



UNIVERSITÀ DI PARMA

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE MEDICO VETERINARIE

CICLO XXVII

## RICERCA ED ISOLAMENTO DI ARBOVIRUS NEGLETTI DA INSETTI EMATOFAGI IN EMILIA-ROMAGNA

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Gaetano Donofrio

UNIVERSITÀ  
DI PARMA



Firmato digitalmente da  
Gaetano Donofrio  
Data: 17.01.2025 14:04:16  
CET

Tutore:

Chiar.mo Prof. Marco Genchi

Dottorando: Mattia Calzolari

Anni Accademici 2021/2022 – 2023/2024

## INDICE

RIASSUNTO/ABSTRACT.....	3
1. INTRODUZIONE	
Scopo progettuale e contesto scientifico.....	5
Gli arbovirus.....	6
Il Tahyna virus.....	8
I <i>Phlebovirus</i> .....	11
Artropodi vettori.....	13
Epidemiologia degli arbovirus.....	15
2. MATERIALI E METODI	
Campionamento degli insetti.....	20
Screening e identificazione degli arbovirus.....	22
Isolamento virale e microscopia elettronica.....	25
Sequenziamenti e analisi filogenetiche.....	27
Messa a punto di protocolli di PCR real-time specifici.....	29
3. RISULTATI	
Arbovirus rilevati nelle zanzare campionate.....	32
Quantificazione del Tahyna virus con PCR real-time .....	36
Isolamento e sequenziamento del Tahyna virus.....	39
Arbovirus rilevati nei flebotomi campionati.....	41
4. DISCUSSIONE.....	47
5. CONCLUSIONI.....	56
RINGRAZIAMENTI.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	59
ARTICOLI PUBBLICATI.....	75

## RIASSUNTO/ABSTRACT

Il termine arbovirus (acronimo di arthropod-borne virus) sta ad indicare i virus biologicamente trasmessi dalla puntura di un artropode ematofago ad un ospite vertebrato. Questo termine non ha quindi un significato tassonomico, ma ha una valenza epidemiologica; gli arbovirus appartengono, infatti, a diversi generi di virus, come *Orthoflavivirus*, *Phlebovirus* e *Orthobunyavirus*.

Numerosi arbovirus sono attivamente monitorati per la loro abbondante diffusione e la loro rilevanza sanitaria. Il West Nile virus (WNV) è uno di questi, oggetto di un piano di sorveglianza nazionale in Italia, implementato a livello regionale anche in Emilia-Romagna, con l'obiettivo primario di garantire la sicurezza delle donazioni di sangue e organi. Altri virus sono invece negletti e non oggetto di sorveglianze dedicate, anche se già rilevati in una particolare area, come il Tahyna virus (TAHV) e il Toscana virus (TOSV).

In questo studio diversi arbovirus, più o meno noti, sono stati ricercati in insetti ematofagi campionati sul campo, in particolare zanzare e flebotomi. Più di 100.000 zanzare sono state catturate e testate, rilevando WNV, Usutu virus e TAHV. Sono stati inoltre campionati più di 98.000 flebotomi, circa 70.000 dei quali sono stati testati rilevando il TOSV e il Fermo virus, ma anche altri *Phlebovirus* meno noti, come Corfou virus, Punique virus e i Ponticelli virus.

Questa attività ha permesso di caratterizzare la presenza di arbovirus nell'area di studio ed inoltre di isolare un ceppo di TAHV, che potrà essere utile per mettere a punto nuovi test diagnostici. La presenza di questi arbovirus sul territorio suggerisce di indagare la loro potenziale capacità patogena per uomo e animali, sia per quelli già noti per provocare malattia nell'uomo, che per quelli solo recentemente descritti e con un ciclo meno noto.

### **Neglected arboviruses search and isolation from haematophagous insects in Emilia-Romagna**

The arboviruses (Arthropod-borne viruses) include viruses biologically transmitted to a vertebrate host by the bite of a blood-sucking arthropod. This term has an epidemiological value but does not have a taxonomic meaning; arboviruses belong to different genera of viruses, such as *Orthoflavivirus*, *Phlebovirus* and *Orthobunyavirus*. Some arboviruses are actively monitored for their abundant spread and health relevance. The West Nile virus (WNV) is one of these and is the subject of a national surveillance plan in Italy, implemented at a regional level, also in Emilia-Romagna, with the primary objective of guarantee the safety of blood and organ donations. Other viruses, however, are neglected and not subject to targeted surveillance, even if already detected in a particular area, such as the Tahyna virus (TAHV) and the Toscana virus (TOSV). In this study, several arboviruses were searched in blood-sucking insects sampled in the field, in particular mosquitoes and sand flies. More than 100,000 mosquitoes were captured and tested, detecting WNV, Usutu virus and TAHV. Furthermore, more than 98,000 sandflies were sampled; approximately 70,000 were tested detecting the TOSV and the Fermo virus, but also other phleboviruses, such as Corfou virus, Punique virus and Ponticelli viruses. This activity made it possible to characterize the presence of arboviruses in the study area and to isolate a strain of TAHV, which may be useful for developing new diagnostic tests. The presence of these arboviruses in the area suggests investigating their potential pathogenicity for humans and animals, both for those already known to cause disease in humans and for those only recently described and with a less known cycle.

## 1. INTRODUZIONE

### Scopo progettuale e contesto scientifico

Le malattie trasmesse da vettore possono essere causate da agenti patogeni diversissimi tra di loro, dai protozoi, agenti eziologici di malaria e leishmaniosi, ai nematodi, causa di filariosi, ai virus (raggruppati sotto il termine di arbovirus) che possono essere causa di febbri estive ma avere complicanze anche gravi, come infezioni neuro-invasive o febbri emorragiche (Service 2001). Queste malattie sono un rilevante problema sanitario a livello globale.

L'attività svolta in questi anni di sorveglianza entomologica dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) ha rilevato diversi arbovirus in Emilia-Romagna, in particolare nelle zanzare e nei flebotomi. Alcuni di questi virus, trasmessi dalle zanzare, sono ben noti per la loro patogenicità su uomo e animali, come il West Nile virus (WNV), altri sono stati rilevati ma non conosciamo la loro diffusione, anche se sappiamo che sono patogeni, per esempio il Tahyna virus (TAHV), altri sono stati rilevati e isolati ma non sappiamo quanto siano patogeni.

Di particolare interesse sono i *Phlebovirus* isolati dai flebotomi. Molti *Phlebovirus* sono agenti di malattie nell'uomo, come le febbri estive causate dai virus Sicilia e Napoli ("febbre dei tre giorni") o la meningite causata dal Toscana virus (TOSV). L'epidemiologia dei *Phlebovirus* è spesso enigmatica, in particolare riguardo alla possibile presenza di serbatoi vertebrati, anche se la capacità di molti di questi virus di infettare i vertebrati non è nota.

La presenza di patogeni trasmessi da artropodi è ben nota in Emilia-Romagna, in questa regione nel 2007 è stato registrato il primo focolaio autoctono, sostenuto dalla zanzara tigre, di una malattia esotica (il Chikungunya) in Europa (Rezza et al. 2007). Diversi patogeni trasmessi da artropodi sono attivamente ricercati con sorveglianze dedicate (in particolare il WNV) perché causa di epidemia più o meno intense e persistenti. Esistono però dei virus negletti, potenzialmente patogeni, ma non attivamente ricercati.

Questo progetto si è quindi focalizzato sulla caratterizzazione degli arbovirus in Emilia Romagna, con una particolare attenzione a quelli meno noti, colmando le lacune esistenti sulla conoscenza della loro distribuzione e dei principali vettori. Inoltre, si è lavorato sulla messa a punto di nuove metodiche per il rilevamento di questi virus, per poter implementare la sensibilità con cui vengono rilevati. Questo nell'ottica di meglio definire la presenza di questi virus sul territorio, migliorare la diagnosi dell'infezione nell'uomo e negli animali e garantire l'implementazione di adeguate azioni preventive di sanità pubblica.

### **Gli arbovirus**

Gli arbovirus (**arthropod-borne virus**) sono virus mantenuti in natura principalmente attraverso la trasmissione biologica tra ospiti vertebrati ed artropodi ematofagi, e tramite la trasmissione verticale (transovarica o venera) negli artropodi vettori (WHO, 1985). Gli arbovirus, dai quali sono esclusi i virus trasmessi meccanicamente dagli artropodi, sono svariati e possono appartenere a diverse famiglie di virus, in particolare *Flaviviridae*, *Phenuiviridae*, *Peribunyaviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae* (Gratz 2006). Sono per la grande maggioranza virus a RNA, e la loro diversità tassonomica suggerisce che l'adattamento alla strategia di persistenza che coinvolge artropodi e ospiti vertebrati, sia avvenuto diverse volte nella storia evolutiva dei virus a RNA. Una lista non esaustiva dei virus potenzialmente trasmessi dalle zanzare e riportata a scopo esemplificativo nella tabella 1.

Tabella 1 — Arbovirus trasmessi dalle zanzare che causano (o sono sospettati di causare) malattia nell'uomo (da Calzolari 2016).

Virus genus	Virus name
<i>Alphavirus</i>	Babanki (AF), <b>Barmah Forest</b> (AU), <b>Chikungunya</b> (AF, AS, AM, PPH, and HV), <b>Eastern equine encephalitis</b> (AM), Everglades (AM), <b>Igbo Ora</b> (AF), <b>Mayaro</b> (AM, PPH, and HV), <b>O'nyon-nyong</b> (AF, PPH, and HV), <b>Ross River</b> (AU), <b>Semliki Forest</b> (AF, AS, and PPH), <b>Sindbis</b> (EU, AF, and AU), Tonate (AM), <b>Venezuelan equine encephalomyelitis</b> (AM and HV), <b>Western equine encephalitis</b> (AM)
<i>Flavivirus</i>	Banzi (AF), Bussuquara (AM and PPH), Cacipacore (AM), <b>Dengue</b> (4 serotypes; AS, AM, AF, PPH, and HV), Edge hill (AU), Ilheus (AM), <b>Japanese encephalitis</b> (AS), Kedougou (AF), Kokobera (AU), Koutango (AF), <b>Murray Valley encephalitis</b> (Alfuy; AU), <b>Rocio encephalitis</b> (AM), Sepik (AU), Sponsweni (AF), St Louis encephalitis (AM), Usutu (EU and AF), Wesselsbron (AF), <b>West Nile fever (Kunjin; AF, AS, AM, AU, and EU)</b> , <b>Yellow fever</b> (AF, AM, PPH, and HV), <b>Zika</b> (AF, AS, AU, PPH, and HV)
<i>Orthobunyavirus</i>	Bunyawera* (Bunyamwera [AF], Germiston [AF], Guaroa [AM], Batai [Calovo; EU, AF, and AS], Ilesha [AF], Tensaw [AM], Maguari [AM], Shokwe [AF], Fort Sherman [AM], Ngari [AF]), Bwaba* (Bwamba [AF and PPH], Pongola [AF]), California encephalitis* (Jamestown Canyon [AM], Inkoo [EU], <b>La Crosse*</b> [AM], <b>Tahyna</b> [EU, AS, and AF], Snowshoe hare encephalitis [EU and AM], Trivittatus [AM]), Caraparu* (Apeu [AM], Caraparu [AM and PPH], Ossa [AM]), Catu* (AM and PPH), Guama* (AM and PPH), Madrid* (AM), Marituba* (Marituba [AM and PPH], Murutucu [AM], Nepuyo [AM], Restan [AM]), Nyando* (AF), Oriboca* (Oriboca [AM and PPH], Itaqui [AM]), Shuni* (AM), Tacaiuma* (AM and PPH), ungrouped (Gan Gan [AU], Tataguine [AF], Tanga [AF], Bangui [AF]), Wyeomyia* (AM)
<i>Phlebovirus</i>	<b>Rift Valley fever</b> (AF), Arumowot (AF)
<i>Orbivirus</i>	Lebombo (AF), Orungo (AF and PPH)
<i>Seadornavirus</i>	Banna (AS)
<i>Vesiculovirus</i>	Piry (AM)

**Notes:** Data from previous studies.<sup>3,5,6,28</sup> Viruses of clinical importance are shown in bold. \*Species according to ICTV serological criteria.<sup>81</sup>

**Abbreviations:** AF, Africa; AM, America; AU, Australasia; AS, Asia; EU, Europe; PPH, primates as possible host; HV, human viremia suitable for vector transmission.

Molti arbovirus appartengono al genere *Orthoflavivirus* (precedentemente noto come *Flavivirus*). Gli *Orthoflavivirus* hanno un RNA a singolo filamento a polarità positiva di circa 9.7-12 kb (figura 1), come i virus Dengue (DENV), il virus della Febbre gialla (JFV), il virus Zika (ZIKV), il virus West Nile (WNV) e il virus Usutu (USUV). Il WNV può essere suddiviso filogeneticamente in diversi lignaggi, di cui i più diffusi sono il lineage 1 (L1) e il lineage 2 (L2), entrambi patogeni per gli uomini (Zannoli e Sambri, 2019). L'USUV è un *Orthoflavivirus* simile al WNV per le sue caratteristiche ecologiche, che mostra anche capacità neurotropiche, sebbene non così marcate come il WNV (Zannoli e Sambri, 2019). La co-circolazione di USUV e WNV è stata precedentemente registrata nella regione Emilia-Romagna attraverso la sorveglianza entomologica (Calzolari et al. 2016). Negli *Orthoflavivirus* sono inclusi i virus specifici degli insetti (ISF). Attraverso i piani di sorveglianza entomologica, gli ISF vengono sempre più segnalati esclusivamente nelle zanzare e non sembrano

essere “veri” arbovirus, in quanto non sembrano in grado di infettare i vertebrati (Calzolari et al. 2016).

Fra gli *Alphavirus* ricordiamo invece il virus Chikungunya, i virus della Western ed Eastern equine encephalitis. Due famiglie di virus, entrambe appartenenti all'ordine *Bunyavirales*, comprendono diversi arbovirus: i *Phenuiviridae* e i *Peribunyaviridae*, principalmente con i due generi *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus* (tabella 2), quest'ultimo comprende virus spesso trasmessi dai flebotomi (Calzolari et al. 2016, Barzon 2016).

## **Il Tahyna virus**

Mentre, come già riportato, alcuni arbovirus sono oggetto di sorveglianza, altri arbovirus, la cui patogenicità è già dimostrata, possono circolare nell'ambiente ma vengono trascurati. Un esempio paradigmatico è il virus Tahyna (TAHV), famiglia *Phenuiviridae*, genere *Orthobunyavirus* (Tabella 2). Gli *Orthobunyavirus* sono virus a RNA a singolo filamento e polarità negativa, presentano un envelope sferico del diametro di 80 a 120 nm. Presentano 3 segmenti genomici, il segmento L è di circa 6,9 kb, il segmento M di circa 4,5 kb e il segmento S di circa 1 kb (<https://viralzone.expasy.org/250>) (figura 1).

La maggior parte delle infezioni da TAHV nell'uomo sono asintomatiche. Quando è sintomatica, l'infezione causa una malattia acuta simil-influenzale, soprattutto nei bambini, denominata “febbre di Valtice” nei paesi del centro Europa, dove questo virus è più diffuso. Sono stati riportati meningiti o altri segni di coinvolgimento del sistema nervoso centrale, ma nessun decesso è stato attribuito al TAHV (Labuda 2001, Bárdos 1976). Tuttavia, la World Health Organization (WHO) considera il TAHV un importante arbovirus per quanto riguarda la salute pubblica in tutta Europa (WHO 2004).

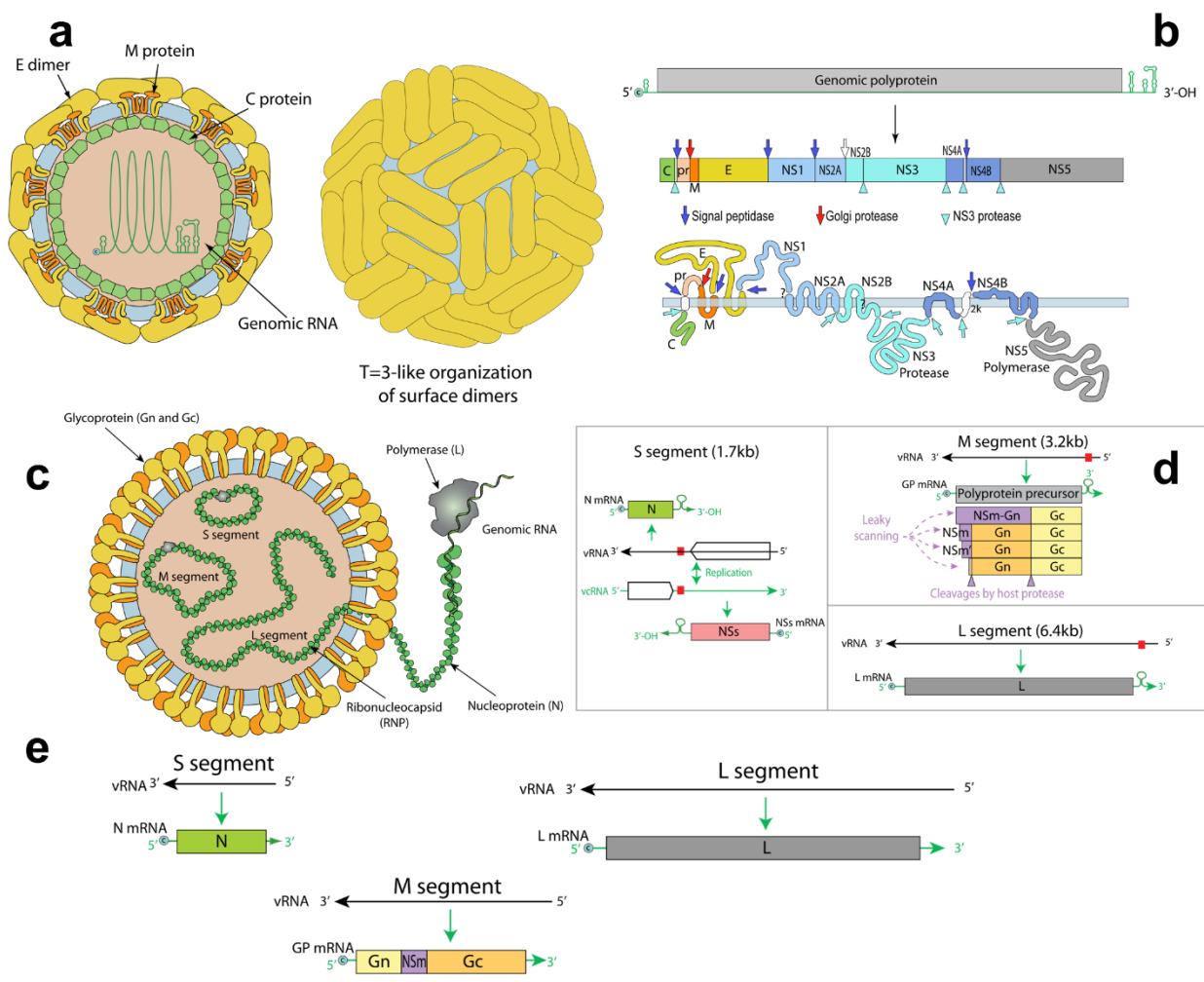


Figura 1 — Caratteristiche del virione e del genoma di *Orthoflavivirus*, dimensione 50 nm, ssRNA+ (a, b), *Phlebovirus* (c,d) e *Orthobunyavirus* (c,e) dimensione 80-120 nm, ssRNA- (dal sito Viralzone, <https://viralzone.expasy.org/>).

TAHV è stato il primo arbovirus mai isolato in Europa, da *Aedes (Ae.) caspius* e *Ae. vexans* raccolti nei villaggi Tahyna e Krizany nella Slovacchia orientale (Bardos e Danielová 1959). Il virus è stato successivamente isolato da diverse specie di zanzare e segnalato in Austria, Repubblica Ceca, Ungheria, Slovenia, Serbia, Romania, Francia, Germania, Norvegia e altri paesi dell'Europa orientale come Estonia, Moldavia, Ucraina e Russia e in Italia (Hubálek 2008, Lundström 1999, Mravcová et al. 2023).

Tabella 2 — Inquadramento tassonomico degli arbovirus oggetto di questo progetto.

Ordine AMARILLOVIRALES
Famiglia <i>Flaviviridae</i> Genere <i>Orthoflavivirus</i> West Nile virus WNV, <i>Orthoflavivirus nilense</i> Usutu virus USUV, <i>Orthoflavivirus usutuense</i>
Ordine BUNYAVIRALES
Famiglia <i>Peribunyaviridae</i> Genere <i>Orthobunyavirus</i> Tahyna virus TAHV, <i>Orthobunyavirus tahynaense</i> Famiglia Phenuiviridae Genere <i>Phlebovirus</i> Toscana virus TOSV, <i>Phlebovirus toscanaense</i> Fermo virus FERV, <i>Phlebovirus fermoense</i> Ponticelli virus I PONV, <i>Phlebovirus adanaense</i> Ponticelli virus II PONV, <i>Phlebovirus adanaense</i> Ponticelli virus III PONV, <i>Phlebovirus adanaense</i> Corfou virus CORV <i>Phlebovirus corfouense</i> Punique virus PUNV <i>Phlebovirus puniqueense</i>

In Italia, il virus è stato isolato per la prima volta nel 1968 dalle zanzare *Aedes* nella provincia di Gorizia (regione Friuli Venezia-Giulia, Italia nord-orientale) (Balducci et al. 1968). Successivamente studi di sieroprevalenza hanno confermato l'esposizione al virus nell'uomo (Verani et al. 1979) e nei piccoli mammiferi (roditori, insettivori, carnivori) (Le Lay-Roguès et al. 1983). Il ciclo del virus prevede come ospiti amplificatori principali, almeno nell'Europa centrale, la lepre europea e il coniglio selvatico. Viene però ipotizzato il possibile coinvolgimento di altri animali nel ciclo di questo virus (Mravcová et al. 2023).

La trasmissione del TAHV avviene attraverso punture di zanzare infette. Secondo Labuda (Labuda 2001) il vettore più importante è *Ae. vexans*, almeno nella Repubblica Ceca. Tuttavia, il virus è stato rilevato in altre specie di zanzare: *Ae. cinereus*, *Ae. caspius*, *Ae. cantans*, *Ae. punctor*, *Ae. communis*, *Ae. flavescens*, *Ae. excrucians*, *Culiseta (Cs.) annulata*, *Cx. modestus*, *Cx. pipiens*, and *Anopheles hyrcanus* (Kolman et al. 1964, Aspöck et al. 1966, Hannoun et al. 1966, Danielová et al. 1966, Lvov et al. 1972, Lvov et al. 1987, Lvov et al. 1989, Arcan P et al. 1974, Gligic et al. 1976, Traavik et al. 1978, Pilaski et al. 1985, Danielová et al. 1992). La trasmissione trans-ovarica è stata documentata in

*Ae. vexans* (Danielová et al. 1979) e in *Cs. annulata* (Bárdoš et al. 1975), mentre è stato osservato un possibile svernamento nella femmina *Cx. modestus* (Chippaux et al. 1970) e *Cs. annulata* (Danielová e Minář 1969).

Il TAHV è stato già rilevato in Emilia-Romagna in pool di *Ae. caspius* nel 2008 (Calzolari et al. 2010) e successivamente testando parte delle zanzare di particolari specie raccolte durante la sorveglianza entomologica nel 2009, 2010 (sottocampione di zanzare del genere *Aedes*) e 2020 (zanzare del complesso *Maculipennis*)(Calzolari et al. 2023).

### *I Phlebovirus*

I *Phlebovirus* (famiglia: *Phenuiviridae*, genere: *Phlebovirus*) sono virus ssRNA caratterizzati da un genoma trisegmentato. Il segmento L (6,4 kb) codifica la RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp), il segmento M (3,2 kb) codifica per una poliproteina che è l'origine di diverse proteine e il segmento S (1,7 kb) codifica per due proteine con una strategia ambisenso (<https://viralzone.expasy.org/252>). Le specie del genere *Phlebovirus* erano precedentemente definite in base al grado di reattività sierologica crociata, ma il frequente isolamento di nuovi virus e la loro capacità di riassortimento hanno suggerito la necessità di modificare gli standard di classificazione (Palacios et al. 2011). Sono ormai state definite più di 60 specie di *Phlebovirus* utilizzando la soglia del 95% di identità nelle sequenze amminoacidiche del RdRp (Kuhn et al. 2020).

Il genere *Phlebovirus* comprende diversi virus isolati e rilevati principalmente nei flebotomi, sebbene il prototipo del genere, il virus della febbre della Rift Valley (RVFV), sia un arbovirus trasmesso dalle zanzare, e molti di questi virus siano stati rilevati solo nei vertebrati (Calisher e Calzolari 2021).

Altri *Phlebovirus* meno conosciuti, come il virus Arumowot e il virus Odrenisrou, sono stati isolati dalle zanzare e rilevati sierologicamente negli esseri umani in Africa (Tesh et al. 1976). Alcuni *Phlebovirus* trasmessi dai flebotomi possono causare malattie negli esseri umani. Fra di questi rientra il TOSV, che provoca forme febbrili, meningite e meningoencefalite nei casi più gravi; il virus della

febbre da pappataci Napoli e Sicilia e diversi virus del Sud America possono causare forme febbrili autolimitanti (Lambert and Hughes 2021). Il TOSV fu isolato per la prima volta nel 1971 (Varani et al. 1982) e successivamente riconosciuto come agente della meningite nell'uomo (Calisher 1987). Questo virus è stato rilevato in gran parte dei paesi del Mediterraneo, dalla Spagna alla Turchia (Moriconi et al. 2017). Negli ultimi decenni è stata rilevata un'ampia varietà di *Phlebovirus* precedentemente non segnalati, in particolare nel bacino del Mediterraneo. Alcuni sottotipi del virus della febbre da pappataci Sicilia e virus appartenenti a questo gruppo sono stati isolati a Cipro (Papa et al. 2006), in Turchia (Carhan et al. 2010), in Algeria (Izri et al. 2008) e il virus Toros in Turchia (Alkan et al. 2016). Inoltre, sequenze di presunti virus correlati a questo gruppo sono state rilevate a Cipro e in Tunisia e provvisoriamente denominate virus Girne 2 (Ergunay et al. 2014) e virus Utique (Zhioua et al. 2010), rispettivamente. Sono stati isolati anche diversi *Phlebovirus* del gruppo del virus Napoli (a cui appartiene anche il TOSV), come i virus Massilia e Granada rispettivamente in Francia e Spagna (Charrel et al. 2009), il virus Punique in Tunisia (Zhioua et al. 2010), il virus Fermo in Italia (Remoli et al. 2014) e lo strettamente correlato Balkan virus nei paesi balcanici (Ayhan e Charrel 2018), il virus Arrabida in Portogallo (Amaro et al. 2015) e il virus Zerdali in Turchia (Alkan et al. 2016). Inoltre, alcuni presunti virus sono stati rilevati in Francia, Cipro e Tunisia e denominati rispettivamente Provenca (Peyrefitte et al. 2013), Girne 1 virus (Ergunay et al. 2014) e Saddaguia virus (Fares et al. 2015). I *Phlebovirus* Adana (Alkan et al. 2015), Alcube (Amaro et al. 2015) e Medjerda Valley (Bichaud et al. 2015), Zaba virus (Ayhan e Charrel 2018) e Bregalaka virus (Ayhan e Charrel 2018) attribuibili al gruppo Salehabad, sono stati isolati e caratterizzati rispettivamente in Turchia, Portogallo, Tunisia Croazia e Macedonia; in Italia sono stati isolati 3 *Phlebovirus* che si differenziano per il segmento M, i virus Ponticelli I, II, III (Calzolari et al. 2018). Sequenze correlate a presunti virus di quest'ultimo gruppo sono state rilevate anche nei flebotomi raccolti sul campo in Albania e Turchia e denominate rispettivamente virus Adria (Papa et al. 2011) e virus Edirne (Ergunay et al. 2014). Molti di questi virus erano stati rilevati nel Nord Italia. Oltre al TOSV, sono

stati isolati tre *Phlebovirus*: il virus Ponticelli I, il virus Ponticelli II e il virus Ponticelli III (Calzolari et al. 2018a). Questi tre virus differiscono nei loro segmenti M, probabilmente a causa di eventi di riassortimento. Nella stessa area, sono stati rilevati nei flebotomi i virus Fermo e Corfou, oltre a *Phlebovirus* non riferibili a virus precedentemente descritti (Calzolari et al. 2018b).

Il virus Fermo è stato isolato per la prima volta nel 2012 nella regione Marche (Italia) da pool di flebotomi *Phlebotomus (Ph.) perfiliewi* (Remoli et al. 2014). Il virus è stato rilevato e isolato in Emilia-Romagna e Lombardia (Calzolari et al. 2018b) e mostra un'identità rilevante per le sequenze parziali del virus Balkan, un virus rilevato nei paesi balcanici (Ayhan et al. 2017). L'analisi filogenetica colloca il FERV nel gruppo dei *Phlebovirus* di Napoli, che comprende anche il TOSV (Calzolari et al. 2021). Secondo il criterio di demarcazione delle specie dell'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), FERV appartiene a una specie indipendente (Calisher e Calzolari 2021). Studi sierologici condotti su animali domestici in Emilia-Romagna hanno evidenziato il potenziale del FERV di infettare i vertebrati, in particolare pecore e capre (Lelli et al. 2021). Nonostante queste osservazioni, il ciclo del virus rimane in gran parte non caratterizzato, così come la sua potenziale patogenicità.

### **Artropodi vettori**

I potenziali vettori biologici sono artropodi ematofagi. Possono essere solo le femmine che effettuano il pasto di sangue, per far maturare le uova (es. zanzare, flebotomi), oppure entrambe i sessi sono ematofagi (es. cimici dei letti, pidocchi, pulci). Diversi artropodi sono in grado di trasmettere patogeni, dalle zecche agli emitteri *Triatominae* (vettori del morbo di Chagas in Centro e sud America). Molti vettori appartengono all'ordine dei Ditteri ed alle famiglie *Culicidae* (zanzare), *Tabanidae* (tafani), *Simuliidae* (simulidi), *Glossinidae* (mosche Tsetse) ed ai generi *Culicoides*

(culicoidi), *Phlebotomus* (flebotomi), *Stomoxys* (figura 2). Le specie di zanzare e flebotomi campionate da IZSLER e segnalate in Emilia-Romagna sono riportate nella tabella 3.

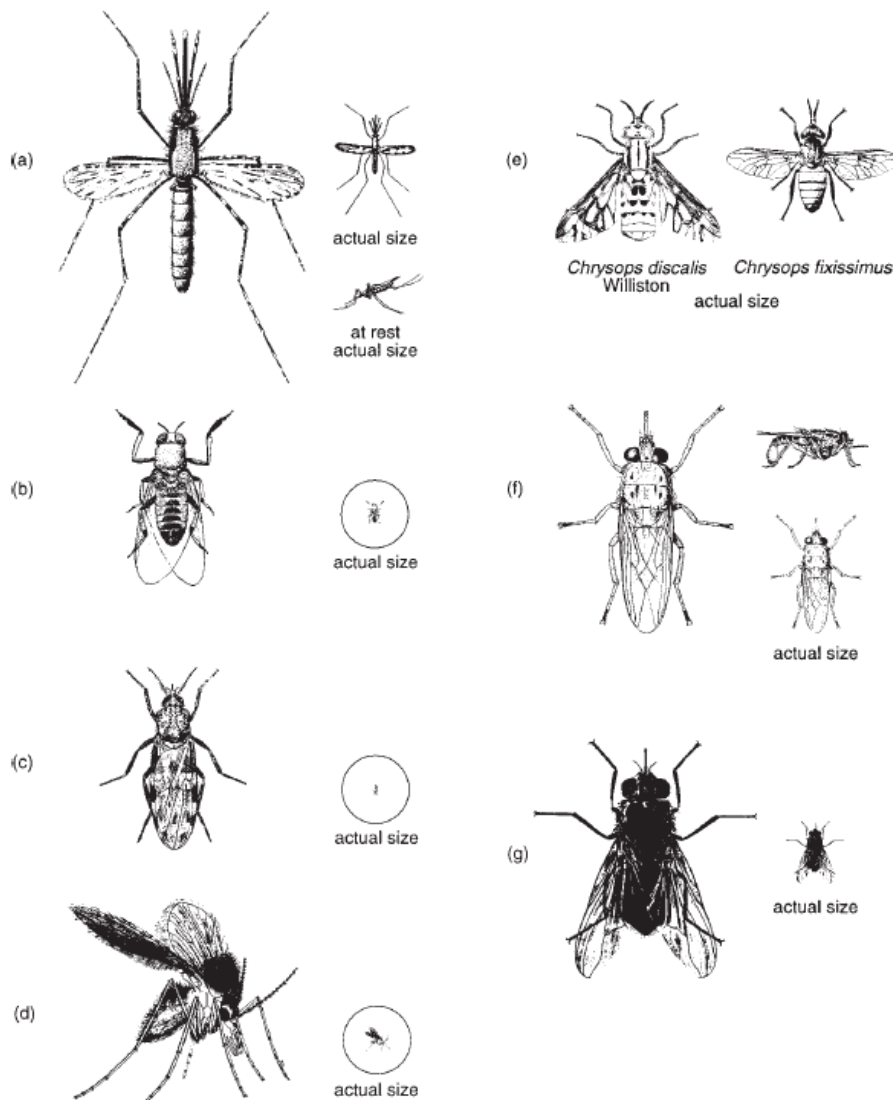


Figura 2 — Ditteri ematofagi con riferimento alle loro dimensioni relative. Zanzara (a), simulide (b), culicoidi (c), flebotomo (d), tafani (e), mosca tse-tse (f), mosca cavallina, *Stomoxys* (g) (da WHO Vector control 1997).

Le zanzare hanno un ciclo legato all'acqua negli stati preimaginali, caratteristica che può essere sfruttata per la lotta a questi insetti. L'abilità delle larve e pupae di zanzara di utilizzare l'ossigeno atmosferico per respirare le rende in grado di sfruttare ambienti acquatici transienti e anche molto ricchi di sostanza organica. Diverse specie di zanzare sfruttano diversi ambienti per il loro sviluppo, dai piccoli manufatti (tombini e sottovasi, *Ae. albopictus*), alle risaie o paludi con livelli variabili

d'acqua (*Ae. caspius* e *Ae. vexans*), mentre *Culex (Cx.) pipiens* occupa ambienti più ampi, come fossi e stagni. Le diverse specie di zanzare hanno preferenze d'ospite che influenzano la loro capacità vettoriale. *Cx. pipiens*, per esempio, è spiccatamente ornitofagica, mentre le zanzare del genere *Aedes* preferiscono solitamente i mammiferi, ed *Ae. albopictus* ha abitudini spiccatamente antropofagiche.

I flebotomi sono piccoli insetti ematofagi che spesso vivono vicino agli animali domestici e all'uomo. Soltanto le femmine pungono, generalmente dal tramonto all'alba. Sono scarsi volatori, volano silenziosamente per brevi distanze e hanno picchi di attività durante l'estate nelle regioni non tropicali; i flebotomi sono ampiamente distribuiti nei paesi del Mediterraneo. Le due specie più abbondanti negli ambienti naturali e rurali dell'Emilia-Romagna sono *Ph. perniciosus* e *Ph. perfiliewi*; entrambe le specie sono vettori accertati di *Leishmania infantum* e TOSV in Italia (Maroli et al. 2013).

Gli arbovirus sono spesso specie-specifici per quanto riguarda i vettori biologici in grado di trasmetterli. La competenza vettoriale è una caratteristica intrinseca del vettore e consiste nella capacità di infettarsi dopo aver ingerito il patogeno, cioè è l'abilità del vettore di acquisire, mantenere, e trasmettere l'agente patogeno (Kondratieff et al. 2004). Ci sono diversi fattori che influenzano la capacità vettoriale: densità del vettore, frequenza dei pasti di sangue, la durata della replicazione del virus nel vettore, la sopravvivenza e le preferenze d'ospite del vettore.

### **Epidemiologia degli arbovirus**

I cicli epidemiologici degli arbovirus possono essere estremamente complessi in dipendenza delle specie vettrici in grado di trasmetterli e del numero di specie ed abbondanza degli animali in grado di fungere da serbatoi in un dato ambiente.

Tabella 3 — Zanzare e flebotomi campionati da IZSLER e segnalati in Emilia-Romagna.

Zanzare (Famiglia CULICIDAE)

- 
- Genere *Anopheles* Meigen, 1818  
*Anopheles (Anopheles) claviger* (Meigen, 1804)  
*Anopheles (Anopheles) plumbeus* Stephens, 1828
- Complesso *Maculipennis*,  
*Anopheles (Anopheles) maculipennis* Meigen, 1818  
*Anopheles (Anopheles) atroparvus* Van Thiel, 1927  
*Anopheles (Anopheles) melanoon* Hackett, 1934  
*Anopheles (Anopheles) messeae* Falleroni, 1926  
*Anopheles (Anopheles) sacharovi* Favre, 1903\*
- Genere *Aedes* Meigen, 1818  
*Aedes (Aedimorphus) vexans* (Meigen, 1830)  
*Aedes (Finlaya) geniculatus* (Olivier, 1791)  
*Aedes (Ochlerotatus) berlandi* Seguy, 1921  
*Aedes (Ochlerotatus) cantans* (Meigen, 1818)  
*Aedes (Ochlerotatus) caspius* (Pallas, 1771)  
*Aedes (Ochlerotatus) cataphylla* Dyar, 1916  
*Aedes (Ochlerotatus) cinereus* Meigen, 1818  
*Aedes (Ochlerotatus) detritus* (Haliday, 1833)  
*Aedes (Ochlerotatus) pulcritarsis* (Rondani, 1872)  
*Aedes (Ochlerotatus) pullatus* (Coquillett, 1904)  
*Aedes (Ochlerotatus) rusticus* (Rossi, 1790)  
*Aedes (Ochlerotatus) sticticus* (Meigen, 1838)  
*Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894)
- Genere *Coquillettidia* Dyar, 1905  
*Coquillettidia buxtoni* (Edwards, 1923).  
*Coquillettidia richiardii* (Ficalbi, 1899)
- Genere *Culex* Linnaeus, 1758  
*Culex (Culex) mimeticus* Noè, 1899  
*Culex (Culex) pipiens* Linnaeus, 1758  
*Culex (Barraudius) modestus* Ficalbi, 1889  
*Culex (Maillotia) hortensis* Ficalbi, 1889
- Genere *Culiseta* Felt, 1904  
*Culiseta (Culiseta) annulata* (Schrank, 1776)  
*Culiseta (Culiseta) subochrea* (Edwards, 1921)  
*Culiseta (Allotheobaldia) longiareolata* (Macquart, 1838)
- Genere *Orthopodomyia* Theobald, 1904  
*Orthopodomyia pulcripalpis* (Rondani, 1872)
- Genere *Uranotaenia* Lynch Arribalzaga, 1891  
*Uranotaenia (Pseudoficalbia) unguiculata* (Edwards, 1913)
- 

Flebotomi (Famiglia PSYCODIDAE)

- 
- Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* Newstead, 1911  
*Phlebotomus (Larroussius) papatasi* (Scopoli, 1786)  
*Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi* Parrot, 1930  
*Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908  
*Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* (Rondani, 1843)
- 

\* ultima segnalazione in Emilia-Romagna negli anni '50

Alcuni virus, come DENV (figura 3), vedono l'uomo come ospite competente e possono essere trasmessi in ambiente urbano da zanzare abbondanti in queste aree, in particolare dalla zanzara della febbre gialla (*Ae. aegypti*) ed in misura minore dalla zanzara tigre (*Ae. albopictus*).

Spesso questi virus hanno dei cicli selvatici che coinvolgono primati e zanzare della foresta, la pressione antropica sulle foreste (cacciatori, distruzione delle foreste) può causare la fuoriuscita da questi ambienti per mezzo dell'infezione di persone, che possono poi fungere da reservoirs del virus in ambiente urbano (figura 3). Questo tipo di virus che vede l'uomo come potenziale serbatoio possono facilmente essere esportati in altre aree e paesi a causa di viaggiatori infetti.

Alcuni virus, per esempio il WNV, mostra un ciclo estremamente complesso (figura 4) che prevede l'interazione far il vettore principale (in Europa) *Cx. pipiens* ed un imprecisato numero di specie di uccelli selvatici che possono agire da serbatoio. La circolazione del WNV è legata al numero di serbatoi presenti, alla loro abbondanza di diffusione, oltre che all'abbondanza del vettore, e risulta quindi molto complesso e imprevedibile. Diversi vertebrati mammiferi sono ospiti a fondo cieco di questo virus, cioè non producono una viremia sufficiente a reinfectare la zanzara vettrice. Nell'uomo e nel cavallo, il WNV può provocare un ampio ventaglio di patologie: nell'uomo l'infezione è normalmente asintomatico, ma può produrre sindromi simil-influenzali con rash cutanei e, in rari casi (meno di uno su cento persone con sintomi), può causare una malattia neuro-invasiva grave. Inoltre, il virus rappresenta un rischio "indiretto" per la salute, per la presenza sul territorio di donatori di sangue infetti ma asintomatici (Zannoli e Sambri 2019). Per questo motivo, il virus è oggetto di sorveglianza in Emilia-Romagna, che ha l'obiettivo principale di valutare la precocità e l'intensità della circolazione virale per garantire la sicurezza delle donazioni di sangue (Zannoli e Sambri 2019). Inoltre, il virus è patogeno per il cavallo, nel quale, in circa il 20% dei casi, provoca sintomi clinici di infezioni neuro-invasive, quali atassia, debolezza e paralisi degli arti, fascicolazione muscolare, deficit propriocettivi, cecità, paralisi delle labbra, digrignamento, febbre, morte acuta (Paré e Moore, 2018); ma per questi animali, al contrario che per l'uomo, è disponibile un vaccino.

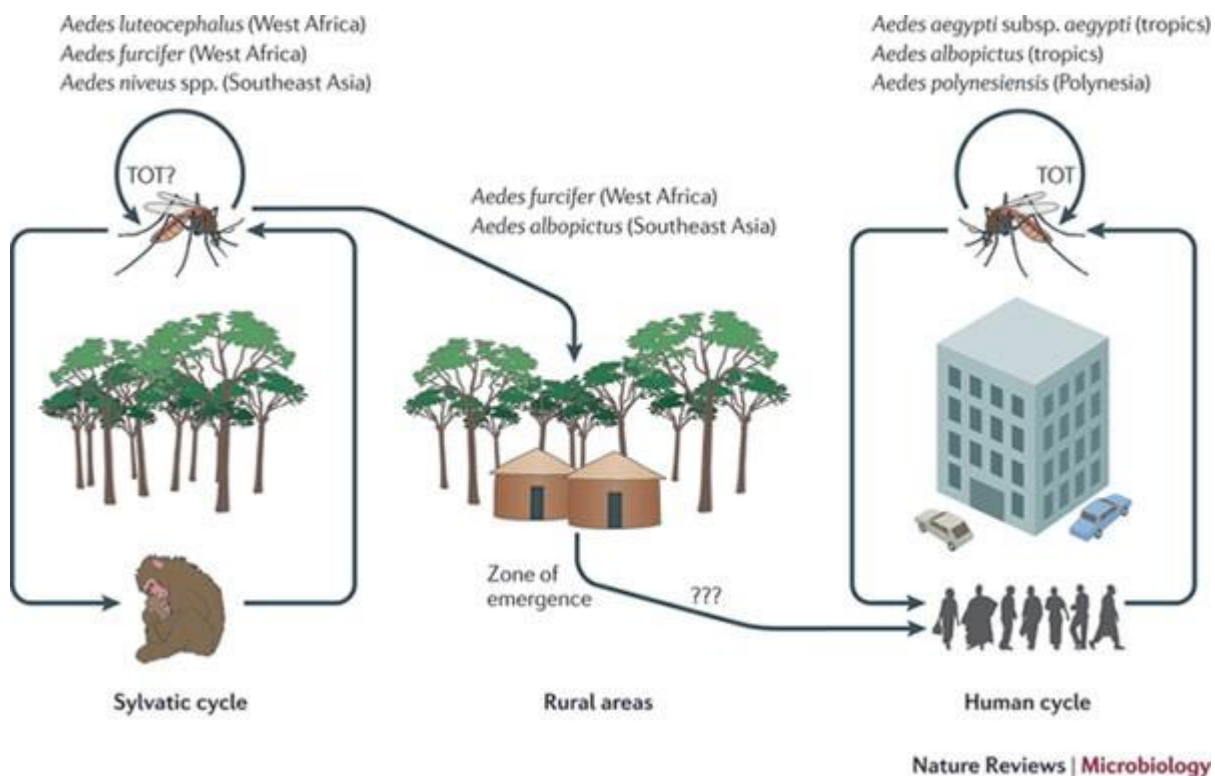


Figura 3 — Ciclo epidemiologico del Dengue virus e interazione fra ciclo selvatico ed epidemico nel quale l'uomo rappresenta il principale ospite serbatoio (Vasilakis et al. 2011).

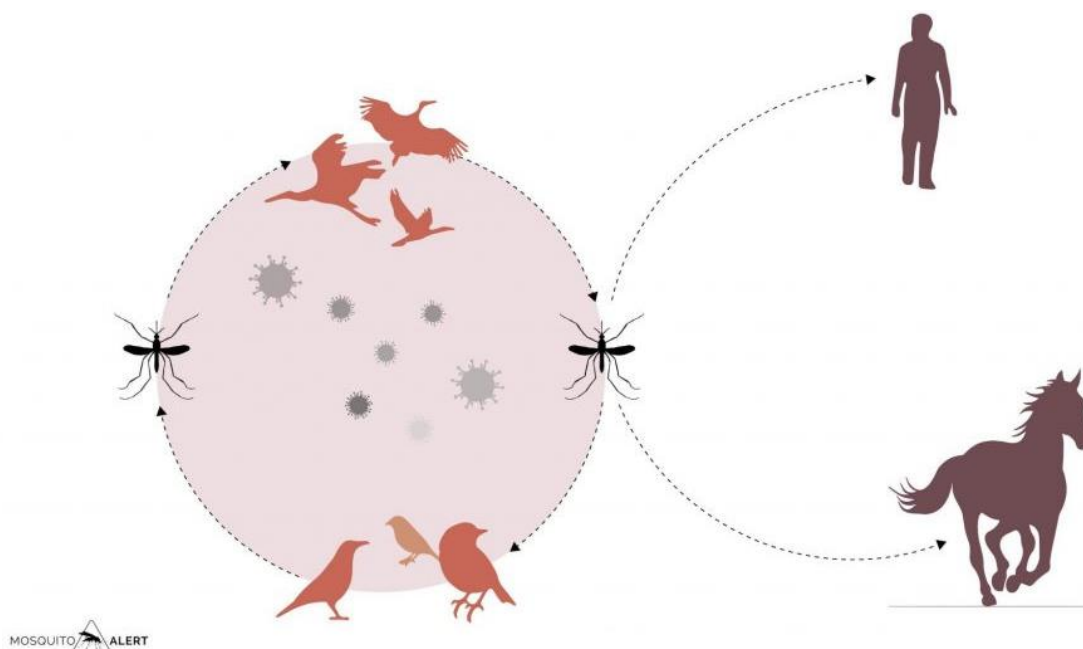


Figura 4 — Ciclo epidemiologico del West Nile virus che circola nell'ambiente fra uccelli e zanzare; l'uomo e il cavallo rappresentano ospiti a fondo cieco (<https://www.mosquitoalert.com/en/primer-caso-de-virus-del-nilo-occidental-en-cataluna/>).

Per altri arbovirus il ciclo non è completamente noto. Il *Phlebovirus* TOSV, per esempio, può provocare meningo-encefaliti nell'uomo. Tuttavia, similmente per altri *Phlebovirus* trasmessi dai flebotomi, non è stato individuato un animale in grado di agire da serbatoio principale. L'alto tasso di trasmissione verticale nei flebotomi, però, suggerisce che il virus sverni nei vettori e che gli ospiti vertebrati agiscano solo da amplificatori del virus nel periodo estivo.

## 2. MATERIALI E METODI

### Campionamento degli insetti

I dati riportati in questa tesi riguardano le attività svolte durante le stagioni del 2021-2022-2023 per la sorveglianza dei patogeni trasmessi dalle zanzare e le stagioni del 2022 e 2023 per la ricerca di *Phlebotivirus* nei flebotomi.

Gli insetti sono stati campionati con diversi modelli di trappole attrattive. In particolare, sono state utilizzate trappole ad anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), modello messo a punto dal CAA e trappole CDC miniature light-trap, che utilizzano la luce come fonte attrattive (figura 5). Mentre le trappole a CO<sub>2</sub> funzionano bene sia per la cattura sia delle zanzare che dei flebotomi, le trappole CDC attirano un numero adeguato di flebotomi ma scarsi numeri di zanzare.

I campioni di zanzare testati nell'ambito di questo studio sono stati recuperati dal sistema regionale di sorveglianza del WNV in Emilia-Romagna, che si avvale di 95 trappole CO<sub>2</sub> georeferenziate operanti nelle pianure della regione (Calzolari et al. 2010), attivate dalle 17:00 circa alle 9:00 del giorno successivo, ogni due settimane (figura 6). Le zanzare raccolte sono state immediatamente refrigerate ( $5 \pm 3$  °C), uccise mediante congelamento a -20 °C e identificate a livello di specie mediante chiavi dicotomiche (Becker et al. 2020, Severini et al. 2009) (figura 7). Le zanzare sono state quindi raggruppate in pool specie-specifiche in base al sito e al giorno del campionamento, con una numerosità massima di 200 individui per pool. I pool sono stati conservati in cryotube di polipropilene da 2 ml o in fiale Falcon da 15 ml per pool >50 esemplari, per essere poi sottoposte alle analisi biomolecolari previste.



Figura 5 — Modelli di trappola utilizzati per la cattura degli insetti, Trappola CO<sub>2</sub> (modello CAA), il termos blu è forato e contiene ghiaccio secco che sublimando produce anidride carbonica, sotto al termos è posizionata una ventola a batteria (12 volt) che aspira le zanzare nel retino (a, b). CDC miniatura light trap, la fonte luminosa è costituita da una luce a incandescenza, la ventola è attivata da una batteria da 6 volt.

Le zanzare testate sono state campionate in un turno di campionamento per ogni trappola, dal 10 al 19 agosto 2021, sono state invece testate le zanzare da due turni di campionamento per ciascuna trappola nel 2022 e 2023 (dal 19 luglio 12 agosto nel 2022, dal 18 luglio al 10 agosto nel 2023).

Oltre a recuperare i flebotomi campionati nell'ambito della sorveglianza regionale WNV, sono stati effettuati numerosi prelievi nelle aree con maggiore abbondanza di flebotomi, principalmente nella parte collinare della regione. Al contrario delle zanzare, per i flebotomi non è stato possibile comporre pool monospecifici, dovuta alla necessità, per effettuare l'identificazione morfologica, di chiarificare gli insetti (con clorolattofenolo o soluzione di idrossido di potassio) e montarli su vetrino, operazione

che poi non consente di testare questi esemplari per la ricerca di virus (figura 8). Per questo motivo si è proceduto utilizzando i maschi, sempre abbondantemente presenti nelle catture di questi insetti, per identificare le specie presenti, mentre le femmine sono state raccolte e raggruppate in pool (con un massimo di 50 esemplari per pool) e conservate in provette a fondo conico da 1,5 ml. I pool sono stati conservati a -80 °C fino al momento di essere testati.

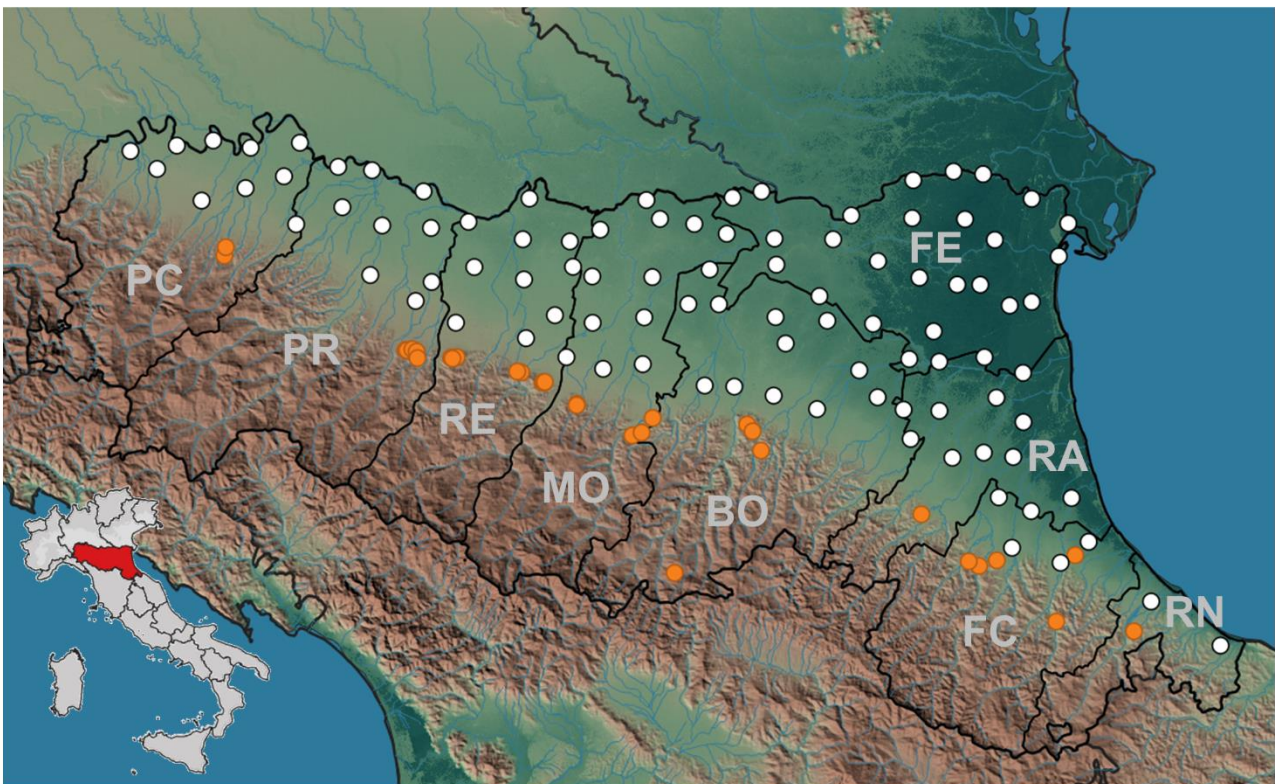


Figura 6 — Siti campionati sulla mappa fisica dell'Emilia-Romagna con riferimento al tipo di campionamento effettuato (siti sorveglianza WNV in bianco, siti espressamente selezionati per il campionamento dei flebotomi in arancione).

### Screening e identificazione degli arbovirus

Per tritare le zanzare, a ciascuna provetta sono stati aggiunti da due a quattro pallini placcati in rame dal diametro di 4,3 mm (Haendler & Natermann Sport GmbH, Münden, D) e da 1 ml a 4 ml di PBS (1 ml ogni 50 zanzare presenti nel pool). I campioni sono stati tritati utilizzando un vortex per 1 minuto e quindi centrifugati a  $4000 \times g$  per 3 minuti. I pool da 50 flebotomi sono stati spappolati con

l'ausilio di pestelli conici in plastica. Infine, 200 µl di surnatante sono stati raccolti e sottoposte ad analisi biomolecolare. La parte rimanente dell'omogenato degli insetti è stata conservata a -80°C fino all'ottenimento dei risultati della PCR. L'RNA virale è stato estratto dall'omogenato degli insetti in piastre da 96 pozzetti utilizzando il kit BioSprint® 96 One-For-All Vet (Qiagen) e la workstation KingFisher™ (Thermo Scientific™) secondo le istruzioni del produttore.

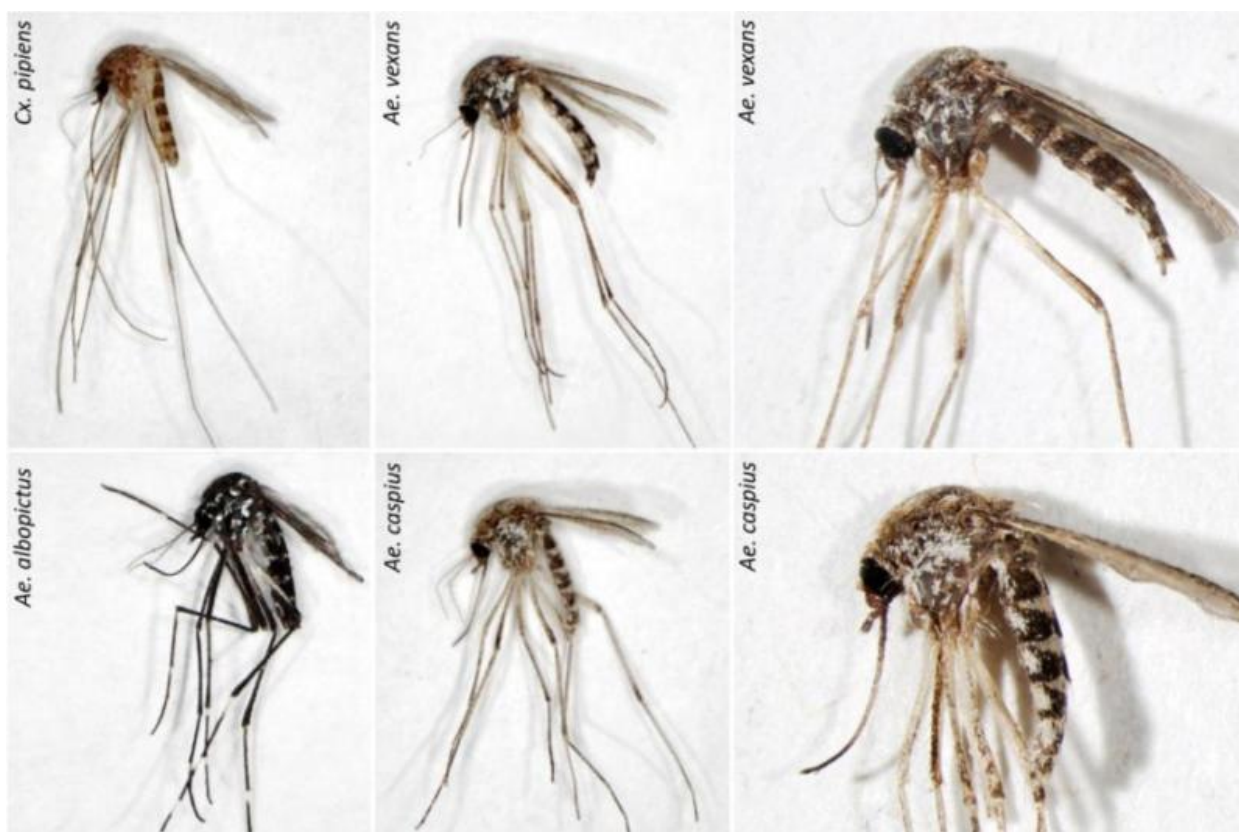


Figura 7 — Specie di zanzare maggiormente campionate durante la sorveglianza entomologica, *Culex pipiens*, *Aedes vexans*, *Aedes caspius*, *Aedes albopictus*.

L'RNA estratto è stato retro-trascritto utilizzando la trascrittasi inversa RNasi(H-)M-MLV (Promega) e random primers (Roche) seguendo le istruzioni del produttore. I pool di zanzare così estratti sono stati sottoposti a PCR real-time per la ricerca di WNV, USUV per tutte le stagioni, TAHV (per gli anni 2022, 2023) e SINDV (solo per il 2023). Inoltre, si sono applicate delle PCR di genere, seguite dal sequenziamento degli ampliconi, ottenuti per la ricerca di *Orthoflavivirus*, *Orthobunyavirus* e

*Phlebotomus*. Le femmine campionate sono state raggruppate in pool di 50 esemplari e testate con PCR specifiche per TOSV e FERV, inoltre è stata applicata la PCR Pan-phlebotomus, seguita dal sequenziamento degli ampliconi ottenuti. Nella tabella 4 sono riportati i dettagli dei protocolli utilizzati. Nella figura 9 sono schematizzati i passaggi per mezzo dei quali si è proceduto all'analisi degli insetti catturati.

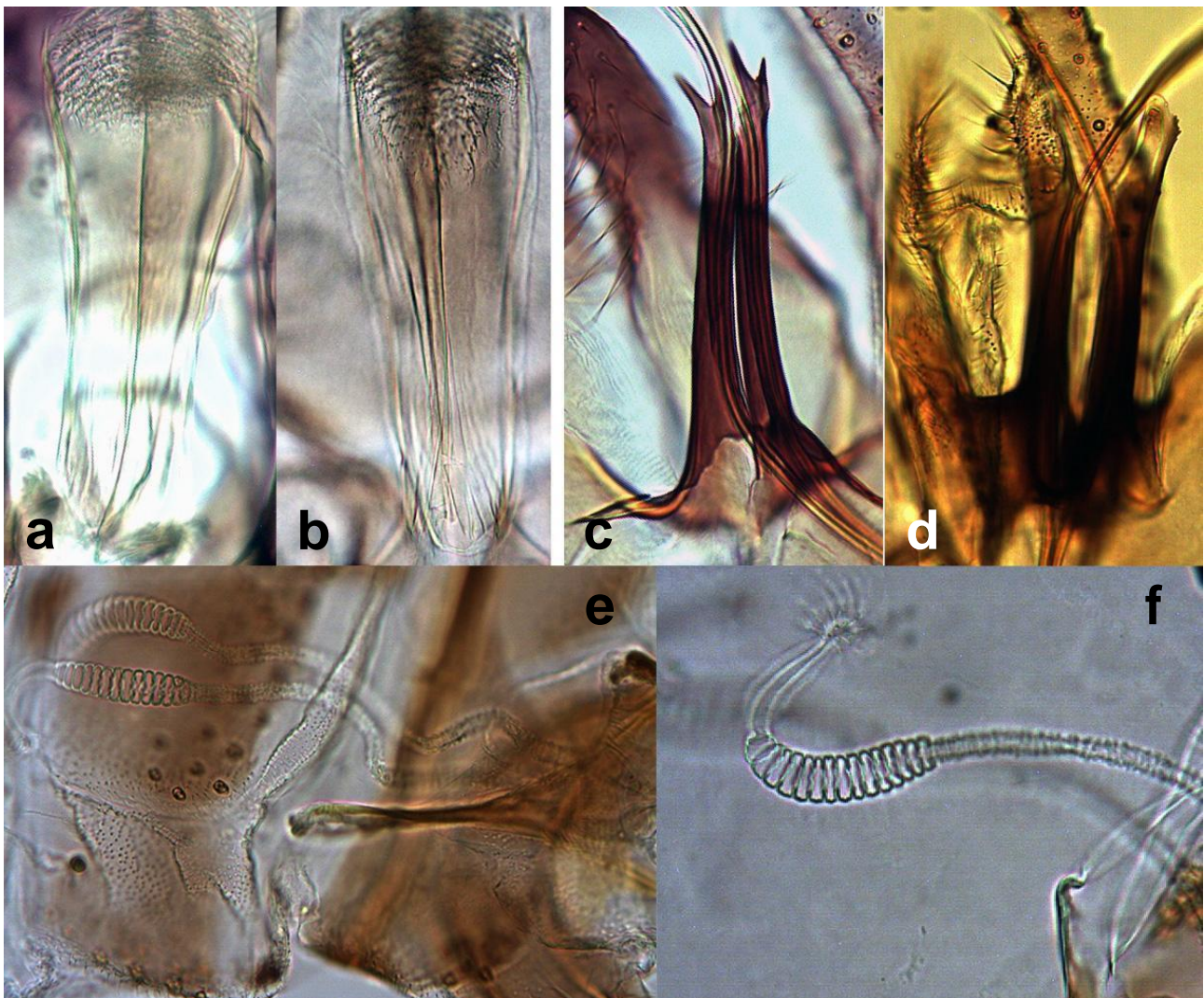


Figura 8 — Particolari morfologici, visti al microscopio ottico, utili per l'identificazione di flebotomi dopo chiarificazione *Phlebotomus perniciosus* (a, c, e), *Phlebotomus perfiliewi* (b, d, f). In alto: pompa faringea della femmina e aedeago del maschio; in basso: spermateca della femmina.

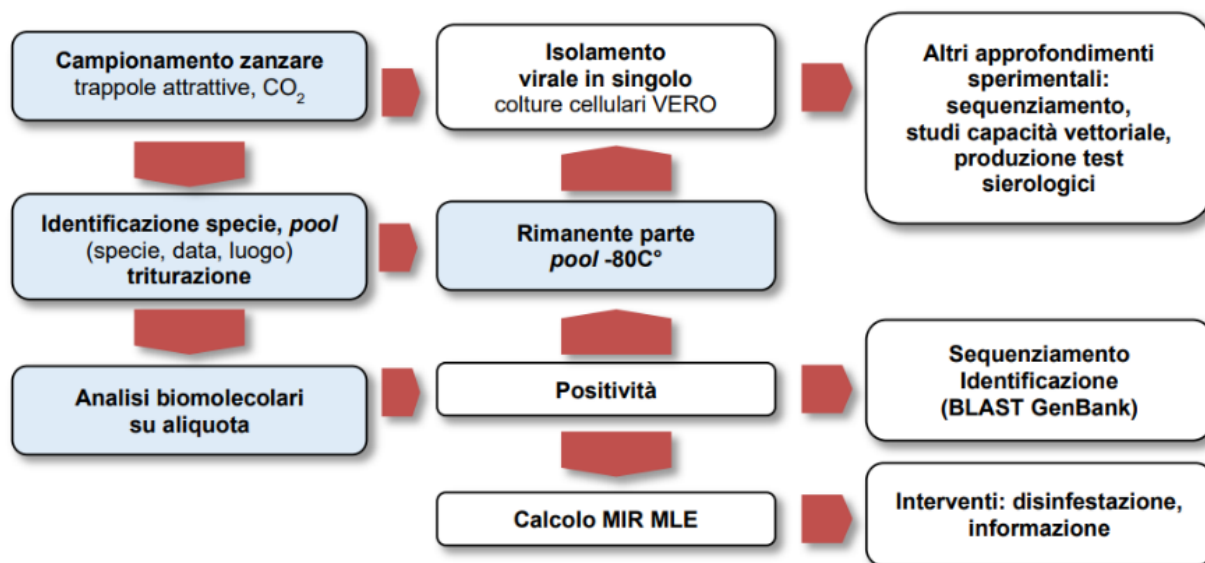


Figura 9 — Passaggi analitici dei pool di insetti campionati dalla cattura all’analisi dei dati.

### Isolamento virale e microscopia elettronica

L’isolamento del TAHV è stato tentato dalla parte restante degli omogenati di zanzara dei pool positivi conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ . I campioni sono stati inoculati in un monostrato confluyente di cellule VERO (cellule renali di cercopiteco grigioverde – provenienti dalla biobanca IZSLER, codice BSCL86), incubati a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5% di  $\text{CO}_2$  e osservati quotidianamente per 7 giorni per valutare lo sviluppo di effetti citopatici (CPE). In assenza di CPE, i criolisati sono stati sottoposti a subcoltura due volte in monostrati di cellule fresche. La scelta di linea cellulare di primati è stata fatta per massimizzare la possibilità di isolare virus potenzialmente patogeni.

Il surnatante delle colture cellulari che mostravano CPE è stato sottoposto a microscopia elettronica a colorazione negativa (nsEM) utilizzando il metodo Airfuge (Lavazza et al. 1990). I surnatanti sono stati ultracentrifugati (Airfuge, Beckman Coulter Inc. Life Sciences, Indianapolis, Indiana, USA) per 15 minuti a  $82.000 \times g$  utilizzando un rotore contenente sei provette da 175  $\mu\text{l}$  in cui sono stati inseriti adattatori specifici per griglie di rame Formvar rivestite di carbonio da 3 mm.

Tabella 4 — Protocolli biomolecolari utilizzati per lo screening degli arbovirus con riferimento a sequenze dei primer, probe e riferimento bibliografico.

	Primer Fr	Primer R	Probe	Ref
WNV <sup>°</sup>	FLI-WNF5-F GGGCCTTCTGGTCTGTTC	FLI-WNF6-R GATCTTGGCYGTCCACCTC	FLI-P CCACCCAG-GAGGTCCTTCGCAA	Eiden et al. 2010
WNV L1/L2 <sup>°</sup>	WN-LCV-F1 GTGATCCATGTAAGCCCT-CAGAA	WN-LCV-R1 GTCTGACATTGGGCTTTGAAGTTA	WN-LCV-S1 AGGACCCCCACATGTT WN-LCV-S2 AGGACCCCCACGTGCT	Del Amo et al. 2013
USUV <sup>°</sup>	USU-F -AAAAATGTACGCGGATGACACA	USU-R -TTTGGCCTCGTTGTCAAGATC	USU-P -CGGCTGGGACACCCGGA-TAACC	Cavrini et al. 2011
TAHV <sup>°</sup>	F-TAHV AGGGTATGTGGACTTCTGT	R-TAHV TTTAGGACTAGCCTTCTCT	P-TAHV TCCTTAATGCCGCAAAAAG-CCAA	Calzolari et al. 2023
TOSV <sup>°</sup>	STOS-50F TGCTTTTCTTGAT-GAGTCTGCAG	STOS-138 RCAATGCGCTTYGGRTCAAA	STOS-84 TAT-CAATGCATGGGTRAAT-GAGTTTGCTTACC	Pérez-Ruiz 2007
FERV <sup>°</sup>	F-FER TGAAGAAGATGTCAGAAAAGGG	R-FER TGGATGGTCCATGGAACAAAGG	FER-S FAMCYACTGTGGCCCAGC-TAGTRTC	Calzolari et al. 2023
SINV <sup>°</sup>	For CCAAGAGCCTGCCCTRTTC	Rev CAGGCGGGCCATCTTCT	Probe ACC GCC AAG GCT A-MGB	Ayhan et al. 2022
Pan-orthoflavivirus*	MAMD AACATGATGGRAARAGRGA-RAA FS 778 AARGGHAGYMGDCHATHHTGGT	cFD2 GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC		Scaramozzino et al. 2001
Pan-orthobunyavirus*	BCS82C ATGACTGAGTTGGAGTTTCAT-GATGTCGC	BCS332V TGTTCCTGTTGCCAGGAAAAT		Kuno et al. 1998
Pan-phlebovirus*	Phlebo forward 1 TTTGCTTATCAAGGATTT-GATGC Phlebo forward 2 TTTGCTTATCAAGGATTT-GACC	Phlebo reverse TCAATCAGTCCAGCAAAGCTGG-GATGCATCAT		Lambert e Lanciotti 2009

<sup>°</sup>RT Real Time PCR, \*PCR tradizionale e sequenziamento

Le griglie sono state quindi colorate utilizzando fosforotungstato di sodio al 2% (pH 6,8) per 1,5 minuti a  $20.500\text{--}43.000 \times g$  e osservate al microscopio elettronico a trasmissione Tecnai G2 Spirit Biotwin (Thermo Fisher, FEI, Hillsboro, Oregon, USA) per almeno 15 min prima di essere considerate negative. L'identificazione delle particelle virali osservate si è basava sulle loro caratteristiche morfologiche.

### **Sequenziamenti e analisi filogenetiche**

Gli ampliconi ottenuti grazie alle PCR di genere sono stati sequenziati mediante tecnica Sanger (ABI-PRISM 3130 Genetic Analyser).

Il sequenziamento completo del genoma è stato eseguito dall'RNA estratto dagli isolati di colture cellulari utilizzando la piattaforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Le librerie di sequenziamento sono state realizzate con il kit di preparazione delle librerie Illumina TruSeq RNA v2 seguendo le istruzioni del produttore. Il genoma completo del TAHV 404118 è stato ottenuto mediante CLC Genomic Workbench v.11 (QIAGEN, Milano, Italia), usando l'assemblaggio de-novo. Le sequenze sono state identificate mediante ricerca BLAST in GenBank (Benson et al. 2013). L'analisi filogenetica è stata effettuata recuperando da GenBank le sequenze di virus omologhe disponibili. Le sequenze ottenute sono state allineate con MAFFT (Katoh et al. 2019), utilizzando parametri predefiniti, le sequenze identiche sono state eliminate dagli allineamenti con lo strumento ElimDupes (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/elimdupesv2/elimdupes.html>). Le *p-distance* fra le diverse sequenze sono state ottenute con il software MEGAX (Kumar et al. 2018). Gli alberi ML sono stati ottenuti utilizzando il software IQtree (Trifinopoulos et al. 2016), lo stesso software è stato utilizzato anche per determinare i modelli di sostituzione più adatti. Gli alberi sono stati visualizzati grazie al software FigTree (disponibile su <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> accesso l'8/8/2024).

Tabella 5 — Primer e sequenze target della sonda registrate per il Tahyna virus (sopra) e Fermo virus (sotto) e in sequenze omologhe di altri orthobunyavirus correlati depositati in GenBank.(Calzolari et al. 2023a; Calzolari et al. 2023b)

	Forward target	Probe target	Reverse target
Tahyna vieirus (40)	A G G G T A T G T G G A C T T C T G	T C C T T A A T G C C G C A A A A G C C A A	G A G G A A G G C T A G * T C C T A A A
Lumbo virus (2)	..... T .....	..... T G .....	.....
California encephalitis virus (2)	.....	..... C .....	..... A .....
La Crosse virus (3)	..... A .....	..... C .....	..... A C .....
Snowshoe hare virus (3)	..... W .....	..... C .....	..... A A .....
Keystone virus (2)	..... C A .....	..... T A T .....	..... C .....

	Forward primer	Probe	Reverse primer
Fermo virus (45)	T G A A G A A G A T G T C A G A A A A G G	C Y A C T G T G G C C C A G C T A G T R T	C C T T T G T T C C D T G G A C C A T C C A
Balkan virus (6)	..... G .....	..... T .....	..... S .....
Zerdali virus (1)	.....	..... T K A T .....	..... T .....
Massilia virus (6)	..... T G R .....	..... T A A Y R R A T .....	..... T Y G .....
Granada virus (1)	..... T G A .....	..... T A A T .....	..... T C G .....
Punique virus (1)	..... T G A .....	..... A T T T T .....	..... T C T .....
Toscana virus (17)	..... R .....	..... Y T .....	..... A .....
Ponticelli viruses (34)	..... A G C .....	..... G G A A T Y A G G G R .....	..... Y .....
Bregalaka virus (1)	..... G C .....	..... G G A A T T A G G G A .....	..... C A G .....
Corfou virus (4)	..... A R G .....	..... A G G A G .....	..... T C A .....
Phlebovirus sp. (4)	..... A .....	..... A C C A A G A A .....	..... T C G C G G T .....

Accession numbers in GenBank: Tahyna virus: GQ480358, GU390669, GU390670, GU390671, GU390672, GU390673, GU390677, GU390678, GU390680, GU390682, GU390683, GU390685, GU390686, GU390687, GU390688, HM036208, HM036214, HM036217, HM068013, HM068014, HM068015, HM243139, HM243142, HQ541823, JN051146, JN051148, JN051150, KJ575081, KJ575082, MZ245724, MZ245725, NC055206, ON124935, ON124936, ON124937, ON124938, ON124939, ON124940, U47142, Z68497; Lumbo virus: NC043631, X73468; California encephalitis virus: MH830340, U12797; La Crosse virus: GU206111, GU206135, KP271104; Snowshoe hare virus: KM215562, KM215563, MK352486; Keystone virus: MG821231, MZ156793. Fermo virus: KY354388, KY354389, KY354390, KY354391, KY354392, KY354393, KY354394, MG869823, MG869824, MG869827, MG869828, MG869830, MG869833, MG869835, MG869836, MG869837, MG869838, MG869839, MG869841, MG869845, MG869846, MG869847, MG869851, MG869852, MG869855, MG869859, MG869861, MG869870, MG869871, MG869872, MG869880, MG869881, MG869882, MG869883, MG869884, MG869885, MG869886, MG869887, MG869892, MG869893, MG869894, OP485761, OP485762, OP485763, OU230767; Balkan virus: KY662276, KY662277, KY662278, KY662280, KY662281, KY662282; Zerdali virus: NC\_037613; Massilia virus: KT783485, KT783486, KT906102, KT906102, KT906103, NC055415; Granada virus: GU135608; Punique virus: NC055300; Toscana virus: KM275237, KM275764, KM275768, KM275772, KM275776, KM275778, KM275779, KM275780, KM275784, KM275785, KM275787, KU935738, MG869826, MG869832, MG869840, MG869895, MN940423; Pon-ticelli viruses: KX388213, KX388216, KX388219, KX388222, KX388225, KY354371, KY354373, KY354374, KY354375, KY354376, KY354377, KY354378, KY354379, KY354380, KY354381, KY354382, KY354383, KY354384, KY354385, KY354387, MG869825, MG869834, MG869844, MG869869, MG869873, MG869874, MG911975, MG911980, MG911983, MG911986, MG911989, MH427535, MH427536, OP293793; Bre-galaka virus: MG573146; Corfou virus: EF201821, KR106179, MG869875, MG869889; Phlebovirus sp.: MG869843, MG869866, MG869868, MG869891.

### **Messa a punto di protocolli di PCR real-time specifici**

Sono stati messi a punto due protocolli di real-time PCR specifici per TAHV e FERV. I primer e la sonda sono stati progettati sfruttando le sequenze ottenute dalla PCR Pan-phlebovirus (Lambert e Lanciotti 2009), grazie alle diverse sequenze omologhe depositate in GenBank (tabella 5). La sequenza target di TAHV era lunga 130 basi, quella di FERV 136 basi ed i primer e le sonde sono stati progettati come riportato in tabella 4. Sono state allestite le reazioni da 20  $\mu$ L utilizzando 4  $\mu$ L di QuantiFast® Pathogen Master Mix 5 $\times$  (Qiagen), 2  $\mu$ M di ciascun primer, 0,7  $\mu$ M di sonda, 3  $\mu$ L di cDNA e acqua distillata. Dopo una prima fase di denaturazione a 95°C per 8 minuti, sono stati eseguiti 50 cicli con il profilo termico di 94°C per 10 sec, 58°C per 20 sec e 72°C per 30 sec. La real-time PCR è stata eseguita sul sistema CFX96 (Bio-Rad, Milano, Italia) e i risultati sono stati analizzati con il software CFX Manager™ (Bio-Rad).

Le curve standard sono state costruite utilizzando diluizioni in base 10 di due controlli positivi ottenuti da ceppi isolati da IZSLER, un FERV del 2018 (isolato 212236/3), e un TAHV del 2021 (ceppo 404118/8), cresciuti su cellule VERO (al 7° e 4° passaggio rispettivamente). Per estrarre il virus in coltura è stato utilizzato il sistema di purificazione KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) secondo le istruzioni del produttore. L'RNA virale è stata quindi quantificata mediante digital PCR (QIAcuity ONE Digital PCR System, Qiagen). Per questa quantificazione abbiamo utilizzato una piastra da 24 pozzetti contenente 8.500 partizioni. La reazione era composta da 3  $\mu$ L della miscela QuantiTECT® Virus + ROX 4 $\times$  (Qiagen), 1,55  $\mu$ L di soluzione di primer e sonda (50  $\mu$ L di primer da 100  $\mu$ M, 35  $\mu$ L di sonda da 100  $\mu$ M e 365  $\mu$ L di acqua sterile), 0,12  $\mu$ L di trascrittasi inversa 100 $\times$  e 1,33  $\mu$ L di acqua sterile. Per ciascun campione, il volume finale è stato di 12  $\mu$ L: 6  $\mu$ L di master mix e 6  $\mu$ L di RNA. I risultati della quantificazione sono stati utilizzati per costruire la curva di calibrazione tracciando la concentrazione dei campioni virali positivi espressi in scala logaritmica e il C<sub>q</sub> ottenuto dall'analisi

delle diluizioni mediante PCR real-time. La curva standard ottenuta è stata utilizzata per stimare la carica virale di TAHV nei pool di zanzare positivi per questo virus (Figura 9).

La quantificazione mediante dPCR del TAHV, utilizzando quattro diluizioni del controllo positivo, ha valutato le copie di genoma virale in 21.322 copie/ $\mu\text{L}$  per  $10^{-1}$ , 2.059 copie/ $\mu\text{L}$  per  $10^{-2}$ , 199 copie/ $\mu\text{L}$  per  $10^{-3}$ , 16 copie/ $\mu\text{L}$  per  $10^{-4}$ . La curva di calibrazione ha una pendenza di -3,726, con un R2 di 0,993 e un'efficienza di reazione dell'85,5% (Figura 10). Il protocollo è stato applicato per la prima volta alle zanzare raccolte nel 2021 e ha rilevato TAHV in 4 pool di zanzare in cui il virus era già stato rilevato utilizzando la PCR del Pan-orthobunyavirus più sequenziamento, mentre ha dato risultati negativi in altri 6 pool selezionati casualmente.

Per il protocollo del FERV il numero di copie virali è stato valutato analizzando in dPCR 10 replicati di 3 diluizioni del virus (da  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$ ) contenenti da 616 copie/ $\mu\text{L}$  a 6,2 copie/ $\mu\text{L}$ . Non è stato ottenuto alcun rilevamento per la diluizione di  $10^{-6}$ , mentre 9 copie/ $\mu\text{L}$  sono state rilevate a  $10^{-5}$  (valore medio Cq di 39,33) e tutti i  $10^{-4}$  replicati hanno fornito una curva di amplificazione (valore medio Cq di 37,17). L'efficienza della reazione era dell'86,6% (pendenza di -3,693, intercetta di 47,448 e R2 di 0,977) (figura 11). Il protocollo è stato applicato a 20 pool di flebotomi raccolti nel 2021, la real-time PCR ha rilevato il virus nei 9 pool già noti per essere positivi, mentre non l'ha rilevato negli 11 pool negativi, 4 dei quali erano positivi per TOSV.

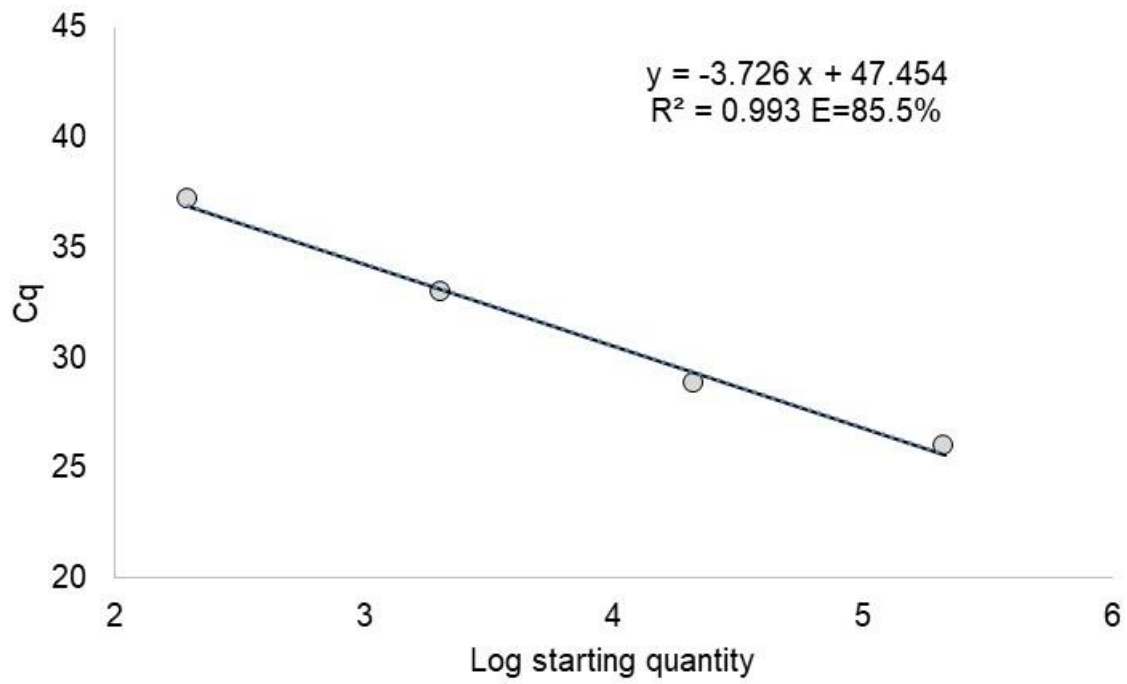


Figura 10 — Curva standard della real-time PCR di Tahyna virus.

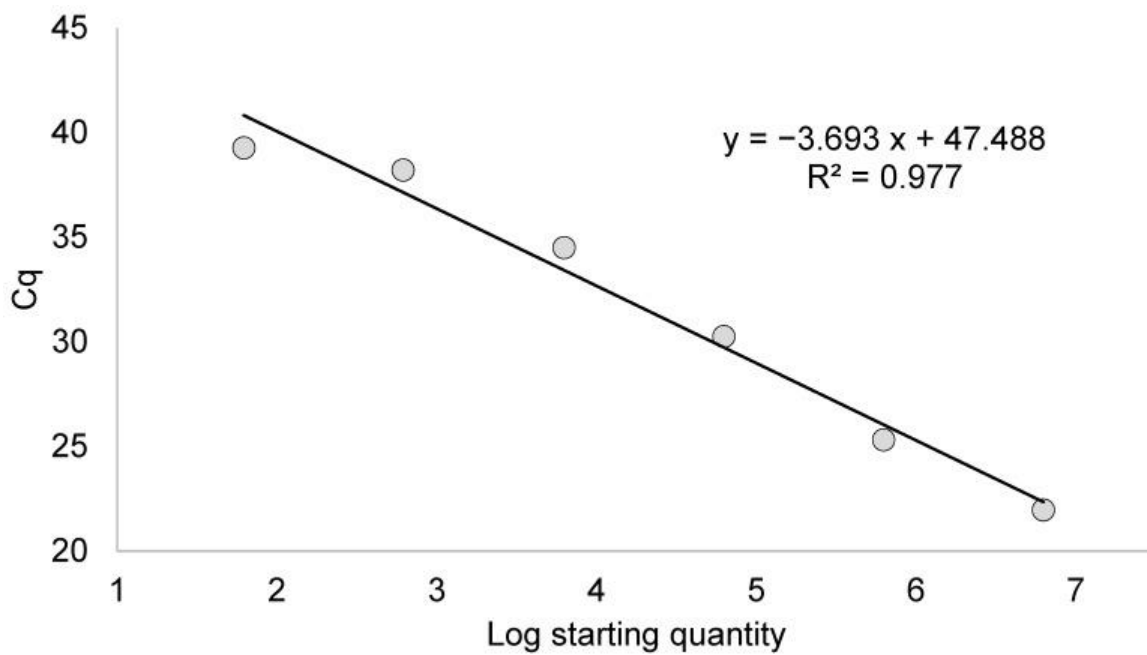


Figura 11 — Curva standard della real-time PCR di Fermo virus.

## RISULTATI

### **Arbovirus rilevati nelle zanzare campionate**

Nelle tre stagioni di sorveglianza, sono state catturate e identificate 102.808 zanzare (20.778 nel 2021 in un turno di campionamento, 37.995 nel 2022 and 44.035 nel 2023, in due turni di campionamento), appartenenti a 10 specie, la quasi totalità di queste zanzare (102.625) è stata testata per la ricerca di Arbovirus in 1.650 pool (tabella 6). La specie in assoluto più campionata è stata *Cx. pipiens*, seguita da *Ae. caspius* e *Ae. vexans*. Sono stati raccolti numeri rilevanti anche di *Ae. albopictus*, *An. maculipennis s.l.* e *Co. richiardii* (tabella 2). Le abbondanze relative per i diversi siti di campionamento nelle tre stagioni sono riportate nella figura 12.

Nei 1.650 pool testati, TAHV è stato rilevato in 50 pool (6 nel 2021, 37 nel 2022 e 7 nel 2023), la PCR specifica è però stata applicata solo sui campioni delle stagioni 2022 e 2023. WNV è stato rilevato in 120 pools (24 nel 2021, 45 nel 2022 e 51 nel 2023), entrambe i lineaggi più diffusi di questo virus a livello globale, il lineaggio 1 (L1) e il lineaggio 2 (L2), sono stati rilevati (L1 in 3 pool, L2 in 115 pool, mentre entrambe i lineaggi sono stati rilevati in 2 pool); USUV è stato rilevato in 61 pool (21 nel 2021, 24 nel 2022 e 16 nel 2023); fra quelli già elencati i pool positivi sia per WNV che per USUV sono stati 23 (8 nel 2021, 10 nel 2022 e 5 nel 2023). La PCR del Panphlebovirus, che è stata applicata solo alle zanzare catturate nel 2021, non ha dato esiti positivi sulle zanzare campionate, non sono stati registrati nemmeno pool positivi applicando la real-time PCR SINV, applicata solo nelle zanzare campionate nel 2023.

Tabella 6 — Zanzare campionate nella sorveglianza nei tre periodi del 2021, 2022 e 2023 con riferimento agli esemplari testati e ai virus rilevati.

	10 - 19 agosto 2021				19 luglio - 12 agosto 2022			18 luglio - 10 agosto 2023			totale	%	pool
	N	test.°	pool	Virus	N	pool	Virus	N	pool	Virus			
<i>Aedes albopictus</i>	838	762	29		1456	120	5 TAHV	1780	138	1 WNV, 1 TAHV	4074	4,0	287
<i>Aedes caspius</i>	7586	7536	80	3 TAHV*, 3 ISFs	16746	191	25 TAHV	9838	170	2 TAHV	34170	33,2	441
<i>Aedes cinereus</i>					4	1	1 TAHV	21	2		25	<0,1	3
<i>Aedes geniculatus</i>								4	2		4	<0,1	2
<i>Aedes vexans</i>	1756	1733	22	2 ISFs	1924	73	3 TAHV	2484	100	1 TAHV	6164	<0,1	195
<i>Anopheles maculipennis</i> sl	115	85	6		261	42	1 TAHV	99	38	1 WNV, 1 TAHV	475	0,5	86
<i>Anopheles plumbeus</i>	3				4	2		17	8	1 WNV	24	<0,1	10
<i>Coquillettidia richiardii</i>	108	107	4		365	6		47	9		520	0,5	19
<i>Culex pipiens</i>	10372	10372	114	24 WNV, 21 USUV, 3 TAHV	17235	233	45 WNV, 24 USUV, 2 TAHV	29744	259	48 WNV, 16 USUV, 2 TAHV	57351	55,8	606
<i>Culiseta longiareolata</i>								1	1		1	<0,1	1
	20778	20595	255		37995	668		44035	727		102808	100	1650

\* TAHV isolamento del virus da uno di questi pool

° Nel 2021 solo i pool >5 sono stati testati

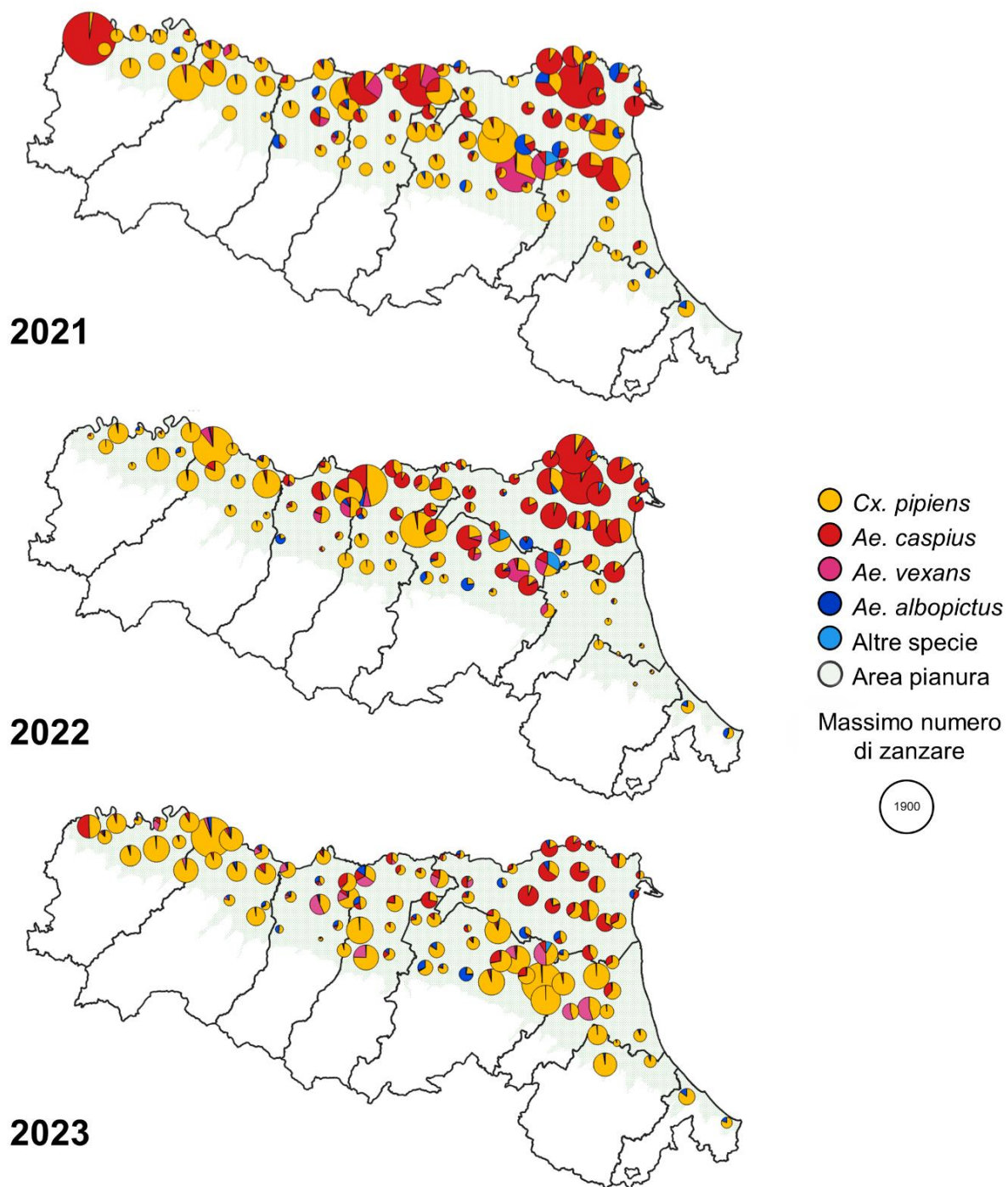


Figura 12 — Mappa dell'Emilia-Romagna con il numero di zanzare medio catturato per ogni anno di monitoraggio. I grafici a torta sono proporzionali al numero di zanzare campionate, in verde l'area di pianura.

Il TAHV è stato rilevato in pool monospecifici composti da 6 specie di zanzare: *Ae. caspius* (30), *Ae. albopictus* (6), *Ae. vexans* (4), *Cx. pipiens* (7), *Ae. cinereus* (1) e *An. maculipennis* sl (2) (tabella 7). WNV ed USUV sono stati invece rilevati, per la stragrande maggioranza, in pool composti dalla specie *Cx. pipiens*, WNV è stato rilevato anche in un pool di *Ae. albopictus*, uno di *An. maculipennis* sl e uno di *An. plumbeus*. Alcuni pool di *Cx. pipiens* sono risultati positivi per diversi virus, in particolare un pool, catturato il 17/08/2021, San Pietro in Casale (BO), è risultato positivo a tutti e tre i virus ricercati, tre sono risultati positivi a TAHV e WNV (campionati tutti in provincia di Parma, il 17/08/2021 a Soragna, il 19/07/2022 e il 02/08/2022 a Sissa Trecasali) e uno a TAHV e USUV (10/08/2021, comune di Bologna). I pool positivi per USUV e WNV sono stati 14, 10 nel 2022 (dalle province di Modena, Reggio Emilia e Ravenna) e 4 nel 2023 (dalle province di Parma e Modena). Oltre a quella del 2021, tutti e tre i virus sono inoltre stati rilevati in due stazioni di campionamento nel 2022, Novi di Modena (MO) e in comune di Ravenna. Il numero maggior numero di pool positivo a TAHV è stato registrato nella stagione 2022 con 9 pool positivi nella stazione di Jolanda di Savoia (FE) mentre 5 pool positivi per USUV è stato catturato nel 2022 in una stazione a Fabbrico (RE). Quattro pool positivi a WNV sono stati registrati in una stazione per ogni stagione di monitoraggio, nel 2021 nella stazione di Fabbrico e nel 2022 e 2023 sempre a Polesine Zibello. La distribuzione geografica dei siti risultati positivi durante gli anni è riportata nella figura 13.

Inoltre, nel 2021, mediante il sequenziamento degli ampliconi della PCR del Pan-orthoflavivirus sono state ottenute cinque sequenze attribuibili a due ISF (Figura S1), di cui tre provenivano da *Ae. caspius* (GB: ON124944-46) e due provenivano da *Ae. vexans* (GB: ON124947-48). Delle prime tre sequenze, due erano identiche e hanno mostrato una *p-distance* di 0,08 con la terza e una *p-distance* di 0,07 con la parte omologa della sequenza del virus Marisma (GB: MF139576). Le sequenze del secondo gruppo erano identiche tra loro e con delle sequenze omologhe rilevate in Repubblica Ceca (GB: JN802283) e Italia (GB: KF801590).

Tabella 7 — Numero di pool positivi e testati per le diverse specie di zanzara.

	Pool test.	TAHV	WNV	USUV
<i>Aedes albopictus</i>	287	6	1	
<i>Aedes caspius</i>	441	30		
<i>Aedes cinereus</i>	3	1		
<i>Aedes geniculatus</i>	2			
<i>Aedes vexans</i>	195	4		
<i>Anopheles maculipennis s.l.</i>	86	2	1	
<i>Anopheles plumbeus</i>	10		1	
<i>Coquillettidia richiardii</i>	19		0	
<i>Culex pipiens</i>	606	7	117	61
<i>Culiseta longiareolata</i>	1			
	1650	50	120	61

### Quantificazione del Tahyna virus con PCR real-time

Utilizzando la curva standard messa a punto in questo lavoro per la real-time PCR per il rilevamento di TAHV, abbiamo stimato il numero di copie virali nei pool risultati positivi nel 2022, l'anno con il maggior numero di pool di zanzare positivi per questo virus. Tra i campioni testati, quattro erano composti da una singola zanzara e mostravano una carica virale di  $1,4 \times 10^6$  per *Ae. caspius*,  $7,2 \times 10^5$  e  $7,5 \times 10^5$  per due esemplari di *Ae. albopictus*, e  $5,7 \times 10^5$  per un esemplare di *Ae. vexans*.

Tra le specie con più di un pool positivo, *Ae. caspius* ha mostrato la carica virale più alta con un valore mediano di  $6,0 \times 10^7$  copie virali per pool, seguito da *Ae. vexans* con un valore mediano di  $2,1 \times 10^6$ , *Cx. pipiens* con  $1,5 \times 10^6$  copie per pool e *Ae. albopictus* con  $7,5 \times 10^5$  copie per pool (figura 14). La maggior carica virale è stata rilevata in un pool di 106 *Ae. albopictus* campionato a Bologna il 26 luglio, con un numero stimato di  $6,8 \times 10^{10}$  copie virali.

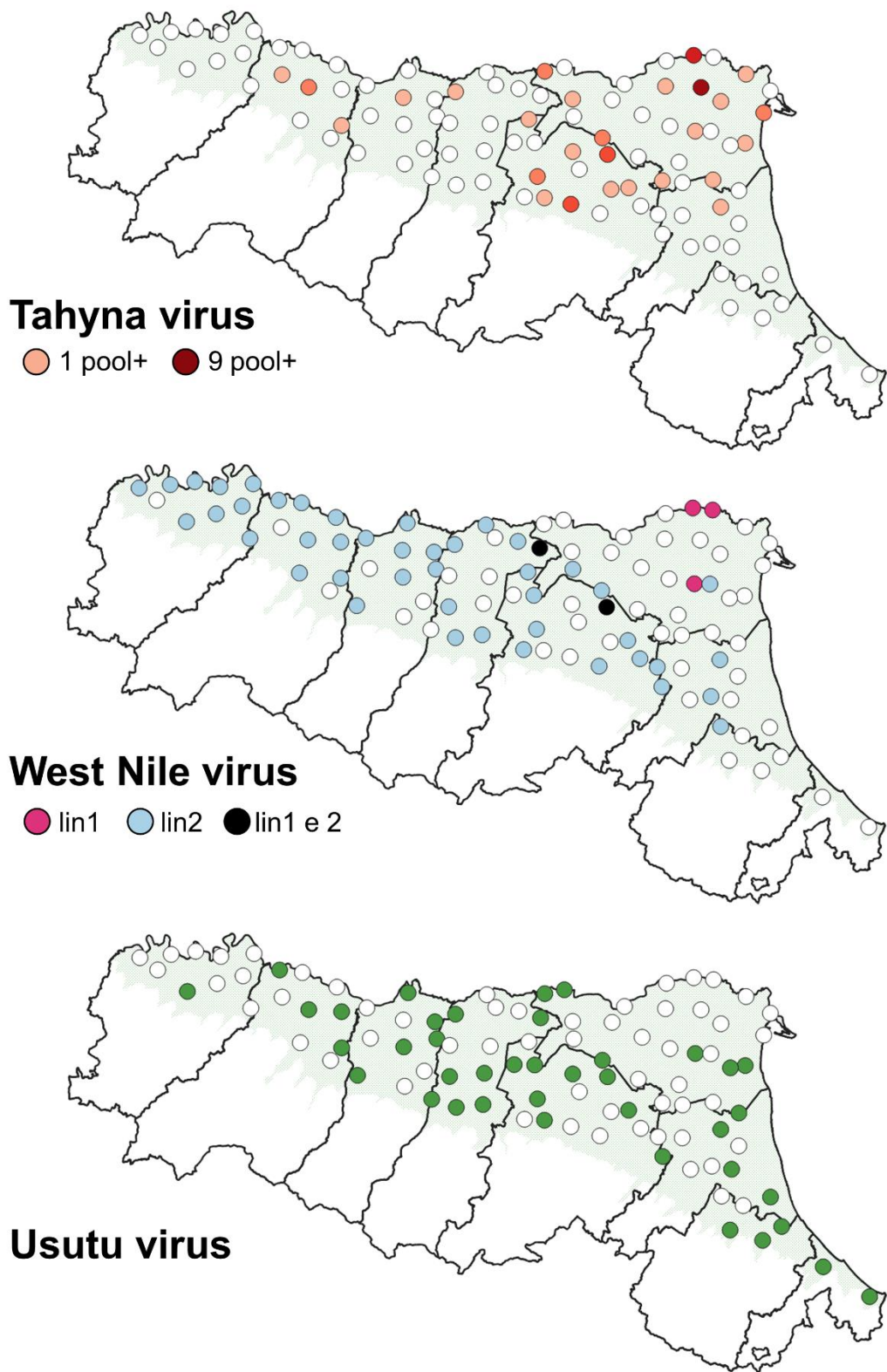


Figura 13 — Mappa dell'Emilia-Romagna con le stazioni risultate positive ai tre virus rilevati nel periodo di monitoraggio. In verde l'area di pianura.

Altre specie con un solo pool positivo per TAHV sono state *Ae. cinereus*, con un pool di quattro esemplari con una stima di  $2,1 \times 10^7$  copie virali, *An. maculipennis* sl, con un pool di 14 zanzare nel quale è stata stimata la presenza di  $2,9 \times 10^5$  copie virali. In 14 siti, il TAHV è stato rilevato in una specie di zanzara, in otto siti solamente in *Ae. caspius*, in due siti in *Ae. albopictus*, in due siti in *Ae. vexans*, in un sito in *Ae. cinereus* e in un sito in *Cx. pipiens*. È interessante notare che nel 2022 il TAHV è stato rilevato in pool di *Ae. caspius* in associazione con un'altra specie in 5 siti: in tre in associazione con *Ae. albopictus*, in un sito con *Ae. vexans* e in un sito con *Ae. maculipennis* sl.

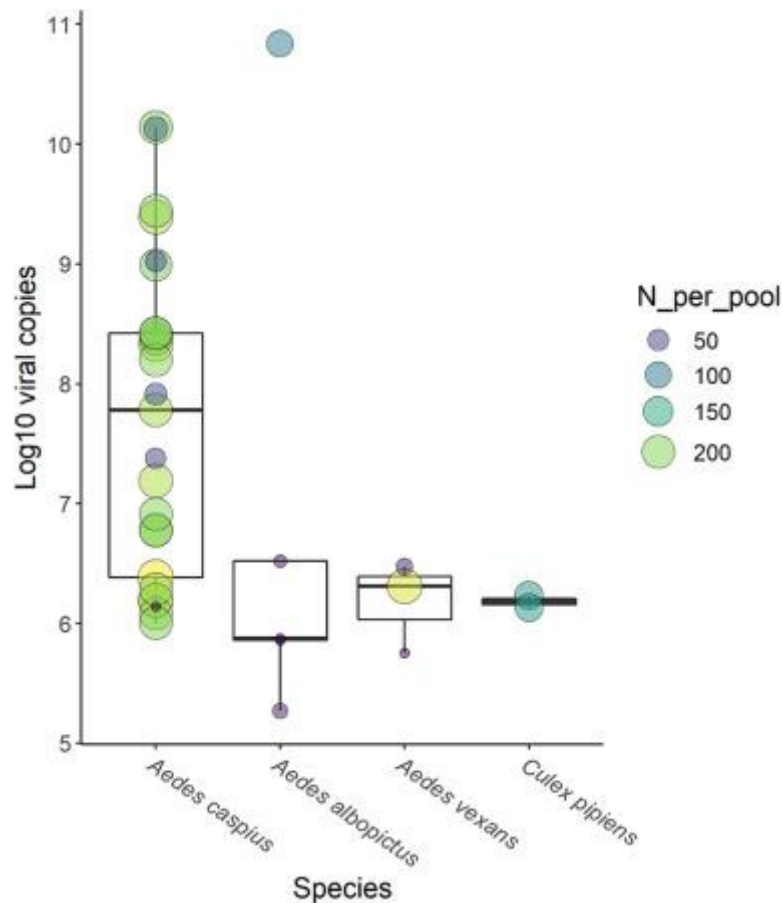


Figura 14 — Box plot del numero stimato di copie virali del virus Tahyna per pool per le diverse specie di zanzare con più di un pool positivo. La stima per ogni singolo pool è stata riportata anche con riferimento al numero delle zanzare nel pool (la dimensione del cerchio è proporzionale al numero di zanzare presenti nel pool).

### Isolamento e sequenziamento del Tahyna virus

L'isolamento su coltura cellulare è stato tentato su tre pool di *Ae. caspius* positivi campionati nel 2021, da uno di questi pool di 20 *Ae. caspius* campionato il 10 agosto nel comune di Comacchio è stato ottenuto il ceppo 404118. Il CPE è stato osservato in colture cellulari inoculate con la parte rimanente dell'omogenato di zanzara TAHV-positivo. Inoltre, i test real-time PCR eseguiti sul surnatante di queste colture e la PCR del Pan-orthobunyavirus sono risultati positivi.

Un'identificazione preliminare del virus isolato è stata ottenuta esaminando i surnatanti delle colture cellulari infette con microscopia elettronica. Come mostrato nella figura 15, è stato possibile osservare numerose particelle sparse con morfologia tipica dei bunyavirus (forma sferica, diametro di circa 90-100 nm e presenza di fitti peplomeri sulla superficie).

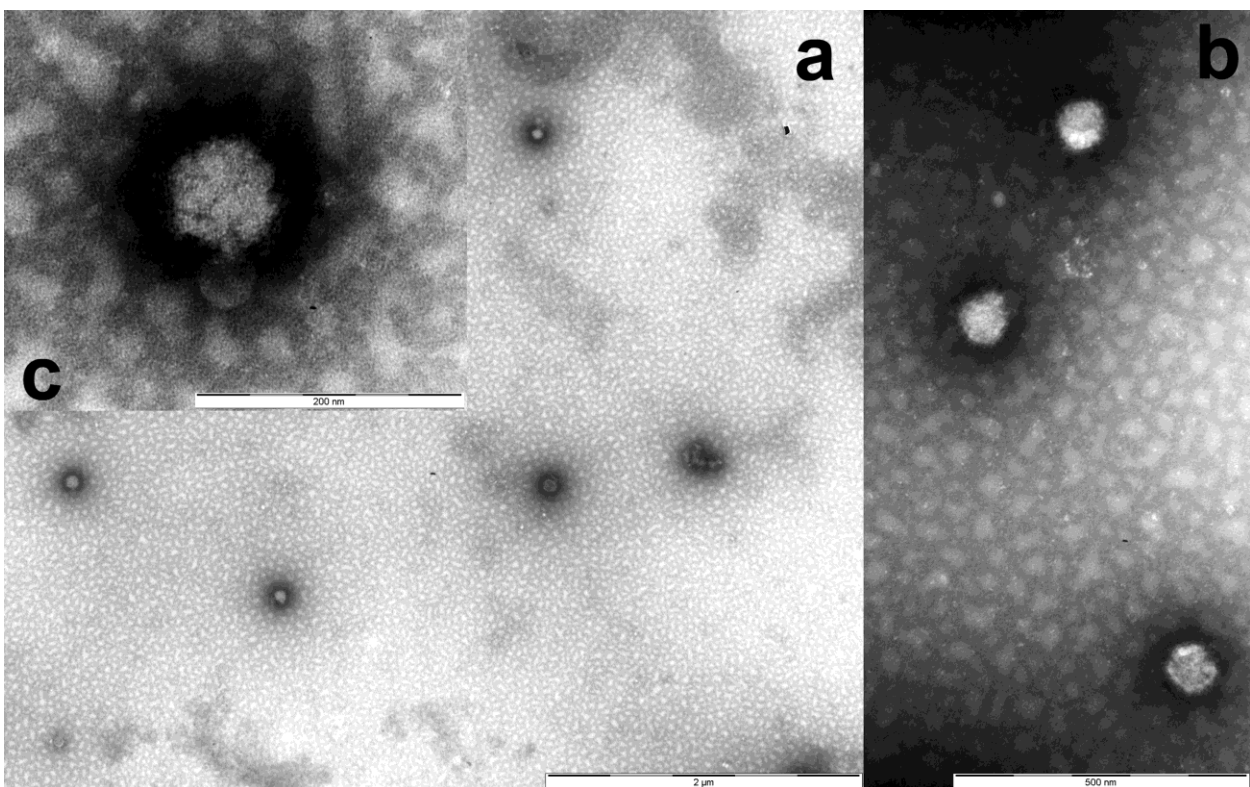


Figura 15 — Ultramicrografie dei virioni osservati nel surnatante delle cellule VERO inoculate con pool di zanzare. Particelle tondeggianti di 90-100 nm con involucri sono mostrate a basso (A), medio (B) e alto ingrandimento (C). Colorazione negativa di NaPt 2% (pH 6,8) osservata con un TEM FEI Tecnai G2 Spirit Bio-twin.

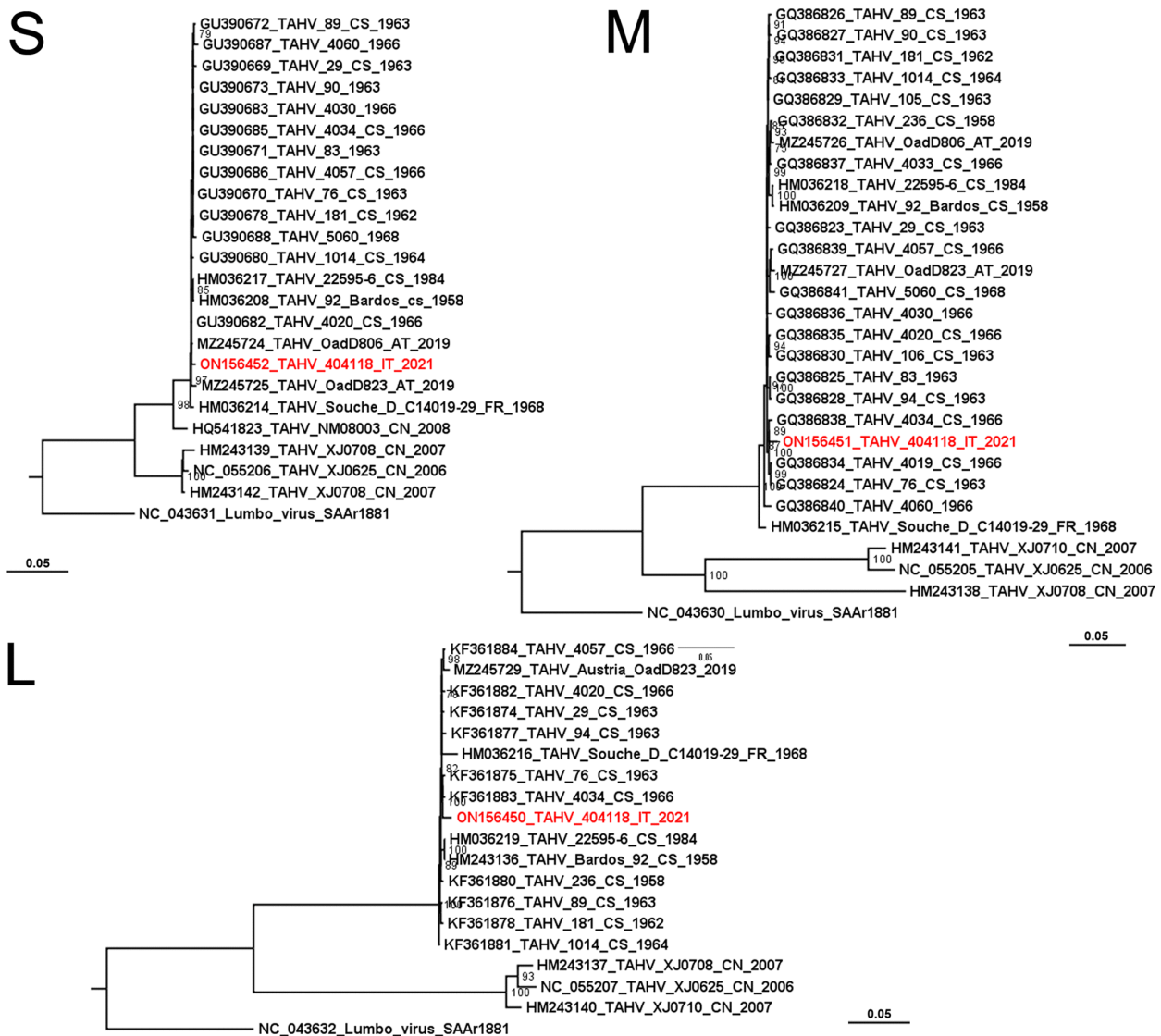


Figura 16 — Alberi ML ottenuti dalle sequenze dei tre segmenti del ceppo di virus Tahyna isolato (ceppo 404118, in rosso) e sequenze omologhe recuperate da GenBank. Per ogni sequenza è riportato l’accession number GB, il paese e l’anno di isolamento (CS, ex Cecoslovacchia; FR, Francia; CH, Cina; AT, Austria; IT, Italia). Bootstrap >75 visualizzato vicino ai rispettivi nodi.

L’isolato ottenuto è stato sequenziato, ottenendo le sequenze complete dei tre segmenti genomici, che sono stati depositati in GenBank (GB: segmento L, ON156450; segmento M, ON156451; segmento S, ON156452). Le altre sequenze complete di TAHV disponibili in GenBank si riferivano a ceppi isolati da zanzare, principalmente tra il 1958 e il 1968 nell’ex-Cecoslovacchia. Oltre a queste, erano disponibili solo sequenze di ceppi provenienti da Francia, Austria e Cina. Non sempre erano disponibili le sequenze di tutti e tre i segmenti di un ceppo. Il modello di

sostituzione selezionato per i diversi alberi è stato TN+F+G4 per i segmenti S, TIM2+F+G4 per i segmenti L, TIM2+F+I per i segmenti M.

Nonostante le sequenze dei primi isolati siano stati ottenuti negli anni '50 e '60, tutte le sequenze ottenute in questo studio sono risultate strettamente imparentate con altri ceppi europei, e più lontanamente imparentate con ceppi cinesi (figura 3). La *p-distance* media nel clade europeo è risultata essere inferiore a 0,01 per la sequenza amminoacidica e nucleotidica per tutti i segmenti.

### **Arbovirus rilevati nei flebotomi campionati**

Il totale di flebotomi catturati nelle stagioni 2022 e 2023 è stato di 98.886. Sulla base dell'identificazione, dopo chiarificazione dei maschi, le specie rilevate sono state due: *Ph. perfiliewi* (pari al 87.2%) e *Ph. perniciosus* (paria al 12.2%) (tabella 8). La prima specie è stata rilevata con notevoli abbondanze in alcune aree, in particolare nella zona pedecollinare dell'Appennino centro orientale della regione (da Bologna verso l'Adriatico). Nella figura 16 sono riportate le proporzioni relative delle due specie e l'abbondanza media dei campionamenti effettuati, che evidenziano la maggiore presenza di *Ph. perfiliewi* in zone collinari e nella parte orientale della regione, mentre *Ph. perniciosus* è prevalente nelle zone pianeggianti della parte occidentale della regione, dove le densità dei flebotomi sono però minori.

Nonostante il maggior sforzo di campionamento sia stato compiuto in pianura, i campionamenti più abbondanti sono stati registrati nelle zone collinari, in particolari nelle aree già conosciute per l'elevato numero di questi insetti (colli bolognesi e romagnoli, figura 17) ed in aree scarsamente campionate in precedenza (colline reggiane e parmensi). Un risultato interessante è stato la presenza di catture rilevanti in alcuni siti di pianura, un ambiente considerato sfavorevole alla presenza dei flebotomi ma nel quale si stanno registrando numeri crescenti di questi insetti negli ultimi anni.

Tabella 8 — Numero di flebotomi campionati, identificati e testati con riferimento ai pool positivi per Toscana virus e Fermo virus e le province di campionamento.

	N	<i>Ph. pw</i>	<i>Ph. pn</i>	testati		positivi	
				numero	pool	TOSV	FERV
Bologna	26903	2951	365	15376	445	2	81
Forlì-Cesena	52926	2014	17	41077	612	59	164
Ferrara	864	6	5	813	78		7
Modena	2023	525	250	1160	104	1	4
Piacenza	269	26	48	191	48		
Parma	4417	731	121	3385	137		32
Ravenna	1914	139	17	1556	63	2	11
Reggio Emilia	7962	913	146	5673	179	5	31
Rimini	1608	298	90	1167	46	5	7
	98886	7603	1059	70398	1712	74	337

*Ph. pw*: *Ph. perfliewi*; *Ph. pn*: *Ph. perniciosus*.

Un totale di 70.398, 33.608 femmine in 1.712 pool, è stata testata per la ricerca di TOSV, rilevando 74 pool positivi, e la ricerca di FERV, con 337 pool positivi. I tre siti in cui è stato registrato il maggior numero di pool positivi per TOSV sono stati quelli in comune di Forlì (27/135), Roncofreddo (14/132) e Castrocaro (14/189), tutti in provincia di Forlì Cesena. Questi tre siti sono anche quelli nei quali si è registrato il maggior numero di flebotomi campionati (da più di 12.000 a più 16.000).

Diversi pool di flebotomi sono inoltre risultati positivi ad entrambe i protocolli, testimoniando la presenza co-presenza di TOSV e FERV, in particolare 19 a Forlì, 5 a Roncofreddo (FC), 4 Casalgrande (RE), 3 Verucchio (RN), 2 Castrocaro (FC) ed uno a Budrio (BO), Cesena (FC) e 1 Faenza (RA). La distribuzione dei siti risultati positivi, con riferimento al numero di pool positivi nel biennio, è riportata nella figura 18.

Particolarmente intensa è stata la circolazione del FERV in 3 siti (due dei quali anche con un alto numero di pool TOSV+) nei comuni di Castrocaro (FC), Forlì e Casalgrande (RE) in cui si sono registrati nei due anni 59/189, 53/135, 26/89 pool positivi, rispettivamente.

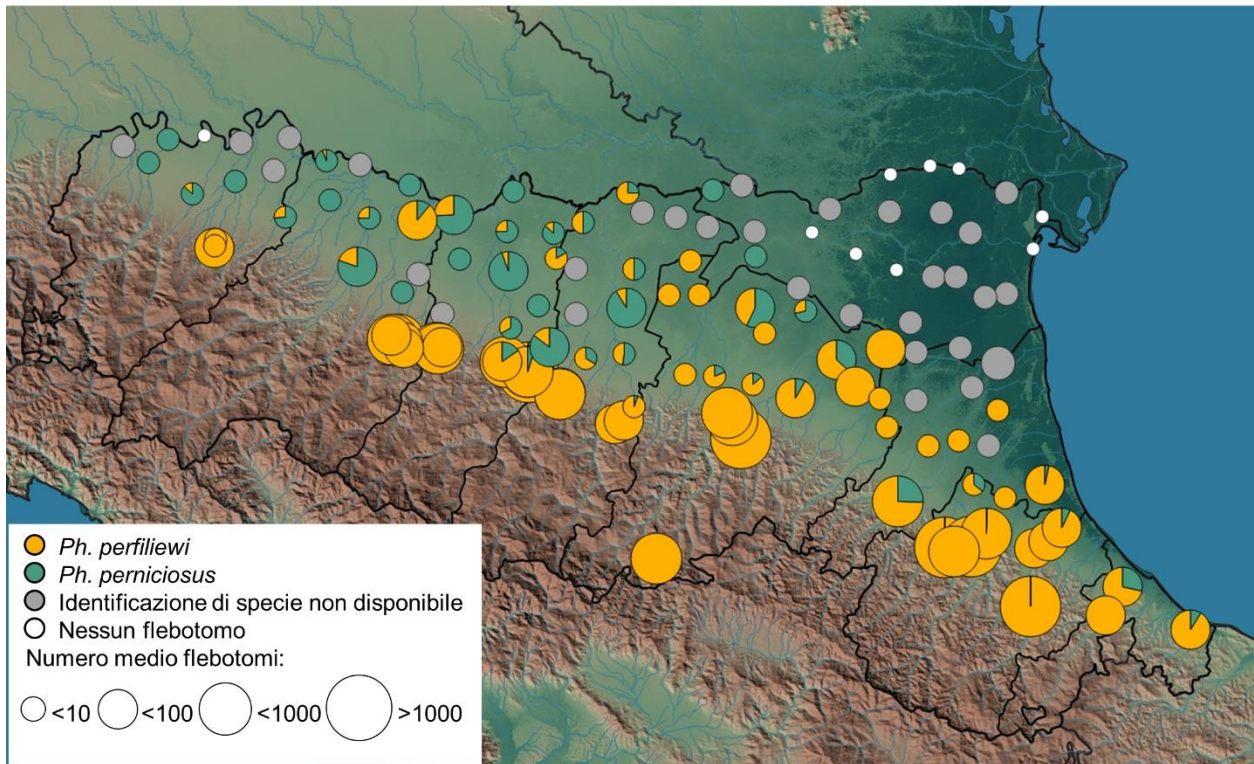


Figura 17 — Media dei flebotomi raccolti nel periodo nei diversi siti. Le circonferenze sono categorizzate in base al numero di flebotomi catturati, evidenziando che la zona con più flebotomi sono le colline preappenniniche (soprattutto nella parte orientale).

Con la PCR Pan-phlebovirus e successivo sequenziamento, oltre al FERV (in 115 pool) e il TOSV (in 9 pool) già rilevati con le PCR specifiche, sono state rilevate positività riferibili ad altri *Phlebovirus* (tabella 9). In particolare, 35 sequenze riferibili ai virus Ponticelli (21 dalla provincia di Forlì-Cesena), 12 al Corfou virus (8 delle quali dalla provincia di Parma), 2 sequenze riferibili al Punique virus (dalla provincia di Forlì Cesena) (tabella 9).

I Ponticelli virus (I, II, III) sono tre virus che differiscono per il segmento M, non è quindi stato possibile stabilire con precisione da quale dei tre virus derivassero le sequenze, visto che la PCR Pan-phlebovirus è sviluppata per rilevare un tratto del segmento S. Inoltre, sono state rilevate le

sequenze probabilmente appartenuti a due *Phlebovirus* non ancora isolati (25 appartenenti ad uno e tre appartenenti ad un altro), ma già rilevati in passato in Emilia-Romagna in flebotomi campionati nel 2015 e nel 2016 (figura 19).

Tabella 9 — Sequenze riferibili ai diversi *Phlebovirus* individuati con riferimento alle province di rilevamento (Toscana virus, TOSV; Fermo virus, FERV; Ponticelli virus, PONV; Corfou virus, CORV; Punique virus, PUNV; sequenze ascrivibili a due *Phlebovirus* non noto, Phlebo1 e Phlebo2).

	pool	TOSV	FERV	PONV	CORV	PUNV	Phlebo1	Phlebo2	Totale
Bologna	445		34	2	1		5		42
Forlì-Cesena	612	5	22	21	3	2	7	3	63
Ferrara	78		5				1		6
Modena	104	1	3	1			1		6
Piacenza	48								
Parma	137		21		8		4		33
Ravenna	63		3	1			3		7
Reggio Emilia	179	2	21	9			2		34
Rimini	46	1	6	1			2		10
Totale		9	115	35	12	2	25	3	201

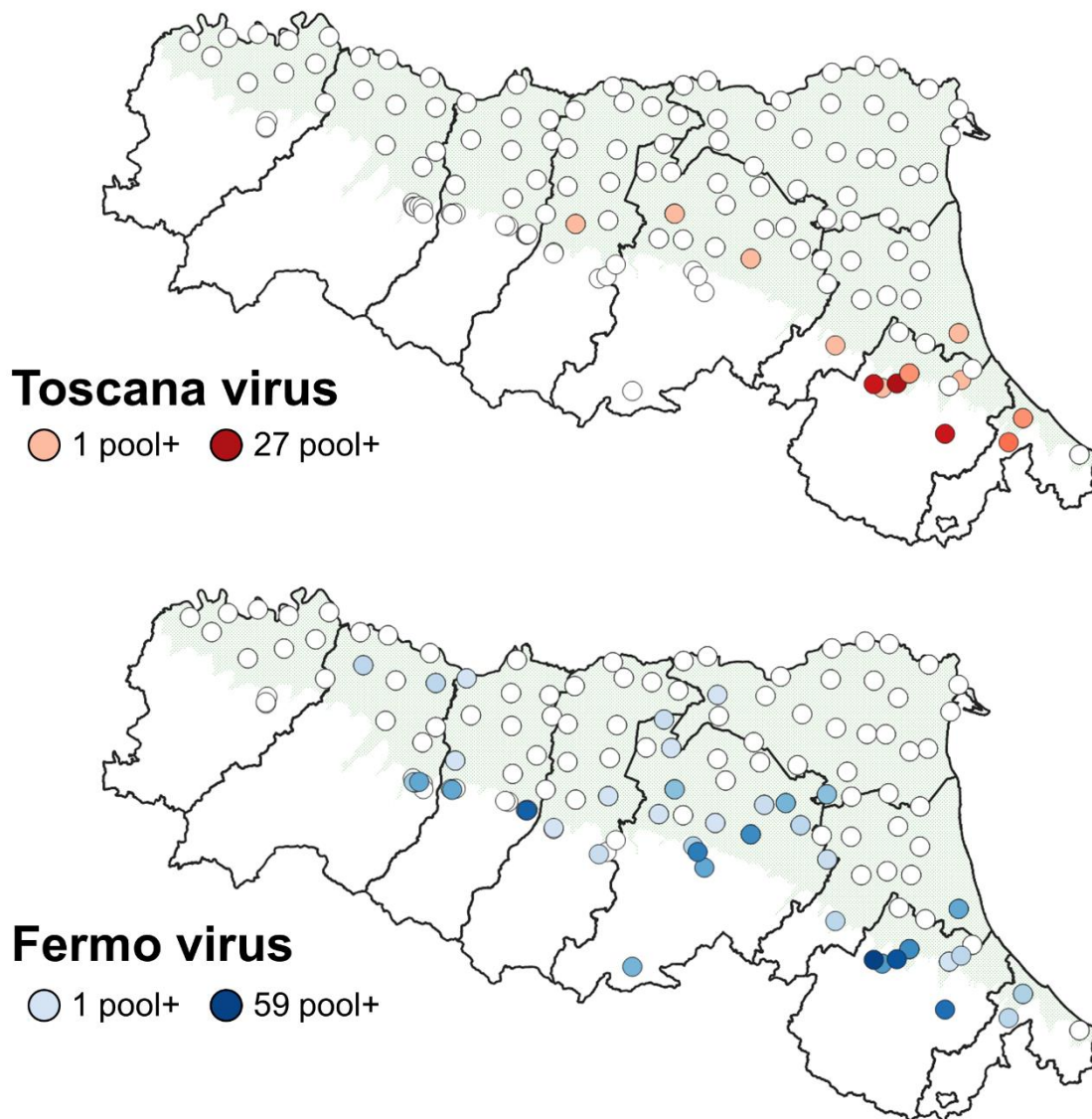
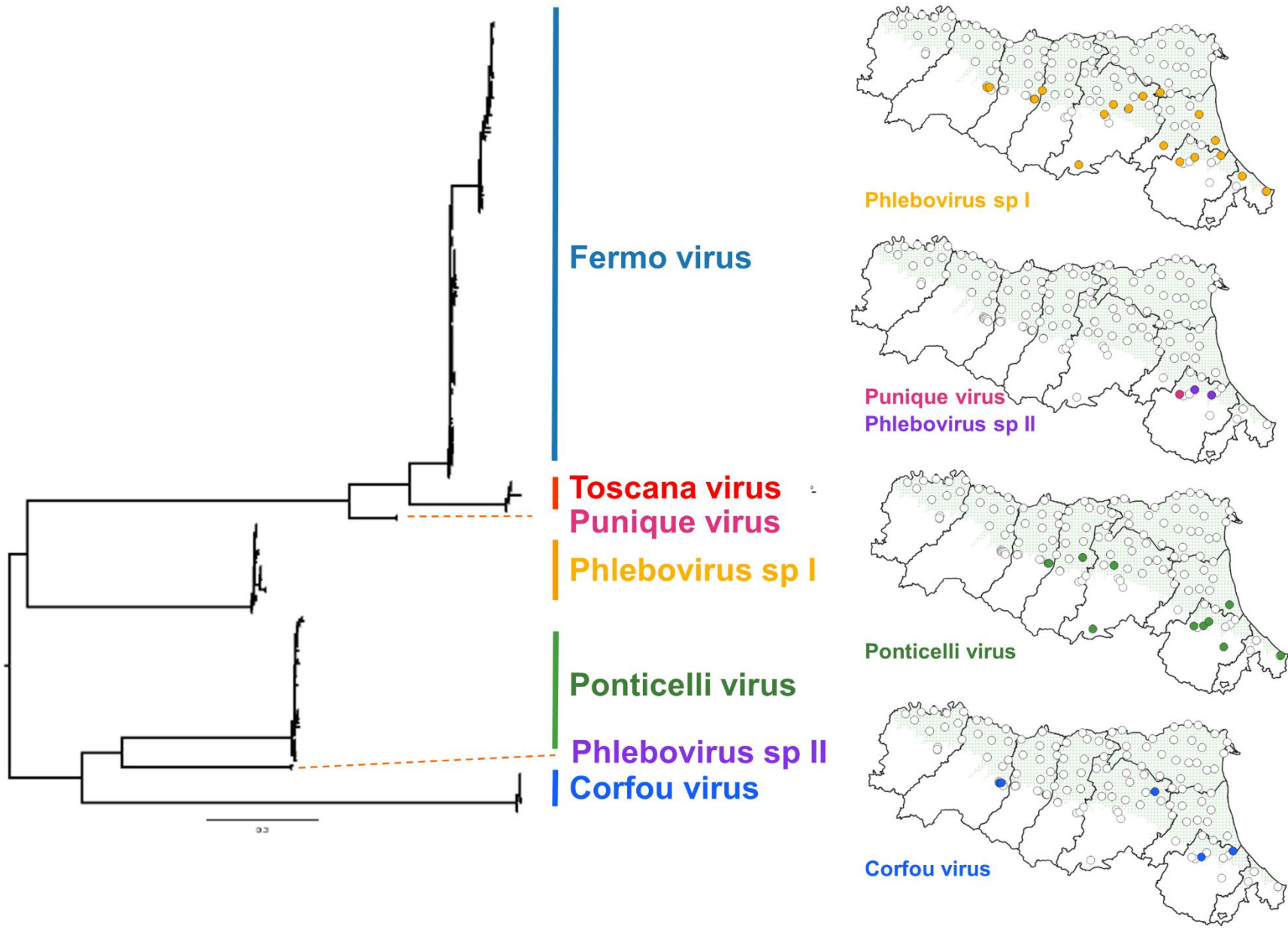


Figura 18 — Mappa dell'Emilia-Romagna con le stazioni risultate positive a Toscana virus e Fermo virus con riferimento al numero di pool positivo raccolto. In verde l'area di pianura.

Figura 19 — Albero ottenuto con le sequenze della PCR Pan-phlebovirus e posizione del loro rilevamento sulla mappa dell'Emilia-Romagna.



## DISCUSSIONE

I risultati del presente studio, volto a rilevare *Orthoflavivirus*, *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus* nelle zanzare raccolte in 2 o 4 settimane in tre stagioni di campionamento diverse, ha fornito “un'istantanea” degli arbovirus presenti nell'area di studio, inclusi quelli non oggetto di sorveglianza, in particolare il TAHV.

La presenza di WNV e USUV in un rilevante numero di pool era un risultato atteso, poiché questi virus sono presenti nell'area di studio almeno dal 2008 (Calzolari et al. 2010). I dati raccolti hanno evidenziato un'intensa circolazione di WNV in Emilia-Romagna in tutte le stagioni di monitoraggio. L'importante circolazione del virus è stata inoltre confermata dalla diagnosi, in regione, di 141 casi umani di malattia neuro-invasiva, (17 nel 2021, 69 nel 2022 e 55 nel 2023) (Bella et al. 2021, Bella et al. 2022, Bella et al. 2023). Lo screening avviato dopo il rilevamento del virus ha inoltre identificato 45 donatori di sangue asintomatici (11 nel 2021, 18 nel 2022 e 16 nel 2023) (Bella et al. 2021, Bella et al. 2022, Bella et al. 2023), prevenendo il rischio per la salute derivante dalle donazioni di sangue infetto.

Nella parte orientale dell'area di studio è stata inoltre registrata la co-circolazione dei ceppi L1 e L2 di WNV, in particolare nel 2023. I due lineaggi di WNV hanno cicli epidemiologici sovrapponibili, questa osservazione potrebbe giustificare la loro possibile co-circolazione nel medesimo ambiente. Questo è però un evento raro, descritto per la prima volta nella stagione 2022 in Emilia-Romagna. Precedentemente i due virus non avevano dato evidenza di una co-circolazione importante in Emilia-Romagna, dal 2008 al 2010, è stata riportata l'esclusiva circolazione di L1 (Calzolari et al. 2007). Dal 2013, dopo due anni in cui il WNV non era stato rilevato (Calzolari et al. 2010), i ceppi registrati durante la sorveglianza erano quasi esclusivamente L2, l'unica eccezione era stato un pool di zanzare positive a L1 campionate nel

2017, ad indicare che comunque il L1 continuava a circolare sotto traccia nell'area di studio, ma non con una intensità tale da consentirne la regolare rilevazione. Nonostante i due lineaggi abbiano una rilevante differenza nucleotidica, intorno al 20%, non è chiaro se esitano e quali possano essere la differenza epidemiologica fra i loro cicli epidemiologici, la loro coesistenza in uno stesso territorio nella stessa stagione sembrerebbe sottintendere che possano essere poche. Visto che il vettore principale di WNV in Nord Italia è *Culex pipiens*, è difficile ipotizzare che eventuali differenze siano da ricercare nell'ambito vettoriale, anche se non si può escludere che i biotipi (*Cx. pipiens pipiens* e *Cx. pipiens molestus*), o addirittura le popolazioni del vettore, possano avere diverse capacità vettoriale per i due lineaggi, ma questa ipotesi non è ancora stata oggetto di adeguati approfondimenti sperimentali, che risultano inoltre di difficile implementazione. Maggiori differenze potrebbero emergere dalle diverse capacità, come serbatoio del virus, di diverse specie di uccello, visto che sono molte quelle che possono rientrare nel ciclo di WNV (Pérez-Ramírez et al. 2014). Eventuali differenze potrebbero giustificare la differente circolazione dei due lineaggi del virus in base alle specie di uccelli più o meno diffuse in una data area ed in una data stagione. Questo tipo di informazione è però difficile da ottenere, per la difficoltà di riuscire ad approntare infezioni sperimentali o ricavare queste informazioni dalla sorveglianza sul campo. Un altro importante tassello necessario per chiarire i cicli dei due lineaggi, sarebbe capire se esiste una eventuale cross-protezione immunitaria nei vertebrati, negli uccelli in particolare, fornita dall'infezione di un lineaggio nei confronti dell'altro.

Di certo la co-circolazione dei due lignaggi, registrata anche in Veneto nel 2022, è una situazione epidemiologica che merita di essere adeguatamente monitorata, che potrebbe avere rilevanti risvolti sanitari. In particolare perché è stata ipotizzato i ceppi L1 siano più patogeni per l'uomo rispetto ai ceppi L2 (Barzon et al. 2022).

Durante questo studio è stato possibile anche registrare una significativa diffusione di USUV. L'individuazione di questo *Orthoflavivirus* è molto rilevante in fase di diagnosi differenziale,

poiché cross-reagisce con il WNV, non solo sierologicamente, ma anche nei test biomolecolari (Clé et al. 2019). Inoltre, i due virus condividono molte caratteristiche epidemiologiche, come il vettore, e mostrano cicli in parte affini. L'USUV è patogeno per l'uomo, anche se in misura minore rispetto al WNV (Domanović et al. 2019). Questa osservazione è confermata dalla diagnosi di soli 2 casi umani di USUV nel periodo di studio in Emilia-Romagna (1 nel 2021, 1 nel 2022) (Bella et al. 2021, Bella et al. 2022, Bella et al. 2023), sebbene la circolazione del virus sia stata significativa, come evidenziato dal rilevante numero di pool di zanzare positive. Anche la definizione della circolazione di USUV è quindi rilevante per caratterizzare il rischio per la salute associato a questo virus.

Nell'analisi dei dati va sottolineato che il campionamento delle zanzare era finalizzato alla cattura di *Cx. pipiens*, ma questa impostazione non ha impedito di campionare numeri rilevanti di altre specie di zanzare. Il rilevamento di WNV e USUV quasi esclusivamente in pool di *Cx. pipiens* conferma ancora una volta questa zanzara come il principale vettore di entrambi i virus nel Nord Italia (Calzolari et al. 2010a, Calzolari et al. 2010b). La presenza di pool di *Ae. albopictus*, *An. maculipennis* s.l. e di *An. plumbeus* positive per il WNV non significa che queste specie svolgano un ruolo vettoriale rilevante nella circolazione di WNV, in Italia solo raramente queste zanzare sono state trovate positive per WNV (Mancini et al. 2017). Le positività riscontrate, potrebbero essere dovute alla persistenza di pasti di sangue non ancora digeriti o all'infezione di un esemplare non necessariamente in grado poi di trasmettere il virus con la puntura. La competenza vettoriale di zanzara tigre è stata confermata in laboratorio (Fortuna et al. 2015, Brustolin et al. 2016, Holicki et al. 2020), ma vista la sua spiccata antropofagia, è difficile ipotizzare che possa contribuire maniera rilevante alla circolazione del virus. Sembra più probabile possa avere un ruolo come vettore ponte, come del resto già ipotizzato (Fortuna et al. 2015, Holicki et al. 2020). Nuovi esperimenti di competenza vettoriale potrebbero aiutare a chiarire il ruolo di queste zanzare nella circolazione del virus.

Meno frequente è stata la rilevazione di sequenze relative a due ISF ottenuta solo nel 2021, con l'individuazione del Marisma virus, precedentemente isolato in Spagna (Vázquez et al. 2012) e già rilevato nel Nord Italia, anche in Emilia-Romagna (Calzolari et al. 2010a), sempre da *Ae. caspius*, come in questo studio. Il secondo è un virus rilevato in Italia (Rizzo et al. 2014, Cerutti et al. 2012) e nella Repubblica Ceca in *Ae. vexans* e *Ae. caspius* (Calzolari et al. 2012), e potenzialmente ascrivibile anche a sequenze integrata nel genoma della zanzara (Rizzo et al. 2014). Gli ISF sono sempre più rilevati attraverso la sorveglianza entomologica in tutto il mondo (Calzolari et al. 2016), pertanto, non sorprende che siano stati rilevati anche nell'ambito di questo studio. In effetti, la loro presenza non sembra costituire un problema sanitario, poiché sembrano essere virus esclusivi delle zanzare (Calzolari et al. 2012). Tuttavia, la caratterizzazione del loro ciclo e la possibile interazione con gli *Orthoflavivirus* patogeni nel vettore, meritano maggiori approfondimenti sperimentali.

I nostri risultati evidenziano la persistenza temporale e la diffusione del TAHV in gran parte del territorio indagato; ciò conferma la persistenza nel tempo del virus in Emilia-Romagna (Calzolari et al. 2023). I pool positivi al TAHV sono stati probabilmente sottostimati nel 2021, poiché il protocollo Pan-orthobunyavirus non offre le stesse prestazioni di una PCR specifica in termini di sensibilità. L'implementazione del protocollo di real-time PCR messo a punto, ha mostrato buone prestazioni in termini di sensibilità e specificità e la sua applicazione ha anche permesso di stimare il numero di copie virali per i pool di zanzare positivi per TAHV. La variabilità della quantità di virus in una zanzara – che è stata caratterizzata nel range di 3-4 logaritmi in un contesto sperimentale per TAHV (Cai et al. 2023) – non ha permesso di stimare un numero preciso di zanzare infette per pool. Al contrario di WNV e USUV, il TAHV è stato identificato in diverse specie di zanzare, principalmente del genere *Aedes*: *Ae. caspius*, *Ae. vexans* e in un pool di *Ae. albopictus*, ma anche nelle zanzare del complesso *Maculipennis* ed in *Cx. pipiens*. Sebbene il rilevamento del virus in una specie non possa essere considerato una prova della sua competenza

vettoriale, questi risultati potrebbero essere spiegati presupponendo un'ampia plasticità ecologica del virus, vale a dire la capacità del virus di essere trasmesso da diverse zanzare e di infettare diversi ospiti in diversi habitat e regioni ecogeografiche. I principali vettori di TAHV sono le zanzare che si nutrono preferenzialmente sui mammiferi, e del resto sono proprio i mammiferi a essere ritenuti i principali serbatoi. Le lepri e i conigli sono identificati come i principali ospiti amplificatori nell'Europa centrale entrambi considerati altamente suscettibili al TAHV, poiché possono sviluppare una viremia di lunga durata in grado di infettare i vettori (Mravcová et al. 2023) (Bardos e Danielova 1959, Bardos 1975). Un'elevata sieroprevalenza è stata però riscontrata in diversi mammiferi, come cervi e cinghiali (Hubálek et al. 1993, Halouzka et al. 2008, Camp et al. 2018), pecore (Juricová et al. 1986), orsi (Madić et al. 1993), cavalli e animali domestici (Stevanovic et al.2022). Il possibile coinvolgimento di specie diverse nel mantenimento del virus nei focolai naturali non può essere escluso a priori. Sebbene diversi uccelli selvatici siano risultati positivi al TAHV mediante metodi sierologici (Juřicová et al. 1998, Juřicová et al. 2000), sembrano non essere coinvolti nella circolazione e nel ciclo ecologico del virus (Simkova et al 1962). In ogni caso, questi dati sembrano indicare un certo grado di plasticità nel ciclo del TAHV: ad esempio, studi sierologici precedenti hanno ipotizzato il ruolo di roditori e insettivori come serbatoi nel nord Italia (Le Lay Rogues et al. 1983). Il possibile coinvolgimento di questi animali e di diverse specie di animali domestici come ospiti occasionali e locali è già stato suggerito (Labuda 2001), e l'importanza relativa delle diverse specie nelle diverse aree richiede indagini più approfondite. Dato che il ciclo di TAHV potrebbe coinvolgere animali diversi in aree diverse, uno sforzo per chiarirlo dovrebbe essere fatto in particolare in Nord Italia, visto che la letteratura disponibile riguarda in prevalenza l'Europa centro-orientale, e per quest'area esiste un unico studio che risale al 1983 (Le Lay Rogues et al. 1983). A questo scopo sarà necessario organizzare studi sul campo che prevedano di effettuare test sierologici e test diretti su un ampio numero di specie selvatiche. A questo scopo potrà essere utile, dopo una opportuna validazione, sfruttare il

protocollo messo a punto per rilevare il TAHV negli insetti, anche nei vertebrati. Si potrà anche valutare, con la collaborazione dei colleghi degli ospedali, la possibile presenza di casi umani. A questo scopo, sarà importante valutare se la real-time PCR messa a punto in questo studio potrà essere utilizzata anche per i campioni umani, intraprendendo un adeguato percorso di validazione del protocollo in quest'ambito.

La zanzara con il più alto numero di pool positivi per TAHV nell'area indagata è stata *Ae. caspius*, specie che ha mostrato anche la maggiore carica virale mediana per pool e dalla quale è stato possibile isolare il virus. Questo risultato suggerisce che *Ae. caspius*, come già ipotizzato (Calzolari et al. 2022, Calzolari et al. 2023), sia il principale vettore di TAHV nell'area di studio, al contrario di quanto osservato in Europa centrale dove questo ruolo è ricoperto da *Ae. vexans* (Labuda 2021). È interessante notare che TAHV è stato rilevato in un pool di *Ae. albopictus*, e questo potrebbe indicare la competenza della zanzara tigre per questo virus, anche se in precedenti studi sperimentali era stata evidenziata una bassa capacità di vettore e nessuna trasmissione verticale (Bellini et al. 2021). Ulteriori studi sperimentali sulla competenza vettoriale di *Ae. albopictus* e altre specie aiuteranno a caratterizzare il ciclo del TAHV.

Il TAHV è stato rilevato anche in pool di *Cx. pipiens*, come già riportato (Arvan et al 1974), anche se con un basso numero di copie di genoma virale. Data la marcata ornitofilia di *Cx. pipiens*, questo risultato suggerisce l'importanza di indagare meglio il possibile ruolo degli uccelli nella trasmissione del virus. Inoltre, la presenza di tre diversi arbovirus (USUV, WNV, TAHV) in due pool di *Cx. pipiens*, potrebbero indicare la presenza di *hot spot* di trasmissione arbovirale, in cui questi virus circolano contemporaneamente. Questa ipotesi è supportata dall'origine di questi pool, campionati in due siti vicini, nell'area con la circolazione di WNV più intensa. Si tratta di un risultato inatteso, considerando che i cicli di questi virus coinvolgono animali e vettori diversi, e suggerisce l'esistenza di particolari condizioni ambientali in grado di favorire la circolazione di arbovirus ecologicamente diversi in un particolare ambiente.

Il genoma TAHV ottenuto ha permesso di valutare la relazione tra il virus isolato in Italia e i ceppi precedentemente isolati. Tutti i genomi disponibili sono stati ottenuti da ceppi isolati da zanzare, principalmente nell'ex Cecoslovacchia dal 1958 al 1964. La grande maggioranza dei ceppi è stata isolata da *Ae. vexans*, ma il ceppo italiano è stato isolato anche da *Ae. caspius*, confermando la capacità di TAHV di sfruttare diverse zanzare come vettore. L'analisi filogenetica basata sulle sequenze complete dei segmenti ha raggruppato tutti i ceppi europei, caratterizzati da un genoma altamente conservato, in un clade ben supportato, mentre gli isolati cinesi sono raggruppati in un ramo diverso. L'alto tasso di identità registrato con ceppi isolati più di 50 anni fa, che rappresenta un periodo significativo per l'evoluzione virale, sembra confermare la stabilità genomica di questo virus (Bennet et al. 2011, Camp et al. 2021), probabilmente legata ad un alto livello di adattamento di TAHV alla sua nicchia ecologica.

In Italia non sono mai stati segnalati casi umani di TAHV, ma la diffusione del virus osservata nel presente studio suggerisce che il TAHV possa essere considerato un possibile agente eziologico nei casi di malattie simil-influenzali estive senza una diagnosi certa. Questo virus può anche essere agente eziologico di meningite o di altre malattie caratterizzate dal coinvolgimento del sistema nervoso centrale (Labuda 2021), e spesso anche queste sindromi possono rimanere non diagnosticate. La sieropositività al virus è stata registrata in passato nell'uomo in diverse regioni d'Italia, anche con valori elevati (Verani et al. 1979). Pertanto, anche considerando i limiti di specificità dei test sierologici, sarebbe utile avviare un'indagine siero-epidemiologica per valutare la presenza di TAHV nell'uomo, in particolare nelle aree dove è stato rilevato.

Nonostante la grande diffusione geografica del SINV, che va dai paesi Scandinavi al Sud Africa all'Oceania, questo virus non è stato rilevato nel presente studio (Ayhan et al. 2022). La mancata rilevazione del SINV sembra indicare, quantomeno, una sua limitata diffusione, anche se sono necessarie ulteriori indagini per escluderne definitivamente la potenziale presenza.

Nell'ambito di questo studio è stato catturato un numero importante di flebotomi, provenienti in particolare dalle zone collinari delle province di Bologna e Forlì-Cesena. In queste aree persistono densità di flebotomi ragguardevoli, sostenute principalmente dalla specie *Ph. perfiliewi*, che è molto più abbondante di *Ph. perniciosus*, come già evidenziato in altri lavori nella stessa area (Corradetti 1962, Calzolari et al. 2019). Queste grandi abbondanze di *Ph. perfiliewi* sono peculiari di alcune aree di questa zona e di alcune altre aree del Centro Italia. L'identificazione di specie ha permesso di evidenziare come il *Ph. perfiliewi* sia preponderante nelle zone collinari e nella parte orientale della regione, mentre spostandosi verso la pianura e verso la parte occidentale della regione, dove le densità dei flebotomi sono però minori, *Ph. perniciosus* diventi più abbondante ed in alcuni siti prevalente.

Esiste inoltre una grande differenza, in termini di abbondanza, fra i campioni collinari e quelli di pianura. Del resto, la pianura era considerata fino a tempi recenti, un ambiente ostile ai flebotomi. Questo studio ha confermato una tendenza, già osservata negli ultimi anni, con l'aumento del numero di questi insetti in pianura, fino al raggiungimento di abbondanze ragguardevoli, un cambiamento forse legato al cambiamento climatico.

Le grandi densità in ambiente collinare sembrano legate inversamente alla piovosità (Pampiglione et al. 1974, Calzolari et al. 2021), all'aumento della piovosità si assiste ad un calo dei flebotomi catturati. In effetti, il numero di flebotomi rilevato nel 2023, anno più piovoso, in molti siti monitorati per entrambe le stagioni, è stato minore di quello rilevato nel 2022 ed in generale la stagione 2023 è stata meno produttiva di quella del 2022. Esistono però alcune notevoli eccezioni (per esempio zona intorno a Forlì), con siti che sono stati più produttivi nel 2023, suggerendo la presenza di fattori locali difficilmente individuabili che determinano l'abbondanza stagionale di questi insetti.

Durante questo studio abbiamo registrato la presenza di almeno 7 diversi *Phlebovirus*, confermando l'abbondante presenza e circolazione di questi virus nell'area di studio (Calzolari et

al. 2018). Oltre al noto TOSV, è stato rilevato il Corfou virus, isolato per la prima volta in Grecia nel 1981 (Rodhain et al 1985), il FERV, isolato per la prima volta nelle Marche nel 2012 (Remoli et al. 2014) ed il Punique virus, isolato per la prima volta in Tunisia (Zhioua et al. 2010) e che non era ancora stato rilevato sulla sponda nord del Mediterraneo. Inoltre, sono stati rilevati i virus del gruppo Ponticelli, anche se non sono stati tipizzati ulteriormente, visto che questi tre virus differiscono per il segmento M. Abbiamo anche rilevato sequenze riferibili a due virus non ancora isolati ma già rilevati in passato in Emilia-Romagna nei flebotomi (Calzolari et al. 2018). Questa grande varietà di virus che si è possibile rilevare nei flebotomi è sorprendente, ed è probabile sia in larga parte legata all'alto tasso di mutazione osservabile in questi virus (Daoudi et al. 2023).

Questi virus sono stati rilevati attraverso un protocollo non specifico, questo pone un limite intrinseco alla sensibilità di rilevazione, suggerendo che questi virus siano più diffusi. L'utilizzo di protocolli in real-time PCR specifici per il TOSV e il FERV ha effettivamente consentito di registrare numeri di pool positivi molto più alti di quanto non evidenziato con la PCR Pan-phlebovirus seguita da sequenziamento.

Tra i virus rilevati, l'unico riconosciuto come patogeno per l'uomo è il TOSV, che ha la capacità di causare infezioni neuroinvasive. Effettivamente il numero di casi di meningoencefalite estiva dovuti a TOSV registrato in Emilia-Romagna è molto rilevante: sono stati riportati 62 casi nel 2023 (<https://www.epicentro.iss.it/arbovirosi/dashboard-2023>), tanto che la nostra regione risulta quella con un maggior numero di casi notificati in Italia (Mellace et al. 2022). Questa situazione risente molto della probabile sotto-notifica nelle altre regioni, visto che l'Emilia-Romagna è l'unica ad includere il TOSV nelle diagnosi differenziali delle meningoencefaliti estive. È anche interessante notare come il numero dei pool positivi per questo virus siano maggiori dove l'abbondanza di flebotomi è maggiore (colline bolognesi e romagnole) e proprio in quest'area si concentrino i casi umani di TOSV. Questa osservazione sembrerebbe indicare come per il TOSV, e probabilmente per i *Phlebovirus* in genere, l'abbondanza dei vettori costituisca un fattore

importante nel determinare l'intensità della circolazione, al contrario di quanto osservabile per WNV e USUV (Calzolari et al. 2020).

Gli altri *Phlebovirus* rilevati non sono stati chiaramente associati a malattie nell'uomo, sebbene ci siano alcune osservazioni che facciano sospettare un loro potenziale patogeno. Per esempio, il FERV, che è stato il *Phlebovirus* più rilevato, ha dato positività in siero-neutralizzazione in capre e pecore (Lelli et al. 2021). In Lombardia sono inoltre state osservate sierconversioni al virus Ponticelli II in persone malate (Percivalle et al. 2021). Queste sierconversioni sono state riscontrate solo nei confronti del virus Ponticelli II, e non verso gli altri due virus, Ponticelli I e virus Ponticelli III, che differiscono dal primo per il segmento M. Ciò evidenzia l'importanza del segmento M nel definire la capacità di questi virus di infettare i vertebrati e la capacità di riassortire questo segmento è probabilmente un fattore importante nel determinare l'evoluzione e la patogenicità dei *Phlebovirus*, simile a quello osservato con i virus del genere *Orthobunyavirus* (Briese et al. 2006, Gerrard et al. 2004). La stretta vicinanza di questi *Phlebovirus* rilevati nello stesso sito offre probabilmente loro l'opportunità di riassorbirsi tra loro.

Quanto ottenuto nel presente studio dimostra quanto i flebotomi possano ospitare una varietà di virus, in stretta coesistenza spaziale e temporale. La definizione dei cicli di questi virus e delle possibili interazioni tra loro porterebbe a una migliore comprensione di questo quadro complesso, consentendo anche di chiarire la loro possibile patogenicità per l'uomo e gli animali. Per definire il ciclo di questi virus è però ancora necessario un importante sforzo sperimentale che ne possa chiarire i meccanismi di persistenza nell'ambiente.

## CONCLUSIONI

Il presente studio dimostra come la sorveglianza entomologica, se applicata con un adeguato sforzo di campionamento, fornisca un quadro preciso della diffusione e dell'intensità della circolazione

di un dato arbovirus nell'area sorvegliata. Nel complesso questi risultati supportano la necessità di mantenere un ampio sistema di sorveglianza entomologica, organizzato per individuare non solo i virus noti per essere presenti nelle aree studiate (WNV per esempio), ma anche altri possibili arbovirus di rilevanza sanitaria, possibilmente attraverso l'applicazione di protocolli specifici per la loro rilevazione.

L'isolamento degli arbovirus rilevati ha reso disponibili ceppi virali che potranno essere utilizzati per test di sieroneuralizzazione e per mettere a punto nuovi test diagnostici, diretti e indiretti, per la diagnosi delle potenziali patologie che possono provocare nell'uomo e negli animali. L'applicazione di queste metodiche potrà aiutare a chiarire il ciclo epidemiologico di questi virus, per molti versi non ancora completamente caratterizzato.

Chiarita la presenza dei virus rilevati in questo studio sul territorio, è ora importante riuscire a caratterizzare la loro patogenicità, se non nota, e la possibilità che questi possano causare malattia nell'uomo o negli animali. Di certo il rilevamento continuo durante il periodo di studio di TAHV nell'area di studio implica la circolazione del virus, e quindi la possibilità che possa essere causa di sindromi simil-influenzali estive. Non si può nemmeno escludere che anche uno dei *Phlebovirus* individuati, oltre al TOSV, possa avere qualche capacità patogena. Visto l'ampio numero di casi di febbri estive e meningoencefaliti in cui l'eziologia rimane sconosciuta, è importante prendere in considerazione questi virus come possibile causa di forme neuro-invasive nella diagnosi differenziale, anche se va precisato che questi sintomi possono essere il segno di molte infezioni da arbovirus (Kallio-Kokko et al. 2005) o di altre malattie virali. La stretta collaborazione, ormai stabilita ed in fase di consolidamento, fra le diverse professionalità (biologi, medici, veterinari, entomologi, zoologi, virologi, epidemiologi, decisori delle strategie di prevenzione etc.) coinvolte nella sorveglianza degli arbovirus consentirà di caratterizzare, in maniera sempre più precisa, la rilevanza di questi patogeni sulla salute di uomo e animali.

## **RINGRAZIAMENTI**

Vorrei ringraziare tutti coloro che hanno reso possibile il presente studio con il loro lavoro ed in particolare Michele Dottori, per lo sforzo organizzativo, chi ha campionato sul campo, Emanuele Callegari, Annalisa Grisendi, Martina Munari, Simone Russo, Danilo Sgura, Antonio Giannini, Gastone Dalmonte, Mara Scremin; Katia Marzani e Deborah Torri per la loro eccellente assistenza di laboratorio. Questa ricerca è stata parzialmente supportata dai finanziamenti dell'UE nell'ambito dell'iniziativa di partenariato esteso NextGenerationEU-MUR PNRR sulle malattie infettive emergenti (Progetto n. PE00000007, INF-ACT) e dal Piano Regionale di Sorveglianza e controllo delle Arbovirosi dell'Emilia-Romagna (DGR N. 531, 11/04 /2022).

## BIBLIOGRAFIA

- Alkan C, Alwassouf S, Piorkowski G, Bichaud L, Tezcan S, Dincer E, et al. Isolation, genetic characterization, and seroprevalence of Adana virus, a novel phlebovirus belonging to the Salehabad virus complex, in Turkey. *J Virol*. 2015;89(8):4080–91.
- Alkan C, Erisoz Kasap O, Alten B, de Lamballerie X, Charrel RN. Sandfly-borne Phlebovirus isolations from Turkey: new insight into the sand fly fever Sicilian and sand fly fever Naples species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3): e0004519.
- Amaro F, Zé-Zé L, Alves MJ, Börstler J, Clos J, Lorenzen S, Becker SC, Schmidt-Chanasit J, Cadar D. Co-circulation of a novel phlebovirus and Massilia virus in sandflies, Portugal. *Virol J*. 2015 Oct 24;12:174. doi: 10.1186/s12985-015-0407-0.
- Arcan P, Topciu V, Rošiu N, Csaky N. Isolation of Ťahyňa virus from *Culex pipiens* mosquitoes in Romania. *Acta Virol*. 1974; 18:175
- Aspöck H, Kunz C Isolierung des Tahyna-Virus aus Stechmücken in Österreich. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1966; 18:8–15
- Ayhan N, Alten, B, Ivovic V, Dvořák V, Martinkovic F, Omeragic J, Stefanovska J, Petric D, Vaselek S, Baymak D, et al. Direct evidence for an expanded circulation area of the recently identified Balkan virus (Sandfly fever Naples virus species) in several countries of the Balkan archipelago. *Parasites Vectors* 2017, 10, 402.
- Ayhan N, Charrel R. Emergent Sand Fly–Borne Phleboviruses in the Balkan Region. *Emerg Infect Dis*. 2018 Dec; 24(12): 2324–2330. doi: 10.3201/eid2412.171626
- Ayhan N, Hachid A, Thirion L, Benallal KE, Pezzi L, Khardine FA, Benbetka C, Benbetka S, Harrat Z, Charrel R. Detection and Isolation of Sindbis Virus from Field Collected Mosquitoes in Timimoun, Algeria. *Viruses*. 2022 Apr 25;14(5):894. doi: 10.3390/v14050894

- Balducci M, Verani P, Lopes MC, Saccà G, Gregorig B (1968). Isolation of Tahyna virus from *Aedes* mosquitoes in Northern Italy (Gorizia Province). *Acta Virol.* 1968 Sep;12(5):457-9.
- Bárdos V (The ecology and medical importance of the Tahyna Virus), *MMW Munch Med Wochenschr.* 118 1976.
- Bárdos V, Adamcova J, Balat F, Hudec K. The study of natural focal character of the "Tahyna" virus by serological examinations of birds. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1960 ;4:282-6.
- Bárdos V, Danielová V. The Tahyna virus—a virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 1959 3, 264–276.
- Bárdoš V, Ryba J, Hubálek Z. Isolation of Ťahyňa virus from field-collected *Culiseta annulata* (Schrk.) larvae. *Acta Virol.* 1975;19:446
- Bardos V, The role of mammals in the circulation of Tahyna virus, *Folia Parasitol (Praha).* 22 1975.
- Barzon L, Pacenti M, Montarsi F, Fornasiero D, Gobbo F, Quaranta E, Monne I, Fusaro A, Volpe A, Sinigaglia A, Riccetti S, Molin ED, Satto S, Lisi V, Gobbi F, Galante S, Feltrin G, Valeriano V, Favero L, Russo F, Mazzucato M, Bortolami A, Mulatti P, Terregino C, Capelli G. Rapid spread of a new West Nile virus lineage 1 associated with increased risk of neuroinvasive disease during a large outbreak in northern Italy, 2022: One Health analysis. *J Travel Med.* 2022 Nov 4:taac125. doi: 10.1093/jtm/taac125
- Barzon L. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *J Clin Virol.* 2018 Oct;107:38-47. doi: 10.1016/j.jcv.2018.08.007.
- Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Madon MB, Dahl C, Kaiser A. Mosquitoes Identification, Ecology and Control. New York: Kluwer Academic Publishers. 2020
- Bella A, Venturi G, Riccardo F, Iapaolo F, Monaco F, Calistri P. Sorveglianza integrata del West Nile e Usutu virus Bollettino N. 19 del 25 novembre 2021 Risultati Nazionali. ISS, 2021.

- Bella A, Venturi G, Riccardo F, Iapaolo F, Monaco F, Calistri P. Sorveglianza integrata del West Nile e Usutu virus Bollettino N. 20 del 2 novembre 2022 Risultati Nazionali. ISS, 2022.
- Bella A, Venturi G, Riccardo F, Iapaolo F, Monaco F, Calistri P. Sorveglianza integrata del West Nilee Usutuvirus 2 Bollettino N. 18 del 9 novembre 2023 Risultati Nazionali. ISS, 2023.
- Bellini, R, Tamassia, MG, Pecorari, M, Pietrosevoli, P, Bartoletti, A, Portolani, M, Rivasi F, Medici, A. Experimental infection of *Aedes albopictus* with Tahyna virus. Third Int. Cong. Vector Ecol, Barcelona, Spain, September 16-21 2001.
- Bellini, R, Veronesi, R, Gentile, G, Pandolfi, N. Optimization of carbon dioxide traps for mosquito monitoring in Italy. 68th Ann Meet Am Mosq Control Assoc; Denver, Colorado, February 16–21, 2002.
- Bennett RS, Gresko AK, Murphy BR, Whitehead SS. Tahyna virus genetics, infectivity, and immunogenicity in mice and monkeys. *Virology*. 2011 Mar 24;8:135. doi: 10.1186/1743-422X-8-135.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D36-42. doi: 10.1093/nar/gks1195.
- Bichaud L, Dachraoui K, Alwassouf S, Alkan C, Mensi M, Piorowski G, et al. Isolation, full genomic characterisation and neutralisation-based human seroprevalence of Medjerda Valley virus, a novel sandfly-borne phlebovirus belonging to the Salehabad virus complex in northern Tunisia. *J Gen Virol.* 2015;97(3):602–10.
- Briese T, Bird B, Kapoor V, Nichol ST, Lipkin WI. Batai and Ngari viruses: M segment reassortment and association with severe febrile disease outbreaks in East Africa. *J. Virology*. 2006, 80, 5627–5630.
- Brustolin M, Talavera S, Santamaría C, Rivas R, Pujol N, Aranda C, Marquès E, Valle M, Verdún M, Pagès N, Busquets N. *Culex pipiens* and *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*)

- populations as vectors for lineage 1 and 2 West Nile virus in Europe. *Med Vet Entomol.* 2016 Jun;30(2):166-73. doi: 10.1111/mve.12164.
- Cai T, Liu R, Jiang Y, Jia N, Jian X, Cheng X, Song F, Guo X, Zhao T. Vector competence evaluation of mosquitoes for Tahyna virus PJ01 strain, a new Orthobunyavirus in China. *Front Microbiol.* 2023 Apr 20;14:1159835. doi: 10.3389/fmicb.2023.1159835.
- Calisher CH, Calzolari M. Taxonomy of Phleboviruses, Emphasizing Those That Are Sandfly-Borne. *Viruses* 2021, 13, 918.
- Calisher CH, Weinberg AN, Muth DJ, Laznick JS. Toscana virus infection in United States citizen returning from Italy. *Lancet* 1987, 1, 165–166.
- Calzolari M, Angelini P, Bolzoni L, Bonilauri P, Cagarelli R, Canziani S, Cereda D, Cerioli MP, Chiari M, Galletti G, Moirano G, Tamba M, Torri D, Trogu T, Albieri A, Bellini R, Lelli D. Enhanced West Nile Virus Circulation in the Emilia-Romagna and Lombardy Regions (Northern Italy) in 2018 Detected by Entomological Surveillance. *Front Vet Sci.* 2020 May 5;7:243. doi: 10.3389/fvets.2020.00243.
- Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Albieri A, Defilippo F, Maioli G, Galletti G, Gelati A, Barbieri I, Tamba M, Lelli D, Carra E, Cordioli P, Angelini P, Dottori M. Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. *PLoS One.* 2010 Dec 15;5(12):e14324. doi: 10.1371/journal.pone.0014324.
- Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Albieri A, Defilippo F, Tamba M, Tassinari M, Gelati A, Cordioli P, Angelini P, Dottori M. Usutu virus persistence and West Nile virus inactivity in the Emilia-Romagna region (Italy) in 2011. *PLoS One.* 2013 May 7;8(5):e63978. doi: 10.1371/journal.pone.0063978
- Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Caimi M, Defilippo F, Maioli G, Albieri A, Medici A, Veronesi R, Pilani R, Gelati A, Angelini P, Parco V, Fabbi M, Barbieri I, Lelli D, Lavazza A,

- Cordioli P, Dottori M. Arboviral survey of mosquitoes in two Northern Italian regions in 2007 and 2008. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2010, 10(9):875-84.
- Calzolari M, Callegari E, Grisendi A, Munari M, Russo S, Sgura D, Giannini A, Dalmonte G, Scremin M, Dottori M. Arbovirus screening of mosquitoes collected in 2022 in Emilia-Romagna, Italy, with the implementation of a real-time PCR for the detection of Tahyna virus. *One Health*. 2023 Dec 26;18:100670. doi: 10.1016/j.onehlt.2023.100670
- Calzolari M, Carra E, Rugna G, Bonilauri P, Bergamini F, Bellini R, Varani S, Dottori M. Isolation and Molecular Typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus perfiliewi* in a Re-Emerging Focus of Leishmaniasis, Northeastern Italy. *Microorganisms* 2019, 7, 644.
- Calzolari M, Chiapponi C, Bellini R, Bonilauri P, Lelli D, Moreno A, Barbieri I, Pongolini, S, Lavazza, A, Dottori, M. Isolation of three novel reassortant phleboviruses, Ponticelli I, II, III, and of Toscana virus from field-collected sand flies in Italy. *Parasites Vectors* 2018a, 11, 84.
- Calzolari M, Ferrarini G, Bonilauri P, Lelli D, Chiapponi C, Bellini R, Dottori M. Co-circulation of eight different phleboviruses in sand flies collected in the Northern Apennine Mountains (Italy). *Infect. Genet. Evol.* 2018, 64, 131–134.
- Calzolari M, Gaibani P, Bellini R, Defilippo F, Pierro A, Albieri A, Maioli G, Luppi A, Rossini G, Balzani A, Tamba M, Galletti G, Gelati A, Carrieri M, Poglayen G, Cavrini F, Natalini S, Dottori M, Sambri V, Angelini P, Bonilauri P. Mosquito, bird and human surveillance of West Nile and Usutu viruses in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2010. *PLoS One*. 2012;7(5):e38058. doi: 10.1371/journal.pone.0038058.
- Calzolari M, Romeo G, Callegari E, Bonilauri P, Chiapponi C, Carra E, Rugna G, Taddei R, Lelli D, Dottori M. Co-Circulation of Phleboviruses and *Leishmania* Parasites in Sand Flies from a Single Site in Italy Monitored between 2017 and 2020. *Viruses*. 2021 Aug 21;13(8):1660. doi: 10.3390/v13081660

- Calzolari M, Russo S, Marzani K, Dalmonte G, Ricchi M, Bonilauri P. Development of a Real-Time PCR Assay for the Detection of the Phlebovirus Fermo Virus. *Viruses*. 2023 Oct 12;15(10):2082. doi: 10.3390/v15102082.
- Calzolari M, Zé-Zé L, Růžek D, Vázquez A, Jeffries C, Defilippo F, Osório HC, Kilian P, Ruíz S, Fooks AR, Maioli G, Amaro F, Tlustý M, Figuerola J, Medlock JM, Bonilauri P, Alves MJ, Šebesta O, Tenorio A, Vaux AGC, Bellini R, Gelbič I, Sánchez-Seco MP, Johnson N, Dottori M. Detection of mosquito-only flaviviruses in Europe. *J Gen Virol*. 2012 Jun;93(Pt 6):1215-1225.
- Calzolari M, Zé-Zé L, Vázquez A, Sánchez Seco MP, Amaro F, Dottori M. Insect-specific flaviviruses, a worldwide widespread group of viruses only detected in insects. *Infect Genet Evol*. 2016 Jun; 40:381-388. doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.032
- Calzolari M. Mosquito-borne diseases in Europe: an emerging public health threat. *Reports in Parasitology* 2016 <http://dx.doi.org/10.2147/RIP.S56780>
- Camp JV, Haider R, Porea D, Oslobanu LE, Forgách P, Nowotny N. Serological surveillance for Tahyna virus (California encephalitis orthobunyavirus, Peribunyaviridae) neutralizing antibodies in wild ungulates in Austria, Hungary and Romania. *Zoonoses Public Health*. 2018 Jun;65(4):459-463. doi: 10.1111/zph.12457
- Camp JV, Kniha E, Obwaller AG, Walochnik J, Nowotny N. The transmission ecology of Tahyna orthobunyavirus in Austria as revealed by longitudinal mosquito sampling and blood meal analysis in floodplain habitats. *Parasit Vectors*. 2021 Oct 30;14(1):561. doi: 10.1186/s13071-021-05061-1
- Carhan A, Uyar Y, Ozkaya E, Ertek M, Dobler G, Dilcher M, et al. Characterization of a sandfly fever Sicilian virus isolated during a sandfly fever epidemic in Turkey. *J Clin Virol*. 2010;48:264–9.

- Cavrini F, Della Pepa ME, Gaibani P, Pierro AM, Rossini G, Landini MP, Sambri V. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J Clin Virol.* 2011 Mar;50(3):221-3.
- Cerutti F, Giacobini M, Mosca A, Grasso I, Rambozzi L, Rossi L, Bertolotti L. Evidence of mosquito-transmitted flavivirus circulation in Piedmont, north-western Italy. *Parasit Vectors.* 2012 May 22;5:99. doi: 10.1186/1756-3305-5-99.
- Charrel RN, Moureau G, Temmam S, Izri A, Marty P, Parola P, et al. Massilia virus, a novel Phlebovirus (Bunyaviridae) isolated from sandflies in the Mediterranean. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009;9:519–30.
- Chippaux A, Rageau J, Mouchet J. Hibernation de l'arbovirus Ťahyňa chez *Culex modestus* Fic. en France. *C R Acad Sci D.* 1970; 270:1648–1650
- Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van de Perre P, Baldet T, Foulongne V, Simonin Y. Usutu virus: A new threat? *Epidemiol Infect.* 2019 Jan;147:e232. doi: 10.1017/S0950268819001213
- Corradetti A. Phlebotomus and leishmaniasis in North-Central Italy (Apennine Region). *Sci. Rep. Ist. Super. Sanità* 1962, 2, 103–109.
- Danielová V, Hájková Z, Kolman JM, Minář J, Smetana A. Results of virological examination of mosquitoes in southern Moravia, 1962–64. *Česk Epidemiol Mikrobiol Imunol* 1966; 15:178–184 (in Czech)
- Danielová V, Minář J. Experimental overwintering of the virus Ťahyňa in mosquitoes *Culiseta annulata* (Schrk.) (Diptera, Culicidae). *Folia Parasitol.* 1969 16:285–287
- Danielová V, Ryba J. Laboratory demonstration of transovarial transmission of Ťahyňa virus in *Aedes vexans* and the role of this mechanism in overwintering of this arbovirus. *Folia Parasitol.* 1979; 26:361–368

- Danielová V. Relationships of mosquitoes to Ťahyňa virus as determinant factors of its circulation in nature. *Stud ČSAV (Praha)*. 1992; 3:1–102
- Daoudi M, Romeo G, Marzani K, Petrella A, Bonilauri P, Lelli D, Boumezzough A, Boussaa S, Dottori M, Calzolari M. New Isolation of Ponticelli III Virus (Bunyavirales: Phenuiviridae) in Emilia-Romagna Region, Italy. *Viruses*. 2023 Feb 2;15(2):422. doi: 10.3390/v15020422.
- Del Amo J, Sotelo E, Fernández-Pinero J, Gallardo C, Llorente F, Agüero M, Jiménez-Clavero MA. A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. *J Virol Methods*. 2013 May;189(2):321-7
- Domanović D, Gossner CM, Lieshout-Krikke R, Mayr W, Baroti-Toth K, Dobrota AM, Escoval MA, Henseler O, Jungbauer C, Liumbruno G, Oyonarte S, Politis C, Sandid I, Vidović MS, Young JJ, Ushiro-Lumb I, Nowotny N. West Nile and Usutu Virus Infections and Challenges to Blood Safety in the European Union. *Emerg Infect Dis*. 2019 Jun;25(6):1050-1057. doi: 10.3201/eid2506.181755
- Ergunay K, Kasap OE, Orsten S, Oter K, Gunay F, Yoldar AZ, et al. Phlebovirus and Leishmania detection in sandflies from eastern Thrace and northern Cyprus. *Parasit Vectors*. 2014;7:575.
- Fares W, Charrel RN, Dachraoui K, Bichaud L, Barhoumi W, Derbali M, et al. Infection of sand flies collected from different biogeographical areas of Tunisia with phleboviruses. *Acta Trop*. 2015;141(Pt A):1–6.
- Fortuna C, Remoli ME, Severini F, Di Luca M, Toma L, Fois F, Bucci P, Boccolini D, Romi R, Ciufolini MG. Evaluation of vector competence for West Nile virus in Italian *Stegomyia albopicta* (=Aedes albopictus) mosquitoes. *Med Vet Entomol*. 2015 Dec;29(4):430-3. doi: 10.1111/mve.12133

- Gerrard SR, Li L, Barrett AD, Nichol ST. Ngari virus is a Bunyamwera virus reassortant that can be associated with large outbreaks of hemorrhagic fever in Africa. *J Virol*. 2004 Aug;78(16):8922-6. doi: 10.1128/JVI.78.16.8922-8926.200
- Gligic A, Adamovic ZR. Isolation of Tahyna virus from *Aedes vexans* mosquitoes in Serbia. *Mikrobiologija*. 1976; 12:119–129
- Gratz, NG. 2006. Vector- and Rodent-Borne Diseases in Europe and North America. Distribution, Public Health Burden, and Control. New York: Cambridge University Press.
- Halouzka J, Juricova Z, Jankova J, Hubalek Z. Serologic survey of wild boars for mosquito-borne viruses in South Moravia (Czech Republic), *Vet Med (Praha)*. 53 2008
- Hannoun C, Panthier R, Corniou B. Isolation of Ťahyňa virus in the South of France. *Acta Virol* 1966, 10:362–364
- Holicki CM, Ziegler U, Răileanu C, Kampen H, Werner D, Schulz J, Silaghi C, Groschup MH, Vasić A. West Nile Virus Lineage 2 Vector Competence of Indigenous *Culex* and *Aedes* Mosquitoes from Germany at Temperate Climate Conditions. *Viruses*. 2020 May 19;12(5):561. doi: 10.3390/v12050561.
- Hubálek Z, Juricová Z, Svobodová S, Halouzka J. A serologic survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech Republic. *J Wildl Dis*. 1993 Oct;29(4):604-7. doi: 10.7589/0090-3558-29.4.604
- Hubálek Z. Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol Res*. 2008 Dec;103 Suppl 1:S29-43. Epub 2008 Nov 23.
- Izri A, Temmam S, Moureau G, Hamrioui B, de Lamballerie X, Charrel RN. Sandfly fever Sicilian virus, Algeria. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:795–7.
- Juricová Z, Hubálek Z, Halouzka J, Sikutová S. Serological examination of songbirds (Passeriformes) for mosquito-borne viruses Sindbis, Tahyna, and Batai in a south Moravian

- wetland (Czech Republic). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009 Jun;9(3):295-9. doi: 10.1089/vbz.2008.0128.
- Juřicová, I. Literák, J. Pinowski, Antibodies to arboviruses in house sparrows (*Passer domesticus*) in the Czech Republic, *Acta Veterinaria Brno.*2000, 69.
- Juricová, J. Mitterpák, J. Prokopic, Z. Hubálek, Circulation of mosquito-borne viruses in large-scale sheep farms in eastern Slovakia, *Folia Parasitol (Praha).* 1986 33.
- Juricová Z, Pinowski J, Literák I, Hahm KH, Romanowski J. Antibodies to alphavirus, flavivirus, and bunyavirus arboviruses in house sparrows (*Passer domesticus*) and tree sparrows (*P. montanus*) in Poland. *Avian Dis.* 1998 Jan-Mar;42(1):182-5. PMID: 9533098
- Kallio-Kokko H, Uzcatogui N, Vapalahti O, Vaheri A. Viral zoonoses in Europe. *FEMS Microbiol Rev.* 2005 Nov;29(5):1051-77.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* 2019 Jul 19;20(4):1160-1166. doi: 10.1093/bib/bbx108.
- Kolman JM, Málková D, Nemeč A, Smetana A, Hájková Z, Minář J. The isolation of the Ťahyňa virus from the mosquito *Aedes vexans* in southern Moravia. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1964; 8:380–386
- Kondratieff B.C. *Biology of Disease Vectors.* Elsevier Science 2004
- Kuhn JH, Adkins S, Alioto D, Alkhovsky SV, Amarasingh GK, Anthony SJ, Avšič-Županc T, Ayllón MA, Bahl, J, Balkema-Buschmann, A, et al. 2020 taxonomic update for phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. *Arch. Virol.* 2020, 165, 3023–3072.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018 Jun 1;35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.

- Kuno G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J Virol Methods*. 1998 May;72(1):27-41.
- Labuda, Tahyna virus, p 482–483. In Service MW (ed), *The Encyclopedia of arthropod-transmitted infections*. CABI Publishing (CABI International), Wallingford, UK (2001)..
- Lambert AJ, Lanciotti RS. Consensus amplification and novel multiplex sequencing method for S segment species identification of 47 viruses of the Orthobunyavirus, Phlebovirus, and Nairovirus genera of the family Bunyaviridae. *J Clin Microbiol*. 2009 Aug;47(8):2398-404.
- Lambert AJ, Hughes HR. Clinically Important Phleboviruses and Their Detection in Human Samples. *Viruses* 2021, 13, 1500.
- Lavazza A, Pascucci S, Gelmetti D. Rod-shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. *Vet Rec*. 1990;126:581
- Le Lay-Roguès G, Valle M, Chastel C, Beaucournu JC. Small wild mammals and arboviruses in Italy. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 1983 Aug-Oct;76(4):333-45.
- Lelli D, Scanferla V, Moreno A, Sozzi E, Ravaioli V, Renzi M, Tosi G, Dottori M, Lavazza A, Calzolari M. Serological Evidence of Phleboviruses in Domestic Animals on the Pre-Apennine Hills (Northern Italy). *Viruses*. 2021 Aug 10;13(8):1577. doi: 10.3390/v13081577.
- Lundström JO. Mosquito-borne viruses in western Europe: a review. *J Vector Ecol*. 1999 Jun;24(1):1-39.
- Lvov DK, Gromashevsky VL, Sidorova GA, Tsyarkin YM, Chervonsky VI, Aristova VA Isolation of Ťahyňa virus from *Anopheles hyrcanus* mosquitoes in Kyzyl-Agach Preserve, SE.-Azerbaijan. *Vopr Virusol*. 1972; 17:18–21 (in Russian)
- Lvov DK, Klimenko SM, Gaidamovich SYA (eds) *Arboviruses and arbovirus infections*. Medicina, Moskva, 1989 (in Russian)
- Lvov SD, Gromashevsky VL, Bogoyavlensky GV, Bayluk FN, Skvortsova TM, Kondrashina NG, Kandaurov EK. Isolation of Zaliv Terpeniya, Uukuniemi and Ťahyňa-like viruses from

mosquitoes collected in tundra, forest-tundra and northern taiga of the Kola and Taimyr peninsulae and the middle taiga of Karelia. *Med Parazitol.* 1987 65(6):40–43 (in Russian)

Lvov SD, Gromashevsky VL, Skvortsova TM, Sokolova NG, Andronova ON, Semenov VB, Makhlin PI, Kondrashina NG, Bystrova EA, Gushchina EA, Morozova TN, Kuznetsov AA, Galkina IV, Yamnikova SS, Aristova VA, Avershin AD, Berezin MV Circulation of California serogroup viruses in northwestern Russian plateau. *Med Parazitol.* 1989; 6:74–77 (in Russian)

Madić, D. Huber, B. Lugović, Serologic survey for selected viral and rickettsial agents of brown bears (*Ursus arctos*) in Croatia, *J Wildl Dis.* 29 (1993).

Mancini G, Montarsi F, Calzolari M, Capelli G, Dottori M, Ravagnan S, Lelli D, Chiari M, Santilli A, Quaglia M, Quaglia M, Federici V, Monaco F, Goffredo M, Savini G. Mosquito species involved in the circulation of West Nile and Usutu viruses in Italy. *Vet Ital.* 2017 Jun 30;53(2):97-110. doi: 10.12834/VetIt.114.933.4764.2

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.* 2013, 27, 123–147.

Mellace F, Del Manso M, Oradini-Alacreu A, Ceccarelli E, Mateo-Urdiales A, Petrone D, Bella A, Caporali MG, Bongiorno G, Bernardini I, Di Luca M, Venturi G, Fortuna C, Giannitelli S, Ferraro F, Maraglino F, Pezzotti P, Riccardo F e la Rete dei referenti regionali per le arbovirosi. Meningiti, meningoencefaliti ed encefaliti da virus Toscana in Italia, 2016-2021: punta dell'iceberg di una arbovirosi endemica poco conosciuta. *Boll Epidemiol Naz* 2022;3(2):10-19.

Moricon, M, Rugna G, Calzolari M, Bellini R, Albieri A, Angelini P, Cagarelli R, Landini MP, Charrel RN, Varani S. Phlebotomine sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017, 11, e0005660.

- Mravcová K, Camp JV, Hubálek Z, Šikutová S, Vaux AGC, Medlock JM, Rudolf I Tahyna virus-  
A widespread, but neglected mosquito-borne virus in Europe. *Zoonoses Public Health*. 2023  
Aug;70(5):371-382. doi: 10.1111/zph.13042.
- Palacios G, Tesh R, Travassos da Rosa A, Savji N, Sze W, Jain K, Serge R, Guzman H, Guevara  
C, Nunes MR, et al. Characterization of the Candiru antigenic complex (Bunyaviridae:  
Phlebovirus), a highly diverse and reassorting group of viruses affecting humans in tropical  
America. *J. Virol*. 2011, 85, 3811–3820.
- Pampiglione S, La Placa M, Schlick G. Studies on mediterranean Leishmaniasis. I. An outbreak  
of visceral leishmaniasis in Northern Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1974;68(5):349-59.  
doi: 10.1016/0035-9203(74)90148-5
- Papa A, Konstantinou G, Pavlidou V, Antoniadis A. Sandfly fever virus outbreak in Cyprus. *Clin  
Microbiol Infect*. 2006;12:192–4.
- Papa A, Velo E, Bino S. A novel phlebovirus in Albanian sandflies. *Clin Microbiol Infect*.  
2011;17(4):585–7.
- Paré J, Moore A. West Nile virus in horses — What do you need to know to diagnose the disease?  
*Can Vet J*. 2018 Oct;59(10):1119–1120.
- Percivalle E, Cassaniti I, Calzolari M, Lelli D, Baldanti F. Thirteen Years of Phleboviruses  
Circulation in Lombardy, a Northern Italy Region. *Viruses* 2021, 13, 209.
- Pérez-Ruiz M, Collao X, Navarro-Marí JM, Tenorio A. Reverse transcription, real-time PCR  
assay for detection of Toscana virus. *J Clin Virol*. 2007 Aug;39(4):276-81. doi:  
10.1016/j.jcv.2007.05.003.
- Pérez-Ramírez E, Llorente F, Jiménez-Clavero MÁ. Experimental infections of wild birds with  
West Nile virus. *Viruses*. 2014 Feb 13;6(2):752-81. doi: 10.3390/v6020752

- Peyrefitte CN, Grandadam M, Bessaud M, Andry PE, Fouque F, Caro V, et al. Diversity of *Phlebotomus perniciosus* in Provence, southeastern France: detection of two putative new phlebovirus sequences. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13(9):630–6.
- Pilaski J, Mackenstein H. Nachweis des Tahyna-Virus bei Stechmücken in zwei verschiedenen europäischen Naturherden. *Zentralbl Bakteriolog.* 1985; 180:394–420
- Remoli ME, Fortuna C, Marchi A, Bucci P, Argentini C, Bongiorno G, et al. Viral isolates of a novel putative phlebovirus in the Marche region of Italy. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(4):760–3.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A; CHIKV study group. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet.* 2007 Dec 1;370(9602):1840–6. doiR10.1016/S0140-6736(07)61779-6.
- Rizzo F, Cerutti F, Ballardini M, Mosca A, Vitale N, Radaelli MC, Desiato R, Prearo M, Pautasso A, Casalone C, Acutis P, Peletto S, Mandola ML. Molecular characterization of flaviviruses from field-collected mosquitoes in northwestern Italy, 2011–2012. *Parasit Vectors.* 2014 Aug 26;7:395.
- Rodhain F, Madulo-Leblond G, Hannoun C, Tesh RB. Le virus corfou: Un nouveau Phlebovirus isolé de phlébotomes en Grèce. *Ann. L'institut Pasteur Virol.* 1985, 136, 161–166.
- Rosický B, Málková D (eds) Ťahyňa virus natural focus in southern Moravia. *Rozpravy ČSAV (Praha), Mat Přír Věd.* 1980; 90(7):1–107.
- Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol.* 2001 May;39(5):1922–7.

- Service, MW (Ed). The Encyclopedia of Arthropod-transmitted Infections. CABI Publishing (CABI International), 2001.
- Severini F, Toma L, Di Luca M, Romi R. Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti (Diptera, Culicidae). *Fragmenta entomologica* 2009 41: 213–372.
- Simkova A. Tahyna virus in birds *Acta Virol.* 1962 Mar;6:190
- Stevanovic V, Vilibic-Cavlek T, Savic V, Klobucar A, Kovac S, Curman Posavec M, Petrinic S, Bogdanic M, Santini M, Tesic V, de Albuquerque Soares N, Barbic L. Surveillance of Tahyna Orthobunyavirus in Urban Areas in Croatia-The "One Health" Approach. *Trop Med Infect Dis.* 2022 Oct 20;7(10):320. doi: 10.3390/tropicalmed7100320.
- Tang Y, Anne Hapip C, Liu B, Fang CT. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *J Clin Virol.* 2006 Jul;36(3):177-82.
- Tesh RB, Saidi S, Gajdamovic SJ, Rodhain F, et al. Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. *Bull World Health Organ* 1976; 54:663–674
- Traavik T, Mehl R, Wiger R. California encephalitis viruses isolated from mosquitoes collected in southern and arctic Norway. *Acta Path Microbiol Scand B.* 1978, 86:335–341
- Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jul 8;44(W1):W232-5. doi: 10.1093/nar/gkw256.
- Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol.* 2011. M
- Vázquez A, Sánchez-Seco MP, Palacios G, Molero F, Reyes N, Ruiz S, Aranda C, Marqués E, Escosa R, Moreno J, Figuerola J, Tenorio A. Novel flaviviruses detected in different species

of mosquitoes in Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012 Mar;12(3):223-9. doi: 10.1089/vbz.2011.0687.

Verani P, Ciufolini MG, Nicoletti L, Balducci M, Sabatinelli G, ColuzzivM, Paci P, Amaducci L. Ecological and epidemiological studies of Toscana virus, an arbovirus isolated from *Phlebotomus*. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 1982, 18, 397–399.

Verani P, Balducci M, Lopes MC. Arboviruses in Italy. In: *Arctic and tropical arboviruses.* 101-121. Academic Press New York 1979.

World Health Organization. *Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases : report of a WHO scientific group.* WHO, Geneva, 1985

World Health Organization. *The vector-borne human infections of Europe: their distribution and burden on public health.* WHO Europe, 2004, 144pp.

Zannoli S, Sambri V. West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms.* 2019 Jun 26;7(7):184. doi: 10.3390/microorganisms7070184.

Zhioua E, Moureau G, Chelbi I, Ninove L, Bichaud L, Derbali M, et al. Punique virus, a novel phlebovirus, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunisia. *J Gen Virol.* 2010;91:1275–83.

## ARTICOLI PUBBLICATI

- Calzolari M, Bonilauri P, Grisendi A, Dalmonte G, Vismarra A, Lelli D, Chiapponi C, Bellini R, Lavazza A, Dottori M. Arbovirus Screening in Mosquitoes in Emilia-Romagna (Italy, 2021) and Isolation of Tahyna Virus. *Microbiol Spectr.* 2022 Sep 27:e0158722. doi: 10.1128/spectrum.01587-22.
- Calzolari M, Romeo G, Munari M, Bonilauri P, Taddei R, Sampieri M, Bariselli S, Rugna G, Dottori M. Sand Flies and Pathogens in the Lowlands of Emilia-Romagna (Northern Italy). *Viruses.* 2022 Oct 7;14(10):2209. doi: 10.3390/v14102209.
- Daoudi M, Romeo G, Marzani K, Petrella A, Bonilauri P, Lelli D, Boumezzough A, Boussaa S, Dottori M, Calzolari M. New Isolation of Ponticelli III Virus (Bunyavirales: Phenuiviridae) in Emilia-Romagna Region, Italy. *Viruses.* 2023 Feb 2;15(2):422. doi: 10.3390/v15020422.
- Calzolari M, Russo S, Marzani K, Dalmonte G, Ricchi M, Bonilauri P. *Viruses.* Development of a Real-Time PCR Assay for the Detection of the Phlebovirus Fermo Virus. 2023 Oct 12;15(10):2082. doi: 10.3390/v15102082.
- Calzolari M, Callegari E, Grisendi A, Munari M, Russo S, Sgura D, Giannini A, Dalmonte G, Scremin M, Dottori M. Arbovirus screening of mosquitoes collected in 2022 in Emilia-Romagna, Italy, with the implementation of a real-time PCR for the detection of Tahyna virus. *One Health.* 2023 Dec 26;18:100670. doi: 10.1016/j.onehlt.2023.100670.n
- Tamba M, Bonilauri P, Galletti G, Casadei G, Santi A, Rossi A, Calzolari M. West Nile virus surveillance using sentinel birds: results of eleven years of testing in corvids in a region of northern Italy. *Front Vet Sci.* 2024 May 16;11:1407271. doi: 10.3389/fvets.2024.1407271.
- Calzolari M, Mosca A, Montarsi F, Grisendi A, Scremin M, Roberto P, Tessarolo C, Defilippo F, Gobbo F, Casalone C, Lelli D and Albieri A. Distribution and abundance of *Aedes caspius* (Pallas, 1771) and *Aedes vexans* (Meigen, 1830) in the Po Plain (northern Italy). *Parasites and Vectors.* Accettato per la pubblicazione