



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Progetto Ricerca Corrente 2012

N. Identificativo progetto: **IZS LT 0312 RC**

Data scadenza: 29/12/2016

Studio sulle popolazioni di ditteri della famiglia Tabanidae in aree a diversa prevalenza d'infezione del virus dell'Anemia Infettiva Equina (AIE).

Codice Progetto LT0312

Responsabile Scientifico: Claudio De Liberato

*Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali;
Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti*

Relazione Finale

INDICE

ELENCO DEI COLLABORATORI	pag.3
SINTESI	pag.4
SUMMARY	pag.7
INTRODUZIONE	pag.9
L'ANEMIA INFETTIVA EQUINA	pag.9
I TABANIDAE	pag.10
Sistematica	pag.12
Morfologia	pag.12
Biologia	pag.16
SCOPI DELLO STUDIO	pag.18
FASI PROGETTUALI	pag.20
MATERIALI E METODI	pag.21
AREA DI STUDIO	pag.21
CAMPIONAMENTO	pag.23
SMISTAMENTO ED IDENTIFICAZIONE	pag.25
RACCOLTA DATI	pag.26
METODI BIOMOLECOLARI	pag.26
ANALISI STATISTICA	pag.27
RISULTATI	pag.28
RISULTATI ANALISI STATISTICA	pag.41
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag.51
BIBLIOGRAFIA CONSULTATA	pag.56
RACCOMANDAZIONI	pag.62
DIVULGAZIONE RISULTATI	pag.63

ELENCO DEI COLLABORATORI

Adele Magliano, UO1, selezione siti, identificazione tabanidi, raccolta ed elaborazione dati, stesura relazione finale.

Raffaele Frontoso, UO2, selezione siti, stesura relazione finale.

Raniero Lorenzetti, UO3, analisi biomolecolari, stesura relazione finale.

Marcello Sala, UO4, selezione siti, creazione di un dataset, elaborazione statistica dei dati, stesura relazione finale.

Walter Mignone, UO5, selezione siti, stesura relazione finale.

Marco Di Domenico, UO1, selezione siti, effettuazione catture.

Marco Ballardini, UO5, selezione siti, effettuazione catture, identificazione tabanidi, stesura relazione finale.

SINTESI

Studio sulle popolazioni di ditteri della famiglia Tabanidae in aree a diversa prevalenza d'infezione del virus dell'Anemia Infettiva Equina (AIE).

L'anemia infettiva equina (AIE) è un'infezione virale cosmopolita degli equidi, provocata da un virus del genere *Lentivirus*, famiglia Retroviridae. Tutti gli equidi sono sensibili all'infezione. Il virus replica attivamente nei tessuti dell'ospite e può portare a morte l'animale colpito. I principali sintomi che la caratterizzano sono la febbre e una drammatica riduzione del numero di piastrine circolanti. La maggior parte dei soggetti colpiti sopravvive. Gli animali infetti rimangono viremici per tutta la vita e possono costituire fonte di contagio per altri animali recettivi. Gli animali positivi sono soggetti a provvedimenti restrittivi; questa malattia è, infatti, una delle 12 malattie degli equini incluse nella lista OIE ad essere soggette a notifica. In condizioni naturali, la trasmissione del virus è prevalentemente mediata da insetti vettori, principalmente ditteri della famiglia Tabanidae (tafani), in grado di trasmettere l'infezione a seguito della puntura di soggetti in fase acuta d'infezione e successivo pasto di sangue su animali sani. L'incidenza del virus è maggiore nelle stagioni favorevoli all'attività di questi artropodi (estate in Europa), ed è più frequente in regioni a clima caldo-umido. Dal 2007, con l'attuazione del Piano di Sorveglianza Nazionale dell'AIE, è stato possibile evidenziare la diffusione dell'infezione su tutto il territorio nazionale, con un'evidente cluster nelle regioni dell'Italia Centrale.

Il ruolo dei tabanidi come vettori dell'AIE è dimostrato in letteratura; tuttavia, trattandosi di vettori meccanici, la loro rilevanza epidemiologica nella circolazione del virus è oggetto di dibattito. Studi condotti negli Stati Uniti hanno dimostrato che aree ecologicamente più adatte a questi insetti e con popolazioni più abbondanti degli stessi erano interessate da una maggiore incidenza del virus. Evidenze indirette confermano il ruolo di questi insetti come vettori dell'AIE anche nel nostro paese. La massima incidenza del virus infatti viene registrata nella stagione estiva, quella di massima abbondanza ed attività dei tafani, ed in aree caratterizzate da condizioni ecologiche particolarmente favorevoli a questi insetti.

Nonostante in Italia l'anemia Infettiva Equina sia endemica, ad oggi non sono mai stati condotte ricerche riguardanti il ruolo dei tafani come vettori di questo virus. In quest'ambito, è sembrato interessante condurre un progetto di ricerca finalizzato ad una prima valutazione della potenziale rilevanza dei tabanidi come vettori dell'AIE in Italia centrale e Liguria. I dati raccolti hanno permesso di ottenere una prima indicazione su presenza ed abbondanza delle diverse specie dei ditteri della famiglia Tabanidae in aree a differente prevalenza del virus, fornendo una prima indicazione indiretta sulla loro maggiore o minor rilevanza epidemiologica come vettori dell'AIE.

Obbiettivi specifici della presente ricerca erano:

- Ottenere dati su composizione specifica, abbondanza e stagionalità delle popolazioni dei ditteri della famiglia Tabanidae presenti in aree a diversa prevalenza d'infezione del virus dell'AIE;
- Individuare le specie di tafani più frequentemente associate alle aree a circolazione virale;
- Quantificare la frequenza di tafani catturati con residui di sangue sui pezzi boccali;
- Correlare dati entomologici e virologici (anche storici) per una valutazione del rischio legata a presenza ed abbondanza dei vettori meccanici del virus;

- Valutare la rilevanza epidemiologica dei tafani come veicolo di diffusione del virus;
- Produrre un'analisi del rischio legato alla loro presenza ed abbondanza;

Per il campionamento dei tafani, i siti sono stati scelti sulla base di dati riguardanti la circolazione dell'AIE a livello nazionale nel periodo 2007-2013. In provincia di Rieti, Roma ed Imperia sono stati selezionati siti a diversa prevalenza del virus, al fine di poter effettuare un confronto tra le loro popolazioni di tafani. Le catture sono state effettuate nel periodo giugno-ottobre 2014 e giugno-settembre 2015. Nel Lazio le catture dei ditteri della famiglia Tabanidae sono state effettuate con periodicità settimanale, utilizzando trappole modello Horse pal, appositamente ideate per la cattura e il monitoraggio di questi insetti. Per aumentare l'attrattività della trappola, che si basa fundamentalmente su stimolo visivo, veniva aggiunto un attrattivo odoroso a base d'octenolo, sostanza naturalmente presente nell'urina di equini e bovini, che esercita un notevole potere attrattivo nei confronti dei ditteri ematofagi. Durante ciascuna sessione di cattura, le trappole operavano per 48 ore consecutive. In Liguria sono state effettuate catture a cadenza quindicinale utilizzando trappole modello Tabana, anch'essa appositamente disegnata per la cattura dei tafani.

Nelle due stagioni di campionamento, nel territorio del Lazio, sono state effettuate complessivamente 96 catture. I tafani catturati in totale sono stati 18.902. Nei siti di cattura si è registrata la presenza di ditteri della famiglia Tabanidae durante tutto il periodo di campionamento. In entrambe le stagioni le catture più abbondanti sono state registrate nel sito di Posta, sito che è anche risultato quello con la maggior ricchezza di specie. I siti con minore diversità di specie sono stati Santa Lucia di Fiamignano nel 2014 e Sacrofano nel 2015. Sono state identificate complessivamente 40 specie di Tabanidi, appartenenti a 8 generi. Il genere più rappresentato, con 13 specie, è risultato il genere *Tabanus*, dominante anche per quanto riguarda il numero di esemplari catturati. La specie dominante è risultata *Haematopota italica*, seguita da *Atylotus loewianus* e *Tabanus lunatus*. Nel 2014 il mese con maggiore numero di specie è stato Luglio nei siti di Borgorose e Posta, Agosto per Fiamignano e Vallemare. In generale, nei 4 siti esaminati, l'aumento del numero di specie mostra un andamento bimodale, con una flessione che, a seconda del sito, si verifica tra gli inizi di luglio e gli inizi di agosto. Nella stagione 2014 tre siti su quattro mostrano anche un picco secondario in numero di specie verso la fine del periodo di campionamento. Nel 2015, si può evidenziare invece un unico picco nel mese di luglio in tutti i siti, tranne che a Sacrofano, dove il picco è anticipato al mese di giugno. Nel 2014 il picco di abbondanza della popolazione di tafani si è verificato tra luglio ed agosto, con la sola eccezione del sito di Fiamignano, dove il picco è tardo estivo (agosto-settembre). Nel 2015, la stazione di Posta ha mostrato lo stesso andamento stagionale della popolazione di tafani, mentre gli altri tre siti hanno mostrato catture medie piuttosto basse durante tutta la stagione di campionamento. Nella stazione di Posta, la sola campionata in entrambe le stagioni, le catture medie mensili siano state costantemente più basse nel 2015 rispetto al 2014. Con l'eccezione di Borgorose nel 2014 e Vicovaro nel 2015, dove il picco più alto d'abbondanza è stato registrato dalla specie *A. loewianus*, in tutti gli altri siti le catture più alte sono state registrate dalla specie *H. italica*. A Fiamignano nel 2014 questa specie ha presentato il picco massimo d'abbondanza nel mese di settembre, mentre negli altri casi le catture medie mensili più alte sono state sempre registrate ad agosto. La dominanza di *H. italica* appare particolarmente marcata nei siti di Vallemare, Fiamignano, e Posta nel 2014, dove questa specie ha registrato la cattura media mensile più alta in assoluto registrata in questa ricerca. *H. italica* è anche la sola specie che appare tra le prime 5 specie più abbondanti in tutti i siti oggetto di studio. La specie *T. lunatus* mostra una caratteristica fenologia precoce; compare già nelle catture di giugno e mostra il suo picco di abbondanza tra giugno e luglio, per poi decrescere. Le catture effettuate nel 2015 mostrano, in generale, medie mensili nettamente

inferiori rispetto a quelle effettuate nel 2014. Anche nel sito di Posta, campionato in entrambe le stagioni, tutte le specie hanno mostrato abbondanze maggiori nella prima stagione di campionamento, ad eccezione di *T. lunatus* nel mese di giugno.

Nel 2014 è stata effettuata una sessione di cattura particolare nel sito di Posta, con la finalità di catturare esemplari per la ricerca e l'identificazione, con metodi biomolecolari, di sangue residuo sui pezzi boccali. con la finalità di analizzare i residui di sangue sui pezzi boccali, sono stati catturati 1.011 nel sito di Posta. Dal 71,0% degli esemplari testati è stato possibile amplificare DNA proveniente da residui di sangue sui pezzi boccali. Nel 54,9% dei casi il DNA amplificato era in quantità insufficiente per permettere l'identificazione di specie mediante sequenziamento. L'identificazione della specie su cui il tafano aveva effettuato il pasto di sangue, eseguita sui 324 campioni da cui era stata amplificata una sufficiente quantità di DNA, ha dato i seguenti risultati: 301 bovino, 15 cavallo, 5 uomo, 2 capriolo, 1 *Mus musculus*. Tutte le specie di tafano sono risultate positive per la presenza di DNA di ospiti sui pezzi boccali. Le specie del genere *Tabanus* sono risultate positive solo per sangue di bovino. Sui pezzi boccali di *H. italica*, la specie di gran lunga più rappresentata in questa prova, è stato rinvenuto DNA di tutte le specie ospiti identificate durante la prova. DNA di cavallo è stato rinvenuto anche sul genere *Atylotus*.

E-mail: claudio.deliberato@izslt.it

Key words: Anemia Infettiva Equina, Tabanidae, Italy

Citazione: C. De Liberato, A. Magliano: Studio sulle popolazioni di ditteri della famiglia Tabanidae in aree a diversa prevalenza d'infezione del virus dell'Anemia Infettiva Equina (AIE). Ricerca Corrente 2012. Anno Presentazione Relazione: 2016.

SUMMARY

Study on horsefly (Diptera, Tabanidae) populations in areas with different levels of prevalence of Equine Infectious Anaemia virus (EIA)

E-mail: claudio.deliberato@izslt.it

Key words: Equine Infectious Anaemia, Tabanidae, Italy

Reference: C. De Liberato, A. Magliano: Study on horsefly (Diptera, Tabanidae) populations in areas with different levels of prevalence of Equine Infectious Anaemia virus (EIA). Ricerca Corrente 2012. Anno Presentazione Relazione: 2016.

INTRODUZIONE

L'ANEMIA INFETTIVA EQUINA

L'anemia infettiva equina (AIE) è un'infezione virale cosmopolita degli equidi, provocata da un virus del genere *Lentivirus*, famiglia Retroviridae, sottofamiglia Orthoretrovirinae. Tutti gli equidi sono sensibili all'infezione (cavallo, asino, mulo, bardotto). Il virus replica nelle cellule della linea bianca del sangue, in particolare nei macrofagi, integrando il proprio genoma e provocando la persistenza dell'infezione virale nel tempo. Il periodo di incubazione della malattia può andare da 5-7 giorni fino a 3 mesi. Fattori individuali dell'ospite e aggressività del ceppo virale coinvolto condizionano l'andamento dell'infezione, che può assumere decorso: acuto, cronico o inapparente. La forma acuta è caratterizzata da attiva replicazione virale con comparsa di febbre associata a tremori e debolezza muscolare; frequente in questa forma è anche il riscontro di diffuse emorragie puntiformi nella zona sublinguale ed anemia. La malattia acuta si manifesta entro 1-4 settimane dall'infezione. Il virus replica attivamente nei tessuti dell'ospite e può portare a morte l'animale colpito in breve tempo, talvolta, ancor prima della comparsa dei segni clinici; i principali sintomi che la caratterizzano sono la febbre e una drammatica riduzione del numero di piastrine circolanti.

La maggior parte dei soggetti colpiti sopravvive. Quindi, l'infezione può evolvere verso una forma subacuta o cronica, con cicli ricorrenti di febbre associati a depressione, perdita di peso, anemia e comparsa di emorragie puntiformi sulle mucose; gli episodi febbrili sono associati e conseguenti alla riattivazione virale che può essere favorita o da eventi stressanti o da immunosoppressione. Nel tempo, la frequenza e l'intensità delle manifestazioni cliniche diminuiscono e generalmente entro un anno dall'infezione il sistema immunitario dei soggetti colpiti riesce a tenere l'infezione sotto controllo; questa fase è caratterizzata da una limitata replicazione virale con assenza di manifestazioni cliniche. Nei soggetti che sopravvivono agli episodi clinici iniziali si può avere un'evoluzione nella forma cronica caratterizzata da dimagrimento e debilitazione progressiva dell'animale. Gli animali infetti rimangono viremici per tutta la vita e possono costituire fonte di contagio per altri animali recettivi. In considerazione di questo rischio, gli animali positivi sono soggetti a provvedimenti restrittivi; questa malattia è, infatti, una delle 12 malattie degli equini incluse nella lista OIE ad essere soggette a notifica.

In condizioni naturali, la trasmissione del virus è prevalentemente mediata da insetti vettori. Insetti ematofagi, principalmente ditteri della famiglia Tabanidae (tafani) e mosche della specie *Stomoxys calcitrans*, sono in grado di trasmettere l'infezione soprattutto a seguito della puntura di soggetti in fase acuta dell'infezione e successivo pasto di sangue su animali sani. La trasmissione può avvenire anche per via iatrogena e transplacentare; l'impiego di strumenti contaminati (aghi, siringhe e strumenti chirurgici) e le trasfusioni di emoderivati non controllati sono le cause più frequenti; in questi casi l'infezione può anche essere trasmessa da animali con infezione cronica, a causa della quantità di sangue inoculato, superiore rispetto a quella degli insetti. Ma nei periodi a rischio la trasmissione avviene principalmente attraverso la puntura degli insetti, che agiscono da vettori meccanici del virus. L'incidenza del virus è infatti maggiore nelle stagioni favorevoli all'attività di questi artropodi (estate in Europa), ed è più frequente in regioni a clima caldo-umido (da cui il nome di febbre delle paludi). Dal 2007, con l'attuazione del Piano di Sorveglianza Nazionale dell'AIE, è stato possibile evidenziare la diffusione dell'infezione su tutto il territorio nazionale, con un'evidente clusterizzazione nelle regioni dell'Italia Centrale (Abruzzo, Lazio, Molise ed Umbria). Un'analisi del rischio condotta sui dati 2007-2011, ha evidenziato in queste Regioni frequenti nuovi casi d'infezione in animali ed allevamenti precedentemente negativi, fornendo l'evidenza di un'attiva circolazione del virus. Mentre nel circuito dei cavalli sportivi l'infezione si può ritenere sporadica, in ambiente

rurale l'AIE è risultata invece assai diffusa. In particolare è stato possibile evidenziare come categoria a maggior rischio d'infezione gli animali, principalmente muli, ancora oggi utilizzati per il lavoro in aree boschive, utilizzo che potrebbe determinare una loro maggior esposizione ai tabanidi vettori dell'infezione. Nel mulo infatti è stato evidenziato un rischio d'infezione 25-60 volte maggiore rispetto al cavallo.

I TABANIDAE

I Tabanidae sono una famiglia di ditteri del sottordine Brachicera, simili, in aspetto, alle mosche. Hanno distribuzione cosmopolita, ad eccezione di Antartide, Islanda e di alcune isole del Pacifico. Ad oggi, ne sono state descritte circa 3.500 specie, di cui 166, appartenenti a 14 generi, in Europa. Questa famiglia ha un rilevante interesse medico-veterinario, a causa dell'ematofagia delle femmine della maggior parte delle specie.

I tafani sono abitualmente associati ad ambienti aperti di tipo agro/forestale; le specie di maggiore interesse sanitario si rinvencono in aree ad alta vocazione zootecnica, dove sono presenti animali al pascolo o allo stato brado. Le femmine si nutrono soprattutto su grossi mammiferi, principalmente bovini, equini, camelidi, cervidi e suidi. Alcuni generi (es. *Haematopota*) attaccano frequentemente anche l'uomo. In alcune zone tropicali esistono specie che si nutrono su altri tipi di vertebrati (coccodrilli in Africa e tartarughe marine alle Seychelles). I tafani possono provocare danni economici al settore zootecnico sia a causa dello stress causato agli animali dai loro attacchi e punture persistenti sia della possibile trasmissione di agenti patogeni.

I ditteri della famiglia Tabanidae sono vettori meccanici di virus, batteri e protozoi, agenti eziologici di importanti malattie degli animali domestici (es. anemia infettiva equina, leucosi bovina e besnoitiosi). In tutti questi casi l'agente patogeno non compie alcuna parte del suo ciclo biologico nel vettore, ma viene trasmesso meccanicamente per contaminazione delle parti boccali del tafano con sangue infetto. Alcune caratteristiche morfologiche e biologiche dei tafani li rendono vettori meccanici particolarmente competenti:

- 1) apparato boccale: di tipo pungitore/lambente, caratterizzato da mandibole e mascelle a forma di lama, con cui l'insetto incide la cute dell'ospite provocando una ferita abbastanza grande da causare la fuoriuscita di sangue. A causa del dolore provocato dalla loro puntura, i tabanidi vengono frequentemente scacciati dall'animale su cui si stanno nutrendo e, nel tentativo di terminare il pasto di sangue, effettuano degli attacchi

ripetuti. Esempari con i pezzi boccali ancora contaminati di sangue possono posarsi su un ospite diverso da quello su cui avevano iniziato il pasto, dando eventualmente luogo alla trasmissione di un agente patogeno presente nel residuo di sangue.

2) dimensioni: a causa delle loro dimensioni relativamente grandi, i loro pezzi boccali possono essere contaminati da una quantità di sangue (fino a 10 nl), tale da permettere la trasmissione di un agente patogeno, anche presente con un titolo non elevato.

Il ruolo dei tabanidi come vettori dell'AIE è dimostrato in letteratura; tuttavia, trattandosi di vettori meccanici, la loro rilevanza epidemiologica nella circolazione del virus è oggetto di dibattito. Studi condotti negli Stati Uniti hanno dimostrato che aree a differente incidenza e prevalenza del virus erano caratterizzate da popolazioni di tabanidi differenti, per composizione specifica ed abbondanza. Aree ecologicamente più adatte a questi insetti e con popolazioni più abbondanti degli stessi erano interessate da una maggiore incidenza del virus, rispetto a zone aride meno idonee a questi insetti. La trasmissione meccanica del virus dell'AIE da parte dei tabanidi è stata anche dimostrata in diversi studi sperimentali. In particolare, ricercatori americani hanno dimostrato che la trasmissione si può verificare anche in seguito ad un'unica puntura da parte di un solo esemplare del genere *Tabanus*, genere che comprende le specie di maggiori dimensioni all'interno della famiglia, che conseguentemente possono avere i pezzi boccali contaminati con una quantità di sangue relativamente grande. Evidenze indirette confermano il ruolo di questi insetti come vettori dell'AIE anche nel nostro paese. La massima incidenza del virus infatti viene registrata nella stagione estiva, quella di massima abbondanza ed attività dei tafani, ed in aree caratterizzate da condizioni ecologiche particolarmente favorevoli a questi insetti.

Sistematica

L'inquadramento sistematico dei ditteri della famiglia Tabanidae è il seguente:

Phylum: Arthropoda

Classe: Insecta

Ordine: Diptera

Sottoordine: Brachicera_

Infraordine: Tabanomorpha

Superfamiglia: Tabanoidea

Famiglia: Tabanidae

Dal 1860 fino agli anni '90 del novecento la sistematica della famiglia Tabanidae ha subito numerosi rimaneggiamenti; fino agli anni '40, si basava fondamentalmente sulla presenza o meno di speroni sulle tibie e sulla struttura del terzo segmento antennale. Successivamente, ci si è resi conto che questi caratteri non erano idonei a stabilire le relazioni filogenetiche all'interno della famiglia. A partire dagli anni '50, è stata adottata una nuova classificazione, tuttora in uso, basata sulla morfologia dei genitali di entrambi i sessi.

Morfologia

Gli adulti della famiglia Tabanidae sono insetti di taglia medio-grande (6-30 mm di lunghezza), con corpo massiccio, testa grande ed occhi sporgenti dai colori iridescenti. Possono essere distinti dai ditteri delle altre famiglie del sottordine Brachicera grazie alla caratteristica disposizione delle venature alari e dalla biforcazione delle venature R₄ ed R₅ (Fig.1).



Fig.1 – *Tabanus* sp., femmina adulta.

La colorazione varia dal marrone/giallastro al grigio/nero. Molte specie appartenenti a popolazioni Mediterranee presentano livree molto scure (a volte di un colore nero carbone). Il dimorfismo sessuale è marcato: i maschi hanno occhi molto ravvicinati (capo oltico) e apparato boccale di tipo lambente (si nutrono di nettare di fiori).

Gli occhi composti, dai colori spesso iridescenti, sono ben sviluppati in entrambi i sessi; hanno una pelosità più o meno marcata e bande trasversali variabili in numero e posizione, che rappresentano un elemento diagnostico per l'identificazione delle diverse specie.

Nelle femmine gli occhi sono separati dalla fronte, dove sono visibili importanti caratteri diagnostici, i calli frontali, aree protuberanti chitinizzate di colore nero/scuro brillante, che variano per forma, posizione e colore nei diversi taxa (Fig 2).



Fig. 2 - Testa di una femmina di *Tabanus* sp. Sono ben visibili i calli frontali e le bande oculari.

Le antenne sono formate da scapo, pedicello e flagello. Lo scapo (1° segmento antennale) presenta una forma pressoché costante in tutti i Tabanini, ma mostra forti variazioni in alcuni generi (es. *Chrysops* ed *Haematopota*).

L'apparato boccale delle femmine è corto e robusto, di tipo pungitore/lambente; è posizionato nella parte inferiore della testa a formare una proboscide, articolata nei seguenti pezzi: il labbro superiore, conformato a doccia aperta ventralmente rivestito dall'epifaringe; le mandibole e le mascelle, trasformate in stiletti conformati a lama tagliente; i palpi mascellari, che non partecipano alla funzione pungente-lambente, composti da 1-2 articoli ben sviluppati, allungati e ingrossati; il labbro inferiore, sviluppato in lunghezza, è di consistenza carnosa, è conformato a doccia, e termina all'estremità distale con due espansioni carnose (*labelli*). In posizione di riposo, tutte le appendici boccali sono alloggiare nella doccia del labbro inferiore, con l'eccezione dei palpi mascellari che sono posizionati anteriormente rispetto alla proboscide. I maschi hanno mandibole non funzionali e non sono pertanto in grado di pungere.

Il torace è la parte del corpo meno soggetta a variazioni morfologiche. Le zampe sono relativamente corte e robuste. Le ali anteriori sono ben sviluppate, trasparenti o pigmentate, e presentano la venulazione tipica della famiglia (Fig.3); come in tutti i ditteri, le ali posteriori sono ridotte a bilancieri.

L'addome è largo, costituito di 7 segmenti. La sua colorazione varia da specie a specie e può avere in alcuni casi una certa rilevanza come carattere diagnostico.



Fig.3 – Ala di *Tabanus* sp.

Biologia

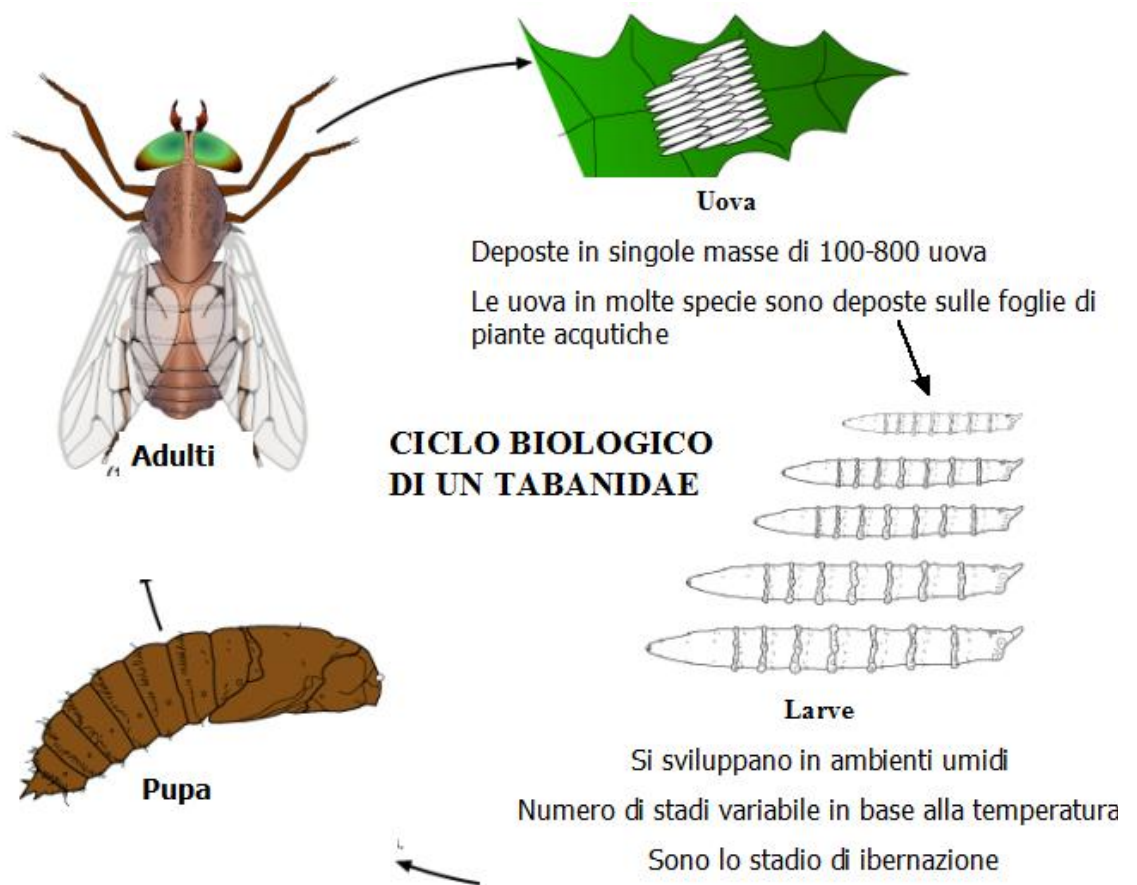


Fig.4 – Ciclo biologico di un Tabanidae.

I Tabanidi adulti sono diurni (in Europa solo la specie *Tabanus paradoxus*, è notturna). Solo le femmine sono ematofaghe, mentre i maschi si nutrono di sostanze zuccherine di origine vegetale. Il ciclo della maggior parte dei tabanidi (Fig.4) è univoltino, con una generazione l'anno e superamento della stagione invernale allo stadio larvale.

Quattro-sette giorni dopo aver effettuato un pasto di sangue la femmina depone le uova in masse compatte, su piante erbacee o altri supporti molto vicini o appena sopra l'acqua. Lo stadio embrionale dura da una a tre settimane, secondo le condizioni ambientali: il principale parametro microclimatico che agisce sulla schiusa delle uova è l'umidità relativa, più è bassa e più dura lo stadio di uovo. Le larve emergono tutte contemporaneamente da una stessa massa di uova e cadono direttamente in acqua o sul terreno. Sono molto adattabili, possono sopravvivere per lunghi periodi senza nutrirsi e possono svernare diverse volte, secondo le condizioni climatiche. Vivono prevalentemente in ambienti umidi (stagni, paludi, ecc.), spesso in prossimità di corsi d'acqua, e possono occupare tre nicchie ecologiche diverse: terrestri, semi-acquatiche o acquatiche. Sono predatrici di altri invertebrati. La durata del periodo larvale e il numero di stadi larvali sono influenzati dalla dieta, dalla temperatura e dall'umidità. Nelle specie europee il numero degli stadi larvali varia da 7 a 11. Allo stadio di larva segue uno stadio di pupa della durata di 1-3 settimane. A maturità, in primavera, le larve si spostano in un substrato asciutto, spesso sabbioso, e completano il ciclo di sviluppo all'interno di una camera sotterranea priva di bozzoli o pupari. Nel complesso, l'intero ciclo biologico (uovo, larva e pupa) si svolge in 1-2 anni. Lo sfarfallamento avviene, in genere, all'inizio dell'estate, ma può variare in base alla latitudine. Gli adulti hanno una vita breve, di circa 2-3 settimane. Il fattore principale che influenza l'attività degli adulti è la temperatura dell'aria; normalmente sotto i 13°C non si vedono adulti in volo, ma l'attività si riduce fortemente già intorno ai 15°C. Le temperature ottimali per volo, ricerca di un ospite, accoppiamento, ecc. sono intorno ai 25°C. Anche i venti influenzano molto l'attività di volo dei Tabanidi: con venti che soffiano a velocità di 4-5 m/sec l'attività decresce molto, soprattutto in zone aperte. L'attività dei tafani adulti si svolge in pieno giorno, in giornate calde e afose e in assenza di vento, con la massima intensità in piena e tarda estate. Alcune specie, come *Haematopota pluvialis*, sono particolarmente aggressive all'avvicinarsi dei temporali. I tabanidi sono buoni volatori, in grado di percorrere notevoli distanze, sebbene tendano a rimanere nell'ambiente frequentato dai loro ospiti o nelle sue immediate vicinanze e a spostarsi con voli brevi. In alcuni casi avvengono degli spostamenti

giornalieri tra boschi o margini di foreste, dove gli adulti trascorrono la notte, e pascoli, dove durante il giorno vanno in cerca del pasto di sangue. Alcune specie del genere *Haematopota* possono rimanere tra gli alberi anche durante il giorno, nutrendosi su mammiferi selvatici. In generale comunque i tafani tendono a scomparire a mano a mano che dal margine delle zone alberate ci si sposta verso il loro interno.

Le abitudini alimentari degli adulti variano in base al sesso: i maschi si nutrono di nettare, le femmine possono avere questo regime alimentare prima dell'accoppiamento, ma necessitano dei pasti di sangue per portare a maturazione e deporre le uova (ciclo gonotrofico). In Europa, nel solo genere *Pangonius*, anche le femmine si nutrono esclusivamente di nettare. Le femmine di diverse specie possono presentare preferenze diverse riguardo la zona del corpo dell'ospite su cui effettuare il pasto di sangue; le specie più piccole prediligono normalmente testa e collo, mentre quelle più grandi pungono più frequentemente su zampe e ventre. Tra i fattori che possono influenzare queste preferenze, ci possono essere lo spessore della pelle dell'animale, la densità dei vasi sanguigni nelle diverse zone e la lunghezza dei peli del manto. Le femmine della famiglia Tabanidae sono particolarmente attratte da oggetti scuri che si stagliano rispetto allo sfondo; esse sono guidate verso i loro ospiti dalla luce polarizzata riflessa dal loro mantello (animali scuri attraggono più di quelli chiari, perché il mantello scuro emette più luce polarizzata). La parte bassa dei loro occhi è invece particolarmente sensibile alla luce polarizzata orizzontalmente riflessa dai corpi d'acqua, utilizzati come siti per l'ovideposizione. Oltre che sugli stimoli visivi, la ricerca degli ospiti segue anche stimoli olfattori da loro emessi, quali anidride carbonica ed octenolo, sostanza presente nell'urina degli ungulati.

In generale i tabanidi non presentano specificità d'ospite. Vengono maggiormente attaccati animali di grossa taglia e dalla colorazione scura, la cui sagoma risalti rispetto ad uno sfondo. Sia il mantello a strisce delle zebre che quello chiaro di diverse razze bovine italiane sarebbero un adattamento volto a ridurre l'attrattiva nei confronti dei tafani e di altri insetti vettori. Nelle nostre regioni equini e bovini sono gli ospiti su cui più frequentemente vengono effettuati i pasti di sangue.

SCOPI DELLO STUDIO

I tabanidi sono vettori meccanici di virus, batteri e protozoi, agenti eziologici di importanti malattie degli animali domestici (anemia infettiva equina, leucosi bovina, besnoitiosi, ecc.). La loro capacità di agire come vettori meccanici è legata in particolare alla dolorosità della loro

puntura; essi vengono, infatti, frequentemente scacciati dall'animale su cui si stanno nutrendo e, nel tentativo di terminare il pasto di sangue, attaccano ripetutamente. Esempari con i pezzi boccali contaminati di sangue possono così posarsi su un ospite diverso da quello su cui avevano iniziato il pasto, dando eventualmente luogo alla trasmissione di un agente patogeno. In oltre, a causa delle loro dimensioni relativamente grandi, i pezzi boccali dei tabanidi (mandibole, mascelle e labium) possono essere contaminati da una notevole quantità di sangue, rendendo più probabile la trasmissione. Il ruolo dei tabanidi come vettori dell'AIE è ampiamente dimostrato in letteratura; tuttavia, trattandosi di vettori meccanici, la loro rilevanza epidemiologica nella circolazione del virus, se paragonata ad altre modalità di trasmissione, è ancora oggetto di dibattito. Numerosi studi sembrerebbero individuare la trasmissione da parte di vettori, e dei tabanidi in particolare, come la principale via di diffusione del virus. Si tratta però per lo più di studi effettuati negli USA, in situazioni ecologicamente molto differenti da quelle riscontrabili nel nostro territorio, in particolare per quanto riguarda presenza, abbondanza e composizione specifica delle popolazioni di potenziali vettori.

Nonostante che in Italia l'anemia Infettiva Equina sia endemica, ad oggi non sono mai stati effettuati e pubblicati lavori riguardanti il ruolo dei tafani come vettori di questo virus. In quest'ambito, è sembrato interessante condurre un progetto di ricerca finalizzato ad una prima valutazione della potenziale rilevanza dei tabanidi come vettori dell'AIE in Italia centrale e nord-occidentale. I dati raccolti hanno permesso di ottenere una prima indicazione su presenza ed abbondanza delle diverse specie dei ditteri della famiglia Tabanidae in aree a differente prevalenza del virus, fornendo una prima indicazione indiretta sulla loro maggiore o minor rilevanza epidemiologica come vettori dell'AIE. E' stato anche condotto uno studio specifico sui residui di sangue sui pezzi boccali dei tafani, volto all'identificazione, mediante tecniche biomolecolari, delle specie su cui era stato effettuato il pasto di sangue. Questo studio ci ha permesso di avere una stima quantitativa della percentuale di individui catturati che presentano residui di sangue sui pezzi boccali e, conseguentemente, un'indicazione sulla percentuale di individui di una popolazione in volo attivo con residui di sangue sui pezzi boccali, i soli potenzialmente in grado di trasmettere un agente patogeno.

Al fine di verificare quanto sopra esposto, obiettivi specifici della presente ricerca erano:

- Ottenere dati su composizione specifica, abbondanza e stagionalità delle popolazioni dei ditteri della famiglia Tabanidae presenti in aree a diversa prevalenza d'infezione del virus dell'AIE;
- Individuare le specie di tafani più frequentemente associate alle aree a circolazione virale;
- Quantificare la frequenza di tafani catturati con residui di sangue sui pezzi boccali;
- Correlare dati entomologici e virologici (anche storici) per una valutazione del rischio legata a presenza ed abbondanza dei vettori meccanici del virus;
- Valutare la rilevanza epidemiologica dei tafani come veicolo di diffusione del virus;
- In base alla maggiore o minore concordanza tra dati virologici ed entomologici, ipotizzare altre possibili modalità di trasmissione del virus (es. iatrogena);

FASI PROGETTUALI

Fase 1:

UU.OO. 1, 2, 4 e 5: Selezione dei siti: Sul territorio di Lazio e Liguria sono state individuate aree in cui si è stata storicamente registrata circolazione virale; all'interno di queste aree, sono state selezionate aziende con positività sierologiche, caratterizzate dalla presenza di equidi stabulati all'aperto nel periodo di massima attività dei vettori (maggio-ottobre). Per permettere il confronto qualitativo e quantitativo tra popolazioni di tabanidi presenti in zone epidemiologicamente differenti, i siti di studio sono stati scelti, in base ai dati storici della sorveglianza nazionale, a diversa prevalenza dell'infezione (categorizzata come alta e bassa). Tenendo conto dei parametri sopra descritti sono stati scelti 4 siti per il Lazio e 2 per la Liguria; nel 2015 in Liguria sono stati utilizzati i siti dell'anno precedente, mentre per il Lazio sono stati scelti nuovi 3 siti ed uno riconfermato dall'anno precedente, da utilizzare come confronto tra le catture delle diverse stagioni di campionamento.

Fase 2:

UU.OO. 1 e 5: Effettuazione delle catture: Nei siti selezionati, nel periodo di massima attività dei vettori, sono state effettuate catture di ditteri della famiglia Tabanidae, utilizzando trappole specificamente ideate per la cattura ed il monitoraggio di questi insetti: trappola Horse Pal, H-Trap e Tabana.

Per lo studio dei residui di sangue sui pezzi boccali, sono state effettuate nel Lazio 2 catture apposite, in 2 con popolazioni di tafani particolarmente abbondanti.

Fase 3:

U.O. 1: Smistamento delle catture ed identificazione tabanidi: Le catture sono state trasferite per lo smistamento e l'identificazione dei tabanidi al Laboratorio di Parassitologia e Sorveglianza Entomologica dell'IZSLT e presso la Sezione di Imperia dell'IZSTO. In questi laboratori è stata eseguita l'identificazione specifica degli esemplari catturati; per lo studio su residui di sangue sui pezzi boccali, all'identificazione seguiva l'asportazione di tali pezzi e il loro trasferimento all'UO3 per l'analisi biomolecolare.

Fase 4:

U.O. 3: Analisi biomolecolare residui di sangue sui pezzi boccali: L'identificazione dei residui di sangue sui pezzi boccali è stata effettuata mediante PCR, sequenziamento di specifici tratti del DNA amplificato e confronto in Genbank delle sequenze ottenute.

Fase 5:

UU.OO. 1, 4 e 5: Registrazione dati: i dati relativi all'identificazione dei tabanidi catturati e alla ricerca sul sangue presente sui pezzi boccali sono stati immessi in appositi data set.

Fase 6:

U.O. 4: Elaborazione statistica dei dati ottenuti;

Fase 7:

UU.OO. 1, 2, 3, 4 e 5: Stesura relazione finale.

MATERIALI E METODI

AREA DI STUDIO

I siti di campionamento sono stati scelti sulla base di dati riguardanti la circolazione dell'AIE a livello nazionale nel periodo 2007-2013. Per permettere l'effettuazione delle catture da parte di un unico operatore nell'arco della stessa giornata si è cercato di selezionare siti di cattura raggruppati dal punto di vista geografico. Sulla base dei dati in possesso del Centro di Referenza Nazionale sull'Anemia Infettiva Equina, nel primo anno di ricerca si è scelto di lavorare sulle province di Rieti nel Lazio e di Imperia in Liguria. Dopo l'individuazione di macro-aree idonee alle finalità del progetto, si è proceduto alla ricerca di siti specifici dove posizionare le trappole mediante sopralluoghi sul campo. A tal fine, sono state selezionate aziende presso le quali erano stabulati all'aperto equini per tutto il periodo previsto per i campionamenti (maggio/giugno-settembre/ottobre).

Per quanto riguarda il Lazio, durante la prima stagione di campionamento (2014), in ciascuna di due macro-aree storicamente interessate da circolazione virale, rispettivamente situate in prossimità dei centri abitati di Posta e di Borgorose (Ri), sono state individuate due micro-aree, una ad alta ed una a bassa prevalenza del virus, per un totale di 4 siti di campionamento.

Sono qui di seguito elencati i siti selezionati per il campionamento nel Lazio nella prima stagione di campionamento (2014):

1. Borgorose: 42°11'37,12''N – 13°14'22,47''E; 800 mslm. Alta prevalenza AIE. Presenza di cavalli, cani, ovini e bovini in prossimità del paese. Zona caratterizzata da boschi e radure, con numerosi fossi con acqua nelle vicinanze;
2. Santa Lucia (Frazione di Fiamignano): 42°15'47,64N – 13°09'46,98''E; 812 mslm. Bassa prevalenza AIE. Presenza cavalli e pony nelle immediate vicinanze di un centro abitato. Zona caratterizzata da boschi e radure e da un grosso fosso con presenza di acqua tutto l'anno;
3. Posta: 42°31'31,43''N – 13°06'22,64''E; 725 mslm. Bassa prevalenza AIE. Presenza di cavalli e bovini. Lungo una strada in prossimità del paese. Pascoli, spesso allagati, alternati a bosco. Nelle strette vicinanze di un corso d'acqua;
4. Vallemare (Frazione di Borbona): 42°28'56,43''N – 13°06'40,84''E; 1.035 mslm. Alta prevalenza AIE. Presenza di cavalli, asini, bovini e cani. Maneggio in una zona erbosa circondata da boschi.

Nello stesso anno in Liguria sono stati selezionati due allevamenti equini in provincia di Imperia, uno a basso ed uno ad alto rischio AIE:

1) Diano Castello: 43.920246N – 8.063364E. Presenza equini (cavalli, pony, asini), ovi-caprini e lama;

2) Costa Bacelega (frazione di Ranzo): 44.070459N – 8.031113E. Presenza di asini.

Nel 2015, in Liguria sono stati confermati gli stessi siti di campionamento. Nel Lazio invece per la seconda stagione di campionamento, l'attività sul campo è stata rimodulata, con la scelta di tre nuovi siti su quattro, confermando solo quello di Posta. I 3 siti nuovi per il 2015 sono stati scelti in aree simili dal punto di vista ambientale/zootecnico a quelli dell'anno precedente, in zone dove fosse nota la presenza di tabanidi, ma dove non fosse mai stata segnalata la circolazione di AIE. Il sito di Posta è stato confermato per la seconda stagione al fine di evidenziare, tramite il confronto tra i risultati delle due annualità di campionamento, eventuali differenze climatiche tra le due stagioni, tali da inficiare un eventuale confronto tra i diversi siti. Sono qui di seguito elencati i siti selezionati per il campionamento nel Lazio nella seconda stagione di campionamento (2015):

1. Borgovelino: 42°22'28,45''N – 13°04'13,79''E; 1.202 mslm. Prevalenza nulla. Pianoro di alta quota con cavalli bradi. Alternanza di boschi di faggio ed ampie radure. Nelle vicinanze acqua non abbondante.
2. Vicovaro: 42°00'54,46''N – 12°55'22,35''E; 288 mslm. Prevalenza nulla. Terreno di privato tra fiume e strada. Nelle vicinanze presenza di boschi. Presenti cavalli, pecore e capre.
3. Sacrofano: 42°04'44,94''N – 12°27'30,61''E; 138 mslm. Prevalenza nulla. Allevamento di purosangue arabi in zona caratterizzata da ampie radure tra i boschi. Paese vicino. Scarsità di acqua nelle immediate vicinanze.

CAMPIONAMENTO

Nel Lazio le catture dei ditteri della famiglia Tabanidae sono state effettuate con periodicità settimanale. In ciascun sito sono state utilizzate contemporaneamente 2 trappole, una Horse pal e una H-trap (Fig.5), appositamente ideate per la cattura e il monitoraggio di questi insetti. Si tratta in entrambi i casi di versioni moderne della trappola Manitoba, specificamente ideate per la cattura di insetti ematofagi che cacciano a vista, come tafani e mosche tse-tse. Sfruttano

l'attrazione esercitata su questi insetti da oggetti scuri e mobili che si stagliano rispetto allo sfondo. In entrambi i modelli di trappola utilizzati, una palla nera appesa sotto la trappola stessa oscilla al minimo movimento dell'aria, attirando i tafani. Al momento di decollare dalla palla gli insetti finiscono in un meccanismo a nassa che li convoglia in un barattolo di raccolta. Per aumentare l'attrattività della trappola, è stato utilizzato un attrattivo odoroso a base d'octenolo, sostanza naturalmente presente nell'urina di equini e bovini, che esercita un notevole potere attrattivo nei confronti dei ditteri ematofagi. Durante ciascuna sessione di cattura, le trappole operavano per 48 ore consecutive. Alla fine della sessione di cattura il contenitore con i tafani veniva rimosso dalla trappola e portato in laboratorio.



Fig.5 – Trappole Horse Pal e H-trap.

In Liguria sono state effettuate catture a cadenza quindicinale, utilizzando trappole modello Tabana. Anche la trappola Tabana è una variante della trappola Manitoba e anch'essa è stata specificamente disegnata per la cattura dei tafani. Questa trappola è molto simile per struttura e

funzionamento alla Horse Pal e alla H trap, basandosi sull'utilizzo di una palla nera oscillante come sagoma attrattiva per i tafani. Ciascuna sessione di cattura era della durata di 24 ore.

Per lo studio dei residui di sangue sui pezzi boccali sono state effettuate due specifiche catture nei due siti del Lazio in cui i tafani erano risultati più abbondanti nelle catture precedenti (Posta e Vallemare). Una trappola Horse Pal innescata sia con octenolo che con ghiaccio secco, al fine di aumentare al massimo il suo potere attrattivo, ha operato durante una giornata nelle ore di massima attività dei vettori (dalle 10 alle 13). Gli insetti catturati venivano trasferiti ogni mezz'ora in provette Falcon immerse in ghiaccio secco. Alla fine della giornata gli esemplari catturati, sempre conservati in ghiaccio secco, sono stati trasferiti al Laboratorio di Parassitologia e Sorveglianza Entomologica dell'IZSLT, dove sono stati congelati a -20°C in attesa delle successive prove biomolecolari.

SMISTAMENTO ED IDENTIFICAZIONE

I contenitori contenenti i tafani catturati venivano portati in giornata presso la Sezione Territoriale dell'IZS dove venivano messi in congelatore a -20°C per la soppressione degli insetti mediante ipotermia. Successivamente veniva effettuato un rapido smistamento del materiale catturato, selezionando i soli ditteri della famiglia Tabanidae, che venivano nuovamente congelati a -20°C e così conservati fino al momento della loro identificazione.

Per lo studio dei residui di sangue sui pezzi boccali, i Tabanidi catturati venivano trasportati in provette immerse in ghiaccio secco, al fine di preservare eventuali residui di sangue sui pezzi boccali, e congelati a -80°C al loro arrivo in laboratorio. Il numero di esemplari da preparare in ogni seduta di lavoro era definito in accordo con la UO3, che doveva immediatamente procedere alle prove biomolecolari per l'individuazione e l'identificazione del sangue eventualmente presente sui pezzi boccali. Una volta scongelati, gli esemplari venivano identificati a livello di specie e subito sezionati, asportando il capo dal resto del corpo. Le due parti così ottenute venivano messe in provette appositamente identificate, in modo da mantenere la tracciabilità dell'intero esemplare. Le teste venivano ulteriormente sezionate, asportando i pezzi boccali (mandibole, mascelle e labium) mediante forbicine da istologia; tali pezzi erano poi messi singolarmente in provette di tipo Eppendorf e trasferiti alla UO3 per le analisi biomolecolari. Per evitare contaminazioni tra un esemplare e l'altro, ad ogni taglio effettuato, le forbicine e tutti gli strumenti utilizzati venivano sottoposti ad un lavaggio in una soluzione di

ipossido di sodio al 10%, seguito da un lavaggio in alcool etilico al 70% e risciacquo in acqua distillata. Per evitare contaminazioni, durante la dissezione dei tafani gli operatori indossavano guanti, mascherina e camice.

L'identificazione a livello specifico dei tafani catturati è stata effettuata mediante esame allo stereo-microscopio dei caratteri morfologici diagnostici, seguendo le chiavi identificative di Chvala (1972) e Portillo-Rubio (2002). Per consentire l'osservazione nel dettaglio dei caratteri morfologici necessari per l'identificazione a livello specifico, gli esemplari venivano preventivamente spillati su appositi supporti, in modo da poter posizionare l'esemplare sotto lo stereo-microscopio nel modo più idoneo all'esame morfologico.

Tra i principali caratteri utili per l'identificazione a livello specifico dei ditteri della famiglia Tabanidae, sono stati presi in considerazione la forma dei calli frontali, il numero e la posizione delle bande oculari, la pubescenza più o meno marcata degli occhi, la conformazione dei palpi labiali, la presenza/assenza di speroni sulle tibie posteriori e, in alcuni casi, la colorazione dei segmenti addominali.

RACCOLTA DATI

Per ciascuna cattura venivano registrate in un apposito data set le seguenti informazioni:

- 1) sito di cattura;
- 2) data di cattura;
- 3) numero dei Tabanidi catturati divisi per specie.

METODI BIOMOLECOLARI

L'identificazione della specie animale dei residui di pasto è stata condotta mediante l'approccio descritto da Karlsson e Holmlund (2007)* utilizzando, tuttavia, il sequenziamento "classico" del DNA (metodo di Sanger) in luogo del pirosequenziamento proposto dagli autori.

Il metodo si basa infatti sull'amplificazione (tramite PCR) e successivo sequenziamento di una limitata regione (circa 120bp) dell'rDNA16S", utilizzando a tale scopo una coppia di primer specifica per il gruppo tassonomico dei mammiferi.

In particolare, per l'amplificazione del DNA si è proceduto trasferendo l'apparato buccale dell'insetto, prelevato come illustrato in precedenza, in 50ul di una miscela di amplificazione composta da 25ul TaqMan GTXpress Master mix 2x (LifeTechnologies); 500nM primer 16S-F

(GACGAGAAGACCCTATGGAGC); 500nM primer 16S-R (TCC GAG GTC GCC CCA ACC) e H₂O fino a 50ul. L'amplificazione, condotta in un termocilatore GenAmp 9700 System (Applied Biosystems) è consistita in una fase di 60" a 95°C seguita da 40 cicli composti da una fase di 60" a 95°C, 30" a 52°C, 60" a 68°C, al termine dei quali il campione è stato conservato a 4°C fino alla successiva fase.

La presenza degli amplificati è stata verificata mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1,5%: i campioni positivi sono quindi stati purificati mediante un kit commerciale (QIAquick PCR purification kit; QIAGEN) per essere sottoposti alle successive fasi di sequenziamento. Relativamente a questo ultimo punto, 6ul di DNA sono stati trasferiti in due distinte miscele di marcatura (una per ciascuno dei due filamenti dell'amplificato, da marcare con gli stessi primer di amplificazione), allestite ed analizzate utilizzando la chimica "Big Dye Terminator" e il sequenziatore capillare "Applied Biosystems 3500" (Life Technologies).

Le sequenze di DNA così ottenute sono state elaborate, assemblate ("Genious 8.1.8") ed infine cimentate nella banca dati pubblica GenBank, alla ricerca di similarità con le sequenze ivi depositate.

ANALISI STATISTICA

Al fine di evidenziare eventuali differenze tra le popolazioni di tafani in aree a diversa prevalenza del virus dell'AIE, sono stati presi in considerazione i dati quantitativi delle catture medie mensili nei diversi siti, considerando i ditteri della famiglia Tabanidae *in toto*. La stessa analisi è stata effettuata anche dopo aver eliminato i dati relativi alla specie più abbondante, *H. italica*, al fine di evidenziare e valutare un eventuale effetto confondente provocato dall'alta numerosità di questa singola specie. Quest'ultima analisi è giustificata anche dal fatto che, stando a quanto riportato in letteratura, *H. italica* potrebbe avere una minor rilevanza nella trasmissione meccanica del virus, a causa delle sue piccole dimensioni.

Separatamente per ogni annualità sono stati calcolati gli indici di tendenza centrale della distribuzione dei conteggi relativi alle catture di tabanidi, stratificati per abbondanza complessiva di tutte le specie (Tabanidae_Tot), abbondanza di insieme di specie esclusa *H. italica* (Tabanidae_No_Italica) ed abbondanza specie *H. italica* (dati relativi alla sola specie *H. italica*), aggregati per ciascun sito di cattura e specifici per ciascun sito e mese di cattura: media, mediana, I e III quartile.

Ai fini delle analisi le due annualità sono state considerate separatamente:

- 1) Per i confronti tra siti, sono state utilizzate statistiche non parametriche a causa della scarsa numerosità delle osservazioni (catture) per ciascun gruppo sottoposto a confronto;
- 2) Per i confronti tra aree di rischio sono state utilizzate anche analisi statistiche parametriche, previa normalizzazione dei dati di abbondanza attraverso trasformazione logaritmica ($\text{LOG}_{10} x+1$). L'aggregazione dei dati di abbondanza registrati nei diversi siti all'interno dei gruppi di rischio (Alto, Basso e Nullo) ha consentito di incrementare il numero di osservazioni tra i gruppi sottoposti a confronto, permettendo l'utilizzo della statistica parametrica;
- 3) E' stato operato un confronto tra i siti in relazione all'abbondanza annuale mediana di tabanidi, stratificati per abbondanza *Tabanidae_Tot*, *Tabanidae_No_Italica* e *H. italica*, mediante statistica non parametrica ANOVA di Kruskal Wallis (significatività per $p < 0,05$);
- 4) considerando che l'abbondanza del vettore risulta notoriamente dipendente dalle dinamiche stagionali durante il periodo di attività, è stato operato un confronto tra le abbondanze mediane al fine di individuare eventuali differenze tra i siti anche in funzione del mese di cattura. E' stata utilizzata la statistica parametrica ANOVA (correlazione per gruppi) previa trasformazione logaritmica ($\text{LOG}_{10} X+1$) dei dati di abbondanza e confronto post hoc mediante test HSD (honest significant difference) di Turkey per campioni diseguali;
- 5) Le stesse analisi sono state eseguite aggregando i dati relativi alle abbondanze per categoria di rischio del sito (Alto-Basso nel 2104, basso-nullo nel 2015) al fine di verificare eventuali differenze in funzione della pregressa incidenza di AIE nelle aree;
- 6) Mediante l'uso delle medesime tecniche statistiche, esclusivamente per il sito Posta è stato operato un confronto delle abbondanze in funzione dell'anno di osservazione, al fine di verificare eventuali differenze di abbondanza dei tabanidi in funzione delle dinamiche annuali.

RISULTATI

Nelle due stagioni di campionamento, nel territorio del Lazio, sono state effettuate complessivamente 96 catture (46 nel 2014 e 50 nel 2015). I tafani catturati in totale sono stati 18.902 (13.667 nel 2014 e 5.235 nel 2015). Nei siti di cattura si è registrata la presenza di ditteri della famiglia Tabanidae durante tutto il periodo di campionamento. In entrambe le stagioni le catture più abbondanti sono state registrate nel sito di Posta (7.436 tafani catturati nel 2014 e 3.663 nel 2015), sito che è anche risultato quello con la maggior ricchezza di specie. I siti con minore diversità di specie sono stati Santa Lucia di Fiamignano nel 2014 (18 specie catturate) e Sacrofano nel 2015 (17 specie catturate). Sono state identificate complessivamente 40 specie di Tabanidi (35 nel 2014 e 30 nel 2015), appartenenti a 8 generi. Il genere più rappresentato, con 13 specie, è risultato il genere *Tabanus*, dominante anche per quanto riguarda il numero di esemplari catturati (7.367/18.902). La specie dominante è risultata *Haematopota italica*, seguita da *Atylotus loewianus* e *Tabanus lunatus*. I risultati ottenuti sono sintetizzati in Tab.1.

Viene qui di seguito riportato l'elenco delle specie campionate, divise per genere:

Genere *Atylotus*: *A. fulvus*, *A. latistriatus*, *A. loewianus*, *A. pulchellus*, *A. venturi*

Genere *Chrysops*: *C. relictus*

Genere *Dasyrhamphis*: *D. anthracinus*, *D. umbrinus*

Genere *Haematopota*: *H. grandis*, *H. italica*, *H. pandazisi*, *H. ocelligera*, *H. pluvialis*

Genere *Hybomitra*: *H. erberi*, *H. kaurii*, *H. lundbecki*, *H. montana*

Genere *Phyllipomyia*: *P. aprica*, *P. graeca*

Genere *Sylvius*: *S. alpinus*

Genere *Tabanus*: *T. autumnalis*, *T. bifarius*, *T. bovinus*, *T. briani*, *T. bromius*, *T. cordiger*, *T. exclusus*, *T. glaucopis*, *T. lunatus*, *T. maculicornis*, *T. marianii*, *T. miki*, *T. nemoralis*, *T. paradoxus*, *T. quatornatus*, *T. rectus*, *T. regularis*, *T. rupium*, *T. spectabilis*, *T. tergestinus*

2014					Tot
	Borgorose	Posta	Vallemare	Santa Lucia	
N° Tabanidi	3.696	7.436	1.391	1.144	13.667
N° Catture	13	10	10	13	46
N° Specie	24	26	20	18	35
2015					
	Sacrofano	Posta	Vicovaro	Borgovelino	
N° Tabanidi	663	3.663	394	515	5.235
N° Catture	16	11	12	11	50
N° Specie	17	27	20	18	30

Tab.1 – Quadro riassuntivo dei risultati ottenuti nel Lazio nelle 2 stagioni di campionamento.

L'andamento del numero di specie di tafani durante i mesi di campionamento è riportato in Fig.6 e Fig.7, per il 2014 e il 2015 rispettivamente. Nel 2014 il mese con maggiore numero di specie è Luglio nei siti di Borgorose e Posta, Agosto per Fiamignano e Vallemare. In generale, nei 4 siti esaminati, l'andamento del numero di specie è bimodale, con una flessione che, a seconda del sito, si verifica tra gli inizi di luglio e gli inizi di agosto. Nella stagione 2014 tre siti su quattro mostrano anche un picco secondario in numero di specie verso la fine del periodo di campionamento. Nel 2015, si può evidenziare invece un unico picco nel mese di luglio in tutti i siti, tranne che a Sacrofano, dove il picco è anticipato al mese di giugno.

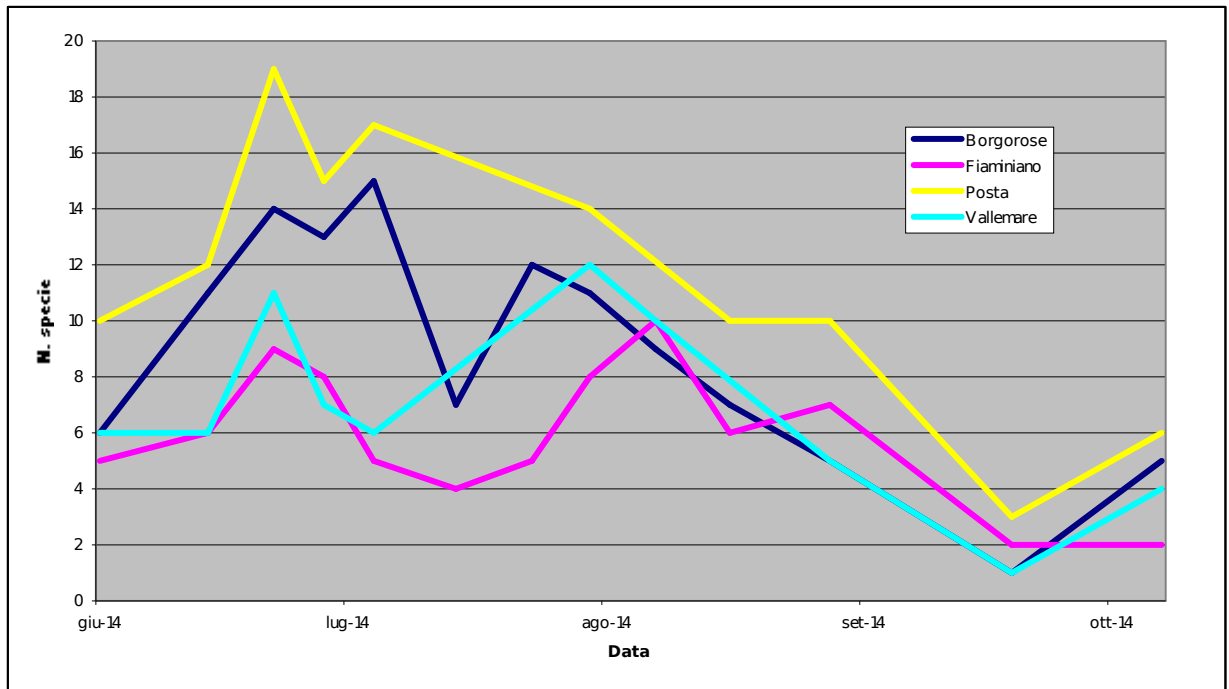


Fig.6 – Andamento temporale del numero di specie della famiglia Tabanidae nei diversi siti di campionamento (2014)

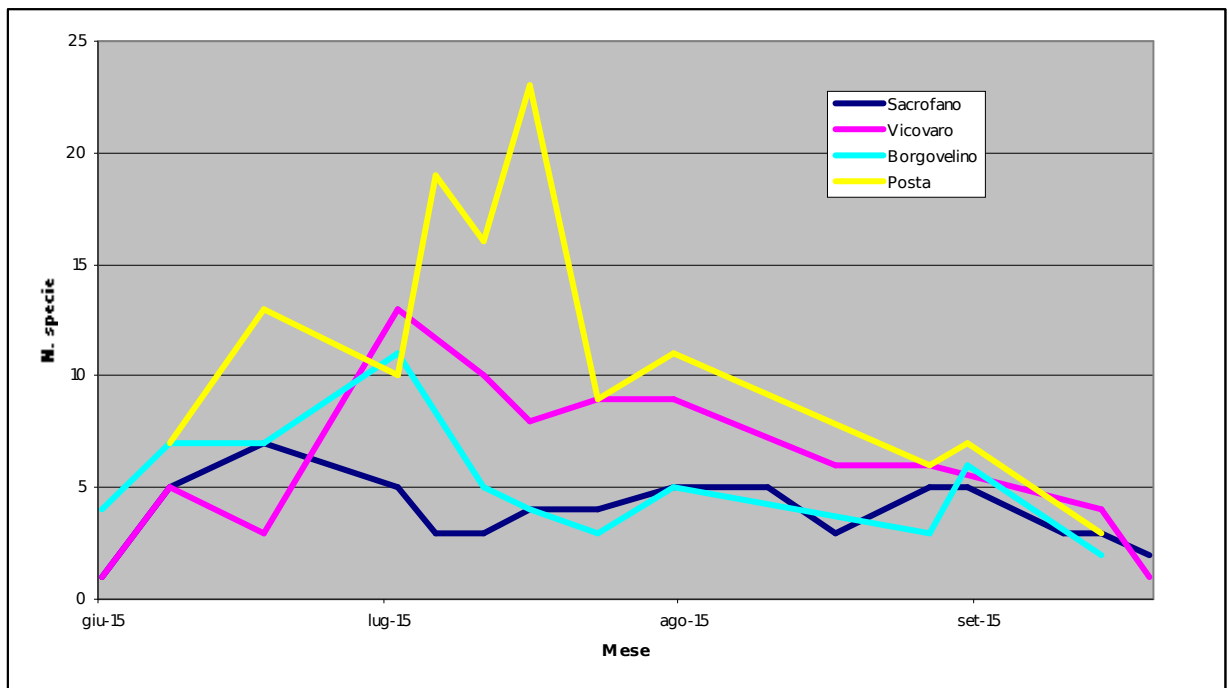


Fig.7 - Andamento temporale del numero di specie della famiglia Tabanidae nei diversi siti di campionamento (2015)

Le catture medie mensili complessive di tutta la famiglia Tabanidae sono riportate in Fig.8 per il 2014 e Fig.9 per il 2015. Nel 2014 il picco di abbondanza della popolazione di tafani si è verificato tra luglio ed agosto, con la sola eccezione del sito di Fiamignano, dove il picco è tardo estivo (agosto-settembre). Nel 2015, la stazione di Posta ha mostrato lo stesso andamento stagionale della popolazione di tafani, mentre gli altri tre siti hanno mostrato catture medie piuttosto basse durante tutta la stagione di campionamento. Dal confronto dei 2 grafici è possibile notare come nella stazione di Posta, la sola campionata in entrambe le stagioni, le catture medie mensili siano state costantemente più basse nel 2015 rispetto al 2014.

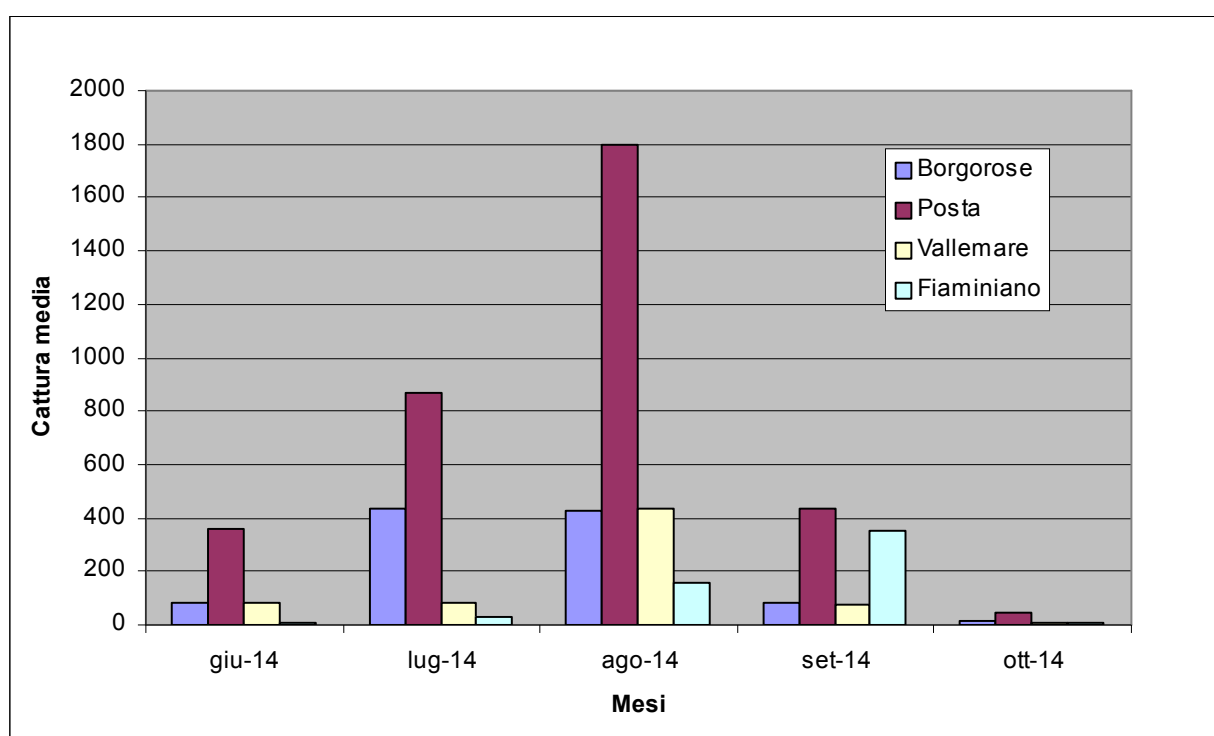


Fig.8 – Catture medie mensili dei ditteri della famiglia Tabanidae nella stagione 2014.

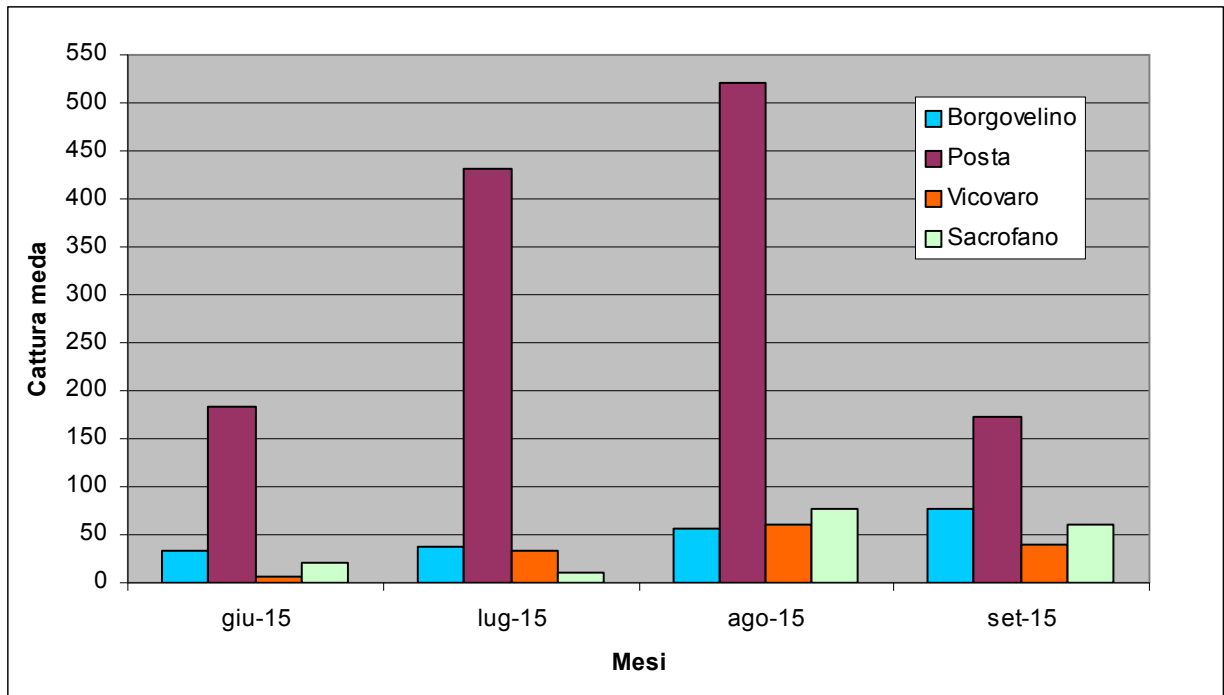


Fig.9 – Catture medie mensili dei ditteri della famiglia Tabanidae nella stagione 2015.

Le catture medie mensili complessive relative al sito di Posta nelle due stagioni di campionamento sono riportate nel grafico di Fig.10, dove si può vedere come nel 2015 le catture siano state inferiori a quelle dell'annata precedente, durante tutto il periodo di campionamento.

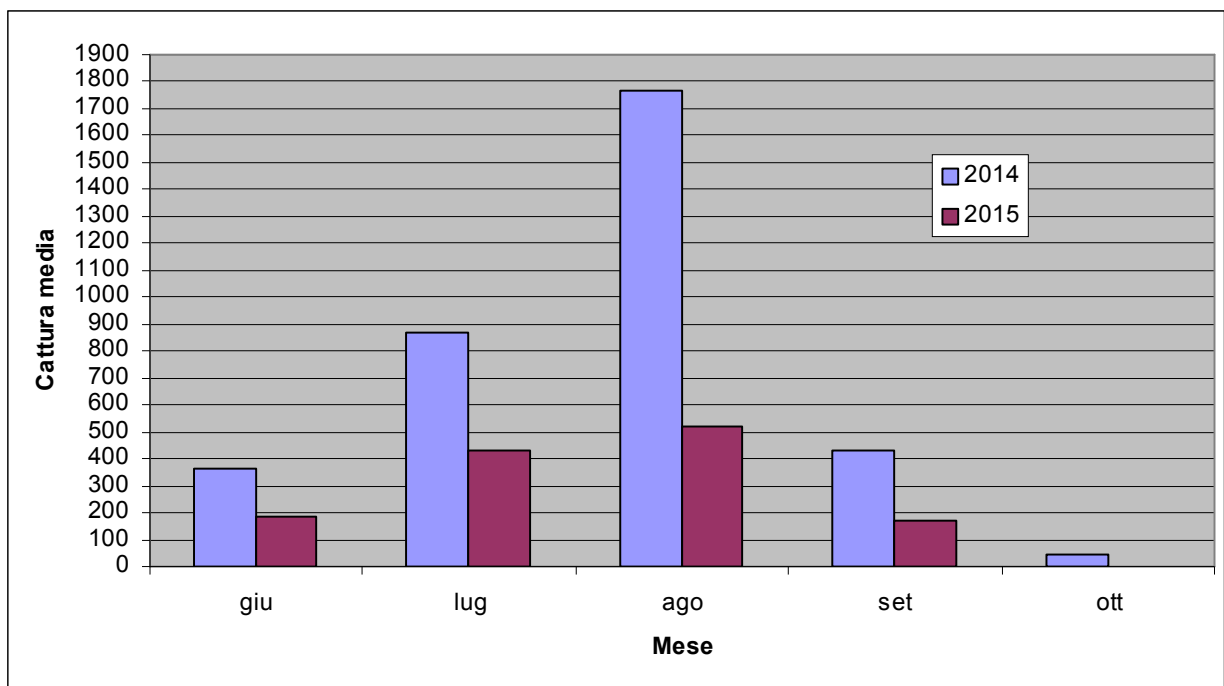


Fig.10 – Catture medie mensili dei ditteri della famiglia Tabanidae nel sito di Posta nelle due stagioni di campionamento (2014-2015).

Le catture medie mensili delle 5 specie più abbondanti per ogni sito sono riportate in Fig.11-16. In Fig.17 e 18 sono riportate le catture medie mensili delle 5 specie più abbondanti riscontrate nel sito di Posta, rispettivamente nel 2014 e 2015. Nelle due Figure l'asse delle y ha la stessa scala, al fine di rendere visivamente confrontabili i risultati dei due anni di campionamento.

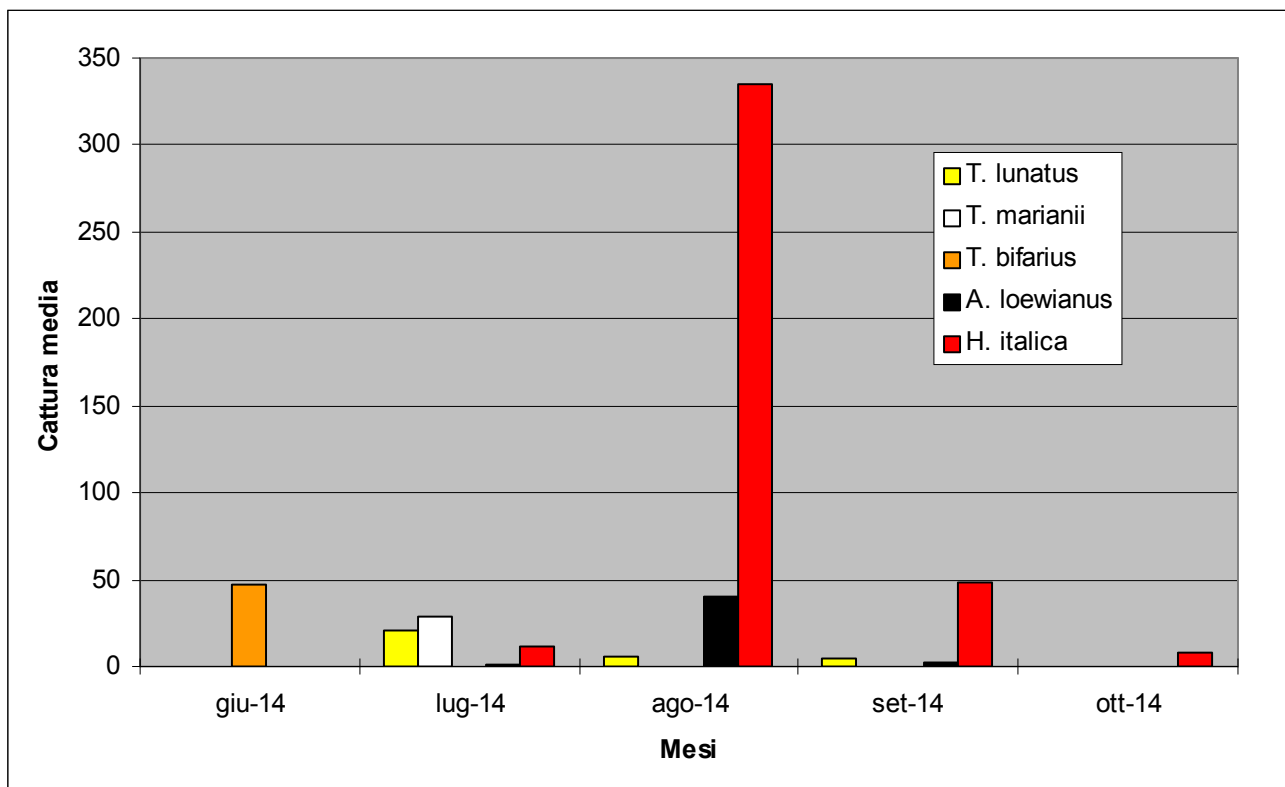


Fig.11 – Cattura media mensile delle 5 specie più abbondanti nel sito di Vallemare (2014)

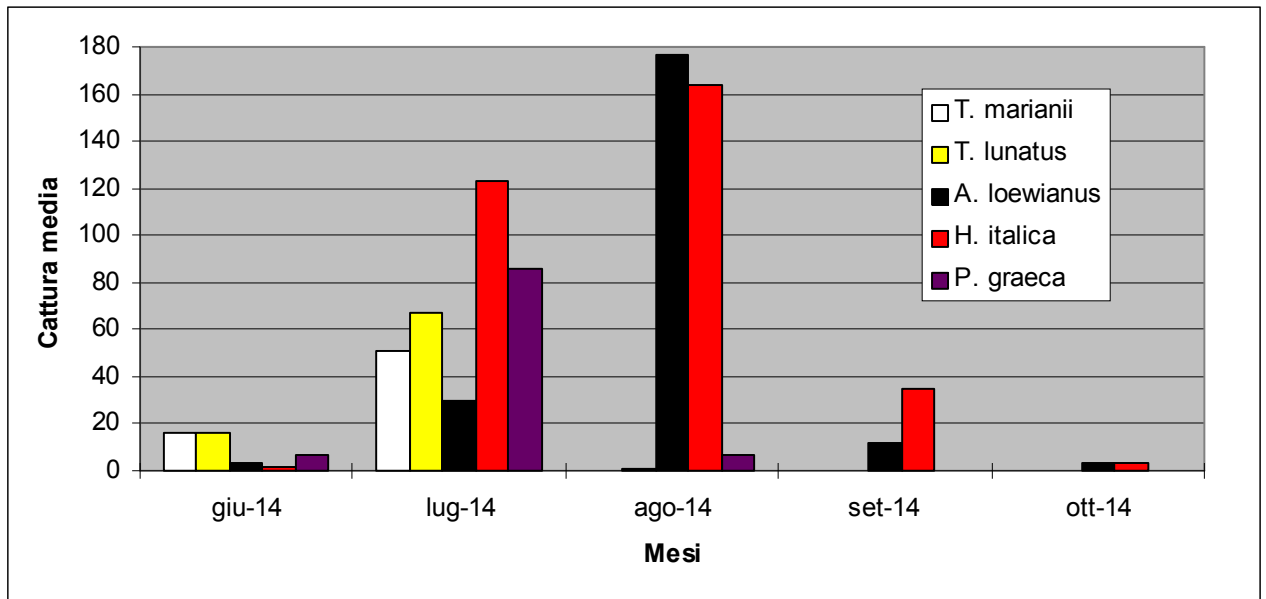


Fig.12 Cattura media mensile delle 5 specie più abbondanti nel sito di Borgorose (2014)

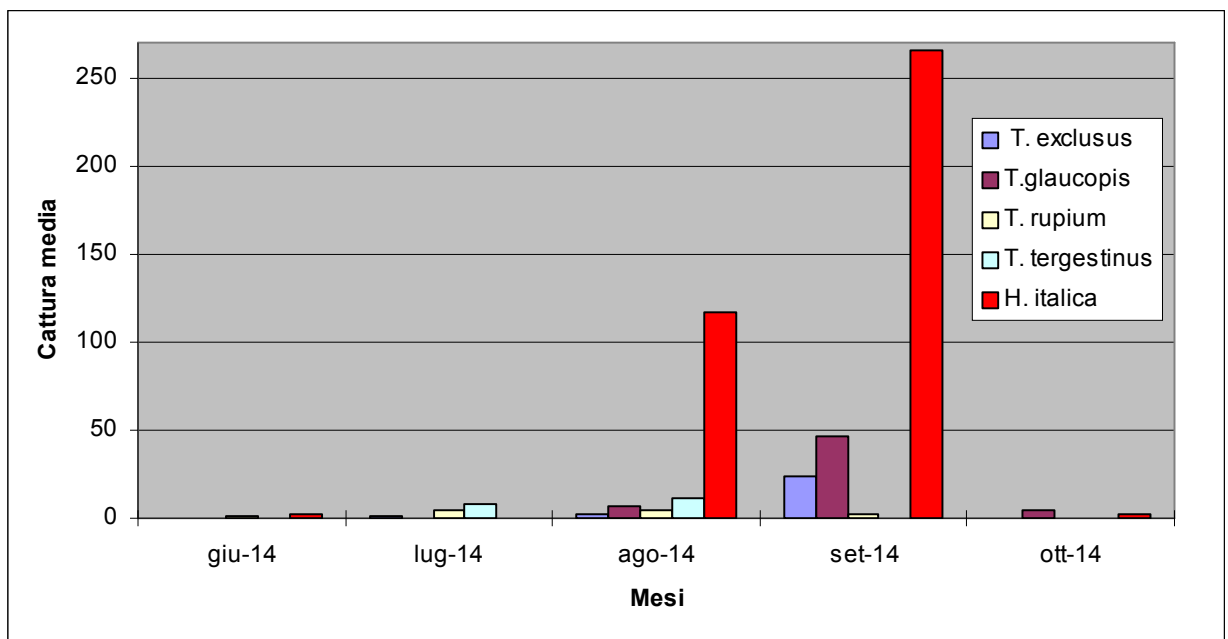


Fig.13 – Cattura media mensile delle 5 specie più abbondanti nel sito di Fiamignano (2014)



Fig.14 – Cattura media mensile delle 5 specie più abbondanti nel sito di Sacrofano (2015)

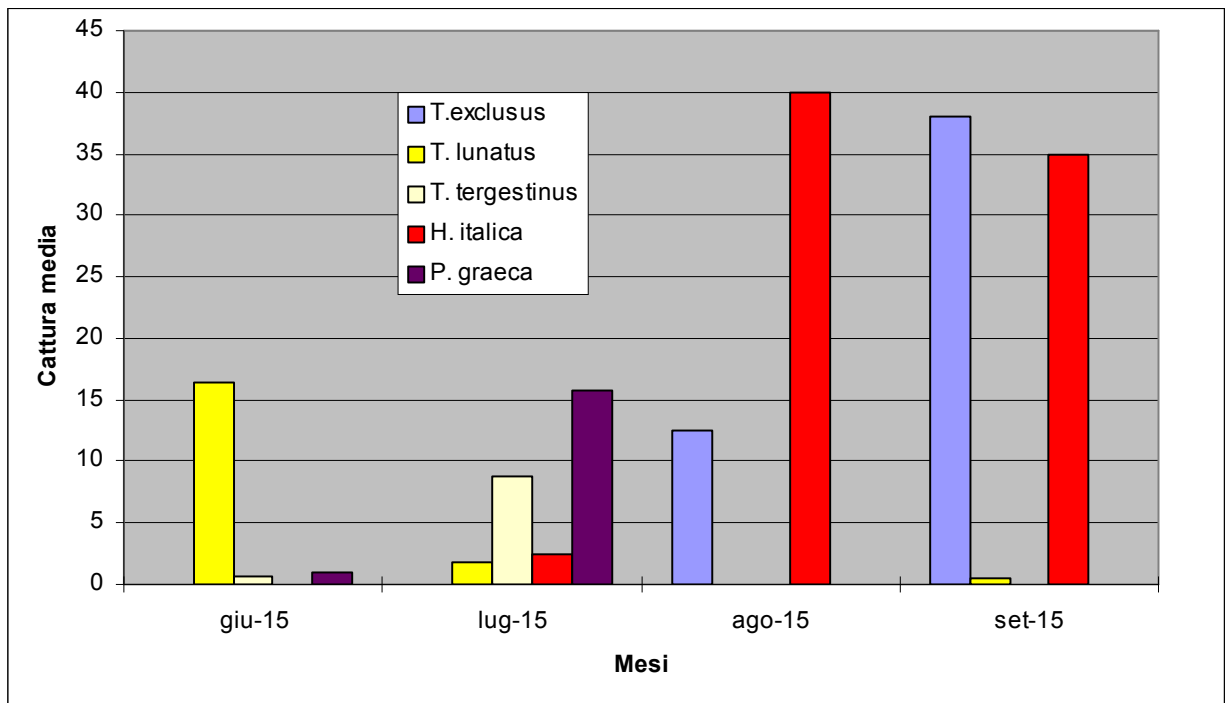


Fig.15 – Cattura media mensile delle 5 specie più abbondanti nel sito di Borgovelino (2015)

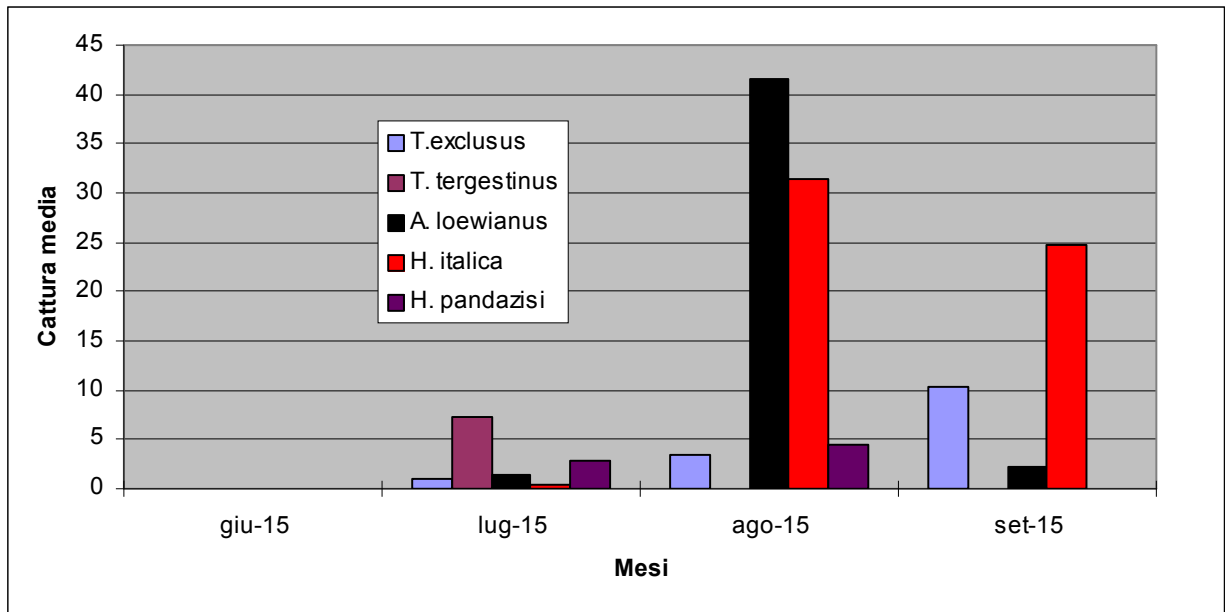


Fig.16 – Cattura media mensile delle 5 specie più abbondanti nel sito di Vicovaro (2015)

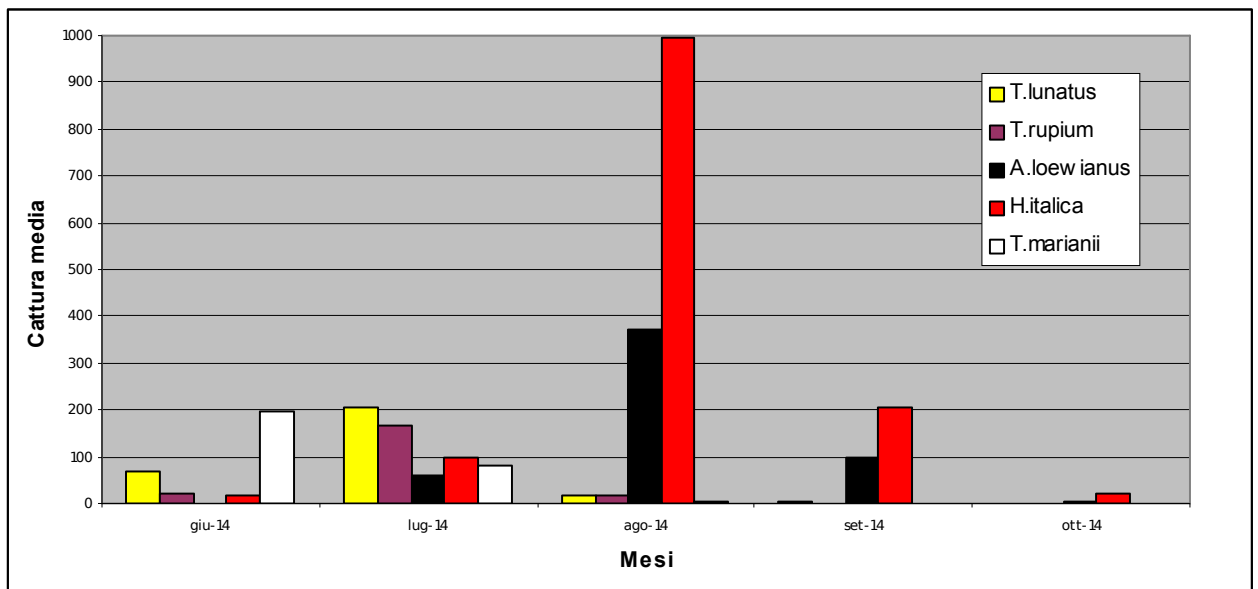


Fig.17 – Cattura media mensile delle 5 specie più abbondanti nel sito di Posta (2014)

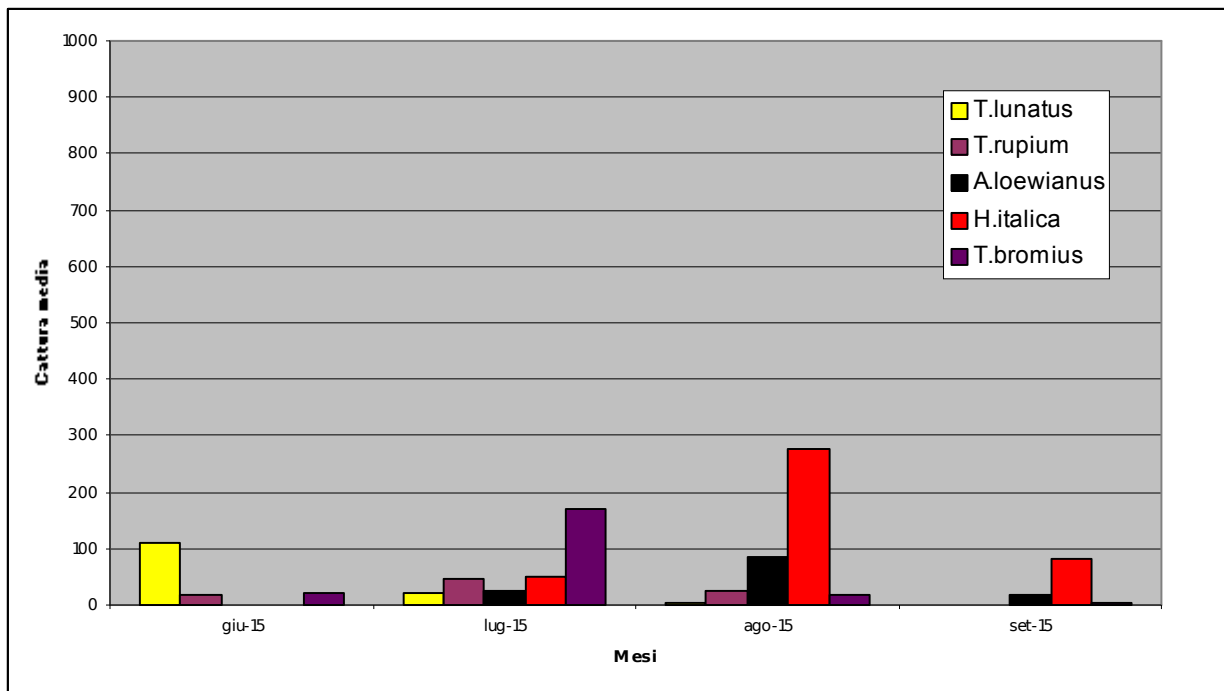


Fig.18 – Cattura media mensile delle 5 specie più abbondanti nel sito di Posta (2015)

Con l'eccezione di Borgorose nel 2014 e Vicovaro nel 2015, dove il picco più alto d'abbondanza è stato registrato dalla specie *A. loewianus*, in tutti gli altri siti le catture più alte sono state registrate dalla specie *H. italica*. A Fiamignano nel 2014 questa specie ha presentato il picco massimo d'abbondanza nel mese di settembre, mentre negli altri casi le catture medie mensili più alte sono state sempre registrate ad agosto. La dominanza di *H. italica* appare particolarmente marcata nei siti di Vallemare, Fiamignano, e Posta nel 2014, dove questa specie ha registrato la cattura media mensile più alta in assoluto registrata in questa ricerca. *H. italica* è anche la sola specie che appare tra le prime 5 specie più abbondanti in tutti i siti oggetto di studio. La specie *T. lunatus* mostra una caratteristica fenologia precoce; compare già nelle catture di giugno e mostra il suo picco di abbondanza tra giugno e luglio, per poi decrescere.

Le catture effettuate nel 2015 mostrano, in generale, medie mensili nettamente inferiori rispetto a quelle effettuate nel 2014. Anche nel sito di Posta, campionato in entrambe le stagioni, tutte le specie hanno mostrato abbondanze maggiori nella prima stagione di campionamento, ad eccezione di *T. lunatus* nel mese di giugno.

Nel 2014, per confrontare l'efficacia di cattura delle trappole Horse-Pal e H-Trap, sono state effettuate, nei 4 siti di campionamento, delle catture in doppio, posizionando contemporaneamente entrambi i modelli di trappola. Le trappole venivano posizionate quanto più vicine possibile in situazioni ambientali analoghe. I risultati ottenuti sono espressi graficamente in Fig. 19 e 20.

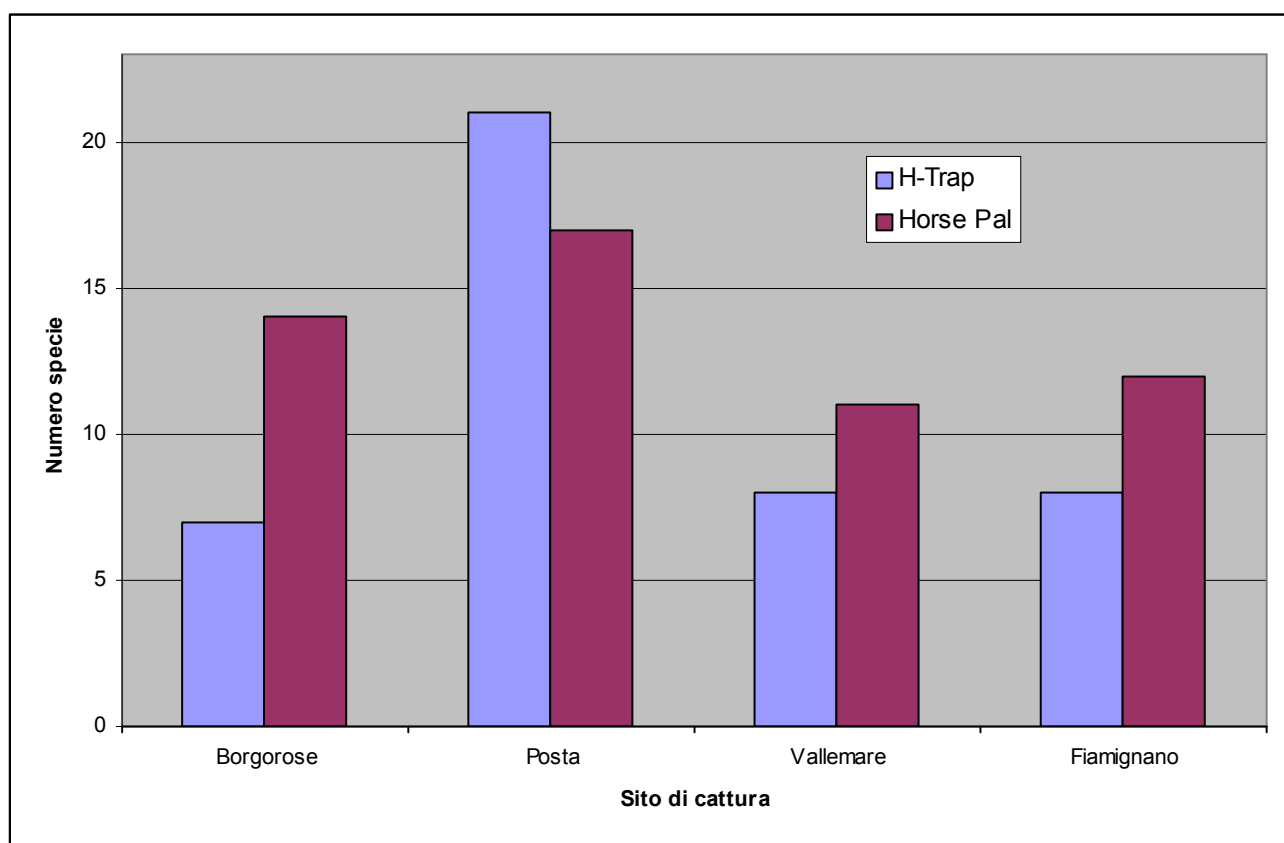


Fig. 19 – Numero di specie della famiglia Tabanidae catturate con i due modelli di trappola testati nello studio.

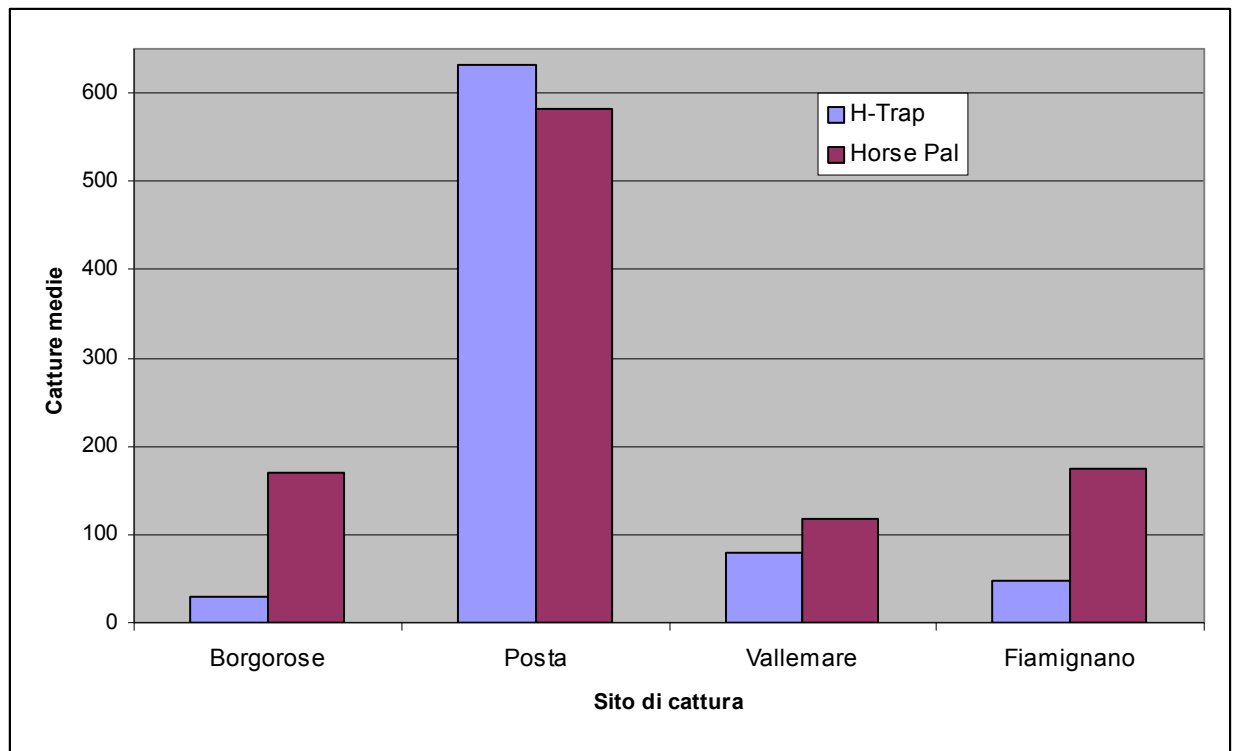


Fig. 20 – Catture medie con i due modelli di trappola testati nello studio.

La trappola Horse Pal è risultata mediamente più efficace, sia come numero di specie campionate che come catture medie ottenute, ad eccezione del sito di Posta, dove la H-Trap ha invece mostrato un'efficacia di campionamento maggiore rispetto alla Horse Pal.

Durante le 2 sessioni di cattura effettuate nel 2014 con la finalità di analizzare i residui di sangue sui pezzi boccali, sono stati catturati 73 esemplari nel sito di Vallemare e 1.011 in quello di Posta. A causa della scarsità della cattura di Vallemare, la ricerca di sangue sui pezzi boccali e successiva identificazione della specie ospite da parte della UO3 è stata effettuata solo su quelli presi a Posta, appartenenti alle specie: *A. latistriatus* (75), *A. loewianus* (97), *C. relictus* (1), *H. italica* (706), *T. bromius* (14), *T. exclusus* (28), *T. glaucopis* (77), *T. lunatus* (9), *T. rupium* (3). Dal 71,0% degli esemplari testati è stato possibile amplificare DNA proveniente da residui di sangue sui pezzi boccali. Nella maggior parte dei casi (54,9%) il DNA amplificato era in quantità insufficiente per permettere l'identificazione di specie mediante sequenziamento. L'identificazione della specie su cui il tafano aveva effettuato il pasto di sangue, eseguita sui 324 campioni da cui era stata amplificata una sufficiente quantità di DNA, ha dato i seguenti risultati: 301 bovino, 15 cavallo, 5 uomo, 2 capriolo, 1 *Mus musculus*. Tutte le specie di tafano sono risultate positive per la presenza di DNA di ospiti sui pezzi boccali. Le specie del genere

Tabanus sono risultate positive solo per sangue di bovino. Sui pezzi boccali di *H. italica*, la specie di gran lunga più rappresentata in questa prova, è stato rinvenuto DNA di tutte le specie ospiti identificate durante la prova. DNA di cavallo è stato rinvenuto anche sul genere *Atylotus*.

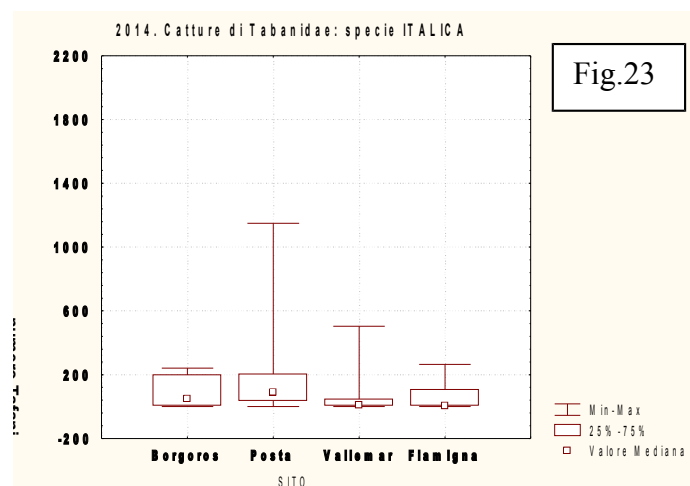
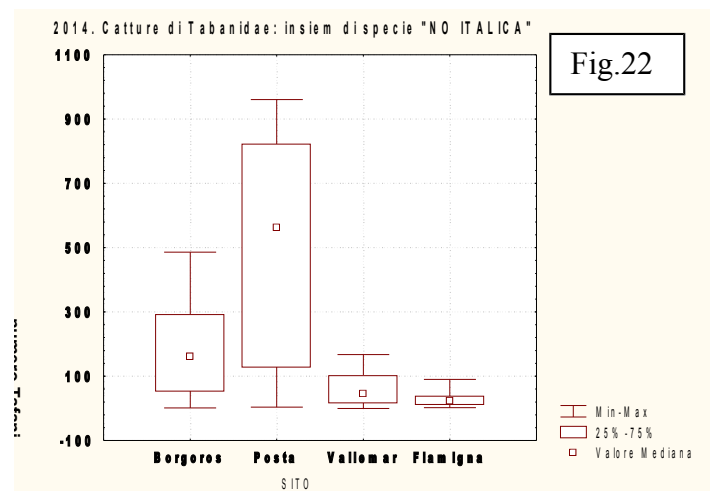
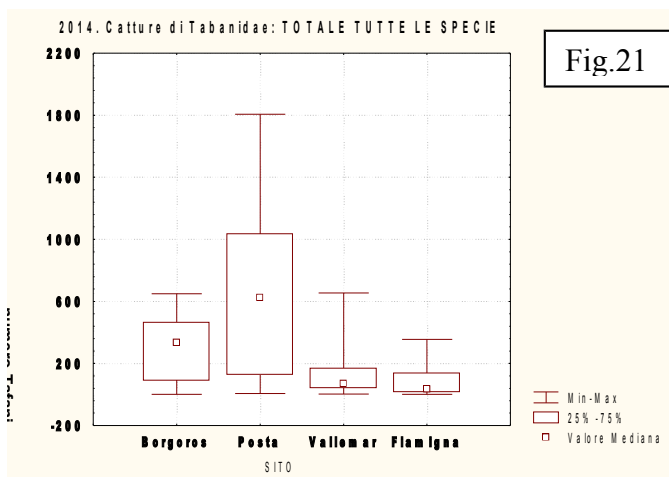
RISULTATI ANALISI STATISTICA

2014

1) Utilizzando i dati come riportati in Tabella 2 l'analisi non parametrica condotta ha evidenziato l'esistenza di abbondanze mediane complessive (indifferentemente dal mese di cattura) significativamente superiori nel sito Posta (rischio basso) rispetto agli altri siti, per la variabile dipendente abbondanza *Tabanidae_No_Italica* e *Tabanidae_Tot* (Tab.4). Non emergono differenze significative tra siti rispetto all'abbondanza di *H. italica*.

L'abbondanza osservata nel sito Borgorose (rischio alto) è risultata, seppur in modo non significativo superiore a Vallemare (rischio alto) e Fiamignano (rischio basso). Pur essendo stata classificata a rischio Basso Per AIE, Posta mostra i valori di abbondanza mediana complessiva superiori ai siti a alto e basso rischio.

Nelle Figure 21, 22 e 23 sono rappresentate graficamente le distribuzioni di abbondanza mediana complessiva di Tabanidi in funzione del sito di cattura.



za per *Tabanidae_Tot*, *Tabanidae_No_Italica* e *H. italica* (Fig. 24, 25, 26).

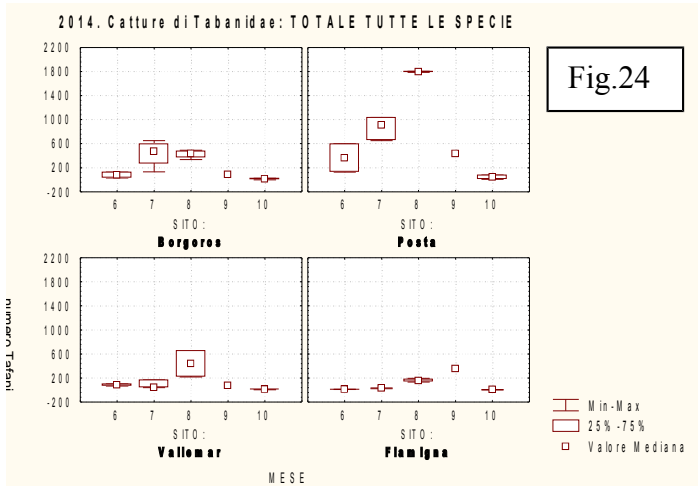


Fig.24

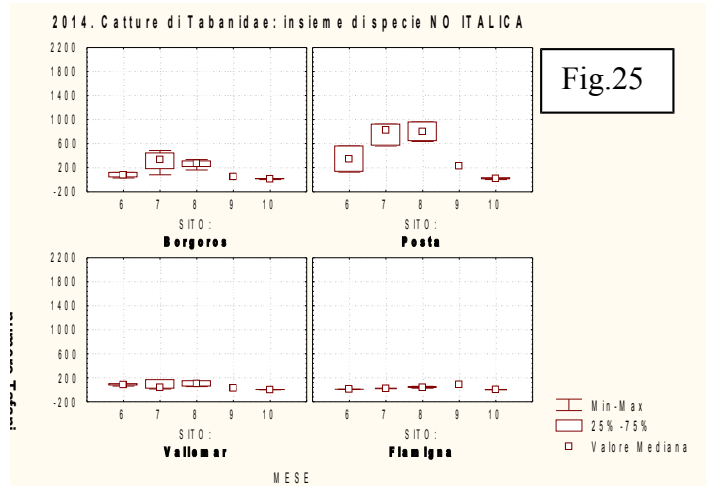


Fig.25

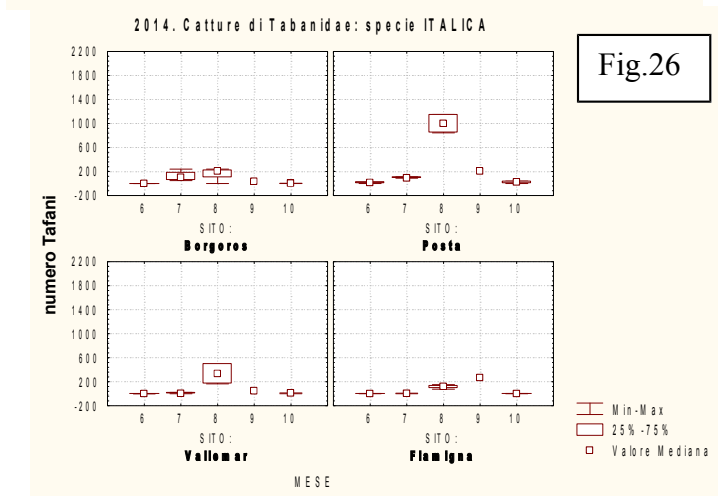


Fig.26

Il trend macroscopico descrive un incremento progressivo dell'abbondanza di tabanidi tra giugno ed agosto per Tabanidae_No_Italica (che determina anche il trend totale) ed anche, seppur in minor intensità per *H. italica*, in particolare per i siti Posta e Borgorose. Viceversa, negli altri due siti, tale trend risulta meno evidente, ad eccezione di un picco ad agosto per *H. italica* a Vallemare, segnalando abbondanze costanti durante il periodo di attività dei tabanidi. Nei mesi di settembre ed ottobre le abbondanze decrescono fino a livelli pari o inferiori a quelli di giugno (riduzione statisticamente significativa a Borgorose e Posta per Tabanidae_No_Italica).

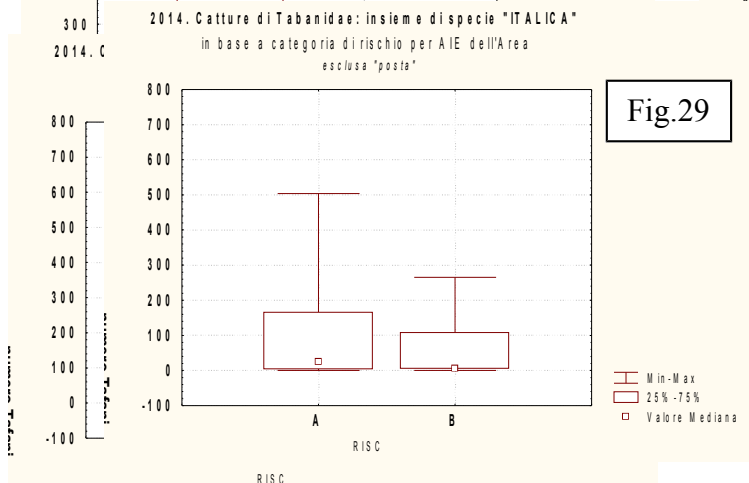
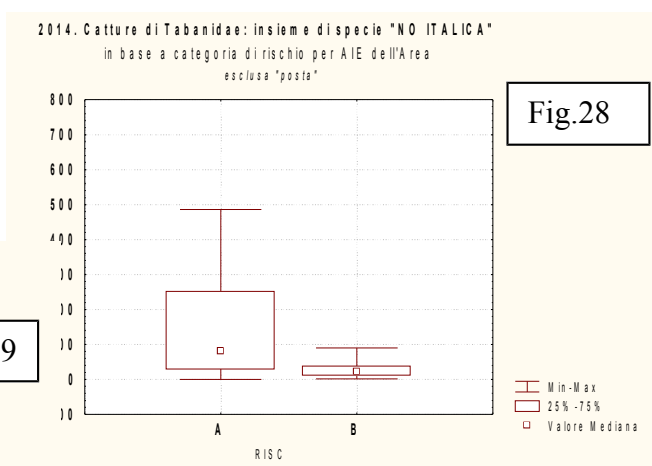
Si sottolinea inoltre che non è emersa alcuna differenza significativa tra le abbondanze mensili di Tabanidae_No_Italica e *H. italica* nei siti di Vallemare e Fiamignano. Viceversa si segnala che nei siti di Borgorose e Posta le abbondanze di Tabanidae_No_Italica sono risultate superiori rispetto a *H. italica*, con differenze significative nei mesi di giugno e Luglio. Per la specie *H. italica* non risultano differenze di rilievo tra i 4 siti ad eccezione dell'abbondanza significativamente più elevata nel mese di agosto a Posta.

Il sito di Posta ha mostrato le abbondanze totali per Tabanidae_Tot e Tabanidae_No_Italica significativamente più elevate nei mesi di luglio-agosto rispetto a Borgorose (rischio alto), Vallemare (rischio alto) e Fiamigano (rischio basso). Il sito di Borgorose (rischio basso) ha mostrato le abbondanze totali per Tabanidae_Tot e Tabanidae_No_Italica significativamente più elevate nei mesi di luglio-agosto rispetto a Fiamigano (Basso). E' stato operato un confronto di dettaglio nell'ambito del quale sono emerse abbondanze significativamente più elevate a luglio ed agosto a Posta VS Borgorose (Fig. 27). Tutte le significatività sono riferite al test ANOVA Kruskal Wallis.

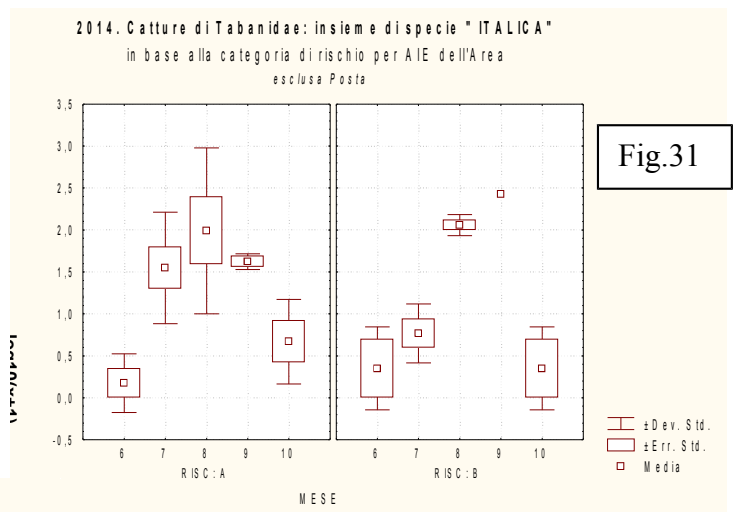
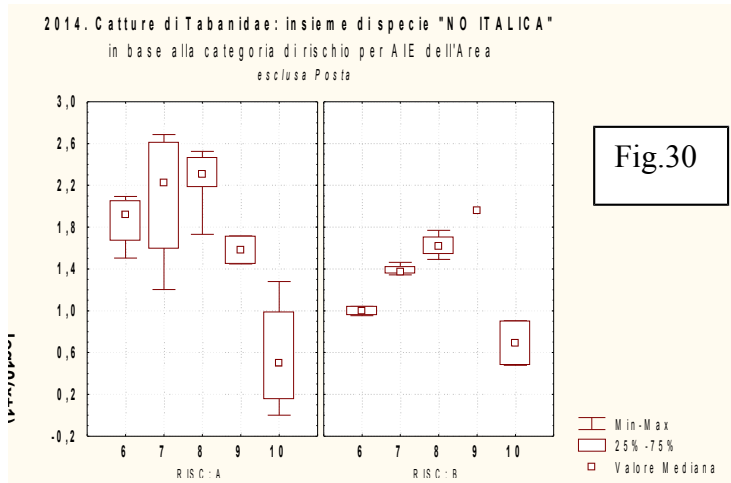
3) I dati relativi ai singoli siti sono stati aggregati in funzione della categoria di rischio attribuita a priori a ciascuno di essi, definendo quindi due gruppi per il confronto; Rischio Alto VS Rischio Basso. Essendo risultato come sito in realtà con le maggiori abbondanze osservate nel 2014, l'analisi è stata condotta anche escludendo il sito di posta (rischio basso), al fine di evitare prevedibili distorsioni dei risultati. Non essendo invece emerse differenze statisticamente significative tra Borgorose e Vallemare, entrambe definite a rischio alto, i siti sono stati raggruppati nella stessa categoria di rischio alto.

Per il confronto tra le abbondanze annuali complessive è stato utilizzato il metodo ANOVA di Kruskal Wallis. E' stata invece utilizzata la statistica parametrica segmentazione ANOVA (correlazione per gruppi) previa trasformazione logaritmica (LOG10X+1) dei dati di abbondanza e confronto post hoc mediante test HSD (honest significant difference) di Turkey per campioni diseguali, al fine di confrontare le abbondanze mensili in funzione dell'area di rischio.

L'area a rischio alto ha mostrato abbondanze annuali complessive significativamente superiori all'area a rischio basso per Tabanidae_No_Italica (Kruskal Wallis Test p-level = 0,0151). Nessuna differenza significativa è emersa per *H. italica* (Fig. 27, 28, 29).



Le differenze significative osservate al confronto tra le abbondanze medie complessive annuali, potrebbero essere determinate da una maggior abbondanza di Tabanidae_No_Italica nelle aree a rischio alto nei mesi di giugno luglio ed agosto (Fig. 30, 31). Tuttavia all'analisi Post Hoc di Turkey, tali differenze non risultano significative. Si evidenzia anche qui un generale trend di crescita progressiva delle abbondanze tra giugno ed agosto in entrambe le categorie di rischio. Non si riscontrano differenze significative di abbondanza di *H. italica* tra area a rischio alto e basso ad eccezione del picco di settembre nelle aree a Rischio basso (Fig. 32).



14: Cature di Tabanidae: insieme di specie NON ITALICA e specie ITALICA
in base a categoria di rischio per AIE dell'Area

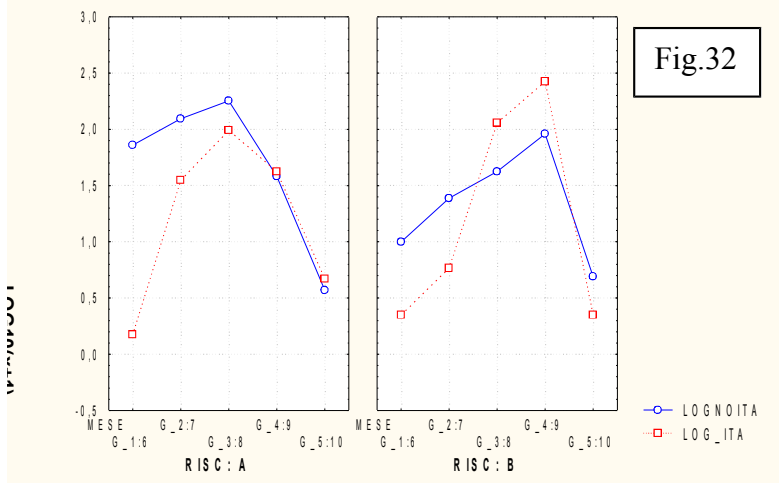


Fig.32

Tabella 2. 2014. Risultati aggregati conteggi di Tabanidae per sito di cattura. Dato complessivo

Sito	Area di rischio AIE	N° di catture	Conta Tabanidae TOTALE				Conta Tabanidae: insieme NO ITALICA				Conta Tabanidae: specie ITALICA			
			Media	I quartile	Mediana	III quartile	Media	I quartile	Mediana	III quartile	Media	I quartile	Mediana	III quartile
Borgorose	alto	13	284,3	86	335	465	192,4	51	161	292	91,9	4	50	200
Posta	basso	10	743,6	126	625	1037	486,5	126	562,5	822	257,1	34	90	205
Vallemare (posta)	alto	10	139,1	40	70,5	170	62,3	15	45,5	102	76,8	3	9,5	48
Fiamignano	basso	13	88	12	34	138	29,2	10	23	38	58,8	4	6	108
Tutti		46	297,1	31	129	434	181,9	22	55,5	252	115,2	3	34,5	140

Tabella 3. 2015. Risultati aggregati conteggi di Tabanidae per sito di cattura. Dato complessivo

Sito	Area di rischio AIE	N° di catture	Conta Tabanidae TOTALE				Conta Tabanidae: insieme NO ITALICA				Conta Tabanidae: specie ITALICA			
			Media	I quartile	Mediana	III quartile	Media	I quartile	Mediana	III quartile	Media	I quartile	Mediana	III quartile
Posta	basso	11	333,0	74	298	571	249,9	71	198	305	83,1	0	43	123
Sacrofano	nullo	16	41,4	10	12	61,5	18	7,5	10,5	25,5	23,4	0	3	28
Vicovaro	nullo	12	32,8	7	38,5	47,5	21,25	7	15	38	11,6	0	0	17,5
Borgovel	nullo	11	46,8	14	27	81	32,3	5	25	47	14,5	0	1	25
Tutti		50	104,7	11	43	111	72,9	8	23,5	47	31,8	0	1,5	41

Tabella 4. 2014: Confronto tra le abbondanze mediane di tabanidi tra siti di cattura. Significatività delle differenze per $p < 0,05$ all'analisi ANOVA di Kruskal Wallis

ANOVA Kruskal Wallis	Tutte le specie	Insieme di specie "no Italica"	Specie "Italica"
Borgorose VS Posta	$p < 0,05$	$p < 0,05$	ns
Borgorose VS Vallemare	ns	ns	ns
Borgorose VS Fiamignano	ns	ns	ns
Posta VS Vallemare	$p < 0,05$	$p < 0,05$	ns
Posta VS Fiamignano	$p < 0,05$	$p < 0,05$	ns
Vallemare VS Fiamignano	ns	ns	ns

Tabella 5. 2014: Risultati aggregati conteggi di Tabanidae per Area di Rischio.

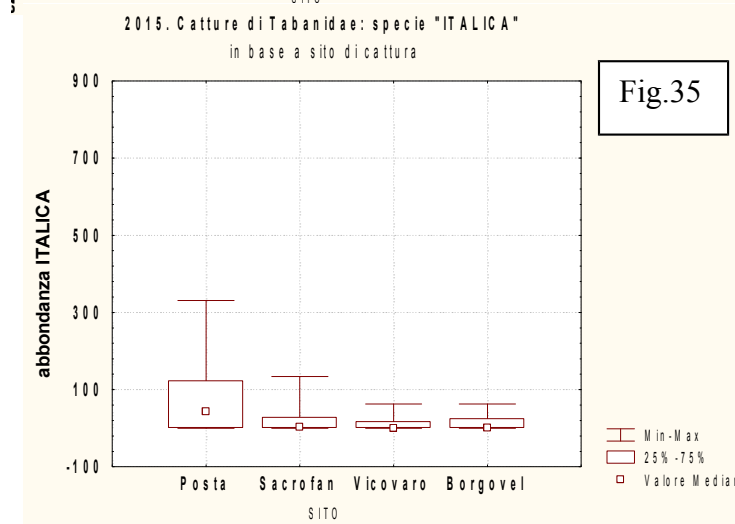
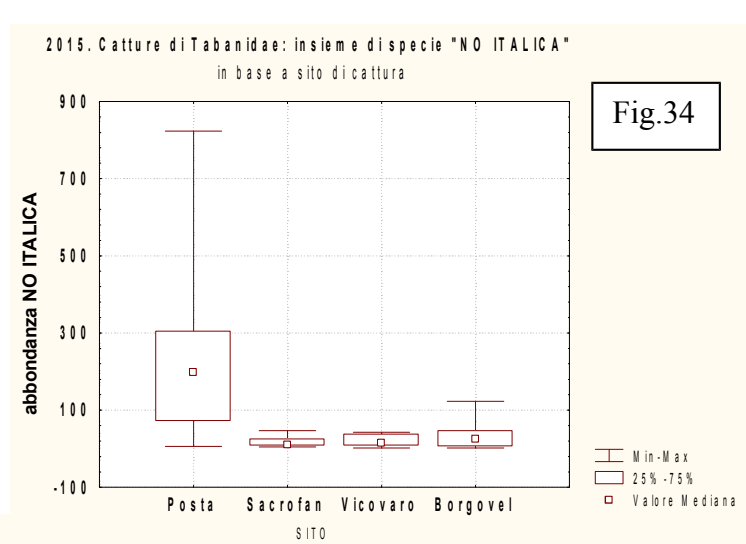
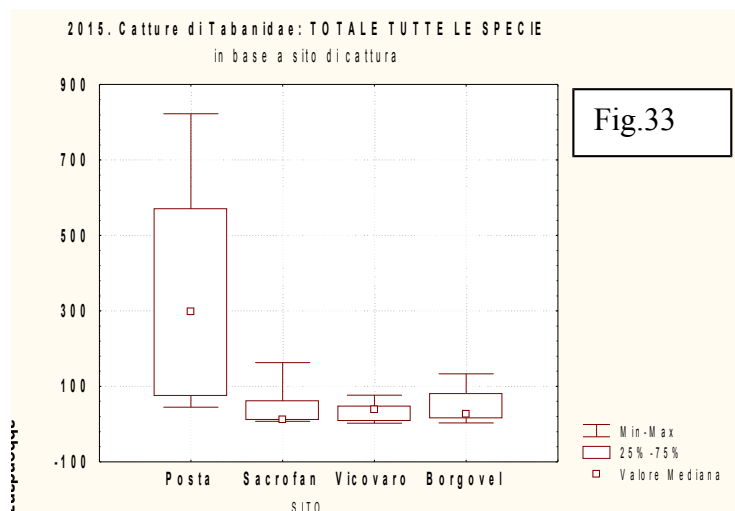
Aria di rischio	Conta Tabanidae TOTALE				Conta Tabanidae: insieme NO ITALICA				Conta Tabanidae: specie ITALICA			
	Media	I quartile	Mediana	III quartile	Media	I quartile	Mediana	III quartile	Media	I quartile	Mediana	III quartile
Alto (A) (Borgorose+Vallemare)	221,17	40	127	403	135,83	27	81	252	85,3478	3	25	166
Basso (B) (Fiamignano)	88	12	34	138	29,23	10	23	38	58,7692	4	6	108
Tutti	173,08	25,5	94	277	97,33	19,5	40,5	137	75,75	3	13,5	134,5

2015

1) Utilizzando i dati come riportati in Tabella 3, l'analisi non parametrica condotta ha evidenziato l'esistenza di abbondanze mediane complessive (indifferentemente dal mese di cattura) significativamente superiori nel sito "Posta" (rischio basso) rispetto a tutti gli altri siti per Tabanidae_No_Italica, *H. italica* e Tabanidae_Tot (Tab.6; Fig. 33, 34, 35). Per ciascun sito di cattura, non emergono differenze significative di abbondanza tra Tabanidae_No_Italica e *H. italica*.

Tabella 6. 2015: Confronto tra le abbondanze mediane di tabanidi tra siti di cattura. Significatività delle differenze per $p < 0,05$ all'analisi ANOVA di Kruskal Wallis.

ANOVA Kruskal Wallis	tutte le specie totale	insieme di specie no Italica	specie Italica
Posta VS Sacrofano	$p < 0,05$	$p < 0,05$	ns
Posta VS Vicovaro	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Posta VS borgovelino	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Serofano VS Vicovaro	ns	ns	ns
Sacrofano VS Borgovelino	ns	ns	ns
Vicovaro VS Boorgovelino	ns	ns	ns

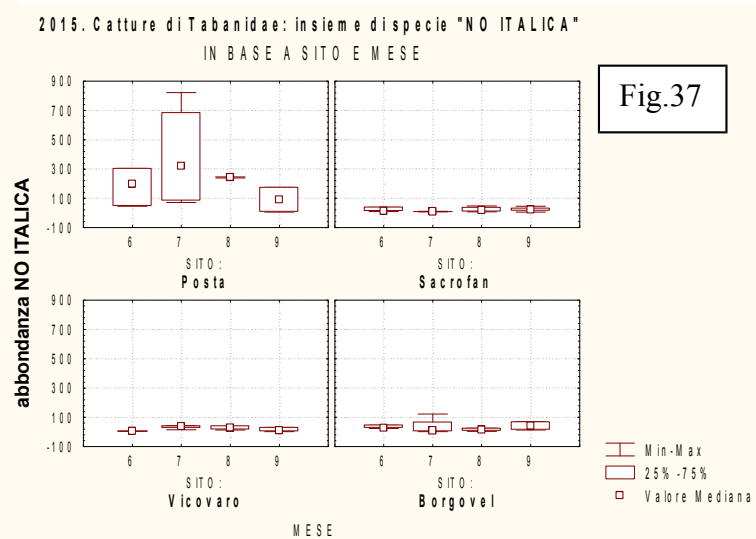
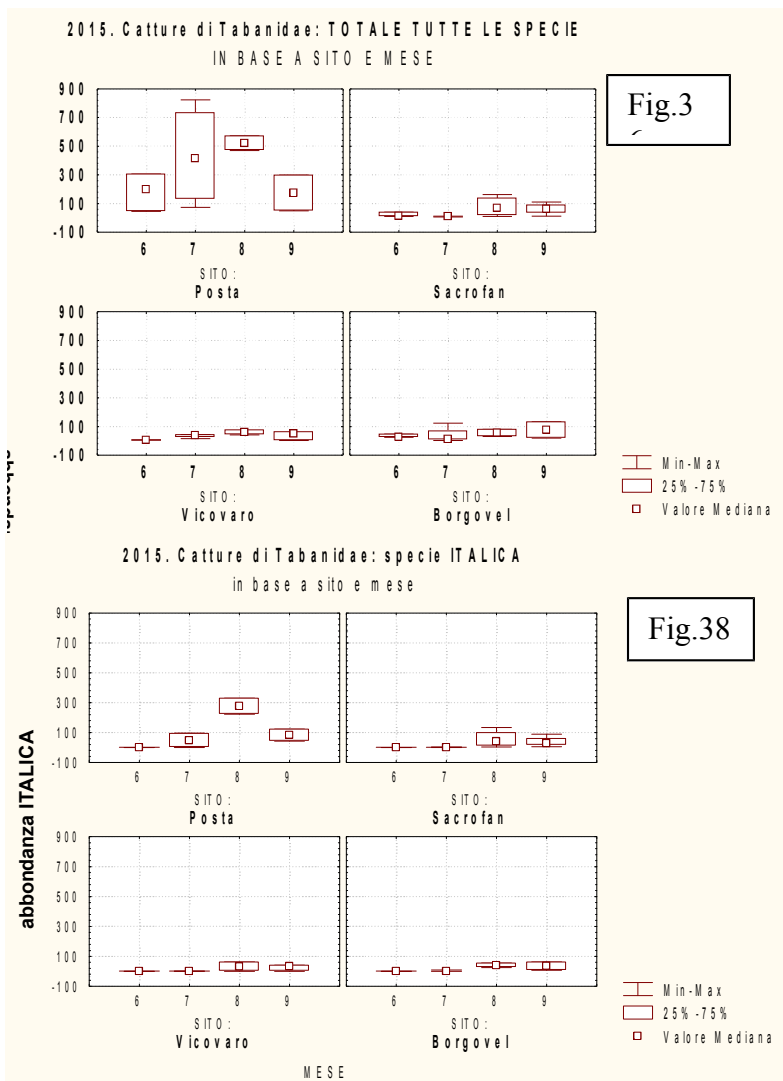


2) Sono state confrontati i trend di abbondanza per Tabanidae_Tot, Tabanidae_No_Italica e *H. italica* tra i siti in funzione del mese di cattura (Fig. 36, 37, 38). Il trend macroscopico descrive un incremento progressivo dell'abbondanza di tabanidi a Posta tra giugno ed agosto per Tabanidae_No_Italica (che determina anche il trend totale) e per la specie *H. italica*.

Le abbondanze di Tabanidae_No_Italica risultano significativamente superiori a Posta rispetto agli altri siti nel mese di luglio. Per la specie *H. italica* la significatività è spiegata dal picco di abbondanza registrato ad agosto a Posta rispetto alle abbondanze mensili osservate negli altri siti nel periodo giugno-settembre.

Non si riscontrano differenze significative di abbondanza mensile per i tre livelli di aggregazione-specie tra i siti Sacrofano, Vicovaro e Borgovelo. Negli stessi tre siti non si registrano differenze significative di abbondanza tra Tabanidae_No_Italica e *H. italica*, mentre a Posta l'abbondanza mensile di giugno e luglio di Tabanidae_No_Italica è risultata significativamente superiore rispetto a *H. italica*.

Tutte le significatività sono riferite al test ANOVA Kruskal Wallis.

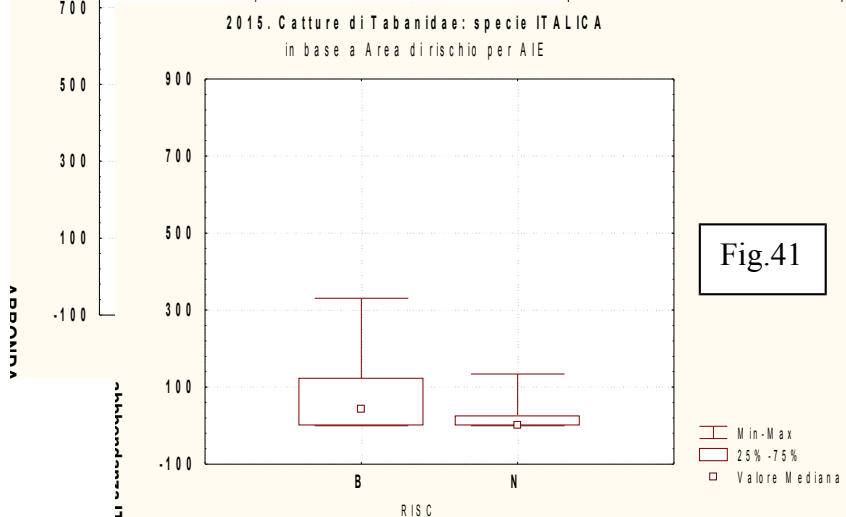
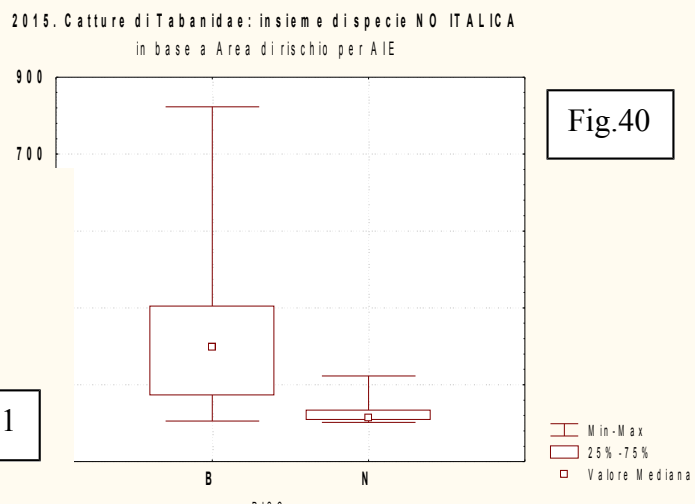


3) I dati relativi ai singoli siti sono stati aggregati in funzione della categoria di rischio attribuita a priori a ciascuno di essi, definendo quindi due gruppi per il confronto; rischio basso VS rischio nullo. Non essendo emerse differenze statisticamente significative tra Sacrofano, Vicovaro e Borgovelino, definite a rischio nullo, i siti sono stati raggruppati nella stessa categoria di rischio Nullo. Per il confronto tra le abbondanze annuali complessive è stato utilizzato il metodo ANOVA di Kruskal Wallis. E' stata invece utilizzata la statistica parametrica segmentazione ANOVA (correlazione per gruppi) previa trasformazione logaritmica (LOG10X+1) dei dati di abbondanza e confronto post hoc mediante test HSD (honest significant difference) di Turkey per campioni diseguali, al fine di confrontare le abbondanze mensili in funzione dell'area di rischio e le differenze tra abbondanze di Tabanidae_No_Italica e *H. italica*.

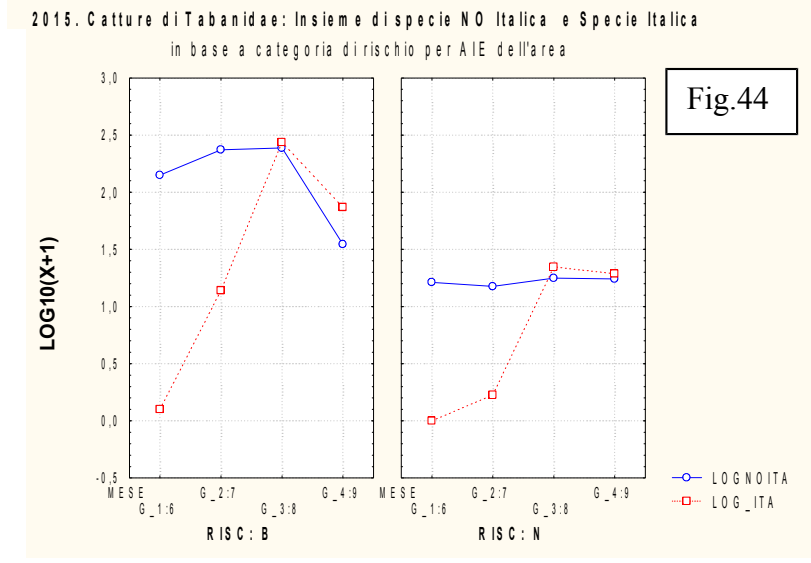
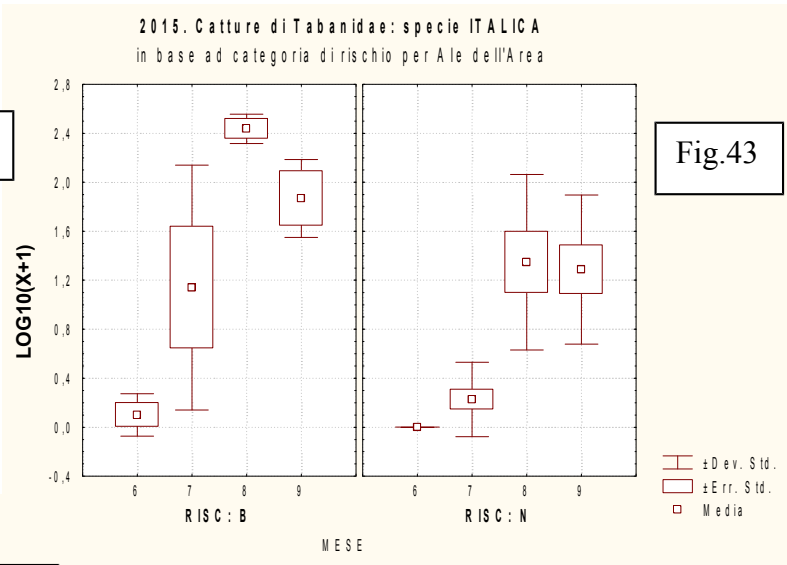
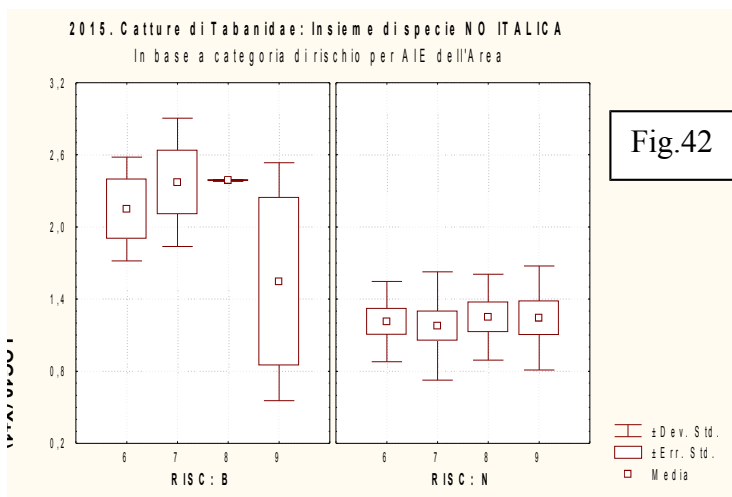
L'area a rischio basso ha mostrato abbondanze annuali complessive significativamente superiori all'area a rischio nullo sia per Tabanidae_No_Italica (Kruskal Wallis Test p-level = 0,00211) sia per Tabanidae_Tot (Kruskal Wallis Test p-level = 0,0001). Nessuna differenza significativa è emersa per *H. italica*. (Tabella 7; Fig. 39, 40, 41)

Tabella 7. 2015: Risultati aggregati conteggi di Tabanidae per Area di Rischio.

Area di rischio	Conta Tabanidae TOTALE				Conta Tabanidae: insieme NO ITALICA				Conta Tabanidae: specie ITALICA			
	Media	I quartile	Mediana	III quartile	Media	I quartile	Mediana	III quartile	Media	I quartile	Mediana	III quartile
Basso (Posta)	333	74	298	571	249,91	71	198	305	83,09	0	43	123
Nullo (Sacrofano Vicovaro Borgovelino)	40,31	10	25	54	23,03	7	14	34	17,28	0	1	25
Tutti	104,7	11	43	111	72,94	8	23,5	47	31,76	0	1,5	41



Le abbondanze registrate per Tabanidae_No_Italica nell'area a rischio basso sono risultate significativamente più elevate di quelle registrate nell'area a rischio nullo nei mesi di giugno luglio ed agosto. Le abbondanze di *H. italica*, pur risultando più elevate nell'area a rischio basso, non hanno rivelato differenze statisticamente significative. Le abbondanze di Tabanidae_No_Italica sono risultate significativamente più elevate a giugno e luglio in entrambe le aree rispetto alle abbondanze della specie *H. italica* (Fig. 42, 43, 44).



Le abbondanze osservate nel 2014 e nel 2015 nel piano registrate abbondanze annuali complessive specie rispetto al 2015, tali differenze non risultano

tano significative (ANOVA di Kruskal Wallis $p > 0,05$). Pur risultando superiori le abbondanze mensili tuttavia non si segnalano differenze statisticamente significative.

Posta (rischio basso) e Borgorose (rischio alto) mostrano abbondanze più elevate per Tabanidae_Tot e Tabanidae_No_Italica nei mesi di luglio ed agosto rispetto agli altri due siti. Posta ha abbondanze in assoluto più elevate in tutti i siti. In entrambi i siti si osserva un chiaro trend di crescita delle abbondanze di Tabanidae_No_Italica tra giugno e agosto e si evidenziano abbondanze significativamente più elevate di Tabanidae_No_Italica rispetto a *H. italica*. Posta mostra picchi di abbondanza di Tabanidae_No_Italica in assoluto più elevati, anche rispetto a Borgorose nei mesi di luglio ed agosto. Negli altri 2 siti il trend stagionale (giugno ottobre) non risulta evidente e non si osservano i differenze di rilievo nelle dinamiche stagionali di *H. italica* e Tabanidae_No_Italica.

In generale, nelle aree a rischio alto si osserva un trend caratterizzato da maggiori abbondanze sin dal mese di giugno per Tabanidae_No_Italica, mentre *H. italica* presenta abbondanze assai ridotte in giugno ed una progressiva crescita nei mesi successivi. Nelle aree a rischio basso (con esclusione di Posta), i trend dei due livelli di aggregazione di specie risultano invece simili, con abbondanze basse a giugno, picco ad agosto e drastica diminuzione in settembre ottobre.

I siti definiti a priori a rischio nullo risultano omogenei e non presentano differenze di abbondanza per i tre livelli di aggregazione specie in base al mese di cattura. Si osserva inoltre che nelle aree a rischio nullo l'abbondanza di Tabanidae_No_Italica rimane pressoché costante nei mesi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questa è la prima ricerca condotta in Italia sui ditteri della famiglia Tabanidae come vettori dell'anemia infettiva equina. Principale obiettivo della ricerca era evidenziare eventuali differenze quali/quantitative tra le popolazioni di tafani in aree a diversa prevalenza del virus dell'AIE. Il ruolo dei tabanidi come vettori dell'AIE è ampiamente dimostrato in letteratura; tuttavia, trattandosi di vettori meccanici, la loro rilevanza epidemiologica nella circolazione del virus, se paragonata ad altre modalità di trasmissione, è ancora oggetto di dibattito. Numerosi studi sembrerebbero individuare la trasmissione da parte di vettori, e dei tabanidi in particolare, come la principale via di diffusione del virus. Si tratta però per lo più di studi effettuati negli

Stati Uniti, in situazioni ecologicamente differenti da quelle riscontrabili nel nostro territorio, in particolare per quanto riguarda abbondanza e composizione specifica delle popolazioni di potenziali vettori. In generale la trasmissione da parte di vettori meccanici è considerata un meccanismo meno efficiente se paragonato a quella da parte di vettori biologici. E' dimostrato però che in determinate condizioni, la trasmissione meccanica può essere un meccanismo molto efficace, in grado di provocare una notevole incidenza dell'agente patogeno trasmesso nella popolazione ospite. Perché ciò sia possibile, si devono verificare contemporaneamente le due seguenti condizioni; 1) presenza di abbondanti popolazioni di vettori; 2) presenza di ospiti viremici con alto titolo a stretto contatto con ospiti suscettibili (Desquesnes et al. 2009). La necessità del verificarsi di queste due condizioni fa sì che le epidemie legate a trasmissione di tipo meccanico siano solitamente eventi occasionali e transitori, che si alternano a periodi in cui la malattia sembra scomparire (Desquesnes et al. 2009). La trasmissione meccanica inoltre non richiede una competenza vettoriale specifica di una determinata specie per un determinato agente patogeno. Tutte le specie della famiglia Tabanidae si nutrono nello stesso modo ed hanno pezzi boccali simili e sono pertanto in grado di trasmettere meccanicamente il virus dell'AIE. Studi condotti negli USA hanno dimostrato che piuttosto che l'abbondanza della singola specie di vettore, nel caso della trasmissione dell'AIE da parte dei tafani il fattore rilevante era l'abbondanza della popolazione dei tafani intesi come gruppo (Foil 1989). Tuttavia gli stessi autori avevano precedentemente ipotizzato che le specie di dimensioni maggiori fossero vettori più efficaci per il maggior quantitativo di sangue residuo che si poteva rinvenire sui loro pezzi boccali e per il fatto che a causa della puntura più dolorosa vengono più frequentemente interrotti e scacciati durante il pasto di sangue (Foil 1989; Foil & Issel 1991; Baldacchino et al. 2014). Alcune specie del genere *Tabanus* arriverebbero a dover compiere fino a 9 pasti interrotti, prima di arrivare alla replezione.

Tra i siti in cui è stata effettuata l'attività di campionamento, quello di Posta è risultato nettamente dominante sia per il numero di esemplari catturati (11.099 su un totale di 18.902) che per numero di specie rinvenute. Questo risultato è probabilmente spiegabile con questioni ambientali. La maggior parte delle specie della famiglia Tabanidae ha bisogno, per lo sviluppo larvale, di ambienti umidi con presenza di acquitrini, stagni, laghetti o anche acqua correnti (Mikuska et al.; Baldacchino review). Poche sono le specie di questa famiglia che si sono affrancate dall'acqua per lo sviluppo larvale. Il sito di Posta è un sito con presenza di prati allagati per buona parte dell'anno, situati nelle strette vicinanze di un corso d'acqua perenne,

caratterizzato da acque fredde e limpide, e di un'ampia zona boschiva con radure. Questo sito è pertanto caratterizzato da tutti gli elementi favorevoli allo sviluppo di abbondanti popolazioni di tafani; 1) presenza di acquitrini per lo sviluppo larvale; 2) presenza di aree boschive utilizzate dagli adulti come siti di riposo durante i periodi di non attività; 3) presenza di prati e radure con ospiti (bovini ed equini) per l'effettuazione del pasto di sangue. Il sito di Posta è stato l'unico in cui l'attività di campionamento è stata effettuata sia durante il 2014 che durante il 2015, allo scopo di evidenziare eventuali differenze tra i due anni legate a questioni climatiche. Lo sviluppo dei tafani è fortemente influenzato dalle temperature e le piovosità che si registrano durante i mesi invernali e primaverili. Annate più piovose e relativamente più fredde consentono normalmente lo sviluppo di siti di sviluppo larvale di maggiore estensione e più duraturi. Al contrario temperature estive sopra la media di solito provocano una riduzione precoce dei siti di sviluppo larvale, con conseguente minor numero di vettori adulti in volo (Mikuska et al). Nel sito di Posta le catture riscontrate nel 2014 sono risultate nettamente più alte rispetto a quelle del 2015, evidenziando due stagioni diverse dal punto di vista climatico, la prima più favorevole allo sviluppo di abbondanti popolazioni di tafani. Effettivamente quella del 2014 è stata una stagione caratterizzata da una piovosità primaverile nettamente al di sopra della media, tale evidentemente da favorire lo sviluppo di popolazioni più abbondanti della media di numerose specie della famiglia Tabanidae. Questo dato è confermato anche se si prendono in considerazione gli altri siti oggetto di studio; tutti quelli campionati nel 2015 hanno, infatti, presentato catture significativamente inferiori rispetto a quelli del 2014. Questi dati rappresentano risultati già di per se epidemiologicamente interessanti, identificando le estati precedute da stagioni primaverili particolarmente piovose come le più a rischio per la circolazione dell'AIE, a causa di popolazioni di tafani con numerosità sopra la media che si sviluppano in questo tipo di stagioni.

Per quanto riguarda la stagionalità, i risultati della presente ricerca confermano quanto già riscontrato in altri paesi temperati in cui sono state condotti analoghi studi: i tafani allo stadio adulto sono attivi per un limitato periodo di tempo durante l'anno, 4-5 mesi nel periodo estivo, periodo durante il quale si assiste ad una successione di specie (Baldacchino et al., 2014). Tuttavia, nell'ambito di questo periodo di attività, alte numerosità si riscontrano solo in un range molto più ristretto, nei mesi di luglio ed agosto nei siti di campionamento selezionati in questo progetto. L'andamento del numero di specie secondo i siti si è presentato unimodale o bimodale, ma sempre nell'ambito del ristretto periodo di massima attività dei vettori. Ai margini di questi

picchi, nei mesi di maggio-giugno e di settembre-ottobre, le numerosità sono molto più basse. Nella stagione di campionamento 2015, risultata in generale meno favorevole ai tabanidi, già dall'inizio del mese di ottobre non è stato più possibile catturare adulti in volo. Lo stesso andamento è stato evidenziato sia per il numero delle specie che per l'abbondanza delle popolazioni. Riguardo alla fenologia delle diverse specie, in analogia con quanto riportato da altri autori (Baldacchino et al., 2014), si assiste nei diversi siti ad una successione stagionale, con specie precoci e specie tardive; in quasi tutti i siti la specie che appare per prima e che è a volte relativamente abbondante già nel mese di giugno è *T. lunatus*, che ha il suo picco di attività tra giugno e luglio e poi decresce e sparisce del tutto. *H. italica* al contrario, pur essendo la specie in assoluto più abbondante, non è mai stata catturata a giugno e presenta picchi relativi di attività fino alla fine della stagione di campionamento (settembre-ottobre).

Dai dati in nostro possesso emerge chiaramente come le condizioni microclimatiche e/o ecologiche locali rappresentino il fattore determinante in grado di influenzare le dinamiche dei tabanidi. Ciò appare dimostrato dall'evidente differenza nella dinamica vettoriale nei siti di Posta e Vallemare (località di Posta), estremamente vicini tra loro ma sostanzialmente differenti per le abbondanze assolute rilevate e per il trend stagionale di abbondanza dei tabanidi. Ciò rende verosimilmente alquanto labile la distinzione effettuata a priori tra aree a rischio alto e basso, almeno in determinate aree geografiche. Tale considerazione è avvalorata anche dal fatto che non emergono sostanziali differenze tra le dinamiche mensili di *H. italica* e Tabanidae_No_Italica tra i siti classificati a rischio basso e alto nel 2014. Interessante è invece la netta differenza delle abbondanze di Tabanidae_No_Italica tra area a rischio basso e nullo, determinate dai picchi di giugno luglio ed agosto nell'area a rischio basso.

E' stata inoltre osservata una significativa maggior abbondanza di tabanidae_No_Italica rispetto a *H. italica* in entrambe le aree nei mesi di giugno e luglio, mentre le abbondanze di specie *H. italica* raggiungono il picco in agosto settembre, con sfasamento di circa 1 mese nella dinamica di popolazione di tabanidi. I dati epidemiologici in nostro possesso sembrano indicare una maggiore corrispondenza di circolazione dell'AIE con la stagionalità di Tabanidae_No_Italica rispetto a *H. italica*.

In conclusione, si osservano chiare differenze di abbondanze assolute e dinamiche mensili tra i siti a rischio basso e nullo mentre non risultano differenze sostanziali tra siti a rischio alto e basso, fatta eccezione per una dinamica mensile di tabanidae_No_Italica caratterizzata da

abbondanze elevate già a partire da giugno nelle aree a rischio alto e picchi nel mese di luglio – agosto, in corrispondenza con i periodi di maggior rischio di incidenza di AIE negli equidi nel Lazio. Questi risultati sembrerebbero confermare quanto riportato in letteratura, circa un ruolo marginale delle specie del genere *Haematopota* come vettori meccanici dell'AIE.

Tra i due modelli di trappola messi a confronto, la Horse Pal è risultata migliore sia come numero di specie campionate che come numero medio di esemplari catturati. I due modelli considerati sono in realtà molto simili tra loro, sfruttando lo stessa tipologia di attrattivo visivo per la cattura dei tafani, così come un simile meccanismo a nassa per convogliare gli esemplari nel barattolo di cattura. L'osservazione diretta sul campo dei due tipi di trappola in azione ha permesso di evidenziare una maggiore efficacia della Horse Pal nel convogliare i tafani nel barattolo di cattura, dopo il loro arrivo sul e successivo decollo dal pallone di colore nero che costituisce l'attrattivo visivo di entrambe le trappole; in particolare la superficie della nassa su cui gli esemplari camminano verso l'alto e che li convoglia nel barattolo di cattura è costituita da una retina nella Horse Pall, da un imbuto di plastica rovescio nella H-Trap. In quest'ultima è stato possibile osservare direttamente che molti esemplari delle diverse specie scivolavano sulla superficie eccessivamente liscia e, non riuscendo ad entrare immediatamente nel barattolo, avevano una maggior probabilità di allontanarsi dalla trappola.

L'analisi sulla presenza e l'identificazione dei residui di pasti di sangue sui pezzi boccali dei tafani ha permesso di evidenziare la presenza di residui di sangue su una percentuale molto alta dei tafani catturati (71,0%), dimostrando come la maggior parte dei tafani in volo avessero i pezzi boccali contaminati con sangue degli ospiti su cui avevano precedentemente iniziato un pasto di sangue. Questo dato ha una certa rilevanza nell'epidemiologia della AIE e delle malattie trasmesse da vettori meccanici in generale, infatti solo i tafani che cercano un nuovo ospite avendo sui pezzi boccali residui del sangue dell'ospite precedente possono fungere eventualmente da vettori meccanici. I nostri dati consentono di dimostrare che questa frazione della popolazione è costituita da un altissimo numero di individui (717 nella nostra prova). Nel sito in cui è stata condotta la prova erano presenti alcuni bovini nelle strette vicinanze della trappola e dei cavalli che, a seconda del momento, erano più o meno vicini alla stessa. Dunque il dato relativo all'identificazione molecolare degli ospiti era abbastanza atteso. Risulta però notevole il numero di esemplari che veniva evidentemente scacciato durante il pasto di sangue e

che passava da un ospite all'altro (la trappola), per completare la replezione. Di fatto si può dire che una certa percentuale di questi individui, almeno quelli su cui è stato amplificato abbastanza DNA da poter procedere al sequenziamento (324 esemplari), sarebbero stati potenzialmente in grado di fungere da vettori meccanici del virus dell'AIE. Sebbene i numeri a disposizione non siano tali da consentire un'analisi statistica significativa, le specie del genere *Tabanus* hanno evidenziato una preferenza nei confronti dei bovini, *H. italica* una certa antropofilia. In generale i bovini sono risultati essere gli ospiti più colpiti; questo risultato potrebbe essere spiegato con il fatto che questi animali stazionavano di più in prossimità della trappola (Murari et al., 2010), mentre i cavalli si muovevano di più e mostravano comportamenti protettivi nei confronti dei tafani molto più incisivi, cercando riparo nel bosco vicino e passando appositamente attraverso dei cespugli per allontanare i tafani poggiati su di loro. I bovini sembravano invece sopportare molto meglio l'attacco da parte dei ditteri. Nonostante questo, alta è risultata la percentuale di esemplari in cerca di un altro ospite per completare il pasto.

I risultati del presente progetto di ricerca sembrano confermare la rilevanza dei tafani nell'epidemiologia dell'AIE in Italia Centrale. In tutti i siti campionati interessati storicamente da circolazione virale è stata riscontrata la presenza di popolazioni di tabanidi che nei mesi di luglio ed agosto raggiungono picchi di abbondanza molto rilevanti. Le specie del genere *Tabanus* sembrerebbero concorrere maggiormente alla circolazione del virus, se confrontate con quelle del genere *Haematopota* (*H. italica*), che pur essendo dominanti dal punto di vista quantitativo, avrebbero una minor rilevanza epidemiologica.

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

- Altunsoy, F., Kilic, A.Y., 2012. Seasonal abundance of horse fly (Diptera: Tabanidae) in Western Anatolia. *J. Entomol. Res. Soc.* 14, 95–105.
- Amano, K., 1985. Statistical analyses of the influence of meteorological factors on flight activity of female tabanids. *Kontyu (Tokyo)* 53, 161–172.
- Anderson, J.F., 1985. The control of horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *Myia* 3, 547–598.
- Andreeva, V.R., 1982. On ecologo-morphological typing of tabanid larvae (Diptera, Tabanidae). *Entomol. Rev.* 64, 49–54.

- Andreeva, V.R., Kilic, A.Y., Altunsoy, F., 2009. New contribution to information about tabanidae (Diptera) adult and larvae from West Anatolia. *J. Entomol. Res. Soc.* 11, 19–30.
- Baldacchino, F., Cadier, J., Porciani, A., Buatois, B., Dormont, L., Jay-Robert, P., 2013. Behavioural and electrophysiological responses of females of two species of tabanid to volatiles in urine of different mammals. *Med. Vet. Entomol.* 27, 77–85.
- Baldacchino, F., Gardes, L., De Stordeur, E., Jay-Robert, P., Garros, C., 2013. Blood-feeding patterns of horse flies in the French Pyrenees. *Vet. Parasitol.* 199, 283–288.
- Baldacchino, F., Manon, S., Puech, L., Buatois, B., Dormont, L., Jay-Robert, P., 2013. Olfactory and behavioural responses of tabanid horseflies to octenol, phenols and aged horse urine. *Med. Vet. Entomol.* <http://dx.doi.org/10.1111/mve.12038>.
- Baldacchino, F., Porciani, A., Bernard, C., Jay-Robert, P., 2013. Spatial and temporal distribution of Tabanidae in the Pyrenees Mountains: influence of altitude and landscape structure. *Bull. Entomol. Res.* 104, 1–11.
- Baldacchino, F., Puech, L., Manon, S., Hertzog, L.R., Jay-Robert, P., 2014. Biting behaviour of Tabanidae on cattle in mountainous summer pastures, Pyrenees, France, and effects on weather variables. *Bull. Entomol. Res.* <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485314000170>.
- Barros, A.M., 2001. Seasonality and relative abundance of Tabanidae (Diptera) captured on horses in the Pantanal, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96, 917–923.
- Barros, A.T.M., Foil, L.D., 2007. The influence of distance on movement of tabanids (Diptera: Tabanidae) between horses. *Vet. Parasitol.* 144, 380–384.
- Blaho, M., Egri, A., Bahidszki, L., Kriska, G., Hegedus, R., Akesson, S., Horvath, G., 2012a. Spottier targets are less attractive to tabanid flies: on the tabanid repellency of spotty fur patterns. *PLoS One.* <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041138>.
- Blaho, M., Egri, A., Szaz, D., Kriska, G., Akesson, S., Horvath, G., 2013. Stripes disrupt odour attractiveness to biting horseflies. Battle between ammonia, CO₂, and colour pattern for dominance in the sensory systems of host-seeking tabanids. *Physiol. Behav.* 119, 168–174.
- Carn, V.M., 1996. The role of dipterous insects in the mechanical transmission of animal viruses. *Br. Vet. J.* 152, 377–393.
- Chvala, M., Lyneborg, L., Moucha, J., 1972. The horse flies of Europe (Diptera, Tabanidae). Entomological Society of Copenhagen, Copenhagen.

- Cilek, J.E., Olson, M.A., 2008. Effects of carbon dioxide, an octenol/phenol mixture, and their combination on Tabanidae (Diptera) collections from French 2-tier box traps. *J. Med. Entomol.* 45, 638–642.
- Cook, R.F., Leroux, C., Issel, C.J., 2013. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: a review. *Vet. Microbiol.* 167, 181–204.
- Cooksey, L.M., Wright, R.E., 1987. Flight range and dispersal activity of the hostseeking horse fly, *Tabanus abactor* (Diptera, Tabanidae), in north central Oklahoma. *Environ. Entomol.* 16, 211–217.
- Desquesnes, M., Biteau-Coroller, F., Bouyer, J., Dia, M.L., Foil, L., 2009. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. *Int. J. Parasitol.* 39, 333–346.
- Djiteye, A., Diarra, M., Ouattara, I., Traore, D., 1998. Comparison of the efficacy of different traps and attractants for Tabanidae and *Stomoxys* in Mali. *J. Protozool. Res.* 8, 263–273.
- Duncan, P., Vigne, N., 1979. Effect of group-size in horses on the rate of attacks by blood-sucking flies. *Animal Behav.* 27, 623–625.
- Egri, A., Blaho, M., Kriska, G., Farkas, R., Gyurkovszky, M., Akesson, S., Horvath, G., 2012a. Polarotactic tabanids find striped patterns with brightness and/or polarization modulation least attractive: an advantage of zebra stripes. *J. Exp. Biol.* 215, 736–745.
- Egri, A., Blaho, M., Sondor, A., Kriska, G., Gyurkovszky, M., Farkas, R., Horvath, G., 2012b. New kind of polarotaxis governed by degree of polarization: attraction of tabanid flies to differently polarizing host animals and water surfaces. *Naturwissenschaften* 99, 407–416.
- Egri, A., Blaho, M., Szaz, D., Barta, A., Kriska, G., Antoni, G., Horvath, G., 2013a. A new tabanid trap applying a modified concept of the old flypaper: Linearly polarising sticky black surfaces as an effective tool to catch polarotactic horseflies. *Int. J. Parasitol.* 43, 555–563.
- Egri, A., Blaho, M., Szaz, D., Kriska, G., Majer, J., Herczeg, T., Gyurkovszky, M., Farkas, R., Horvath, G., 2013b. A horizontally polarizing liquid trap enhances the tabanid-capturing efficiency of the classic canopy trap. *Bull. Entomol. Res.* 103, 665–674.
- Ferreira-Keppler, R.L., Rafael, J.A., Guerrero, J.C.H., 2010. Seasonality and landscape use by tabanidae species (Diptera) in the Central Amazon, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 39, 645–654.
- Foil, L.D., 1983. A mark-recapture method for measuring effects of spatial separation of horses on tabanid (Diptera) movement between hosts. *J. Med. Entomol.* 20, 301–305.
- Foil, L.D., 1989. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitol. Today* 5, 88–96.

- Foil, L.D., Gorham, J., 2000. Mechanical transmission of disease agents by arthropods. In: Eldridge, B.F., Edman, J.D. (Eds.), *Medical Entomology*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 461–514.
- Foil, L.D., Hogsette, J.A., 1994. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Rev. Sci. Tech.* 13, 1125–1158.
- Foil, L.D., Issel, C.J., 1991. Transmission of retrovirus by arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 36, 355–381.
- Foil, L.D., Meek, C.L., Adams, W.V., Issel, C.J., 1983. Mechanical transmission of equine infectious anaemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Am. J. Vet. Res.* 44, 155–156.
- Foil, L.D., Adams, W.V., Issel, C.J., Pierce, R., 1984. Tabanid (Diptera) populations associated with an equine infectious anaemia outbreak in an inapparently infected herd of horses. *J. Med. Entomol.* 21, 28–30.
- Foil, L.D., Stage, D., Adams, W.V., Issel, C.J., 1985. Observations of tabanid feeding on mares and foals. *Am. J. Vet. Res.* 46, 1111–1113.
- Foil, L.D., Adams, W.V., McManus, J.M., Issel, C.J., 1987. Bloodmeal residues on mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera, Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens. *J. Med. Entomol.* 24, 613–616.
- Foil, L.D., Adams, W.V., McManus, J.M., Issel, C.J., 1988a. Quantifying the role of horse flies as vectors of equine infectious anemia. In: Powell, D.G. (Ed.), *Equine Infectious Diseases. Proceedings of the Fifth International Conference*. University Press of Kentucky, Lexington, pp. 189–195.
- Foil, L.D., Seger, C.L., French, D.D., Issel, C.J., McManus, J.M., Ohrberg, C.L., Ramsey, R.T., 1988b. Mechanical transmission of bovine leukemia virus by horse flies (Diptera, Tabanidae). *J. Med. Entomol.* 25, 374–376.
- Foil, L.D., French, D.D., Hoyt, P.G., Issel, C.J., Leprince, D.J., McManus, J.M., Seger, C.L., 1989a. Transmission of bovine leukemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1771–1773.
- Foil, L.D., Leprince, D.J., Church, G.E., 1989b. Changes in the parity rate of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) populations associated with controlling available hosts. *J. Med. Entomol.* 26, 306–310.

- Foil, L.D., Leprince, D.J., Byford, R.L., 1990. Sublethal effects and mortality of tabanids (Diptera) induced by fenvalerate treatment of cattle. *J. Entomol. Sci.* 25, 294–302.
- Ganeva, D., 1999. Daily activity of *Tabanus bromius* L., *Tabanus tergustinus* Egg and *Haematopota pluvialis* L. (Tabanidae, Diptera) in the Stara Zagora district. *Period. Biol.* 101, 215–220.
- Hackenberger, B.K., Jaric', D., Krc'mar, S., 2009. Distribution of tabanids (Diptera: Tabanidae) along a two-sided altitudinal transect. *Environ. Entomol.* 38, 1600–1607.
- Hall, M.J.R., Farkas, R., Chainey, J.E., 1998. Use of odour-baited sticky boards to trap tabanid flies and investigate repellents. *Med. Vet. Entomol.* 12, 241–245.
- Hansens, E.J., 1979. Tabanidae of the east coast as an economic problem: review. *J. New York Entomol. Soc.* 87, 312–318.
- Hawkins, J.A., Adams, W.V., Cook, L., Wilson, B.H., Roth, E.E., 1973. Role of horse fly (*Tabanus fuscicostatus* Hine) and stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.) in transmission of equine infectious anaemia to ponies in Louisiana. *Am. J. Vet. Res.* 34, 1583–1586.
- Hawkins, J.A., Adams Jr., W.V., Wilson, B.H., Issel, C.J., Roth, E.E., 1976. Transmission of equine infectious anemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 168, 63–64.
- Hollander, A.L., Wright, R.E., 1980. Impact of tabanids (Diptera: Tabanidae) on cattle: blood meal size and preferred feeding sites. *J. Econ. Entomol.* 73, 431–433.
- Horvath, G., Majer, J., Horvath, L., Szivak, I., Kriska, G., 2008. Ventral polarization vision in tabanids: horseflies and deerflies (Diptera : Tabanidae) are attracted to horizontally polarized light. *Naturwissenschaften* 95, 1093–1100.
- Horvath, G., Blaho, M., Kriska, G., Hegedus, R., Geric, B., Farkas, R., Akesson, S., 2010. Unexpected advantage of whiteness in horses: the most horsefly-proof horse has a depolarizing white coat. *Proc. R. Soc. B.* 277, 1643–1650.
- Issel, C.J., Foil, L.D., 1984. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184, 293–297.
- Kemen, M.J., McClain, D.S., Matthyse, J.G., 1978. Role of horse flies in transmission of equine infectious anemia from carrier ponies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172, 360–362.
- Konstantinov, S.A., 1993. The attack distance and the range and nature of the daily flight dispersion of horseflies in the genus *Hybomitra* (Diptera: Tabanidae). *Parazitologiya* 27, 419–426.
- Krc'mar, S., 2005. Response of horse flies (Diptera, Tabanidae) to different olfactory attractants. *Biologia Bratislava* 60, 611–613.

- Krc̣mar, S., Lajos, P., 2011. Response of horse flies to aged equine urine (Diptera: Tabanidae). *Entomol. Gen.* 33, 245–250.
- Krc̣mar, S., Mikuska, A., Merdic', E., 2006. Response of Tabanidae (Diptera) to different natural attractants. *J. Vector Ecol.* 31, 262–265.
- Krinsky, W.L., 1976. Animal-disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera, Tabanidae). *J. Med. Entomol.* 13, 225–275.
- Magnarelli, L.A., Anderson, J.F., 1980. Feeding-behavior of Tabanidae (Diptera) on cattle and serological analysis of partial blood meals. *Environ. Entomol.* 9, 664–667.
- Maresca, C., Scoccia, E., Faccenda, L., Zema, J., Costarelli, S., 2012. Equine infectious anemia: active surveillance in Central Italy 2007–2009. *J. Equine Vet. Sci.* 32, 596–598.
- Mihok, S., Mulye, H., 2010. Responses of tabanids to Nzi traps baited with octenol, cow urine and phenols in Canada. *Med. Vet. Entomol.* 24, 266–272.
- Mooring, M.S., Blumstein, D.T., Reisig, D.D., Osborne, E.R., Niemeyer, J.M., 2007. Insect-repelling behaviour in bovids: role of mass, tail length, and group size. *Biol. J. Linn. Soc.* 91, 383–392.
- Mullens, 2002. Horse flies and deer flies (Tabanidae). In: Mullen, G., Durden, L. (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press, San Diego, pp. 263–277.
- Muzari, M.O., Jones, R.E., Skerratt, L.F., Duran, T.L., 2010a. Feeding success and trappability of horse flies evaluated with electrocuting nets and odour-baited traps. *Vet. Parasitol.* 171, 321–326.
- Muzari, M.O., Skerratt, L.F., Jones, R.E., Duran, T.L., 2010b. Alighting and feeding behaviour of tabanid flies on horses, kangaroos and pigs. *Vet. Parasitol.* 170, 104–111.
- Perich, M.J., Wright, R.E., Lusby, K.S., 1986. Impact of horse flies (Diptera: Tabanidae) on beef-cattle. *J. Econ. Entomol.* 79, 128–131.
- Portillo-Rubio (Fauna Iberica. Vol. 18. Diptera: Tabanidae, 2002).
- Schreck, C.E., Kline, D.L., Williams, D.C., Tidwell, M.A., 1993. Field evaluations in malaise and canopy traps of selected targets as attractants for tabanid species (Diptera, Tabanidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9, 182–188.
- Sheppard, C., Wilson, B.H., 1977. Relationship of horse fly host seeking activity to edge of wooded areas in southern Louisiana. *Environ. Entomol.* 6, 781–782.

- Stein, C.D., Lotze, J.C., Mott, L.O., 1942. Transmission of equine infectious anemia by the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, the horse fly, *Tabanus sulcifrons* (Macquart) and by injection of minute amounts of virus. Am. J. Vet. Res. 3, 183–193.
- Van Hennekeler, K., Jones, R.E., Skerratt, L.F., Fitzpatrick, L.A., Reid, S.A., Bellis, G.A., 2008. A comparison of trapping methods for Tabanidae (Diptera) in North Queensland, Australia. Med. Vet. Entomol. 22, 26–31.
- Van Hennekeler, K., Jones, R.E., Skerratt, L.F., Muzari, M.O., Fitzpatrick, L.A., 2011. Meteorological effects on the daily activity patterns of tabanid biting flies in northern Queensland, Australia. Med. Vet. Entomol. 25, 17–24.
- Watson, D.W., Denning, S.S., Calibeo-Hayes, D.I., Stringham, S.M., Mowrey, R.A., 2007. Comparison of two fly traps for the capture of horse flies (Diptera: Tabanidae). J. Entomol. Sci. 42, 123–132.
- Wiesenhutter, E., 1975. Research into the relative importance of Tabanidae (Diptera) in mechanical disease transmission. II. Investigation of the behaviour and feeding habits of Tabanidae in relation to cattle. J. Nat. His. 9, 385–392.

RACCOMANDAZIONI

- 1) **in alcune delle aree dell'Italia centrale interessate dallo studio i ditteri della famiglia Tabanidae sono risultati molto abbondanti nei mesi più caldi dell'anno, con un elevato numero di specie e di individui registrato nei picchi stagionali. Trattandosi di vettori diurni, difficile se non impossibile sembra essere la protezione individuale degli equini nei confronti dei loro attacchi, sia per quanto riguarda i cavalli utilizzati per attività equestri sia per quanto riguarda asini e muli ancora oggi utilizzati nei lavori di taglio della legna nei boschi. Inoltre, nei confronti di questi vettori non sono al momento disponibili metodi di controllo, soprattutto nelle condizioni ambientali prevalentemente naturali che caratterizzano le aree di studio;**
- 2) **unico mezzo di prevenzione del contagio dell'AIE è il controllo periodico degli equini che vivono nelle aree a rischio nella stagione di massima attività dei vettori (giugno-agosto soprattutto) ed il successivo isolamento degli animali che dovessero risultare infetti.**

MODALITA' DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI

- 1) invio della relazione finale alle ASL coinvolte. Fruitore: veterinari del sistema sanitario nazionale coinvolti nell'ispezione dei prodotti ittici;
- 2) pubblicazione lavoro scientifico su rivista internazionale. Fruitore: tutte le persone interessate all'argomento, sia dal punto di vista scientifico che gestionale;
- 3) partecipazione ad eventi appositamente organizzati dall'Istituto Zooprofilattico Lazio e Toscana per la presentazione dei risultati delle Ricerche Correnti.