLOBALIZZAZIONE ED EVOLUZIONE DELLE PATOLOGIE DA VETTORI

Negli ultimi anni è aumentato il numero degli episodi e degli allarmi riferiti alle malattie trasmesse da vettori sia in campo medico sia veterinario; dal 1970 a oggi sono state identificate circa 40 nuove patologie infettive che non erano conosciute dalle generazioni precedenti mentre negli ultimi 5 anni l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha registrato, in tutto il mondo, circa 1100 focolai epidemici di varia natura.

Tra le cause di tale tumultuosa evoluzione rientrano, incontestabilmente, i cambiamenti climatici connessi al riscaldamento del pianeta e la movimentazione di merci e animali legata alla globalizzazione dei mercati, fenomeni che creano le condizioni per far entrare specie esotiche di agenti di malattia - e/o di loro vettori - nel territorio europeo ove, poi, riescono a trovare condizioni ambientali e climatiche favorevoli alla loro sopravvivenza e diffusione. Anche l'aumento degli spostamenti di persone (turisti e lavoratori) incrementano la possibilità che agenti patogeni "esotici" s'insedino in un territorio "libero".

L'OMS, nel suo ultimo Rapporto annuale *A Safer Future - Global Public Health Security in the 21st Century* raccomanda, per affrontare le sfide che si presentano sul percorso collettivo volto a perseguire una sicurezza sanitaria globale, di mobilitare le necessarie competenze tecniche e sostenere la collaborazione interprofessionale per far fronte alle emergenze.

È sulla base di queste considerazioni che la Regione Emilia Romagna ha promosso un progetto teso a creare un sistema di sorveglianza, basata su di una rete di professionalità multidisciplinari (medici, veterinari, biologi), in grado di dare risposta adeguata

a tali problematiche presenti, emergenti e potenziali. Al progetto collaborano attivamente la Direzione Generale Sanità e Politiche Sociali Regionale, l'Università di Bologna - Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, il Centro Emiliano Romagnolo di Epidemiologia Veterinaria e la Sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia - Romagna, il Centro Agricoltura e Ambiente "G. Nicoli" e i Dipartimenti di Sanità Pubblica delle AUSL di Ravenna e Cesena.

I criteri fondamentali del Progetto trovano coerenza con alcuni dei principi fissati dal documento, proposto al Ministero della Salute per una modifica dei Livelli Essenziali di Assistenza, in cui viene fatto riferimento alla predisposizione di sistemi di risposta a emergenze epidemiche tramite:

- l'analisi dei possibili scenari;
- l'identificazione delle misure organizzative da adottare in rapporto ai diversi livelli d'allarme;
- la predisposizione di procedure/protocolli locali per le operazioni di gestione;
- la formazione del personale addetto ai sistemi di controllo.

Il caso *Chikungunya* di Ravenna (estate 2007) risponde in maniera paradigmatica ad alcuni criteri sopradelineati tanto che il "Sistema di Sorveglianza" ha fornito un sostanziale contributo nell'identificazione delle cause e nella pianificazione degli interventi di lotta al vettore (*Aedes albopictus*).

IL RUOLO DELLA ZANZARA TIGRE (*Aedes albopictus*)

Aedes albopictus è un Culicidae molto noto nel nostro Paese col nome di Zanzara Tigre, così battezzata sulla scia dell'anglosassone *Asian Tiger Mosquito*. La distribuzione geografica originaria è asiatica, interessando un'area che va dal Madagascar alla Nuova Guinea e a Nord fino al Giappone (Hawley, 1988). Per ragioni legate alle sue caratteristiche bio-ecologiche, come la capacità di svilupparsi in piccole raccolte d'acqua e la resistenza alle basse temperature attraverso il fenomeno della diapausa embrionale, e grazie anche al commercio internazionale di merci, *in primis* i pneumatici usati, la specie ha iniziato un vero e proprio periodo di espansione invadendo nuovi continenti. Attualmente abbiamo popolazioni stabili di *Ae. albopictus* in diversi Paesi Americani [20, 38, 5, 30, 40, 15, 24] e Africani [13, 17, 51]. In Europa il primo ritrovamento è riferito all'Albania dove si suppone l'introduzione sia da riferire alla metà degli anni '70 [2, 3], nel 1990 la specie fu identificata a Genova [41], nel 1999 in Francia [46], nel 2001 in Serbia e Montenegro [34], nel 2003 in Svizzera [12]; nel 2004 in Croazia [22], Spagna [4] e Grecia [43]; nel 2005 in Olanda [47]. Inoltre nel bacino del mediterraneo è stata segnala-

ta nel 2003 in Israele [33] e Libano [18], e nel 2005 in Siria [18]. Nel nostro Paese la diffusione è capillare nelle aree di pianura e bassa collina del centro-nord mentre più lenta appare la colonizzazione del sud e delle isole. Si tratta di una specie in grado di adattarsi a pungere diversi animali ma con spiccata antropofilia e attività ematofaga diurna, in grado di limitare fortemente le normali attività all'aperto negli ambienti urbani. È infatti nell'ambiente urbano dove trova le migliori possibilità di sviluppo larvale sfruttando le innumerevoli raccolte d'acqua di origine artificiale che si formano in orti, giardini e terrazzi.

Gli inverni degli ambienti temperati, come nel Nord Italia, determinano forte mortalità naturale nelle popolazioni di uova svernanti, cosicché ogni anno la specie riparte in primavera da livelli di densità molto bassi e raggiunge il picco di popolazione in agosto-settembre. Nel Centro-Sud il periodo favorevole allo sviluppo è più lungo ma i mesi estivi sono più asciutti e la dinamica di popolazione si adatta di conseguenza. La capacità di dispersione attiva nell'ambiente urbano è scarsa, anche per l'abbondanza di ospiti e siti di ovideposizione, indicata entro i 500 m. Ma in compenso molto efficace è il trasporto passivo tramite gli autoveicoli. *Ae. albopictus* è tra le specie di zanzara a più alto potenziale di efficienza vettoriale nei confronti di patogeni umani e animali [48, 28, 23, 39, 16].

Nella tabella 1 si riporta una sintesi degli studi di laboratorio sulla competenza vettoriale, cioè la capacità di trasmettere il virus, di *Ae. albopictus* nei confronti degli arbovirus più importanti.

È anche da segnalare che *Ae. albopictus* è in grado di trasmettere la filariosi da *Dirofilaria immitis* e *D. repens* (Cancrini et al., 2003a e 2003b) aggiungendosi così ai vettori indigeni.

LA PATOLOGIA DA VIRUS *CHIKUNGUNYA*: ELEMENTI DI DIAGNOSI CLINICA

Il sintomo principale con cui l'infezione da virus *Chikungunya* si manifesta nel soggetto umano è l'artralgia. Questo sintomo insorge solitamente in modo improvviso dopo un breve periodo di incubazione variabile da 1 a 12 giorni dopo il morso infetto del vettore ed è accompagnato da un nutrito corteo di manifestazioni cliniche, fra cui sono preminenti febbre, cefalea, dolore al dorso e mialgia [36]. L'artralgia è di solito un sintomo intenso e perdurante per lunghi periodi anche dopo la fase di massima acuzie clinica e coinvolge con maggiore frequenza le anche, i polsi e le articolazioni interfalangee [14]. Le grandi articolazioni sono invece meno coinvolte. Una percentuale va-

tabella 1. Competenza vettoriale di *Aedes albopictus* nei confronti degli arbovirus.

		Infezione	Trasmissione	Riferimenti bibliografici
FLAVIVIRIDAE	Dengue 1,2,3,4	+++	+++	[29]
		+++	+++	citato in [27]
		++	++	[56]
	Febbre gialla	++	++	citato [27]
	St. Louis E.	+	+	[45]
	West Nile	+	+	citato in [48]
		+++	+++	[55]
		+++	+++	[44]
TOGAVIRIDAE	Eastern Equine E.	+++	++	[54]
	Western Equine E.	+++	+++	citato in [27]
	Venez. Equine E.	+++	++	[52]
	Ross River	++	++	[29]
	Mayaro	++	++	[49]
	Chikungunya	++	++	[26]
		+++	+++	[50]
		+++	++	[52]
Sindbis	++	++	[11]	
BUNYAVIRIDAE	LaCrosse	+++	++	citato in [27]
		++	++	[21]
	Jamest. Canyon	+++	+	citato in [27]
	Keystone	+++	-	citato in [27]
	Oropouche	+	-	[49]
	Potosi	+	+	citato in [27]
	Rift Valley Fever	++	+	citato in [27]
Trivittatus	+	-	citato [27]	
REOVIRIDAE	Orungo	+(?)	+(?)	citato in [48]

+++ alta; ++ moderata; + bassa; - negativa; (?) livello non determinato.

riabile dal 40 al 50% dei soggetti si presenta anche con sintomi cutanei che si manifestano in forma di eritema pruriginoso maculo papulare (predominante al tronco), edema del volto e (con maggiore prevalenza in età infantile) manifestazioni edematose e petecchiali al volto.

La febbre rappresenta il sintomo più rappresentativo del quadro clinico, con un percentuale di presenza molto vicina al 100% dei soggetti, mentre i dolori articolari sono descritti in una percentuale di pazienti variabile dal 80% al 100%. L'artralgia è spesso ricorrente anche dopo la risoluzione della fase di acuzie della patologia e può persistere per diversi mesi: si stima che almeno il 50% dei soggetti malati ne sia ancora affetto a sei mesi dall'esordio clinico. Secondo alcuni studi eseguiti in occasione della recente epidemia sviluppatasi due anni or sono sull'isola di Reunion, la percentuale di soggetti sofferenti alle articolazioni sarebbe del 15%, dopo 20 mesi dall'esordio [36]. In questi casi non sono ri-

portati indici di flogosi alterati o la presenza di segni di anormalità radiologica.

La mortalità dell'infezione da virus *Chikungunya* è assolutamente modesta e la necessità di ospedalizzazione (indice indiretto di severità clinica) è stata molto modesta in corso della sopra citata epidemia di La Reunion [36]. La malattia sembra colpire con maggiore frequenza i soggetti anziani (età >70 anni) senza che ad oggi se ne sia trovata una soddisfacente spiegazione epidemiologica o patogenetica. A volte sono descritte sporadiche forme di gravità clinica particolarmente rilevante con complicanze neurologiche (meningoencefalite). In corso di gravidanza la trasmissione verticale da madre a feto è un evento altamente probabile se la madre risulta affetta da fase acuta di infezione (30 neonati infetti da 35 madri clinicamente malate e con conferma laboratoristica dell'infezione). In una percentuale elevata di casi (>50%), i neonati presentavano forme clinicamente severe [9].

tabella 2. Primer e sonde utilizzate nelle metodiche PCR che hanno dimostrato la presenza del virus dalle zanzare vettori durante l'epidemia romagnola.

Riferimenti bibliografici	Primer
[35] (RT-nPCR)	I round Chik-1 TAATGCTGAACTCGGGGACC
	cChik-4 ACCTGCCACACCCACCATCGAC
[31] (Taqman® RT-PCR)	II round Chik-2 GATCAGGTTAACCGTGCCGACT
	cChik-3 CACTGACACAACCTACCACAGTCA
	R-CHIK CCAAATTGTCCYGGTCTTCTTCT 10554-10574
	F-CHIK AAGCTYCGCGTCTTTACCAAG 10366-10387
	P-CHIK CCAATGTCYTCMGCTGGACACCTTT 10465-10490

La conferma della infezione clinicamente sospettata si ottiene mediante l'identificazione del genoma virale (RNA) nel siero dei pazienti, mediante tecniche di polimerizzazione degli acidi nucleici (sia classiche che *Real Time*) entro i primi 5-6 giorni dalla comparsa dei sintomi [31]. Trascorso tale periodo dall'infezione, la diagnosi si basa sulla dimostrazione di una specifica risposta anticorpale nel siero dei soggetti infetti. Già entro la prima settimana è spesso possibile mettere in evidenza la presenza di anticorpi specifici di classe IgM, immediatamente seguiti dalla comparsa della risposta di classe IgG [42].

Le tecniche sierologiche attualmente disponibili sono la indaginosa ma molto specifica metodica di inibizione della emoagglutinazione o quelle immunoenzimatiche o di immunofluorescenza indiretta [36].

RICERCHE DI LABORATORIO PER IL VIRUS *CHIKUNGUNYA*

Come ricordato sopra il virus *Chikungunya* è un virus a RNA che appartiene alla famiglia *Togaviridae* e al genere *Alphavirus*, per dimostrare la presenza del genoma virale tramite metodiche PCR occorre primariamente procedere all'estrazione dell'RNA virale. Questa può avvenire con eguale sensibilità da sangue *in toto* o da siero di persone infette entro cinque giorni dalla comparsa dei sintomi. La presenza del virus è rilevabile anche sui vettori responsabili della diffusione della malat-

tia, in questo caso l'estrazione del RNA virale avverrà dopo opportuna omogenizzazione delle zanzare in PBS o MEM, da preferire nel caso si voglia procedere con l'isolamento virale su substrati cellulari (cellule *Vero*, BHK21 o colture cellulari di zanzare in monostrato). In ogni caso il metodo di elezione per l'estrazione del RNA virale avviene tramite l'utilizzo di TRIzol® LS (Invitrogen) seguendo quanto indicato dal protocollo fornito dalla ditta produttrice. All'estrazione del RNA virale deve necessariamente seguire la sintesi del cDNA che come enzima, da preferire, prevede l'utilizzo di SuperScript II® (Invitrogen). Tra i differenti protocolli di PCR disponibili, quelli che hanno consentito di diagnosticare la presenza del CHIKV nel corso dell'epidemia italiana sono una PCR *nested* proposta da Pfeffer *et al.* [35] e una metodica *Real Time* PCR con sonde Taqman® proposta da Pastorino *et al.* [31], come riportato in tabella 2. Queste metodologie erano già state con successo applicate sia su campioni di sangue di persone infette sia su campioni di zanzare vettori nel corso delle ultime epidemie asiatiche.

Durante l'episodio epidemico romagnolo, la presenza del genoma virale tramite PCR è stata dimostrata dai campioni di *Ae. albopictus* 1 e 2, mentre i restanti pool di zanzare sono risultati negativi (tabella 3). Sempre dai pool di *Ae. albopictus* provenienti Castiglione di Cervia e Castiglione di Ravenna è stato condotto con successo l'isolamento virale e da questo è stato possibile procedere con il sequenziamento dell'intero genoma virale ed è stato recentemente depositato in GenBank (*access number* EU244823). Il virus isolato

tabella 3. Pool di zanzare analizzate per isolamento e PCR rivolte a dimostrare la presenza di CHIKV.

Pool	N° di zanzare	Sesso	Specie	Luogo della raccolta	PCR CHIKV
1	125	Femm.	<i>Aedes albopictus</i>	Castiglione Ravenna	POS
2	90	Femm.	<i>Aedes albopictus</i>	Castiglione Cervia	POS
3	214	Femm.	<i>Culex pipiens</i>	Castiglione Ravenna	NEG
4	155	Femm.	<i>Culex pipiens</i>	Castiglione Cervia	NEG
5	5	Femm.	<i>Aedes caspius</i>	Castiglione Ravenna e Castiglione Cervia	NEG
6	2	Femm.	<i>Anopheles spp.</i>	Castiglione Ravenna e Castiglione Cervia	NEG
7	57	maschile	<i>Aedes albopictus</i>	Castiglione Ravenna e Castiglione Cervia	NEG
8	15	maschile	<i>Culex pipiens</i>	Castiglione Ravenna e Castiglione Cervia	NEG

durate l'epidemia italiana è risultato omologo con i virus isolati durante l'ultima epidemia di CHIKV in India nel 2006 (dati in pubblicazione su *Emerging infectious disease*).

RUOLO DEGLI ANIMALI QUALI SERBATOIO DEL VIRUS CHIKUNGUNYA

Non vi sono molti studi o dati disponibili in letteratura relativamente al coinvolgimento di ospiti vertebrati non umani in grado di mantenere il CHIKV nell'ambiente. In Africa il virus è stato isolato da diverse specie di scimmie (cercopiteco verde, galagone del Senegal, babbuino, pata), da roditori e pipistrelli [10]. Anche in Asia il virus è stato isolato in pipistrelli [59], mentre un'indagine svolta in Sri Lanka in una popolazione di macachi di Ceylon (*Macaca sinica*) ha escluso la suscettibilità al CHIKV di questa specie [32].

A oggi un serbatoio vertebrato o una trasmissione silvestre del CHIKV è stata dimostrata solamente in Africa (area in cui il virus si è originato), mentre in Asia si presume che il virus si trasmetta attraverso un ciclo uomo - zanzara - uomo, che talvolta coinvolge altri animali vertebrati.

In Africa il CHIKV è caratterizzato da periodiche epidemie seguite da periodi di silenzio di 3-4 anni. Si ritiene che durante questo periodo di silenzio il virus si mantenga in un ciclo silvestre scimmia - zanzara - scimmia, e che l'esplosione di casi umani sia legata all'aumento della percentuale di soggetti suscettibili nella popolazione di scimmie che ogni 3-4 anni si ricambia [10]. In infezioni sperimentali di scimmie (cercopitechi e babbuini) è stata registrata una viremia di 4 giorni (durata paragonabile a quella rilevata nell'uomo). Le scimmie infettate non hanno mostrato sintomi particolari, a esclusione di un modesto rialzo febbrile e hanno presentato elevati titoli (da 1:160 a 1:1280) all'inibizione dell'emoagglutinazione [25].

L'infezione sperimentale di animali di altre specie, quali uccelli (anatre, polli, egrette e ibis) e mammiferi (bovini, ovini, caprini e cavalli) non ha invece permesso la rilevazione di viremia e di anticorpi neutralizzanti, mentre gli animali infettati hanno mostrato bassi titoli (da 1:40 a 1:80) all'inibizione della emoagglutinazione [25].

La maggior parte delle ipotesi relative al ruolo di potenziali serbatoi derivano da indagini sierologiche di campo che hanno dimostrato la presenza di anticorpi specifici per CHIKV. Da indagini svolte in Africa sono state rilevate alte percentuali di positività tra le scimmie: 15% sieri positivi da scimpanzé, 4 positivi su 5 in cercopitechi verdi (*Cercopithecus aethiops*), 2/3 in babbuini (*Papio ur-*

sinus) [26], mentre i ruminanti risultano marginalmente coinvolti: 0/60 bovini, 3/50 ovini, 2/47 capre 0/63 dromedari in Nigeria [1]; 1/183 zebù nella Repubblica dell'Africa Centrale.

Va però sottolineato che questi studi sono stati per la maggior parte svolti mediante emoagglutinazione (HA) o inibizione dell'emoagglutinazione (HI). Questi test per il CHIKV mostrano reazioni crociate con altri arbovirus (Mayaro, Semliki forest, Getah e Sindbis) endemici in quelle aree e pertanto le eventuali positività andrebbero attentamente valutate [58]. Tra i virus che danno reazioni crociate solo il virus Sindbis è stato segnalato in Italia [51] e questo faciliterebbe l'interpretazione di eventuali sieropositività nella nostra realtà. Pertanto allo scopo di avere maggiori informazioni sull'eventuale ruolo degli animali nell'epidemiologia del virus CHIKV si è deciso di svolgere indagini sierologiche nel ravennate sugli animali (cani, pollame e conigli) conviventi con casi umani di CHIKV.

BIBLIOGRAFIA

- Adesina O. A., Odelola H. A. (1991) "Ecological distribution of Chikungunya haemoagglutination inhibition antibodies in human and domestic animals in Nigeria". *Trop. And geograph. Med.* 43: 3, 271-275.
- Adhami J., N. Murati (1987) "Prani e mushkonjës *Aedes albopictus* në shqipëri". *Revista Mjekësore* 1: 13-16.
- Adhami J., P. Reiter (1998) "Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania". *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14: 340-343.
- Aranda C., R. Eritja, D. Roiz (2006) "First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain". *Med. Vet. Entomol.* 20: 150-152.
- Braga I.A. (1999) "Status of *Aedes albopictus* in Brazil". *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15: 420.
- Calzolari M., Dottori M. (2007) "Arbovirus trasmessi da Culicidi". *L'Osservatorio* anno 10 n. 3.
- Cancrini G., A. Frangipane di Regalbono, I. Ricci, C. Tessarin, S. Gabrielli, M. Pietrobelli (2003 a) "*Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy". *Vet. Parasit.* 118: 195-202.
- Cancrini G., R. Romi, S. Gabrielli, L. Toma, M. Di Paolo, P. Scaramozzino (2003 b) "First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Aedes albopictus*". *Med. Vet. Entomol.* 17: 448-451.
- Cordel H., Quatresous I., Parquet C., Coutourier E. (2006) "Imported cases of Chikungunya in metropolitan France, April 2005-February 2006". *Euro Surveill.* 11, E060810.
- Diallo M., Thonnon J., Traore-Lamizana M., Fontenille D. (1999) "Vectors of chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycle". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 2, 281-286.
- Dohm D.J., T.M. Logan, J.F. Barth, M.J. Turell (1995) "Laboratory transmission of Sindbis virus by *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti*, and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae)". *J. Med. Entomol.* 32: 818-821.
- Flacio E., P. Lüthy, N. Patocchi, F. Guidotti, M. Tonolla, R. Peduzzi (2004) "Primo ritrovamento di *Aedes albopictus* in Svizzera". *Boll. Soc. Ticinese Sc. Nat.* 92: 141-142.
- Fontenille D., J.C. Toto (2001) "*Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), a potential new Dengue vector in Southern Cameroon". *Emerging Infectious Diseases* 7: 1066-1067.

14. Fourie E. D., Morrison J. G. (1979) "Rheumatoid arthritic syndrome after *Chikungunya* fever". S.Afr.Med. 56, 130-132.
15. González Broche R., E. Marro Borja (1999) "*Aedes albopictus* in Cuba". J. Am. Mosq. Control Assoc. 15: 569-570.
16. Gratz N.G. (2004) "Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*". Med. Vet. Entom. 18: 215-227.
17. Gubler D.J. (2003) "*Aedes albopictus* in Africa". The Lancet Infectious Diseases 3: 751-752.
18. Haddad N., R. E. Harbach, S. Chamat, H. Bouharoun-Tayoun (2007) "Presence of *Aedes albopictus* in Lebanon and Syria". J. Am. Mosq. Control Assoc. 23: 226-228.
19. Hawley W. A. (1988) "The biology of *Aedes albopictus*". J. Am. Mosq. Control Assoc. Supplement 1: 1-39.
20. Hawley W. A., P. Reiter, R. S. Copeland, C. B. Pumpuni, G. B. Craig Jr. (1987) "*Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia". Science 236: 1114-1116.
21. Hughes M. T., J.A. Gonzales, K. L. Reagan, C. D. Blair, B. J. Beaty (2006) "Comparative potential of *Aedes triseriatus*, *Aedes albopictus*, and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to transovarially transmit La Crosse virus". J. Med. Entomol. 43: 757-761.
22. Klobu_ar A., E. Merdi_, N. Beni_, _ Baklai_, S. Kr_mar (2006) "First record of *Aedes albopictus* in Croatia". J. Am. Mosq. Control Assoc. 22: 147-148.
23. Knudsen A.B. (1995) "Geographic spread of *Aedes albopictus* in Europe and the concern among public health authorities". Europ. J. Epidem. 11: 345-348.
24. Lugo E. C., G. Moreno, M. A. Zachariah, M. M. López, J. D. López, M. A. Delgado, S. I. Valle, P. M. Espinoza, M. J. Salgado, R. Pérez, S. N. Hammond, E. Harris (2005) "Identification of *Aedes albopictus* in Urban Nicaragua". J. Am. Mosq. Control Assoc. 21: 325-327.
25. Mangiafico J. A. (1971) "Chikungunya virus infection and transmission in five species of mosquito". Am J. Trop. Med. & Hyg. 20: 642-645.
26. McIntosh B. M., Paterson H. E., Donaldson J. M., De Sousa J. (1963) "Chikungunya virus: viral susceptibility and transmission studies with some vertebrates and mosquitoes". Afr. J. Med. Sci., 28, 45-52.
27. Mitchell C. J. (1991) "Vector competence of North and South American strains of *Aedes albopictus* for certain arboviruses: a review". J. Am. Mosq. Control Assoc. 7: 446-451.
28. Mitchell C. J. (1995) "The role of *Aedes albopictus* as an arbovirus vector". Parassitologia 37: 109-113.
29. Mitchell C. J., B. R. Miller, D. J. Gubler (1987) "Vector competence of *Aedes albopictus* from Houston, Texas, for dengue serotypes 1 to 4, yellow fever and Ross River viruses". J. Am. Mosq. Control Assoc. 3: 460-465.
30. Moore C.G. (1999) "*Aedes albopictus* in the United States: current status and prospects for further spread". J. Am. Mosq. Control Assoc. 15: 221-227.
31. Pastorino B., Bessaud M., Grandadam M., Murri S., Tolou H. J., Peyrefitte C. N. (2005) "Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses". J Virol Methods Mar; 124 (1-2): 65-71.
32. Peiris J. S., Dittus W. P., Ratnayake C. B. (1993) "Seroepidemiology of Dengue and other arboviruses in a natural population of toque macaques *Macaca sinica* in Polonnaruwa, Sri Lanka". J. Med. Primatol. 22: 240-245.
33. Pener H., A. Wilamowski, H. Schnur, L. Orshan, U. Shalom, A. Bear (2003) "*Aedes albopictus* in Israel". Europ. Mosq. Bull. 14: 32.
34. Petri_ D., I. Pajovi_, A. Ignjatovi_-upina, M. Zgomba (2001) "*Aedes albopictus* (Skuse, 1894) new mosquito species (Diptera, Culicidae) in the entomofauna of Yugoslavia". Symposia Entom. Serbia, Ent. Soc Serbia, Belgrade, pp. 26-29.
35. Pfeffer M., Linssen B., Parke M. D., Kinney R.M. (2002) "Specific detection of *Chikungunya* virus using a RT-PCR/nested PCR combination". J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. Feb; 49(1): 49-54.
36. Pialoux G., Gauzere B. A., Jaureguiberry S., Strobel M. (2007) "*Chikungunya*, an epidemic of arbovirosis". The Lancet Infect. Dis. 7, 319-327.
37. Powers A. M., Logue C. H. (2007) "Changing patterns of *Chikungunya* virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus". J. Gen. Virol. 88, 2363-2377.
38. Rodriguez Tovar M.L., M.G. Ortega Martínez (1994) "*Aedes albopictus* in Muzquiz city, Coahuila, Mexico". J. Am. Mosq. Control Assoc. 10: 587.
39. Romi R. (2001) "*Aedes albopictus* in Italy: an underestimated health problem". Ann. Ist. Sup. Sanità 37: 241-247.
40. Rossi G. C., N. T. Pascual, F. J. Krsticevic (1999) "First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina". J. Am. Mosq. Control Assoc. 15: 422.
41. Sabatini A., V. Raineri, G. Trovato, M. Coluzzi (1990) "*Aedes albopictus* in Italia e possibile diffusione della specie nell'area mediterranea". Parassitologia 32: 301-304.
42. Sam I. C., AbuBakar S. (2006) "Chikungunya virus infection". Med J Malaysia 61, 264-269.
43. Samanidou - Voyadjoglou A., E. Patsoula, G. Spanakos, N.C. Vakalis (2005) "Confirmation of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Greece". Europ. Mosq. Bull. 19: 10-12.
44. Sardelis M.R., M.J. Turell, M.L. O'Guinn, R.G. Andre, D.R. Roberts (2002) "Vector competence of three North American strains of *Aedes albopictus* for West Nile virus". J. Am. Mosq. Control Assoc. 18: 284-289.
45. Savage H.M., G.C. Smith, C.J. Mitchell, R.G. McLean, M.V. Meisch (1994) "Vector competence of *Aedes albopictus* from Pine Bluff, Arkansas, for a St.Louis encephalitis virus strain isolated during the 1991 epidemic". J. Am. Mosq. Control Assoc. 10: 501-506.
46. Schaffner F., S. Karch (1999) "*Aedes albopictus* discovered in France". SOVE Newsletter 30(4): 11.
47. Scholte E.-J., F. Jacobs, Y.-M. Linton, E. Dijkstra, J. Fransen, W. Takken (2007) "First record of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in the Netherlands". Europ. Mosq. Bull. 22: 5-9.
48. Shroyer D.A. (1986) "*Aedes albopictus* and arboviruses: a concise review of the literature". J. Am. Mosq. Control Assoc. 2: 424-428.
49. Smith G.C., D.B. Francy (1991) "Laboratory studies of a brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses". J. Am. Mosq. Control Assoc. 7: 89-93.
50. Soekiman S., E. Konishi, T. Matsumura (1986) "Susceptibility of Indonesia colonies of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes to experimental infection with *Chikungunya* virus". Kobe J. Med. Sci. 32: 127-132.
51. Tempera G., Guglielmino S., Pappalardo G., Castro A. (1980) "Haemoagglutination inhibition antibodies against Sindbis virus in human and bovine sera in Eastern Sicily". Acta Virologica. 24: 2, 157.
52. Toto J.- C., S. Abaga, P. Carnevale, F. Simard (2003) "First report of the oriental mosquito *Aedes albopictus* on the West African island of Bioko, Equatorial Guinea". Med. Vet. Entomol. 17: 343-346.
53. Turell M. J., J. R. Beaman (1992) "Experimental transmission of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus by a strain of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from New Orleans, Louisiana". J. Med. Entomol. 29: 802-805.
54. Turell M. J., J. R. Beaman, R. F. Tammariello (1992) "Susceptibility of selected strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to Chikungunya virus". J. Med. Entomol. 29: 49-53.
55. Turell M. J., Beaman J. R., Neely G.W. (1994) "Experimental transmission of Eastern Equine Encephalitis virus by strains of *Aedes albopictus* and *Ae. taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae)". J. Med. Entomol. 31: 287-290.

56. Turell M.J., M.L. O'Guinn, D.J. Dohm, J.W. Jones (2001) "Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus". J. Med. Entomol. 38: 130-134.
57. Vazeille-Falcoz M., J. Adhami, L. Mousson, F. Rodhain (1999) "Aedes albopictus from Albania: a potential vector of Dengue viruses". J. Am. Mosq. Control Assoc. 15: 475-478.
58. Zhang H. L., Mi Z. Q., Shi H. F., Yu Y. X., Liu L. H., Wang Z. W. (1997) "A study of the haemoagglutination properties of isolates of Chikungunya virus in Yunnan Province, China". Endemic Dis. Bull. 12: 2, 28-30.
59. Zhang H. L., Shi H. F., Mi Z. Q. (2000) "Investigation of arbovirus in Jinghong city, Yunnan Province, China". Endemic Dis. Bull. 15: 3, 40-44.

THE FIRST TIME IN EUROPE A NON-IMPORTED OUTBREAK OF A TROPICAL ARTHROPOD-BORNE DISEASE IN ROMAGNA

Summary Changes in geographical distribution and transmission patterns of infectious diseases once considered as "exotic" are probably a consequence of globalization and climate changes. Imported cases of Chikungunya have been reported in the lastest years in Europe, and they originated from travels and immigration from endemic countries. In this report regarding a Chikungunya outbreak in Italy in summer 2007, for the first time in Europe, a non-imported outbreak of a tropical arthropod-borne (mosquitoes) disease is described. Epidemiological, ethiological, and diagnostic implications of the outbreak are reported. The interdisciplinary approach and the importance of collaboration among medical doctors, veterinarians and biologists are emphasized.

KEY WORDS: Aedes albopictus, Virus Chikungunya, arthropod-borne diseases.



advantix[®]
spot-on per cani

Grazie all'effetto repellente Advantix[®]:

- **riduce i fastidi e lo stress legati alle punture**
- **riduce i rischi di trasmissione di alcune malattie (CVBD - Canine Vector Borne Disease) come la Leishmaniosi, e le malattie veicolate da zecche (ad es. Ehrlichiosi e Rickettsiosi)**

Non solo uccide pulci e zecche del cane, ma ha anche un **effetto repellente** nei confronti di zecche, zanzare e flebotomi.



EFFETTO REPELENTE




A base di Imidacloprid e Permetrina spot-on per cani

TRIPLA PROTEZIONE
contro pulci, zecche e *anche* zanzare

con effetto repellente



Adatto anche per cagne in gravidanza e allattamento e per i cuccioli di almeno 7 settimane. Prima di utilizzare Advantix[®] su un cucciolo di questa età accertarsi che l'animale abbia raggiunto il peso minimo indicato sulla confezione.

Antiparassitari per uso esterno, per cani. Per uso veterinario - Composizione: 1 ml di soluzione contiene: p.a.: imidacloprid 100 mg, permetrina 500 mg - **Indicazioni:** per la prevenzione ed il trattamento delle infestazioni da pulci, uccide e repelle le zecche, repellente nei confronti di zanzare e flebotomi nei cani. - **Controindicazioni:** non utilizzare su cuccioli di età inferiore a 7 settimane. **NON USARE SUI GATTI.** - **Effetti indesiderati:** in rare occasioni, le reazioni nei cani possono includere sensibilità cutanea transitoria (compresi aumentato prurito, alopecia ed entema nel sito di applicazione) o letargia. - **Istruzioni per l'uso:** per uso esterno, applicare solo su cute integra. - **Regime di dispensazione:** la vendita non è riservata esclusivamente alle farmacie e non è sottoposta all'obbligo di ricetta medico-veterinaria. - **Prima dell'uso leggere attentamente il foglio illustrativo.** Bayer S.p.A. Viale Certosa, 130 - Milano.

NON USARE SUI GATTI. Advantix[®] è estremamente tossico per i gatti. Se applicato su un gatto, o da esso ingerito accidentalmente, può essere letale.