

Arpa Emilia-Romagna	METODO DI PROVA	M/B/Am/003/LM
<i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i>		Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 1 di 17

**INDIVIDUAZIONE E CONTEGGIO DELLE UOVA DI AEADES ALBOPICTUS
DEPOSTE SU LISTELLE IN OVITRAPPOLE**

Indice

1. SCOPO
2. CAMPO DI APPLICAZIONE
3. AVVERTENZE E PRECAUZIONI
4. PRINCIPIO DEL METODO
5. PRODOTTI PER LE PROVE
6. APPARECCHIATURE E ATTREZZATURE
7. CONDIZIONI AMBIENTALI ALLE QUALI IL METODO DEVE ESSERE ESEGUITO
8. PERSONALE
9. PROCEDIMENTO
 - 9.1 Trasporto e conservazione delle listelle di masonite
 - 9.2 Individuazione delle uova di *Aedes albopictus*
 - 9.3 Conteggio delle uova di *Aedes albopictus*
10. ESPRESSIONE DEI RISULTATI
 - 10.1 Calcolo, trasferimento dei dati e archiviazione
 - 10.2 Validazione del metodo
 - 10.3 Incertezza di misura

Rev.	Natura modifica	
3	Modificato titolo, par 1-3-5-6-7-8-9.1-9.2-9.3-10-10.1-10.2-11.1-11.2-14-15-16 allegati 1 e 2. Inserimento paragrafi 12-13 e Allegati 3-4-5	
Preparazione	Verifica	Approvazione
Bacchi Marta Manzileri Anna Maria Morelli Samanta	RUA	RSP In vigore dal

<p style="text-align: center;">Arpa Emilia-Romagna</p>	<p style="text-align: center;">METODO DI PROVA</p>	<p style="text-align: center;">M/B/Am/003/LM</p>
<p><i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i></p>		<p style="text-align: right;">Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 2 di 17</p>

- 11. CONTROLLO DI QUALITA' ANALITICO (CQA)
 - 11.1 Controllo qualitativo
 - 11.2 Controllo quantitativo
- 12. **VERIFICHE INTERNE DEGLI OPERATORI**
 - 12.1 Verifica interna giornaliera
 - 12.2 Verifica periodica interlaboratorio
- 13. **TRASMISSIONE DATI DEI CONTROLLI DI QUALITA'**
- 14. RIFERIMENTI
- 15. ALLEGATI
- 16. TABELLA RIASSUNTIVA DELLE REVISIONI

<p style="text-align: center;">Arpa Emilia-Romagna</p>	<p style="text-align: center;">METODO DI PROVA</p>	<p style="text-align: center;">M/B/Am/003/LM</p>
<p><i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i></p>		<p style="text-align: right;">Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 3 di 17</p>

1. SCOPO

Il presente metodo viene utilizzato per **individuare e conteggiare** le uova di *Aedes albopictus* deposte su listelle di masonite inserite in specifiche ovitrappole utilizzate per il monitoraggio ambientale della specie di zanzara in oggetto.

2. CAMPO D'APPLICAZIONE

Il metodo è utilizzato per il monitoraggio ambientale di *Aedes albopictus* sia in siti a potenziale rischio di introduzione, sia in siti in cui è accertata la presenza dell'insetto. La determinazione quantitativa del numero di uova ha un ambito di numerazione che va da 0 a N uova (tutte quelle presenti) per listella di masonite.

3. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

L'applicazione del presente metodo non comporta rischi particolari per l'operatore; è comunque necessario adottare dispositivi di protezione individuale (es. guanti) atti ad evitare il contatto con le listelle di masonite **che, nelle ovitrappole, sono immerse in una soluzione di acqua e *Bacillus thuringiensis israelensis*.**

4. PRINCIPIO DEL METODO

Individuazione e conteggio delle uova di *Aedes albopictus* deposte sulle listelle di masonite mediante stereomicroscopio.

5. PRODOTTI PER LE PROVE

Il metodo non prevede l'impiego di prodotti per le prove.

6. APPARECCHIATURE E ATTREZZATURE

- Stereomicroscopio
- Pinze, puntali entomologici, pennello e **sacchetti a "cartucciera"**

Per l'utilizzo dell'apparecchiatura indicata, si dovranno seguire le modalità specificate nel manuale d'uso dello strumento.

<p style="text-align: center;">Arpa Emilia-Romagna</p>	<p style="text-align: center;">METODO DI PROVA</p>	<p style="text-align: center;">M/B/Am/003/LM</p>
<p><i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i></p>		<p style="text-align: right;">Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 4 di 17</p>

7. CONDIZIONI AMBIENTALI ALLE QUALI IL METODO DEVE ESSERE ESEGUITO

Il metodo di prova non richiede particolari condizioni ambientali.

8. PERSONALE

Il personale addetto all'esecuzione della prova, viene qualificato, tramite una delle seguenti verifiche:

- a) **corso di formazione teorico-pratico relativo alle modalità di esecuzione del monitoraggio regionale e all'identificazione e conteggio delle uova di *Aedes albopictus***
- b) affiancamento a personale già abilitato per un periodo di tempo che permetta di applicare il metodo per un numero di almeno 10 volte. Le prove per la verifica del conseguimento dell'abilitazione sono il riconoscimento e la ripetibilità di conteggio.
- c) **verifica interna giornaliera**
- d) **verifica periodica interlaboratorio**
- e) partecipazione a circuito interlaboratorio interno

9. PROCEDIMENTO

9.1 Trasporto e conservazione delle listelle di masonite

Le listelle raccolte devono essere trasportate singolarmente dentro una bustina di plastica, e conferite allo **sportello provinciale dagli operatori addetti alla raccolta** conservandole a temperatura ambiente. **Le listelle verranno trasferite al laboratorio di riferimento, che se non coincidente con lo sportello di accettazione, avverrà tramite trasporto refrigerato interno (2 - 4°C).**

Prima della lettura allo stereomicroscopio le listelle possono essere conservate integre per vari giorni purché a temperatura refrigerata 2 - 4°C.

Alle listelle consegnate deve essere allegato il verbale di prelievo predisposto dal Protocollo Operativo Regionale per il Monitoraggio di *Aedes albopictus* tramite ovitrappole.

9.2 Individuazione delle uova di *Aedes albopictus*

L'individuazione delle uova deve avvenire ad un ingrandimento sufficiente per permettere una agevole **riconoscimento, in genere 20X - 30X.**

La morfologia dell'uovo ha le seguenti caratteristiche:

Arpa Emilia-Romagna	METODO DI PROVA	M/B/Am/003/LM
<i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i>		Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 5 di 17

- Forma ovoidale ellittica con un lato più appiattito;
- Dimensioni medie: 0,55 x 0,16 mm;
- Colore nero lucente;
- Presenza sulla superficie dell'*esocorion* di tubercoli in rilievo.

N.B. La discriminazione di specie sulla base della morfologia dell'uovo è complessa e non può essere adottata nell'ambito di un piano di monitoraggio su ampia scala. In particolare, nella nostra regione in ambiente urbano possono essere deposte sulle listelle uova di *Aedes geniculatus*, presente a bassissime densità tali da non incidere in maniera significativa sul dato medio complessivo. Va comunque tenuta nota interna delle listelle dove vi è predominanza di uova di *Aedes geniculatus* al fine di consentire eventuali azioni correttive.

9.3 Conteggio delle uova di *Aedes albopictus*

Le listelle, una volta prelevate dai sacchetti, vanno distese su carta assorbente e lasciate asciugare a temperatura ambiente.

Il conteggio delle uova deve essere effettuato su tutta la superficie della listella. Prima sulla parte alveolata, poi sui bordi e infine sul retro (lato liscio della listella)

Se le uova deposte sono sovrapposte, aiutandosi con un puntale o un pennello spostare (dopo averle contate) lo strato di uova superiore e contare anche tutte le uova presenti nello strato sottostante. **Queste listelle dovranno essere identificate con il simbolo # sul verbale e non dovranno essere utilizzate per eventuali controlli.**

Ai fini del conteggio devono essere considerate le uova:

- Intere e integre
- Schiuse (**costituite da due parti di cui una di dimensioni maggiori**)
- Disidratate. Queste ultime assumono una forma appiattita leggermente rialzata sui bordi mantenendo comunque la presenza sulla superficie dell'*esocorion* di tubercoli in rilievo
- **Disidratate e rotte (uova suddivise in più parti)**

In allegato 1 sono riportati alcuni esempi di tipologie di listelle, con il relativo conteggio.

Tra il conteggio di una listella e quella successiva è importante pulire in modo accurato il supporto dello stereomicroscopio sul quale viene appoggiata la listella per evitare che uova cadute durante il conteggio da un campione, **che devono essere anch'esse contate**, possano contaminare quello successivo.

Non devono essere conteggiate le uova delle listelle che riportano sul verbale di prelievo (nel campo note) che l'ovitrappola al momento della raccolta è stata trovata senza acqua (asciutta, secca...).

<p style="text-align: center;">Arpa Emilia-Romagna</p>	<p style="text-align: center;">METODO DI PROVA</p>	<p style="text-align: center;">M/B/Am/003/LM</p>
<p><i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i></p>		<p style="text-align: right;">Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 6 di 17</p>

Dopo la lettura, le listelle devono essere riposte all'interno di una nuova cartuccia e conservate per almeno 15 giorni, ad una temperatura di 2 - 4°C, finché non viene comunicato dal CAA (Centro Agricoltura Ambiente) la possibilità di smaltimento.

10. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il numero di uova conteggiato è relativo ad una listella standard di dimensioni 2,5 x 14.5 cm.

In caso di assenza di uova il risultato si esprime con "0".

In caso di listelle non leggibili per presenza di materiale che ricopre (**muffe, fango, ecc**) le uova il risultato si esprime con -1.

Nel caso di uova schiuse (vedi par. 9.3), contare solo la parte di dimensioni maggiori; nel caso di uova rotte, prestare attenzione a non contare più volte lo stesso uovo, sovrastimandone il numero effettivo.

Il risultato è espresso come "Conteggio uova "seguito dal numero di uova conteggiato.

10.1 Calcolo, trasferimento dei dati e archiviazione

Dall'operatore vengono applicati sul verbale di prelievo per ogni singolo punto di monitoraggio i relativi codice a barre.

I risultati delle prove vengono annotati nell'apposito spazio denominato "Risultato" presente sul codice a barre insieme alla data di fine analisi e alla firma dell'operatore che ha eseguito il conteggio.

Successivamente i risultati vengono inseriti in un applicativo specifico di accettazione campioni di "zanzara tigre" e poi chiusi secondo le modalità previste dal programma.

Non viene stampato il rapporto di prova in quanto **due volte alla settimana (mercoledì e venerdì alle ore 12.00)**, i dati sono direttamente estrapolati dalla DG di ARPA dall'applicativo specifico e inviati al Dipartimento di Sanità Pubblica di Cesena, per le elaborazioni e l'inserimento nel sito web www.zanzaratigreonline.it.

10.2 Validazione del metodo

La validazione del risultato è assicurata attraverso l'utilizzo di un controllo di qualità analitico **intra e interlaboratoriale** interno qualitativo e quantitativo di tutti gli operatori coinvolti nel conteggio-con **le modalità specificate di seguito**.

L'obiettivo del circuito è quello di valutare il reale allineamento degli operatori nelle letture di ciascuna listella, verificando anche la ripetibilità di ciascuno (letture in doppio).

Arpa Emilia-Romagna	METODO DI PROVA	M/B/Am/003/LM
<i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i>		Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 7 di 17

10.3 Incertezza di misura

Attraverso l'elaborazione dei dati dell'interconfronto del circuito verrà valutato un intervallo di incertezza di conteggio, idoneo per i livelli di densità di uova individuati.

11. CONTROLLO DI QUALITA' ANALITICO (CQA)

Viene organizzato a cadenza biennale in concomitanza con il rinnovo del contratto del personale assunto stagionalmente per il servizio di monitoraggio della zanzara tigre, un circuito di interconfronto ai fini di garantire l'allineamento delle letture da parte degli operatori stessi.

Vengono allestite due tipi di prove: una prova qualitativa e una quantitativa.

11.1 Controllo qualitativo

Vengono predisposte n°2 listelle con uova di *Aedes albopictus* e uova di specie diverse deposte su listelle posizionate in campo.

I risultati vengono registrati su apposita scheda **Allegato 2** e successivamente elaborati.

Poiché la rispettiva positività e negatività delle listelle è nota a priori in quanto classificate dal Centro di Riferimento Regionale CAA (Centro Agricoltura Ambiente di Crevalcore), si elaborano i dati in base della valutazione di efficienza di un test¹: in questo caso l'efficienza è misurata come la capacità dell'operatore di individuare la listella contenente *Aedes albopictus* come positiva e viceversa.

Il calcolo si sviluppa attraverso la costruzione di una tabella di contingenza:

ESITO LETTURA	LISTELLA VERA POSITIVA +	LISTELLA VERA NEGATIVA -
+	a	c
-	b	d

Dove:

a: numero di listelle con *Aedes albopictus* lette come pos (Vero Positivo)

b: numero di listelle con *Aedes albopictus* lette come neg. (Falso Negativo)

c: numero di listelle contenenti specie alternative lette come pos. (Falso Positivo)

d: numero di listelle contenenti specie alternative lette come neg. (Vero Negativo)

L'efficienza del test si esprime matematicamente secondo la formula:

$$\frac{(a+d)}{(a+b+c+d)}$$

Il livello di efficienza è rappresentato da un valore compreso fra 0 e 1, traducibile anche in termini percentuali. Più il rapporto si avvicina a 1 migliore è l'efficienza del test.

¹ http://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/screen/ind_con.htm

Arpa Emilia-Romagna	METODO DI PROVA	M/B/Am/003/LM
<i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i>		Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 8 di 17

11.2 Controllo quantitativo

Vengono allestiti **n (corrispondente al numero di operatori)** stereomicroscopi, numerati da 1 a **n**, in ciascuno dei quali è posizionata una listella per la lettura opportunamente preparate presso il Centro Agricoltura Ambiente di Crevalcore.

Ad ogni operatore viene consegnato un piano di lettura delle listelle e dovrà quindi rispettare l'ordine di lettura seguendo la numerazione dei microscopi indicata nello schema. Per ogni listella viene anche fissato un tempo limite massimo di lettura proporzionato alla densità di uova presenti. Al termine del primo turno gli operatori eseguiranno una seconda lettura, sulle stesse listelle, seguendo un ordine casuale e differente rispetto a quello seguito nella prima lettura. Ciascun operatore avrà una lettura in doppio per ciascuna listella e i dati saranno raccolti nell'Allegato 3 e successivamente elaborati..

Le listelle saranno di densità tale da poter valutare il reale allineamento nel conteggio sia di piccole che di grandi densità di uova.

I data set sono analizzati valutando il tipo di distribuzione che seguono e l'eventuale presenza di dati anomali o outliers utilizzando la tecnica grafica dei Box-Plot.

La valutazione della performance viene effettuata con il calcolo dello z-score come:

$$Z_i = \frac{x_i - \mu_0}{\sigma}$$

dove x_i la singola osservazione, μ_0 rappresenta il valore medio delle letture di ogni listella, e σ è la deviazione standard del gruppo di dati di ogni barretta.

Ogni singola lettura corrisponde ad uno z-score; sono considerati fuori controllo le letture corrispondenti ad uno z-score $>+/-3$

Tutte le elaborazioni statistiche sono effettuate in ambiente Minitab®

12. VERIFICHE INTERNE DEGLI OPERATORI

12.1 Verifica interna giornaliera

Durante ogni giornata di lettura, per ciascun operatore, dovrà essere riverificata la lettura di una listella scelta a caso, tramite doppia lettura da parte dell'operatore e verifica successiva del referente. Le letture in triplo, effettuate giornalmente, verranno inserite in apposito file di calcolo riportante il codice della listella, il numero di uova lette nelle due sessioni dall'operatore e il numero di uova lette dal referente. (Allegato 4)

12.2 Verifica periodica interlaboratorio

Per almeno due volte nel periodo di monitoraggio verranno conservate 10 listelle già lette per ciascuna provincia, con un adeguato numero di uova, che verranno inviate al

<p style="text-align: center;">Arpa Emilia-Romagna</p>	<p style="text-align: center;">METODO DI PROVA</p>	<p style="text-align: center;">M/B/Am/003/LM</p>
<p><i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i></p>		<p style="text-align: right;">Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 9 di 17</p>

referente della Direzione Tecnica, corredate dall'elenco dei codici e dal relativo conteggio.

Il referente della Direzione Tecnica, sceglierà 10 listelle per ciascun operatore, le renderà anonime cambiando i codici identificativi e le invierà in modo organizzato agli operatori che effettuano la ri-lettura. I risultati della ri-lettura di verifica verranno inviati al Referente della Direzione tecnica.

Tutti i dati raccolti saranno inseriti in apposito file di calcolo (Allegato 5)

13. TRASMISSIONE DATI DEI CONTROLLI DI QUALITA'

Tutte le elaborazioni dei controlli di qualità e verifiche verranno trasmesse periodicamente al Responsabile Regionale del monitoraggio.

14. RIFERIMENTI

Bellini R., Carrieri M., Burgio G., Bacchi M., 1996. Efficacy of different ovitraps and binomial sampling in *Aedes albopictus* surveillance activity. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12(4):632-636

Bellini R., Carrieri M., Bacchi M., Benedetti A.. 1997. Terzo anno di attività del programma di lotta ad *Aedes albopictus* a Desenzano del Garda, Sirmione e Lonato. *Disinfestazione* 14 (3): 51-56.

Romeo Bellini, Rodolfo Veronesi, Claudio Venturelli, Paola Angelini *Linee guida per gli operatori dell'Emilia – Romagna “ Per una strategia integrata di lotta alla zanzara tigre* Servizio Sanitario Emilia Romagna e Regione Emilia Romagna. Bologna, 2008.

Istruzione Operativa Regione Emilia Romagna *Protocollo Monitoraggio Aedes albopictus tramite ovitrappole – Protocollo operativo regionale per il monitoraggio ANNO 2011.*

Romi R.. 1996. Linee guida per la sorveglianza e il controllo di *Aedes albopictus* in Italia. Rapporti ISTISAN, 96/4, 51 pp.

Romi R.. 2001. *Aedes albopictus* in Italia: un problema sottovalutato. Ann. Ist. Super. Sanità 37(2): 241-247.

Indice di concordanza, accuratezza e validità di un test
http://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/screen/ind_con.htm

Arpa Emilia-Romagna	METODO DI PROVA	M/B/Am/003/LM
<i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i>		Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 10 di 17

Environmental Quality - Environmental Statistics United States-identification and Handling of Outliers Army. Corps of Engineers. (<http://140.194.76.129/publications/eng-manuals/em1110-1-4014/a-i.pdf>)

MINITAB: SW Commerciale di calcolo statistico (Minitab Inc.)

15. ALLEGATI

- Allegato 1 – Immagini di tipologie di listelle con le modalità di conta
- Allegato 2 – Scheda di raccolta dati – valutazione qualitativa
- Allegato 3 – Scheda di raccolta dati N°1 e N°2 – valutazione quantitativa
- Allegato 4 - **Verifica interna giornaliera**
- Allegato 5 - **Verifica periodica interlaboratorio**

16. TABELLA RIASSUNTIVA DELLE REVISIONI

Rev.	Data	Descrizione	Verifica	Approvazione
0		Prima emissione		
1	08/06/2011	Modifica par 10-11-12		
2	09/05/2013	Modifica par 9.3 e 10		
3	05/02/2015	Modificato titolo, par 1-3-5-6-7-8-9.1-9.2-9.3-10-10.1-10.2-11.1-11.2-14-15-16 allegati 1 e 2. Inserimento paragrafi 12-13 e Allegati 3-4-5		

<p style="text-align: center;">Arpa Emilia-Romagna</p>	<p style="text-align: center;">METODO DI PROVA</p>	<p style="text-align: center;">M/B/Am/003/LM</p>
<p><i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i></p>		<p style="text-align: right;">Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 11 di 17</p>

Allegato 1 Immagini di tipologie di listelle con le modalità di conta



N° uova conteggiate = 16



N° uova conteggiate:
2 *Aedes albopictus*
4 *Aedes geniculatus*

<p align="center">Arpa Emilia-Romagna</p>	<p align="center">METODO DI PROVA</p>	<p align="center">M/B/Am/003/LM</p>
<p><i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i></p>		<p align="right">Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 12 di 17</p>



N° uova conteggiate = 16

Uovo disidratato e rotto

Uovo schiuso (1 sola parte presente)

3 Uova disidratate o "collassate"

Uovo schiuso (2 parti presenti)



N° uova conteggiate = 2

Arpa Emilia-Romagna	METODO DI PROVA	M/B/Am/003/LM
<i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i>		Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 13 di 17

Allegato 2 - Scheda di raccolta dati – valutazione qualitativa

SCHEDA RACCOLTA DATI

VALUTAZIONE QUALITATIVA

Nome:

Cognome:

OPERATORE A	ID Microscopio	Presenza/Assenza	
		Ae.albopictus	Altre spp.

DATA

FIRMA

Arpa Emilia-Romagna	METODO DI PROVA	M/B/Am/003/LM
<i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i>		Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 14 di 17

Allegato 3 - Scheda di raccolta dati N°1e N°2 – valutazione quantitativa

Nome Cognome

VALUTAZIONE QUANTITATIVA

SCHEDA RACCOLTA DATI N°1

OPERATORE A	ID Microscopio	Numero uova
Prima lettura	1	
Prima lettura	2	
Prima lettura	5	
Prima lettura	6	
Prima lettura	4	
Prima lettura	3	

DATA

FIRMA

Arpa Emilia-Romagna	METODO DI PROVA	M/B/Am/003/LM
<i>Individuazione e conteggio delle uova di Aedes albopictus deposte su listelle in ovitrappole</i>		Revisione 3 del 09/02/2015 Pag. 15 di 17

Nome Cognome
Data

VALUTAZIONE QUANTITATIVA
SCHEMA RACCOLTA DATI N°2

OPERATORE A	ID Microscopio	Numero uova
Seconda lettura	1	
Seconda lettura	3	
Seconda lettura	6	
Seconda lettura	2	
Seconda lettura	4	
Seconda lettura	5	

DATA

FIRMA

