

DEFINIZIONE DI UNA SOGLIA DI RISCHIO EPIDEMIOLOGICO

A seguito dello studio condotto nel 2008 nell'ambito del progetto ministeriale su Chikungunya si sono valutati i livelli di rischio epidemico sulla base dei parametri bio-climatici e in funzione della densità del vettore Zanzara Tigre.

La raccolta dei dati di campo è stata condotta a Cesena, Forlì, Ravenna, Rimini, realizzando tre turni di campionamento nel corso della stagione favorevole, in modo da campionare densità di popolazione crescenti.

Dati riassuntivi della superficie urbanizzata e dei civici campionati nelle 4 aree di studio

Città	Area urbanizzata			Civici		
	Totale (ha)	Area di studio (ha)	%	N. Totale	N. Area di studio	N. campionati
RAVENNA	1274	821	64%	23.793	18.364	837
RIMINI	2707	1699	63%	35.773	30.848	922
CESENA	2000	1111	56%	25.671	16.780	826
FORLÌ	2152	1367	63%	35.436	27.256	924

Complessivamente sono stati ispezionati 3.509 civici rilevando tutti i focolai attivi e potenziali.

I dati raccolti durante i sopralluoghi sono stati: il *Premise Condition*, le caratteristiche dei luoghi di sviluppo larvale, il numero di punture ricevute il giorno precedente l'intervista dal proprietario dell'area ispezionata.

Sono stati condotti campionamenti anche nei tombini presenti in area pubblica interessando 3.317 tombini (822 tombini a Ravenna, 502 a Forlì, 663 a Cesena e 1,330 a Rimini).

E' stato utilizzato anche il dato fornito dalla rete di monitoraggio mediante ovitrapole.

Nell'analisi delle correlazioni tra gli indici di popolazione (larvali e adulti) e il numero di uova raccolte con le ovitrapole sono state prese in considerazione la settimana di monitoraggio precedente il campionamento larvale (le uova raccolte da 0 a 7 giorni prima del campionamento), la settimana coincidente (da 0 a 7 giorni dopo) e la settimana successiva (da 7 a 14 giorni dopo).

Per risalire al numero di adulti in base al numero di pupe è stato utilizzato il modello stocastico di dinamica di popolazione sviluppato per *Ae.aegypti* (Focks et al.1993; Otero et al. 2005).

Le catture di femmine su persona (Human Landing Catches) sono state realizzate nelle aree verdi delle città nel tardo pomeriggio.

Capacità vettoriale. Nel caso delle malattie epidemiche il tasso di riproduzione R viene definito come il numero di casi secondari che si originano dal caso primario. Perché possa avvenire un'epidemia R deve essere maggiore di 1, se $R < 1$ si possono avere solo delle infezioni accidentali ma non una vera e propria epidemia.

Per l'epidemia di Chikungunya sostenuta da *Ae.albopictus* nell'Isola di La Reunion, R_0 è stato calcolato pari a 3,7 (range da 2 a 11 in funzione della durata del periodo di incubazione e dalla velocità del ciclo di sviluppo di *Ae.albopictus*). Rizzo (ESCAIDE Berlino 2008), analizzando i dati dell'epidemia in Italia è arrivata ad una conclusione simile con $R_0 = 3,62$ (range da 3.1 a 4.8).

La capacità vettoriale è definita come il numero medio di punture potenzialmente infettive che vengono realizzate dai vettori che si alimentano su un singolo ospite in un giorno.

$$(1) \text{ Capacità vettoriale} = (mbS_m * p^i) / (-\log_e p)$$

mentre il tasso di accrescimento della malattia è:

$$(2) R_0 = mbS_m VS_v p^i / (-\log_e p)$$

Fine 1981; Reisen 1989

Dalla equazione (2) è possibile ricavare m la quantità di punture/uomo/giorno che è la nostra incognita.

$$(3) m = [R_0 * (- \log_e p)] / bS_mVS_v p^i$$

L'equazione finale inserendo il fattore di correzione X_v risulta essere:

$$(4) m = [R_0 * (- \log_e p)] / bX_vS_mVS_v p^i$$

In base all'equazione (4) è possibile calcolare il numero di punture giornaliere necessarie perché sia avviata un'epidemia ($R=1$) mantenendo fissi tutti i parametri tranne il ciclo gonotrofico che è possibile definire in base alla temperatura.

I singoli elementi dell'equazione vengono di seguito descritti e riassunti nella tabella 2:

Tab.2 . Parametri utilizzati per il calcolo della capacità vettoriale di *Ae. albopictus*

Parametri		Valori	Referenze
Pasti di sangue multipli/ciclo gonotrofico	mF	1.20	Hawley 1988
Preferenza per l'uomo	AI	0.86	Valerio et al. (2010)
Ciclo gonotrofico	GC	4 - 11 g	Focks et al. (1993).
Competenza vettoriale	Sm	Chik.: 24 - 80 % Dengue: 38.0 - 72.0 %	Vazeille et al. (2007) Talabaghi et al. (2010) Mitchell (1991)
Viremia	v	6 giorni	Peters and Dalrymple (1990) Boelle et al. (2008)
Sopravvivenza giornaliera femmine	p	0.82	Hawley (1988) Willis and Nasci (1994) Almeida et al. (2005)
Durata ciclo estrinseco	i	Chik.: 2-6 giorni Dengue: 10 giorni	Rizzo et al. (2008) Hawley (1988)
Fattore di correzione capacità vettoriale	XSm	0.094	Calcolato
Rapporto punture/uova	B/E	PDS: 0,05 ± 0.02 SD HLC: 0,04 ± 0.02 SD Interv: 0.03 ± 0.03 SD	Calcolato
Suscettibilità a Dengue and Chikungunya	Sv	1	Stimato

m – numero di punture uomo/giorno

b = AI/GC dove AI è la proporzione di femmine che si alimentano sull'uomo e GC è la durata del ciclo gonotrofico in giorni (Fig.2).

Sm – Vector competence MacDonald (1957) introdusse nella formula della capacità vettoriale un fattore di correzione, Sm, definito come la proporzione delle Anopheline con sporozoiiti nelle ghiandole salivari e quindi infettive. Nel nostro caso Sm corrisponde alla competenza vettoriale che descrive l'efficienza con la quale un patogeno acquisito è trasmesso dal vettore.

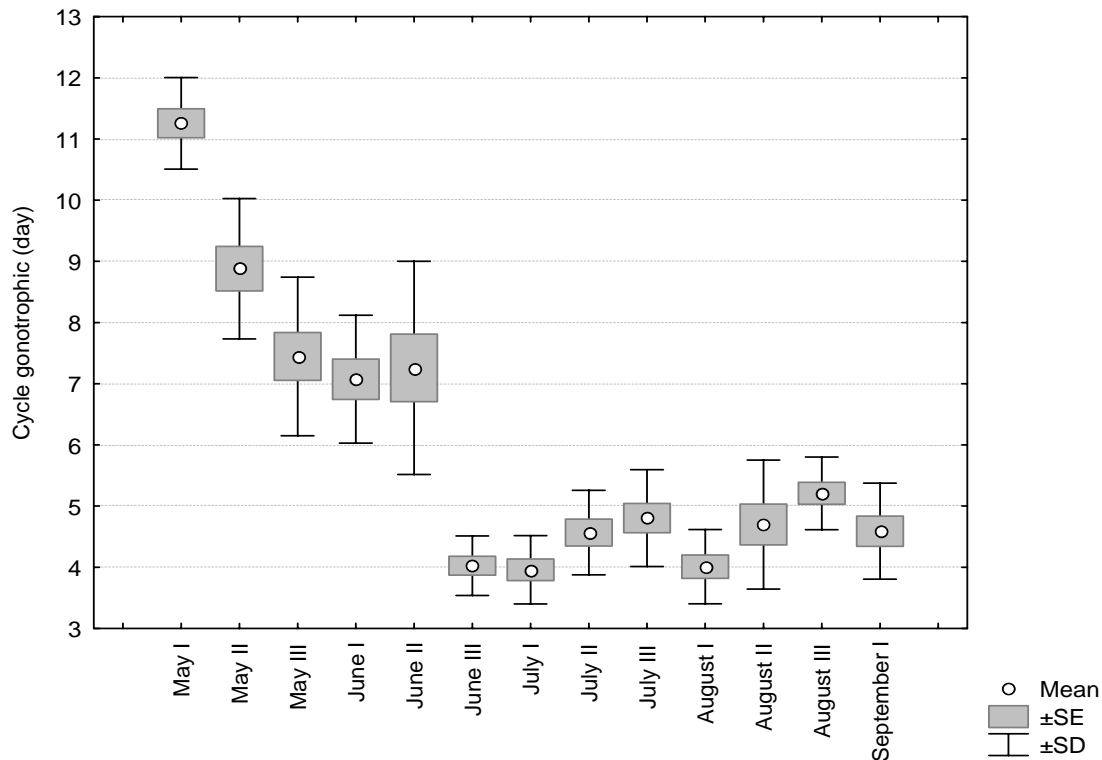
V- Viremia è il periodo di infettività dell'ospite malato, per Chikungunya sono 5-7 giorni (Peters and Dalrymple 1990, Boelle et al. 2008) con massimo di 12 giorni. Noi assumeremo che una persona rimanga viremica per 6 giorni. Per il Dengue la viremia varia da 2 a 12 con una media di 4-5 giorni.(Gubler et al. 1981) e non ci sono differenze sostanziali tra i quattro ceppi di virus.

Sv – la proporzione di popolazione sensibile all'infezione. In questo caso abbiamo considerato la popolazione italiana completamente suscettibile a Chikungunya e Dengue.

P – sopravvivenza giornaliera delle zanzare che mediamente è circa 0.82.

i - è la durata del ciclo estrinseco del virus, cioè il periodo di incubazione nella zanzara, che varia a 26°C da 3 a 4 giorni (ECDC meeting Report Consultation on vector-related risk for Chikungunya virus transmission in Europe Paris, 22 October 2007). Rizzo et al. indicano come ciclo estrinseco in *Ae.albopictus* un valore variabile da 2.99 a 6.31 (4.5 di media). Hawley (1988) indica che la durata del ciclo estrinseco del Dengue in *Ae.albopictus* è di 10 giorni.

Fig. 2 Andamento del ciclo gonotrofico nel 2008 calcolato mediante il modello di Focks durante la stagione estiva in Emilia-Romagna



Risultati

Complessivamente i sopralluoghi sono stati realizzati in 3.509 civici di cui 2.919 (83,18%) avevano un giardino. Le case con almeno un focolaio di *Ae.albopictus* sono state 922 e sono stati analizzati 27.836 potenziali luoghi di sviluppo larvale, di questi 8.931 (32,1%) presentavano acqua, mentre 1.583 (17,7% dei contenitori con acqua) erano positivi (Tab.3).

Tab.3 Dati raccolti nei giardini ispezionati nelle aree di studio

Città	Civici	N. abitanti/Kmq	Civici ispezionati	Case positive	N. contenitori	Contenitori con acqua	Contenitori positivi	n. pupe
RIMINI	30.848	8.679-9.593	922	130	6.747	2.042	182	5.192
RAVENNA	18.364	5.704	837	189	5.945	2.063	303	8912
CESENA	16.780	3.752	826	262	7.655	2.120	444	13.000
FORLÌ	27.256	4.252	924	341	7.489	2.706	654	17.080
TOTALE	93.248	5.711	3.509	922	27.836	8.931	1.583	44.184

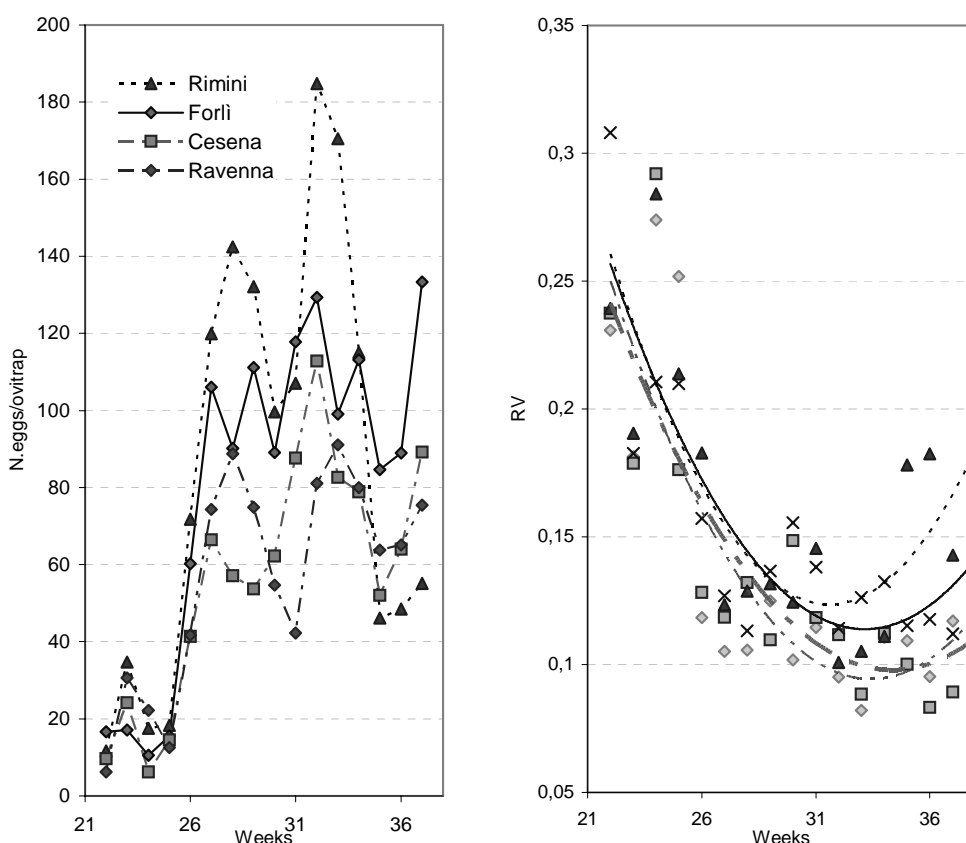
La maggior parte dei contenitori rilevati erano sottovasi (il 61% di tutti i contenitori ispezionati) e tombini (25%). Ma se andiamo ad analizzare i contenitori in funzione della presenza di pupe osserviamo che i focolai con la stragrande maggioranza di pupe erano tombini (94,14 % delle pupe rilevate), seguono i bidoni utilizzati negli orti domestici (2,6%), i secchi (0,9 %) ed i contenitori di medie dimensioni (0,79%), mentre nei sottovasi sono state rilevate solo il 0,65 % delle pupe totali.

Tab.4 Numero medio di contenitori e di pupe per giardino presenti nei 2.919 giardini ispezionati e numero medio di pupe/ettaro rilevato nei 12 campionamenti

Contenitori	N.contenitori /giardino	N.cont. infestati /giardino	N.pupe /giardino	N.pupe /ettaro
Tombini	2,35 ± 2,96	0,33 ± 0,96	15,14 ± 123,14	237,77 ± 152,46
Sottovasi	5,79 ± 11,75	0,08 ± 0,57	0,10 ± 1,34	1,72 ± 1,67
Bidoni orti	0,09 ± 0,62	0,03 ± 0,27	0,42 ± 13,60	6,09 ± 11,13
Secchi	0,31 ± 1,16	0,03 ± 0,27	0,14 ± 2,59	2,08 ± 2,35
Teli	0,09 ± 1,06	0,00 ± 0,03	0,00 ± 0,06	0,01 ± 0,05
Copertoni	0,23 ± 9,75	0,00 ± 0,11	0,01 ± 0,38	0,13 ± 0,44
Vasche	0,02 ± 0,23	0,00 ± 0,05	0,02 ± 1,00	0,36 ± 0,87
Altri contenitori < 1 l	0,28 ± 3,01	0,02 ± 0,20	0,03 ± 0,57	0,54 ± 0,64
1 < Altri contenitori < 10 l	0,29 ± 1,07	0,03 ± 0,27	0,13 ± 2,08	2,28 ± 4,80
Altri contenitori > 10 l	0,09 ± 0,66	0,01 ± 0,14	0,08 ± 2,17	1,25 ± 1,89

Monitoraggio con ovitrappole. Nella figura 3 è possibile osservare l'andamento stagionale del numero medio di uova raccolto nelle aree di studio dalla rete regionale di monitoraggio di *Ae.albopictus* nel 2008. Si osservano diversi picchi di cattura alla 23^a, 28^a e 32^a settimana. Il coefficiente RV (Relative Variation) nel periodo estivo dalla 26^a alla 38^a è accettabile (RV compreso tra 0.08 e 0.15) indicando una buona efficienza del monitoraggio (Southwood 1978).

Fig.3 Andamento del numero medio di uova raccolte con le ovitrappole durante il periodo di studio e il Relative Variation Coefficient.



Analisi degli indici di popolazione. Sono stati presi in esame i diversi indici di popolazione normalmente utilizzati per *Ae.aegypti* che tengono conto dell'infestazione presente nei giardini delle abitazioni quali House Index, Container Index, Breteau Index, Pupe/giardino e Pupe/persona. Inoltre è stato calcolato l'indice Pupe/ettaro che tiene conto anche della quota di zanzare che si sviluppa in area pubblica.

Si osserva una buona correlazione tra i diversi Indici tradizionali di popolazione in accordo con i dati di Tun Lin et al. (2005) ma non con il numero di pupe rilevato in un ettaro (Tab.4).

Gli indici di popolazione calcolati sono stati messi in correlazione con il numero medio di uova deposte nella settimana precedente, nella settimana coincidente e in quella successiva l'indagine.

Rapporto tra il numero adulti stimato dalla densità di pupe e numero medio di uova rilevato con il monitoraggio. In base al numero di pupe raccolte in campo è stato stimato attraverso il modello stocastico di dinamica di popolazione di Otero et al. (2005) il numero di femmine adulte. Quindi è stato calcolato il rapporto medio tra il numero di femmine presenti in un ettaro stimato attraverso Pupal Demographic Survey e il numero di uova raccolte con le ovitrappole nella settimana successiva il campionamento che è pari 1.22 ± 0.65 SD (Limiti conf. 95% 0.81 – 1.63).

Interviste sul numero di punture ricevute il giorno precedente. I risultati delle interviste realizzate durante i sopralluoghi sono raccolti nella tabella 4.

L'ANOVA a due vie (Data*Area) evidenzia differenze significative nel numero di punture giornaliere dichiarate dagli intervistati tra le diverse aree e nei tre campionamenti ($F_{1,6}=2,46$ and $P<0.03$). A Giugno il numero medio di punture ricevuto dagli intervistati è stato significativamente superiore a Forlì con 1,15 punture/giorno contro le 0,23-0,41 punture/giorno dichiarate dagli intervistati nelle altre aree.

A Luglio si assiste ad un incremento del numero di punture rilevato a Cesena e a Rimini, mentre Ravenna risulta la città con il minor numero di punture. Nel mese di Agosto non si osservano differenze significative tra le 4 aree e il numero di punture giornaliere varia da 1,12 di Rimini a 1,67 di Forlì (Tab.4).

Tab.4 Numero medio di punture ricevute dichiarate dagli intervistati (I) e numero di femmine catturate in 15 minuti (HLC)

Data	Comune	Numero medio di punture ricevute dagli intervistati			HUMAN LANDING COLLECTION			
		N	Media \pm SD		N	Media \pm SD		
Giugno	Cesena	208	0,37 \pm 1,06	a	15	0,73 \pm 1,33	ns	
	Forlì	225	1,15 \pm 2,49	b	15	1,00 \pm 1,25		
	Ravenna	192	0,41 \pm 1,15	a	15	0,60 \pm 0,83		
	Rimini	196	0,23 \pm 0,66	a	15	0,53 \pm 1,06		
Luglio	Cesena	185	1,48 \pm 3,15	ns	15	1,27 \pm 0,96	ns	
	Forlì	180	1,59 \pm 2,69		15	3,80 \pm 3,93		
	Ravenna	185	0,73 \pm 2,08		15	1,93 \pm 2,12		
	Rimini	213	1,11 \pm 2,19		15	2,20 \pm 2,51		
Agosto	Cesena	189	1,26 \pm 2,71	a	-	-		
	Forlì	189	1,67 \pm 2,91	a	15	5,73 \pm 4,48		a
	Ravenna	173	1,50 \pm 3,22	b	15	2,73 \pm 2,4		b
	Rimini	222	1,12 \pm 3,59	ab	-	-		
All Groups		2357	1,04 \pm 2,53		180	2,09 \pm 2,69		

Lettere uguali non evidenziano differenze significative al Test di Newman-Keuls

Human Landing Collection. Nell'analisi delle catture su uomo sono stati esclusi i dati di cattura realizzati a Cesena e a Rimini nel mese di Agosto poiché a Cesena il vento registrato al momento delle catture era elevato e non consentiva il volo delle zanzare, mentre a Rimini sono stati realizzati interventi adulticidi nelle aree di studio.

Il numero medio di catture su uomo in 15 minuti nel mese di giugno e di luglio è risultato simile in tutte le 4 aree di studio, mentre nel mese luglio si sono registrate catture significativamente (ANOVA $F_{1,28}=5.22$ and $P<0.03$) più alte a Forlì rispetto a Ravenna.

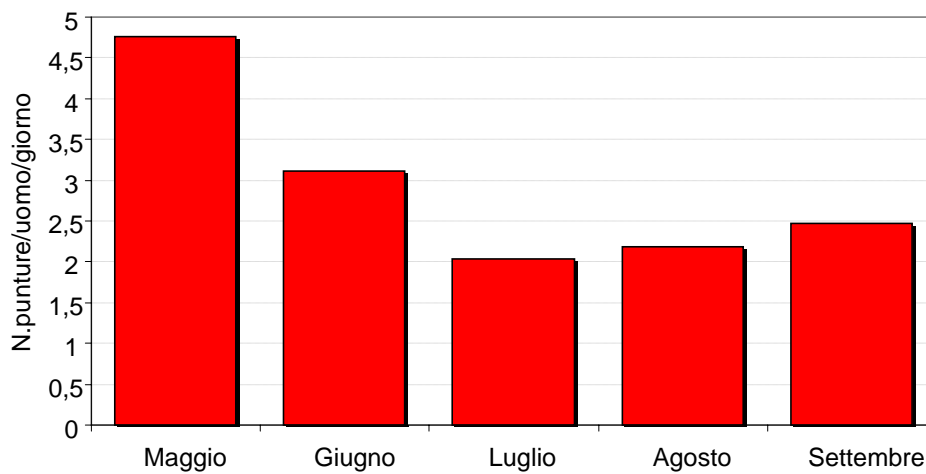
Relazione tra il monitoraggio mediante ovitrappole, il numero di punture ricevute dai cittadini (interviste) e Human Landing Collection. Il numero di punture dipende ovviamente dal numero di zanzare presenti ma anche dalla densità dell'ospite e quindi dal rapporto

zanzare/ospite. Partendo da questa considerazione si è deciso di correggere il numero di uova raccolte, che stima la densità delle zanzare, con la densità di popolazione (abitanti/ha). Per Cesena, Ravenna e Forlì la densità di popolazione è stata mantenuta costante per tutta la stagione estiva mentre per Rimini si è tenuto conto anche del flusso turistico.

Definizione della soglia di diffusione. Per definire il valore soglia di punture/uomo si è posto $R=1$ (una epidemia viene avviata quando $R > 1$), la durata del ciclo estrinseco da 2 a 6 in funzione della temperatura e si è calcolata la lunghezza media del ciclo gonotrofico mediante il modello di Focks (1993).

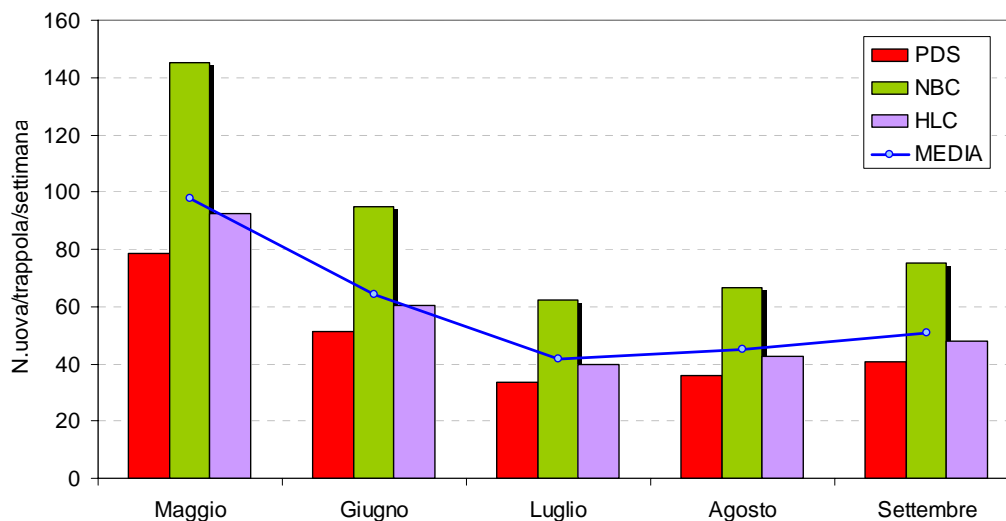
Come si osserva nella figura 4 per avviare un'epidemia di Chikungunya (ceppo mutato Ala226Val) occorrono da 1,7 punture/persona/giorno nei mesi più caldi fino a 3,9 punture/persona/giorno a maggio.

Fig.4 Numero di punture/persona/giorno necessario per avviare una epidemia ($R=1$) di Chikungunya (ceppo mutato Ala226Val)



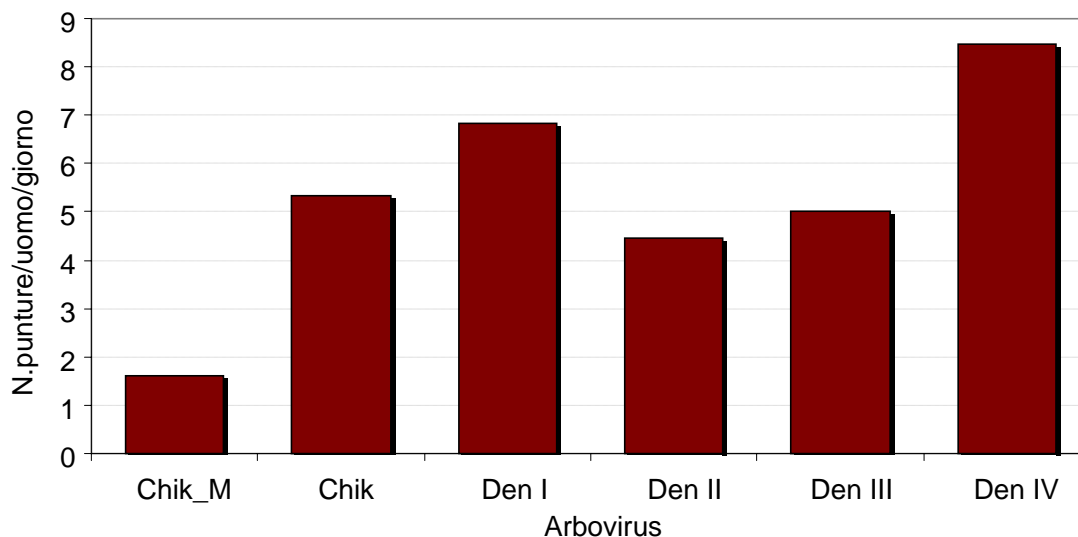
Considerando $X_v = 0.094$ abbiamo stimato attraverso l'equazione (8) (utilizzando i 3 rapporti femmine/uova calcolati con i dati raccolti con l'HLC, PDS e le interviste), i valori soglia per la diffusione del virus ($R=1$), in termini di numero di uova/trappola/settimana. Il numero medio di uova varia da 98 uova/trap/settimana a maggio a 42 uova/trap/settimana a luglio (Fig.5).

Fig.5 Numero di uova/trappola/settimana (calcolato utilizzando i rapporti definiti attraverso HLC, PDS e interviste) necessario per avviare una epidemia di Chikungunya (ceppo mutato Ala226Val)



Fissando la lunghezza media del ciclo gonotrofico a 4.5 giorni ed il ciclo estrinseco in 4 giorni per CHIK e 10 per Dengue, è stato possibile calcolare la soglia come numero di punture (Fig.6) e come numero di uova (Tab.5) per Chikungunya (CHIK_M ceppo mutato; CHIK ceppo non mutato) e per i 4 ceppi di Dengue nel periodo estivo.

Fig.6 Numero di punture/persona/giorno necessario per avviare una epidemia ($R=1$) di Chikungunya (ceppi mutato e non mutato) e per i 4 ceppi di Dengue



Tab.5 Numero medio di uova/trap/sett (calcolato utilizzando la media dei 3 rapporti F/E calcolati) necessario per avviare un'epidemia ($R=1$) di Chikungunya e Dengue in un'area urbana con una densità abitativa di 30 persone/ha

Arbovirus	N	Media	SD
Chik_M	3	40,21	14,47
Chik	3	134,02	48,22
Den I	3	171,70	61,78
Den II	3	112,08	40,33
Den III	3	126,09	45,37
Den IV	3	212,36	76,41

In un centro abitato con densità abitativa media di 30 persone/ha, risulta quindi che la soglia espressa in numero di uova/trappola/settimana, per il ceppo mutato di Chikungunya è da 3 a 5 volte più bassa rispetto al ceppo non mutato ed ai 4 ceppi di Dengue.