



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di: **Biomedicina Comparata e Alimentazione**

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: **SCIENZE VETERINARIE**  
CICLO XXVI

**ANALISI ECOLOGICA DEI FLEBOTOMI VETTORI DELLA  
LEISHMANIOSI CANINA IN ITALIA NORD-ORIENTALE  
ATTRAVERSO L'UTILIZZO  
DI SISTEMI INFORMATIVI GEOGRAFICI (GIS)  
E MODELLI DI DISTRIBUZIONE DI SPECIE**

**Direttore della Scuola:** prof. GIANFRANCO GABAI

**Supervisore:** prof. MARIO PIETROBELLI

**Co-supervisore:** dott. RUDI CASSINI

**Dottoranda:** dott.ssa MANUELA SIGNORINI

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>PARTE GENERALE</b>	4
<b>1 La leishmaniosi canina: malattia emergente</b>	5
<b>1.1 La leishmaniosi canina in Europa</b>	6
<b>1.2 Il caso italiano</b>	8
<b>2 Sistemi di sorveglianza e controllo</b>	11
<b>2.1 Strategie di sorveglianza della leishmaniosi canina</b>	11
2.1.1 Morfo-fisiologia e biologia di <i>Leishmania infantum</i>	11
2.1.2 Monitoraggio epidemiologico	14
2.1.3 Trattamento farmacologico	16
2.1.4 Vaccinazione	17
<b>2.2 Strategie di monitoraggio dei vettori</b>	18
2.2.1 Biologia ed ecologia dei flebotomi	19
2.2.2 Metodi di monitoraggio	26
2.2.3 Controllo dei vettori	28
<b>2.3 GIS, Remote Sensing e modelli predittivi</b>	30
2.3.1 GIS e RS	30
2.3.2 Analisi ecologiche e modelli predittivi di distribuzione di specie	36
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	50
<b>1 Scopo dello studio</b>	51
<b>2 Materiali e metodi</b>	54
<b>2.1 Area di studio: il Triveneto, clima e orografia</b>	54
<b>2.2 Monitoraggio entomologico</b>	57
<b>2.3 Analisi di laboratorio</b>	60

<b>2.4 Analisi dei dati di campo</b>	61
2.4.1 Analisi preliminari	61
<b>2.5 Analisi dei dati ambientali e modelli predittivi</b>	62
2.5.1 Dati geografici e telerilevati utilizzati	62
2.5.2 Creazione del geo-database	68
2.5.4 Modelli predittivi di distribuzione di specie	71
2.5.5 Validazione del modello predittivo	74
<b>3 Risultati</b>	76
<b>3.1 Analisi dei dati di campo</b>	76
3.1.1 Analisi descrittive	76
3.1.2 Analisi dei fattori di rischio	78
<b>3.2 Analisi delle variabili ambientali e modelli predittivi</b>	80
3.2.1 Analisi preliminari	80
3.2.2 Modelli predittivi di distribuzione di specie	88
3.2.3 Validazione	94
<b>4 Discussione</b>	96
<b>4.1 Analisi descrittiva</b>	96
<b>4.2 Analisi ecologica e modelli di distribuzione di specie</b>	99
<b>5 Considerazioni conclusive</b>	103
<b>Allegato 1</b>	105
<b>Allegato 2</b>	111
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	117
<b>SITOGRAFIA</b>	141

## RIASSUNTO

A partire dagli anni '90, sono stati evidenziati nuovi focolai autoctoni di leishmaniosi canina in Italia settentrionale, area fino agli anni precedenti considerata indenne. Gradualmente, la malattia si è diffusa nelle Regioni dell'arco alpino e i monitoraggi entomologici condotti, hanno evidenziato la presenza stabile di due vettori della malattia, *P. perniciosus* e *P. neglectus*, in diverse aree del Territorio. Il cambiamento della distribuzione della malattia sembra legato principalmente al movimento dei cani infetti dalle aree endemiche, all'aumento degli spostamenti di merci, animali e persone ed ai cambiamenti climatici, determinanti per la sopravvivenza dei vettori.

Lo studio descrive i risultati di 12 anni di campionamenti entomologici, condotti in Veneto, Friuli Venezia Giulia e Trentino Alto Adige, analizzati attraverso l'utilizzo di strumenti GIS e modelli di distribuzione di specie (SDMs) basati su dati ambientali ottenuti tramite *remote sensing*. Sono state analizzate diverse caratteristiche climatiche ed ambientali, relazionandole con i dati relativi ai monitoraggi, con la finalità di comprendere meglio l'ecologia dei vettori e l'epidemiologia della malattia, per creare uno strumento di supporto alle attività di sorveglianza.

Il monitoraggio è stato condotto dal 2001 al 2012 in 175 siti, utilizzando *sticky traps* (n=114 siti), *CDC light traps* (n=53 siti) e *CO<sub>2</sub> traps* (n=66 siti). I siti sono stati georeferenziati ed alcuni possibili fattori di rischio (altitudine, numero e specie di animali esca, tipologia di sito e livello di urbanizzazione) sono stati individuati e registrati sul campo. I dati di presenza/assenza dei flebotomi sono stati analizzati in funzione dei fattori di rischio considerati, di due variabili ambientali ottenute dal sensore MODIS (*Normalized Difference Vegetation Index* e *Land Surface Temperature*), di una mappa di uso del suolo (*Corine Land Cover 2006*), di un modello digitale del terreno (GTOPO30) e di una variabile climatica ottenuta dal data set WorldClim (BIO 18), relativa alle precipitazioni medie registrate nei trimestri più caldi.

Le variabili risultate più rilevanti sono state utilizzate per elaborare un modello predittivo della presenza di *P. perniciosus* e dei flebotomi in Triveneto, utilizzando il software MaxEnt (Maximum Entropy Modeling System).

In totale sono stati raccolti e identificati 6.144 flebotomi e *P. perniciosus* si è dimostrato essere la specie più rappresentata nel territorio (3.797 esemplari, 61,8%), con densità paragonabili a quelle registrate nelle aree endemiche del centro-sud Italia. L'analisi ecologica dei fattori di rischio ha individuato la fascia altitudinale tra i 100 e i 300 m s.l.m. come quella più idonea ai flebotomi. L'analisi delle variabili ambientali ha evidenziato che i flebotomi e *P. perniciosus* prediligono ambienti collinari, caratterizzati da un clima mite, elevata copertura vegetazionale e precipitazioni non abbondanti. Il modello di distribuzione di specie elaborato, ha mostrato un buon potere predittivo e si è dimostrato realistico, in quanto l'area risultata più idonea alla presenza dei flebotomi nel territorio si sovrappone in modo chiaro con le aree interessate da focolai di leishmaniosi canina.

La visualizzazione dei *pattern* di distribuzione dei flebotomi vettori nello spazio ecologico, attraverso l'utilizzo di modelli di distribuzione di specie, si è dimostrata essere un valido strumento per comprendere quali fattori condizionano maggiormente la presenza degli stessi. Gli strumenti utilizzati possono essere considerati una nuova risorsa da integrare alle azioni di sorveglianza per la prevenzione della leishmaniosi canina, con il fine di destinare le risorse correttamente e di sviluppare strategie sempre più appropriate.

## SUMMARY

Since the 1990s, new foci of Canine Leishmaniosis have been detected in northern Italy, previously regarded as non-endemic. The disease has increased gradually in the regions of the Alps and entomological surveys demonstrated the established presence of two vectors of the disease, *P. perniciosus* and *P. neglectus*, in several localities of the area. The changing pattern of the disease is mainly due to movement of infected dogs from endemic areas, to the increase in human and animal travels and goods trade and to climatic changes, critical to the establishment of the vectors.

The study describes the results of the 12-years entomological survey in Veneto, Friuli Venezia Giulia and Trentino Alto Adige Regions, analysed through the use of GIS

tools and Species Distribution Models (SDMs), based on remote sensing environmental data. Several climatic and environmental features were explored in regard to the entomological data, in order to better understand the ecology of the vectors and the epidemiology of the disease, to create a tool in support of surveillance activities.

Sandfly trapping was conducted from 2001 to 2012 in 175 sites, using sticky traps (n=114 sites), CDC light traps (n=53) and CO<sub>2</sub> traps (n=66). GPS coordinates were acquired for all sites and potential risk factors (altitude, number and species of domestic bait animals, structural characteristics of site and level of urbanization) were identified and registered. The presence/absence of sandflies were compared with the risk factors considered and environmental variables, such as MODIS data (Normalized Difference Vegetation Index and Land Surface Temperature), a land cover map (Corine Land Cover 2006), a Digital Elevation Model (GTOPO30) and a bioclimatic variable taken from the database WorldClim (BIO 18, precipitation of Warmest Quarter). The environmental features resulted more relevant, were used to build a predictive model of presence of *P. perniciosus* and sandflies in Veneto, Friuli Venezia Giulia and Trentino Alto Adige Regions, using the software MaxEnt (Maximum Entropy Modeling System).

Overall, 6.144 sandflies were collected and identified and *P. perniciosus* was the most abundant species (3.797, 61,8%), with density values comparable to endemic areas of southern and central Italy. The ecological analyses of risk factors identified the altitudinal range between 100 and 300 m as the optimal environment for sandflies. The analyses of eco-climatic variables showed that the species *P. perniciosus* and the sandflies prefer hilly areas, characterized by temperate climate, high vegetation cover and moderate rainfall.

The SDMs developed showed a high predictive power and demonstrated to be realistic, since areas highly suitable for sandflies overlap with Canine Leishmaniosis foci in the study area.

Visualisation of patterns of distribution of vector species in ecological space, using SDMs, was a useful tool for the understanding of the ecological requirements of the sandfly vectors. The used approach may be considered a new resource for the proper identification of the surveillance actions for the control of Canine Leishmaniosis.

# **PARTE GENERALE**

# 1 La leishmaniosi canina: malattia emergente

La leishmaniosi canina, malattia protozoaria sostenuta da *Leishmania infantum* e trasmessa da insetti ematofagi appartenenti alla famiglia *Psychodidae* ed al genere *Phlebotomus*, nel Vecchio Mondo e *Lutzomyia*, in America Centrale e Meridionale, è un'importante malattia del cane, che rappresenta il suo principale *reservoir*.

*L. infantum*, inoltre, è agente causale nell'uomo di una nota zoonosi, la leishmaniosi umana (forma viscerale e forma cutanea), malattia potenzialmente fatale, diffusa in tutto il Bacino del Mediterraneo, oltre che in America Centrale e Meridionale, in Asia, Medio Oriente e Cina.

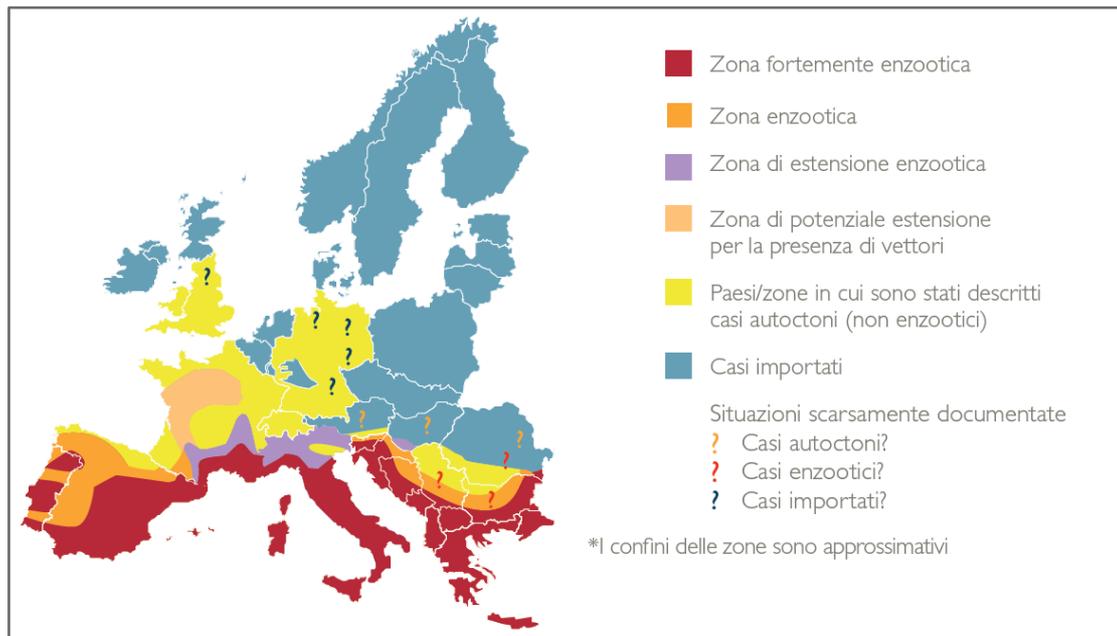
Nel corso dell'ultimo ventennio si è assistito ad un aumento, in termini di incidenza e diffusione, della malattie trasmesse da vettori (leishmaniosi, Blue Tongue, West Nile), che ha riguardato diverse regioni del pianeta, come l'Europa centro-settentrionale o gli Stati Uniti precedentemente indenni a queste malattie o caratterizzati solo dall'insorgenza di casi sporadici, riportando l'attenzione e l'interesse della Sanità Pubblica sullo studio e la sorveglianza delle stesse. All'interno di questo scenario s'inserisce la leishmaniosi canina (Lcan). Anche se l'incidenza della leishmaniosi umana è relativamente bassa nel Sud Europa, dove sembra essere limitata a circa 700 nuovi casi all'anno (3.950 casi includendo la Turchia) (Dujardin *et al.*, 2008), l'aumento dell'areale di distribuzione della Lcan, avvenuto nell'ultimo ventennio, nelle regioni del Nord Europa, dimostrato da nuovi casi di leishmaniosi autoctona avvenuti in Nord Italia e Germania, è motivo di preoccupazione (Bogdan *et al.*, 2001; Maroli *et al.*, 2008). E' comunque indubbio che la reale incidenza di questa malattia sia sottostimata per diversi fattori: non esiste l'obbligo di denuncia a livello Europeo, le infezioni asintomatiche sono comuni (Pampiglione *et al.*, 1974) sia nell'uomo sia nei cani e infine, alcune ricerche hanno evidenziato che la sieroprevalenza sottostima il reale tasso d'infezione nei cani, confermato invece mediante PCR (Berrahal *et al.*, 1996; Solano-Gallego *et al.*, 2001). Nel 2002, Moreno e collaboratori, hanno stimato che nel Bacino del Mediterraneo almeno 2,5 milioni di cani siano affetti da leishmaniosi e considerata la crescente espansione della malattia nelle regioni dell'Europa settentrionale anche questo dato rischia di non essere

realistico. Tra le principali malattie protozoarie emergenti (o riemergenti) trasmesse da vettori, la leishmaniosi è seconda solo alla malaria a livello mondiale in termini di numero di casi umani (WHO, 2010). La causa principale dell'aumento della distribuzione e/o dell'incidenza di questa malattia sembra essere rappresentata dai cambiamenti climatici, determinanti per la sopravvivenza dei vettori. L'aumento medio delle temperature, infatti, permette ai vettori di potersi adattare in aree mediamente più fredde e, in regioni endemiche, di prolungare la loro stagione di attività. Altri fattori, comunque, hanno influenzato questo fenomeno e più probabilmente, come sottolineano alcuni Autori, la loro interazione: la globalizzazione, intesa come aumento degli spostamenti di persone, animali e merci da aree di classica endemia ad aree non endemiche, i fenomeni migratori, i cambiamenti ambientali (deforestazione, urbanizzazione, etc.), cambiamenti demografici, economici e sociali. Tutto ciò ha sicuramente influenzato una variazione nella densità delle popolazioni d'insetti vettori e un loro spostamento geografico (Ferroglio *et al.*, 2005; Ready, 2008; Colwell *et al.*, 2011; Maroli *et al.*, 2012). In questo senso possiamo certamente definire la leishmaniosi una malattia emergente (o riemergente), in quanto negli ultimi anni si è assistito ad un cambiamento nella sua diffusione in aree non endemiche ed ad un aumento della sua incidenza in aree endemiche (Morse, 1995).

## **1.1 La leishmaniosi canina in Europa**

La leishmaniosi canina, come le altre malattie trasmesse da vettori, ha risentito negli ultimi anni dei cambiamenti eco-climatici e socio-economici, che hanno comportato lo sviluppo di nuovi focolai di malattia sia in aree endemiche sia in aree precedentemente indenni. È stato dimostrato inoltre uno spostamento delle popolazioni di flebotomi vettori verso le regioni del Nord Europa, dove fino agli anni '90 le condizioni climatiche erano sfavorevoli all'istaurarsi di cicli endemici (Bongiorno *et al.*, 2003; Ferroglio *et al.*, 2005). Il quadro europeo che oggi si presenta è quindi caratterizzato principalmente da un aumento dell'incidenza in aree storicamente endemiche e dall'insorgenza di nuovi focolai autoctoni in aree in precedenza considerate indenni (fig. 1). Ad esempio, in Spagna meridionale nell'ultimo ventennio, si è registrato un aumento della sieroprevalenza nei cani di circa due volte (Martin-Sanchez *et al.*, 2009), l'insorgenza di nuovi casi autoctoni e il

ritrovamento dei vettori in Spagna nord-orientale (Ballart *et al.*, 2011a; Ballart *et al.*, 2011b), nord-occidentale (Mirò *et al.*, 2012) e nelle isole Baleari (Alcover *et al.*, 2013). Situazioni simili si sono verificate in Francia, in un'area dei Pirenei francesi, precedentemente non endemica, dove è stato registrato un consistente aumento della sieroprevalenza nei confronti della Lcan dal 1994 al 2007 (Dereure *et al.*, 2009), e in Portogallo, dove sono stati identificati nuovi potenziali focolai di Lcan in aree prima non considerate a rischio (Branco *et al.*, 2013). In Grecia *L. infantum* è ampiamente diffusa in quasi tutto il Paese e nell'ultimo trentennio si è assistito ad un aumento della sua diffusione e della incidenza di casi umani (Gkolfinopoulou *et al.*, 2013); inoltre nelle isole dello Ionio e a Creta è presente anche *L. tropica*, agente causale della leishmaniosi cutanea antroponotica e recentemente, nell'isola di Cipro è stata ritrovata anche *L. donovani*, agente sia della forma viscerale che cutanea antroponotica; pur avendo queste specie una distribuzione più sporadica, preoccupa la loro presenza (e la presenza dei loro vettori) per la possibilità dell'instaurarsi di cicli antroponotici e per il rischio di introduzione di specie esotiche di *Leishmania* in Europa e conseguentemente un'augmentata possibilità di scambio genetico tra diverse specie/ceppi del parassita (Antoniou *et al.*, 2013). In Europa centrale le cause principali dell'instaurarsi di cicli di trasmissione autoctoni sembrano essere stati i cambiamenti climatici, rendendo le temperature più idonee alla sopravvivenza dei vettori, e l'importazione del patogeno (cani e persone infette) da aree endemiche (Aspöck *et al.*, 2008; Fisher *et al.*, 2010). In Svizzera, Austria, Belgio, Ungheria e Germania, negli ultimi anni, sono state ritrovate alcune specie di flebotomi provati o sospetti vettori di leishmaniosi (rispettivamente *P. perniciosus* e *P. mascittii*) ed in alcune regioni sono stati evidenziati alcuni casi di Lcan e leishmaniosi umana di probabile origine autoctona, anche se la malattia risulta più frequentemente d'importazione (Naucke *et al.*, 2000; Bogdan *et al.*, 2001; Ready, 2010; Farkas *et al.*, 2011; Naucke *et al.*, 2011; Haeberlein *et al.*, 2013). Dal quadro europeo in precedenza illustrato, se pur non esaustivo, risulta chiaramente come l'epidemiologia della Lcan si sia modificata e allo stesso tempo, come sia possibile immaginare altri futuri cambiamenti, alla luce dei diversi fattori di rischio che possono influenzarla.



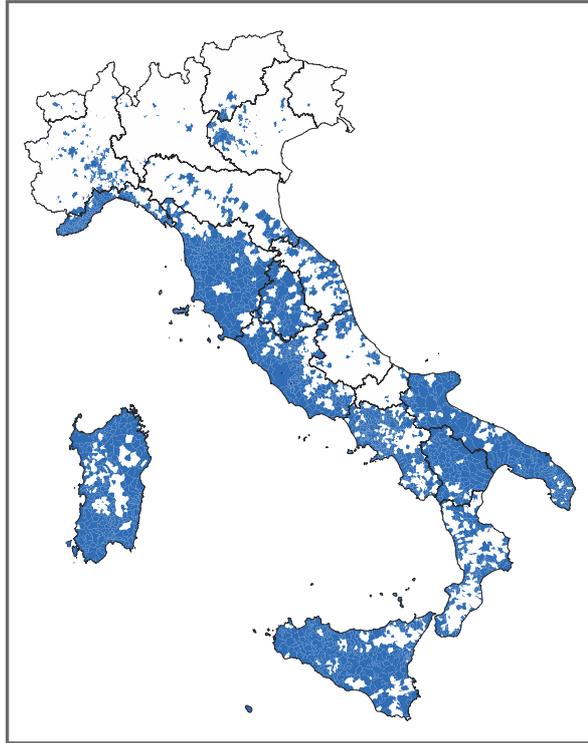
**Figura 1:** leishmaniosi canina in Europa (tratto da Bourdeau, 2012).

## 1.2 Il caso italiano

L'Italia, all'interno del panorama europeo, rappresenta certamente l'esempio più rappresentativo dei cambiamenti avvenuti nell'epidemiologia della leishmaniosi canina. Fino a metà degli anni '80 le Regioni dell'Italia settentrionale, con l'esclusione della Liguria e di alcune zone dell'Emilia Romagna, erano considerate indenni dalla Lcan (Pozio *et al.*, 1985) e la presenza dei flebotomi vettori nelle regioni settentrionali era minima o di bassa/media densità solo in alcune aree pre-appenniniche e prealpine (Biocca *et al.*, 1977). A partire dagli anni '90 si è assistito ad un aumento progressivo dell'insorgenza di nuovi focolai autoctoni, sia nelle Regioni endemiche come l'Emilia Romagna, la Toscana, l'Umbria, le Marche e gli Abruzzi (Dalla Villa *et al.*, 1999; Pedonese *et al.*, 2000; Baldelli *et al.*, 2001; Bongiorno *et al.*, 2002; Corradetti *et al.*, 2002; Mollicone *et al.*, 2003), sia nelle Regioni settentrionali. I primi due focolai furono segnalati in Veneto (Poglayen *et al.*, 1997) ed in Piemonte (Rossi *et al.*, 1999; Ferroglio *et al.*, 2002) dove venne confermata la presenza di due vettori competenti, *P. perniciosus* e *P. neglectus*. Uno studio entomologico condotto negli anni successivi (dal 2003 al 2005), da Maroli e collaboratori (2008) registrò la presenza dei vettori in 57/175 siti monitorati in Piemonte, Veneto, Valle d'Aosta, Lombardia e Trentino e in seguito la presenza dei

vettori competenti fu segnalata anche in Friuli Venezia Giulia e Alto Adige (Cassini *et al.*, 2007; Morosetti *et al.*, 2009). Parallelamente, alcune aree collinari e sub-alpine dell'Italia settentrionale diventarono endemiche per Lcan: tra il 2003-2005 furono confermati 47 casi di Lcan di origine autoctona provenienti da 16 focolai e una ricerca di sieroprevalenza nei cani asintomatici residenti nelle aree circostanti identificò 106 positivi su 5.442 (2,1%) (Maroli *et al.*, 2008). Valori di sieroprevalenza superiori furono poi riscontrati nei focolai piemontesi, friulani e veneti (Cassini *et al.*, 2007; Biglino *et al.*, 2010).

Tra il 1989 e il 2009, inoltre, in Italia si è assistito ad un aumento dei casi di leishmaniosi viscerale nell'uomo, che ha raggiunto un picco nel 2000 e nel 2004, quando si sono verificati circa 200 casi all'anno (Gramiccia *et al.*, 2013). E' da segnalare inoltre il recente focolaio di leishmaniosi viscerale nella provincia di Bologna tra Novembre 2012 e Maggio 2013 (Varani *et al.*, 2013). Nonostante quindi la sieroprevalenza nelle Regioni settentrionali sia mediamente più bassa rispetto alle aree tradizionalmente endemiche (Capelli *et al.*, 2004), la situazione epidemiologica italiana è sicuramente preoccupante e i cambiamenti ecologici e climatici in corso, oltre allo spostamento di animali infetti, stanno contribuendo a mantenere e diffondere la malattia anche nel nord del Paese, raggiungendo in alcune località tassi di sieroprevalenza nei cani, simili a quelli del sud Italia e suggerendo un aumento del rischio nel prossimo futuro anche per la popolazione umana residente al Nord (Cassini *et al.*, 2013). Il quadro attuale (fig. 2), quindi, impone una seria valutazione dei rischi e delle contromisure da mettere in atto, per limitare l'instaurarsi di nuovi cicli endemici, prendere le adeguate misure per limitare quelli già esistenti, ed evitare l'introduzione di nuove specie di parassiti e vettori (ad esempio dall'Africa settentrionale) che potrebbero trovare condizioni favorevoli alla loro sopravvivenza. Nuovi strumenti per il monitoraggio e la mappatura dei focolai (Sistemi informativi geografici, telerilevamento, mappatura genetica), nuovi metodi di diagnosi, profilassi e controllo, dovrebbero essere studiati ed applicati, insieme al monitoraggio attivo, per ridurre i rischi per la popolazione umana.



**Figura 2:** Mappatura (ArcGis 10) dei comuni italiani (in blu) dove si sono registrati casi autoctoni di leishmaniosi canina dal 2005-2012 (tratto da Gramiccia *et al.*, 2013).

## 2 Sistemi di sorveglianza e controllo

In questo capitolo saranno illustrati brevemente i metodi finalizzati alla sorveglianza della leishmaniosi canina, cercando di metterne in luce i principali scopi e limitazioni. Essenzialmente, i sistemi di controllo delle malattie trasmesse da vettori sono indirizzati all'ambiente (valutazione dei rischi legati alle condizioni ecologiche, climatiche, strutturali, geofisiche e ambientali), ai vettori (piani di monitoraggio e lotta attraverso l'uso d'insetticidi) e agli ospiti (protezione dal contatto con i vettori, vaccinazione, terapia). Indubbiamente, al fine di rendere efficaci in senso generale gli interventi locali, sarebbe fondamentale disporre di un tempestivo sistema di diffusione delle informazioni e di denuncia obbligatoria, coordinato almeno a livello europeo e, allo stesso tempo, di un sistema rapido di passaggio d'informazioni e di collaborazione interdisciplinare, tra chi si occupa di assistenza sanitaria per gli esseri umani, gli animali e l'ambiente, nell'ottica del cosiddetto approccio *One Health*.

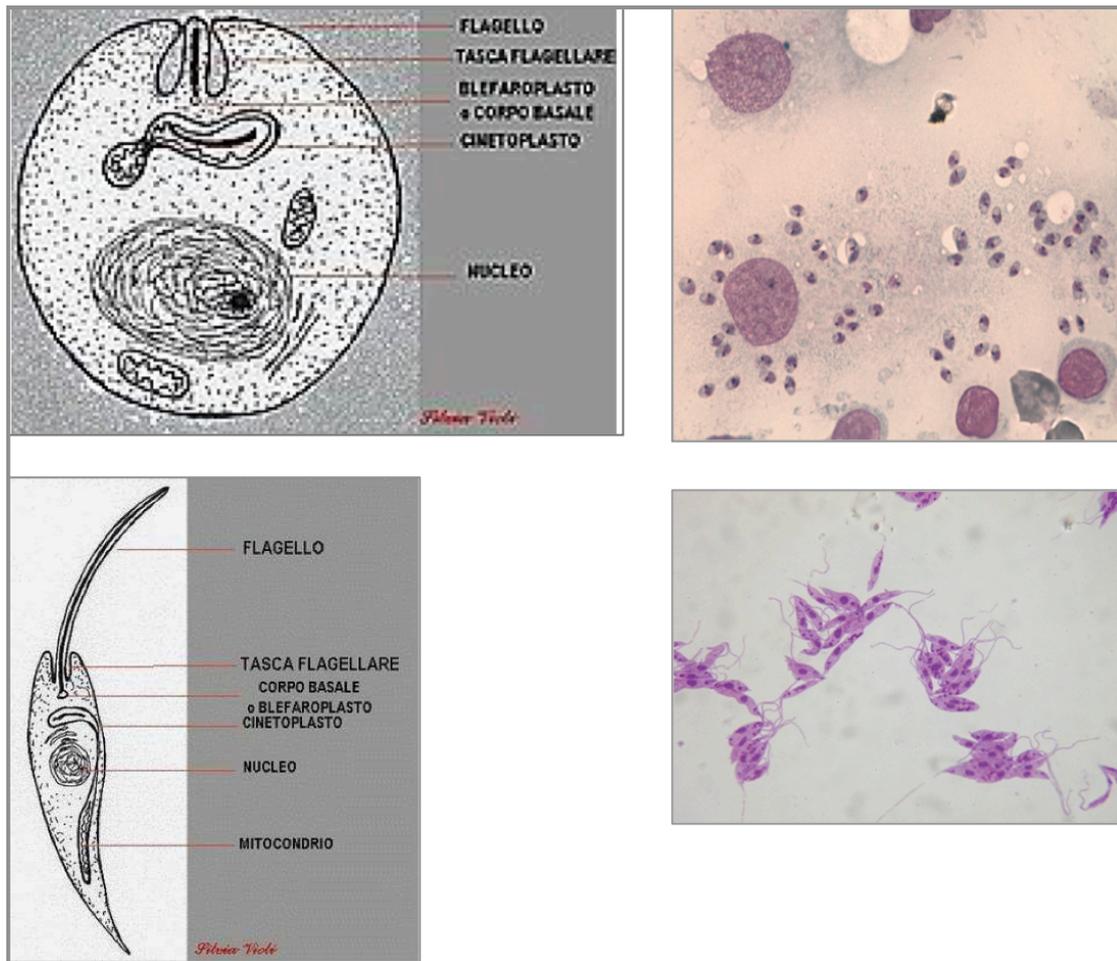
### 2.1 Strategie di sorveglianza della leishmaniosi canina

La leishmaniosi canina è una malattia protozoaria, sostenuta, in Italia, da *Leishmania infantum* (Ordine: *Kinetoplastida*, Famiglia: *Trypanosomatidae*); il parassita ha come principale serbatoio il cane, che frequentemente può sviluppare forme croniche generalizzate, di difficile guarigione, ma è anche un agente zoonotico, provocando nell'uomo la leishmaniosi viscerale zoonotica (LVZ) e la leishmaniosi cutanea sporadica (LCS). La sorveglianza dell'infezione è certamente complessa e si basa essenzialmente sul trattamento farmacologico del serbatoio per renderlo meno infettante per i vettori; le terapie sono più efficaci nelle prime fasi dell'infezione e quindi una diagnosi precoce della malattia e il controllo periodico dei cani utilizzando test diagnostici affidabili, permette un miglior controllo dell'infezione, ed è quindi un sistema di profilassi molto efficace in aree endemiche.

#### 2.1.1 Morfo-fisiologia e biologia di *Leishmania infantum*

Le leishmanie sono protozoi dimorfici, caratterizzati da una struttura mitocondriale detta kinetoplasto che contiene il DNA extranucleare, in connessione con un corpo basale da cui origina un flagello. Sulla base della diversa organizzazione di questi

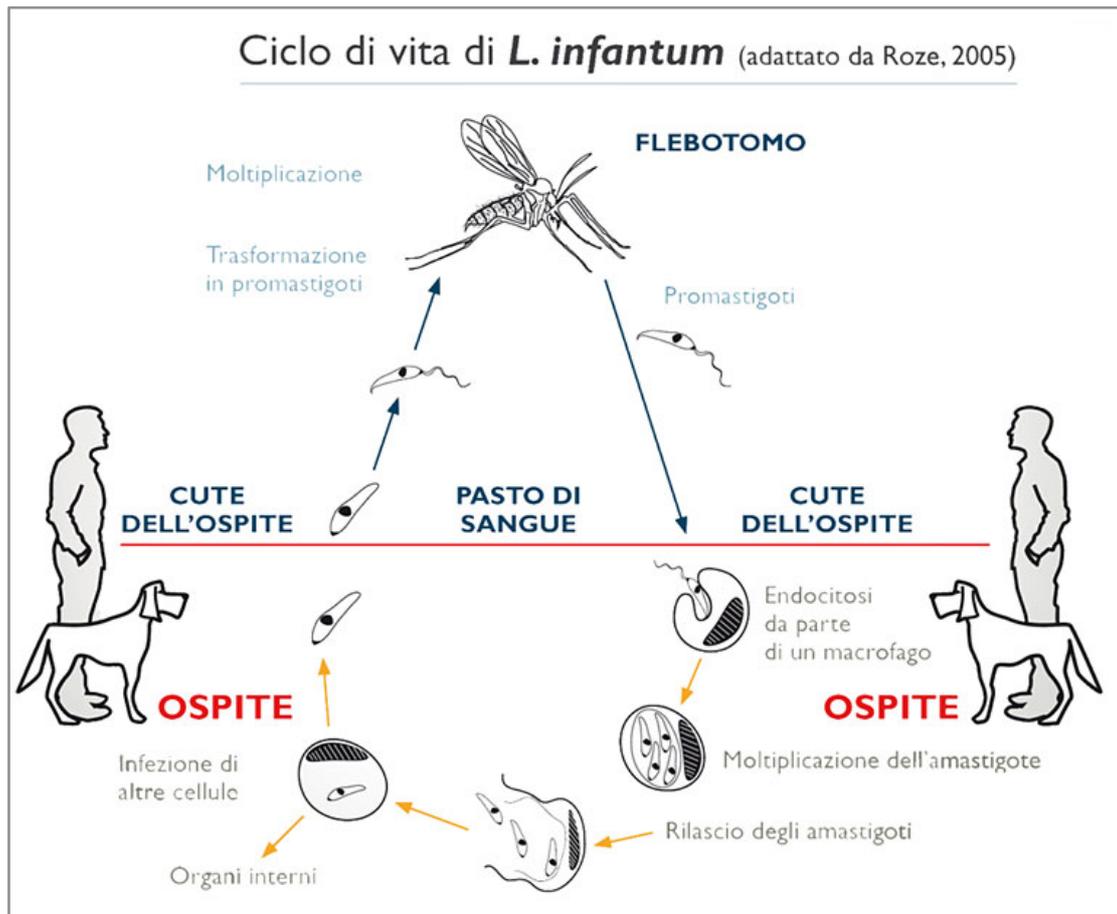
organelli si distinguono due forme, i promastigoti, flagellati e mobili che si localizzano nel tratto intestinale dei flebotomi e gli amastigoti, aflagellati, parassiti endocellulari obbligati, che si localizzano nei macrofagi degli ospiti vertebrati (fig. 3). Durante il ciclo nell'ospite invertebrato le leishmanie assumono un ulteriore stadio detto paramastigote, che si differenzia dal promastigote in quanto il kinetoplasto è situato allo stesso livello o posteriormente al nucleo (Killick-Kendrick, 1979).



**Figura 3:** disegno schematico e immagine di amastigoti (sopra) e di promastigoti (sotto) di *Leishmania* (tratto da vetpedia, [www.vetpedia.it](http://www.vetpedia.it)).

Le leishmanie sono parassiti dixeni, cioè necessitano di un ospite definitivo vertebrato che svolge il ruolo di serbatoio della malattia e di un ospite intermedio invertebrato che funge da vettore. E' stato ipotizzato, a partire da studi paleogenetici, che l'evoluzione del vettore e del parassita si sia svolta in modo parallelo almeno fin dal Cretaceo, era da cui sono giunti resti fossili di flebotomi ematofagi (Azar e Nel, 2003). Gli amastigoti vengono ingeriti durante il pasto di sangue dal flebotomo e nel

suo intestino si trasformano in promastigoti ed iniziano una serie di scissioni binarie. Terminata la digestione del pasto di sangue, vengono liberati nel lume intestinale colonizzando l'intestino anteriore (Molyneux e Killick-Kendrick, 1987); segue una seconda fase di replicazione dei protozoi che poi migrano in senso orale e raggiungono la faringe, dove si trasformano in promastigoti metaciclici infettanti, estremamente mobili, che risalgono fino alla proboscide per essere poi rigurgitati nel sito di puntura. L'intero ciclo nei flebotomi dura da 4 a 20 giorni, a seconda delle specie di *Leishmania* ed è influenzato soprattutto dalla temperatura ambientale (Killick-Kendrick, 1979; Rioux *et al.*, 1985). Il ciclo quindi prosegue nell'ospite vertebrato e i promastigoti infettanti depositi sulla cute penetrano con il flusso della saliva e vengono fagocitati dai macrofagi e mutano in amastigoti. Iniziano a moltiplicarsi per scissione binaria fino a quando le cellule macrofagi che, invase dai parassiti, si rompono, liberando i parassiti che attaccano altre cellule del sistema reticolo endoteliale (fig. 4). L'evoluzione del ciclo dipenderà dalla specie ospite, dalla specie di *Leishmania* e dal suo tropismo e l'infezione quindi potrà rimanere localizzata a livello cutaneo o propagarsi a livello viscerale, dando quadri clinici differenti. In ogni caso, gli amastigoti a livello cutaneo o nel circolo periferico potranno essere assunti nuovamente da un flebotomo durante il pasto di sangue (Hadman e Bullen, 2002).



**Figura 4:** Ciclo biologico di *Leishmania infantum* (tratto da Roze, 2005).

### 2.1.2 Monitoraggio epidemiologico

La profilassi nei confronti della leishmaniosi canina, oltre che rivolta ai vettori e a proteggere il serbatoio dal contatto con i flebotomi, in particolare nelle aree endemiche, dovrebbe includere il monitoraggio periodico, attraverso test diagnostici specifici, nei cani che vi risiedono o che vi si sono recati durante le stagioni di trasmissione. La leishmaniosi canina è una malattia complessa, con decorso spesso sub-clinico e cronico e con sintomatologia polimorfa e non patognomica. Inoltre, vi sono animali che, nonostante siano infetti, non sviluppano la malattia, ma che comunque potrebbero essere infettanti per i flebotomi; ugualmente i soggetti che, dopo terapia, risultano clinicamente guariti, continuano ad essere infettanti anche se in misura minore. Per prevenire quindi l'infezione e l'effetto patologico della stessa, le misure che possiamo adottare sul serbatoio canino sono la sorveglianza epidemiologica attiva sul territorio, il trattamento farmacologico dei soggetti malati ed eventualmente la vaccinazione (Maroli *et al.*, 2009). E' ormai noto che il periodo che

intercorre tra un'infezione leishmaniotica acquisita in una determinata stagione di trasmissione e lo sviluppo di anticorpi ha una durata media di 5-8 mesi. Pertanto, il periodo dell'anno in cui, nel nostro areale, vi è la probabilità maggiore di identificare i nuovi casi di infezione è compreso tra febbraio e maggio. Le attività di sorveglianza attiva, quindi, dovrebbero essere condotte durante il suddetto periodo, ed avere periodicità annuale, almeno nelle aree endemiche o dove sono presenti focolai autoctoni della malattia. L'implementazione di questi sistemi di sorveglianza dovrebbe essere sostenuta dai Servizi Sanitari Pubblici, coinvolgere anche i veterinari liberi professionisti e includere azioni d'informazione e sensibilizzazione rivolte ai proprietari dei cani. Le metodologie più affidabili per uno *screening* di massa sono i test sierologici, volti alla dimostrazione di anticorpi serici specifici, in presenza o meno di segni clinici. Esistono molte diverse metodologie diagnostiche (IFI, ELISA, Western-Blot, Agglutinazione Diretta), ma tra queste l'IFI (Immunofluorescenza Indiretta) è considerata il test di riferimento per la diagnosi sierologica dall'OMS e dall'OIE. La risposta viene data in titoli anticorpali di diluizione: il valore soglia per considerare un soggetto sospetto di infezione è 1:40, soggetti clinicamente sani con un titolo IFI compreso tra 1:40 e 1:80 sono considerati "sospetti" e dovrebbero essere ricontrollati utilizzando un'altra metodica affidabile, oppure con la stessa metodica dopo 6 mesi; i cani con un titolo  $IFI \geq 1:160$  che presentano forme asintomatiche o sintomatiche d'infezione, quindi potenzialmente infettanti, sarebbero da sottoporre ad altri esami di laboratorio per valutare lo stato clinico e sottoposti a terapia (Gradoni *et al.*, 2004). Tra le metodiche di diagnosi diretta, le tecniche molecolari come la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) con le sue modificazioni e integrazioni specifiche, sono indubbiamente molto utili nell'approccio diagnostico e si basano sull'evidenziazione del DNA parassitario in campioni di origine diversa (cute, linfonodi, midollo osseo, tamponi congiuntivali). Sono molto efficaci come test di conferma nei quadri che risultano dubbi, per determinare la carica parassitaria (Real-Time PCR) e per valutare l'efficacia dei trattamenti farmacologici, nonché per classificare le diverse specie del parassita. Vanno comunque accompagnati da altri test diagnostici in quanto le infezioni rilevate possono essere di tipo criptico-latente con presenza scarsa o nulla di parassiti vitali (Mancianti e Ariti, 2010).

### 2.1.3 Trattamento farmacologico

Vista l'estrema complessità della malattia, che si esprime in differenti quadri clinici e la cui evoluzione non è semplice da prevedere, l'approccio terapeutico al paziente leishmaniotico è tuttora una sfida per il veterinario clinico. Essendo comunque un soggetto malato infettante per i vettori, un sistema di profilassi corretto dovrebbe includere una terapia mirata dei cani positivi, considerandola non solo come una misura protettiva individuale, ma di massa. Dal punto di vista clinico risulta utile suddividere gli animali affetti da leishmaniosi in diverse classi, in base alle caratteristiche cliniche, al tipo di risposta immunitaria e alla carica parassitaria. Il Gruppo di Studio sulla Leishmaniosi Canina (GSLC) ha proposto la seguente classificazione (Oliva *et al.*, 2008):

- **Stadio A, cane esposto:** soggetti clinicamente sani, nei quali i test diagnostici diretti risultano negativi ma sono evidenziabili titoli anticorpali specifici non superiori a quattro volte i valori soglia del laboratorio di riferimento; questi soggetti non vanno trattati farmacologicamente ma ricontrollati tramite test sierologici e parassitologici dopo 2-4 mesi.
- **Stadio B, cane infetto:** soggetti clinicamente sani, nei quali è dimostrabile la presenza del parassita con metodi diretti; questi soggetti devono essere trattati farmacologicamente se è presente anche la sierconversione. Se questa è assente, vanno monitorati tramite test sierologici ogni 2-4 mesi, per almeno un anno.
- **Stadio C, cane malato:** soggetti infetti che mostrano uno o più segni clinici compatibili con la leishmaniosi o alterazioni ematologiche, ematobiochimiche o urinarie riferibili alla malattia; questi soggetti vanno trattati farmacologicamente.
- **Stadio D, cane malato con quadro clinico grave:** soggetti malati sottoposti già a trattamenti anti-Leishmania senza remissione della sintomatologia, o affetti da nefropatia proteinurica, o da insufficienza renale cronica, o da gravi malattie oculari, articolari, o da altre severe malattie concomitanti; questi cani devono essere trattati con farmaci anti-Leishmania ed eventualmente terapie collaterali di supporto, in relazione al quadro clinico.

- **Stadio E, cane refrattario a trattamento/cani con recidiva precoce:** i soggetti che non rispondono alla terapia o nei quali, dopo un'iniziale fase di miglioramento, le condizioni cliniche peggiorano; in questi casi è necessario escludere altre patologie e rivalutare il protocollo terapeutico.

Adottando alcuni regimi farmacologici per la terapia del cane, vi è la dimostrazione che la carica infettante nei confronti dei flebotomi vettori, si riduce durante e nei primi mesi successivi al trattamento. Il ciclo di terapia dovrebbe di conseguenza essere intrapreso in seguito alla prima diagnosi, ma anche durante i mesi immediatamente precedenti la stagione di trasmissione, cioè nel periodo compreso tra Maggio e Giugno (Gradoni *et al.*, 2004).

#### **2.1.4 Vaccinazione**

La vaccinazione effettuata su cani sani potrebbe rappresentare una buona strategia profilattica per abbattere i casi di leishmaniosi canina, oltre che umana. Nonostante i progressi ottenuti nella ricerca di un vaccino anti-*Leishmania* i risultati non possono essere ritenuti molto soddisfacenti. Da marzo 2011 la Commissione Europea ha rilasciato l'autorizzazione alla Virbac<sup>TM</sup> al commercio di CaniLeish®, vaccino costituito da proteine escrete/secrete da *Leishmania infantum*. L'adiuvante utilizzato, estratti purificati di *Quillaja saponaria*, è stato scelto per le proprietà immunostimolanti, in quanto induce una forte risposta immunitaria di tipo 1 (Th1), mediata soprattutto dalle citochine IFN-, IL-2 e dall'attivazione dei linfociti T citotossici; questo tipo di risposta è ritenuto fondamentale per lo sviluppo di un vaccino efficace contro la leishmaniosi. Studi presentati nel *CaniLeish European Dossier*, sia di campo sia di laboratorio, hanno confermato la difficoltà di valutare l'efficacia di un vaccino contro una malattia parassitaria caratterizzata da evoluzione e manifestazioni eterogenee. La somministrazione del vaccino non induce gravi effetti collaterali, anche in caso di extra-somministrazione e in caso venga utilizzato su animali già positivi alla malattia. La dimostrazione dell'efficacia del vaccino è stata basata su uno studio di campo della durata di due anni, che ha coinvolto cani vaccinati e controlli, esposti naturalmente all'infezione in zone ad alta endemia. Dopo questi due anni, il vaccino ha dimostrato di ridurre il numero dei cani che sviluppavano un'infezione attiva nel gruppo dei vaccinati e, dal punto di vista del singolo cane, di ridurre significativamente la probabilità di infettarsi e di sviluppare la malattia. In

condizioni di debole pressione infettiva, non è stato possibile individuare un beneficio chiaro derivante dalla vaccinazione. I dati delle prove sperimentali di laboratorio hanno mostrato che l'infezione può essere rilevata da 4 a 9 mesi dopo l'infezione sperimentale e che la vaccinazione determina una risposta costante ed omogenea. Comunque tale risposta non può essere collegata in maniera chiara alla protezione e alla risposta futura dei cani all'infezione. Considerando la diversità dell'evoluzione dell'infezione ed il periodo d'incubazione variabile, è risultato difficile definire per questo vaccino i tempi quali l'inizio e la durata dell'immunità e della protezione negli studi di laboratorio, ma una durata dell'immunità di un anno dopo l'ultimo richiamo (inizialmente sono previste tre dosi di vaccinazione a distanza di tre settimane una dall'altra) ed un inizio dell'immunità dopo 4 settimane, sono stati supportati dai dati di campo (EMA, 2011). Infine, in un recente studio preliminare effettuato su 10 Beagles a diversi stadi di infezione da *Leishmania infantum*, 6 dei quali vaccinati con CaniLeish®, volto a verificare il loro potenziale d'infettività su *P. perniciosus*, è stata registrata una differenza significativa sia nel numero di flebotomi che si erano infettati alimentandosi sui cani vaccinati (10/82) rispetto a quelli che si erano alimentati sui cani non vaccinati (30/49), sia nella percentuale di flebotomi con più di 500 parassiti nel loro intestino: 3,7% dei flebotomi alimentati sui cani vaccinati rispetto al 28,6% sui non vaccinati (Gradoni *et al.*, 2013). Benché i risultati sull'efficacia non abbiano mostrato la protezione completa dei cani vaccinati, si può concludere che la vaccinazione contro la leishmaniosi possa rappresentare un strumento valido e complementare ai mezzi che già sono a disposizione, in quanto in grado di ridurre il rischio di sviluppare l'infezione attiva e la malattia a livello individuale. Tuttavia, anche in considerazione del costo del prodotto, non può allo stato attuale essere considerata un'alternativa all'utilizzo di misure profilattiche e terapeutiche già a disposizione, in un'ottica di sorveglianza di massa.

## **2.2 Strategie di monitoraggio dei vettori**

Occupandosi delle strategie di controllo nei confronti della Lcan, il monitoraggio dei flebotomi, unici vettori biologici provati della malattia, è indispensabile. Altre vie di trasmissione sono state ipotizzate: la trasmissione congenita, quella sessuale (Naucke *et al.*, 2012) e attraverso le trasfusioni di sangue (Owens *et al.*, 2001). Queste vie

vanno tenute in considerazione (soprattutto in quelle aree dove non sono presenti i vettori) ma non rivestono importanza epidemiologica nel mantenimento dell'infezione in una determinata area. I primi interventi da mettere in atto sono i piani di monitoraggio attivo sul campo, volti all'identificazione delle specie presenti ed a una stima della loro densità e conseguentemente ad una mappatura dei siti a rischio per la presenza dei vettori competenti e/o di densità tali da rendere possibile l'instaurarsi di cicli endemici.

### 2.2.1 Biologia ed ecologia dei flebotomi

I flebotomi sono piccoli ditteri ematofagi appartenenti alla famiglia *Psychodidae*, a sua volta suddivisa in due sottofamiglie: *Psychodinae* e *Phlebotominae*; a quest'ultima sottofamiglia appartengono le oltre 800 specie di flebotomi presenti nel mondo, la cui classificazione comunque rimane complessa. Secondo la classificazione di Lewis (1982), riconosciuta a livello internazionale, i flebotomi sono raggruppati in cinque generi: *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Warileyia*, *Lutzomyia* e *Brumptomyia*. Le specie del Vecchio Mondo appartengono ai primi due generi, mentre agli ultimi tre generi i flebotomi del Nuovo Mondo (America meridionale e centrale). Alcune caratteristiche ne rendono facile il riconoscimento da altri insetti delle stesse dimensioni (2-3 mm): a riposo mantengono le ali con un'angolazione di 45° sull'addome, il corpo e le ali sono ricoperti da una fitta peluria e contrariamente ad altri insetti ematofagi il loro attacco all'ospite è silenzioso (fig. 5). In Italia sono presenti i generi *Phlebotomus* e *Sergentomyia*. Questo secondo genere comprende una sola specie (*S. minuta*) che, pur essendo molto abbondante nel territorio, soprattutto in ambienti selvatici (Maroli *et al.*, 1994), è di scarso interesse sanitario poiché erpetofila, quindi non responsabile della trasmissione di *Leishmania infantum*.



**Figura 5:** adulto di flebotomo (foto F. Montarsi).

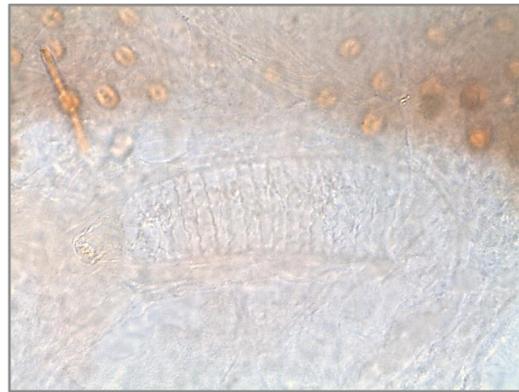
Attualmente, le specie appartenenti al genere *Phlebotomus*, presenti nel territorio nazionale sono: *P. perniciosus*, *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. ariasi* (appartenenti al sottogenere *Larroussius* e implicati nella trasmissione di *L. infantum*) (Maroli *et al.*, 2008), *P. sergenti*, *P. papatasi* e *P. mascittii*. Dall'analisi dei risultati di diverse ricerche svolte in Italia, le specie più abbondanti e ubiquitarie sono risultate essere *P. perniciosus*, *P. perfiliewi* e *S. minuta*.

*P. perniciosus* è associato ad ambienti domestici e peri-domestici, dato molto importante dal punto di vista epidemiologico, poiché indica che il rischio di trasmissione della leishmaniosi in presenza dell'ospite *reservoir* è possibile anche in ambienti urbani, ma risulta comune anche in ambienti selvatici (Maroli, *et al.*, 1994, Maroli and Khoury, 1998). *P. neglectus*, in passato, era una specie segnalata solo nelle Regioni del Sud (Puglia, Calabria, Sicilia) (Biocca, *et al.*, 1977; Maroli *et al.*, 1994), ma negli ultimi anni è stata identificata in diverse aree anche del Veneto, Lombardia e Piemonte (Maroli *et al.*, 1995; Ferroglio *et al.*, 2002; Capelli *et al.*, 2004). *P. mascittii* è una specie rara in Italia, la sua distribuzione sembra essere limitata alle Regioni del Veneto, Piemonte, Toscana, Lazio, Abruzzo, Molise e Campania (Maroli e Khoury, 1998). *P. papatasi*, vettore in Italia di arbovirus agenti della Febbre da Pappataci, specie che era diminuita enormemente durante le campagne antimalariche, è ubiquitario anche se appare più abbondante nelle aree urbane, dove è maggiormente catturato in ambiente domestico. *P. sergenti* è stato ritrovato solo in Sicilia (Maroli e Khoury, 1998). La distribuzione di *P. ariasi* è limitata a pochi focolai in Liguria e Piemonte (Maroli *et al.*, 1988; Maroli *et al.*, 1997a; Capelli *et al.*, 2004; Maroli *et al.*, 2008).

L'identificazione di specie nei maschi si effettua in base alle diverse caratteristiche dell'ipopigio (armatura genitale) e in particolare delle valve copulatrici (fig. 6) mentre nelle femmine, dopo aver effettuato una chiarificazione, sono da osservare le differenze nell'armatura faringea e nelle spermateche (fig. 7).



**Figura 6:** particolare dell'ipopigio e valve copulatrici di *P. perniciosus* (sx) e *P. neglectus* (dx); notare la parte terminale delle valve copulatrici biforcuta in *P. perniciosus* e arrotondata in *P. neglectus*.



**Figura 7:** particolare delle spermateche di *P. papatasi* (sx) e *P. mascittii* (dx); notare il corpo delle spermateche di *P. papatasi* composto da circa 10 anelli con una struttura a ciuffo direttamente adesa alla parte terminale (caratteristica che lo distingue da *P. perniciosus*); in *P. mascittii* invece le spermateche sono molto segmentate e lunghe.

La femmina di flebotomo necessita di un pasto di sangue per la maturazione delle uova, anche se sono stati dimostrati alcuni casi di autogenia in condizioni sfavorevoli. Il tempo che intercorre tra pasto di sangue e ovodeposizione è variabile e sembra dipendere dalla temperatura ambientale, dalla specie e dalla velocità di digestione. In colonie di laboratorio varia da 4 a 8 giorni (Maroli *et al.*, 1994). Le uova vengono deposte in microhabitat umidi, bui, e protetti da agenti esterni, con un substrato ricco in materia organica (Killick-Kendrick, 1999). La scelta del sito di ovodeposizione sembra essere anche influenzata da caratteristiche chimico-fisiche del suolo e dai feromoni di uova di specie conspecifiche (Dougherty *et al.*, 1995), mentre la schiusa sembra dipendere principalmente dalla temperatura (Felicciangeli, 2004). Il ciclo

biologico, comune a tutte le specie descritte in precedenza, comprende una metamorfosi completa. La fase preimaginale presenta uno stadio embrionale di uovo, quattro stadi larvali e uno di pupa. I tempi di sviluppo dei vari stadi sono influenzati principalmente dalle condizioni climatiche e in particolare dalla temperatura, che influisce particolarmente nelle zone a clima temperato. In Italia lo sviluppo è fortemente rallentato nella stagione fredda e le larve di quarto stadio superano l'inverno in diapausa: s'infossano nel suolo ad una profondità adeguata, divengono poco mobili ed il metabolismo si riduce notevolmente (Maroli e Bettini, 1977). Le larve sono terricole e si nutrono di substrato organico, necessitando di buio, temperatura costante e umidità relativa prossima alla saturazione, per il loro sviluppo (Alexander, 2000). I siti di sviluppo larvale possono essere i più svariati, come ad esempio grotte, tane di animali, crepe nel terreno, nidi e cantine. L'identificazione dei siti larvali comporta notevoli difficoltà e la loro ricerca è spesso poco fruttuosa, così come sembra poco praticabile la lotta alle larve per il controllo dei flebotomi (Maroli, 2003). Gli adulti sfarfallano dalle pupe dopo circa 10 giorni. I cicli di sviluppo (da uova ad adulto) di *P. perniciosus* o *P. perfiliewi* sono stati stimati essere rispettivamente di 51 e 48 giorni (Maroli *et al.*, 1987a). La stagione di attività dei flebotomi nelle regioni paleartiche va da inizio Giugno (o Maggio) a fine Settembre (od Ottobre) e il trend stagionale mostra, in alcune specie, un tipico andamento bimodale, con un picco nella densità degli adulti a fine Luglio ed uno all'inizio di Settembre (Rossi *et al.*, 2008). La loro attività è crepuscolare, notturna e all'alba, mentre durante il giorno tendono a rifugiarsi in luoghi riparati e protetti come incavi degli alberi, muretti a secco, rifugi per animali e vegetazione. Il loro volo caratteristico a saltelli non permette grandi spostamenti dai siti di riposo o dai focolai larvali e solitamente non supera i 200-300 m, anche se in letteratura è stato riportato che alcune specie possono spostarsi da 1-2 Km fino ad un raggio di dispersione massima di 4 Km in determinate circostanze (Killick-Kendrick *et al.*, 1984; Alexander, 2000). I maschi di flebotomo sono esclusivamente fitofagi mentre le femmine, che sono anche ematofaghe, possono pungere una grande varietà di ospiti vertebrati per compiere il loro pasto di sangue (mammiferi e volatili, sia domestici sia selvatici, uomo), ma nella loro attività trofica la maggior parte delle specie sembra essere esofagica e preferire siti di riposo all'esterno (esofilia). Nonostante queste caratteristiche, i flebotomi sembrano essersi adattati molto bene all'ambiente domestico ed ai biotopi associati all'uomo, trovando condizioni più semplici per la

loro sopravvivenza (Petrishcheva, 1962). Le abitudini alimentari dei flebotomi possono influire sulle possibilità che l'insetto s'infetti con *Leishmania* e il grado di antropofilia è essenziale per determinare il ciclo di trasmissione zoonosico (WHO, 1990). Da numerosi studi di campo e laboratorio risulta che i principali fattori di rischio ambientali e climatici legati alla sopravvivenza dei flebotomi sembrano essere la temperatura, l'umidità, la quantità di precipitazioni e l'altitudine. Anche altre caratteristiche ambientali e del suolo, come ad esempio l'indice di copertura vegetazionale (*Normalized Difference Vegetation Index, NDVI*) e la classificazione d'uso del suolo, sembrano essere fattori importanti nel determinare la presenza dei flebotomi. Informazioni su queste caratteristiche possono essere reperite grazie ai dati provenienti dal telerilevamento.

**Temperatura.** Theodor (1936) in un esperimento di laboratorio dimostrò che sia le larve che degli adulti di *P. papatasi* erano sensibili ad elevate temperature e bassa umidità: tutti gli adulti sottoposti per due ore ad una temperatura superiore ai 40 °C morivano e temperature inferiori a 10 °C erano sfavorevoli alla loro sopravvivenza. Le ricerche effettuate da Dolmatova e Demina (1968) provarono che la temperatura è essenziale per definire il limite di area geografica di distribuzione dei flebotomi e che ogni specie, per compiere il ciclo evolutivo, necessita di differenti quantità di calore, essendo la temperatura stessa fondamentale per la sopravvivenza delle larve. Maroli e collaboratori (1983, 1987) documentarono che, in colonie di laboratorio, la temperatura era l'unico fattore discriminante tra le specie, infatti, *P. perniciosus* si sviluppava più velocemente a 25-26 °C, *P. papatasi* a 29-30 °C e *P. perfiliewi* a 28-29 °C, mentre il fotoperiodo ottimale era uguale per tutte e corrispondeva a quello del mese di Luglio, 17 ore di luce e 7 di buio. Da uno studio più recente condotto sui Colli Euganei (Provincia di Padova, Italia) è risultato che tra i differenti parametri climatici presi in considerazione (temperatura media, umidità relativa, quantità di precipitazioni, numero di giorni di pioggia, registrati ogni 5 giorni per un periodo di 5 anni) solo la temperatura media era correlata alla densità dei vettori presenti nel sito di cattura (Signorini *et al.*, 2010). In un altro studio di campo effettuato in Turchia è risultata significativa la differenza tra le densità dei flebotomi registrate tra i 22-28 °C e i 28-30 °C, mentre non è stata trovata alcuna correlazione significativa tra l'abbondanza dei flebotomi e i *range* altitudinali (Belen and Alten, 2011). Infine, utilizzando modelli predittivi, alcuni Autori hanno recentemente studiato e valutato

come i cambiamenti climatici, condizionati in particolare dall'aumento medio delle temperature in scenari futuri, creeranno condizioni sempre più favorevoli alla sopravvivenza dei vettori e alla loro espansione in aree ora non idonee al loro insediamento (Fischer *et al.*, 2010, 2011a; Moo-Llanes *et al.*, 2013).

**Umidità.** Diversi studi hanno dimostrato che un elevato tasso di umidità relativa è necessario per lo sviluppo larvale e che le larve sopportano meglio un eccesso di umidità che un ambiente secco (Theodor, 1936; Adler e Theodor, 1957; Dolmatova e Demina, 1968; Bettini e Melis, 1988, Alexander, 2000). In un recente studio di campo l'umidità è risultata positivamente correlata anche al numero di adulti catturati (Perez *et al.*, 2013). Un'altra ricerca, in una differente zona geografica, invece, ha dimostrato una correlazione negativa tra questi due fattori, per altre specie di flebotomi (Moschin *et al.*, 2013). Risposte differenti potrebbero indicare un diverso adattamento delle specie di flebotomi alle condizioni ambientali.

**Altitudine.** L'altitudine ha una forte influenza sul grado di adattamento degli artropodi vettori (Bhunia *et al.*, 2010). Considerando l'area geografica del nord Italia, caratterizzata da una notevole varietà orografica, i flebotomi si sono meglio adattati nelle aree collinari o pedemontane, rispetto a quelle pianeggianti o montane. Sono poche le segnalazioni di flebotomi sopra i 900 m: Biocca e collaboratori (1977) riportavano di aver catturato *P. ariasi* e *P. perniciosus* sopra i mille metri in due località e il solo *P. perniciosus* a 805 m in Piemonte, a 900 m negli Abruzzi, a 880 m in Sicilia e a 800 m in Sardegna e *P. mascittii* a 850 m in Provincia di Cuneo. Certamente la quota condiziona i parametri climatici, quindi per le specie italiane i climi più rigidi e meno umidi (come quelli montani) ed escursioni termiche maggiori (come quelle che si verificano in pianura) rendono gli habitat meno favorevoli al loro insediamento. L'aumento medio della temperatura, comunque, potrebbe favorire l'adattamento dei flebotomi in aree montane.

**Parametri ambientali ottenuti mediante telerilevamento.** Negli ultimi anni, negli studi ecologici relativi ai vettori ed alle malattie trasmesse, vengono spesso utilizzati dati telerilevati da satellite (*Remote Sensing*, RS), scaricabili sotto forma di mappe digitalizzate (*raster*) che possono essere sfruttate per caratterizzare variabili climatiche, ambientali e della superficie terrestre a diverse risoluzioni spaziali e

temporali; i dati telerilevati sono sempre più utilizzati per le indagini nel campo delle scienze ambientali, negli studi ecologici, per la mappatura e lo sviluppo di modelli di previsione, nella sorveglianza e nel monitoraggio epidemiologico, in particolare delle malattie trasmesse da vettori (Beck *et al.*, 2000). Poiché i vettori di malattia richiedono particolari parametri climatici, di vegetazione, caratteristiche del suolo e di altri elementi edafici e sono sensibili ai cambiamenti di questi fattori, i dati telerilevati possono essere utilizzati per descrivere e comprendere la loro ecologia, distribuzione presente e prevedere la loro futura diffusione (Rinaldi *et al.*, 2006).

Nello specifico, per quanto riguarda i vettori di leishmaniosi, i dati telerilevati maggiormente utilizzati in letteratura e risultati utili per raggiungere gli obiettivi prima descritti, sono: l'NDVI, che rappresenta lo stato della vegetazione in base alla sua attività fotosintetica; il tipo di copertura/uso del suolo ed in particolare per i Paesi Europei, vengono spesso utilizzati i prodotti cartografici ottenuti dal progetto *Corine Land Cover* (CLC); infine la temperatura al suolo notturna e diurna (*Land Surface Temperature*, LST). Sia le informazioni relative all'NDVI che all'LST, sono calcolate da dati acquisiti dal sensore MODIS (*The Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer*) e verranno descritti più nel dettaglio nei successivi capitoli. Cross e collaboratori (1996) hanno sviluppato il primo modello relativo alla diffusione di *P. papatasi* nel Golfo Persico in relazione ai dati termometrici prodotti da centraline a terra ed all'NDVI e un secondo modello predittivo relativo sempre alla diffusione della stessa specie, simulando un aumento della temperatura per comprendere il possibile effetto del *Global Warming* sul vettore nel Sud-ovest dell'Asia (Cross e Hyams, 1996). Gebre-Michael e collaboratori (2003) hanno sviluppato due modelli di regressione logistica per mappare la potenziale distribuzione di due specie vettrici, *P. martini* e *P. orientalis* in Africa orientale, utilizzando i dati di temperatura del suolo (LST) e di NDVI (telerilevati dal sensore AVHRR del satellite NOAA), una carta d'uso del suolo e un modello digitale del terreno. Il primo vettore è risultato essere sensibile alla temperatura media del suolo nella stagione secca e favorito dalle temperature medie annuali più basse, dalle quote medie, e dall'elevata umidità del suolo, mentre *P. orientalis* ha invece dimostrato di occupare una diversa nicchia ecologica, preferendo le temperature medie annuali più alte. Bhunia e collaboratori (2010) hanno sviluppato un modello per verificare la correlazione esistente tra diversi parametri quali l'altitudine, la temperatura, l'umidità, le precipitazioni, l'NDVI e la diffusione del Kala-Azar (VL), in un'area nord-orientale del subcontinente indiano.

L'analisi dei dati sulla prevalenza della malattia ha mostrato che la più alta prevalenza era sotto i 150 m di altitudine e in aree caratterizzate da un basso valore di NDVI. Un lavoro più recente (De Oliveira *et al.*, 2012) si è proposto di valutare l'influenza di alcune caratteristiche ambientali sulla distribuzione spaziale e sull'abbondanza di *Lutzomyia longipalpis* in un'area urbana di Campo Grande, Stato di Mato Grosso do Sul, Brasile. L'NDVI e la percentuale di terreno coperto da vegetazione sono state le variabili ambientali telerilevate (IKONOS – 2) che hanno dimostrato una significativa correlazione lineare positiva con l'abbondanza di flebotomi.

### **2.2.2 Metodi di monitoraggio**

I metodi di monitoraggio si basano essenzialmente sulla cattura di adulti di flebotomo mediante l'utilizzo di trappole di tipo attrattivo o per intercettazione o con catturatori manuali/elettrici, durante le ore notturne, in vicinanza dei luoghi dove i flebotomi si alimentano o durante il giorno, nei loro siti di riposo. La ricerca degli stadi immaturi, essendo indaginosa, è poco applicabile soprattutto su larga scala. La scelta delle trappole da utilizzare dovrebbe essere fatta in base agli obiettivi del monitoraggio stesso, alle condizioni ambientali e all'area geografica dove viene effettuato (Alexander, 2000). Verranno in seguito illustrate le trappole più comunemente utilizzate per la cattura dei flebotomi illustrandone brevemente vantaggi e svantaggi. Per maggiori e ulteriori dettagli si può far riferimento all'allegato 1, in cui è stato inserito un articolo riguardante uno studio di campo, effettuato in una località dei Colli Euganei (PD), finalizzato a valutare la differente efficienza di tre trappole (Signorini *et al.*, 2013). Questo articolo è parte del programma e delle attività del percorso di dottorato qui presentato e si integra nel più complesso studio sugli aspetti ecologici dei flebotomi vettori di leishmaniosi canina mediante metodiche GIS.

**Sticky traps.** Sono metodi di cattura per intercettazione, costituiti semplicemente da fogli di carta bianca (20X20 cm) imbevuti di olio di ricino quale adesivo; essendo questo tipo di olio poco viscoso, normalmente solo piccoli insetti rimangono adesi e i flebotomi catturati possono essere facilmente rimossi. Le *sticky traps* vanno collocate in prossimità dei luoghi di attività dei flebotomi (ad esempio all'ingresso di stalle, pollai) o nei siti di riposo diurno (barbacani, incavi di alberi) per un minimo di 24h, fino ad un massimo di 3-5 gg (se non esposte ad agenti atmosferici) ed usualmente 48h. Non essendo trappole attrattive hanno il vantaggio di catturare in modo

indifferenziato tutte le specie presenti in un dato sito, e quindi di raccogliere informazioni più rappresentative rispetto alla composizione della fauna di flebotomi presente. Le *sticky traps* consentono di ottenere anche un dato quantitativo (espresso in numero di flebotomi per m<sup>2</sup> di superficie di cattura) che può essere interpretato come una sorta di densità o abbondanza e conseguentemente consentono di studiare l'andamento stagionale. Queste trappole, inoltre, sono economiche e quindi consentono un impiego su larga scala. D'altra parte, non essendo attrattive, catturano solo i flebotomi che ne vengono a contatto e quindi è possibile rinvenire pochi esemplari, anche in presenza di densità elevate. Inoltre, possono facilmente essere danneggiate da agenti atmosferici, essere poco efficaci in ambienti ad elevata umidità relativa o se sottoposte a forte pioggia e vento. La rimozione dal foglio adesivo può comportare danni all'insetto e renderne più difficile l'identificazione (Maroli *et al.*, 1997b; Alexander, 2000).

**CDC *light traps*.** Sono trappole attrattive che utilizzano una fonte luminosa come esca per gli insetti. Normalmente vengono collocate in vicinanza dei luoghi di attività dei flebotomi e lasciate per una notte e offrono la possibilità di catturare insetti vivi. Il loro raggio di azione è limitato a 2-6 m (Killick-Kendrick *et al.*, 1985; Valenta *et al.*, 1995). Gli svantaggi principali sono relativi al costo sia di acquisto che di utilizzo (batterie). Inoltre, tendenzialmente attraggono più esemplari femmine e appartenenti a specie altamente fototropiche (Campbell-Lendrum *et al.*, 1999), di conseguenza risultano meno utili negli studi ecologici, ma potrebbero risultare la scelta idonea nei piani di monitoraggio finalizzati alla ricerca di patogeni nei vettori.

**CO<sub>2</sub> *traps*.** Questi dispositivi sfruttano il potere attrattivo dell'anidride carbonica (che normalmente viene prodotta utilizzando ghiaccio secco) nei confronti degli insetti ematofagi, ragione per cui risultano molto più efficaci nella cattura delle femmine rispetto alle trappole ad attrazione luminosa. Anche il loro raggio di azione sembra essere maggiore (Gillies, 1980; Veronesi *et al.*, 2007; Kasap *et al.*, 2009); quindi possono essere utilizzate con successo in aree a bassa densità di flebotomi e in aree di nuova circolazione di patogeni trasmessi dai vettori. Gli svantaggi sono sovrapponibili a quelli delle CDC *light traps*.

Se gli obiettivi del piano di monitoraggio sono rivolti all'identificazione e alla mappatura delle aree a rischio per la presenza dei vettori, è utile raccogliere informazioni sul campo relative alla tipologia del sito di cattura e geo-referenziare le località monitorate; la scelta della trappola dovrebbe essere fatta in questo caso, anche in relazione all'area geografica in esame (ad esempio se ad alta o bassa o sconosciuta densità dei vettori), ma preferibilmente dovrebbe essere standardizzata e uniforme, per ottenere dati entomologici comparabili.

### **2.2.3 Controllo dei vettori**

Le strategie rivolte al controllo dei vettori sono basilari per prevenire la diffusione della leishmaniosi canina e devono essere indirizzate a tre obiettivi principali: il monitoraggio, importante per valutare la presenza/densità dei flebotomi e l'efficacia degli interventi, la lotta al vettore attraverso l'utilizzo d'insetticidi e il controllo ambientale e l'utilizzo di misure atte a prevenire il contatto tra l'insetto potenzialmente patogeno e il serbatoio dell'infezione (cane). Il controllo delle larve, come già ricordato, è poco realizzabile, poiché essendo terricole e non avendo fasi acquatiche, la bonifica ambientale non è generalmente efficace. Tuttavia, alcuni studi in aree dove erano stati identificati i siti di riproduzione, hanno dimostrato che la modifica dell'habitat e/o il trattamento con insetticidi residuali comportavano una riduzione significativa di adulti (Kumar *et al.*, 1995; Robert e Perich, 1995). Comunque, non essendo i siti di riproduzione facilmente identificabili e trattabili, la lotta agli adulti, effettuata tramite l'utilizzo di insetticidi ad azione residuale, ottiene risultati migliori. Trattamenti all'interno delle abitazioni o ricoveri per animali o l'utilizzo di repellenti su tende, zanzariere o sui vestiti sarebbero da preferire, in quanto campagne su larga scala comportano svantaggi sia economici che ambientali, oltre al rischio di insorgenza di resistenza agli insetticidi anche da parte di insetti non bersaglio (Alexander e Maroli, 2003). La strategia più efficace e applicabile, in particolare nel nostro areale geografico, è quindi rivolta alla protezione del principale serbatoio della malattia, il cane, prevenendone il contatto con i vettori, sia per proteggerlo dall'infezione leishmaniotica sia per limitare la diffusione del parassita se già infetto. Una soluzione che ha dato buoni risultati in differenti studi, è quella di applicare sui cani insetticidi con effetto anti-feeding e tossico ad uso topico (collari o *spot-on*) a base di piretroidi di sintesi, che essendo lipofili, vengono assorbiti dalla frazione lipidica del pelo e della cute dell'animale, diffondendosi su tutta la superficie

corporea e persistendo per alcuni mesi. In una delle prime sperimentazioni di campo avvenuta in Italia, Maroli e collaboratori (2001) dimostrarono che l'utilizzo di collari a base di deltametrina su una popolazione definita di cani, residenti in un'area endemica per leishmaniosi canina, in Italia meridionale, per due stagioni consecutive di attività dei vettori, comportava una riduzione della sieroprevalenza molto significativa, in relazione ad una popolazione canina di controllo sulla quale, durante lo studio, non era stato applicato il collare. Un'altra ricerca svolta su una coorte di cani residenti in un canile situato in un'area endemica, il 50% dei quali protetti con i collari a base di deltametrina, ha confermato nuovamente una riduzione significativa della sierconversione nei cani sieronegativi protetti dal presidio, stimata, alla fine dei due anni di studio, in un tasso di protezione del 50,8%. Inoltre, nei cani, protetti dal collare, divenuti sieropositivi durante la ricerca, è stata riscontrata una minore evidenza di segni clinici che nei cani senza collare, probabilmente perché sottoposti a un minore numero di punture di vettori infetti (Foglia Manzillo *et al.*, 2006). Ferroglio e collaboratori (2008) hanno svolto uno studio per valutare l'effetto protettivo dell'utilizzo d'insetticidi topici sui cani, utilizzando anche una formulazione *spot-on* a base di permetrina, comparandone l'efficacia protettiva con un gruppo di cani non trattati e un altro di cani ai quali era stato invece applicato il collare a base di deltametrina. Hanno verificato che tra i due gruppi di cani trattati non c'era una differenza significativa nella riduzione del rischio di infezione leishmaniotica, che invece si verificava confrontandoli con il gruppo di cani-controllo. Un recente lavoro ha valutato l'efficacia preventiva nei confronti di *L. infantum* di una nuova formulazione (collare), contenente una combinazione di imidacloprid al 10% e di flumetrina al 4,5%, in cani giovani residenti in una zona iper-endemica del sud Italia, dopo la loro prima esposizione all'agente eziologico. Questa combinazione si è dimostrata al 100% efficace nel prevenire l'infezione. Il tasso di protezione nei confronti della Lcan è risultato superiore a quello calcolato in studi condotti utilizzando collari a base di deltametrina in Italia meridionale (Otranto *et al.*, 2013). Per concludere, si può far riferimento all'allegato 2, in cui è stato inserito un articolo relativo ad una ricerca finalizzata a valutare l'efficacia dell'utilizzo di biocidi topici sui cani in un'area di nuova endemia, situata sui Colli Euganei (PD) in Italia nord-orientale. A differenza dei precedenti lavori, non è uno studio sperimentale propriamente detto ma un effettivo studio di campo, rappresentativo quindi della reale situazione che si potrebbe verificare in un focolaio di LCan che dai suoi esordi viene

monitorato e sul quale vengono consigliate e stimolate strategie di prevenzione, quali l'utilizzo massiccio di insetticidi-repellenti sui cani, nonché la sensibilizzazione della popolazione residente nei confronti dell'infezione in atto (Cassini *et al.*, 2013). Anche questo articolo è parte del programma e delle attività del percorso di dottorato qui presentato.

## **2.3 GIS, *Remote Sensing* e modelli predittivi**

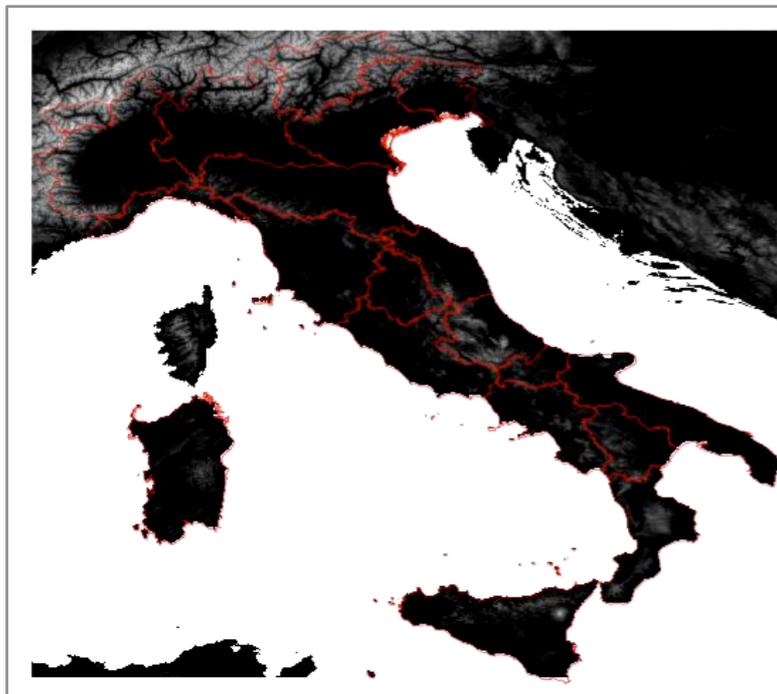
Lo sviluppo crescente delle conoscenze e degli strumenti relativi ai *Geographic Information System* (GIS) e ai dati provenienti dai *Remote Sensing* (RS) hanno contribuito al potenziamento delle attività di sorveglianza epidemiologica e degli studi ecologici, permettendo di comprendere meglio il legame esistente tra la distribuzione spaziale di un evento morboso e il suo andamento, correlandolo a dati ambientali, climatici, orografici. Inoltre, il notevole sviluppo nell'ultimo decennio di queste tecnologie le ha rese più fruibili anche a tutti i soggetti che a vario titolo si occupano di Salute Pubblica, grazie allo sviluppo di programmi più semplici da utilizzare, software liberi (*Open Source*) o basati su internet (Web GIS), determinando un più semplice accesso agli utenti e favorendo così la condivisione e la divulgazione delle informazioni, ad esempio attraverso mappe che ne rendono immediata la lettura e l'interpretazione.

### **2.3.1 GIS e RS**

Un GIS è fondamentalmente un sistema informativo computerizzato, come un generico database, ma con una differenza fondamentale: tutte le informazioni in un GIS devono avere un riferimento geografico (latitudine/longitudine, o altre coordinate spaziali). Nel complesso un GIS è una piattaforma costituita da hardware, software, dati e strumenti volti all'acquisizione, trasformazione, analisi e visualizzazione d'informazioni aventi una specifica localizzazione geografica (geo-referenziate). I GIS permettono d'integrare dati provenienti da una molteplicità di fonti che descrivono diverse informazioni (ad esempio la delimitazione di una provincia o la temperatura media invernale) rappresentandole su una mappa digitale. I dati possono variare nel formato, nella risoluzione e nella struttura, ma vengono immagazzinati utilizzando due approcci: il modello vettoriale e quello *raster*. Nel modello vettoriale i

dati di tipo spaziale o oggetti geografici, corrispondono a punti (coppia di coordinate), linee (serie di punti) e poligoni (aree delimitate da linee) e a ciascun oggetto vettoriale poi sono associati degli attributi che corrispondono invece ai dati tradizionalmente intesi, cioè alle caratteristiche degli oggetti geografici, quali ad esempio la densità della popolazione in quella determinata area. Il modello *raster*, invece, utilizza una matrice di celle adiacenti (pixel) e ad ogni cella è assegnato un valore. Generalmente i *raster* sono immagini che rappresentano fenomeni continui, ad esempio la piovosità o un modello digitale del terreno (Rinaldi *et al.*, 2006). La risoluzione del *raster* equivale alla misura del lato della cella (fig. 8).

Un aspetto peculiare ed estremamente versatile dei GIS è dato dalla possibilità di sovrapporre strati o livelli informativi (*layers*), ciascuno dei quali descrive una categoria di informazioni (per esempio: strade, posizione di ospedali, morbosità, etc.) e metterli in relazione per ottenere nuove informazioni dai dati esistenti. I dati geografici, per venire correttamente rappresentati all'interno di un GIS, devono possedere tutti lo stesso Sistema di coordinate e la stessa proiezione. Spesso quindi si rende necessario manipolarli prima dell'inserimento (convertire e/o ri-proiettare le coordinate).



**Figura 8:** Modello digitale del terreno (immagine in formato *raster*) e linee di confine delle regioni italiane (formato vettoriale).

Un sistema di coordinate è semplicemente un criterio per descrivere una proprietà spaziale relativa ad un centro. Per fare questo si utilizzano diversi modi:

- il sistema di coordinate geocentriche è basato su un normale sistema di coordinate (X, Y, Z) con l'origine posta nel centro della Terra ed è il sistema che un GPS usa al suo interno per eseguire i propri calcoli;
- il sistema di coordinate sferiche o geografiche, probabilmente il più conosciuto, si basa su angoli relativi ad un meridiano di riferimento (*Prime Meridian*) ed all'Equatore, angoli solitamente espressi come longitudine e latitudine e le altezze sono di solito fornite rispetto al livello medio del mare oppure rispetto al *datum*;
- infine il sistema di coordinate cartesiane definito come un sistema di coordinate piane sulla superficie della Terra.

La Terra inoltre può essere rappresentata da vari modelli (*datum*) e generalmente viene utilizzato l'ellissoide come approssimazione: il *datum* indica il centro e l'orientamento dell'ellissoide. Esistono diversi *datum* alcuni utilizzati a livello globale, altri definiti localmente. Il *datum* più conosciuto è WGS84, utilizzato dai sistemi GPS attuali, fornisce una buona approssimazione per l'intera terra e per questo si sta affermando a livello globale. La proiezione infine, trasporta le coordinate dall'ellissoide di riferimento su un piano: ciascuna proiezione è usata per scopi diversi in quanto privilegia la rappresentazione delle forme, delle aree o delle distanze, le une a scapito delle altre; tra le proiezioni più utilizzate a livello globale c'è la *Universal Transverse Mercator* (UTM) (Salvemini *et al.*, 2013).

Per quanto riguarda gli strumenti software che costituiscono il GIS, è da notare che molti di essi hanno recentemente avuto un forte sviluppo in ambienti "open": si assiste cioè al passaggio dai software commerciali tradizionali (quali ad esempio ArcGis® della ESRI, MapInfo® della Pitney Bowes MapInfo) a sistemi aperti, modificabili, disponibili liberamente e gratuitamente su Internet (quali ad esempio GRASS, Quantum Gis o i Web GIS), ai quali sviluppatori e ricercatori stanno dedicando sempre maggiori energie. Attualmente, si può affermare che l'*Open Source* GIS e i software Web GIS hanno raggiunto uno stadio di sofisticatezza, stabilità, utilizzabilità e facilità per gli utenti che eguaglia quella dei prodotti commerciali.

**Principali funzioni dei GIS applicabili negli studi epidemiologici.** Le tecnologie e gli strumenti GIS permettono di effettuare analisi spaziali, restituendo informazioni utili per scopi epidemiologici. Le principali funzioni utilizzate sono:

- l'*overlay* topologico, per identificare le aree d'intersezione tra due o più strati d'informazioni, per produrre nuovi tematismi;
- le *query* spaziali, per interrogare le informazioni presenti nei dati in relazione a criteri spaziali (analisi di vicinanza, inclusione, sovrapposizione, etc.);
- la *network analysis*, per calcolare per esempio la più breve distanza tra due punti;
- la creazione di *buffer zone* attorno a punti aventi specifiche caratteristiche;
- l'interpolazione, processo che permette partendo da punti noti di dedurre il valore dello spazio vicino;
- la correlazione spaziale, per valutare la correlazione (o associazione) tra due o più variabili, per prevederne un'altra nella stessa area;
- la *cluster* analisi, utile per individuare pattern spaziali non casuali.

Negli studi epidemiologici relativi alle malattie trasmesse da vettori è molto utile creare mappe descrittive indicanti le località dove si sono verificati ad esempio focolai di malattia o mappe di distribuzione della presenza dei vettori, o mappe di incidenza e/o prevalenza di una certa infezione trasmessa (mappe coropletiche, isopletiche), l'analisi per linee (ad esempio per definire le linee di propagazione e diffusione di un determinato evento morboso), la *point pattern analysis*, per comprendere le relazioni spaziali tra punti, rappresentanti ad esempio focolai autoctoni di malattia e la cattura dei vettori e le relazioni esistenti tra questi e variabili ambientali e climatiche. A questo scopo in letteratura sono stati riportati diversi modelli di regressione spaziale (Cringoli *et al.*, 2005; Bergquist e Rinaldi, 2010; Jerrett *et al.*, 2010; Auchincloss *et al.*, 2012).

Il **telerilevamento** (*Remote Sensing*) può essere definito come l'acquisizione e la misurazione di dati/informazioni su alcune proprietà di un fenomeno, oggetto, materiale, presenti sulla superficie terrestre da un dispositivo di registrazione non in

contatto intimo con le caratteristiche sotto sorveglianza. Si tratta essenzialmente dell'acquisizione, recupero, analisi e visualizzazione d'informazioni su oggetti o fenomeni presenti sulla Terra, attraverso l'utilizzo di sensori posti su aereomobili o satelliti o altre tecnologie progettate per rilevare energia, luce o proprietà ottiche a distanza (Short, 2009). Le immagini che vengono prodotte, possono dare diverse informazioni sulle componenti biologiche e non, presenti sulla superficie terrestre: informazioni sui fattori ambientali come la vegetazione, la copertura/uso del suolo, o fattori climatici come la temperatura al suolo, l'umidità al suolo e atmosferica, le precipitazioni. Tutti questi fattori sono strettamente correlati con l'insorgenza di molte malattie legate all'ambiente, come le malattie trasmesse da vettori, e sono in grado di conseguenza di influenzarne la loro diffusione. In letteratura sono presenti moltissimi studi sull'utilizzo dei dati rilevati da satellite nello studio delle malattie trasmesse da vettori, anche se l'utilizzo di queste informazioni negli studi ecologici ha avuto un enorme incremento dagli anni '90 in poi: numerose sono le ricerche iniziate in quegli anni, ad esempio, sul controllo della malaria (Pope *et al.*, 1993; Rejmánková *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1997; Devi *et al.*, 2003), della filariosi (Thompson *et al.*, 1996; Hassan *et al.*, 1998) o della leishmaniosi (Cross *et al.*, 1996).

Nel presente studio sono stati utilizzati dati telerilevati provenienti dal sensore MODIS, montato sui satelliti TERRA e AQUA, come il *Normalized Difference Vegetation Index-NDVI* e la *Land Surface Temperature-LST*) e una mappa relativa alla copertura del suolo prodotta dal progetto europeo CORINE Land Cover, che verranno in seguito illustrati nel dettaglio.

**Dati provenienti dal sensore MODIS (MODerate resolution Imaging Spectroradiometer).** Creati appositamente per il programma EOS (Earth Observing System), che ha come principale obiettivo quello di migliorare la conoscenza sui cambiamenti globali terrestri attraverso l'osservazione continua del pianeta, i satelliti TERRA e AQUA sono il risultato di una collaborazione tra l'agenzia spaziale americana NASA e quella giapponese NASDA. Il primo sorvola la Terra da nord a sud, passando l'equatore, di mattina, mentre AQUA passa da sud a nord nel pomeriggio. Volano su un'orbita eliosincrona, ad un'altezza di 705 km dalla Terra. Tale orbita comporta due passaggi giornalieri per ciascun satellite, approssimativamente alla stessa ora solare ogni giorno. Su entrambi i satelliti è montato il MODIS, uno spettro-radiometro a 36 bande che misura la radiazione nel

visibile e nell'infrarosso, derivandone prodotti relativi alla vegetazione, alla tipologia della superficie, etc. Il primo MODIS fu lanciato a bordo del satellite TERRA nel Dicembre 1999, il secondo su AQUA nel Maggio 2002. Il MODIS quindi produce due coperture globali a risoluzione di 250 m (rosso e infrarosso vicino, NIR), 500 m (infrarosso medio, MIR) e 1000 m (infrarosso termico, TIR) con elevata risoluzione spaziale e temporale. Tutti i dati telerilevati sono disponibili gratuitamente (in formato hdf) dal sito della LP DAAC (*Land Processes Distributed Active Archive Center*) della NASA che fornisce anche tutte le informazioni relative ai prodotti presenti, tutorial e alcune applicazioni per scaricarli e processarli nel comune formato geo.TIFF, utilizzabile nei software GIS (<https://lpdaac.usgs.gov>).

Tra i prodotti disponibili, l'NDVI viene utilizzato per valutare l'attività fotosintetica presente, in base al seguente algoritmo:

$$\text{NDVI} = (\text{NIR}-\text{R}) / (\text{NIR}+\text{R})$$

ovvero, dal rapporto tra differenza e somma delle bande del vicino infrarosso, NIR (frazione riflessa dalle foglie) e rosso R (frazione assorbita da parte della clorofilla): il concetto è che se è presente più luce riflessa nell'infrarosso vicino che nel visibile è probabile che la vegetazione sia più densa in quanto la clorofilla assorbe gran parte della luce visibile. L'indice risulta molto utile per descrivere anche le condizioni climatiche e di umidità del suolo in quanto risultano correlate all'attività vegetazionale. Il dato fornito da NASA LPDAAC (MOD13Q1) consiste in un'immagine composita di 16 gg con una risoluzione spaziale di 250 m ([https://lpdaac.usgs.gov/products/modis\\_products\\_table/mod13q1](https://lpdaac.usgs.gov/products/modis_products_table/mod13q1)).

La temperatura al suolo (LST) viene stimata a partire dalla radiazione rilevata e da una stima dell'emissività del suolo (Dash *et al.*, 2001). La determinazione della temperatura di superficie LST si basa sulla funzione di Planck, che pone in relazione l'energia radiante emessa da un corpo nero con la temperatura assoluta della superficie e può essere quindi definita come l'effetto complessivo e direzionale della temperatura radiometrica superficiale (Norman e Becker, 1995). Il prodotto finito (MOD11A2) rappresenta la temperatura al suolo espressa in gradi Kelvin, con una risoluzione spaziale di 1 Km e viene fornito con un'immagine che rappresenta la media della LST diurna e notturna di 8 gg ([https://lpdaac.usgs.gov/products/modis\\_products\\_table/mod11a2](https://lpdaac.usgs.gov/products/modis_products_table/mod11a2)).

**Corine Land Cover.** Il progetto Corine Land Cover (CLC) è nato a livello europeo specificamente per il rilevamento e il monitoraggio delle caratteristiche di copertura e uso del territorio, con particolare attenzione alle esigenze di tutela ambientale. La prima realizzazione del progetto CLC risale al 1990 (CLC90), mentre gli aggiornamenti successivi si riferiscono all'anno 2000 tramite il progetto Image & Corine Land Cover 2000. Il progetto CLC 2006 si basa su un aggiornamento e miglioramento dei prodotti ottenuti dai precedenti progetti. Le fonti d'informazione utilizzate per la sua realizzazione sono basate su immagini satellitari prodotte dai satelliti: Landsat 7 (12,5 m di risoluzione), SPOT 4 (HRVIR – 20 m di risoluzione) e IRS P6 (LISS III - 23 m di risoluzione), abbinate ad ortofoto digitalizzate e ad un Modello Digitale del Terreno (DTM). Il risultato è una cartografia (in formato sia *raster* che vettoriale) della copertura del suolo con una risoluzione spaziale di 100 m e 250 m, i cui dati di copertura/uso del suolo sono organizzati su tre livelli gerarchici e suddivisi in 44 classi (<http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/corine-land-cover-2006-clc2006-100-m-version-12-2009#tab-gis-data>).

### **2.3.2 Analisi ecologiche e modelli predittivi di distribuzione di specie**

L'influenza che rivestono il "luogo" e lo spazio sulla diffusione delle malattie è stata a lungo investigata ed è un concetto basilare in epidemiologia. L'utilizzo dei GIS, il miglioramento delle loro potenzialità, le analisi spaziali ed i modelli predittivi hanno dato nell'ultimo decennio una svolta in epidemiologia geografica (spaziale) ed in Sanità Pubblica. Gli scopi principali delle analisi spaziali e dei modelli predittivi per la salute pubblica e animale sono essenzialmente indirizzati a: mappare le patologie, individuare i fattori di rischio connessi all'insorgenza di certe patologie (analisi ecologiche), comprendere se questi si concentrano attorno a certe aree geografiche (studi di aggregazione), prevedere cosa accadrà nel futuro (previsione temporale) e in diverse aree geografiche (previsione spaziale) (Bailey, 2001; Stevens e Pfeiffer, 2011). Come accennato in precedenza, gli "studi ecologici" si occupano di indagare le associazioni tra presenza/assenza di una data malattia (o di una specie animale-vegetale) e i potenziali fattori di rischio o favorenti (Bailey, 2001).

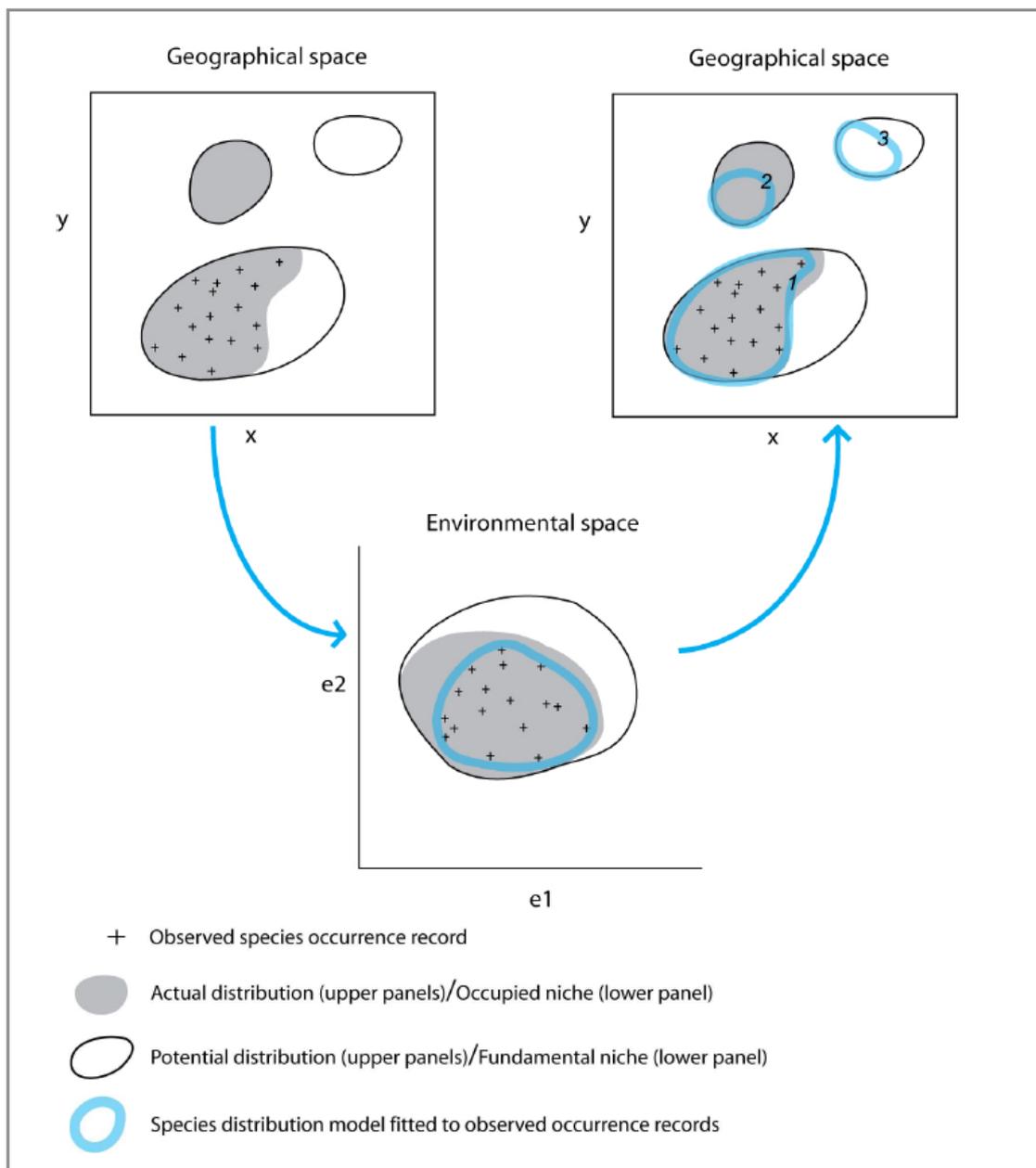
Partendo dal condivisibile presupposto che le diverse specie sono influenzate dalle condizioni fisiche, ambientali e climatiche nelle quali vivono, i Modelli di Distribuzione di Specie (*Species Distribution Models-SDMs*), detti anche da alcuni Autori *Ecological Niche Modeling* o *Environmental Niche Modeling*, sono stati,

soprattutto nell'ultimo decennio, ampiamente utilizzati per acquisire conoscenze ecologiche ed evolutive relative a diverse specie animali e vegetali, per comprendere la loro naturale distribuzione e per fare previsioni sulla loro attuale o futura potenziale diffusione. I SDMs utilizzano differenti modelli matematici, ma l'approccio comune è quello di combinare dati relativi alla presenza/assenza o abbondanza di una data specie con variabili ambientali, per identificare quali siano le condizioni più favorevoli per la specie stessa (motivo per cui alcuni Autori preferiscono utilizzare per questi modelli il nome: *Environmental Envelope Models*). Vengono impiegati ampiamente in ecologia, in biologia dell'evoluzione, in epidemiologia, in biogeografia, in quanto possono essere applicati ad un'ampia varietà di scopi, ad esempio negli interventi di tutela e conservazione ambientale (Araújo *et al.*, 2011a), nella valutazione dei potenziali limiti geografici di specie invasive (Broennimann *et al.*, 2007 ; Peterson *et al.*, 2008), nella mappatura del rischio di trasmissione di malattie (Peterson *et al.*, 2006, 2007) e delle malattie trasmesse da vettori (Peterson e Shaw, 2003; Mughini-Gras *et al.*, 2013), per prevedere gli effetti dei cambiamenti climatici sulla distribuzione delle specie (Pearson e Dawson, 2003; Araújo e Rahbek, 2006; Lawler *et al.*, 2009) sia in ambienti terrestri sia acquatici e su una grande varietà di specie (pesci, insetti, piante, mammiferi). Un'ampia trattazione sugli aspetti principali relativi agli SDMs e sui potenziali utilizzi è trattata da Schröder (2008), Elith e Leathwick (2009), Araújo e Peterson (2012). Come modelli previsionali, possono essere utilizzati in due modi: in primo luogo, le previsioni sono fatte per identificare la potenziale distribuzione di una data specie all'interno dell'area campionata, partendo dai dati noti e nello stesso lasso di tempo, come quello in cui è avvenuto il campionamento, (questo approccio viene chiamato anche *model-based interpolation*). Le applicazioni tipiche comprendono analisi globali di distribuzione di specie, la mappatura all'interno di una regione per la pianificazione, sorveglianza, conservazione e gestione di risorse e fondamentalmente per individuare l'habitat adatto per le specie. Tali modelli sono di solito abbastanza affidabili ed efficaci a condizione che i dati utilizzati siano scelti in base alle conoscenze della biologia delle specie in esame e le eventuali correlazioni tra le variabili predittive siano stabili nell'area geografica nella quale sono fatte le previsioni. In secondo luogo, i modelli sono utilizzati anche per prevedere la distribuzione di una specie in nuove aree geografiche o in un nuovo lasso di tempo (passato o futuro). La previsione a nuove regioni geografiche o in nuovi tempi (definita anche trasferibilità o estrapolazione)

può però essere intrinsecamente rischiosa, perché spesso è stata utilizzata senza informazioni chiare sulle similitudini ambientali tra le differenti aree (quella dove viene costruito il modello e quella dove viene proiettato) e spesso i dati di *input* (ovvero le variabili ambientali e i *record* di presenza/assenza o abbondanza di una data specie utilizzati per costruire il modello) non sono rappresentativi delle nuove condizioni che il modello andrà a descrivere (Miller *et al.*, 2004; Araùjo, 2007; Elith e Leathwick, 2009). Come già anticipato, la strategia comune a questi modelli, per stimare la distribuzione geografica attuale o potenziale di una specie, è quella di caratterizzare le condizioni ambientali che sono adatte per la specie e quindi identificare dove l'habitat adatto è distribuito nello spazio; quindi fondamentalmente questo tipo di modello va a definire lo spazio geografico dove esistono le condizioni ambientali favorevoli alla presenza e al mantenimento di una data specie. Ci può essere una serie di motivi per cui una specie non possa effettivamente occupare tutti i siti idonei previsti (ad esempio la presenza di barriere geografiche che ne limitano la dispersione, la concorrenza con altre specie, etc.), tuttavia, questa è la strategia fondamentale e comune alla maggior parte dei modelli di distribuzione. Questi modelli mirano a stimare l'habitat adatto per una specie associando record di occorrenza con una serie di variabili ambientali (scelte in base alle conoscenze relative alla biologia della specie) partendo dalla premessa che la distribuzione osservata di una specie fornisce già informazioni utili per comprendere i requisiti ambientali di tale specie. L'immagine in figura 9 mostra la relazione tra un'ipotetica distribuzione di una specie nello spazio geografico, definito da coordinate  $x$  e  $y$  (figura in alto a sx) e lo spazio ambientale, qui illustrato per semplicità solo in due dimensioni ovvero due fattori ambientali,  $e_1$  ed  $e_2$  (figura in basso al centro); per inciso il concetto di spazio ambientale ha le sue basi nella teoria di nicchia ecologica: Hutchinson (1957) definisce la nicchia fondamentale di una specie come l'insieme delle condizioni ambientali entro cui una specie può sopravvivere e mantenersi. Le croci rappresentano i record di presenza di una data specie. L'area grigia nello spazio geografico rappresenta l'effettiva distribuzione della specie. Alcuni settori della distribuzione reale della specie possono essere sconosciuti, in quanto la specie, ad esempio, non è stata catturata. L'area grigia nello spazio ambientale rappresenta la parte di nicchia occupata dalla specie (la nicchia occupata). Anche in questo caso, si noti che i record di presenza possono non identificare la reale portata della nicchia occupata quando proiettati nello spazio ambientale (area grigia intorno alle croci). La

linea nera continua nello spazio ambientale raffigura la nicchia fondamentale della specie, ovvero l'intera gamma di condizioni abiotiche entro cui la specie è vitale; nello spazio geografico, le linee continue nere rappresentano invece le aree con le condizioni abiotiche della nicchia fondamentale: questa è la potenziale distribuzione della specie nello spazio geografico. Alcune regioni della distribuzione potenziale della specie possono non essere in realtà occupate dalla specie, a causa per esempio d'interazioni biotiche o limitazioni di dispersione. Le linee azzurre illustrano come un modello di distribuzione di specie potrebbe caratterizzare la nicchia della specie nello spazio ambientale, partendo appunto dai dati di occorrenza della specie e da una serie di variabili ambientali. Si noti che, nello spazio ambientale il modello non può identificare la nicchia fondamentale, anzi, il modello identifica solo la parte della nicchia definita dai record utilizzati. Quando viene ri-proiettato nello spazio geografico (figura in alto a dx), il modello identifica sia l'effettiva distribuzione sia la distribuzione potenziale della specie: si noti che una porzione della distribuzione reale della specie non viene identificata dal modello, poiché i dati utilizzati non identificano la reale portata della nicchia occupata; allo stesso modo il modello potrebbe identificare una zona della distribuzione potenziale non ancora occupata dalla specie per diversi fattori.

I dati relativi alla presenza/assenza (dati di *training*) e le variabili ambientali vengono utilizzati per costruire i modelli attraverso diversi algoritmi di modellazione; l'output sarà una mappa dove sono rappresentati nello spazio le aree idonee o non idonee alla specie in esame. In questa fase va testata la capacità del modello di predire la potenziale distribuzione delle specie, utilizzando un insieme di record di occorrenza della specie che non sono stati precedentemente utilizzati nel modello e attraverso test statistici adeguati (Pearson, 2007).



**Figura 9:** Illustrazione della relazione tra un'ipotetica distribuzione di una specie nello spazio geografico e ambientale e di come potrebbe funzionare un SDM (tratto da Pearson, 2007).

Un metodo robusto e rigoroso per valutare il potere predittivo di un modello (la cosiddetta validazione) è quello di utilizzare come dati di *test*, dati indipendenti raccolti da una nuova area o sulla base di una strategia di campionamento diversa (Guisan e Zimmermann, 2000), ma se, come spesso accade, un set di dati realmente indipendente non è disponibile, i dati di *training* possono essere suddivisi in modo da creare un data set indipendente. Due tipi principali di test di validazione sono utilizzati: il primo, è la *Confusion Matrix*, che confronta i dati discreti osservati con i

dati discreti previsti (tab. 1) e i differenti parametri statistici utilizzati per descriverne i risultati, schematizzati nella tabella 2.

		Record osservati	
		presenza	assenza
Record predetti	presenza	a (VP)	b (FP)
	assenza	c (FN)	d (VN)

**Tabella 1:** *confusion matrix*: le celle in verde rappresentano i record correttamente predetti (veri positivi-VP e veri negativi-VN) mentre le celle in rosso i record non correttamente predetti dal modello (falsi positivi-FP e falsi negativi-FN).

Poiché questi test trattano con previsioni discrete (0/1 o habitat idoneo/non idoneo) e la maggior parte degli algoritmi utilizzati nei SDMs generano invece previsioni continue, è necessario fissare una soglia (*threshold*) che deve essere in precedenza stabilita per discriminare quali record verranno convertiti in presenza e quali in assenza. La selezione della soglia va correttamente valutata, poiché può avere effetti significativi sia sulla precisione del modello che sulle previsioni e deve essere scelta in conformità con gli obiettivi dello studio (Pearson, 2007; Miller, 2010; Peterson *et al.*, 2011). Due studi hanno suggerito le linee guida su cui basare tale decisione, ad esempio, utilizzando la prevalenza, la probabilità media predetta dei dati di *training* (Liu *et al.*, 2005), o la soglia che massimizza kappa (Freeman e Moisen, 2008). In generale, i falsi positivi possono derivare da fattori biotici e abiotici che impediscono ad una specie di occupare l'habitat adatto, (ad esempio limitazioni alla dispersione o problemi relativi al campionamento), i falsi negativi possono invece essere dovuti ad imprecisioni del modello o addirittura alla scelta di una soglia troppo alta.

Measure	Description	Calculation
PCC	Percent correctly classified	$(a + d)/n$
Kappa	Difference between prediction accuracy and chance agreement	$\frac{[(a + d) - ((a + c) \times (a + b) + (b + d) \times (c + d))/n]}{[n - ((a + c) \times (a + b) + (b + d) \times (c + d))/n]}$
Sensitivity	Proportion of <i>observed present</i> correctly predicted	$a/(a + c)$
Specificity	Proportion of <i>observed absent</i> correctly predicted	$d/(b + d)$
PPP	Proportion of <i>predicted present</i> correctly predicted	$a/(a + b)$
NPP	Proportion of <i>predicted absent</i> correctly predicted	$d/(c + d)$
TSS	True skill statistic	$a/(a + c) + d/(b + d) - 1$

**Tabella 2:** test comunemente utilizzati per valutare l'accuratezza di un SDMs (tratto da Miller, 2010).

Il secondo test di validazione utilizzato è quello del calcolo dell'area sottesa dalla curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (Fielding e Bell, 1997). Essa mostra la probabilità di rilevare il vero segnale (sensibilità) e il falso segnale (1 - specificità) per tutte le soglie disponibili. Questo test evita la fase di selezione della soglia, un netto vantaggio e utilizza anche tutte le informazioni derivanti dalla previsione, piuttosto che i risultati discreti. Queste sue caratteristiche la rendono il metodo più idoneo al confronto di modelli diversi. Per queste ragioni, il calcolo dell'area sottesa dalla curva ROC (AUC) è diventato il test di validazione standard utilizzato per confrontare approcci diversi (Elith *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2010). Esiste comunque un comune consenso tra i diversi ricercatori per quanto riguarda la valutazione della precisione dei SDMs, ovvero che nessun singolo metodo di validazione dovrebbe essere utilizzato da solo e che va scelto in relazione agli obiettivi dello studio (Pearson, 2007).

Diversi algoritmi di modellazione sono stati applicati per classificare la probabilità di presenza e assenza di una determinata specie in funzione di un insieme di variabili ambientali (Franklin, 2009). La tabella 3 elenca alcuni approcci comunemente usati nei SDMs. Alcuni metodi sono statistici (ad esempio, i modelli lineari generalizzati [GLMs] e i modelli additivi generalizzati [GAMs]), mentre altri approcci sono basati su tecniche di *machine-learning* (per esempio, i modelli di massima entropia [Maxent] e le reti neurali artificiali [ANNs]). Spesso questi modelli sono stati implementati in software *user-friendly*.

Method(s) <sup>1</sup>	Model/software name <sup>2</sup>	Species data type	Key reference/URL
Gower Metric	DOMAIN*	presence-only	Carpenter et al. 1993 <a href="http://www.cifor.cgiar.org/docs/ref/research_tools/domain/">http://www.cifor.cgiar.org/docs/ref/research_tools/domain/</a>
Ecological Niche Factor Analysis (ENFA)	BIOMAPPER*	presence and background	Hirzel et al. 2002 <a href="http://www2.unil.ch/biomapper/">http://www2.unil.ch/biomapper/</a>
Maximum Entropy	MAXENT*	presence and background	Phillips et al. 2006 <a href="http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/">http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/</a>
Genetic algorithm (GA)	GARP <sup>3*</sup>	pseudo-absence <sup>4</sup>	Stockwell and Peters 1999 <a href="http://www.lifemapper.org/desktopgarp/">http://www.lifemapper.org/desktopgarp/</a>
Artificial Neural Network (ANN)	SPECIES	presence and absence (or pseudo-absence)	Pearson et al. 2002
Regression: generalized linear model (GLM), generalized additive model (GAM), boosted regression trees (BRT), multivariate adaptive regression splines (MARS)	Implemented in R <sup>5</sup>	presence and absence (or pseudo-absence)	Lehman et al. 2002 Elith et al. 2006 Leathwick et al. 2006 Elith et al. 2007
Multiple methods	BIOMOD	presence and absence (or pseudo-absence)	Thuiller 2003
Multiple methods	OpenModeller	depends on method implemented	<a href="http://openmodeller.sourceforge.net/">http://openmodeller.sourceforge.net/</a>

**Tabella 3:** alcuni dei metodi pubblicati per lo sviluppo dei Modelli di Distribuzione di Specie (tratto da Pearson, 2007)

Ci sono alcune importanti differenze tra gli algoritmi utilizzati nei differenti modelli che devono essere considerate nella scelta: un fattore chiave è se il modello richiede dati di assenza delle specie osservate (ad esempio, GLM e GAM). Tuttavia, spesso non sono disponibili dati di assenza affidabili e quindi altri metodi sono stati implementati con questo scopo. Possiamo distinguere tre tipi di modelli per record di presenza:

- 1) I metodi che si basano esclusivamente sui record di presenza (ad esempio DOMAIN). Questi metodi utilizzano dati di solo-presenza, in quanto la previsione è fatta senza alcun riferimento ad altri campioni della zona di studio.
- 2) I metodi che utilizzano dati ambientali “di sfondo” per l'intera area di studio (ad esempio MaxEnt ed ENFA). Questi metodi relazionano l'ambiente, nel quale i dati di presenza relativi alla specie sono noti, all'ambiente nel resto dell'area di studio (lo “sfondo” o *background*); i record di presenza sono inclusi come parte dello “sfondo”.
- 3) I metodi che utilizzano dati di “pseudo-assenza” dalla zona di studio, che vengono utilizzati al posto dei record di assenza. Una differenza importante tra l'approccio che utilizza dati di pseudo-assenza con quello che utilizza dati di sfondo è che il primo non include i record di presenza all'interno del set di record di pseudo-assenza.

Un'ulteriore considerazione nella scelta del modello è se lo stesso è in grado di determinare l'influenza delle diverse variabili o in relazione alla sua capacità predittiva (Pearson, 2007). Alcuni modelli possono avere un ottimo potere predittivo, ma non ci permettono di comprendere facilmente il contributo relativo di ogni variabile nella previsione. Ad esempio, le reti neurali artificiali (ANN) hanno

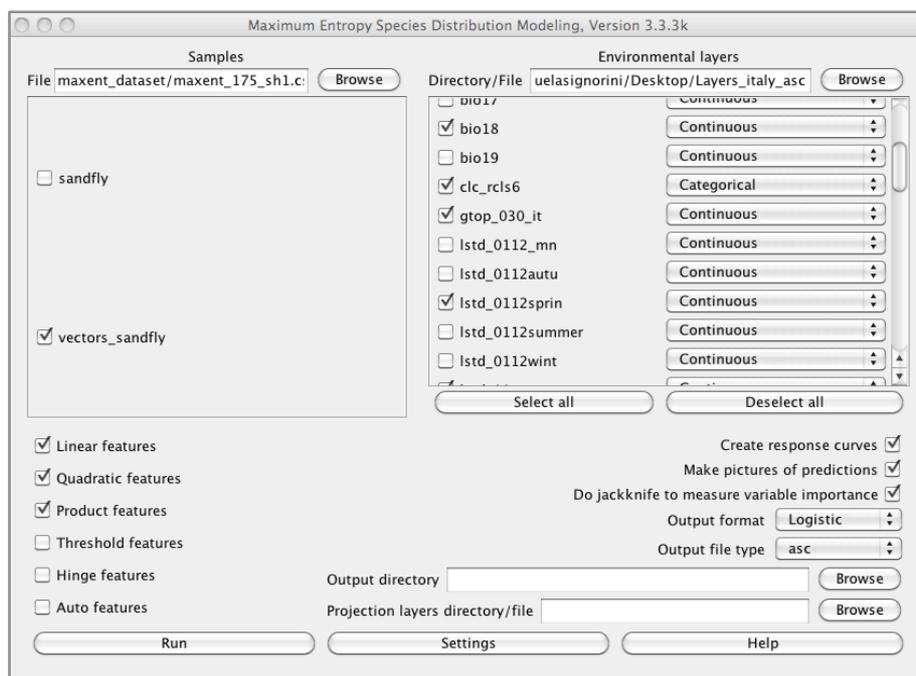
dimostrato una buona capacità predittiva (Thuiller, 2003; Segurado e Araújo, 2004), ma non è semplice interpretare il contributo di ogni variabile, al contrario nei GLM il contributo relativo delle diverse variabili è immediatamente evidente (Guisan *et al.*, 2002). Non è possibile nell'ambito di questa sintesi descrivere le basi teoriche dei differenti modelli e i relativi vantaggi e svantaggi. Tuttavia, verrà descritto in maniera più dettagliata il modello di massima entropia (MaxEnt), in quanto si tratta del metodo utilizzato nel presente studio.

**MaxEnt.** È un metodo per caratterizzare distribuzioni di probabilità partendo da informazioni incomplete. Le sue origini si trovano in meccanica statistica (Jaynes, 1957). Il **Principio della Massima Entropia** è enunciato nella seguente definizione:

*“In presenza di dati e/o evidenze sperimentali riguardanti un ben determinato fenomeno fisico-statistico, per stimarne la relativa distribuzione di probabilità è sufficiente scegliere un modello che sia consistente con i dati disponibili ma che altrove abbia la massima entropia”.*

Massimizzare l'entropia di una distribuzione di probabilità significa generalizzarne il comportamento statistico su tutto ciò che non è conosciuto a priori. Si massimizza cioè l'incertezza assunta sui parametri non noti del sistema, ottenendo dei modelli basati solo su dati certi. Nello stimare una distribuzione di probabilità, che definisce poi la distribuzione di una specie in una determinata area, MaxEnt applica quindi il principio che la distribuzione stimata deve essere dedotta da ciò che si conosce (ovvero le condizioni ambientali che caratterizzano l'area in cui una specie è stata trovata), evitando di stimare distribuzioni di probabilità non supportate dai dati. L'approccio è quello di individuare la distribuzione di probabilità di massima entropia, ovvero quella che, tenendo conto della natura dei fattori ambientali che caratterizzano sia i punti di presenza che l'intera area di studio (il “*background*”), utilizzati come “costrittori”, si avvicina maggiormente ad una distribuzione uniforme (Phillips *et al.*, 2006; Phillips e Dudík 2008), restituendo una distribuzione spaziale dell'idoneità del territorio per la specie stessa. I “costrittori” o vincoli ai quali questa distribuzione è soggetta sono rappresentati dalle nostre informazioni incomplete sulla distribuzione osservata della specie e delle caratteristiche ambientali dell'intera area di studio. Questo metodo quindi valuta l'idoneità di ogni pixel presente nell'area di

studio, in funzione delle variabili ambientali utilizzate e il modello di distribuzione di probabilità prodotto rispetta una serie di vincoli, derivati da funzioni delle variabili ambientali stesse. Maggiore è l'informazione quindi, minore sarà l'entropia (infatti è generalmente considerata come l'espressione del disordine di un sistema fisico o come misura della mancanza d'informazioni sulle caratteristiche di un sistema fisico). In MaxEnt, quindi, l'entropia misurata all'interno di una cella (pixel) corrispondente ad un record di presenza della specie indagata dovrebbe essere bassa, mentre l'entropia misurata all'interno di una cella di presenza incerta dovrebbe essere alta. Phillips e collaboratori (2006) hanno sviluppato un software "open source" (l'ultima versione è: MaxEnt 3.3.3k) per implementare il metodo MaxEnt nei Modelli di Distribuzione di Specie, disponibile all'indirizzo web: <http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/>, la cui interfaccia è anche molto semplice da utilizzare per gli utenti (fig. 10).



**Figura 10:** Interfaccia grafica del software MaxEnt 3.3.3k.

Il metodo MaxEnt non richiede record di assenza per le specie, ma genera invece dati di “sfondo” ambientali per l'intera area di studio. I pixel dell'area di studio costituiscono lo spazio su cui è definita la distribuzione di probabilità di massima entropia.

I vantaggi principali che MaxEnt offre sono i seguenti: richiede solo i record di presenza insieme a delle variabili ambientali per l'intera area di studio ed è ben noto come l'assenza sia, ad eccezione di alcuni casi, difficile da accertare; si possono utilizzare sia variabili continue sia categoriali; l'output può incorporare le interazioni tra le diverse variabili; l'output è continuo e ciò consente di stimare sottili distinzioni tra le aree (pixel) previste idonee e non; se si preferiscono previsioni binarie, MaxEnt consente una grande flessibilità nella scelta della soglia (Phillips *et al.*, 2006; Elith *et al.*, 2010; Peterson *et al.*, 2011). I risultati ottenuti con questo metodo sono inoltre meno influenzati da livelli ineguali di campionamento, caratteristica che, in considerazione della poca omogeneità dei dati in genere disponibili, spesso concentrati in aree particolari, può essere molto utile; un altro vantaggio è la possibilità di utilizzare dati raccolti in maniera non standardizzata e rispetto ad altri algoritmi di modellazione sembra funzionare bene anche quando la quantità di dati di *training* è limitata (Hernandez *et al.*, 2006; Papes e Gaubert, 2007; Pearson *et al.*, 2007). Il software effettua test di validazione, riportandoli nell'output e consente all'utente di eseguire una procedura (*jackknife*) per determinare quali variabili ambientali contribuiscono maggiormente al modello di previsione.

L'utilizzo di MaxEnt pone anche alcuni problemi. In particolare, MaxEnt utilizza un modello esponenziale per il calcolo delle probabilità e quindi non ha un limite superiore per questi valori; questo può determinare, nel caso si vadano ad “esportare” i risultati in altre aree, caratterizzate da condizioni ambientali che non ricadono nel *range* dell'area di studio, valori di probabilità molto alti, non riconducibili ad un corrispondente livello di idoneità ambientale (“*overfitting*”). Per questo motivo, qualora ci si trovi in queste condizioni, è importante limitare l'esportazione dei modelli ad aree con caratteristiche ambientali paragonabili, individuando “un'area di calibrazione” (Phillips *et al.*, 2006), anche se le versioni più recenti di MaxEnt hanno introdotto un formato di output logistico che risolve in parte questo problema (Phillips e Dudik, 2008). MaxEnt ha dimostrato di avere una buona capacità predittiva, confrontato con altri metodi alternativi utilizzati nei SDMs (Elith *et al.*, 2006; Guisan

*et al.*, 2007; Pearson *et al.*, 2007) e il suo ampio utilizzo nelle diverse discipline in parte lo conferma: dal 2006 ad oggi sono più di mille le pubblicazioni scientifiche che hanno utilizzato MaxEnt nei modelli di distribuzione di specie (Merow *et al.*, 2013).

Alla luce di quanto in precedenza esposto appare chiaro quanto questi modelli di distribuzione di specie, basati sulle variabili ambientali, ottenute anche dal *Remote Sensing*, e supportati da una piattaforma GIS, possano essere utili strumenti per comprendere meglio la geografia delle malattie trasmesse da vettori (Peterson *et al.*, 2002; Moffett *et al.*, 2007). Nello specifico, i SDM si sono dimostrati efficaci anche negli studi epidemiologici ed ecologici relativi ai flebotomi ed alla leishmaniosi. Uno studio effettuato da Peterson e Shaw (2003) in Brasile è stato tra i primi lavori pubblicati ad utilizzare un SDM per caratterizzare la distribuzione geografica e comprendere meglio l'ecologia di tre specie di vettori della leishmaniosi. Gli Autori hanno analizzato la distribuzione di tre specie di flebotomi del genere *Lutzomyia*, vettori di leishmaniosi cutanea, utilizzando come approccio per sviluppare il modello, il *Genetic Algorithm for Rule-set Prediction* (GARP); dopo aver identificato i fattori ecologici che determinavano la loro potenziale distribuzione (sono stati usati allo scopo dati storici di presenza e assenza dei vettori, analizzati rispetto ad un modello digitale del terreno, pendenza, esposizione, con l'aggiunta di dati meteorologici), hanno sviluppato diversi modelli in relazione a diversi scenari futuri relativi ai cambiamenti climatici (*Global Warming*) e i risultati hanno suggerito una preoccupante espansione dell'areale di distribuzione solo per *L. whitmani* in aree dove era ancora poco o non presente. Sempre Peterson e collaboratori (2004) hanno sviluppato un interessante studio utilizzando il medesimo approccio (GARP) per valutare la potenziale distribuzione di cinque specie di flebotomi del genere *Lutzomyia* presenti nello Stato di San Paolo, in Brasile e per identificare quanti record di presenza erano necessari per sviluppare un valido modello di distribuzione (costruendo differenti modelli utilizzando il 10%, 30%, 50%, 70% e il 90% dei record disponibili). Come variabili sono state inserite il modello digitale del terreno, alcune variabili climatiche e la mappa di copertura del suolo, provenienti dai RS. Lo studio ha dimostrato che una moderata densità di campionamento (40 record) è sufficiente a produrre mappe e modelli predittivi affidabili della distribuzione geografica di una specie. Colacicco-Mayhugh e collaboratori (2010) utilizzando MaxEnt hanno sviluppato modelli di distribuzione di *P. papatasi* e *P. alexandri*, in tutto il Medio

Oriente, partendo da record di presenza ottenuti da altri studi dal 1950 al 2007. Le variabili ambientali utilizzate includevano un modello digitale del terreno, una mappa di uso del suolo e diverse variabili bioclimatiche. Per entrambe le specie, la copertura del suolo è stato il fattore che più ha influenzato il modello. Alcuni degli studi sono orientati a comprendere l'effetto che i previsti cambiamenti climatici potranno avere sulla diffusione dei vettori e della leishmaniosi, utilizzando i modelli di distribuzione di specie e ottenendo anche risultati contrastanti (oltre a quello già citato di Peterson e Shaw, 2003; Gonzales *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2011a; Gonzales *et al.*, 2014). Fisher e collaboratori (2011b), ad esempio hanno utilizzato il metodo MaxEnt per predire la potenziale distribuzione di cinque specie di flebotomi (*P. ariasi*, *P. mascittii*, *P. perniciosus*, *P. neglectus* e *P. perfiliewi*) con competenza vettoriale provata o ipotizzata per *L. infantum* in Europa e trasferendola in due differenti scenari di cambiamento climatico, per valutare il rischio del loro insediamento in Europa centrale, identificando inoltre, per le differenti specie, il modo più probabile di dispersione naturale (“percorso a costo minimo”) e quindi valutando l'accessibilità dei futuri habitat potenzialmente adatti, in relazione anche alla loro capacità di dispersione (caratteristiche del paesaggio, cambiamenti climatici e velocità del vento). I risultati hanno indicato che il clima dell'Europa centrale sarà sempre più adatto a tutte le specie tranne *P. perfiliewi* nella seconda metà del 21° secolo. Tuttavia, lo studio dimostra che i flebotomi difficilmente saranno in grado di occupare del tutto i loro habitat idonei, a causa della loro bassa capacità di dispersione e per la presenza di barriere geografiche. Una prima mappa di rischio per la Lcan è stata prodotta per la Francia (Chamaille *et al.*, 2010) utilizzando dati retrospettivi relativi all'incidenza e prevalenza della malattia dal 1965 al 2007. I casi di Lcan sono stati mappati e sono state effettuate delle analisi spaziali, utilizzando diverse variabili climatiche e ambientali, l'altitudine e la densità della popolazione canina e umana. I risultati dell'analisi spaziale, hanno rivelato l'esistenza di due gruppi distinti di casi di Lcan, accomunati da differenti caratteristiche. Il primo gruppo si trovava nella Regione Cévennes, ad altitudini tra i 200-1000 m sul livello del mare, caratterizzata da temperature relativamente basse invernali, precipitazioni annuali mediamente intense e valori elevati di copertura forestale. Il secondo gruppo si trovava, invece, su una zona costiera, caratterizzata da temperature più elevate, precipitazioni più basse e inferiore copertura forestale. Gli Autori hanno valutato che questi due ambienti corrispondono agli habitat più idonei ai due vettori presenti in Francia, *P. ariasi* e *P.*

*perniciosus*, rispettivamente. In seguito è stata prodotta una mappa di rischio di Lcan in Francia, utilizzando le variabili selezionate dalle precedenti analisi e il software MaxEnt.

Tutti questi esempi confermano come l'utilizzo sinergico di queste nuove tecnologie e approcci statistici possa essere molto utile per approfondire le conoscenze ecologiche dei vettori di leishmaniosi, identificare i fattori di rischio, definire la loro distribuzione spaziale e quindi indirizzare gli interventi di sorveglianza.

## **PARTE SPERIMENTALE**

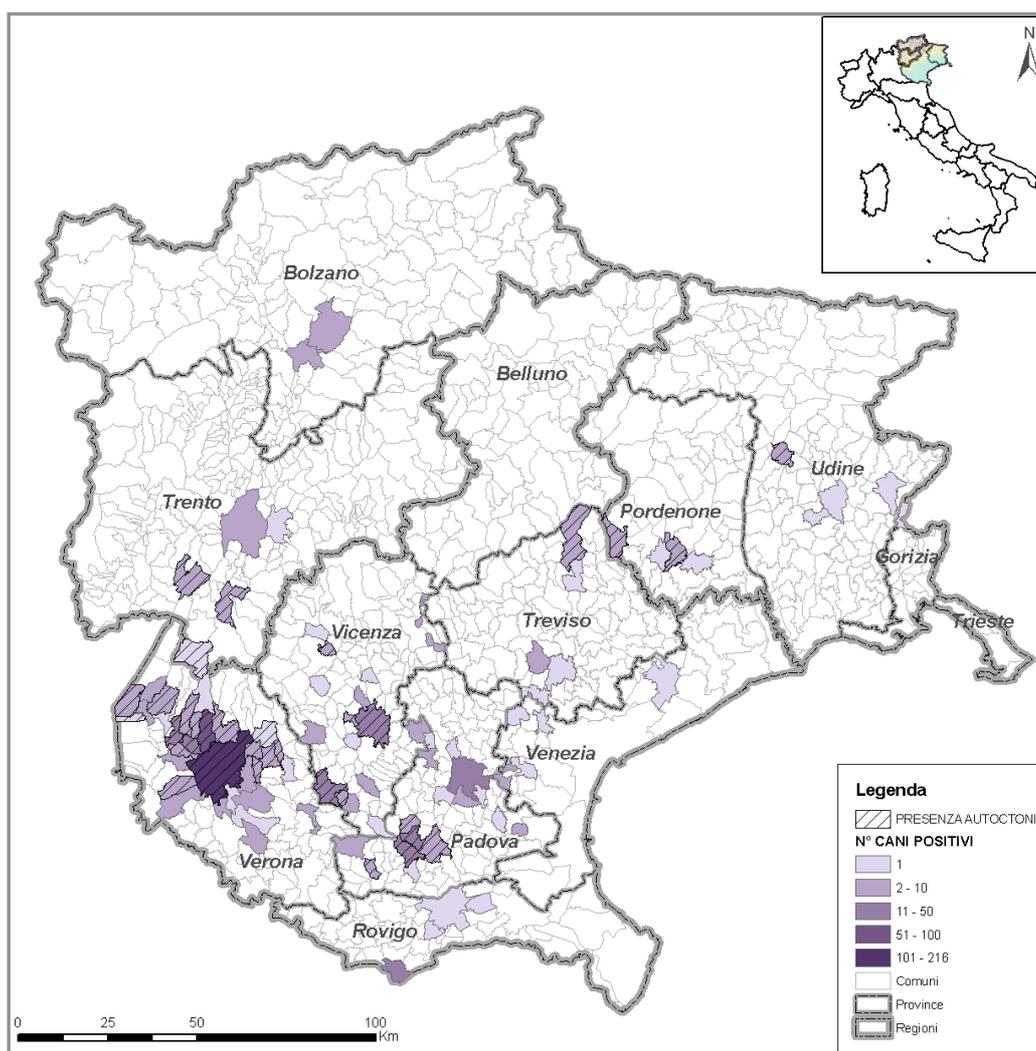
# 1 Scopo dello studio

A partire dagli anni '90 in Italia nord-orientale si sono iniziati a registrare i primi casi di leishmaniosi canina (Lcan) e mediante indagini sierologiche ed entomologiche appositamente svolte, è stato possibile stabilire che si trattava di focolai autoctoni della malattia. Il primo focolaio fu segnalato in Valpolicella a Verona nel 1994, con un trend di prevalenza in ascesa negli anni successivi presi in esame (Poglayen *et al.*, 1997) e venne registrata la presenza in densità sufficiente a mantenere l'infezione, del vettore riconosciuto, *P. perniciosus* e di *P. neglectus*, per la prima volta catturato in quest'area (Maroli *et al.*, 1995). Negli anni successivi si evidenziò che l'infezione si stava espandendo a nord-ovest verso il lago di Garda (Piccoli *et al.*, 1999) e vennero segnalati nuovi focolai autoctoni nell'area a nord-est di Verona, nella zona di Arco di Trento e Vittorio Veneto (Capelli *et al.*, 2004; Pietrobelli *et al.*, 2004; Vascellari *et al.*, 2005). Negli anni 2005-2007 le indagini effettuate sul territorio dimostrarono la presenza di focolai autoctoni di leishmaniosi e dei vettori anche in Friuli Venezia Giulia, a Majano (UD) e a Caneva (Pordenone) e in un'altra località, Calaone, situata sui Colli Euganei, in Provincia di Padova (Cassini *et al.*, 2007).

Più recentemente, sono stati rilevati casi autoctoni in Provincia di Vicenza, uno localizzato nelle zone collinari che circondano la città, uno nei Colli Berici occidentali ed uno nell'area pedemontana. È stato inoltre evidenziato un ampliamento dell'area già conosciuta come endemica in Provincia di Verona. Tale area, che era inizialmente localizzata nella zona collinare cittadina, si è estesa all'area prospiciente il lago di Garda e successivamente in direzione est verso la provincia di Vicenza (fig. 1). A partire quindi dal 2001, i ricercatori del laboratorio di Parassitologia e Malattie Parassitarie dell'Università degli Studi di Padova e del laboratorio di Parassitologia ed Ecopatologia dell'Istituto Zooprofilattico (IZS) delle Venezie, hanno compiuto numerose indagini entomologiche in diverse aree del Triveneto, basandosi sulla segnalazione di casi sospetti autoctoni di Lcan e sulle caratteristiche climatiche ed orografiche del territorio adatte alla presenza dei vettori, con lo scopo di individuare precocemente la loro presenza a densità tali da permettere l'instaurarsi di cicli endemici. Infatti, anche se la diffusione della Lcan in territori indenni è causata principalmente dallo spostamento di cani infetti da e verso aree endemiche, solo nelle

zone con condizioni favorevoli allo sviluppo e persistenza dei vettori si possono instaurare nuovi focolai.

La biologia del vettore e quindi lo studio delle condizioni climatiche ed ambientali che ne favoriscono la persistenza e la significativa abbondanza, sono fondamentali per comprendere l'epidemiologia della malattia, influenzando significativamente nella dinamica di trasmissione del patogeno. Diversi sono i modelli matematici proposti che condividono questa ipotesi (Macdonald, 1952; Hasibeder *et al.*, 1992; Dye, 1996; Rabinovich e Feliciangeli, 2004).



**Figura 1:** distribuzione per Comune dei campioni risultati positivi all'esame sierologico mediante IFI (titolo soglia 1:40) sul totale dei campioni raccolti nel periodo 2005-2010 ed evidenziazione dei casi autoctoni (tratto da Cassini *et al.*, 2010).

Considerando, inoltre, le difficoltà che si possono riscontrare nell'esecuzione di piani di sorveglianza entomologica in ampi territori (limitate risorse economiche e umane) e la scarsità di segnalazioni di nuovi casi di Lcan rispetto a quelli diagnosticati (dovuta prevalentemente allo scarso dialogo tra veterinari liberi professionisti e servizio pubblico), l'utilizzo di modelli statistici predittivi in grado di identificare aree a rischio d'introduzione, possono essere, quindi, validi strumenti da associare a quelli già esistenti, nei piani di sorveglianza per le malattie da vettori.

La presente Tesi ha lo scopo principale di individuare le caratteristiche ambientali più idonee alla presenza dei flebotomi vettori di Lcan ed elaborare un modello previsionale relativo alla loro potenziale distribuzione in Triveneto, basandosi su parametri climatici ed ambientali derivati anche dai Sistemi di Telerilevamento e supportati da una piattaforma GIS ed utilizzando dati relativi a campionamenti entomologici effettuati in questo territorio durante 12 anni (dal 2001 al 2012).

## 2 Materiali e metodi

### 2.1 Area di studio: il Triveneto, clima e orografia

Il Triveneto presenta caratteristiche orografiche e climatiche molto variegata, in quanto coesistono in questa area, territori molto differenti, rappresentati dalle catene montuose delle Alpi, dalle vaste aree pianeggianti della Pianura Padana, da un grande bacino lacustre (Lago di Garda) e dalle aree costiere del mar Adriatico: queste caratteristiche orografiche determinano la presenza di microclimi molto differenziati.

**Friuli Venezia Giulia.** La Regione Autonoma del Friuli Venezia Giulia è posta all'estremo nord-est del territorio italiano ed è limitata a nord dal confine di stato con l'Austria, a ovest dal confine regionale del Veneto, a est dal confine di stato della Slovenia, mentre a sud è bagnata dal Mare Adriatico. Il territorio che caratterizza questa Regione è molto articolato, infatti, la sua orografia può essere distinta in diversi settori che possono essere identificati da nord verso sud come settore montano, collinare, di pianura e costiero. Il territorio montuoso (altitudine superiore ai 600 m s.l.m.) rappresenta il 42,6% dell'intera superficie regionale (Alpi Carniche e Giulie), mentre il rimanente 19,3% e 38,1% sono rispettivamente collinare e pianeggiante. Il clima del Friuli-Venezia Giulia va dal clima sub mediterraneo delle zone costiere, a un clima temperato più umido delle pianure e zone collinari, fino al clima alpino. La temperatura annuale media di Trieste (dati 2000-2008) è di 15,7 °C, mentre quella della pianura va dai 13 ai 14,5 °C. La zona della Regione più mite è quella litoranea presso Trieste per l'influenza del mare più profondo ed il parziale riparo delle colline retrostanti. Questo tratto di costa ha un clima tra i più secchi d'Italia, contando in media solo nove minime sottozero all'anno (in genere di pochi decimi di grado) contro le 60 ed oltre (che possono arrivare fino ai -10 °C e oltre) di alcune zone della pianura friulana. Sulla costa i venti principali sono la caratteristica Bora e lo Scirocco, che si alternano nel corso dell'inverno, mentre il Maestrone e le brezze predominano in estate. La montagna friulana ha un clima più rigido e piovoso e i livelli altimetrici delle nevicate e della vegetazione sono più bassi che nel resto delle Alpi.

**Trentino Alto Adige.** Il Trentino-Alto Adige è la Regione italiana più a nord ed è pressoché completamente montuosa; confina a nord e a est con l'Austria, a ovest con la Svizzera, a sud e sud-est con il Veneto e sud e sud-ovest con la Lombardia. Le catene montuose s'innalzano fino a quote altimetriche di 2700-3900 m s.l.m.; a sud, la riva trentina del Lago di Garda registra un'altitudine di circa 70 m s.l.m.. Nel complesso le foreste ne ricoprono oltre il 70%. Il clima del Trentino-Alto Adige può essere definito di transizione tra il clima semicontinentale e quello alpino. Le temperature di gennaio sono comprese tra i -5°C e i -10°C ma possono raggiungere anche i -30°C nelle zone montuose dell'Alto Adige, mentre le estati sono generalmente calde (30°C - 35°C). Pur essendo gran parte territorio posto ad un'altitudine media piuttosto elevata (circa il 77% al di sopra dei 1000 m s.l.m., poco meno del 20% al di sopra dei 2000 m s.l.m.), esso non presenta quei caratteri di rigidità propri di altre aree alpine. Tuttavia a causa della complessa orografia, il clima del Trentino Alto Adige varia in modo sensibile in base all'esposizione rispetto ai venti predominanti, alla quota e alla presenza dei grandi Laghi Alpini, come quello di Garda, capaci di conferire alle aree limitrofe i caratteri tipici del clima Mediterraneo. Le piogge variano in base alla quota ed all'orientamento dei rilievi, ma non sono particolarmente abbondanti se commisurate alle altre Regioni facenti parte del settore Alpino. Procedendo verso nord e verso est le Alpi agiscono come una barriera e la piovosità annua decresce progressivamente. I venti che soffiano più frequentemente in Trentino Alto Adige sono di provenienza occidentale e meridionale specialmente durante le stagioni intermedie e nel periodo estivo; viceversa in inverno prevalgono le correnti da nord o da est che apportano un clima freddo e asciutto.

**Veneto.** La regione confina a est con il Friuli-Venezia Giulia e con il Mar Adriatico, a nord con l'Austria, a nord-ovest con il Trentino-Alto Adige, a ovest con la Lombardia e a sud con l'Emilia-Romagna.

Con una superficie di 18.390 km<sup>2</sup>, il Veneto costituisce l'ottava Regione italiana per superficie. Il suo territorio è morfologicamente molto vario, con una prevalenza di pianura (56,4%), ma anche estese zone montuose (29,1%) e, in minor misura, collinari (14,5%). Avvicinandosi al mare la pianura si confonde con alcune delle zone umide più estese d'Italia, in particolare il Delta del Po e la Laguna Veneta. Le colline venete appartengono principalmente alla fascia che si allunga ai piedi delle Prealpi. Gran parte dei rilievi sono di origine orogenetica e possono essere considerati

fenomeni periferici al sollevamento delle Alpi. Per fare alcuni esempi, si ricordano le colline che da Bassano del Grappa proseguono fino a Vittorio Veneto. Di diversa formazione sono, invece, le colline che si trovano allo sbocco delle valli dell'Adige e del Piave, formatesi da depositi accumulati da ghiacciai quaternari (si tratta dunque di rilievi morenici). Differente ancora è l'origine dei Colli Berici e dei Colli Euganei, gruppi isolati nel mezzo della pianura veneta di natura prevalentemente vulcanica. Le Prealpi venete sono caratterizzate dall'alternarsi di massicci e vasti altipiani. La catena fa da corona alla pianura e si estende dal lago di Garda sino al confine con il Friuli-Venezia Giulia, dove è continuata dalle Prealpi Carniche. Le cime superano di rado i 2.000 m. La montagna veneta è rappresentata per il 70% dalle Dolomiti della Provincia di Belluno. Nel territorio della Regione vi è una varietà di condizioni climatiche che vanno dai climi molto rigidi delle zone montane, dove le temperature in inverno scendono abbondantemente sotto lo zero (anche a  $-25^{\circ}\text{C}$ ), a quelli miti della fascia pedemontana, esposta a sud e protetta a nord dalla catena delle Prealpi. Il clima della pianura, risente marginalmente della mitigazione del mar Adriatico. In pianura le medie di Gennaio oscillano tra  $1^{\circ}\text{C}$  e  $3^{\circ}\text{C}$ , mentre a Luglio oscillano tra  $23^{\circ}\text{C}$  e  $25^{\circ}\text{C}$ . L'esposizione a est della Regione favorisce l'introduzione di venti (Bora e Scirocco), che provocano bruschi cambi di temperatura. Nella pianura a est e a sud la presenza di zone umide (fiumi, lagune, foci) favorisce la formazione di nebbie invernali e di foschie estive e l'umidità è spesso elevata. Per quanto riguarda le precipitazioni, i massimi di 1500 o 2000 mm annui si hanno nella fascia prealpina, che funge da condensatore dei vapori che si formano nella pianura. La piovosità decresce spostandosi a nord nelle zone montuose dolomitiche (meno di 1500 mm) e spostandosi a sud, nelle aree collinari e pianeggianti (tra 1000 e 1300 mm), toccando il valore minimo nella zona del delta (sotto i 600 mm annui).

Data la complessità di quest'area geografica, risulta chiaro come in questo territorio i flebotomi vettori non possano presentare una distribuzione omogenea in quanto, basandosi sulle conoscenze relative alla loro biologia, coesistono condizioni climatiche e orografiche non adatte alla loro sopravvivenza e *habitat* idonei alla loro persistenza. L'individuazione di zone potenzialmente adatte al loro insediamento presente e/o futuro potrebbe essere molto utile nella programmazione degli interventi di sorveglianza.

## 2.2 Monitoraggio entomologico

Il presente studio si basa su dati relativi a catture di flebotomi, effettuate in Triveneto dal 2001 al 2012, durante la stagione di attività degli stessi (generalmente dai primi di Giugno a fine Ottobre), dal personale del Laboratorio di Parassitologia e Malattie Parassitarie dell'Università di Padova, del laboratorio di Parassitologia ed Ecopatologia dell'IZS delle Venezie e da alcuni veterinari delle ASL presenti sul territorio. Durante i primi dieci anni (dal 2001 al 2010), la sorveglianza entomologica è stata effettuata prevalentemente in località dove c'erano state segnalazioni di casi di Lcan autoctoni. Lo scopo principale di questi monitoraggi era di valutare se sussisteva il rischio che si sviluppassero cicli endemici della malattia, identificando le aree dove fossero presenti i vettori a densità significative da un punto di vista epidemiologico. Nel corso degli anni, alcuni focolai, inoltre, sono stati selezionati (in particolare, il focolaio dei Colli Euganei, PD) per studiare l'andamento e le dinamiche temporali delle popolazioni dei flebotomi vettori presenti (Signorini *et al.*, 2010; Cassini *et al.*, 2013). Con questi obiettivi sono stati monitorati 120 siti localizzati prevalentemente in Veneto, ma anche in Provincia di Trento e Pordenone. Le catture sono state effettuate, nella grande maggioranza dei siti, più volte durante la stagione di attività dei vettori (in circa un centinaio di stazioni di cattura) ed utilizzando principalmente *sticky traps* (in 110 siti) e *CDC light traps* (in 53 siti); in 43 località sono state utilizzate entrambe le trappole in associazione e infine, in 8 siti sono stati effettuati campionamenti utilizzando anche *CO<sub>2</sub> traps* (fig. 2).



**Figura 2:** trappole utilizzate nel monitoraggio entomologico; da sx a dx: *sticky traps*, *CDC light trap* e *CO<sub>2</sub> trap*.

Nel 2011-2012, invece, il monitoraggio entomologico è stato realizzato con la finalità di sviluppare un modello predittivo della presenza dei vettori, quindi in maniera più standardizzata, per ottenere dati più uniformi e di conseguenza comparabili. In questo caso sono state indagate anche aree con caratteristiche ambientali e spaziali differenti dai caratteristici *habitat* preferiti dai flebotomi. In totale, i campionamenti sono stati effettuati in 69 siti: nella maggior parte dei casi (51 siti) sono state utilizzate solo le CO<sub>2</sub> traps, in 11 le sticky traps e in 7 siti di cattura entrambe, con cadenza quindicinale durante tutta la stagione di attività dei vettori; quasi tutti i siti monitorati utilizzando le CO<sub>2</sub> traps facevano parte del Piano di Monitoraggio regionale per la sorveglianza della West Nile ed erano, infatti, situati in aree prevalentemente pianeggianti, più idonee alla presenza delle zanzare che dei flebotomi. Le restanti località monitorate, invece, erano situate in aree collinari o montane.

Nel complesso, nei 12 anni di monitoraggio entomologico (dal 2001 al 2012), sono stati monitorati 175 siti e in ognuno sono stati registrati le coordinate utilizzando un GPS (Juno SB<sup>®</sup>, Trimble, USA), la Provincia, il Comune, la località, l'indirizzo ed a complemento, sono state raccolte informazioni riconducibili a possibili fattori di rischio:

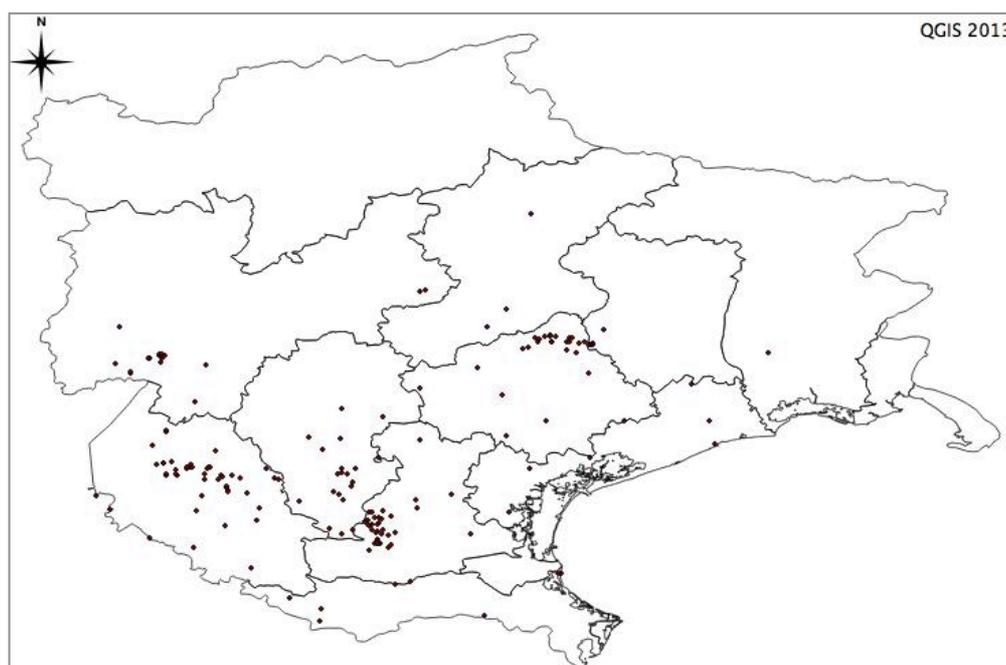
- specie di animali esca presenti (cani, bovini, ovini o caprini, cavalli, suini, conigli, volatili)
- numero di specie di animali presenti (0, 1, >1)
- livello di urbanizzazione (sito isolato o non isolato)
- tipologia di sito (canile, fattoria, giardino, ambiente selvatico)
- altitudine

Le sticky traps sono state lasciate *in situ* per due notti consecutive mentre le due trappole attrattive utilizzate (CDC light traps e CO<sub>2</sub> traps) per una sola notte. In totale, in 114 siti sono state utilizzate le sticky traps, in 53 le CDC light traps e in 66 le CO<sub>2</sub> traps (in molti casi più tipi di trappola sono stati usati nello stesso sito). La quasi totalità dei siti è stata monitorata più volte nel corso delle stagioni di attività dei vettori e 31 siti di cattura sono stati monitorati più volte nel corso dei 12 anni. La distribuzione geografica dei siti monitorati è variata nel corso degli anni ma complessivamente il monitoraggio ha interessato tutte le Province della Regione

Veneto, la Provincia di Trento e la Provincia di Udine e Pordenone. In tabella 1 sono riportati i siti monitorati suddivisi per tipo di trappola utilizzata e Provincia nei 12 anni, mentre nella figura 3 sono mappate le 175 stazioni di cattura.

anno	n. totale siti campionati per anno	n. siti monitorati per Regione e Provincia													
		n. siti monitorati per tipo di trappola			Veneto								Trentino A. G.	Friuli V. G.	
		sticky trap	CDC light trap	CO <sub>2</sub> trap	BL	PD	RO	TV	VE	VI	VR	TN	PN	UD	
2001	7	7								7					
2002	15	15			6					9					
2003	9	6	7		2		4				3				
2004	37	35	23				16			10	11				
2005	15	13	5		4					8		3			
2006	16	15	4		8							8			
2007	14	13	6		8				6						
2008	12	10	9		6				6						
2009	9	9	7		9										
2010	8	8		8											
2011	64	18		54	1	10	6	7	6	9	25				
2012	11			11	2	2		1		2	1	2	1		

**Tabella 1:** numero di siti monitorati, suddiviso per tipo di trappola utilizzata, Regione, Provincia e anno.



**Figura 3:** stazioni di cattura (n=175).

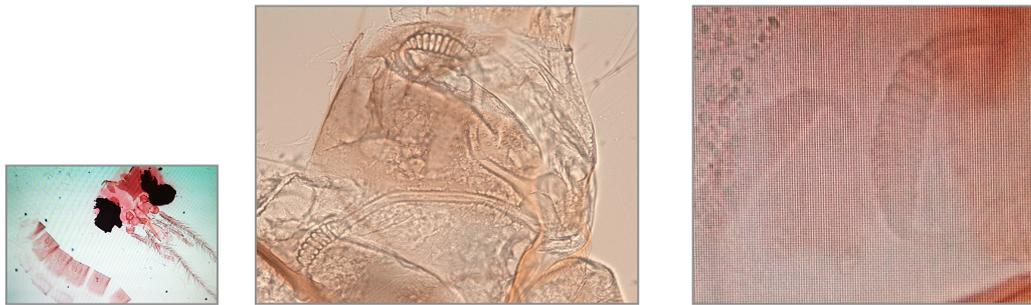
## 2.3 Analisi di laboratorio

Gli esemplari di flebotomi raccolti sono stati immediatamente differenziati dagli altri insetti presenti nelle trappole, in base alle caratteristiche morfologiche macroscopiche e conservati in alcool 70% all'interno di provette identificate tramite data, sito di cattura, numero di esemplari e trappola utilizzata. In un momento successivo si è proceduto all'identificazione: i flebotomi sono stati chiarificati sia in clorallattofenolo, per 72 ore a 40°C (Maroli e Bettini, 1977) sia utilizzando il balsamo di Hoyer (una miscela costituita da idrato di cloralio, glicerolo, gomma arabica e acqua distillata). I flebotomi sono stati poi montati su vetrino allestendo preparati permanenti a base di Fenolo Balsamo. L'allestimento dei vetrini varia a seconda del sesso, poiché l'identificazione tassonomica si basa sull'osservazione, al microscopio ottico, delle caratteristiche morfologiche dell'armatura genitale nei maschi e dell'armatura faringea e delle spermateche nelle femmine (Romi *et al.*, 1994). I maschi vengono montati integri su vetrino, in gruppi di circa 10 esemplari disposti su due file con le armature genitali rivolte gli uni verso gli altri, in modo da rendere più rapida l'identificazione; il corpo deve essere disteso, ali e zampe posizionate in modo da rendere ben visibile l'armatura genitale esterna (ipopigio) ed in particolare le valve copulatrici, fondamentali per l'identificazione tassonomica (fig. 4).



**Figura 4:** a sx esemplare maschio di flebotomo montato su vetrino; al centro ipopigio di *P. mascittii*: le valve copulatrici sono lunghe e parallele con un accenno di strozzatura subito sotto la punta arrotondata; a dx ipopigio di *S. minuta*: le valve copulatrici sono corte e leggermente incurvate e affusolate all'estremità.

Le femmine vengono sezionate e la testa e l'addome vengono montati singolarmente su vetrino, così da visualizzare al meglio le differenze morfologiche relative alle spermateche e all'armatura faringea (fig. 5).



**Figura 5:** a sx esemplare femmina di flebotomo montato su vetrino; al centro particolare delle spermateche di *P. perniciosus*: notare il numero di anelli del corpo inferiori a 12 e i dotti che alla base terminano nell'atrio genitale, ciascuno con due dilatazioni lobiformi; a dx particolare del corpo delle spermateche di *P. neglectus*: notare il numero di anelli del corpo superiore a 12.

## 2.4 Analisi dei dati di campo

### 2.4.1 Analisi preliminari

Le caratteristiche di presenza, distribuzione e densità delle diverse specie di flebotomi riscontrati nell'area di studio sono state inizialmente analizzate attraverso una semplice statistica descrittiva, riportando la numerosità e la densità dei flebotomi e quella delle due specie di flebotomi vettori catturati nell'area di studio (*P. perniciosus* e *P. neglectus*), in relazione alla loro distribuzione per tipo di trappola e per Provincia. La densità è stata calcolata solo per le catture effettuate mediante *sticky traps*.

In seguito si è proceduto ad una prima analisi statistica sull'insieme di tutti i 175 siti monitorati, volta a valutare la possibile influenza di alcuni fattori di rischio raccolti sul campo rispetto alla presenza/assenza di flebotomi, utilizzando inizialmente un approccio univariato, mediante il test chi-quadrato di Pearson o il test esatto di Fisher, quando maggiormente appropriato. I fattori di rischio considerati sono stati i seguenti:

- numero e tipo di specie di animali esca
- livello di urbanizzazione
- tipologia di sito
- altitudine

L'analisi dei fattori di rischio è stata completata attraverso un modello di regressione logistica che includesse i fattori risultati significativi o vicini alla significatività all'analisi univariata. Per i siti per i quali erano state eseguite catture mediante *sticky traps* (n=114) ed era pertanto presente un valore di densità, si è proceduto con un'analisi di come questa potesse essere influenzata dai fattori precedentemente

elencati, mediante statistiche non parametriche. In particolare è stata eseguita una comparazione delle densità generali per tutti i fattori di rischio, già considerati nella precedente analisi, mediante il test K di Kruskal-Wallis (quando presenti più di due variabili), seguito poi dal test U di Mann-Whitney per il confronto a coppie. Per l'analisi è stato utilizzato il software IBM SPSS Statistics 20.

## **2.5 Analisi dei dati ambientali e modelli predittivi**

### **2.5.1 Dati geografici e telerilevati utilizzati**

Per la creazione del geo-database e del modello predittivo sono state scelte alcune variabili ambientali e climatiche tra quelle segnalate in letteratura come rilevanti per l'ecologia degli insetti vettori. Le variabili selezionate per essere inserite nel geo-database e le modalità di acquisizione, sono di seguito elencate.

#### **Modello Digitale del Terreno (DEM) GTOPO30.**

Completato nel 1997, il modello digitale del terreno GTOPO30 ([http://gcmd.nasa.gov/records/GCMD\\_NCARG758.0.html](http://gcmd.nasa.gov/records/GCMD_NCARG758.0.html)) è stato sviluppato dal *Geological Survey's EROS Data Center* degli Stati Uniti; sono state utilizzate diverse fonti di dati per la sua costruzione ed il prodotto finale è un modello digitale del terreno in formato *raster* disponibile per l'intero globo, che fornisce i valori di elevazione corrispondenti ad una griglia regolare di punti sulla superficie terrestre; è così chiamato perché la distanza tra i punti di quota adiacenti è di 30-arc-secondi (circa 1 Km) di latitudine e longitudine. E' disponibile liberamente al sito <http://earthexplorer.usgs.gov/>, al quale è sufficiente registrarsi; per facilitarne la distribuzione, il prodotto è stato suddiviso in 33 *tiles* che delimitano le diverse regioni del globo.

#### **Uso del suolo - Corine Land Cover 2006 (CLC).**

Come già spiegato nella parte generale della presente Tesi, la cartografia della copertura del suolo è stata realizzata dal Progetto Europeo CORINE Land Cover. Le fonti d'informazione utilizzate per la sua realizzazione sono basate su immagini satellitari prodotte da diversi satelliti, abbinata a ortofoto digitalizzate e ad un Modello Digitale del Terreno. Il risultato è una cartografia (in formato sia *raster* sia

vettoriale) della copertura del suolo con una risoluzione spaziale di 100 m, i cui dati di copertura/uso del suolo sono organizzati su tre livelli gerarchici e suddivisi in 44 classi, che è disponibile liberamente a questo sito: (<http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/corine-land-cover-2006-clc2006-100-m-version-12-2009#tab-gis-data>). Nel presente studio si è scelto di utilizzare la classificazione del livello gerarchico superiore, suddiviso originariamente in 5 classi, riclassificandolo in 6 classi:

- 1<sup>a</sup>: territori modellati artificialmente
- 2<sup>a</sup>: terreni arabili
- 3<sup>a</sup>: colture permanenti e prati
- 4<sup>a</sup>: terreni agricoli eterogenei
- 5<sup>a</sup>: territori boscati ed aree seminaturali
- 6<sup>a</sup>: ambienti umidi e corpi idrici

La scelta è stata effettuata in quanto i terreni agricoli (2<sup>a</sup> classe del primo livello gerarchico) erano molto rappresentati nell'area di studio e di conseguenza sarebbe stato difficile trovare delle differenze nella distribuzione dei siti di cattura; questa classe è stata quindi suddivisa in 3 classi (2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>) presenti nel secondo livello gerarchico, mentre sono state accorpate le classi originarie 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> nella classe 6<sup>a</sup>.

#### **Dati telerilevati dal sensore MODIS (LST e NDVI).**

Sono stati scaricati e processati alcuni dati provenienti dal sensore MODIS (*MODerate resolution Imaging Spectroradiometer*), relativi all'indice di copertura vegetazionale (NDVI: *Normalized Difference Vegetation Index*) e alla temperatura del suolo (LST: *Land Surface Temperature*), le cui caratteristiche sono già state illustrate nella parte generale della Tesi. I prodotti sono distribuiti da *Land Processes Distributed Active Archive Center* della NASA (<https://lpdaac.usgs.gov/>) ed il formato utilizzato per la loro distribuzione è l'hdf. Per scaricare i prodotti, ri-proiettarli con datum WGS84, ritagliarli per le aree d'interesse, e convertirli nel formato geo-tiff, utilizzabile dai comuni software GIS, è stato impiegato il software *open-source* R 3.0.1 (*MODIS Package*) (<http://www.R-project.org/>) attraverso l'utilizzo del software *Modis Reprojection Tool* distribuito sempre dalla LP DAAC ([https://lpdaac.usgs.gov/tools/modis\\_reprojection\\_tool](https://lpdaac.usgs.gov/tools/modis_reprojection_tool)). Sono stati ottenuti in questo

modo i *files* geo-tiff relativi alla LST diurna e notturna (immagine composta di 8 gg) e all'NDVI (immagine composta di 16 gg) dall'inizio del 2001 alla fine del 2012.

Gli script utilizzati in R per eseguire queste operazioni sono stati i seguenti:

```
# Script basato sul Package MODIS per eseguire il download dei files hdf attraverso  
MRT (Modis reprojection tool)
```

```
#Installare separatamente MRT ed in R i seguenti packages: mapdata, maps,  
mapproj, foreign, grid, lattice, Rcurl, bitops, XML, rgeos, rgdal:
```

```
install.packages("MODIS", repos="http://R-Forge.R-project.org")  
install.packages("SSOAP", repos="http://www.omegahat.org/R",  
dependencies=TRUE, type="source")  
library(MODIS)
```

```
#Mostrare il percorso del file MRT.exe:
```

```
MRT <- 'C:\\Users\\SPECSTUD\\Desktop\\MRT\\Modis\\bin\\'
```

```
#Utilizzare la funzione runMrt e selezionare i prodotti d'interesse (ad esempio:  
MOD11A2 o LST), la regione e il periodo di tempo d'interesse; poiché i files hdf  
hanno multipli Science data layer (per una descrizione dettagliata vedere:  
https://lpdaac.usgs.gov/products/modis\_products\_table) è necessario indicare anche i  
layers d'interesse (SDSstring="").
```

```
# LST (MOD11A2):
```

```
runMrt(product="MOD11A2", extent="Italy",  
begin="2001001", end="2012361", SDSstring="110011",  
outProj="GEOGRAPHIC", job="MODISLST_2001_2012")
```

```
# NDVI (MOD13Q1):
```

```
runMrt(product="MOD13Q1", extent="Italy",  
begin="2001001", end="2012353",  
SDSstring="100000000011", outProj="GEOGRAPHIC",  
job="MODISNDVI_2001_2012")
```

**#Convertire i files scaricati a geo-tiff, (package raster):**

```
library(raster)
```

**# indicare la directory dove salvare i files processati:**

```
setwd("C:/Users/SPECSTUD/Desktop/MODISLST/MODISLST_night")
```

**# MODIS LST:**

```
fileDisp (list.files(path=("C:/Users/SPECSTUD/Desktop/MODISLST
/MODISLST_night_out") , full.names=TRUE)) for (f in
1:length(fileDisp)) { r <- raster(fileDisp[f])
r[r==0]<-NA
outf <- paste0(extension(fileDisp[f], ""), "_out.tif")
x <- calc(r, function(x){x*0.02}, filename=outf)}
```

**#Verificare che i files siano stati processati in maniera corretta visualizzandoli:**

```
fileDisp2 list.files(path=("C:/Users/SPECSTUD/Desktop/MODISLST
/MODISLST_night_out") , full.names=TRUE)
r <- raster(fileDisp2[2])
plot(r)
```

**#NDVI:**

```
setwd("/Users/SPECSTUD/Desktop/NDVI")
```

```
fileDisp (list.files(path=("/Users/SPECSTUD/Desktop/NDVI"),
full.names=TRUE))
for (f in 1:length(fileDisp)) {
r <- raster(fileDisp[f])
r[r<=-2000 ]<-NA
r[r>10000]<-NA
outf <- paste0(extension(fileDisp[f], ""), "_out.tif")
x <- calc(r, function(x){x*0.0001}, filename=outf) }
```

Si è poi deciso di calcolare per ogni anno le medie mensili, stagionali e annuali della LST diurna, notturna e dell'NDVI, anche per limitare lo spazio su disco (i files scaricati sono stati oltre un migliaio). Nell'elaborazione del modello predittivo, infine,

sono state utilizzate solo le medie stagionali e le medie annuali relative alla totalità dei 12 anni di campionamento (interannuali).

Per effettuare questi calcoli sono stati utilizzati i seguenti script:

#Esempio per calcolare la media mensile dell'NDVI di gennaio 2001; assegnare la *directory*:

```
library(raster)
```

```
setwd("/Users/manuelasignorini/Desktop/MODISNDVI_monthly/NDVI_2001_monthly")
```

#Indicare la *directory* nella quale i *files* (suddivisi per anno) sono stati salvati:

```
TIF_files<-
```

```
list.files(path="/Users/manuelasignorini/Desktop/MODISNDVI_ou  
t/NDVI_2001") , full.names=TRUE)
```

#Gennaio 2001 media mensile (i *files* 1 e 2 rappresentano il mese di gennaio):

```
Jan <- stack(TIF_files[1:2])
```

```
Jan.mean <- calc(Jan, mean, filename="NDVI_2001_1jan.tif",  
na.rm=TRUE)
```

```
plot(Jan.mean)
```

# Medie stagionali (ad esempio: inverno 2001); i *files* 1-3 corrispondono ai mesi invernali:

```
setwd("/Users/manuelasignorini/Desktop/MODISNDVI_monthly/NDVI_  
mean_season")
```

```
TIF_files<-
```

```
list.files(path="/Users/manuelasignorini/Desktop/MODISNDVI_mo  
nthly/NDVI_2001_monthly") , full.names=TRUE)
```

```
Wint <- stack(TIF_files[1:3])
```

```
Wint.mean <- calc(Wint, mean, filename="NDVI_2001_winter.tif",  
na.rm=TRUE)
```

```
plot(Wint.mean)
```

**# Medie annuali; i files 1-12 corrispondono all'anno 2001:**

```
setwd("/Users/manuelasignorini/Desktop/MODISNDVI_annual_mean")
TIF_files<-
list.files(path=("/Users/manuelasignorini/Desktop/MODISNDVI_mo
nthly/NDVI_2001_monthly") , full.names=TRUE)
Year <- stack(TIF_files[1:12])

Year.mean <- calc(Year, mean,
filename="NDVI_2001_annual_mean.tif", na.rm=TRUE)
plot(Year.mean)
```

**#Medie interannuali; i files 1-12 corrispondono alle medie annuali degli anni dal 2001 al 2012:**

```
setwd("/Users/manuelasignorini/Desktop/MODISNDVI_20012012_mean
")
TIF_files<-
list.files(path=("/Users/manuelasignorini/Desktop/MODISNDVI_me
an") , full.names=TRUE)
Years0112 <- stack(TIF_files[1:12])
Years0112.mean <- calc(Years0112, mean,
filename="NDVI_20012012_mean.tif", na.rm=TRUE)
plot(Years0112.mean)
```

**#Medie stagionali interannuali; i files 1-12 corrispondono alla stagione invernale dal 2001 al 2012:**

```
setwd("/Users/manuelasignorini/Desktop/NDVI_inter_annual_seaso
nal_mean")
TIF_files<-
list.files(path=("/Users/manuelasignorini/Desktop/NDVI_inter_a
nnual_seasonal_mean") , full.names=TRUE)
Wint <- stack(TIF_files[1:12])

Wint.mean <- calc(Wint, mean,
filename="NDVI_20012012_winter.tif", na.rm=TRUE)
plot(Wint.mean)
```

### **Variabili climatiche relative alle precipitazioni, dal data set globale WordClim.**

Il data set Wordclim (Hijmans *et al*, 2005) liberamente disponibile a questo indirizzo <http://www.worldclim.org>, è costituito da un insieme di variabili climatiche globali, con una risoluzione spaziale di circa 1 Km<sup>2</sup>, distribuite in diversi formati e risoluzioni e generate attraverso l'interpolazione delle medie mensili di dati climatici provenienti da stazioni meteorologiche, dal 1950 al 2000; le variabili ottenute sono la precipitazione totale e media mensile, la temperatura minima e massima e altre 19 variabili bioclimatiche derivate dai dati mensili.

Nel presente lavoro sono state scaricate ed inserite nel geo-database le seguenti variabili :

- BIO12 = precipitazioni annuali
- BIO13 = precipitazioni nel mese più piovoso
- BIO14 = precipitazioni nel mese più secco
- BIO16 = precipitazioni nel trimestre più piovoso
- BIO17 = precipitazioni nel trimestre più secco
- BIO18 = precipitazioni nel trimestre più caldo
- BIO19 = precipitazioni nel trimestre più freddo

### **2.5.2 Creazione del geo-database**

E' stato costruito un geo-database, utilizzando ArcGIS® 10.1 (Esri) in associazione con *Geospatial Modelling Environment* (G.M.E.), un software libero (Copyright (c) 2009-2012 Spatial Ecology LLC; <http://www.spatial ecology.com/>) che offre la possibilità di svolgere alcune analisi spaziali e modellazioni, interfacciandosi anche con ArcGIS® ed R. Il geo-database è stato creato integrando il database relativo ai dati di campo (contenente i siti georeferenziati e i dati di presenza/assenza/numerosità dei flebotomi), con le diverse variabili ambientali e geografiche (in formato *raster*) ottenute con le modalità precedentemente descritte (par. 2.5.1). Come sistema di riferimento è stato utilizzato WGS84. Per i diversi tematismi ambientali disponibili, sono stati estrapolati i valori medi relativi a ogni variabile all'interno di *buffer*, aventi il diametro di 1 Km e costruiti attorno ad ogni sito di cattura; tale valore è stato scelto poiché appariva biologicamente significativo in relazione alla capacità di dispersione dei flebotomi, che si aggira intorno a tale ordine di grandezza. La creazione delle *buffer zones* e conseguentemente la costruzione del geo-database in ArcGIS® è stata effettuata utilizzando i seguenti script nella piattaforma di G.M.E. (fig. 6):

**\*\*Creazione delle *buffer zones*:**

```
buffer(in="C:\Users\SPECSTUD\Desktop\Shp_database_fleb\XY'2001_2012$.shp",out="C:\Users\SPECSTUD\Desktop\Shp_database_fleb\Buff_XY20012012.shp",distance=0.012,copyfields=TRUE);
```

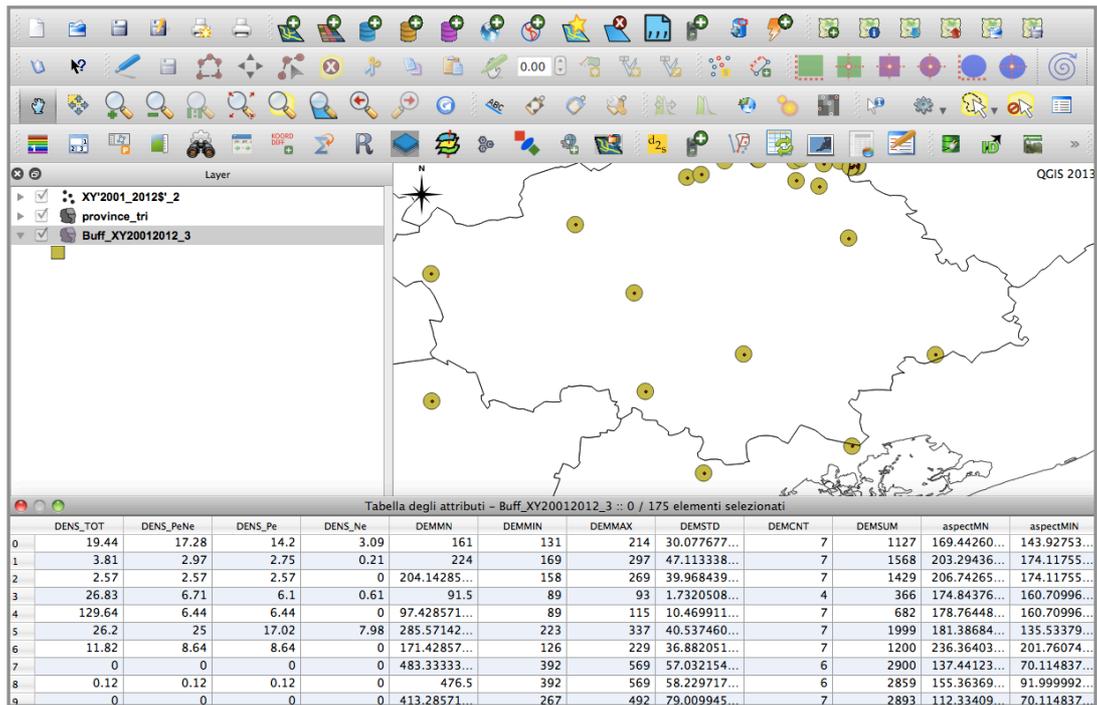
**\*\*Estrazione dei valori medi all'interno delle *buffer zones*, per tutti i *layers* d'interesse (nell'esempio, il Modello Digitale del Terreno e le relative variabili derivate):**

```
isectpolyrst(in="C:\Users\SPECSTUD\Desktop\Shp_database_fleb\Buff_XY20012012.shp",raster="C:\Users\SPECSTUD\Desktop\cartografia_veneto\GTOP_030_Italy", prefix="DEM");
```

```
isectpolyrst(in="C:\Users\SPECSTUD\Desktop\Shp_database_fleb\Buff_XY20012012.shp",raster="C:\Users\SPECSTUD\Desktop\cartografia_veneto\aspect_gtop", prefix="aspect");
```

```
isectpolyrst(in="C:\Users\SPECSTUD\Desktop\Shp_database_fleb\Buff_XY20012012.shp",raster="C:\Users\SPECSTUD\Desktop\cartografia_veneto\slope_gtop", prefix="slope");
```

```
isectpolyrst(in="C:\Users\SPECSTUD\Desktop\Shp_database_fleb\Buff_XY20012012.shp",raster="C:\Users\SPECSTUD\Desktop\cartografia_veneto\solar_rad", prefix="solara");
```



**Figura 6:** particolare di alcuni *buffer* intorno ai siti di cattura e di una porzione del geodatabase associato, mediante l'interfaccia di Quantum GIS.

### 2.5.3. Analisi esplorativa delle variabili ambientali

Sono state create in seguito, delle mappe descrittive, utilizzando Quantum GIS ([www.qgis.org](http://www.qgis.org)), per rappresentare la distribuzione dei flebotomi in Triveneto in relazione ai diversi tematismi ambientali ed è stato importato il geo-database nel software IBM SPSS Statistics 20, per eseguire delle analisi esplorative e descrittive che permettessero di studiare la relazione tra le variabili utilizzate e la presenza/assenza dei flebotomi. Come spiegato in precedenza i valori delle variabili riferiti ad ogni sito consistevano in realtà nei valori medi delle stesse all'interno delle *buffer zones* costruite attorno alle coordinate geografiche del sito stesso. La distribuzione dei siti positivi e di quelli negativi è stata indagata tramite grafici (*boxplot*) e tabelle di contingenza per le seguenti variabili:

- altitudine basata sul DEM (GTOPO30)
- Corine Land Cover
- BIO 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19
- media interannuale delle LST diurne e notturne autunnali, estive, primaverili, invernali e annuali
- media interannuale dell'NDVI autunnale, estivo, primaverile, invernale e annuale;

Inoltre, è stato determinato il grado di correlazione tra le diverse variabili, calcolandone il coefficiente di correlazione di Pearson e visualizzato tramite *scatterplot*, con la finalità di escludere dal modello quelle risultate tra loro molto correlate.

#### **2.5.4 Modelli predittivi di distribuzione di specie**

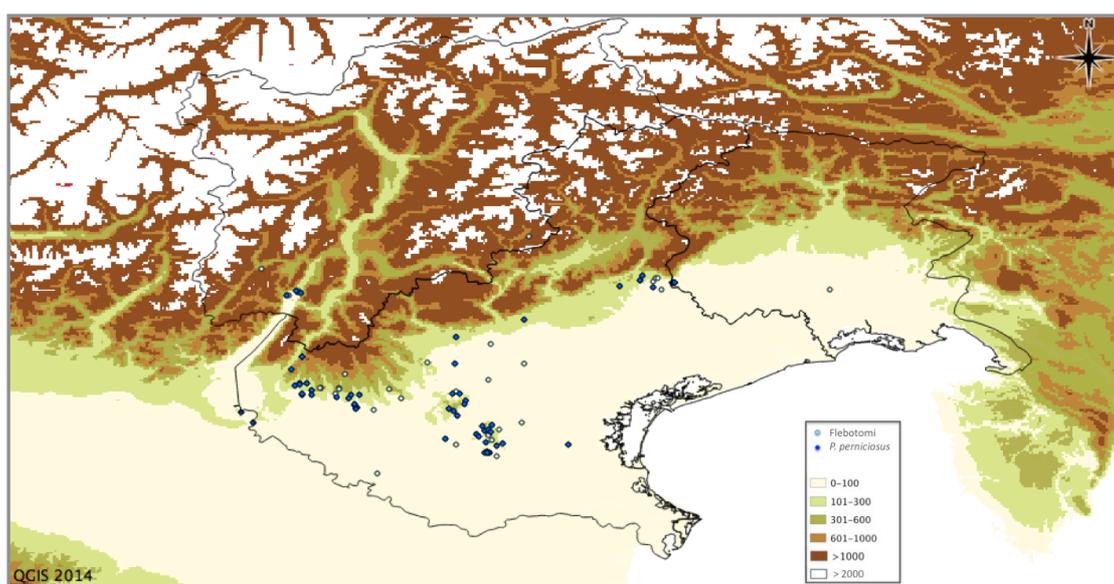
Per lo sviluppo dei modelli di distribuzione è stato utilizzato il software MaxEnt 3.3.3k (Maximum Entropy Modeling; <http://www.cs.princeton.edu/schapire/maxent/>). MaxEnt genera una stima della probabilità di presenza di una specie, o meglio d'idoneità ambientale per una data specie, che varia in maniera continua tra 0 e 1 (utilizzando l'output logistico) dove 0 rappresenta i pixel con la minima probabilità di presenza (territorio non idoneo) e 1 i pixel con la massima probabilità (territorio idoneo). Nel presente studio, si è deciso di utilizzare questo approccio per sviluppare i modelli di distribuzione di specie, anche in considerazione delle caratteristiche dei dati relativi ai monitoraggi entomologici. Infatti, come descritto in precedenza, i campionamenti non sono stati effettuati in maniera standardizzata e uniforme (differenti trappole, differenti anni di campionamento, differenti intensità di cattura per sito e anno, siti distribuiti sul territorio in maniera non uniforme) e il dato complessivo di siti monitorati è comunque caratterizzato da una media numerosità campionaria. MaxEnt risulta più efficace rispetto ad altri algoritmi di modellazione su campioni di piccole e medie dimensioni e su dati raccolti in maniera non standardizzata (Pearson *et al.* 2007; Loiseau *et al.*, 2008), oltre ad essere indicato in letteratura come uno tra i migliori approcci tra quelli utilizzati nei modelli di distribuzione di specie (Elith *et al.*, 2006; Hernandez *et al.*, 2006; Ortega-Huerta e Peterson, 2008). MaxEnt richiede che tutte le variabili indipendenti inserite siano in formato *raster* e abbiano la stessa estensione (uguali confini geografici ed uguale grandezza della cella e proiezione). E' stato quindi necessario modificare i *layers* ambientali e geografici, da inserire nel modello, in *raster* aventi la stessa dimensione della cella ed estensione e successivamente trasformarli in *files ASCII raster grid* che è l'unico formato utilizzabile in MaxEnt. Per eseguire questa operazione sono stati utilizzati alcuni strumenti presenti in ArcMap (ArcGis®) (Yang *et al.*, 2001).

Si è deciso di sviluppare due possibili modelli predittivi della presenza di flebotomi in Triveneto, uno relativo alla distribuzione della sola specie *P. perniciosus* (la più diffusa ed abbondante tra le specie trovate e una delle due specie vettori di Lcan) ed

uno relativo a tutti i flebotomi. Nel primo caso, sono stati utilizzati, come record di presenza, 60 siti dei 94 risultati positivi per la presenza dei flebotomi nei 12 anni di campionamento entomologico. Sono stati esclusi 34 siti caratterizzati dalla sola presenza di flebotomi non vettori di Lcan (*P. mascittii*, *S. minuta* o *P. papatasi*) oppure caratterizzati dalla presenza di un numero di esemplari di *P. perniciosus* inferiore a 3. Questa scelta è stata fatta per rafforzare la capacità predittiva del modello, inserendo solo i record di presenza più realistici, considerando che la presenza di uno o due esemplari poteva anche derivare da errori nella fase di campionamento. Per il modello relativo ai flebotomi sono stati considerati tutti i 94 siti positivi (fig. 7).

MaxEnt, come già illustrato, genera una serie di punti di *background*, ovvero dati ambientali “di sfondo”, per l’intera area di studio e li relaziona con i dati ambientali che caratterizzano i punti di presenza; i punti di presenza sono inclusi, nell’elaborazione, nel *background*; per i due modelli sviluppati nel presente lavoro è stata utilizzata l’opzione di default che utilizza 10.000 punti di *background*.

Essendo i diversi *raster* relativi a tutto il territorio italiano, è stata creata una maschera (un *file asc*) del Triveneto ed inserita come predittore nei modelli, per indicare al software quale porzione di area includere nel *background* e quale escludere, evitando in questo modo anche problemi di *overfitting*.



**Figura 7:** siti positivi ai flebotomi (n=94) ed a *P. perniciosus* ( $\geq 3$  esemplari; n=60), utilizzati nei modelli, rappresentati in relazione a classi di altitudine.

I record di presenza (o dati di *training*) sono stati suddivisi in due parti, utilizzandone il 25%, scelto dal software in maniera *random*, come dati di *test*. Questa operazione consente al programma di effettuare delle analisi statistiche, utili, per la sua validazione, (come l'area sottesa dalla curva ROC [AUC]) e la sua interpretazione. Il software, infatti, offre la possibilità di effettuare differenti test durante l'elaborazione del modello, volti a valutare il contributo delle variabili ambientali, nella generazione dello stesso (ovvero indicando come varia la capacità predittiva del modello al variare di ogni variabile). Ad esempio, produce diverse curve di risposta relative ad ogni singola variabile inserita, sia mantenendo le altre al loro valore medio sia utilizzando una singola variabile alla volta ed escludendo le altre dal modello. Un altro test interessante (*jackknife test*) stima l'effetto di ogni variabile e lo confronta con il potere predittivo del modello (valutato in base al *gain* ottenuto sia utilizzando i dati di *training*, sia i dati di *test*, sia in base al valore assunto dall'AUC) elaborato utilizzando tutte le variabili. Per effettuare questo test, MaxEnt genera differenti modelli escludendo prima una variabile per volta, poi utilizzando ogni variabile singolarmente e infine utilizzando tutte le variabili.

A questo punto, si è proceduto ad un ulteriore passo per selezionare quali variabili inserire nel modello finale. Sono stati a questo scopo implementati diversi modelli utilizzando un singolo *raster* alla volta e valutato il potere predittivo di ogni variabile tramite il confronto del valore assunto dall'area sottesa dalla curva ROC (AUC) per i dati di *test*, valore che rappresenta l'effettivo potere predittivo del modello. I *raster* utilizzati per questo scopo, sono stati i seguenti:

- altitudine (DEM)
- esposizione (DEM)
- pendenza (DEM)
- irradiazione solare (DEM)
- Corine Land Cover
- BIO 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19
- media interannuale delle LST diurne e notturne autunnali, estive, primaverili, invernali e annuali
- media interannuale dell'NDVI autunnale, estivo, primaverile, invernale e annuale

In seguito, nei modelli finali sono state inserite alcune di queste variabili, scegliendole in base sia ai risultati dei test di correlazione (ovvero escludendo le variabili altamente correlate tra loro), sia al valore assunto dall'AUC, sia in relazione al loro significato biologico ed ecologico.

Infine, utilizzando le impostazioni per il software descritte in precedenza (e mantenendo le altre impostazioni di default), le medesime variabili ambientali ed i rispettivi set di record di presenza (94 e 60 siti), sono stati prodotti i due modelli di distribuzione dei flebotomi e di *P. perniciosus*.

Inoltre, per il modello relativo a *P. perniciosus*, utilizzando i medesimi dati di input, sono state effettuate attraverso una procedura iterativa, più repliche (n=50), operazione che permette di misurare il grado di variabilità del modello e che consente di testare le prestazioni del modello utilizzando tutti i dati disponibili senza avere un dataset indipendente; il *training set* (set di record di presenza) utilizzato per ciascuno dei 50 modelli calcolati, è stato selezionato attraverso un campionamento *random* di una porzione (25%) dei dati (*sub samples*) utilizzati come dati di *test* per ogni replica.

### **2.5.5 Validazione del modello predittivo**

Per la validazione del modello sono stati utilizzati gli approcci tradizionali che consistono nell'utilizzo delle curve ROC (che il software calcola autonomamente avendo disponibili i dati di *test*) e della *Confusion Matrix* (utilizzata per validare solo il modello relativo a *P. perniciosus*), già descritti nella parte generale della tesi. Le curve ROC sono rappresentazioni grafiche che valutano la performance predittiva del modello sulla base di una variabile risposta, in questo caso la presenza/assenza dei flebotomi e di *P. perniciosus*. Il valore dell'area al di sotto della curva ROC (AUC) indica l'accuratezza del modello. Per predizioni completamente casuali, il valore di AUC è 0,5, mentre è 1 per il modello che prevede esattamente la presenza della specie. Il vantaggio maggiore dell'analisi delle curve ROC è che il valore AUC rende disponibile una misura singola di accuratezza del modello, indipendentemente dai possibili valori soglia (*threshold*) utilizzati e può essere impiegato per confrontare più modelli indipendentemente dalla numerosità campionaria e dalle variabili inserite. Per la validazione effettuata, invece, utilizzando la *confusion matrix*, che confronta i dati discreti osservati con i dati discreti previsti, è stato necessario fissare una soglia per discriminare quali record convertire in presenza e quali in assenza. Il programma fornisce diverse soglie per generare previsioni discrete (0-1 o habitat idoneo/non

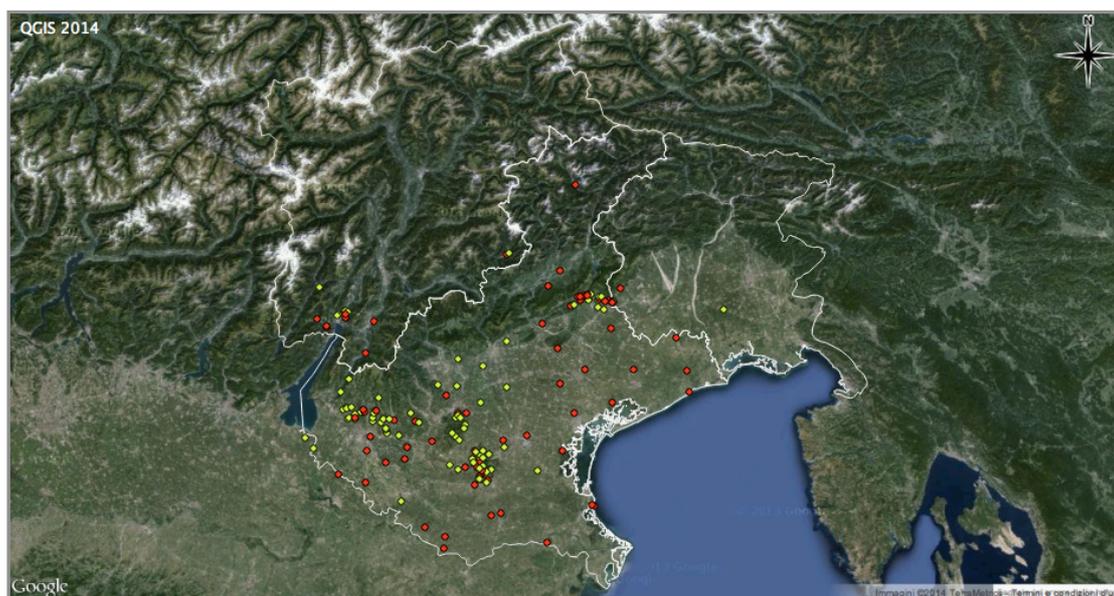
idoneo): per la validazione dei modelli sono state selezionate due opzioni, la prima (*Minimum Training Presence*), che si può definire la più conservativa (Pearson *et al.*, 2007), prevede di identificare le aree idonee in base al valore minimo di idoneità, tra quelli corrispondenti ai dati effettivi; la seconda (*10 percentile training presence*), corrisponde al valore di idoneità che include il 90% dei dati utilizzati per sviluppare il modello, tenendo quindi in considerazione il fatto che i dati utilizzati possano contenere degli errori (Young *et al.*, 2011).

## 3 Risultati

### 3.1 Analisi dei dati di campo

#### 3.1.1 Analisi descrittive

Tra i 175 siti monitorati in Triveneto dal 2001 al 2012, 94 (54%) sono risultati positivi alla presenza dei flebotomi (fig. 8). In totale sono stati raccolti 6.144 flebotomi, di cui 4.249 utilizzando le *sticky traps*, 874 tramite le *CDC light traps* e 1.021 impiegando le *CO<sub>2</sub> traps*.



**Figura 8:** mappa dei 175 siti di cattura monitorati nei 12 anni; in rosso sono stati rappresentati i siti negativi e in verde i siti positivi ai flebotomi.

Le specie identificate nell'area di studio sono state cinque: la specie più rappresentata è stata *P. perniciosus*, con 3.797 esemplari (61,8%), seguita da *S. minuta* con 1.065 esemplari (17,3%), *P. neglectus* con 665 esemplari (10,8%), *P. papatasi* con 45 esemplari (0,7%) e *P. mascittii* con 29 esemplari (0,5%); non è stato possibile invece identificare 543 flebotomi a causa della perdita di parti anatomiche necessarie per l'identificazione (tab. 2).

TRAPPOLA	<i>P. perniciosus</i>	<i>P. neglectus</i>	<i>P. papatasi</i>	<i>P. mascittii</i>	<i>S. minuta</i>	N.I.	TOTALE
sticky	2497	364	29	0	1052	307	<b>4249</b>
CDC	569	235	2	0	3	65	<b>874</b>
CO <sub>2</sub>	731	66	14	29	10	171	<b>1021</b>
<b>TOTALE</b>	<b>3797</b>	<b>665</b>	<b>45</b>	<b>29</b>	<b>1065</b>	<b>543</b>	<b>6144</b>

**Tabella 2:** specie di flebotomi catturati in relazione al tipo di trappola utilizzata.

Le tabelle 3 e 4 descrivono invece il numero di siti positivi e le densità medie dei flebotomi catturati nei 114 siti monitorati utilizzando *sticky traps* e dei flebotomi appartenenti alle due specie d'importanza epidemiologica (*P. perniciosus* e *P. neglectus*), suddivisi per le Province campionate (solo in 6 Province su 10 sono state usate *sticky traps*). I risultati mostrano una densità media totale di 9,50 flebotomi/m<sup>2</sup>, con un valore massimo in Provincia di Verona (15,69 flebotomi/m<sup>2</sup>) ed un valore minimo nella provincia di Trento (0,45 flebotomi/m<sup>2</sup>). La densità media dei due principali vettori di leishmaniosi canina in Triveneto invece è di 5,58 flebotomi/m<sup>2</sup> per quanto riguarda *P. perniciosus* e 0,81 flebotomi/m<sup>2</sup> per *P. neglectus*. Il valore più alto per entrambi i vettori è quello relativo alla Provincia di Padova, ma questo dato è stato particolarmente influenzato da un sito molto produttivo (situato a Calaone, Baone), che è stato monitorato ininterrottamente dal 2005 al 2012; infatti, togliendo questo sito, le densità di queste specie diventano rispettivamente di 2,37 *P. perniciosus*/m<sup>2</sup> e 0,14 *P. neglectus*/m<sup>2</sup> in Provincia di Padova e di 2,70 *P. perniciosus*/m<sup>2</sup> e 0,05 *P. neglectus*/m<sup>2</sup> sull'insieme delle Province. La densità media minima riportata infine è di 0,43 flebotomi/m<sup>2</sup> in Provincia di Trento per *P. perniciosus* e di 0,02 flebotomi/m<sup>2</sup> in Provincia di Pordenone per *P. neglectus*, che nel complesso rappresentano, infatti, le due Province con le densità più basse dei due vettori.

PROVINCIA	Numero di siti monitorati	Numero di siti positivi	Superficie di cattura (m <sup>2</sup> )	Flebotomi		
				Numero	Densità media	Densità massima
PD	29	16	189,88	2310	12,17	43,10
PN	9	5	44,68	32	0,72	2,03
TN	10	5	39,88	18	0,45	1,30
TV	20	4	23,48	95	4,05	17,50
VI	11	8	40,96	94	2,29	31,25
VR	35	24	108,32	1700	15,69	129,64
<b>TOTALE</b>	<b>114</b>	<b>62</b>	<b>447,20</b>	<b>4249</b>	<b>9,50</b>	<b>129,64</b>

**Tabella 3:** numero di siti positivi e densità medie dei flebotomi nei siti monitorati utilizzando le *sticky traps*, divisi per Provincia.

PROVINCIA	Numero di siti monitorati	Numero di siti positivi	Superficie di cattura (m <sup>2</sup> )	<i>P. perniciosus</i>		<i>P. neglectus</i>	
				Numero	Densità media	Numero	Densità media
PD	29	14	189,88	1752	9,23	270	1,42
PN	9	5	44,68	30	0,67	1	0,02
TN	10	4	39,88	17	0,43	1	0,03
TV	20	4	23,48	94	4,00	1	0,04
VI	11	8	40,96	59	1,44	15	0,37
VR	35	24	108,32	545	5,03	76	0,70
<b>TOTALE</b>	<b>114</b>	<b>59</b>	<b>447,2</b>	<b>2497</b>	<b>5,58</b>	<b>364</b>	<b>0,81</b>

**Tabella 4:** numero di siti positivi e densità medie di *P. perniciosus* e *P. neglectus* nei siti monitorati utilizzando le *sticky traps*, divisi per Provincia.

### 3.1.2 Analisi dei fattori di rischio

L'analisi univariata dei possibili fattori di rischio, registrati sul campo per ogni sito campionato e descritti in precedenza, ha mostrato risultati significativi, dal punto di vista statistico, per la presenza di conigli e per l'altitudine.

Per quanto riguarda i primi (tab. 5), su 148 siti in cui non erano presenti conigli, la positività alla presenza dei flebotomi si è riscontrata in 74 (49,3%), mentre su 27 siti con presenza di conigli la positività è stata di 21 (77,8%), con una differenza molto significativa ( $p < 0,001$ ).

<b>Conigli</b>	<b>Totale</b>	<b>Positivi</b>	<b>% pos</b>
Assenti	148	73	49,3%
Presenti	27	21	77,8%
<b>Totali</b>	<b>175</b>	<b>94</b>	<b>54,0%</b>

**Tabella 5:** siti con presenza o assenza di conigli correlati alla positività dei flebotomi ( $p=0,007$ ).

Per quanto riguarda l'altitudine, l'analisi ha reso evidente come la maggior parte dei siti positivi ai flebotomi si è concentrata tra 100 e 600 m. s.l.m., mentre i siti negativi erano distribuiti con relativa continuità a differenti quote (tab. 6).

<b>Fasce altitudinali</b>	<b>Totale</b>	<b>Positivi</b>	<b>%</b>
<b>0-100m</b>	78	29	37,2%
<b>101-300m</b>	69	51	73,9%
<b>301-600m</b>	20	12	60,0%
<b>&gt;600m</b>	8	2	25,0%
<b>Totali</b>	<b>175</b>	<b>94</b>	<b>54%</b>

**Tabella 6:** siti positivi ai flebotomi per classi di quota ( $p<0,001$ ).

In altri due casi si sono registrate differenze di positività per flebotomi al variare dei fattori di rischio considerati, anche se con significatività sopra il valore soglia. In particolare nei 72 siti con presenza di volatili da cortile, 44 erano positivi alla presenza dei flebotomi (66,1%), mentre nei 103 con assenza di volatili da cortile, solamente in 50 (48,5%) sono stati catturati i flebotomi, con una differenza vicino alla significatività ( $p=0,11$ ). Analogamente, i 93 siti con presenza di più di una specie di animali esca hanno mostrato una positività (55 siti positivi; 59,2%) maggiore rispetto agli 82 siti con una o nessuna specie animale (39 positivi; 47,6%).

L'analisi multivariata ha preso in considerazione, di conseguenza, quattro fattori (presenza di conigli, presenza di uccelli, numero di specie di animali esca, altitudine) ed ha confermato l'altitudine quale unico fattore importante nel determinare una minore o maggiore positività ai flebotomi (tab. 7).

	p value	Odds Ratio (O.R.)	95% CI per O.R.	
			Inferiore	Superiore
<b>Presenza di uccelli</b>	0,098	2,451	0,848	7,087
<b>Presenza di conigli</b>	0,157	1,745	0,806	3,778
<b>Più di una specie esca</b>	0,937	1,032	0,479	2,222
<b>Altitudine sopra i 100 m</b>	0,000	3,559	1,834	6,903

**Tabella 7:** risultati analisi fattori di rischio (modello di regressione logistica).

L'analisi dei fattori di rischio ha poi preso in esame le stesse variabili, mettendole in relazione con i valori di densità totale dei flebotomi. In questo caso, l'unico fattore per il quale le densità hanno mostrato differenze statisticamente significative è stato l'altitudine. In particolare la fascia altitudinale tra i 100 m e i 300 m è risultata avere densità di flebotomi maggiori rispetto alle altre (tab. 8) e le differenze tra le fasce sono risultate significative ( $p=0,005$ ) al test di Kruskal-Wallis. Le differenze tra la fascia centrale e le altre due sono state confermate anche da ulteriori confronti a coppie mediante il test U di Mann-Whitney. Le altre due fasce altitudinali (<100 m e >300 m), invece, non hanno mostrato differenze significative tra di loro ( $p>0,05$ ).

Fasce di altitudine	N siti	Superficie di cattura (m <sup>2</sup> )	Numero flebotomi	Densità media
0-100m	36	124,6	78	0,63
101-300m	57	238,4	3892	16,33
>301m	21	84,2	279	3,31
<b>Totale</b>	<b>114</b>	<b>447,2</b>	<b>4249</b>	<b>9,50</b>

**Tabella 8:** numero di flebotomi raccolti e densità medie per le tre fasce altitudinali.

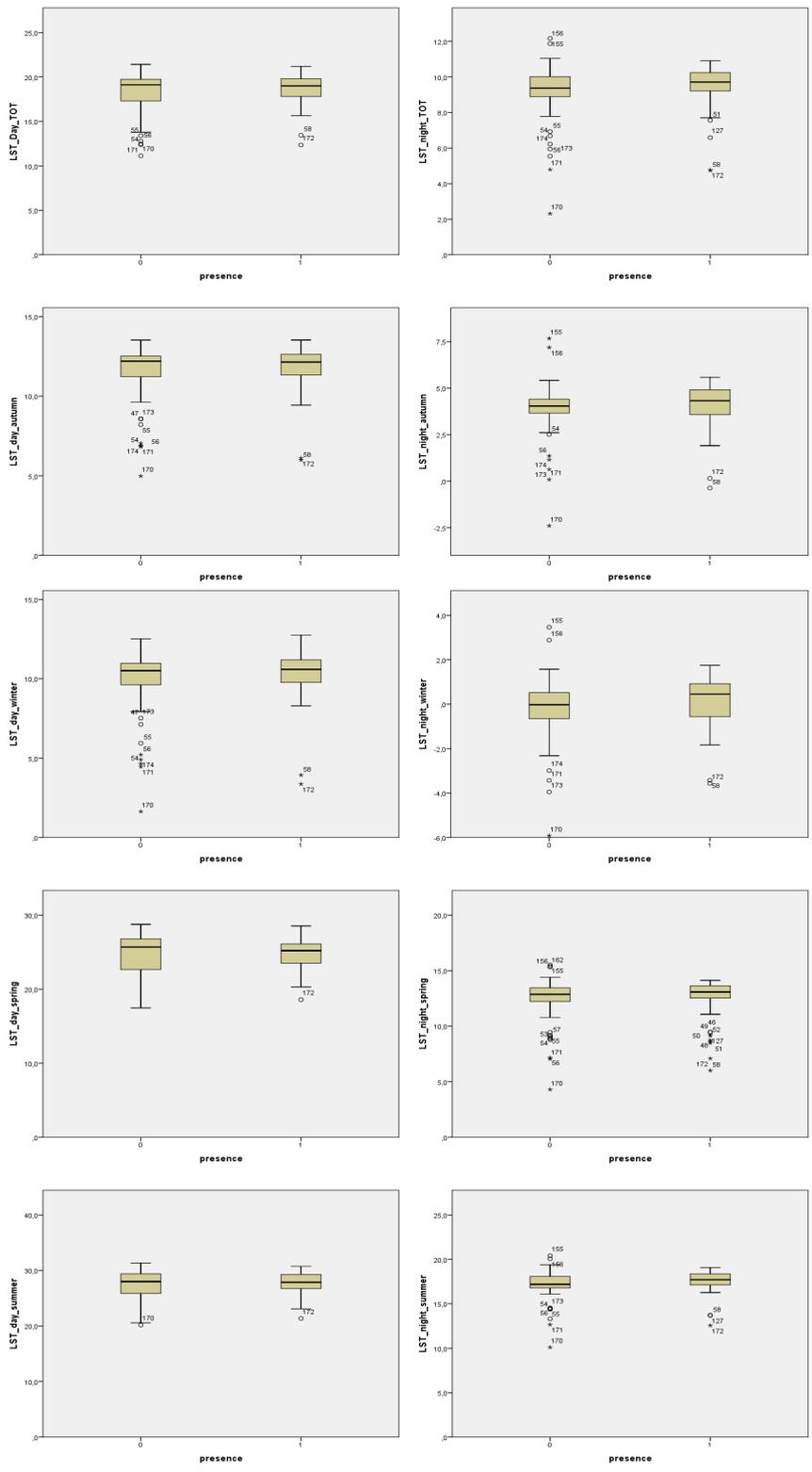
## 3.2 Analisi delle variabili ambientali e modelli predittivi

### 3.2.1 Analisi preliminari

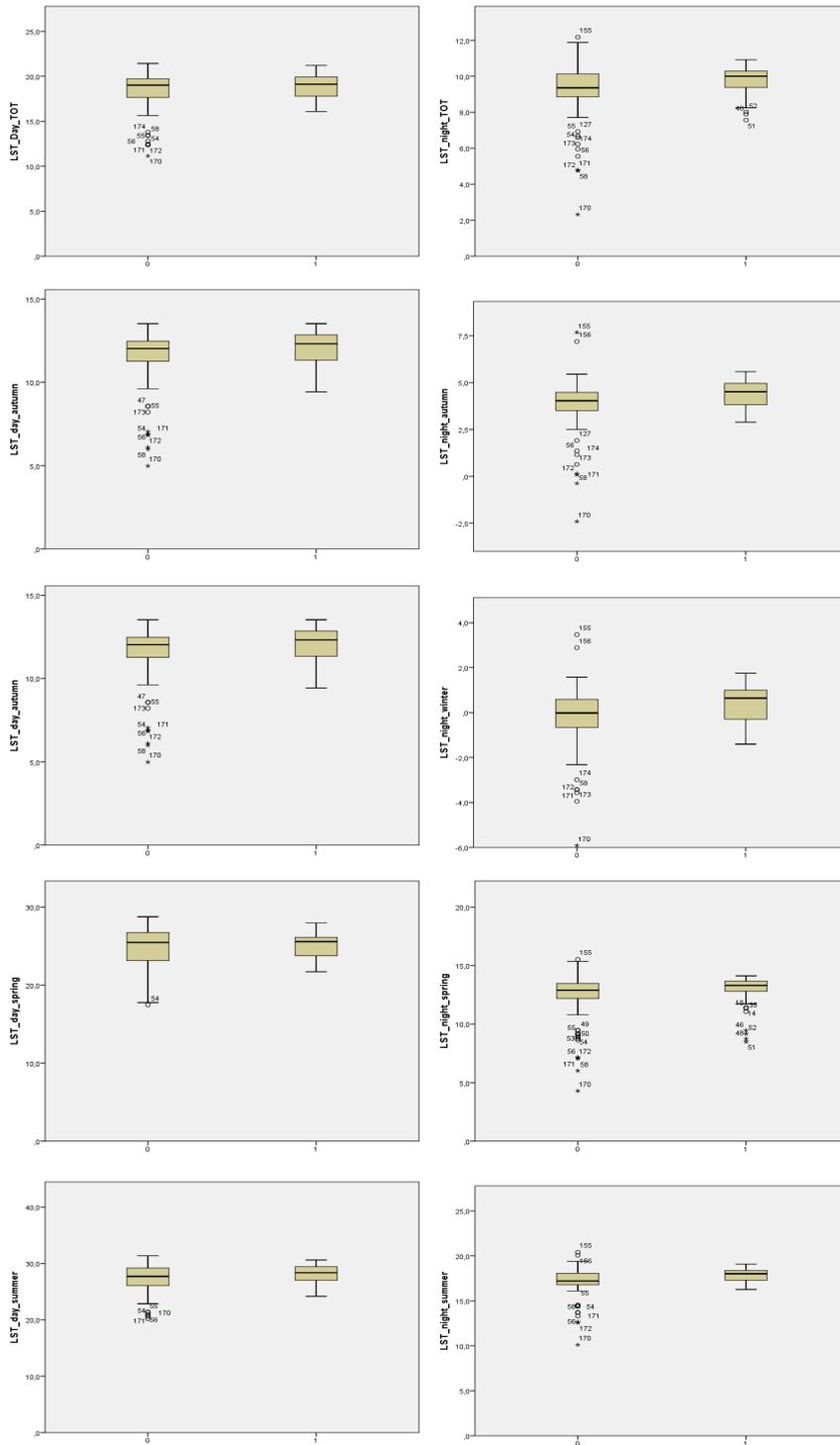
L'analisi preliminare delle variabili ambientali, inserite nel geo-database, ha permesso di valutare se vi erano evidenti differenze nella distribuzione dei siti positivi per la presenza di flebotomi (o per la presenza di 3 o più esemplari di *P. perniciosus* nell'approccio più specifico e prudenziale) e di quelli negativi, con la finalità di

comprendere quali fattori ecologici influenzino di più la distribuzione dei flebotomi. L'analisi effettuata utilizzando l'altitudine ricavata dal DEM, non ha mostrato differenze significative con quella svolta impiegando l'altitudine registrata in campo tramite GPS, descritta nel paragrafo precedente.

**Temperature al suolo (LST).** I *boxplot* riportati in figura 9 e 10, mostrano la distribuzione delle stazioni positive e negative rispettivamente ai flebotomi e a *P. perniciosus* ( $\geq 3$  esemplari), rispetto alle temperature al suolo (medie stagionali ed annuali, diurne e notturne), relative alla totalità dei 12 anni di campionamento. Risulta evidente come i flebotomi sembrano prediligere ambienti con temperature mediamente più alte in tutte le stagioni, ma soprattutto come il *range* di temperature che caratterizza i siti di presenza sia più definito entro certi limiti, che evidentemente rispecchiano i limiti biologici favorevoli alla sopravvivenza e allo sviluppo degli insetti durante tutto il loro ciclo vitale.



**Figura 9:** Boxplot dei siti positivi(1) e negativi (0) ai flebotomi rispetto alle temperature medie stagionali (*autumn, winter, spring, summer*) ed annuali (TOT), giornaliere (*day*) e notturne (*night*) derivate da dati MODIS.



**Figura 10:** Boxplot dei siti positivi(1) e negativi (0) a *P. perniciosus* ( $\geq 3$  esemplari) rispetto alle temperature medie stagionali (*autumn*, *winter*, *spring*, *summer*) ed annuali (TOT), giornaliera (*day*) e notturne (*night*) derivate da dati MODIS.

La tabella 9 mostra i risultati del test di correlazione di Pearson e la figura 11 i relativi grafici (*scatterplot*); risulta evidente come in generale siano meno correlate le temperature medie notturne con le diurne, mentre tendono ad essere maggiormente correlati tra loro i valori notturni, così come i diurni (fig. 11).

	LST diurna annuale	LST diurna autunnale	LST diurna invernale	LST diurna primaverile	LST diurna estiva	LST notturna annuale	LST notturna autunnale	LST notturna invernale	LST notturna primaverile	LST notturna estiva
LST diurna annuale	1	0,957**	0,919**	0,960**	0,965**	0,724**	0,496**	0,498**	0,727**	0,726**
LST diurna autunnale	0,957**	1	0,962**	0,854**	0,874**	0,769**	0,597**	0,577**	0,755**	0,748**
LST diurna invernale	0,919**	0,962**	1	0,797**	0,806**	0,702**	0,549**	0,515**	0,674**	0,694**
LST diurna primaverile	0,960**	0,854**	0,797**	1	0,949**	0,606**	0,332**	0,346**	0,651**	0,621**
LST diurna estiva	0,965**	0,874**	0,806**	0,949**	1	0,714**	0,477**	0,508**	0,708**	0,723**
LST notturna annuale	0,724**	0,769**	0,702**	0,606**	0,714**	1	0,937**	0,939**	0,949**	0,957**
LST notturna autunnale	0,496**	0,597**	0,549**	0,332**	0,477**	0,937**	1	0,956**	0,834**	0,891**
LST notturna invernale	0,498**	0,577**	0,515**	0,346**	0,508**	0,939**	0,956**	1	0,837**	0,888**
LST notturna primaverile	0,727**	0,755**	0,674**	0,651**	0,708**	0,949**	0,834**	0,837**	1	0,850**
LST notturna estiva	0,726**	0,748**	0,694**	0,621**	0,723**	0,957**	0,891**	0,888**	0,850**	1

**Tabella 9:** analisi della Correlazione di Pearson tra i valori di LST (\*\*p<0,01; \*p<0,05).

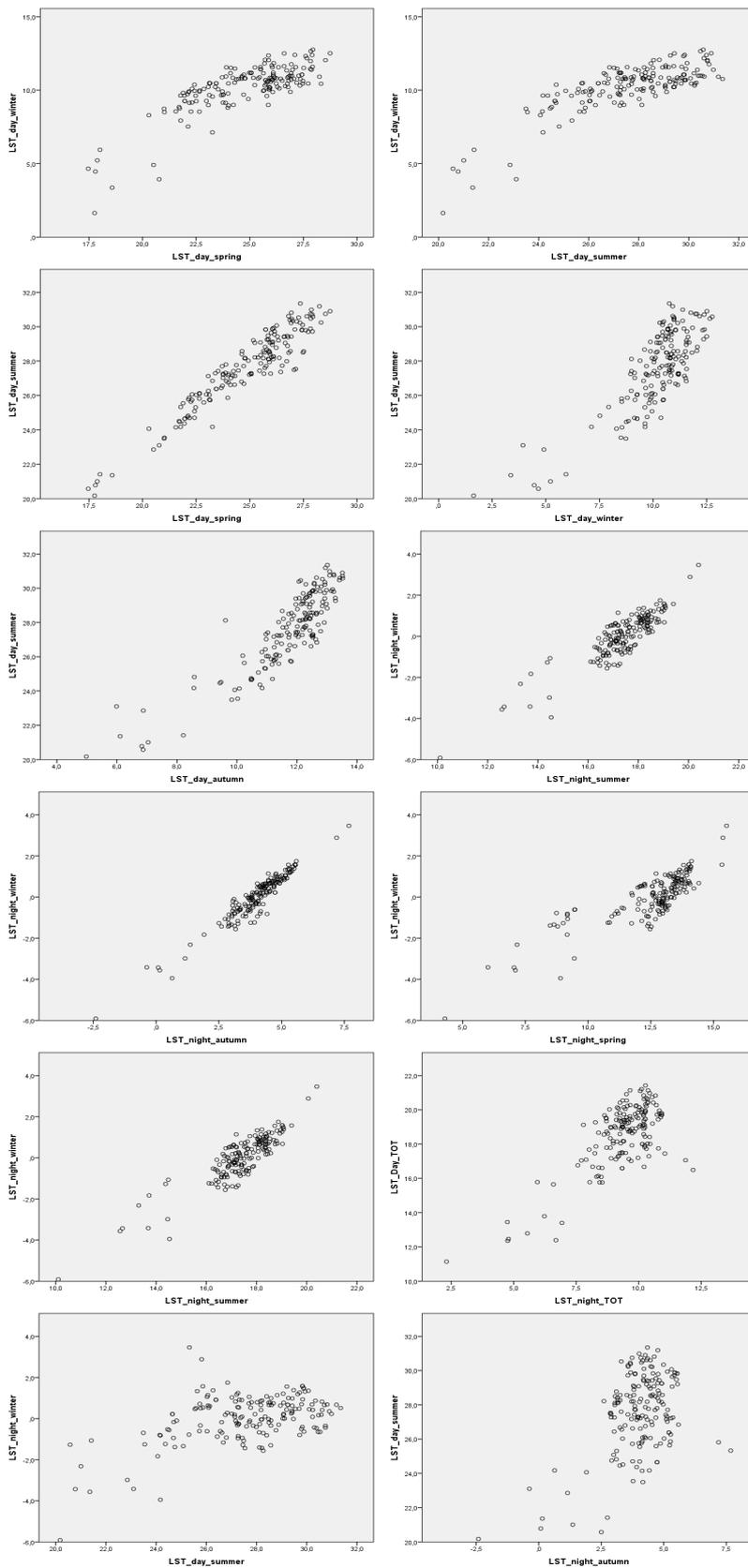
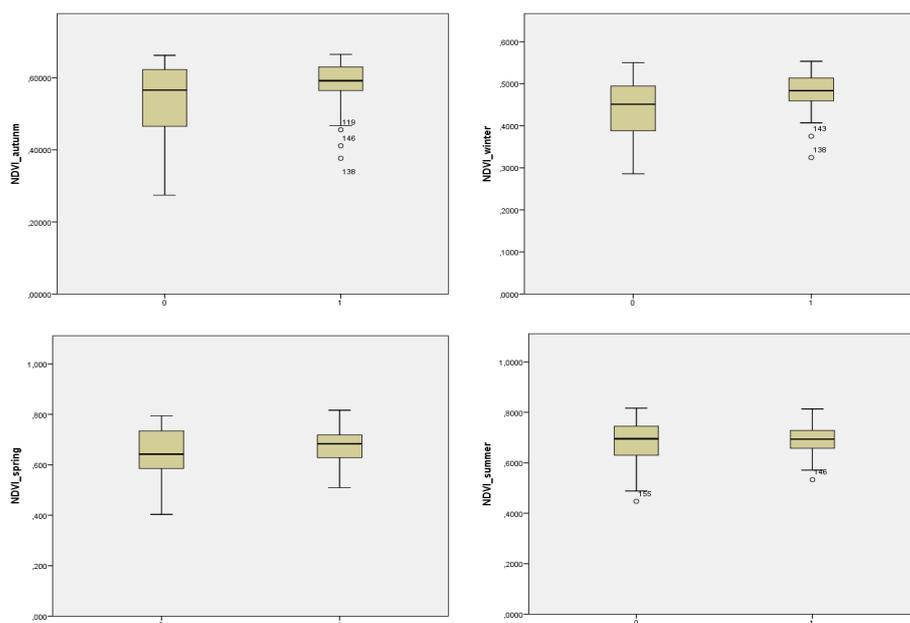


Figura 11: alcuni esempi di *scatterplot* tra diverse temperature del suolo.

**NDVI.** Per analizzare l'NDVI, i cui valori medi nell'area di studio variano da un minimo di 0,2 nella stagione autunnale ad un massimo di 0,8 in quella estiva, è stato adottato lo stesso procedimento. I *boxplot* mostrano che le catture di *P. perniciosus* si sono verificate in aree con valori NDVI più alti in tutte le stagioni (tendenzialmente concentrate tra 0,5 e 0,8) ovvero caratterizzate da una maggiore vegetazione (fig. 12). Lo stesso andamento è stato evidenziato per i flebotomi in generale.



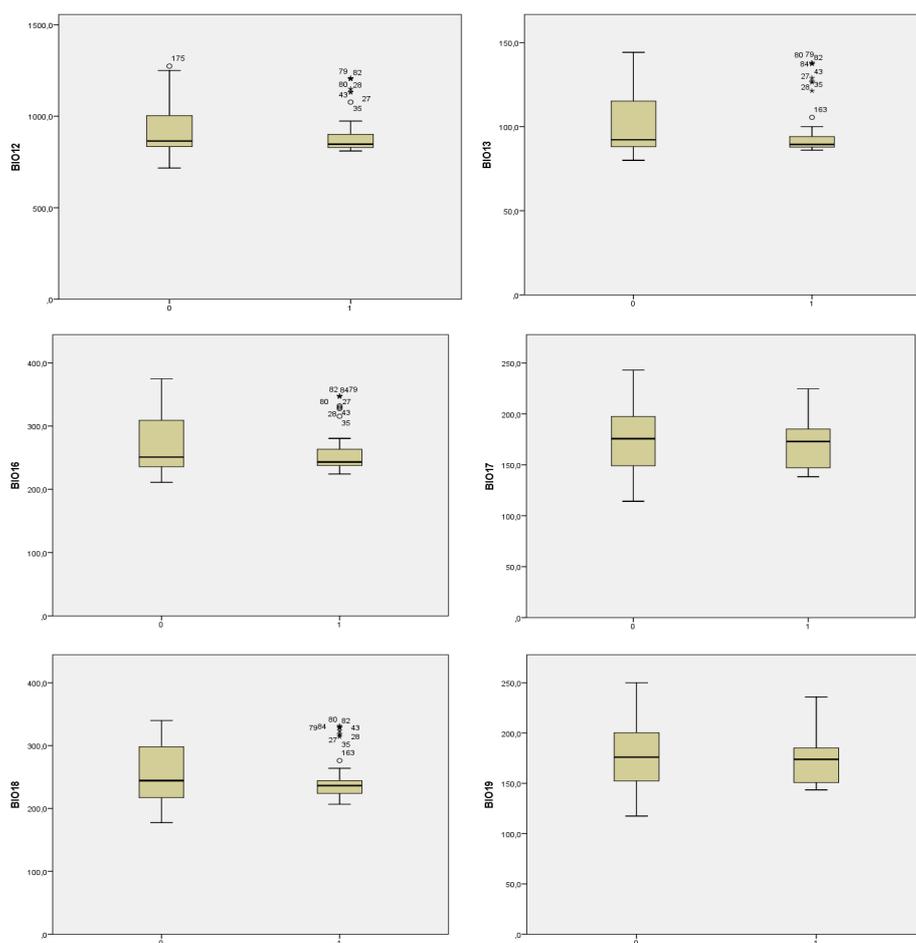
**Figura 12:** *boxplot* dei siti positivi a *P. perniciosus* ( $\geq 3$  esemplari) e negativi rispetto ai valori dell'NDVI medi stagionali (*autumn*, *winter*, *spring*, *summer*), derivati da dati MODIS.

Le analisi di correlazione anche in questo caso hanno evidenziato una significativa correlazione tra i valori stagionali e annuali medi dell'NDVI (tab. 10).

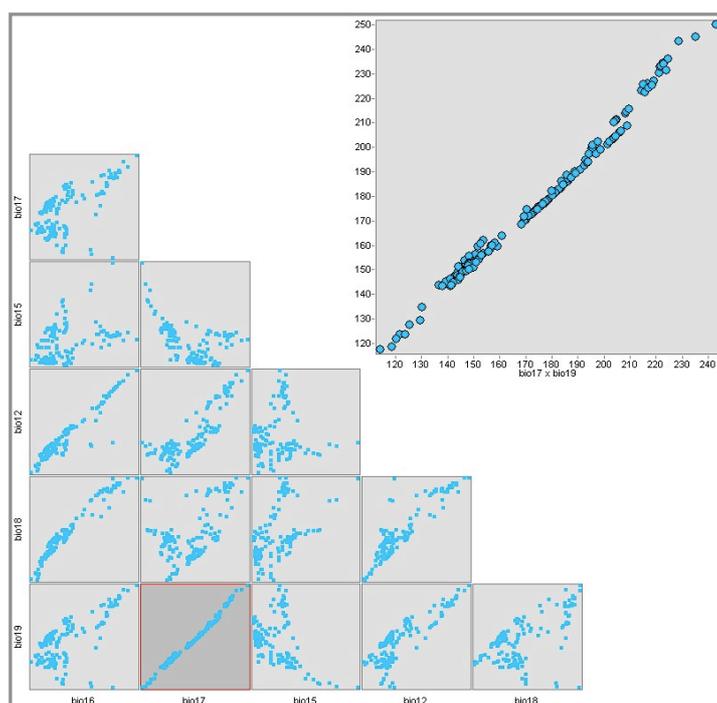
	NDVI annuale	NDVI autunnale	NDVI invernale	NDVI primaverile	NDVI estivo
NDVI annuale	1	0,964**	0,893**	0,955**	0,894**
NDVI autunnale	0,964**	1	0,909**	0,866**	0,794**
NDVI invernale	0,893**	0,909**	1	0,797**	0,632**
NDVI primaverile	0,955**	0,866**	0,797**	1	0,871**
NDVI estivo	0,894**	0,794**	0,632**	0,871**	1

**Tabella 10:** analisi della Correlazione di Pearson tra i valori di NDVI (\*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ).

**Precipitazioni.** Per quanto riguarda le diverse variabili climatiche relative alle precipitazioni, le catture dei flebotomi e di *P. perniciosus* si sono verificate in zone caratterizzate da valori medi (misurati in mm di pioggia) di precipitazioni più bassi ed in un range più ristretto, rispetto ai siti negativi (fig. 13). La correlazione tra le precipitazioni è risultata abbastanza variabile, ma tendenzialmente alta, come evidenziato dagli *scatterplot* di figura 14.



**Figura 13:** *boxplot* dei siti negativi (0) e positivi (1) a *P. perniciosus* ( $\geq 3$  esemplari) rispetto ai valori pluviometrici relativi (da sx in alto) alle precipitazioni annuali, precipitazioni del mese più piovoso, precipitazioni del trimestre più piovoso, precipitazioni del trimestre più secco, precipitazioni del trimestre più caldo e precipitazioni del trimestre più freddo.



**Figura 14:** esempio di *scatterplot* tra le variabili relative alle precipitazioni.

**Copertura del suolo.** La tabella 11 mostra le 6 classi di copertura del suolo utilizzate nello studio, in relazione con i dati di presenza di *P. perniciosus*. Si può notare che percentuali di positività maggiore si riscontrano nella 5<sup>a</sup> classe (43,5%) seguita dalla 4<sup>a</sup> (40,0%) e dalla 3<sup>a</sup> (33,3%), mentre le più basse nelle aree classificate come terreni arabili (escludendo la 6<sup>a</sup> classe).

	<b>totale</b>	<b>presenza</b>	<b>% pos</b>
<b>1<sup>a</sup>: territori modellati artificialmente</b>	28	8	28,6%
<b>2<sup>a</sup>: terreni arabili</b>	33	7	21,2%
<b>3<sup>a</sup>: colture permanenti e prati</b>	15	5	33,3%
<b>4<sup>a</sup>: terreni agricoli eterogenei</b>	75	30	40,0%
<b>5<sup>a</sup>: territori boscati ed aree seminaturali</b>	23	10	43,5%
<b>6<sup>a</sup>: ambienti umidi e corpi idrici</b>	1	0	0,0%
<b>Totale</b>	<b>175</b>	<b>60</b>	<b>34,3%</b>

**Tabella 11:** presenza di *P. perniciosus* ( $\geq 3$  esemplari) secondo la classificazione a 6 classi di copertura del suolo CORINE.

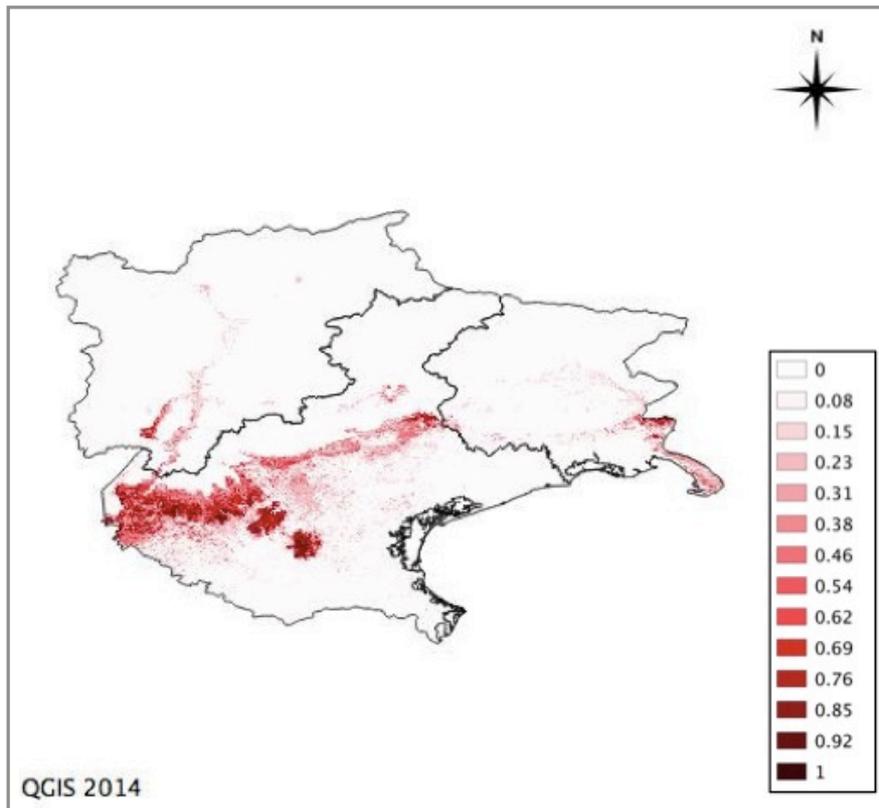
### 3.2.2 Modelli predittivi di distribuzione di specie

Le variabili che hanno ottenuto più alti valori dell'area sotto la curva ROC (AUC) per i dati di *test*, derivati dallo sviluppo di modelli creati utilizzando le singole variabili, sono state le seguenti (vengono riportate solo le variabili con valore di AUC compreso tra 0,930 e 0,710):

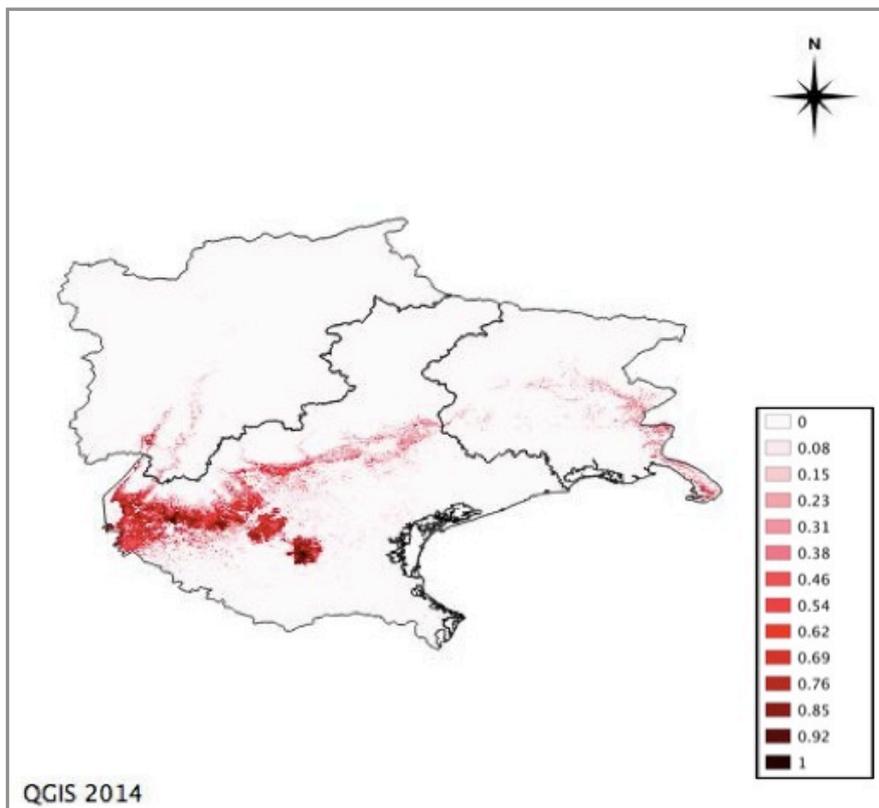
- LST notturna invernale
- LST notturna annuale
- LST notturna estiva
- LST notturna primaverile
- LST notturna autunnale
- BIO 18
- Altitudine (DEM)
- LST diurna invernale
- LST diurna autunnale
- LST diurna estiva
- BIO 16
- NDVI invernale
- LST diurna annuale
- BIO 19
- BIO 13
- CLC
- BIO 14
- BIO 17

Sulla base di tali valori, dei risultati dei test di correlazione e prendendo in considerazione il significato biologico ed ecologico delle singole variabili, è stato possibile selezionare quelle da inserire nel modello, come predittori ambientali. Le variabili predittive scelte, quindi, per elaborare entrambi i modelli sono state sei: altitudine (DEM), Corine Land Cover (CLC), precipitazioni nel trimestre più caldo (BIO 18), NDVI invernale, LST notturna invernale, LST diurna estiva.

Nelle figure 15 e 16 sono rappresentate le mappe di idoneità ambientale rispettivamente ai flebotomi e alla specie *P. perniciosus* in Triveneto, derivate da due modelli predittivi di MaxEnt: è stato utilizzato l'output logistico (valori dei pixel da 0 a 1) ed in rosso scuro sono stati rappresentati i pixel aventi la più alta probabilità di condizioni ambientali idonee, in bianco quelli aventi la minore probabilità. E' facilmente apprezzabile come, nella mappa relativa ai flebotomi in generale, le aree risultate idonee siano leggermente più diffuse nel territorio; questo risultato è facilmente interpretabile considerando sia la maggior numerosità dei dati utilizzati per sviluppare il modello sia tenendo in considerazione il fatto che i 34 siti esclusi dal modello relativo a *P. perniciosus* erano prevalentemente situati in pianura ed alcuni in montagna e quindi risulta normale un'espansione dell'area predetta verso queste tipologie di luoghi (fig. 7).



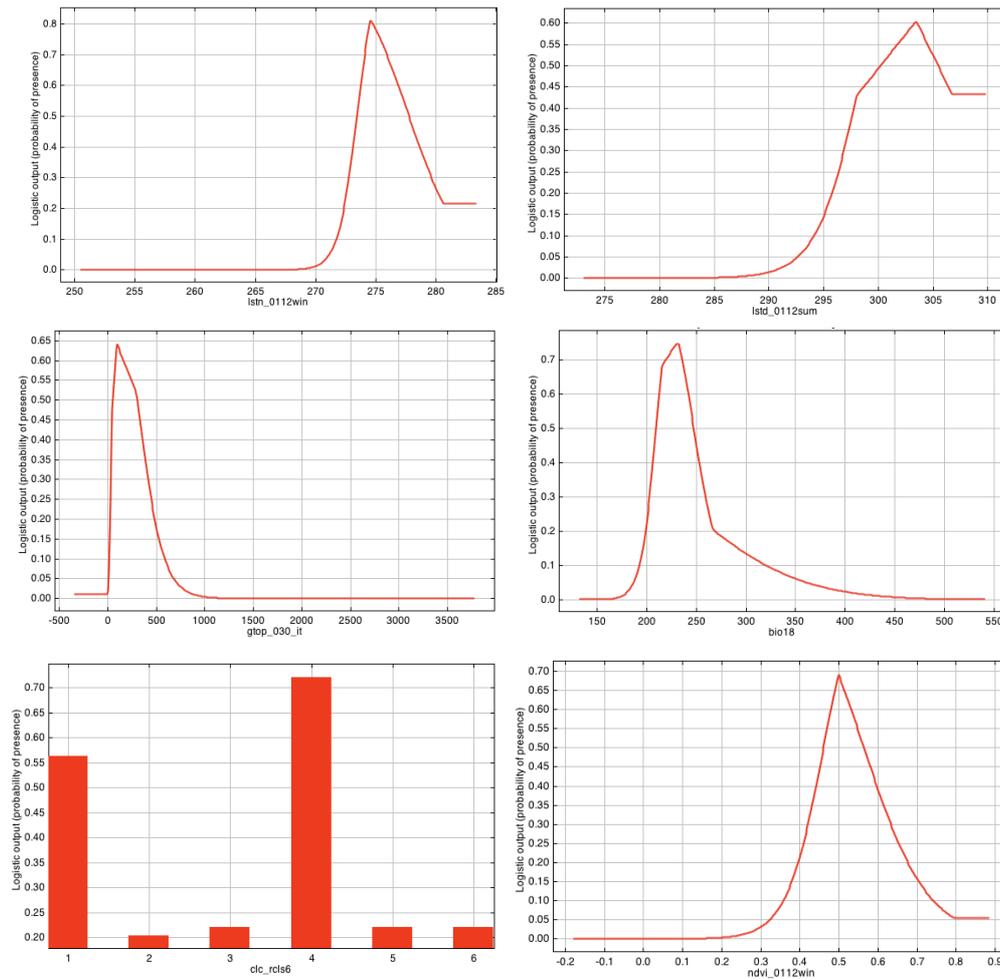
**Figura 15:** modello di idoneità ambientale basato sulla massima entropia (MaxEnt) per i flebotomi in Triveneto.



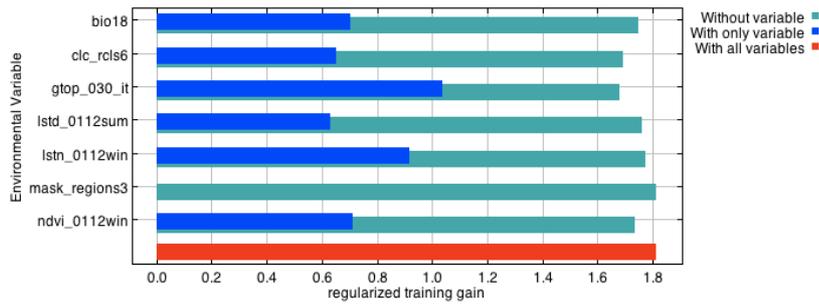
**Figura 16:** modello di idoneità ambientale basato sulla massima entropia (MaxEnt) per *P. perniciosus* in Triveneto.

Per quanto riguarda i risultati dei test volti a valutare l'influenza delle variabili ambientali inserite nel modello, è interessante notare (fig. 17) come tutte le curve mostrino dei picchi di maggiore probabilità di presenza della specie, corrispondenti ai *range* riscontrati nelle precedenti analisi descrittive; il modello sembra quindi essere in grado di individuare le condizioni climatiche ed ambientali idonee ai flebotomi. Nelle figure 18 e 19, invece, vengono riportati i risultati del *jackknife test* per i dati di *training*, nei due modelli. L'altitudine (gtop\_O30\_it) è risultata essere, in entrambi i casi, la variabile con più alto valore predittivo utilizzando i dati di *training* per la modellazione (seguita dalla LST notturna invernale), ed allo stesso tempo, la variabile che ha fatto decrescere maggiormente il potere predittivo dei modelli, se esclusa dagli stessi. Questi test confermano dunque che la variabile altitudine contiene una parte di informazioni utili in se stessa, non contenute nelle altre variabili.

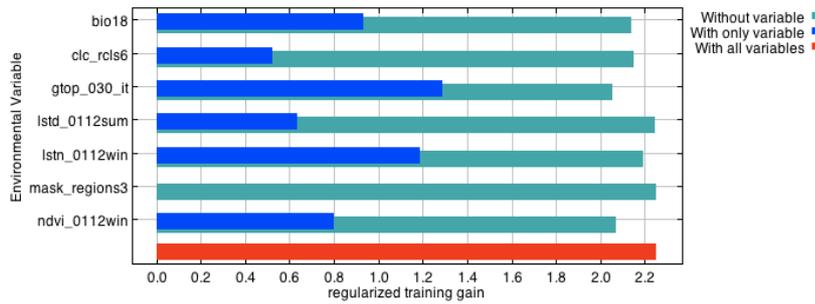
Confrontando però lo stesso test effettuato sul 25% dei dati tenuti da parte come dati di *test*, è interessante notare che la BIO 18 (per il modello di distribuzione dei flebotomi) e la LST notturna invernale (per il modello di distribuzione di *P. perniciosus*) siano risultate le variabili con maggiore capacità predittiva. Questo spiega che l'altitudine ha aiutato MaxEnt ad ottenere un buon adattamento ai dati di *training* ma che la BIO 18 e la LST notturna invernale generalizzano meglio; in altre parole i modelli generati utilizzando l'altitudine sembrano essere meno trasferibili (fig. 20 e fig. 21). E' da notare comunque che l'altitudine rappresenta la seconda variabile per importanza nel modello relativo a *P. perniciosus* elaborato utilizzando i dati di *test* e che l'esclusione da tale modello della CLC sembrerebbe migliorarne leggermente le capacità predittive.



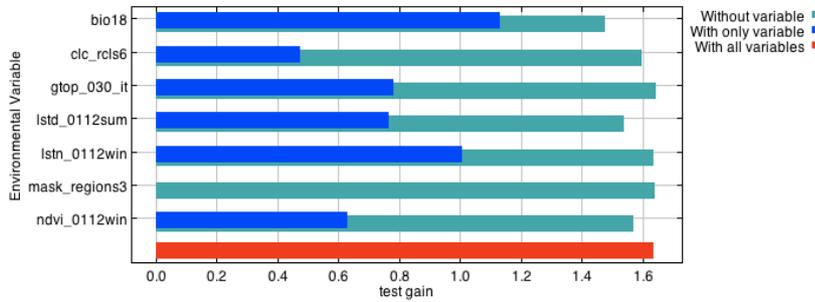
**Figura 17:** curve di risposta dell'andamento della relazione tra probabilità di presenza di *P. perniciosus* e le variabili ambientali, quando utilizzate singolarmente da MaxEnt; (da sx in alto: LST notturna invernale, LST diurna estiva, altitudine, precipitazioni nel trimestre più caldo, uso del suolo Corine, NDVI invernale; le temperature sono espresse in gradi Kelvin).



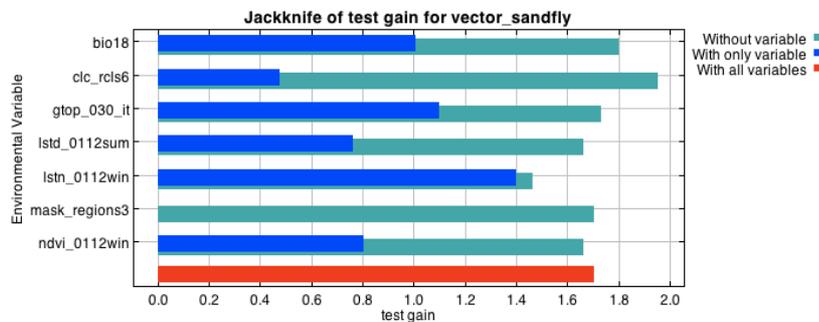
**Figura 18:** contributo delle variabili nell'elaborazione del modello predittivo per i flebotomi utilizzando i dati di *training* (*jackknife test*) .



**Figura 19:** contributo delle variabili nell'elaborazione del modello predittivo per *P. perniciosus* utilizzando i dati di *training* (*jackknife test*).



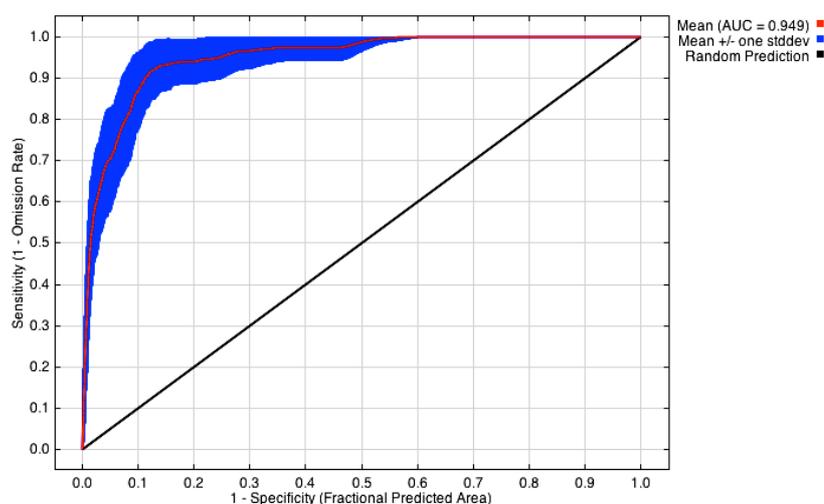
**Figura 20:** contributo delle variabili nell'elaborazione del modello predittivo per i flebotomi utilizzando i dati di *test* (25%) (*jackknife test*).



**Figura 21:** contributo delle variabili nell'elaborazione del modello predittivo per *P. perniciosus* utilizzando i dati di *test* (25%) (*jackknife test*).

### 3.2.3 Validazione

I due modelli elaborati hanno ottenuto alti valori di AUC e bassi valori di deviazione standard: 0,931 e 0,026, per il modello relativo ai flebotomi, 0,933 e 0,030 per quello relativo al solo *P. perniciosus*. Allo stesso modo, il valore di AUC mostra una media alta e valori bassi di deviazione standard per le esecuzioni ripetute, effettuate solo per il modello relativo a *P. perniciosus* (50 repliche): 0,949 e 0,022, mostrando quindi una basso grado di variabilità del modello (fig. 22).



**Figura 22:** area sottesa dalla curva ROC (AUC) del modello relativo a *P. perniciosus* ottenuto effettuando 50 repliche.

Per effettuare la validazione del modello di distribuzione di *P. perniciosus* è stata creata, inoltre, la *confusion matrix*, che confronta i dati predetti con quelli osservati, utilizzando due delle differenti soglie disponibili nel software (*thresholds*), per produrre output discreti che individuassero gli habitat idonei e non idonei: *minimum training presence* e *10 percentile training presence*.

Conseguentemente sono state valutate il potere predittivo positivo e negativo, la sensibilità e la specificità del modello. Dalle tabelle 12 e 13 si nota come quasi tutti i siti di presenza siano stati correttamente predetti dal modello utilizzando entrambe le soglie. Il potere predittivo positivo e negativo sono risultati pari a 36,2% e 91,7% utilizzando la soglia *minimum training presence* e 46,6% e 89,9% utilizzando *10 percentile training presence*. La sensibilità e la specificità, invece, sono risultate

98,3% e 9,6% utilizzando la soglia più bassa, mentre 90,0% e 46,1% utilizzando come soglia 10% *training presence*.

		SITI		
		POS	NEG	
MAXENT	POS	59	104	163
	NEG	1	11	12
	TOT	60	115	175

**Tabella 12:** *confusion matrix* : soglia *minimum training presence*.

		SITI		
		POS	NEG	TOT
MAXENT	POS	54	62	116
	NEG	6	53	59
	TOT	60	115	175

**Tabella 13:** *confusion matrix* : soglia 10% *training presence*.

E' da sottolineare, comunque, che il valore soglia viene scelto in modo arbitrario in base agli scopi per cui viene costruito il modello ed ai dati disponibili (nel nostro caso di sola presenza e relativi ad una specie non caratterizzata da una grande capacità dispersiva), quindi, la *confusion matrix* non discrimina correttamente la capacità predittiva di un modello. Gli obiettivi del modello sviluppato nello studio erano maggiormente orientati ad una analisi ecologica, quindi, a caratterizzare le aree potenzialmente idonee alla presenza di *P. perniciosus*, in relazione a determinate caratteristiche climatiche, geografiche e ambientali. Di conseguenza, lo scopo era di massimizzare il numero di presenze correttamente predette, più che quello di ridurre il numero dei falsi positivi (infatti, una specie può non essere presente o non essere catturata, anche in *habitat* a lei idonei). In questi casi, quindi, può essere più opportuno scegliere una soglia più bassa (Stensgaard *et al.*, 2005; Pearson *et al.*, 2006); infatti, aumentando la soglia, si può notare, come siano fortemente diminuiti i falsi positivi (tab. 13).

## 4 Discussione

### 4.1 Analisi descrittiva

Il monitoraggio entomologico effettuato dal 2001 al 2012 ha permesso di raccogliere informazioni utili sulla distribuzione dei flebotomi ed in particolare delle specie implicate nella trasmissione di *L. infantum*, nel territorio del Triveneto. Il monitoraggio attivo sul campo rimane, quindi, lo strumento basilare negli studi ecologici ed epidemiologici dei flebotomi vettori e conseguentemente nella pianificazione degli interventi di sorveglianza nei confronti della leishmaniosi canina. Indubbiamente, la metodologia adottata negli interventi di monitoraggio entomologico, può influenzare i risultati degli stessi, quindi la scelta del metodo di campionamento (tipo di trappole utilizzate, numero di catture attuate e periodo monitorato nella stagione di attività) e dei siti di cattura (localizzazione geografica e tipologia) va attentamente calibrata in relazione agli obiettivi specifici prefissati.

Nel nostro caso, il monitoraggio entomologico ha risposto, nel corso dei 12 anni, ad esigenze diverse: primariamente, è stato rivolto all'individuazione di focolai autoctoni di Lcan, in un territorio che fino a pochi anni prima era considerato indenne, quindi effettuato in aree nelle quali erano stati individuati casi della malattia e utilizzando principalmente *sticky traps*, in modo da poter valutare se la densità dei flebotomi vettori presenti era tale da permettere l'instaurarsi di cicli endemici. In seguito, gli obiettivi principali sono stati quelli di monitorare i focolai confermati nei primi anni e comprendere meglio la dinamica delle popolazioni di flebotomi presenti, in aree caratterizzate da condizioni ecologiche differenti dalle aree di classica endemia del centro-sud Italia. Infine, il monitoraggio entomologico ha avuto lo scopo di tracciare la potenziale distribuzione attuale dei flebotomi e del vettore maggiormente presente, *P. perniciosus*, in Triveneto, attraverso l'individuazione degli aspetti ecologici che maggiormente ne favoriscono o limitano la presenza/numerosità; con questo intento, quindi, le catture sono state condotte in aree con caratteristiche ecologiche variegata e utilizzando principalmente *CO<sub>2</sub> traps*.

Da quanto appena descritto risulta evidente come i dati dei 12 anni di campionamento non siano uniformi e come il loro utilizzo all'interno di un modello predittivo ne richieda un'attenta analisi. Parte del lavoro svolto nell'ambito del Dottorato di

Ricerca, infatti, ha avuto il proposito di comparare l'efficacia delle diverse trappole utilizzate e di individuare quale tra queste, potesse rispondere meglio all'obiettivo di sviluppare modelli predittivi (allegato 1). In merito a ciò, si può concludere che l'utilizzo delle CO<sub>2</sub> traps possa essere la scelta più corretta in territori, come l'Italia nord-orientale, caratterizzati generalmente da basse-medie densità dei vettori ed emergente circolazione di *L. infantum*. La loro maggiore capacità attrattiva nei confronti dei flebotomi e la conseguente maggiore efficacia nella cattura, infatti, permette di discriminare con più certezza le zone nelle quali i flebotomi sono realmente assenti da quelle dove sono presenti, fattore importante negli studi ecologici. E' da evidenziare, infatti, che i pochi esemplari raccolti, se pur occasionalmente, in pianura (<80 m, con l'esclusione delle aree pedecollinari), quindi in aree non tipicamente idonee alle due specie di vettori presenti, sono stati tutti catturati utilizzando CO<sub>2</sub> traps.

Dall'analisi descrittiva e statistica dei dati di campo, è possibile affermare che i flebotomi sono distribuiti in maniera discontinua in Triveneto, presentando dei cluster di aggregazione in aree collinari e pedecollinari, che sembrano rappresentare quindi le aree maggiormente idonee al loro sviluppo e stabilizzazione. Tali aree sono localizzate tra i 100 e i 600 m s.l.m, ma le densità maggiori si sono registrate tra i 100 e i 300 m. s.l.m. E' interessante sottolineare, comunque, il ritrovamento, di *P. perniciosus* e *P. neglectus*, anche in siti localizzati in piena pianura, aspetto precedentemente non segnalato nel territorio delle Venezie (Capelli *et al.*, 2004; Natale, 2004). L'analisi dei fattori di rischio ha confermato che l'altitudine rappresenta il fattore discriminante più importante tra quelli considerati nello studio, sia per la presenza dei flebotomi sia di densità elevate (16,33 flebotomi/m<sup>2</sup>, nella fascia altitudinale compresa tra i 100 m e i 300 m). Questo dato è in linea con quelli presenti in letteratura, che hanno dimostrato come la presenza dei due vettori sia maggiore, in Italia settentrionale, in ambiente collinare (Biocca *et al.*, 1977; Maroli *et al.*, 2008; Cassini *et al.*, 2010). Uno studio in Piemonte, invece, ha documentato una maggiore presenza di *P. perniciosus* nella fascia compresa tra i 300 e i 600 m s.l.m. (Vesco, 2005). Probabilmente, in Italia nord-orientale, le condizioni climatiche e orografiche favorevoli ai flebotomi, caratterizzate da climi miti e vegetazione abbondante tipicamente mediterranea, coincidono con le aree collinari e pedecollinari, ad altitudine limitata. I parametri climatici che possono essere considerati fattori

limitanti la sopravvivenza dei flebotomi, come la temperatura e l'umidità relativa, d'altronde, sono abbastanza condizionati dalla quota.

Per quanto riguarda gli altri fattori di rischio presi in considerazione, il livello di inurbamento del sito non è risultato in alcun modo determinante, evidenziando come siti isolati non siano diversamente a rischio rispetto a quelli localizzati in piccoli agglomerati periurbani o rurali (nello studio nessun sito si trovava in aree pienamente urbane). Per quanto riguarda il numero e la tipologia di specie animali presenti sono risultati significativi o vicini alla significatività la presenza di più specie di animali esca ed in particolare di animali da cortile, come volatili e conigli. Questi aspetti sembrano evidenziare come la tipologia di sito maggiormente adatto sia quella riconducibile ad una situazione definita come 'fattoria': vecchie strutture rurali con presenza di stalle in muratura, svariate specie animali (tra cui quelle da cortile), ma con limitata numerosità degli stessi. Questa impressione è confermata dall'esperienza di monitoraggio sul campo svolta nei tre anni; infatti, anche in località caratterizzate da condizioni climatiche ed orografiche simili e situate vicine tra loro, si sono riscontrate forti differenze nelle densità dei flebotomi, tra siti di cattura con le caratteristiche sopradescritte e siti di cattura ascrivibili ad altre categorie (abitazioni con giardino, allevamenti intensivi, ambienti selvatici). Ad ogni modo, questi aspetti sono risultati meno determinanti per la presenza/abbondanza dei flebotomi, rispetto all'altitudine, quindi, all'unico fattore di rischio considerato nell'analisi, prettamente ambientale.

Un altro dato interessante, è stato il riscontro, in alcune aree, di densità dei vettori paragonabili ed in alcuni casi superiori, a quelle delle aree tradizionalmente endemiche del centro-sud Italia. La densità media di *P. perniciosus* in alcuni siti delle Province di Padova, Verona e Treviso è risultata simile a quella registrata in un'area della Campania (Rossi *et al.*, 2007), in due aree endemiche in Puglia (Tarallo *et al.*, 2010) e in un'area in Provincia di Roma (Rossi *et al.*, 2008). In queste Province, infatti, sono presenti i principali focolai autoctoni di leishmaniosi canina del Triveneto. Alcuni siti presenti in queste zone, inoltre, hanno fatto registrare densità annuali e picchi stagionali, ben superiori a questi valori: in particolare in un sito localizzato sui Colli Euganei, dove è presente un focolaio stabile di Lcan, sono state registrate densità annuali superiori a 70 flebotomi/m<sup>2</sup> (Signorini *et al.*, 2010). Queste evidenze rimarcano l'importanza degli studi entomologici per individuare le aree a maggior rischio di diffusione della malattia e improntare di conseguenza interventi

tempestivi di profilassi sulla popolazione canina, che possono dimostrarsi molto efficaci nelle aree di nuova introduzione (allegato 2).

## **4.2 Analisi ecologica e modelli di distribuzione di specie**

La finalità principale dello studio era rivolta ad identificare i fattori ambientali e climatici favorevoli alla presenza di *P. perniciosus* e più in generale dei flebotomi, nell'area di studio, per delinearne la loro potenziale distribuzione geografica, con lo scopo di costruire un valido strumento da utilizzare nella pianificazione degli interventi di sorveglianza.

Come in precedenza descritto, i dati disponibili, relativi alle catture entomologiche presentavano caratteri di disomogeneità, poiché condotti senza un disegno sperimentale di campionamento indirizzato esclusivamente a questo scopo. L'utilizzo di trappole con capacità attrattiva differente, le intensità di cattura non uniformi, ad esempio, rendevano i dati di assenza registrati incerti e quelli di presenza poco comparabili. Questi aspetti di criticità sono stati superati grazie alla scelta di un algoritmo di modellazione (MaxEnt) che utilizza solo record di presenza e che meglio si adatta all'uso di dati raccolti in maniera non standardizzata, rispetto ad altri approcci. In entrambi i modelli non sono stati impiegati per la modellazione valori di densità o abbondanza e in quello più restrittivo, relativo a *P. perniciosus*, sono stati classificati come record positivi solo quei siti di cattura dove erano stati trovati almeno tre esemplari. Questo valore, in base agli elementi disponibili, garantiva una maggiore sicurezza del dato, senza diminuire troppo la numerosità campionaria.

E' opportuno sottolineare quanto la scelta del modello sia da calibrare ai dati disponibili oltre che agli obiettivi dello studio. Certamente, avendo effettuato il campionamento in alcuni siti utilizzando solo *sticky traps* e con bassa intensità di cattura, è verosimile che i risultati del monitoraggio entomologico non descrivano in maniera rigorosa l'effettiva distribuzione del vettore, ma questo è un fattore comune e difficilmente superabile negli studi entomologici non sperimentali.

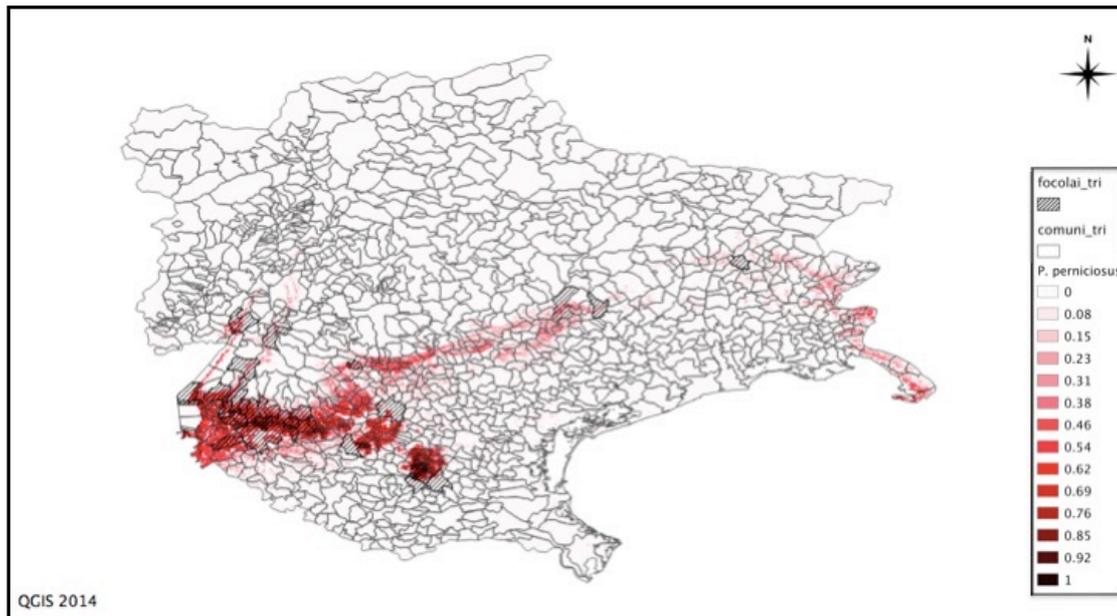
Uno dei problemi principali del modello elaborato è legato al fatto che i dati provengono da catture effettuate nell'arco di molti anni, durante i quali non è da escludere un cambiamento nella distribuzione della specie. Per ovviare a ciò sarebbe

più corretto utilizzare dati provenienti da monitoraggi condotti in maniera standardizzata e in un lasso di tempo delimitato.

Un altro punto critico è quello relativo alla scelta della scala sia spaziale (di 1 Km, con l'esclusione della variabile di uso del suolo) che temporale (per quanto riguarda l'NDVI e le temperature al suolo e la variabile relativa alle precipitazioni) dei dati ambientali utilizzati. Questi aspetti rendono le stesse variabili meno indicative per una caratterizzazione chiara degli *habitat* idonei alla specie. Utilizzare dati ambientali a maggiore risoluzione, sia temporale che spaziale, permetterebbe di rilevare con maggiore precisione gli *habitat* favorevoli al vettore, in un territorio così frammentato dal punto di vista orografico, come quello oggetto dello studio e permetterebbe di utilizzare variabili più significative per la biologia degli insetti, come i gradi-giorno (Neteler *et al.*, 2011). Nel caso del presente studio, comunque, costruito su scala regionale, le variabili utilizzate si sono dimostrate in grado di circoscrivere bene la distribuzione.

Infine, un ultimo aspetto da rilevare è quello relativo alla validazione che dovrebbe essere svolta con una serie di dati indipendenti provenienti da luoghi diversi da quelli usati per sviluppare il modello, per ottenere una stima rigorosa del suo potere predittivo. Questi dati al momento dello studio non erano disponibili.

Il modello ha mostrato comunque di adattarsi bene ai dati e la distribuzione di probabilità prodotta, basandosi anche su altri elementi disponibili, ha caratterizzato correttamente le aree potenzialmente idonee alla specie. Infatti, come evidenziato nella figura 23, si può rilevare una certa corrispondenza della predizione con i principali focolai di leishmaniosi canina segnalati in Triveneto, che corrispondono generalmente, ad aree con una densità vettoriale medio-alta. Inoltre, sono stati individuati *habitat* idonei, oltre che in prossimità dei principali focolai (area ai piedi dei Colli Berici e nella parte a sud del lago di Garda), anche nella Provincia di Trieste, nella quale era stato riscontrato *P. perniciosus* da Biocca e collaboratori (1977); non si dispone di informazioni sulla sua distribuzione attuale in quest'area. Non bisogna dimenticare che nel caso di specie non molto mobili, come i flebotomi, un'area idonea alla loro sopravvivenza e stabilizzazione potrebbe non essere comunque occupata, per motivi legati, ad esempio, alla presenza di barriere geografiche o perché non ancora colonizzata o per la presenza di altri fattori antropici limitanti, non considerati nel presente modello.



**Figura 23:** modello di distribuzione della specie *P. perniciosus* e Comuni con casi autoctoni di Lcan presenti in Triveneto.

In definitiva, confrontando i due modelli prodotti, si può osservare come quello relativo a *P. perniciosus* individui le aree maggiormente idonee, mentre quello relativo ai flebotomi possa rappresentare la potenziale massima distribuzione di questo gruppo di insetti nell'area di studio. Le due mappe risultanti dai modelli (fig. 15 e 16) non si differenziano in modo sostanziale, ma ad esempio, nel caso del modello più ampio, le zone intorno a Bolzano sono risultate idonee, anche se minimamente. Questo esito è in accordo con una recente indagine che, su 36 siti monitorati lungo la Val d'Adige (Provincia di Bolzano), ha trovato solo 4 siti positivi ai flebotomi (Morosetti *et al.*, 2009).

In aggiunta alla corrispondenza tra aree a rischio ed aree con focolai di leishmaniosi, il modello sembra descrivere bene le caratteristiche ecologiche che influenzano i flebotomi, dal momento che i parametri di massima idoneità identificati dalle curve di risposta sono in accordo con i dati di letteratura e con quanto risultato dalle analisi relative ai fattori di rischio ed ecologici. L'altitudine si è confermata essere la variabile più importante per la modellazione e la probabilità di presenza massima è stata registrata all'incirca tra i 100 e 300 m, confermando i risultati ottenuti dall'analisi dei dati di campo. La temperatura media notturna invernale, che potrebbe essere considerata un fattore limitante la sopravvivenza degli stadi larvali in diapausa, ha ottenuto un alto potere predittivo e il valore di temperatura limite al di sotto del

quale non sono state predette presenze è stato  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Anche la temperatura media diurna estiva, in relazione alla biologia della specie, può essere considerata un parametro importante per il compimento del ciclo vitale degli adulti e il *range* nel quale è stata registrata la maggior probabilità di presenza è stato tra i  $25$  e i  $33\text{ }^{\circ}\text{C}$  e la temperatura limite al di sotto della quale non sono state predette presenze  $16,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , valori che confermano i dati sperimentali (Theodor, 1936; Dalmatova e Demina, 1968; Maroli *et al.*, 1983, 1987). E' interessante notare, inoltre, che le diverse temperature notturne sono risultate come i fattori con la maggiore capacità predittiva, nell'elaborazione dei modelli condotta utilizzando una singola variabile alla volta, risultato che per la biologia dei vettori, potrebbe essere legato alla sopravvivenza/sviluppo dall'autunno alla primavera degli stadi larvali e in estate degli adulti (attivi di notte).

Per quanto riguarda l'NDVI, dai risultati ottenuti, i flebotomi sembrano prediligere aree maggiormente coperte da vegetazione; inoltre l'alto potere predittivo ottenuto dall'NDVI invernale anche in questo caso potrebbe essere legato alla sopravvivenza delle larve, essendo questo fattore correlato positivamente all'umidità del suolo.

Per quanto riguarda le ultime due variabili prese in considerazione sono da evidenziare alcuni punti critici: nel caso delle precipitazioni medie del trimestre più caldo è importante tenere presente che rappresentano la media di dati raccolti in 50 anni; questa variabile, di conseguenza, potrebbe non risentire di eventuali variazioni o *trend* intervenuti negli ultimi anni e pertanto non essere la più indicata nell'individuare le condizioni ottimali ai vettori al momento attuale. Ad ogni modo i risultati mostrano come i flebotomi sembrano prediligere *habitat* non eccessivamente piovosi. Alle latitudini dell'area di studio questi coincidono maggiormente con le aree collinari e pedecollinari, rispetto a quelle montane. Questa variabile comunque ha ottenuto un buon potere predittivo per i modelli e soprattutto per quelli elaborati utilizzando i dati di *test*, motivo per cui potrebbe essere un parametro importante da inserire nel caso si volesse estrapolare il modello ed estenderlo ad altre aree geografiche. La Corine Land Cover non ha caratterizzato precisamente gli *habitat* adatti ai flebotomi, ma ciò probabilmente dipende dalla scelta di utilizzare come livello gerarchico principalmente quello superiore, che non differenzia bene le diverse caratteristiche di uso del suolo che potrebbero influenzare maggiormente i vettori a questa scala. Ad esempio, la classe "territori boscati ed aree seminaturali" comprende indifferentemente aree di collina e di montagna, con caratteristiche climatiche tra loro

completamente diverse, con conseguente diversa idoneità per i flebotomi. Queste caratteristiche si riflettono sicuramente in una composizione vegetale differente, ma questa specificità è contenuta solo in livelli gerarchici più bassi della classificazione del Corine Land Cover, che si è preferito non inserire nel modello.

In definitiva, si può affermare che il modello ha mostrato un alto valore predittivo. Gli alti valori di sensibilità e di potere predittivo negativo, evidenziati dai test di validazione basati sulla *confusion matrix*, indicano inoltre, che il modello è particolarmente efficace nell'identificare correttamente le presenze osservate e le aree non idonee al vettore. Il campo di variazione delle variabili utilizzate e dei *record* di presenza (concentrati maggiormente attorno ad alcune zone), probabilmente, rende tale modello poco esportabile in altre aree. La scelta dei parametri ambientali inclusi nel modello sembra comunque aver dato buoni risultati e potrebbe essere confermata sviluppando nuovi modelli di più ampio respiro, ad esempio, allargando l'area di studio all'intero nord Italia. Nella prospettiva di realizzare una simile operazione, sarebbe comunque opportuno includere tra i dati di *training* ulteriori siti di presenza riferiti alle nuove aree, anche in considerazione di alcune differenze già emerse, ad esempio tra i *range* altitudinali ottimali riscontrati nel presente studio e in un analogo studio condotto in Italia nord-occidentale (Vesco, 2005).

## 5 Considerazioni conclusive

Nell'ultimo ventennio, le malattie trasmesse da vettori, hanno riacquisito rilevanza in Sanità Pubblica ed esistono diversi esempi, nel nostro Paese, che confermano quanto sia importante attuare azioni di controllo tempestive per limitare i rischi legati alla loro diffusione, anche per l'uomo: il progressivo stabilizzarsi della leishmaniosi canina nel nord del Paese, il focolaio endemico di Chikungunya in Provincia di Ravenna verificatosi nel 2007, la crescente espansione del virus della West Nile riscontratasi dal 2008 e la nuova introduzione di una zanzara esotica, *Aedes koreicus*, in Veneto nel 2011, provato o sospetto vettore di pericolosi agenti patogeni, sono alcuni degli esempi in merito (Rezza *et al.*, 2007; Maroli *et al.*, 2008; Montarsi *et al.*, 2013; Mulatti *et al.*, 2013).

L'utilizzo degli strumenti GIS, delle tecniche di analisi spaziale e di modelli

predittivi, basati sul *remote sensing* dei dati ambientali, stanno contribuendo al potenziamento delle attività di sorveglianza epidemiologica e degli studi ecologici relativi ai vettori, a livello globale. Ad oggi, nel nostro Paese, sono ancora pochi, comunque, i lavori che hanno utilizzato questa tipologia di approcci modellistici per lo studio della leishmaniosi canina e dei suoi vettori. Riteniamo, invece, alla luce del presente studio, che sia importante integrare le tradizionali azioni di sorveglianza con tali tecnologie e approcci statistici, poiché permettono, attraverso l'approfondimento delle conoscenze ecologiche dei vettori, l'identificazione dei fattori di rischio e la mappatura della loro potenziale distribuzione spaziale.

In queste attività di ricerca è fondamentale ottimizzare le risorse, finanziarie e umane, destinate agli imprescindibili interventi di monitoraggio entomologico ed epidemiologico e ciò è particolarmente utile in tempi di scarsità di fondi destinati a tali scopi, come quello attuale. E' da sottolineare, infatti, che gli strumenti impiegati in questo studio non hanno richiesto investimenti economici rilevanti.

Un possibile sviluppo futuro della ricerca potrebbe consistere nell'affinare la metodologia utilizzata, attuando un preliminare monitoraggio più mirato ed inserendo come predittori nel modello, variabili a maggiore risoluzione spaziale e dati di temperatura e NDVI, relativi alle stagioni (autunnale, invernale) precedenti alla stagione di attività dei flebotomi, per produrre previsioni sulla loro potenziale distribuzione, nel breve periodo e con maggiore accuratezza. Tale approccio è stato suggerito per *Aedes albopictus* da Neteler e collaboratori (2011).

Al contempo, come precedentemente accennato, potrebbe essere interessante esportare il modello a tutto il Territorio dell'Italia settentrionale e verificarne il potere predittivo al di fuori dell'area di studio.

I risultati ottenuti dal monitoraggio entomologico condotto dal 2001 al 2012, possono essere considerati una buona sintesi della situazione relativa alla distribuzione dei flebotomi e del principale vettore di leishmaniosi canina, in Triveneto e le analisi relative ai fattori di rischio di campo ed ecologici, una solida base scientifica per impostare, nel prossimo futuro, indagini più specifiche.

Ci sembra di poter affermare che il lavoro si prospetta, quindi, una volta affinato, come un valido strumento per indirizzare i monitoraggi entomologici e gli *screenings* sulla leishmaniosi canina, per comprendere meglio l'influenza dell'ambiente sulla sua epidemiologia, ad integrazione delle azioni di sorveglianza.

## **Allegato 1**

## Comparative field study to evaluate the performance of three different traps for collecting sand flies in northeastern Italy

M. Signorini<sup>1</sup>✉, M. Drigo<sup>1</sup>, F. Marcer<sup>1</sup>, A. Frangipane di Regalbono<sup>1</sup>, G. Gasparini, F. Montarsi<sup>2</sup>, M. Pietrobelli<sup>1</sup>, and R. Cassini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Medicine, Production and Health, University of Padova, Legnaro (PD), Italy, manuela.signorini@studenti.unipd.it

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), Italy

Received 25 June 2013; Accepted 25 Aug 2013

**ABSTRACT:** Three standard methods for collecting sand flies (sticky trap, CDC light trap, and CO<sub>2</sub> trap) were compared in a field study conducted from June to October, 2012, at a site located in the center of a newly established autochthonous focus of canine leishmaniasis in northeastern Italy. Six traps (two sticky traps, two CDC light traps, and two CO<sub>2</sub> traps) were activated at the same time for a single night every two weeks during the season of sand fly activity. A total of 5,667 sand flies were collected and 2,213 identified, of which 82.1% were *Phlebotomus perniciosus*, 17.4% *P. neglectus*, 0.3% *Sergentomya minuta*, and 0.2% *P. mascitti*. The performances of all traps were influenced by their position inside the site, increasing with proximity to the animal shelters. CO<sub>2</sub> traps were more attractive for females of *P. perniciosus* and *P. neglectus*. CDC light traps showed an intermediate efficiency and were more attractive for *P. neglectus*, compared to other two traps. Results suggest that in northern Italy the CO<sub>2</sub> trap is a suitable sampling method for sand fly monitoring programs that include transmitted pathogen surveillance. *Journal of Vector Ecology* 38 (2): 374-378. 2013.

**Keyword Index:** *Phlebotomus mascitti*, *Phlebotomus neglectus*, *Phlebotomus perniciosus*, sampling methods, sex ratio, Italy.

### INTRODUCTION

Over the last decades there has been a significant resurgence and northward spread of sand flies and sand fly-borne diseases in Europe (Dujardin et al. 2008, Maroli et al. 2013), where sand flies of the genus *Phlebotomus* are vectors of *Leishmania infantum*, the causative agents of canine leishmaniasis (CanL), cutaneous and visceral zoonotic human leishmaniasis, and viral diseases (Tesh et al. 1976, Maroli et al. 2013). The increase in sand flies and sand fly-borne diseases can be due mainly to ecological and climatic changes (Fisher et al. 2011) and to the increases in human migration, movement of infected dogs, and trends of globalization (Ferroglio et al. 2005, Aspöck et al. 2008, Otranto et al. 2009, Maroli et al. 2013). In order to prevent the emerging risk of increasing sand fly distribution and density, and to develop methods for sand fly control, a correct approach to surveillance is necessary in Europe. A uniform method of collection is necessary to generate comparable entomological data, to understand vector ecology, and to obtain an improving knowledge of their bionomics and distribution. Several studies aiming to compare different sampling methods have been implemented for these goals (Kaul et al. 1994, Kasap et al. 2009, Kasili et al. 2009). The most commonly used methods to capture sand flies are sticky traps (non-attractant traps, consisting of paper impregnated with castor oil, useful to establish the density and seasonal trend of sand flies in an area), Centers for Disease Control (CDC) light traps, and CO<sub>2</sub> traps (suction traps that use a light source or dry ice as bait, respectively)

(Alexander 2000). This paper describes a field study designed to test the different efficiency of these three traps, currently and routinely used in sand fly monitoring programs, and to evaluate which of these sampling devices should be used, according to the specific objectives of each entomological sampling program.

### MATERIALS AND METHODS

#### Study area

The field study was conducted in one site (N 45.24942, E 11.67343) located in Calaone village (municipality of Baone), in the southern Colli Euganei, an isolated hilly area of the Province of Padova, in the central part of the Veneto Region (northeastern Italy). This site, at an altitude of 178 m above sea level (a.s.l.), was selected due to the evidence that Calaone village is located in the center of a newly established autochthonous focus of CanL in Colli Euganei area (Cassini et al. 2013) and that this specific site showed a high sand fly density.

Furthermore, environmental parameters (typical sub-Mediterranean climate) and the structure of the site area, such as the presence of different species of domesticated animals, animal shelters, soil rich in organic material, and dry walls with cracks and crevices, created the essential characteristics for sand fly resting and breeding sites (Killick-Kendrick 1999, Feliciangeli 2004).



Figure 1. CO<sub>2</sub> gas trap (A), CDC light trap (B), and sticky trap (C: one trap is composed of ten papers) at collection points in the study site.

### Trapping methods

Sand fly trapping was conducted during the active season (from 15<sup>th</sup> June to 3<sup>rd</sup> October, 2012), using six traps of three different types (two sticky traps, two CDC light traps, and two CO<sub>2</sub> traps): sticky traps (each one composed of ten papers 20x20 cm coated with castor oil), CDC light traps (Bioquip Products, Rancho Dominguez, CA, U.S.A.), and CDC-CO<sub>2</sub> traps (Byblos, Cantù, CO, Italy) filled with 1 kg dry ice (Figure 1). All traps were activated simultaneously, from 19:00 to 07:00, for a single night every two weeks. Captures were repeated for nine nights. Each trap was hung at a height of approximately 1.5 m above the ground. Figure 2 shows the position of the traps and animal shelters. Traps of the

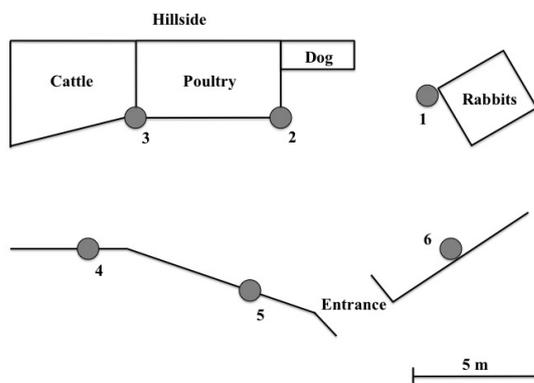


Figure 2. Design of the study site with the position of traps and animal shelters.

same type were located one in front of the other, near and far from the animal shelter (position 1 and 6), approximately 5 m distant. Therefore, for each capture, three traps were arranged near the animal shelters and three distant. The trap positions were changed every sampling day: the traps in positions 1 and 6 were moved toward positions 2 and 5; the traps located in places 2 and 5 moved toward positions 3 and 4; and the traps in places 3 and 4 moved toward positions 1 and 6. Collected specimens were identified and stored in 70% ethanol. At the end of the field trial, sand flies were mounted in Hoyer's medium and observed by microscopy for gender separation and identification up to species level, according to morphological features (Romi et al. 1994).

### Statistical analysis

Data on the total number of sand flies captured for each night and each trap were log-transformed to ensure normality (Shapiro-Wilk test), and Levene's test was implemented to check homogeneity of variances among groups. The analysis of variance was conducted with a two-way ANOVA, to assess the effect of type of trap (sticky, CDC light, CO<sub>2</sub> traps) and location (near or far from animal shelters) on the number of sand flies collected.

In order to estimate the number of different species and sex ratio of sand flies collected, a representative number of specimens (at least 100 sand flies) was identified for each sample (sample=total number of sand flies collected in one trap during one capture night). The total numbers of different species and the number of males and females for each species were estimated, applying the ratio among the identified specimens to the total number of sand flies collected for each sample (one trap/night). The effect of the type of trap on the species collected and sex within species captured was evaluated, comparing the relative abundance obtained from the sum of all the captures using the Pearson chi-square test.

### RESULTS

A total of 5,667 sand flies was collected. Table 1 shows the total number of sand flies collected by the three traps, in relation to the position. Approximately, 66.7% of the phlebotomine fauna was collected by CO<sub>2</sub> traps, 24.8% using CDC light traps, and 8.4% with sticky traps. The two-way ANOVA highlighted a significant difference among the performances of the three different sampling methods ( $F=4.214$ ;  $DF=2$ ;  $p=0.021$ ), and also the position (near or far from animal shelters) significantly influenced ( $F=7.865$ ;  $DF=1$ ;  $p=0.007$ ) the number of captured sand flies. The interaction effect was not statistically significant ( $F=0.772$ ;  $DF=2$ ;  $p=0.468$ ). Estimated marginal means are reported in Table 2.

Of the collected sand flies, a total of 2,213 specimens was identified. Among identified phlebotomine fauna, *Phlebotomus perniciosus* (Newstead 1911) was found to be the most abundant species ( $n=1,816$ ; 82.1%), followed by *P. neglectus* (Tonnoir 1921) ( $n=386$ ; 17.4%), *Sergentomya minuta* (Rondani 1843) ( $n=6$ ; 0.3%), and *P. mascitti* (Grassi 1908) ( $n=5$ ; 0.2%). Concerning these last two species, only

Table 1. Sand flies collected by sticky, CDC, and CO<sub>2</sub> traps, according to their position.

Traps	Distance to animal shelters	Captures (n)	Sand flies collected (n)	Median	Min	Max
Sticky	nearby	9	442	46	2	115
	far away	9	34	3	1	12
	Total	18	476	5.5		
CDC	nearby	8*	978	98.5	1	259
	far away	8*	431	26	1	160
	Total	16	1,409	60		
CO <sub>2</sub>	nearby	8*	3,227	174	1	1,252
	far away	9	555	53	2	169
	Total	17	3,782	72		
Total		51	5,667	41		

\*The trap failed to work on one night.

Table 2. Estimated Marginal Means of two-way ANOVA.

Position	Type of trap	n	Mean	Std. Error	95% C.I.
Nearby	Sticky	9	3.2940	0.5998	2.0859 to 4.5020
	CDC	8	3.8193	0.6362	2.5380 to 5.1006
	CO <sub>2</sub>	8	4.4604	0.6362	3.1791 to 5.7417
Far away	Sticky	9	1.0319	0.5998	-0.1761 to 2.2400
	CDC	8	3.0333	0.6362	1.7520 to 4.3146
	CO <sub>2</sub>	9	3.2614	0.5998	2.0534 to 4.4695

Table 3. Comparison between relative abundance of *P. perniciosus* and *P. neglectus*, according to the type of trap.

Species	Sticky N (%)	CDC N (%)	CO <sub>2</sub> N (%)	$\chi^2$	p-value
<i>P. perniciosus</i>	414 (87.5%)	1,038 (73.9%)	3,342 (89.3%)	770.80	<0.001
<i>P. neglectus</i>	59 (12.5%)	366 (26.1%)	401 (10.7%)		
TOTAL	473	1,404	3,743		

Table 4. Comparison between relative abundance of male and female *P. perniciosus* and *P. neglectus*, according to the type of trap.

	Sex	Sticky N (%)	CDC N (%)	CO <sub>2</sub> N (%)	$\chi^2$	p-value
<i>P. perniciosus</i>	male	355 (85.7%)	863 (83.1%)	2,160 (64.6%)	171.23	<0.001
	female	59 (14.3%)	175 (16.9%)	1,182 (35.4%)		
	TOTAL	414	1,038	3,342		
<i>P. neglectus</i>	male	53 (89.8%)	290 (79.2%)	125 (31.2%)	208.18	<0.001
	female	6 (10.2%)	76 (20.8%)	276 (68.8%)		
	TOTAL	59	366	401		

females of *P. mascitti* were captured, three by CO<sub>2</sub> traps and two by CDC light traps, whereas *S. minuta* specimens (four males and two females) were caught by all types of trap. Of the identified flies, 1,573 (71%) were male and 640 (29%) female, for a sex ratio male/female of 2.46.

The trap efficiency for species and sex was compared only between *P. perniciosus* (estimated n=4,794) and *P. neglectus* (estimated n=826), because they represented the only two species with a significant abundance. Tables 3 and 4 show the relative abundance of these two species and inside each species for male and female with respect to the type of traps.

The CDC light trap was more efficient in capturing *P. neglectus* (p<0.001) compared to other traps, whereas the CO<sub>2</sub> trap was more attractive for females of both species (p<0.001).

#### DISCUSSION

The sticky trap, CDC light trap, and CO<sub>2</sub> trap are three standard methods for collecting adult sand flies during their periods of activity (Alexander 2000). Our study confirms that these traps differ in performance and that the CO<sub>2</sub> trap is more effective than the sticky trap in collecting sand flies and, at the same time, very similar in estimating the species composition (Veronesi et al. 2007, Kasap et al. 2009). The CDC light trap has an intermediate efficiency, which agrees with previous studies (Kasap et al. 2009). Besides, this trap is more attractive than the other two traps for *P. neglectus*, resulting in a different description of the species composition. This result may suggest a strong phototropism of this sand fly species.

Species with very low abundance, such as *P. mascitti*, may be difficult to detect using only non-attractive traps. In our case, this species was not captured by sticky traps. To our knowledge, this is the first report of *P. mascitti* in northeastern Italy. Furthermore, the study showed that all trap performances were affected by proximity to the animal shelters and, more generally, by the exact position chosen by the operator inside the site structures.

The overall percentage of male sand flies recorded (71%) during the study period is consistent with other published data (Reza and Mansour 2006, Kasap et al. 2009) and may be due to the 'lekking' behavior of the males (Killick-Kendrick 1999). However, this study showed a higher capacity of CO<sub>2</sub> traps to catch females of *P. perniciosus* and *P. neglectus* compared to the other two traps and agrees with previous studies (Maroli et al. 1997, Veronesi et al. 2007). It may represent an advantage for whenever sand fly monitoring associates the study of the ecological aspects with the detection of sand fly transmitted pathogens.

Although sticky traps constitute an inexpensive and simple method to randomly determine species composition and to provide more realistic estimation of sand flies densities than baited-traps (Alexander 2000), our study suggests that it may really be of low efficiency, mainly when the position chosen inside the site is not optimal. Out of a total of 5,667 sand flies captured by the six traps, only 34 were caught by the sticky trap located far away the animal shelters and therefore in the worse position. Besides, it is common knowledge

(Maroli et al. 1997, Alexander 2000) that these traps are ineffective under particular climate conditions of high relative humidity, wind, and rain. CDC light traps are commonly used, associated with sticky traps, for sand fly monitoring activity in northern Italy, since the discover of the northward spread of CanL (Maroli et al. 2008). CO<sub>2</sub> traps are normally used for adult mosquito trapping during entomological surveillance activity in the study area (Mulatti et al. 2012), and their use in sand fly captures was only recently proposed in the country (Veronesi et al. 2007). According to our study, both types of traps seem to be more effective than sticky traps in terms of the total number of sand flies collected. However, CDC light traps could influence the correct assessment of species composition, preferentially attracting phototropic species, whereas the CO<sub>2</sub> trap showed higher performance in capturing sand fly females.

In conclusion, our results suggest that CO<sub>2</sub> traps are suitable for entomological surveys in northern Italy. In fact, their capacity to detect the presence of sand flies at low densities and their higher attractiveness for females (transmitted pathogens are found only in females) represent an advantage in areas characterized by emerging circulation of the phlebotomine fauna and increasing presence of pathogens transmitted by sand flies.

#### REFERENCES CITED

- Alexander, B. 2000. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.* 14: 109-122.
- Aspok, H., T. Gerersdorfer, H. Formayer, and J. Walochnik. 2008. Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. *Wien. Klin. Wochenschr.* 120 (Suppl. 4): 24-29.
- Cassini, R., M. Signorini, A. Frangipane di Regalbono, A. Natale, F. Montarsi, M. Zanaica, M. Brichese, G. Simonato, S. Borgato, A. Babiker, and M. Pietrobelli. 2013. Preliminary study of the effects of preventive measures on the prevalence of Canine Leishmaniosis in a recently established focus in northern Italy. *Vet. It.* 49: 151-156.
- Dujardin, J.C., L. Campino, C. Canavate, J.P. Dedet, L. Gradoni, and K. Soteriadou. 2008. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1013-1018.
- Feliciangeli, M. D. 2004. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.* 18: 71-80.
- Ferroglio, E., M. Maroli, S. Gastaldo, W. Mignone, and L. Rossi. 2005. Canine leishmaniasis in Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1618-1620.
- Fischer, D., S. M. Thomas, and C. Beierkuhnlein. 2011. Modeling climatic suitability and dispersal for disease vectors: the example of a phlebotomine sandfly in Europe. *Procedia Environ. Sci.* 7: 164-169.
- Kasap, O. E., A. Belen, S. Kaynas, F.M. Simsek, L. Biler, N. Ata, and B. Alten. 2009. Activity patterns of sand fly (Diptera: Psychodidae) species and comparative performance of different traps in an endemic cutaneous leishmaniasis focus in Cukurova Plain, Southern Anatolia, Turkey.

- Acta Vet. Brno. 78: 327-335.
- Kasili, S., H. Kutima, C. Mwandawiro, P.M. Ngumbi, and C.O. Anjili. 2009. Comparative attractiveness of CO<sub>2</sub>-baited CDC light traps and animal baits to *Phlebotomus duboscqi* sandflies. *J. Vector Borne Dis.* 46: 191-196.
- Kaul, S.M., A.K. Khera, and D. Bora. 1994. A comparative study on the optimum time and method of collection of *Phlebotomus argentipes* and other sandflies. (Diptera: Psychodidae). *J. Commun. Dis.* 26: 172-176.
- Killick-Kendrick, R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17: 279-289.
- Maroli, M., M.D. Feliciangeli, and J. Arias. 1997. Metodos de captura, conservacion y montaje de los flebotomos (Diptera: Psychodidae). Documento OPS/HCP/HCT/95/97, Organizacion Panamericana de la Salud, Washington DC, USA.
- Maroli, M., L. Rossi, R. Baldelli, G. Capelli, E. Ferroglio, C. Genchi, M. Gramiccia, M. Mortarino, M. Pietrobelli, and L. Gradoni. 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Int. Hlth.* 13: 256-264.
- Maroli, M., M.D. Feliciangeli, L. Bichaud, R.N. Charrel, and L. Gradoni. 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.* 27: 123-147.
- Mulatti, P., L. Bonfanti, G. Capelli, K. Capello, M. Lorenzetto, C. Terregino, F. Monaco, G. Ferri, and S. Marangon. 2012. West Nile virus in north-eastern Italy, 2011: Entomological and equine IgM-based surveillance to detect active virus circulation. *Zoonosis Publ. Hlth.* 60: 375-382.
- Otranto, O., G. Capelli, and C. Genchi. 2009. Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniasis vs. dirofilariosis. *Parasit. Vectors* 2 (Suppl 1): S2 Available online: <http://www.parasitesandvectors.com/content/2/S1/S2>
- Reza, F.M. and N. Mansour. 2006. Entomological studies of *Phlebotomus papatasi* and *P. sergenti* (Diptera: Psychodidae) as vectors of cutaneous leishmaniasis in Shiraz, Iran. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.* 37: 115-117.
- Romi, R., C. Khoury, F. Bigliocchi, and M. Maroli. 1994. Schede guida su acari e insetti di interesse sanitario. *Rapp. ISTISAN.* 94/8: 33-42. Available online: [http://www.iss.it/binary/publ/cont/Pag21\\_47Rapp94\\_08.pdf](http://www.iss.it/binary/publ/cont/Pag21_47Rapp94_08.pdf)
- Tesh, R.B., S. Saidi, S.J. Gajdamovic, F. Rodhain, and J. Vesenjakh-Hirjan. 1976. Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 54: 663-674.
- Veronesi, E., R. Pilani, M. Carrieri, and R. Bellini. 2007. Trapping sand flies in the Emilia Romagna region of northern Italy. *J. Vector Ecol.* 32: 313-318.

## **Allegato 2**

# Preliminary study of the effects of preventive measures on the prevalence of Canine Leishmaniosis in a recently established focus in northern Italy

Rudi Cassini<sup>1</sup>, Manuela Signorini<sup>2</sup>, Antonio Frangipane di Regalbano<sup>2</sup>, Alda Natale<sup>3</sup>, Fabrizio Montarsi<sup>3</sup>, Mauro Zanaica<sup>4</sup>, Michele Brichese<sup>5</sup>, Giulia Simonato<sup>2</sup>, Serena Borgato<sup>6</sup>, Amira Babiker<sup>3</sup> & Mario Pietrobelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy  
rudi.cassini@unipd.it

<sup>2</sup> Department of Animal Medicine, Production and Health, University of Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy

<sup>4</sup> Local Health Unit, ULSS 17, Veneto Region, via G. Marconi 19, 35043 Monselice (PD), Italy

<sup>5</sup> Veneto Region, Animal Health Unit, Dorsoduro 3493, 30123 Venezia, Italy

<sup>6</sup> Veterinary practitioner, Cavalcavia Stati Uniti 14, 35127 Padova, Italy

## Keywords

Canine Leishmaniosis, Dog, Italy, *Leishmania infantum*, Preventive measures, Seroprevalence.

## Summary

Canine Leishmaniosis is endemic in Mediterranean areas, with a well-documented northward spread. The mass use of preventive measures against sandfly bites (collar and spot-on formulations) was tested in a small focus recently established in an isolated hilly area of north-eastern Italy (Colli Euganei). In 2006 and 2007, a total of 449 dogs living in the southern part of Colli Euganei were screened against *Leishmania infantum* using an immunofluorescence antibody test (IFAT), and 31 (6.9%) were seropositive. A risk factor analysis clearly described the focus as limited to a small village named Calaone. In 2010, 63 animals from Calaone were sampled and their owners interviewed to verify the effectiveness of the preventive measures. According to what reported by owners, dogs started to be protected in 2006 (66.7% dogs protected), and protection rate incremented (around 90%) during the subsequent years. The seroprevalence value (4.2%) of the youngest age class (<5 years) was significantly lower than other classes, demonstrating that animals born after 2006 had low probabilities of getting infected. Besides, seroprevalence value referred only to dogs living in Calaone was 32.4% (23/71) in 2006-2007 and 20.6% (13/63) in 2010, showing a decreasing trend. Although still preliminary, the results show high sensitization of dog owners and suggest that the mass use of collars and spot-on acts positively in reducing the circulation of *L. infantum*.

*Veterinaria Italiana* 2013, **49** (2), 157-161. doi: 10.12834/VetIt.2013.492.157.161

## Introduction

*Leishmania infantum* is considered an important and emerging zoonotic pathogen (17). It is the etiologic agent of Canine Leishmaniosis (CanL) and of cutaneous and visceral zoonotic Human Leishmaniasis (HumL) in Mediterranean areas. Canine Leishmaniosis is endemic along the Mediterranean coast, where its prevalence varies widely (1, 8, 18).

A northward spread of CanL in Italy is well documented (11) and there is a high risk of emergence in other parts of Europe further north (17). The massive use of sandfly bite preventive measures (e.g. deltamethrin- and imidacloprid 10%/flumethrin 4.5%-impregnated collars, and imidacloprid 10%/permethrin 50% in spot-on formulation) has been

shown to be one of the most effective systems in preventing CanL in dogs and reducing its incidence in endemic and hyper-endemic areas (6, 10, 14, 16). Although this approach has been extensively promoted also in newly established foci to control the spread of the parasite, no field studies have documented its effectiveness so far.

Many new autochthonous foci of CanL in northern Italy have been described since the 90s (15). Among these, a small focus was first suspected and then confirmed in a small village in the southern part of Colli Euganei, an isolated hilly area in the central part of the Veneto Region, north-eastern Italy. This study summarizes a 5-year surveillance activity and presents the preliminary results of a mass use of

sandfly bite preventive measures in controlling, and possibly eradicating, CanL from the area.

## Material and methods

### Study area

The first part of the study investigated the diffusion of *L. infantum* in southern Colli Euganei (Figure 1). The area presents unique climatic and environmental characteristics, which substantially differ from the surrounding plain. In particular, southern slopes are characterized by a Mediterranean climate.

The second part of the study was limited to Calaone, which is a small village located in Baone municipality, southern part of Colli Euganei (45°14'58"N-11°39'54"E). Calaone is the only village of the municipality located mostly 100 m above sea level (a.s.l.), with an average altitude of 223 m a.s.l. (range 74-377 m a.s.l.), and a predominant southern exposition. According to the local veterinary service office (ULSS 17) the registered Calaone dog population in 2010 consisted of 119 animals, with an estimated 5% of unregistered dogs.

### Field sampling

The first suspicion of the presence of *L. infantum* in the area was based on the report of one autochthonous case of CanL and on the presence of *Phlebotomus perniciosus* in Calaone village, documented in 2005 (3). The spread of CanL in the southern area of Colli Euganei was assessed in 2006 and 2007, when 245 and 229 dogs, respectively, were screened by serological tests (25 dogs were tested both years). Dog owners in Baone and surrounding hilly municipalities were invited to test their animals during a one-day sampling campaign organized on a free basis in the late May 2006 and in June 2007. Since the first

2006 campaign, dog owners had been invited to use preventive measures (collars or spot-on formulation) during the June-October period. Furthermore, an informative meeting was organized in October 2006 in Baone, aimed at increasing the public awareness of the disease and its prevention.

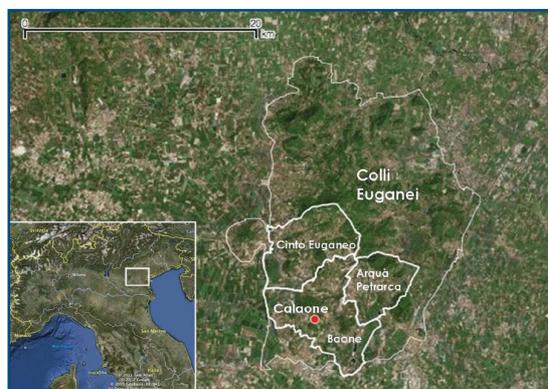
A new specific epidemiological survey, including queries about dog owners' use of preventive measures, was designed in 2010 to verify the effectiveness of the intervention promoted in Calaone village. A total of 63 animals were sampled and their owners interviewed on the use of preventive measures against sandfly bites during the previous years.

### Laboratory analyses

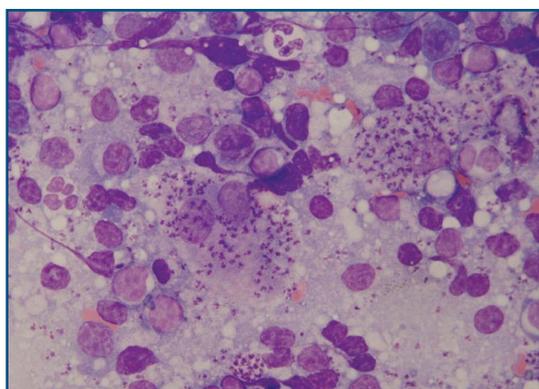
Blood samples were analysed using an immunofluorescence antibody test (IFAT) according to OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (13). Immunofluorescence antibody test serum titres  $\geq 1:40$  were considered positive and indicative of CanL exposure, i.e. a contact with an infected vector in the previous summer season. Whenever possible, aspirates from lymph nodes were collected from dogs positive at serological analysis, and cytological smears were stained using Diff-Quick® kit (Medion Diagnostics International Inc., Miami, FL, USA).

### Statistical analyses

Considering all dogs sampled in 2006 and 2007 ( $n = 449$ ; dogs tested both years were considered only once), a risk-factor analysis was performed to evaluate seroprevalence differences among sex, life style (companion animals; hunting dogs/watchdogs), age class (<5; 5-7; >7 years), municipality of origin (Arquà Petrarca; Baone; Cinto Euganeo), and altitude (plain: under 100 m a.s.l.; hill: above



**Figure 1.** Study area. Boundaries of municipalities involved in the study (thick white lines) and of Colli Euganei area (thin white lines).



**Figure 2.** Amastigotes in a positive lymph node aspirate collected from a dog living in Calaone stained using Diff-Quick® kit.

100 m a.s.l.). Sleeping outside at night, living with other dogs, and travelling to endemic areas were also investigated as possible risk factors. Differences in seroprevalence were first evaluated using univariate statistic, specifically Pearson's Chi-squared test or, when appropriate, Fisher's exact test. Statistical analyses were also performed considering positive animals with titres  $\geq 1:160$ , which is indicative of CanL infection (5). Moreover, the dataset of dogs was analysed by means of multivariate logistic regression model (9) to evaluate potential risk factors associated with *L. infantum* seroprevalence at different cut-off (1:40 or 1:160). Statistical analysis was performed using PASW Statistic 18 (SPSS Inc.).

Differences in seroprevalence among age classes (<5; 5-7; >7 years) of the dogs sampled in 2010 in Calaone village (n = 63) were evaluated using Pearson's Chi-squared test. Seroprevalence obtained in 2010 was compared to the values referred only to Calaone dogs and obtained from the dataset of 2006-2007 samples.

## Results

### Preliminary survey (years 2006-2007)

A total of 31 (6.9%) out of the 449 dogs tested were seropositive ( $\geq 1:40$ ). Nearly all positive dogs (n = 29) were from Baone municipality, and 24 lived

in Calaone village. Only one animal had history of travelling to an endemic area.

Most of the dog owners were not willing to let their dogs being checked by means of lymph nodes aspirates. Thus, only 4 dogs were sampled and 2 resulted positive, respectively with 1:320 and 1:160 titres at IFAT (Figure 2).

The results of univariate analysis are presented in Table I, whereas logistic regression model results are shown in Table II. Dogs living in hilly areas and particularly in Baone municipality and kept outside at night showed higher probability to be exposed to an infected sandfly bite.

### Epidemiological investigation in Calaone (year 2010)

Dog owners interviewed during the 2010 campaign reported that they had started using collars or spot-on formulations or both since 2006. At the beginning 66.7% (30/45) dogs resulted to be protected from sandfly bites. The percentage increased in subsequent years: 90.0% (45/50) in 2007, 91.1% (51/56) in 2008, and 88.9% (56/63) in 2009.

In 2010, 13 (20.6%) dogs, out of 63 investigated, resulted positive. Figure 3 shows the differences in age class seroprevalence values in 2010. The <5 age class presents a value (4.2%) significantly lower

**Table I.** *L. infantum* seroprevalence based on epidemiological data and significant statistical differences (years 2006-2007).

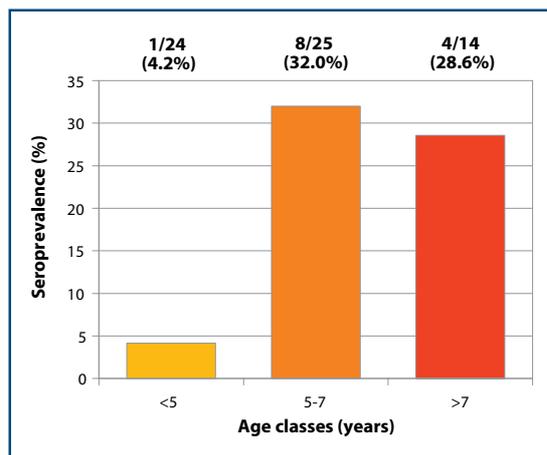
Factor	N	Exposure (1:40 cut-off)		Infection (1:160 cut-off)	
		Pos	Prev (%)	Pos	Prev (%)
Municipality	Arquà Petrarca	48	0	0.0	0.0
	Baone	242	29	12.0**	8.3**
	Cinto Euganeo	111	1	0.9	0.0
Altitude	Plain	273	6	2.2	0.7
	Hill	174	25	14.4**	10.3**
Night outdoor	No	131	6	4.6	0.8
	Yes	316	25	7.9	6.0*
Age class (years)	<5	185	12	6.5	4.9
	5-7	123	10	8.1	4.1
	>7	133	9	6.8	4.5
Sex	Male	246	16	6.5	4.1
	Female	199	15	7.5	5.0
Life style	Companion animals	278	17	6.1	3.6
	Hunting dogs/watchdogs	94	9	9.6	6.4
Living with other dogs	No	208	11	5.3	4.3
	Yes	238	20	8.4	4.6
Travels to endemic areas	No	413	30	7.3	4.8
	Yes	32	1	3.1	0.0

\*\* p<0.01; \* p<0.05.

**Table II.** Results of multivariate risk-factor analysis (years 2006-2007).

Factor	P value	Odds Ratio	95% C.I. for O.R.	
			Lower	Upper
Baone municipality	<0.001	8.718	3.181	23.890
Hilly area	<0.001	4.225	2.468	7.232
Night outdoor <sup>a</sup>	0.026	3.332	1.158	9.592

<sup>a</sup> Only dogs positive at IFAT >1:160.



**Figure 3.** Seroprevalence for *L. infantum* in different age classes (year 2010).

( $p < 0.05$ ) than other classes. In 2006-2007, 71 dogs out of the 449 sampled were from Calaone village, and 23 (32.4%) of these resulted positive at IFAT, at least at one sampling. The reduction of prevalence between 2006-2007 and 2010 was 11.8%.

### Discussion

The screening of dogs in 2006-2007 clearly demonstrated that a CanL focus has established in the southern part of Colli Euganei area. Provenances from a hilly area and from Baone municipality were identified as the two major risk factors, so confirming Calaone village as the centre of the focus. The lack of differences in seroprevalence values among age classes is indicative of a newly established infection in which old dogs have the same probability of getting infected as young animals. The CanL focus was therefore described as limited to Calaone village and recently established.

Dogs spending the night outdoor resulted at higher risk when using the 1:160 cut-off. This result suggests that also dogs kept inside during the night may have occasional contacts with infected sandflies, but sleeping outside is confirmed to be an important risk factor for the development of the infection and consequently of the disease (4, 12).

Although the results of the epidemiological study

conducted in 2010 to evaluate focus progression are still preliminary and affected by the limited size of the dog population sampled, they are encouraging.

Data on the use of sandfly bite preventive measures suggest that dog owners have been highly sensitized to the disease and are aware of the appropriate measures to control the infection.

The mass use of collars and spot-on products seems to act positively, considering the decreasing trend of the seroprevalence and the reduced number of seropositive dogs among young animals. In fact, seroprevalence in Calaone was reduced by one third in about three years. Furthermore, considering only animals sampled in 2010, the seroprevalence value of the youngest age class (up to 4 years old) is significantly lower than other classes, demonstrating that animals born after 2006, when the mass use of preventive measures started in the village, had clearly lower probabilities of being exposed to the parasite than older animals (Figure 3).

This focus, along with the numerous new foci of CanL detected in northern Italy (11, 14), confirm the expansion of *L. infantum* infection in this part of the country, which must now be considered endemic, at least in most of its hilly areas with Mediterranean climate. At present, only one autochthonous case of HumL has been documented in north-eastern Italy (7), but subclinical cases and the underestimation of HumL cases in official reports can conceal a higher circulation of the parasite in the human population, as it has been found in north-western Italy (2). The presence of areas with high prevalence and the geographic spread of the parasite among dog populations suggest that the risk to the human population may increase in the near future.

### Conclusions

The study describes the identification of a new autochthonous focus of CanL in a small village of a hilly area of northern Italy, previously considered free from the parasite. A prompt intervention to promote the use of sandfly bite preventive measures was implemented to stop the spread of the parasite and showed to be able to reduce the seroprevalence among dogs in the area. The results confirm that active CanL monitoring is a useful tool in alerting and preparing public health services, and that any action aimed at preventing the spread of CanL also contributes to lowering the risk for the human population.

### Acknowledgments

We thank Baone municipality personnel and private veterinary practitioners of the area for the collaboration.

## Grant support

This study was supported by a grant from the University of Padua (Project code CPDA083110) and by the Veneto Region.

## References

- Baneth G., Koutinas A.F., Solano-Gallego L., Bourdeau P. & Ferrer L. 2008. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*, **24**, 324-30.
- Biglino A., Bolla C., Concialdi E., Trisciuglio A., Romano A. & Ferroglio E. 2011. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of Northwestern Italy (Piedmont Region) where such infections are traditionally nonendemic. *J Clin Microbiol*, **48**, 131-136.
- Cassini R. 2008. Aspetti epidemiologici e rischi zoonosici delle malattie trasmesse da vettori: Babesiosi e Leishmaniosi in Italia Nord-Orientale. PhD thesis, University of Padova. ([http://paduaresearch.cab.unipd.it/794/1/Tesi\\_Dottorato\\_Cassini.pdf](http://paduaresearch.cab.unipd.it/794/1/Tesi_Dottorato_Cassini.pdf) accessed on 20/5/2013).
- Cortes S., Vazc Y., Nevesd R., Maia C., Cardoso L. & Campino L. 2012. Risk factors for canine leishmaniosis in an endemic Mediterranean region. *Vet Parasitol*, **189**, 189-196.
- Ferroglio E., Trisciuglio A., Gastaldo S., Mignone W. & Delle Piane M. 2002. Comparison of ELISA IFAT and Western blot for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog. *Parassitologia*, **44**, 64.
- Ferroglio E., Poggi M. & Trisciuglio A. 2008. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses Public Health*, **55**, 145-148.
- Gabrielli G.B., Zaia B., Stanzial A.M. & Corrocher R. 2001. Leishmaniosi viscerale: una malattia raramente diagnosticata nel nord Italia. Descrizione di un caso. *Annali Italiani di Medicina Interna*, **16**, 185-191.
- Gramiccia M. 2011. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol*, **181**, 23-30.
- Hosmer D.W. & Lemeshow S. 2000. Applied logistic regression, 2<sup>nd</sup> ed. Wiley, New York.
- Maroli M., Mizioni V., Siragusa C., D'Orazi A. & Gradoni L. 2001. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniosis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in Southern Italy. *Med Vet Entomol*, **15**, 358-363.
- Maroli M., Rossi L., Baldelli R., Capelli G., Ferroglio E., Genchi C., Gramiccia M., Mortarino M., Pietrobelli M. & Gradoni L. 2008. The northward spread of leishmaniosis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health*, **13**, 256-264.
- Martín-Sánchez J., Morales-Yuste M., Acedo-Sanchez C., Baron S., Diaz V. & Morillas-Marquez F. 2009. Canine Leishmaniosis in southeastern Spain. *Emerg Infect Dis*, **15**, 795-798.
- Office International des Épizooties: OIE (World Organisation for Animal Health). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008. Chapter 2.1.8. Leishmaniosis. ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.08\\_LEISHMANIOSIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.08_LEISHMANIOSIS.pdf) accessed on 20/05/2013).
- Otranto D., Paradies P., Lia R.P., Latrofa M.S., Testini G., Cantacessi C., Mencke N., Galli G., Capelli G. & Stanneck D. 2007. Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniosis in kennel dogs in an endemic area. *Vet Parasitol*, **144**, 270-278.
- Otranto D., Capelli G. & Genchi C. 2008. Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasite Vector*, **2**, S2. doi:10.1186/1756-3305-2-S1-S2.
- Otranto D., Dantas-Torres F., de Caprariis D., Di Paola G., Tarallo V.D., Latrofa M.S., Lia R.P., Annoscia G., Breitshwerdt E.B., Cantacessi C., Capelli G. & Stanneck D. 2013. Prevention of Canine Leishmaniosis in a Hyper-Endemic Area Using a Combination of 10% Imidacloprid/4.5% Flumethrin. *PLoS One*, **8**. doi: 10.1371/journal.pone.0056374.
- Ready P.D. 2010. Leishmaniosis emergence in Europe. *Euro Surveill*, **15**, pii=19505. (<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19505>).
- Solano-Gallego L., Koutinas A., Mirò G., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G. & Baneth G. 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, **165**, 1-18.

## BIBLIOGRAFIA

- Adler S., Theodor O. (1957) Transmission of disease agents by phlebotomine sandflies. *Annual Review Entomology*, **2**: 203-226
- Alcover M.M., Ballart C., Serra T., Castells X., Scalone A., Castillejo S., Riera C., Tebar S., Gramiccia M., Portús M., Gállego M. (2013) Temporal trends in canine leishmaniosis in the Balearic Islands (Spain): A veterinary questionnaire. Prospective canine leishmaniosis survey and entomological studies conducted on the Island of Minorca, 20 years after first data were obtained. *Acta Tropica*, **128** (3): 642-651
- Alexander B. (2000) Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, **14** (2): 109–22
- Alexander B., Maroli M. (2003) Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**: 1-18
- Antoniou M., Gramiccia M., Molina R., Dvorak V., Volf P. (2013) The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro Surveill*, **18** (30):pii=20540
- Araujo M.B., Rahbek C. (2006) How does climate change affect biodiversity? *Science*, **313**: 1396-1397
- Araujo M.B. (2007) Ensemble forecasting of species distributions. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**: 42-47
- Araujo M.B., Alagador D., Cabeza M., Nogues-Bravo D., Thuiller W. (2011a) Climate change threatens European conservation areas. *Ecology Letters*, **14**: 484-492

- Araujo M.B., Peterson T. (2012) Uses and misuses of bioclimatic envelope modelling *Ecology*, **93**(7): 1527-1539
  
- Aspöck H, Gerersdorfer T, Formayer H, Walochnik J (2008) Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. *Wiener klinische Wochenschrift*, **120**: 24-29. doi: 10.1007/s00508-008-1072-8.
  
- Auchincloss A. H., Samson Y. Gebreab S.Y, Christina Mair C., Ana V. Diez Roux A.V. (2012) A Review of Spatial Methods in Epidemiology, 2000–2010. *Annual Review Public Health*, **33**: 107-122. doi:10.1146/annurev-publhealth-031811-124655.
  
- Azar D.; Nel A. (2003) Fossil psychodoid flies and their relation to parasitic diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**: 35-7
  
- Bailey T. (2001) Spatial statistical methods in health. *Caderno de Saude Publica*, **17**(5): 1083–98
  
- Baldelli R., Battelli G., Maroli M., Mollicone E., Gudi A., Stegagno G., Tasini G. (2001) A new stable focus of canine leishmaniasis in northern Italy. *Parassitologia*, **43**: 151-153
  
- Ballart C., Alcover MM., Portus M., Gallego M. (2011a) Is leishmaniasis widespread in Spain? First data on canine leishmaniasis in the province of Lleida, Catalonia, northeast Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **106**:134-136
  
- Ballart C., Barón S., Alcover MM., Portus M., Gallego M. (2011b) Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: First finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*. *Acta Tropica*, **122**:155-159
  
- Beck L.R., Lobitz B.M., Wood B.L. (2000). Remote sensing and human health: new sensors and new opportunities. *Emerging Infectious Diseases*, **6**: 217-227

- Belen A., Alten B. (2011) Seasonal dynamics and altitudinal distributions of sand fly (Diptera: Psychodidae) populations in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Cukurova region of Turkey. *Journal of Vectors Ecology*, **36** (Suppl 1): S87-94. doi: 10.1111/j.1948-7134.2011.00116.x.
  
- Bergquist R., Rinaldi L. (2010) Health research based on geospatial tools: a timely approach in a changing environment. *Journal of Helminthology*, **84**: 1-11
  
- Berrahal F., Mary C., Roze M. (1996) Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **55**: 273-277
  
- Bettini S., Melis P. (1988) Leishmaniasis in Sardinia. Soil analysis of a breeding site of three species of sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, **2**: 67-71
  
- Bhunia G.S., Kesari S., Jeyaram A., Kumar V., Das P. (2010) Influence of topography on the endemicity of Kala-azar: a study based on remote sensing and geographical information system. *Geospatial Health*, **4**(2): 155-165
  
- Biglino A., Bolla C., Concialdi E., Trisciuglio A., Romano A., Ferroglio E. (2010) Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**(1): 131-136
  
- Biocca E., Coluzzi A., Costantini R. (1977) Osservazioni sulla attuale distribuzione dei flebotomi italiani e su alcuni caratteri morfologici differenziali tra le specie del sottogenere *Phlebotomus*. *Parassitologia*, **19**(1-2): 19-32
  
- Bogdan C.; Schonian G.; Banuls A. L.; Hide M.; Pratlong F.; Lorenz E.; Rollinghoff M.; Mertens R. (2001) Visceral leishmaniasis in a german child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, **32**(2): 302-306

- Bongiorno G., Habluetzel A., Khoury C., Maroli M. (2003) Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Tropica*, **88**(2): 109-116
  
- Bongiorno G., Habluetzel A., Traldi G., Maroli M. (2002) Notes on the sand fly fauna and their feeding habits from an inland focus of canine leishmaniasis in central Italy (Marche region). *Parassitologia*, **44**(Suppl 1): 23
  
- Bongiorno G., Paparcone R., Foglia Manzillo V., Oliva G., Cuisinier A.M., Gradoni L. (2013) Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs--a preliminary xenodiagnosis study. *Veterinary Parasitology*, **197**(3-4): 691-5. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.05.008.
  
- Bourdeau P. (2012) Elements pratiques du diagnostic de la leishmaniose canine. *Point Veterinaire*, **15**(72): 43-50
  
- Branco S., Alves-Pires C., Maia C., Cortes S., Cristovão J.M., Gonçalves L., Campino L., Afonso M.O. (2013) Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. *Acta Tropica*, **125**(3): 339-348
  
- Broennimann O., Treier U.A., Muller-Scharer H., Thuiller W., Peterson A. T., Guisan A. (2007) Evidence of climatic niche shift during biological invasion. *Ecology Letters*, **10**: 701-709
  
- Campbell-Lendrum, D., Pinto, M.C. & Davies, C. (1999) Is *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) more endophagic than *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) because it is more attracted to light? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **94**: 21-22
  
- Chamailé L., Tran A., Meunier A., Bourdoiseau G., Ready P., Dedet J. (2010) Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasites & Vectors*, **3**: 31, <http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/31>
  
- Capelli G., Baldelli R., Ferroglio E., Genchi C., Gradoni L., Gramiccia M., Maroli M., Mortarino M., Pietrobelli M., Rossi L., Ruggiero M. (2004)

Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network. *Parassitologia*, **46** (1-2): 193-197

- Cassini R., Pietrobelli M., Montarsi F., Natale A., Capelli G., Beraldo P., Sinigaglia A., Moresco G. (2007) Leishmaniosi canina in Triveneto: quali novità? *Il Progresso Veterinario*, **7**: 295-300
- Cassini R., Natale A., Pozzato N., Lorenzetto M., Capelli G. (2010) La progressione della leishmaniosi canina verso nord: una malattia da tenere sotto controllo. *Summa, Speciale Parassitologia*: 1-8
- Cassini R., Signorini M., Frangipane di Regalbono A., Natale A., Montarsi F., Zanaica M., Bricchese M., Simonato G., Borgato S., Babiker A., Pietrobelli M. (2013) Influenza delle misure preventive sulla prevalenza di leishmaniosi canina in un focolaio identificato in Nord Italia nel 2006. *Veterinaria Italiana*, **49**(2), 151-156. doi: 10.12834/VetIt.2013.492.151.156
- Colacicco-Mayhugh M.G., Masuoka P.M., Grieco J.P. (2010) Ecological niche model of *Phlebotomus alexandri* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the Middle East. *International Journal of Health Geographics*, **9**: 2
- Colwell D.D., Dantas-Torres F., Otranto D. (2011) Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. *Veterinary Parasitology*, **182**, 14-21
- Corradetti C., Spinelli G., Khoury C., Bianchi R., Maroli M. (2002) Prima indagine entomologica sulla presenza dei vettori di leishmaniosi in focolai campione della provincia di Perugia. Atti XIX Congresso Nazionale Italiano Entomologia, Catania, 10-15 giugno, 235
- Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Musella V. (2005) Disease mapping and risk assessment in veterinary parasitology: some case studies. *Parassitologia*, **47**: 9-25
- Cross E. R., Hyams K. C. (1996). The potential effect of global warming on the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. *Environmental Health Perspectives*, **104**(7): 724-7

- Cross E. R., Newcomb W. W., Tucker C. J. (1996). Use of weather data and remote sensing to predict the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **54**(5): 530-6
  
- Dalla Villa P., Ruggeri F. (1999) Situazione epidemiologica della leishmaniosi canina in provincia di Pescara. Atti Congresso di Igiene Urbana Veterinaria, Roma, 14-16 dicembre, 137
  
- Dash P., Gottsche F., Olesen F., Fischer H. (2001) Retrieval of Land Surface Temperature and Emissivity from Satellite Data: Physics, Theoretical Limitations and Current Methods. *Journal of the Indian Society of Remote Sensing*, **29**, No. 1&2
  
- De Oliveira E.F, Araújo e Silva E., Dos Santos Fernandes C.E., Paranhos Filho A.C., Macedo Gamarra R.M., Ribeiro A.A., Brazil R.P., De Oliveira A.G. (2012) Biotic factors and occurrence of *Lutzomyia longipalpis* in endemic area of visceral leishmaniasis, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **107**(3): 396-401
  
- Dereure J., Vanwambeke S. O., Malé P., Martinez S., Pratlong F., Balard Y., Dedet J. P. (2009) The Potential Effects of Global Warming on Changes in Canine Leishmaniasis in a Focus outside the Classical Area of the Disease in Southern France. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **9**(6): 687-694
  
- Devi P. M.; Manickiam B.; Balasubramanian S. (2003). Use of remote sensing and gis for monitoring the environmental factors associated with vector-borne disease (malaria). In Proceedings of the Third International Conference on Environment and Health. A cura di Bunch M. J., Madha Suresh V., Vasantha Kumaran T., pp. 127–137, Chennai, India. Department of Geography, University of Madras and Faculty of Environmental Studies, York University.
  
- Diekmann O., Heesterbeek J., Metz J. (1990). On the definition and the computation of the basic reproduction ratio  $R_0$  in models for infectious diseases in heterogeneous populations. *The Journal of Mathematical Biology*, **28**(4): 365-82

- Dolmatova A. V.; Demina N. A. (1968). Les Phlébotomes (Phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent. Relazione tecnica, Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer.
  
- Dougherty M.J., Guerin P.M., Ward R.D. (1995) Identification of oviposition attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae) in volatiles of faeces from vertebrates. *Physiological Entomology*, **20**: 23-32
  
- Dujardin J.C., Campino L., Canavate C., Dedet J.P., Gradoni L., Soteriadou K. (2008) Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis. *Europe Emerging Infectious Diseases*, **14**: 1013-1018
  
- Dye C. (1996) The logic of visceral leishmaniasis control. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **55(2)**: 125-30
  
- Elith, J., Graham C.H., Anderson R.P. Dudík M., Ferrier S., Guisan A., Hijmans R. J., Huettmann F., Leathwick J. R., Lehmann A., Li J. Lohmann, L. G. Loiselle, B. A. Manion G., Moritz C., Nakamura M., Nakazawa Y., Overton J. McC., Peterson A. T., Phillips S. J., Richardson K. S., Scachetti-Pereira R., Schapire R. E., Soberón J., Williams S., Wisz M. S., Zimmermann N. E. (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*, **29**: 129-151
  
- Elith J., Leathwick J.R. (2009) Species Distribution Models: Ecological Explanation and Prediction Across Space and Time. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **40**: 677-97
  
- Elith, J., Phillips S.J., Hastie T., Dudík M., Chee Y.E., Yates C.J. (2010). A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distribution*, **17**: 43-57
  
- EMA: EMA/CVMP/296057/2010 – EPAR – Public assessment report, CaniLeish Scientific discussion (2011) [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_Public\\_assessment\\_report/veterinary/002232/WC500104953.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Public_assessment_report/veterinary/002232/WC500104953.pdf)
  
- Farkas R., Tánzos B., Bongiorno G., Maroli M., Dereure J. (2011) First surveys to investigate the presence of canine leishmaniasis and its

phlebotomine vectors in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, **11**: 823-834. doi: 10.1089/vbz.2010.0186

- Feliciangeli, M.D. (2004) Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**: 71-80
- Ferrarese U., Natale A., Corradi S., Maroli M. (2004) Nuovi ritrovamenti di flebotomi (Diptera, Psychodidae) nella parte meridionale del Trentino. *Annali del museo civico di Rovereto*, **20**: 341-348
- Ferroglio E., Maroli M., Castaldo S., Trisciuglio A., Raimondo C., Veysendaz E., Saracco M., Rossi L. (2002) Survey of phlebotomine sandflies in North-West Italy. *Parassitologia*, **44**(Suppl 1): 68
- Ferroglio E., Maroli M., Gastaldo S., Mignone W., Rossi L. (2005) Canine leishmaniasis in Italy, *Emerging Infectious Diseases*, **11**: 1618-1620
- Ferroglio E., Poggi M., Trisciuglio A. (2008) Evaluation of 65% Permethrin Spot-on and Deltamethrin- impregnated Collars for Canine *Leishmania infantum* Infection Prevention. *Zoonoses Public Health*, **55**: 145-148
- Fielding A.H., Bell J.F. (1997) A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environmental Conservation*, **24**: 38-49
- Fischer D., Thomas S.M., Beierkuhnlein C. (2011a) Modelling climatic suitability and dispersal for disease vectors: the example of a phlebotomine sandfly in Europe. *Procedia Environmental Science*, **7**: 164-169
- Fischer D., Moeller P., Thomas S.M., Naucke T.J., Beierkuhnlein C. (2011b) Combining Climatic Projections and Dispersal Ability: A Method for Estimating the Responses of Sandfly Vector Species to Climate Change. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **5**(11): e1407. doi: 10.1371/journal.pntd.0001407.

- Fischer D., Thomas S.M., Beierkuhnlein C. (2010) Temperature-derived potential for the establishment of phlebotomine sandflies and visceral leishmaniasis in Germany. *Geospatial Health*, **5**: 59-69
  
- Foglia Manzillo V., Oliva G., Pagano A., Manna L., Maroli M., Gradoni L. (2006) Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Veterinary Parasitology*, **142**: 142-145
  
- Franklin J. (2009) Mapping Species Distributions: Spatial Inference and Prediction. Cambridge University Press. PART III, pp.: 105-205. Available at: [http://assets.cambridge.org/97805218/76353/frontmatter/9780521876353\\_frontmatter.pdf](http://assets.cambridge.org/97805218/76353/frontmatter/9780521876353_frontmatter.pdf)
  
- Freeman E., Moisen, G. (2008) A comparison of the performance of threshold criteria for binary classification in terms of predicted prevalence. *Ecological Modelling*, **217**: 48-58
  
- Gebre-Michael T., Malone J. B., Balkew M., Ali A., Berhe N., Hailu A., Herzi A. A. (2004). Mapping the potential distribution of *Phlebotomus martini* and *P. orientalis* (diptera: Psychodidae), vectors of kala-azar in east Africa by use of geographic information systems. *Acta Tropica*, **90**(1): 73-86
  
- Gillies M.T. (1980) The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera: Culicidae): a review. *Bulletin of Entomological Research*, **70**: 525-532
  
- Gkolfinopoulou K., Bitsolas N., Patrinos S., Veneti L., Marka A., Dougas G., Pervanidou D., Detsis M., Triantafyllou E., Georgakopoulou T., Billinis C., Kremastinou J., Hadjichristodoulou C. (2013) Epidemiology of human leishmaniasis in Greece, 1981-2011. *Euro Surveill*, **18** (29): pii=20532
  
- Gonzalez C., Wang O., Strutz S.E., González-Salazar C., Sanchez-Cordero V., Sarkar S. (2010) Climate Change and Risk of Leishmaniasis in North America: Predictions from Ecological Niche Models of Vector and Reservoir Species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **4**(1): e585. doi:10.1371/journal.pntd.0000585

- González C. Paz A., Ferro C. (2014) Predicted altitudinal shifts and reduced spatial distribution of *Leishmania infantum* vector species under climate change scenarios in Colombia. *Acta Tropica*, **129**: 83-90
  
- Gradoni L., Gramiccia M., Khoury C., Maroli M. (2004) Linee guida per il controllo del serbatoio canino della leishmaniosi viscerale zoonotica in Italia. *Rapporti ISTISAN* 04/12, <http://www.anagrafecaninarer.it/acrer/Portals/0/files/linee%20guida%20ISS.pdf>
  
- Gramiccia M., Scalone A., Di Muccio T., Orsini S., Fiorentino E., Gradoni L. (2013) The burden of visceral leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: a retrospective analysis of the multi-annual epidemic that occurred from 1989 to 2009. *Euro Surveill*, **18**(29): pii=20535
  
- Guisan A., Zimmermann N. (2000) Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling*, **135**: 147-186
  
- Guisan A., Edwards Jr. T.C., Hastie T. (2002) Generalized linear and generalized additive models in studies of species distributions: Setting the scene. *Ecological Modelling*, **157**: 89-100
  
- Guisan A., Graham C.H., Elith J., Huettmann F. (2007) Sensitivity of predictive species distribution models to change in grain size. *Diversity and Distributions*, **13**: 332-340
  
- Handman E., Bullen D.V. (2002) Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, **18**(8): 332-4
  
- Haeberlein S., Fischer D., Thomas S.M., Schleicher U., Beierkuhnlein C., Bogdan C. (2013) First Assessment for the Presence of Phlebotomine Vectors in Bavaria, Southern Germany, by Combined Distribution Modeling and Field Surveys. DOI: 10.1371/journal.pone.0081088
  
- Hassan A.N., Beck L.R., Dister S. (1998) Prediction of villages at risk for filariasis transmission in the Nile Delta using remote sensing and geographic information system technologies. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **28**: 75-87

- Hasibeder G., Dye C., Carpenter J. (1992) Mathematical modelling and theory for estimating the basic reproduction number of canine leishmaniasis. *Parasitology*, **105**: 43-53
  
- Hernandez P.A., Graham C.H., Master M.M., Albert D. (2006). The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modelling methods. *Ecography*, **29**: 773-785
  
- Hijmans R.J., Cameron S.E., Parra J.L., Jones P.G., Jarvis A., (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **25**: 1965-1978
  
- Hernandez PA, Graham CH, Master LL, Albert DL (2006). The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography*, **29**: 773-785
  
- Hutchinson, G.E. (1957) Concluding remarks. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. **22**: 415-457
  
- Jaynes E.T., 1957. Information theory and statistical mechanics. *Physical Review*, **106**: 620-630
  
- Jerrett M., Gale S., Kontgis C. (2010) Spatial Modeling in Environmental and Public Health Research. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **7**: 1302-1329; doi:10.3390/ijerph7041302
  
- Kasap, O. E., A. Belen, S. Kaynas, F.M. Simsek, L. Biler, N. Ata, B. Alten (2009) Activity patterns of sand fly (Diptera: Psychodidae) species and comparative performance of different traps in an endemic cutaneous leishmaniasis focus in Cukurova Plain, Southern Anatolia, Turkey. *Acta Veterinaria Brno*, **78**: 327-335
  
- Killick-Kendrick R. (1979) The biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies In *Biology of the Kinetoplastida*. A cura di Killick-Kendrick R., Lumsden W. H. R., Evans D. A., Academic Press, London. 395-460

- Killick-Kendrick R., Rioux J. A., Bailly M. (1984) Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **59**: 555-572
  
- Killick-Kendrick, R., Wilkes, T.J., Alexander, J., Bray, R.S., Rioux, J. A., Bailly M. (1985) The distance of attraction of CDC light traps to phlebotomine sandflies. *Annales de Parasitologie et Humaine Comparee*, **60**: 763-767
  
- Killick-Kendrick, R. (1999) The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, **17**: 279-289
  
- Kumar, K., Singh, K., Das, R.K., Rahman, S.J., Sharma, S.K. (1995) Laboratory and Field Observations on the Effectiveness of DDT for the Control of the Vector Sandfly *Phlebotomus Argentipes* in the kala azar endemic state of Bihar. Document WHO/LEISH/95.36, World Health Organization, Geneva.
  
- Lawler J. J., Shafer S. L., White D., Kareiva P., Maurer E. P., Blaustein A. R., Bartlein P. J. (2009) Projected climate- induced faunal change in the Western Hemisphere. *Ecology*, **90**: 588-597
  
- Lewis D.J. (1982) A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of the British Museum (Entomology)*, **45**: 121-209
  
- Liu C., Berry P.M., Dawson T.P., Pearson R.G. (2005) Selecting thresholds of occurrence in the prediction of species distributions. *Ecography*, **28**: 385-393
  
- Loiselle B.A., Jørgensen P.M., Consiglio T., Jiménez I., Blake J.G., Lohmann L.G., Montiel O.M. (2008) Predicting species distributions from herbarium collections: does climate bias in collection sampling influence model outcomes? *Journal of Biogeography*, **35**: 105-116
  
- Macdonald G. (1952) The analysis of the sporozoite rate. *Tropical Diseases Bulletin*, **49**: 569-86

- Mancianti F., Ariti G. (2010) Diagnosi eziologica della leishmaniosi canina, in: Leishmaniosi canina: recenti acquisizioni su epidemiologia, implicazioni cliniche, diagnosi, terapia e prevenzione, *Edizioni Veterinarie*, 65-73
  
- Maroli M.; Bettini S. (1977) Leishmaniasis in Tuscany (Italy): An investigation on phlebotomine sandflies in Grosseto Province. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **71**(4): 315-21
  
- Maroli M. (1983) Laboratory colonization of *Phlebotomus perfiliewi* (Parrot). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **77**(6): 876-7
  
- Maroli M., Fiorentino S., Guandalini E. (1987a) Biology of a laboratory colony of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, **24**(5): 547-51
  
- Maroli M.; Gramiccia M.; Gradoni L. (1987) Natural infection of *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **81**(4): 596-8
  
- Maroli M. (1988) La specie *Phlebotomus papatasi* (Diptera: psychodidae) è attualmente rara in Italia? alcuni aspetti sanitari legati alla sua endofilia. *Parassitologia*, **30** (1): 119-120
  
- Maroli M., Bigliocchi F., Khoury C. (1994) Sandflies in Italy: observations on their distribution and methods for control. *Parassitologia*, **36**(3): 251-64
  
- Maroli M., Sansoni L., Bigliocchi F., Khoury C., Valsecchi M. (1995) Reperimento di *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 (= *P. major* s.l.) in un focolaio di leishmaniosi nel nord Italia (Provincia di Verona). *Parassitologia*, **37**: 241-244
  
- Maroli M.; Pontuale G.; Khoury C.; Frusteri L.; Raineri V. (1997a) About the eastern limit of distribution of *Phlebotomus ariasi* (Diptera: Psychodidae). *Parasite*, **4**, 377-381

- Maroli M., Feliciangeli M.D., Arias J. (1997b) Metodos de captura, conservacion y montaje de los flebotomos (Diptera: Psychodidae). Documento OPS/HCP/ HCT/95/97, Organizacion Panamericana de la Salud, Washington DC, USA
  
- Maroli M., Khoury C. (1998) Leishmaniasis vectors in Italy. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale*, **3**(3-4): 69-75
  
- Maroli M., Mizzoni V., Siragusa C., D’Orazi A., Gradoni L. (2001) Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**: 358-363
  
- Maroli M. (2003) I vettori di leishmaniosi e prospettive di controllo. *Il controllo degli infestanti di interesse urbano e sanitario: integrazione tra pubblico e privato*. Atti del convegno presso il Centro Ricerche Marine , Cesenatico, 15-16 maggio 2003, 36-46
  
- Maroli M., Rossi L., Baldelli R., Capelli G., Ferroglio E., Genchi C., Gramiccia M., Mortarino M., Pietrobelli M., Gradoni L. (2008) The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine and International Health*, **13**: 256-264
  
- Maroli M., Gradoni L., Oliva G., Castagnaro M., Crotti A., Lubas G., Paltrinieri S., Roura X., Zatelli A., Zini E. (2009) Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte III: Prevenzione. *Veterinaria*, Anno 23, **4**: 19-26
  
- Maroli M., Feliciangeli M.D., Bichaud L., Charrel R.N., Gradoni L. (2012) Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x
  
- Martin-Sanchez J., Morales-Yuste M., Acedo-Sanchez C., Baròn S., Diaz V., Morillas-Marquez F. (2009) Canine Leishmaniasis in Southeastern Spain. *Emerging Infectious Diseases*, **15**(5): 795-798

- Merow C., Matthew J., Smith and John A. Silander, Jr. (2013) A practical guide to MaxEnt for modeling species' distributions: what it does, and why inputs and settings matter. *Ecography*, **36**: 1058-1069
  
- Miller J.R., Turner M.G., Smithwick E.A.H., Dent C.L., Stanley E.H. (2004) Spatial extrapolation: the science of predicting ecological patterns and processes. *BioScience*, **54**: 310-20
  
- Miller J. (2010) Species Distribution Modeling. *Geography Compass* **4/6**: 490–509
  
- Miró G., Checa R., Montoya A., Hernández L., Dado D., Gálvez R. (2012) Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasites and Vectors*, **5**: 60
  
- Moffett A., Shackelford N., Sarkar S. (2007) Malaria in Africa: vector species' niche models and relative risk maps. *PLoS ONE*, **2**: e824. doi:810.1371/ journal.pone.0000824.0000822.
  
- Molyneux D. H.; Killick-Kendrick R. (1987). Morphology, ultra- structure and life cycles life cycles. Volume 1, pp. 121-76. Academic Press, London.
  
- Mollicone E., Battelli G., Gramiccia M., Maroli M., Baldelli R. (2003) A stable focus of canine leishmaniosis in the Bologna Province (Italy). *Parassitologia*, **45**(1-2): 85-88
  
- Montarsi F., Martini S., Dal Pont M., Delai N., Ferro Milone N., Mazzucato M., Soppelsa F., Cazzola L., Cazzin S., Ravagnan S., Ciocchetta S., Russo F., Capelli G. (2013) Distribution and habitat characterization of the recently introduced invasive mosquito *Aedes koreicus* [*Hulecoeteomyia koreica*], a new potential vector and pest in north-eastern Italy. *Parasites & Vectors*, doi: 10.1186/1756-3305-6-292.
  
- Moo-Llanes D., Ibarra-Cerden C.N., Rebollar E.A., Ibáñez-Bernal S., Gonzalez C., Janine M. Ramsey J.M. (2013) Current and Future Niche of North and Central American Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Climate

Change Scenarios. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **7**(9): e2421. doi: 10.1371/journal.pntd.0002421.

- Moreno J., Alvar J. (2002) Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, **18**: 399-405
- Morosetti G., Bongiorno G., Beran B., Scalone A., Moser J., Gramiccia M., Gradoni L., Maroli M. (2009) Risk assessment for canine leishmaniasis spreading in the north of Italy. *Geospatial Health*, **4**(1): 115-127
- Morse S.S. (1995) Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, **1**(1): 7-15
- Moschin J.C., Ovallos F.G., Sei I.A., Galati E.A. (2013) Ecological aspects of phlebotomine fauna (Diptera, Psychodidae) of Serra da Cantareira, Greater São Paulo Metropolitan region, state of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, **16**(1): 190-201
- Mughini-Gras L., Mulatti P., Severini F., Boccolini D., Romi R., Bongiorno G., Khoury C., Bianchi R., Montarsi F., Patregnani T., Bonfanti L., Rezza G., Capelli G., Busani L. (2013) Ecological Niche Modelling of Potential West Nile Virus Vector Mosquito Species and Their Geographical Association with Equine Epizootics in Italy. *Ecohealth*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24121802>
- Mulatti P., Bonfanti I., Capelli G., Capello K., Lorenzetto M., Terregino C., Monaco F., Ferri G., Marangon S. (2013) West Nile Virus in North-Eastern Italy, 2011: Entomological and Equine IgM-Based Surveillance to Detect Active Virus Circulation. *Zoonoses and Public Health*, **60**: 375-382
- Natale A. (2004) Vecchi e nuovi focolai di leishmaniosi canina nelle Venezie: indagine epidemiologica. Tesi di dottorato di Ricerca in “Sanità Pubblica, Igiene Veterinaria e delle Produzioni Animali” XVI ciclo- Università degli studi di Padova.
- Naucke T.J., Lorentz S. (2012) First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors*, **5**: 67, doi: 10.1186/1756-3305-5-67.

- Naucke T.J., Lorentz S., Rauchenwald F., Aspöck H. (2011) *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908, in Carinthia: first record of the occurrence of sandflies in Austria (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasitology Research*, **109**: 1161-1164
  
- Naucke T.J., Pesson B. (2000) Presence of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae) in Germany. *Parasitology Research*, **86**: 335-336
  
- Norman J., Becker F. (1995) Terminology in thermal infrared remote sensing of natural surfaces. *Remote Sensing Reviews*, **12**: 159-173
  
- Neteler M., Roiz D., Rocchini D., Castellani C., Rizzoli A. (2011) Terra and Aqua satellites track tiger mosquito invasion: modelling the potential distribution of *Aedes albopictus* in north-eastern Italy. *International Journal of Health Geographics*, **3**:10-49
  
- Oliva G., Roura X., Crotti A., Zini E., Maroli M., Castagnaro M., Gradoni L., Lubas G., Paltrinieri S., Zatelli A., (2008) Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadi azione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte II: Approccio terapeutico. *Veterinaria*, **6**: 9-20
  
- Ortega-Huerta M.A., Peterson A.T. (2008) Modeling ecological niches and predicting geographic distributions: a test of six presence-only methods. *Revista Mexicana De Biodiversidad*, **79**: 205-216
  
- Otranto D., Dantas-Torres F., De Caprariis D., Di Paola G., D. Tarallo V., Latrofa M.S., Riccardo Lia R.P., Annoscia G., Breitshwerdt E.B., Cantacessi C., Capelli G., Stanneck D. (2013) Prevention of Canine Leishmaniosis in a Hyper-Endemic Area Using a Combination of 10% Imidacloprid/4.5% Flumethrin. *PLoS One*, **8**(2): e56374
  
- Owens S.D., Oakley D.A., Marryott K., Hatchett W., Walton R., Nolan T.J., Newton A., Steurer F., Schantz P., Giger U. (2001) Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **219**(8): 1076-83

- Pampiglione S, La Placa M & Schlick G (1974) Studies on Mediterranean leishmaniasis. I. An outbreak of visceral leishmaniasis in Northern Italy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **68**: 349-359
  
- Papes M., Gaubert P. (2007) Modelling ecological niches from low numbers of occurrences: assessment of the conservation status of poorly known viverrids (Mammalia, Carnivora) across two continents, *Diversity and Distributions*, **13**: 890-902
  
- Pearson R.G., Dawson T.P. (2003) Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? *Global Ecology & Biogeography*, **12**: 361-371
  
- Pearson R.G., Thuiller W., Araújo M.B., Martinez-Meyer E., Brotons L., McClean C., Miles L., Segurado P., Dawson T.P., Lees D. (2006) Model-based uncertainty in species' range prediction. *Journal of Biogeography*, **33**: 1704-1711
  
- Pearson R.G., Raxworthy C.J., Nakamura M., Peterson A.T. (2007) Predicting species distribution from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography*, **34**: 102-117
  
- Pearson R.G. (2007) Species' Distribution Modeling for Conservation Educators and Practitioners. Synthesis. American Museum of Natural History. "Copyright 2006, by the authors of the material, with license for use granted to the Center for Biodiversity and Conservation of the American Museum of Natural History. All rights reserved." Available at <http://ncep.amnh.org>
  
- Pedonese F., Mancianti F., Bernardini S., Melosi M. (2000) Further records on canine leishmaniasis in the province of Pisa (Tuscany). *Animal Biology*, **9**: 101-103
  
- Pérez J., Virgen A., Rojas J.C., Rebollar-Téllez E.A., Alfredo C., Infante F., Mikery O., Marina C.F., Ibáñez-Bernal S. (2013) Species composition and seasonal abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coffee agroecosystems. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130224>

- Peterson A.T., Sanchez-Cordero V., Beard C.B., Ramsey J.M. (2002) Ecologic niche modeling and potential reservoirs for Chagas disease, México. *Emergence Infectious Diseases*, **8**: 662-667
  
- Peterson A.T., Shaw J. (2003) Lutzomyia vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *International Journal for Parasitology*, **33**: 919-931
  
- Peterson A.T., Scachetti Pereira R., Fonseca de Camargo Neves V. (2004) Using epidemiological survey data to infer geographic distributions of leishmaniasis vector species. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **37**: 10-14
  
- Peterson A. T., Benz B. W, Papexs M. (2007) Highly pathogenic H5N1 avian influenza: entry pathways into North America via bird migration. *PLoS ONE*, **2**:e261.
  
- Peterson A.T., Lash R.R, Carrol D.S., Johnson K.M. (2006) Geographic potential for outbreaks of Marburg hemorrhagic fever. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **75**: 9-15
  
- Peterson A. T., Stewart A., Mohamed K. I., Araujo M. B. (2008) Shifting global invasive potential of European plants with climate change. *PLoS ONE*, **3**:e2441
  
- Peterson A.T., Soberòn J., Pearson R.G., Anderson R.P., Martinez-Meyer E., Nakamura M., Araujo M.B. (2011) Ecological Niches and Geographic Distributions. Monographs in population biology, Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
  
- Phillips S.J., Dudík, M. (2008) Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, **31**: 161-175
  
- Phillips S.J., Anderson R.P., Schapire R.E. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, **190**: 231-259

- Piccoli L., Ceretti G., Capelli G., Manca G., Poglayen G (1999) Leishmaniosi Canina: la situazione in Veneto. *Il Progresso Veterinario*, **19**: 991-996
  
- Pietrobelli M., Frangipane di Regalbano A., Natale A., Butteri E., Lerco C., Furnari C., Capelli G. (2004) Sorveglianza sierologica della leishmaniosi canina in Italia nord-orientale. *Atti SISVet*, **LVIII**: 124
  
- Poglayen G., Marangon S., Manca M.G., Capelli G., Dalla Pozza M., Casati D., Vantini E., Bressan G., Passarini G. (1997) A new outbreak of canine leishmaniosis in the North-East of Italy. *Acta Parasitologica Turcica*, **21**(1): 143
  
- Pope K.O., Rejmánková E., Savage H.M., Arredondo- Jimenez J.I., Rodríguez M.H., Roberts D.R. (1993) Remote sensing of tropical wetlands for malaria control in Chiapas, Mexico. *Ecological Applications*, **4**: 81-90
  
- Pozio E., Gradoni L., Gramiccia M. (1985) La leishmaniose canine en Italie de 1910 a 1983. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, **60**: 543-553
  
- Rabinovich J., Feliciangeli M. (2004) Parameters of *Leishmania braziliensis* transmission by indoor *Lutzomyia ovallesi* in Venezuela. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **70**(4): 373-82
  
- Ready P.D. (2008) Leishmaniasis emergence and climate change. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, **27**: 399-412
  
- Ready P.D. (2010) Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*, **15**(10): pii=19505
  
- Rejmánková E., Roberts D.R., Pawley A., Manguin S., Polanco J. (1995) Predictions of adult *Anopheles albimanus* densities in villages based on distance to remotely sensed larval habitats. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **53** (5): 482-488

- Rinaldi L., Musella V., Biggeri A., Cringoli G. (2006) New insights into the application of geographical information systems and remote sensing in veterinary parasitology. *Geospatial Health*, **1**(1): 33-47
  
- Rezza G., Nicoletti L., Angelini R., Finarelli A., Panning M., Cordioli P., Fortuna C., Boros S., Maturano F. (2007) Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet*, **370**(9602): 1840- 1846
  
- Rioux J.A., Aboulker J.P., Lanotte G., Killick-Kendrick R., Martini-Dumas A. (1985) Ecologie des leishmanioses dans le sud de la france. 21. Influence de la temperature sur le d'veloppement de *Leishmania infantum* nicolle, 1908 chez *Phlebotomus ariasi* tonnoir, 1921. Etude expèrimentale. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, **60**(3): 221-9
  
- Robert L.L., Perich M.J. (1995) Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) control using a residual pyrethroid insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **11**: 195-199
  
- Romi R., Khoury C., Bigliocchi F., Maroli M. (1994) Schede guida su acari e insetti di interesse sanitario. *Rapporti ISTISAN*, **94/8**: 33-42
  
- Rossi E., Rinaldi L., Musella V., Veneziano V., Carbone S., Gradoni L., Cringoli G. (2007) Mapping the main *Leishmania* phlebotomine vector in the endemic focus of the Mt. Vesuvius in southern Italy. *Geospatial Health*, **2**: 191-198
  
- Rossi E., Bongiorno G., Ciolli E., Di Muccio T., Scalone A., Gramiccia M., Gradoni L., Maroli M. (2008) Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Tropica*, **105**: 158-165
  
- Rossi L., Ferroglio E., Guiso P., Ferrasi P., Pancaldi P. (1999) Segnalazione di un focolaio di leishmaniosi canina sulla collina torinese. *Medicina Veterinaria Preventiva*, **20**: 20
  
- Roze M. (2005) Canine leishmaniasis: A spreading disease. Diagnosis and treatment. *EJCAP*, **15**: 39-52

- Salvemini M., Berardi L., Di Donato P., Mattiozzi G. (2013) La rappresentazione cartografica. La Certificazione ECDL-GIS, modulo I. APOGEO srl, ISBN: 9788850313648. Idee Editoriali Feltrinelli, Milano, Italia.
  
- Schröder B. (2008) Challenges of species distribution modelling belowground. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **171**: 325-37
  
- Short N.M. (2009) The Remote Sensing Tutorial: The Concept of Remote Sensing. Available online: [http://rst.gsfc.nasa.gov/Intro/Part2\\_1.html](http://rst.gsfc.nasa.gov/Intro/Part2_1.html)
  
- Segurado P., Araújo M.B. (2004) An evaluation of methods for modelling species distributions. *Journal of Biogeography*, **31**(10): 1555-1568, DOI: 10.1111/j.1365-2699.2004.01076.x
  
- Signorini M., Montarsi F., Drigo M., Agugiaro G., Frangipane di Regalbono A., Cassini R. (2010) Increment of sandflies density detected through a 5-years entomological monitoring of a recently described leishmaniosis focus in north-eastern Italy. Atti del XXVI Congresso nazionale della Società Italiana di Parassitologia, Perugia, 22-25 giugno, *Parassitologia*, **52** (1-2): 185
  
- Signorini M., Drigo M., Marcer F., Frangipane di Regalbono A., Gasparini G., Montarsi F., Pietrobelli M., Cassini R. (2013) Comparative field study to evaluate the performance of three different traps for collecting sand flies, in north-eastern Italy. *Journal of Vector Ecology*, **38**(2): 374-378
  
- Solano-Gallego L., Morell P., Arboix M., Alberola J., Ferrer L. (2001) Prevalence of *L. infantum* infection in dogs living in an area of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**: 560-563
  
- Stevens K.B., Pfeiffer D.U. (2011) Spatial modelling of disease using data- and knowledge-driven approaches. *Spatial and Spatiotemporal Epidemiology*, **2**(3): 125-33. doi: 10.1016/j.sste.2011.07.007.
  
- Stensgaard, A. Jørgensen, N.B. Kabatereine, J.B. Malone, T.K. Kristensen (2005) Modeling the distribution of *Schistosoma mansoni* and host snails in

Uganda using satellite sensor data and Geographical Information Systems. *Parassitologia*, **47**: 115-125

- Stensgaard A.S., Utzinger J., Vounatsou P., Hurlimann E., Schur N., Saarnak C.F.L., Simoonga C., Mubita P, Kabatereine N. B., Tchuenté T. L., Rahbek C., Kristensen T.K. (2013) Large-scale determinants of intestinal schistosomiasis and intermediate host snail distribution across Africa: Does climate matter? *Acta Tropica*, **128**(2): 378-90. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.11.010.
- Tarallo V.D., Dantas-Torres F., Lia R.P., Otranto D. (2010) Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy. *Acta tropica*, **116**: 227-234
- Theodor O. (1936) On the relation of *Phlebotomus papatasi* to the temperature and humidity of the environment. *Bulletin of Entomological Research*, **36**: 653- 671
- Thompson D.F., Malone J.B., Harb M., Faris R., Huh O.K., Buck A.A. (1996) Bancroftian filariasis distribution and diurnal temperature differences in the southern Nile Delta. *Emergence Infectious Diseases*, **2**: 234-5
- Thomson M.C., Connor S.J., Milligan P.J.M., Flasse S.P. (1997) Mapping malaria risk in Africa: what can satellite data contribute? *Parasitology Today*, **13**: 313-8
- Thuiller W. (2003) Biomod - optimizing predictions of species distributions and projecting potential future shifts under global change. *Global Change Biology*, **9**: 1353-1362
- Valenta, D.T., Tang, Y., Anez, N. (1995) A new method to determine the distance at which phlebotomine sandflies are attracted to light under field conditions. Proceedings of the II International Symposium on Phlebotomine Sand Flies (ISOPS II) Merida, Venezuela. Boletón de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental, **35**(Suppl. 1): 353-358
- Varani S., Cagarelli R., Melchionda F., Attard L., Salvadori C., Finarelli A.C., Gentilomi G.A., Tigani R., Rangoni R., Todeschini R., Scalone A., Di Muccio

- T., Gramiccia M., Gradoni L., Viale P., Landini M.P. (2013) Ongoing outbreak of visceral leishmaniasis in Bologna Province, Italy, November 2012 to May 2013. *Euro Surveill.* **18**(29): pii=20530
- Vascellari M., Natale A., Schievenin E., Miatto A., Brino A., Frangipane di Regalbono A., Pietrobelli M. (2005) Descrizione di un nuovo focolaio di leishmaniosi canina nella Regione Veneto. *Veterinaria*, **3**: 25-29
  - Vesco U. (2005) Elaborazione di un modello previsionale sulla presenza dei vettori di leishmaniosi canina in Piemonte e Valle d'Aosta. Tesi di Laurea in Medicina Veterinaria, anno accademico 2004-2005, Università degli Studi di Torino.
  - Veronesi E., Pilani R., Carrieri M., Bellini R. (2007). Trapping sand flies in the Emilia Romagna region of northern Italy. *Journal of Vector Ecology*, **32**: 313-318
  - World Health Organization (1990) Control of leishmaniasis. Relazione tecnica, WHO, Geneva.
  - World Health Organization (2010) Control of the leishmaniasis. Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, 22–26 March 2010, WHO Technical Report Series. WHO, Geneva.
  - Young N., Carter L., Evangelista P. (2011) A MaxEnt Model v3.3.3e Tutorial (ArcGIS v10) [http://ibis.colostate.edu/WebContent/WS/ColoradoView/TutorialsDownloads/A\\_Maxent\\_Model\\_v7.pdf](http://ibis.colostate.edu/WebContent/WS/ColoradoView/TutorialsDownloads/A_Maxent_Model_v7.pdf)

# SITOGRAFIA

- European Environment Agency (EEA). <http://www.eea.europa.eu/>
- Global Change Master Directory, NASA. [http://gcmd.nasa.gov/records/GCMD\\_NCAR\\_DS758.0.html](http://gcmd.nasa.gov/records/GCMD_NCAR_DS758.0.html)
- Land Processes Distributed Active Archive Center (LP DAAC), located at USGS/EROS, Sioux Falls, SD. <http://lpdaac.usgs.gov>
- MaxEnt. <http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/>
- Quantum Gis Project. <http://www.qgis.org/it/site/>
- R project. <http://www.R-project.org/>
- Spatial Ecology. <http://www.spatialecology.com/gme/>
- U.S. Geological Survey (USGS). <http://earthexplorer.usgs.gov/>
- WorldClim - Global Climate Data - Free climate data for ecological modeling and GIS. <http://www.worldclim.org/>