



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

XXVIII CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE DELLA RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO

Indirizzo: Genetico Molecolare

Settore scientifico-disciplinare: MED/42 Igiene Generale e Applicata

**Sorveglianza
e caratterizzazione molecolare
di Arbovirus nel Friuli Venezia Giulia**

DOTTORANDA

ILARIA CARACCIOLO

COORDINATORE

PROF.SSA GIULIANA DECORTI

SUPERVISORE DI TESI

PROF. PIERLANFRANCO D'AGARO

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

SOMMARIO

PREMESSA.....	1
1. INTRODUZIONE.....	3
1.1. ARBOVIRUS.....	3
1.2. FAMIGLIA FLAVIVIRIDAE, GENERE FLAVIVIRUS.....	7
1.2.1. GENOMA, CARATTERISTICHE STRUTTURALI E REPLICAZIONE	11
1.3. TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS	14
1.3.1. CARATTERISTICHE E SOTTOTIPI DEL TBEV	14
1.3.1. GENOMA E STRUTTURA	16
1.3.2. PATOGENESI E MANIFESTAZIONI CLINICHE	17
1.3.3. DIAGNOSI E TERAPIA.....	18
1.3.4. EPIDEMIOLOGIA.....	20
1.4. WEST NILE VIRUS.....	34
1.4.1. CLASSIFICAZIONE E LINEAGE DEL WEST NILE VIRUS	34
1.4.2. REPLICAZIONE, PATOGENESI E MANIFESTAZIONI CLINICHE	37
1.4.3. DIAGNOSI E TERAPIA.....	41
1.4.4. EPIDEMIOLOGIA DEL WEST NILE VIRUS.....	42
1.5. DENGUE VIRUS	50
1.5.1. CLASSIFICAZIONE E SIEROTIPI DEL DENGUE VIRUS	50
1.5.2. GENOMA.....	50
1.5.3. PATOGENESI E MANIFESTAZIONI CLINICHE	51
1.5.4. DIAGNOSI E TERAPIA.....	54
1.5.5. EPIDEMIOLOGIA.....	56
1.6. FLAVIVIRUS EMERGENTI.....	63
1.6.1. USUTU VIRUS	63
1.6.2. ZIKA VIRUS	68
1.6.3. MARISMA VIRUS.....	72
1.7. FAMIGLIA TOGAVIRIDAE, GENERE ALPHAVIRUS	74
1.7.1. GENOMA, CARATTERISTICHE STRUTTURALI E REPLICAZIONE	75
1.7.2. PATOGENESI E MANIFESTAZIONI CLINICHE	78
1.8. CHIKUNGUNYA VIRUS	79
1.8.1. CLASSIFICAZIONE E SOTTOTIPI DEL CHIKUNGUNYA VIRUS	79
1.8.2. GENOMA E REPLICAZIONE	80
1.8.3. MANIFESTAZIONI CLINICHE	81

1.8.4. DIAGNOSI E TERAPIA	82
1.8.5. EPIDEMIOLOGIA	83
1.8. FAMIGLIA BUNYAVIRIDAE, GENERE BUNYAVIRUS.....	88
1.8.1. GENOMA, CARATTERISTICHE STRUTTURALI E REPLICAZIONE	89
1.8.2. PATOGENESI E MANIFESTAZIONI CLINICHE	90
1.8.3. DIAGNOSI E PREVENZIONE	91
1.8.4. PHLEBOVIRUS	92
1.8.5. TOSCANA VIRUS	93
2. SCOPO DELLA TESI	97
3. MATERIALI E METODI	99
3.1. IDENTIFICAZIONE DEL TBEV NEI VETTORI	99
3.1.1. RACCOLTA DELLE ZECHE E CAMPIONAMENTO.....	99
3.1.2. SUDDIVISIONE IN POOL E OMOGENEIZZAZIONE	103
3.1.3. ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI	103
3.1.4. CONTROLLO DI ESTRAZIONE	104
3.1.5. INDAGINI MOLECOLARI.....	105
3.1.6. SEQUENZIAMENTO ED ANALISI FILOGENETICA.....	106
3.1.7. ANALISI FILOGENETICA.....	111
3.1.8. COLTURE CELLULARI	111
3.1.9. ANALISI STATISTICA.....	112
3.2. IDENTIFICAZIONE DEL TBEV IN CAMPIONI UMANI.....	113
3.2.1. DIAGNOSI SIEROLOGICA	113
3.2.2. DIAGNOSI MOLECOLARE.....	114
3.2.3. GENOTIPIZZAZIONE DEI CAMPIONI POSITIVI	114
3.2.4. ISOLAMENTO VIRALE	115
3.2.5. TEST DI RIDUZIONE DI NEUTRALIZZAZIONE DELLE PLACCHE	115
3.2.6. CENTRIFUGAZIONE IN GRADIENTE DI DENSITÀ.....	117
3.3. IDENTIFICAZIONE DEL WEST NILE VIRUS.....	117
3.3.1. DIAGNOSI SIEROLOGICA	118
3.3.2. DIAGNOSI MOLECOLARE.....	118
3.3.3. GENOTIPIZZAZIONE DEI CAMPIONI POSITIVI	120
3.3.4. ISOLAMENTO VIRALE	122
3.3.5. TEST DI RIDUZIONE DI NEUTRALIZZAZIONE DELLE PLACCHE	122
3.4. IDENTIFICAZIONE DEL DENGUE VIRUS	122

3.4.1. DIAGNOSI SIEROLOGICA	122
3.4.2. DIAGNOSI MOLECOLARE.....	123
3.4.3. GENOTIPIZZAZIONE DEI CAMPIONI POSITIVI	123
3.5. IDENTIFICAZIONE DEL CHIKUNGUNYA VIRUS	124
3.5.1. DIAGNOSI SIEROLOGICA	124
3.5.2. DIAGNOSI MOLECOLARE.....	125
3.6. REAL-TIME RT-PCR PER ZIKA VIRUS	126
3.7. REAL-TIME RT-PCR FLAVIVIRUS UNIVERSALI (Pan-Flavi)	126
4. RISULTATI.....	128
4.1. IDENTIFICAZIONE DEL TBEV NEI VETTORI	128
4.2. IDENTIFICAZIONE DEL TBEV IN CAMPIONI UMANI.....	147
4.3. IDENTIFICAZIONE DEL WNV	153
4.4. IDENTIFICAZIONE DI CHIKUNGUNYA E DENGUE VIRUS.....	162
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	167
6. BIBLIOGRAFIA	177
PUBBLICAZIONI.....	196

PREMESSA

Negli ultimi anni i cambiamenti climatici e la globalizzazione hanno aumentato il rischio di introduzione e di diffusione di patologie trasmesse da vettori (vector-borne diseases - VBDs) in molti paesi europei, Italia inclusa. In questo progetto di ricerca la nostra attenzione si è focalizzata sulle infezioni causate da Arbovirus (acronimo di ARthropod-BOrne virus).

In Italia è stata registrata la circolazione di Tick-borne encephalitis virus (TBEV), virus trasmesso dalla zecca *Ixodes ricinus*, e di virus trasmessi da vettori di origine tropicale come il West Nile virus (WNV), l'Usutu virus (USUV), il Chikungunya virus (CHIKV). Negli ultimi anni si è verificato un incremento di casi importati di Dengue virus (DENV) e CHIKV e per questo motivo si è attuato un sistema di sorveglianza ad ampio raggio al fine di monitorare tali infezioni.

Grazie alle attività di sorveglianza da noi condotte sia sui casi umani che sui vettori (per quanto riguarda il TBEV), è stato possibile confermare che anche nella regione Friuli Venezia Giulia circolano virus come il TBEV ed il WNV e che vi sono casi importati sia di WNV, DENV e CHIKV. Risulta quindi importante tenere rigorosamente monitorate queste infezioni poiché sono stati documentati anche casi di donatori (di sangue e di organi e tessuti) asintomatici infetti.

La sorveglianza di Arbovirus su campioni clinici è stata condotta sia con tecniche molecolari che sierologiche. Poiché in fase acuta di infezione è possibile individuare l'RNA virale mediante tecniche molecolari, i campioni di sangue intero in EDTA, liquor e urine sono stati analizzati mediante RT-Real-Time PCR. Nel caso della ricerca di WNV si utilizza oltre ad una Real Time home made, un kit commerciale in grado di rilevare e quantificare l'RNA. In entrambi i casi si tratta di saggi molto sensibili e specifici che consentono di riscontrare tutti i vari Lineage del WNV circolanti in Italia e nelle zone limitrofe. La riproducibilità dei risultati ottenuti dalle due metodiche è stata verificata testando i pannelli per proficiency test QCMD 2011-2013-2014-2015 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito). Ogni 1-2 anni infatti vengono inviati presso il nostro laboratorio controlli di qualità, denominati Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD), per il miglioramento della qualità della diagnostica

molecolare. Nel 2015 sono stati eseguiti i QCMD per WNV, DENV e anche per CHIKV. Nel siero e nel liquor di pazienti con sospetta encefalite da TBEV o WNV si sono cercati anticorpi IgM e IgG specifici mediante test immuno-enzimatico (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay). I campioni in cui si sono riscontrate le IgG sono stati poi sottoposti al test di avidità, per poter stabilire se l'infezione era più o meno recente. Per monitorare le infezioni da CHIKV e DENV, invece, si è utilizzato il test sierologico dell'immunofluorescenza indiretta.

Per confermare le positività di WNV e TBEV si è utilizzata la metodica delle placche messa a punto durante il secondo anno di dottorato. Il test di neutralizzazione di riduzione delle placche PRNT (Plaque Reduction Neutralization Test) è utile per rilevare gli anticorpi neutralizzanti ed incrementare la sensibilità e la specificità ovviando il problema della cross reattività degli anticorpi tra i diversi Flavivirus. Precedentemente WNV e TBEV sono stati titolati mediante test delle placche.

Infine, la ricerca del TBEV è stata eseguita anche nei vettori che lo trasmettono ovvero le zecche *I. ricinus*. Le zecche, raccolte nel Friuli Venezia Giulia, sono state suddivise in pool ed omogenate; successivamente la ricerca del virus è stata effettuata mediante real-time RT-PCR. I campioni positivi sono stati sequenziati per poter costruire alberi filogenetici al fine di identificare i ceppi circolanti nella nostra regione.

1. INTRODUZIONE

1.1. ARBOVIRUS

Una zoonosi è una malattia o infezione di origine virale, batterica e protozoica, che viene trasmessa all'uomo da animali vertebrati, roditori e altri mammiferi, ma anche artropodi (zanzare, zecche, flebotomi).

Gli Arbovirus, dall'inglese arthropod-borne viruses, sono altamente patogeni per l'uomo e per gli animali poiché agenti eziologici di alcune zoonosi, chiamate arbovirosi. Gli Arbovirus sono virus mantenuti in natura grazie ad un ciclo biologico che coinvolge un vertebrato come ospite ed un artropode ematofago come vettore (Figura 1) [Go et al., 2014].

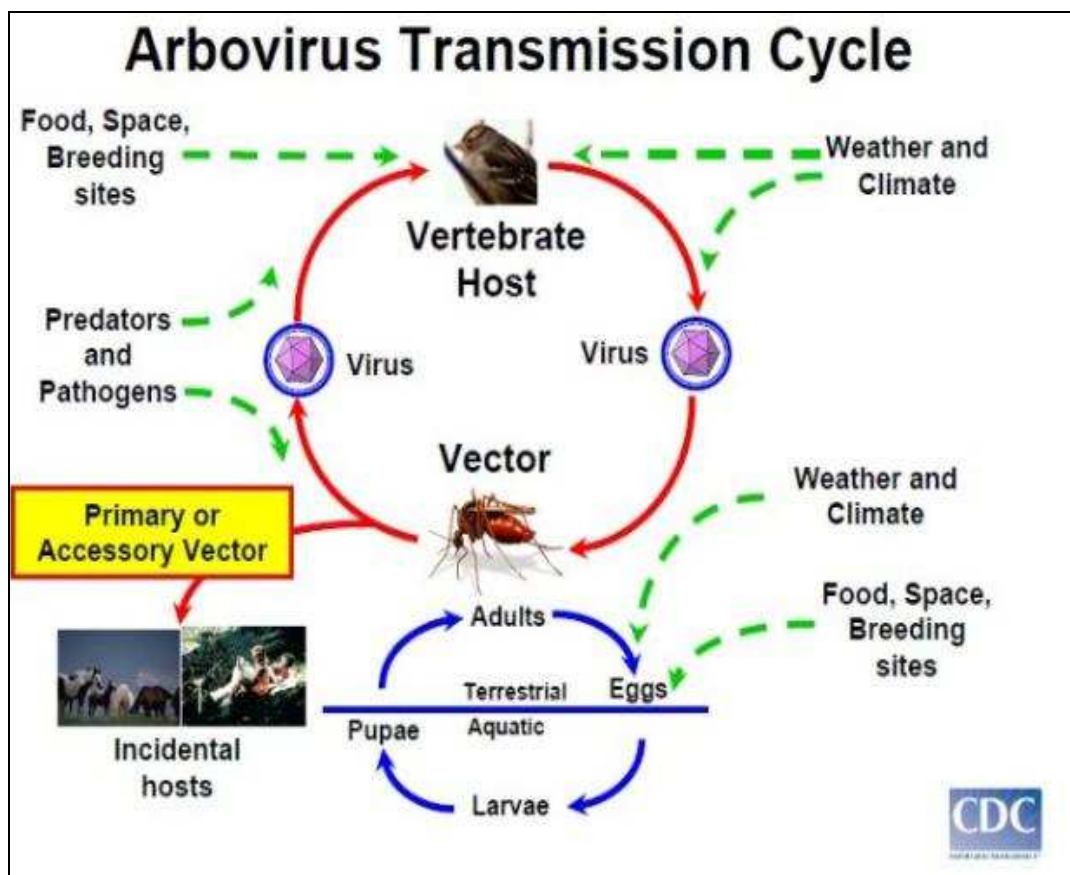


Figura 1. Ciclo biologico degli Arbovirus.

La trasmissione delle arbovirosi può avvenire tramite diversi cicli (Figura 2):

1. Ciclo enzootico (sylvatic or jungle cycle): avviene tramite la naturale trasmissione tra animali selvatici (ospiti vertebrati) e vettori; il virus si replica nei vettori e gli ospiti vertebrati fungono da reservoir, cioè da serbatoi dell'infezione che possono ospitare il virus per lunghi periodi di tempo pur non manifestando sintomatologia. Pertanto i reservoir sono definiti come ospiti primari e possono essere infettati più volte nel corso della loro vita.
2. Ciclo epizootico (rural cycle): il virus viene trasmesso tra animali non selvatici o domestici e i vettori. Possono originare focolai epidemici di infezione in popolazioni di animali domestici dove il virus si replica (amplifying host) e spesso in questo ciclo viene coinvolto anche l'uomo (per esempio Japanese encephalitis virus, Venezuelan equine encephalitis virus).
3. Ciclo epidemico o urbano (urban cycle): l'uomo, sviluppando elevati livelli di viremia, è il principale serbatoio di infezione; uno dei vettori principalmente coinvolti in questa modalità di trasmissione è la zanzara *Aedes aegypti* (Dengue virus, Yellow fever virus, St. Louis encephalitis virus, Chikungunya virus, Rift Valley fever virus).
4. Ospiti accidentali, occasionali o a fondo cieco: l'uomo è talvolta un ospite a fondo cieco ovvero non sviluppando una viremia sufficiente e non essendo fonte di amplificazione virale non può trasmettere a sua volta l'infezione ai vettori (Eastern equine encephalitis virus, Western equine encephalitis virus, West Nile virus, Sindbis virus).

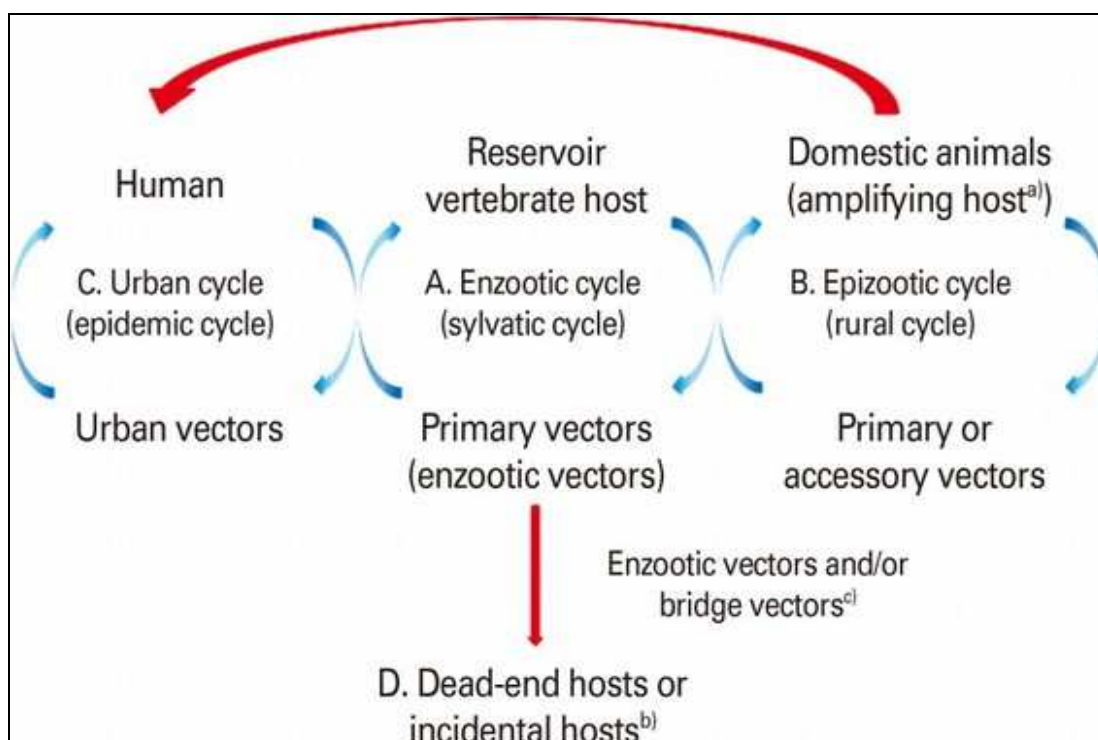


Figura 2. Cicli di trasmissione degli Arbovirus;

A. ciclo enzootico, B. ciclo epizootico, C. ciclo epidemico, D. ospiti a fondo cieco o accidentali;

a) ospiti in cui avviene l'amplificazione del virus e i vettori possono quindi infettarsi quando si nutrono da essi; b) ospiti a fondo cieco o occasionali sono ospiti intermedi che generalmente non sviluppano una viremia elevata da consentire ad un vettore di infettarsi; c) vettori ponte, cioè artropodi che acquisiscono il virus da animali selvatici infetti e successivamente trasmettono il patogeno all'uomo o ad un ospite secondario [Go et al., 2014].

Gli Arbovirus sono virus ad RNA la cui classificazione si basa sia su caratteristiche strutturali sia su criteri ecologici. Le famiglie virali maggiormente rappresentate sono quelle dei Bunyaviridae, dei Flaviviridae e dei Togaviridae [Hernandez et al., 2014]. Tra le arbovirosi più importanti di interesse medico vi sono l'encefalite trasmessa dalla zecca del genere *Ixodes ricinus* e la malattia da West Nile Virus che è una zoonosi veicolata dalla zanzara comune del genere *Culex*. Altre Arbovirosi tra cui Dengue e Chikungunya hanno l'uomo come ospite principale e sono trasmesse da zanzare del genere *Aedes*. In Italia il vettore potenzialmente più efficace è *Aedes albopictus*, meglio conosciuta come zanzara tigre, introdotta nel 1990 in relazione al commercio di pneumatici usati, e attualmente diffusa in tutta la penisola.

Nell'elenco sottostante vengono indicati le principali arbovirosi di interesse medico suddivise per famiglie:

Famiglia FLAVIVIRIDAE (Genere Flavivirus)

- * St. Louis encephalitis
- * Japanese encephalitis
- * Yellow fever
- * Dengue 1, 2, 3, 4
- * West Nile
- * Marisma
- * Rocio
- * Usutu
- * Zika
- * Tick-borne encephalitis
- * Louping ill
- * M. foresta Kyasanu
- * Febbre emorragica di Omsk
- * Powassan

Famiglia TOGAVIRIDAE (Genere Alphavirus)

- * Eastern Equine encephalitis
- * Western Equine encephalitis
- * Venezuelan equine encephalitis
- * Chikungunya
- * Barmah forest
- * Mucambo
- * Ross River

Famiglia BUNYAVIRIDAE

- * Bunyavirus
- * Phlebovirus
 - Febbre della Valle del Rift
 - Sand fly Fever - tipo Napoli
 - Sand fly Fever - tipo Sicilia
 - Toscana
- * Nairovirus
 - Febbre emorragica di Crimea e Congo

Quasi tutti questi virus originariamente circolavano in regioni tropicali di Africa e Sud America o in vari paesi asiatici; tuttavia oggi molti Arbovirus si trovano diffusi in tutto il mondo. Negli ultimi anni la globalizzazione, i cambiamenti climatici, l'aumento dell'urbanizzazione e della popolazione nelle regioni tropicali, l'aumento di viaggi e la rapidità dei trasporti e del commercio hanno contribuito alla diffusione anche in nuove aree dei vettori e quindi delle infezioni da loro trasmesse [Go et al., 2014].

La maggior parte di queste arbovirosi sono inapparenti; le forme sintomatiche si possono suddividere nei seguenti raggruppamenti:

- febbre con sintomi simil influenzali, con o senza rash maculopapulare
- encefalite e/o meningite
- mialgie e artralgie
- febbre emorragica

Spesso possono dar luogo ad una sintomatologia che comprende più di una di queste categorie [Hernandez et al., 2014].

1.2. FAMIGLIA FLAVIVIRIDAE, GENERE FLAVIVIRUS

I Flavivirus appartengono alla famiglia Flaviviridae, che sulle basi della filogenesi molecolare, si distingue in tre generi: il genere Flavivirus, che include ad esempio il West Nile virus (WNV), il Dengue virus (DENV) e Yellow fever virus (YFV); il genere Pestivirus (dal latino pestis, peste); il genere Hepacivirus (dal greco hepár, fegato), a cui appartiene il virus dell'epatite C (HCV). I virus membri di questa famiglia condividono morfologia del virione, organizzazione genomica e strategia di replicazione, ma presentano diverse proprietà biologiche [Kuno et al., 1998].

Il nome Flavivirus deriva dal termine latino flavus, giallo, ricordando l'ittero causato da Yellow fever Virus (YFV). Il genere Flavivirus è costituito da più di 70 specie divise in 3 gruppi, chiamati cluster, e 14 sierogruppi, denominati clade (Figura 3) [Kuno et al., 1998]. In base al tipo di vettore coinvolto si distinguono i cluster mosquito-borne flavivirus (MBF), tick-borne flavivirus (TBF) e virus no-known-vector per i quali non è ancora stato identificato un vettore (NKV).

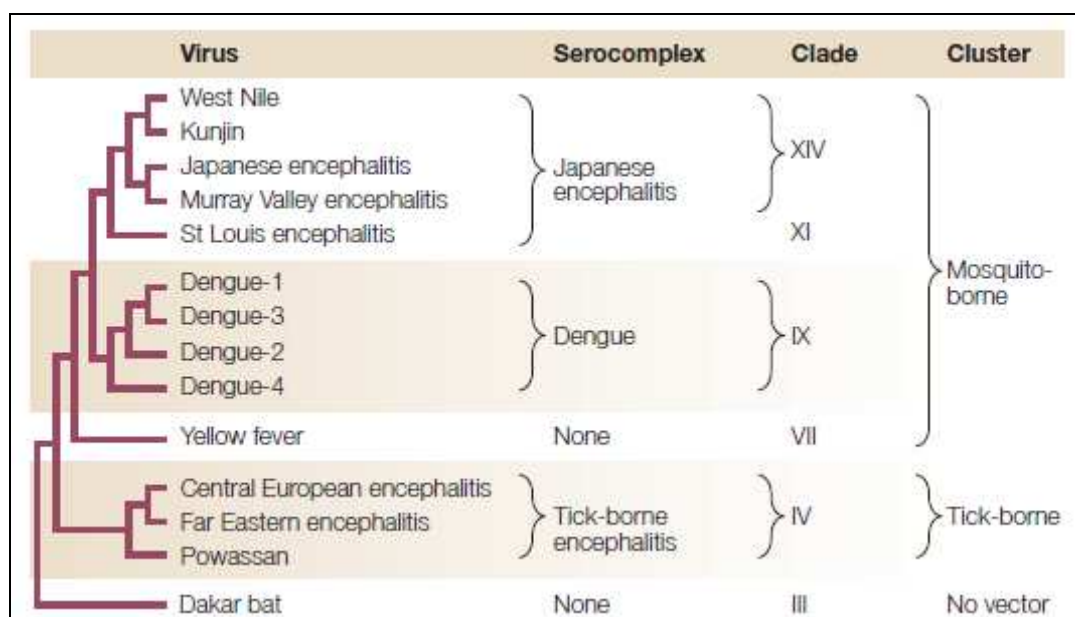


Figura 3. Classificazione dei Flavivirus [Mukhopadhyay et al., 2005].

Mosquito-borne flavivirus

La distribuzione geografica dei mosquito-borne flavivirus (dal clade VI al clade XIV) è molto ampia e dipende dalla localizzazione dei vettori; questi virus si dividono in due distinti gruppi epidemiologici:

1. sierogruppo dei virus neurotropi: causa encefaliti nell'uomo e negli animali ed è rappresentato dal Japanese encephalitis sierocomplex che comprende West Nile virus (WNV) e Japanese encephalitis virus (JEV); questi virus sono spesso correlati alle zanzare del genere *Culex* e hanno come reservoir i volatili;
2. sierogruppo dei virus non neurotropi: causa principalmente febbri emorragiche e include Dengue virus (DENV) e Yellow fever virus (YFV); questi virus sono spesso associati alle zanzare del genere *Aedes* [Gaunt et al., 2001; Colpitts et al., 2012].

Nello specifico, tra i Flavivirus trasmessi da zanzare troviamo:

- ✓ il sierogruppo del Calbertado virus;
- ✓ il virus del sierogruppo Aroa con l'Aroa virus (AROAV);
- ✓ il sierogruppo del virus Dengue che comprende i quattro sottotipi del Dengue virus (DENV1, 2, 3 e 4);

- ✓ il sierogruppo del Kedougou virus (KEDV);
- ✓ i virus del sierogruppo dell'encefalite giapponese a cui prendono parte Cacipacore virus (CPCV), Koutango virus (KOUV), Japanese encefalite virus (JEV), Murray Valley encefalite virus (MVEV), Virus dell'encefalite di Saint Louis (SLEV), Usutu virus (USUV), West Nile virus (WNV) e Yaounde virus (YAOV);
- ✓ i virus del sierogruppo Kokobera che include il Kokobera virus (KOKV);
- ✓ i virus del gruppo Ntaya includono Bagaza virus (BAGV), Ilheus virus (ILHV), Israel turkey meningoencephalomyelitis virus (ITV), Ntaya virus (NTAV), Tembusus virus (TMUV);
- ✓ i virus del gruppo Spondweni che comprende lo Zika virus (ZIKV);
- ✓ il sierogruppo Yellow fever in cui troviamo Banzi virus (BANV), Bouboni virus (BOUV), Edge Hill virus (EHV), Jugra virus (JUGV), Saboya virus (SABV), Sepik virus (SEPV), Uganda S virus (UGSV), Wesselsbron virus (WESSV) e Yellow fever virus (YFV).

Tick-borne flavivirus

I tick-borne flavivirus (clade IV e V) vengono veicolati da zecche e vedono coinvolti spesso i roditori come ospiti reservoir; possono essere a loro volta suddivisi in due gruppi:

1. Mammalian group, che infettano i mammiferi;
2. Seabird group, che infettano gli uccelli marini.

Il Tick-borne encephalitis virus (TBEV) appartiene al primo gruppo (clade IV), assieme a Louping ill (LIV) virus, Langat virus (LGTV), Central European encephalitis virus (CEEV), Russian spring-summer encephalitis virus (RSSEV), Omsk hemorrhagic fever virus (OHFV), Alkhurma hemorrhagic fever virus (ALKV), Kyasanur Forest disease virus (KFDV), Kadam virus (KADV), Powassan virus (POWV), Royal Farm virus (RFV), Karshi virus (KSIV), Gadgets Gully virus (GGYV). Tra questi, TBEV, CEEV, RSSEV, POWV e LIV causano encefalite nell'uomo e in altri mammiferi, OHFV, KFDV e AHFV sono responsabili di disturbi emorragici, LGTV è conosciuto come Virus non patogeno, mentre non sono stati riportati disturbi nell'uomo causati da KSIV, RFV o GGYV (Figura 4) [Gritsun et al., 2003; Turell, 2015].

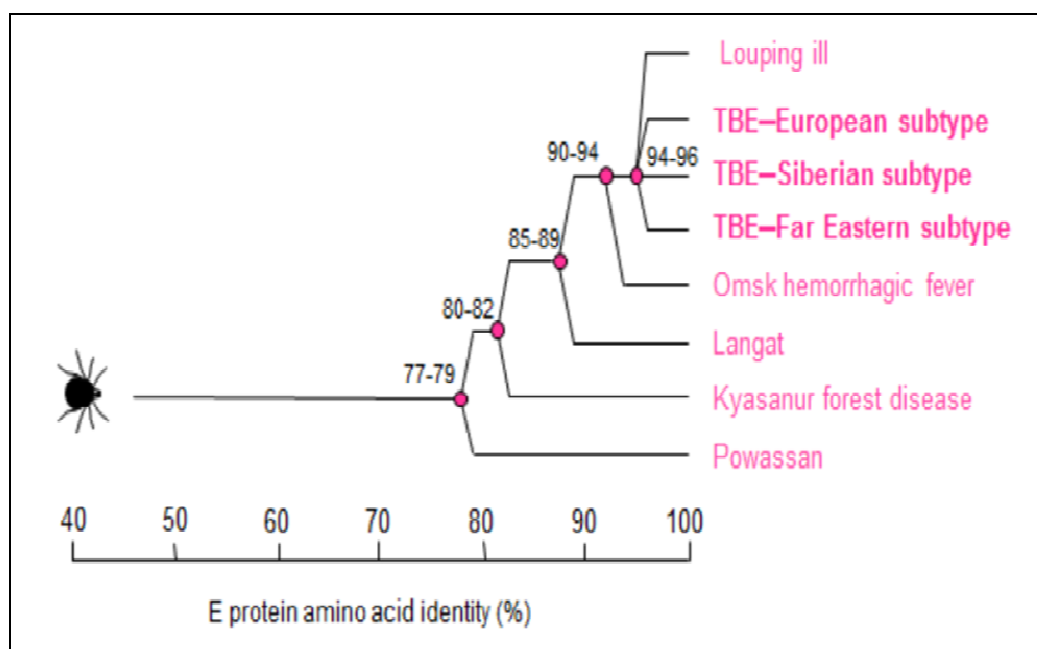


Figura 4. Sottotipi e relazioni filogenetiche dei tick-borne flavivirus.

No-known-vector-borne flavivirus

Gli NKV Flavivirus formano tre gruppi distinti:

1. primo gruppo: correlato con i mosquito-borne virus, associato ai pipistrelli;
2. secondo gruppo: associato ai pipistrelli come ospiti reservoir ma geneticamente distante dal primo;
3. terzo gruppo: associato ai roditori, probabilmente correlato filogeneticamente ai TBF [Gaunt et al., 2001].

Studi recenti hanno suddiviso la terza categoria di Flavivirus (NKV) in Un-known arthropod vector (UNKV), isolati dai mammiferi, ed Insect Flavivirus o Insect-specific Flavivirus. Il primo virus all'interno del gruppo degli Insect flavivirus è il Cell fusing agent virus (CFAV), isolato da cellule di *Aedes aegypti*. Il CFAV replica nelle zanzare e nelle colture cellulari di *Ae. Albopictus*, ma non in cellule di mammifero. Per la prima volta il CFAV è stato isolato a Porto Rico e in Thailandia, successivamente sono stati descritti diversi virus appartenenti a questo gruppo. Nel 2003 il Kamiti River virus (KRV) è stato isolato dalla specie *Aedes macintoshi* in Kenya; inoltre il Culex flavivirus (CXFV) è stato isolato e caratterizzato dalle zanzare *Culex sp.* in Giappone, Indonesia, Guatemala,

Trinidad, USA, Mexico e Uganda. Altri nuovi membri degli insect flavivirus sono il Quang Binh Virus (QBV) isolato da *Cx. tritaeniorhynchus* in Vietnam, Nakiwogo Virus (NAKV) isolato dalla specie *Mansonia africana nigerrima* in Uganda e il Calbertado virus identificato principalmente nelle zanzare *Cx. tarsalis* nel nord America. L'Aedes flavivirus (AEFV) è stato isolato da *Aedes albopictus* e *Aedes flavopictus* in Giappone ed è correlato al CFAV e al KRV. In Europa sono stati riportati diversi Insect flavivirus in zanzare *Ochlerotatus* sp., *Culex* sp. e *Aedes* sp. raccolte in Italia, Spagna, Portogallo, Regno Unito e Repubblica Ceca [Roiz et al., 2012].

1.2.1. GENOMA, CARATTERISTICHE STRUTTURALI E REPLICAZIONE

Il genoma dei Flavivirus è costituito da un singolo filamento lineare di RNA a polarità positiva di circa 11.000 nucleotidi (Figura 5). Nel genoma si distingue un lungo segmento ORF (Open Reading Frame) incluso tra due regioni non codificanti (non coding regions, NCR) e altamente conservate, una all'estremità 5' (5' NCR) e una all'estremità 3' (3' NCR). Le regioni NCR, denominate anche NTR (not translated regions) o UTR (untranslated regions), constano rispettivamente di 130 e 400-700 nucleotidi. La regione 5' NCR funge da innesco di traduzione.

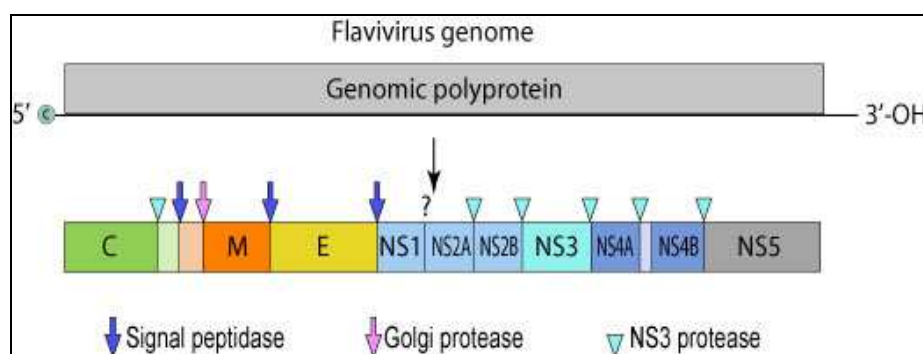


Figura 5. Organizzazione del genoma dei Flavivirus.

La singola ORF codifica per un'unica poliproteina che viene scissa in 10 proteine da proteasi virali e della cellula ospite: 3 proteine strutturali, denominate proteina E (envelope o mantello), proteina C (nucleocapside) e proteina prM (precursore di membrana) e 7 proteine non strutturali NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Le sequenze codificanti più vicine all'estremità 5' (N-terminale) codificano per le proteine strutturali

mentre le proteine non strutturali (proteasi, elicasi e polimerasi) sono codificate da sequenze più vicine all'estremità 3' [Mukhopadhyay et al., 2005; Lindquist et al., 2008; Hernandez et al., 2014].

I Flavivirus vengono rapidamente inattivati dall'esposizione al calore: in dieci minuti a 50°C perdono già il 50% della loro infettività. Sono inoltre sensibili a disinfettanti, solventi dei lipidi e detergenti mentre risultano stabili a pH 8, in condizioni di laboratorio.

La struttura dei virioni dei Flavivirus, rivelata grazie alle tecniche di microscopia elettronica (cryoEM), varia durante gli stadi maturativi del virus [Mukhopadhyay et al., 2005]. I virioni immaturi (Figura 6) appaiono come particelle sferiche o pleomorfe di circa 40-60 nm e contengono un capsido o core denso di elettroni (circa 30 nm) a simmetria icosaedrica circondato da un envelope (o pericapside o mantello). Il capsido è composto da una singola proteina denominata proteina C di 100 amminoacidi. Sulla superficie del virione vi sono due glicoproteine ancorate, tramite il C-terminale, al doppio strato lipidico che circonda il core; queste sono la proteina E dell'envelope e la proteina prM, proteina precursore di membrana. Le proteine E e prM neosintetizzate vengono incorporate nel virione immaturo ed interagiscono tra loro per garantire il suo trasporto dal reticolo endoplasmatico (RE) verso l'esterno della cellula proteggendolo dall'ambiente acido degli endosomi [Allison et al., 1995; Guirakhoo et al., 1991]. Grazie al taglio di prM da parte della furin proteasi cellulare, il virione viene convertito nella forma attiva matura e rilasciato dalla cellula [Allison et al., 1999; Stadler et al., 1997]. Il virione maturo (diametro di circa 50 nm) è composto da un capsido icosaedrico avvolto da un envelope con le due proteine associate alla membrana, M ed E [Kuhn et al., 2002].

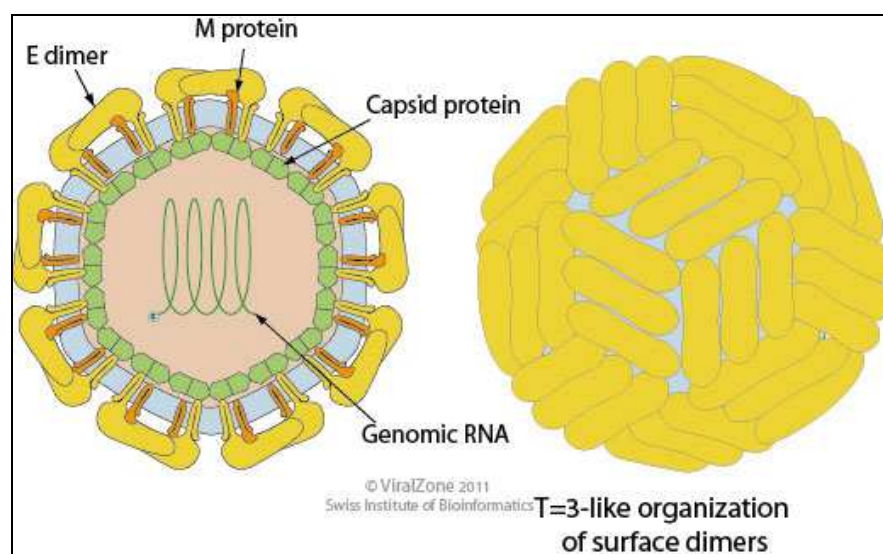


Figura 6. Rappresentazione del virione dei Flavivirus.

La glicoproteina E (50-60 kDa) è la componente principale della superficie virale, consente il legame dell'ospite al recettore e media la fusione del virione maturo con la membrana endosomiale. Il rilascio del genoma virale nel citoplasma si verifica dopo il cambio conformazionale indotto dal pH acido presente nell'endosoma. Inoltre questa proteina è responsabile della formazione di anticorpi neutralizzanti che determinano un'efficace immunità protettiva nell'ospite [Allison et al., 2001].

La proteina di membrana M è invece una proteina non glicosilata, associata all'envelope, ed è responsabile dei legami fra nucleocapside ed envelope e stimola anch'essa la produzione di anticorpi neutralizzanti.

La proteina del capsido C (11 kDa), rispetto alle altre due proteine strutturali, presenta una minore omologia tra i vari Flavivirus.

Vi sono poi le proteine non strutturali (NS), che intervengono, in vario modo, nella replicazione virale (espressione delle proteine, assemblaggio e rilascio delle particelle virali) e nell'elusione del sistema immunitario dell'ospite. Queste sono:

- * NS1: proteina implicata nella replicazione dell'RNA virale; mutazioni nei siti di glicosilazione possono portare a difetti in questo processo e nella produzione del virus [Lindenbach et al., 2007]. Sembra inoltre contribuire alla regolazione della risposta immunitaria innata ed è in grado di impedire l'attivazione del TLR3 [Wilson et al, 2008].
- * NS2A: proteina coinvolta nei processi di assemblaggio del capsido, inibizione della trascrizione ed espressione dell'INF-beta [Liu et al, 2004].
- * NS2B: proteina cofattore per la sintesi della serina proteinasi NS3.
- * NS3: proteina che partecipa alla replicazione virale e mostra attività NTPasica in associazione con NS5.
- * NS4A e NS4B: piccole proteine che agiscono durante la replicazione virale, inducendo riarrangiamenti della membrana del reticolo endoplasmatica dell'ospite per la formazione di vescicole contenenti dsRNA e polimerasi. NS4A sembra regolare l'attività ATPasi della NS3 elicasi, NS4B previene invece l'azione antivirale cellulare, mediante il blocco della produzione di interferone (INF) alfa e beta [Munoz-Jordan et al., 2005].
- * NS5: proteina multifunzionale di 130 kDa, maggiormente conservata tra i flavivirus; contiene all'N-terminale una metiltransferasi (MTase) e al C-terminale una RNA polimerasi-RNA dipendente (RdRp). L'attività di metiltransferasi consiste

nell'aggiungere gruppi metilici nella parte terminale degli RNA virali nascenti per proteggerli dalla degradazione e per consentire ai ribosomi cellulari di riconoscerli per la traduzione. Studi di mutagenesi hanno dimostrato che NS5 è essenziale durante la replicazione e contribuisce a prevenire l'azione antivirale da parte dell'INF; si pensa quindi che potrebbe essere un importante target antivirale per farmaci in grado di bloccare questo processo [Geiss et al., 2009; Laurent-Rolle et al., 2010].

L'entrata del virus nelle cellule ospiti avviene tramite endocitosi mediata da recettori; la proteina E virale lega lectine e glicosaminoglicani, in particolare l'eparan solfato, presenti sulla superficie cellulare [Lindquist et al., 2008; Mansfield et al., 2009]. L'endocitosi è di tipo clatrina-dipendente: dopo che il recettore si è legato al dominio DIII della proteina E, si forma una depressione sulla superficie cellulare che attira la clatrina e porta alla formazione delle cosiddette fossette rivestite. Queste si ripiegano ulteriormente fino a richiudersi per formare una vescicola che si fonderà poi con l'endosoma primario nel citoplasma; a questo punto avviene la fusione, durante la quale il rivestimento si rompe (scapsidamento) e la clatrina ritorna nella membrana plasmatica per formare una nuova fossetta rivestita. Una volta penetrato nella cellula, il virus perde il capsido e il genoma va incontro a replicazione. Questo processo consiste nella sintesi del filamento negativo di RNA, che funge da stampo per l'amplificazione di quello positivo. La reazione enzimatica è catalizzata dall'attività di NS5 in associazione con la proteasi virale NS3. Il virione assemblato subisce un processo di maturazione mediante la proteolisi di prM, per essere poi rilasciato sulla superficie cellulare per esocitosi [Villordo et al., 2009; Selisko et al., 2014].

1.3. TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

1.3.1. CARATTERISTICHE E SOTTOTIPI DEL TBEV

Il Tick-borne encephalitis virus (TBEV) appartiene al gruppo degli Arbovirus, alla famiglia Flaviviridae e al genere Flavivirus [Kuno et al., 1998].

Le analisi genetiche delle sequenze del gene E dei ceppi isolati, in differenti regioni geografiche, hanno permesso di distinguere tre sottotipi di TBEV denominati a seconda dell'area di maggiore circolazione: European o Western European o europeo, Siberiano o

siberiano e Far Eastern o asiatico (Figura 7).

Il sottotipo European è largamente distribuito in Europa occidentale e adopera come vettore *Ixodes ricinus*; il Far Eastern ed il Siberian vengono trasmessi da *I. persulcatus* e si riscontrano nell'Europa dell'Est (Russia, Estonia, Lettonia e Siberia) ed in Asia (Cina e Giappone) [Dumpis et al., 1999; Charrel et al., 2004; Ecker et al., 1999]. Vi sono tuttavia delle aree in cui si osserva una co-circolazione dei diversi sottotipi e dei due vettori, come ad esempio nei Paesi Baltici o in Finlandia [Mavtchoutko et al., 2000; Lindquist et al., 2008; Amicizia et al., 2013].

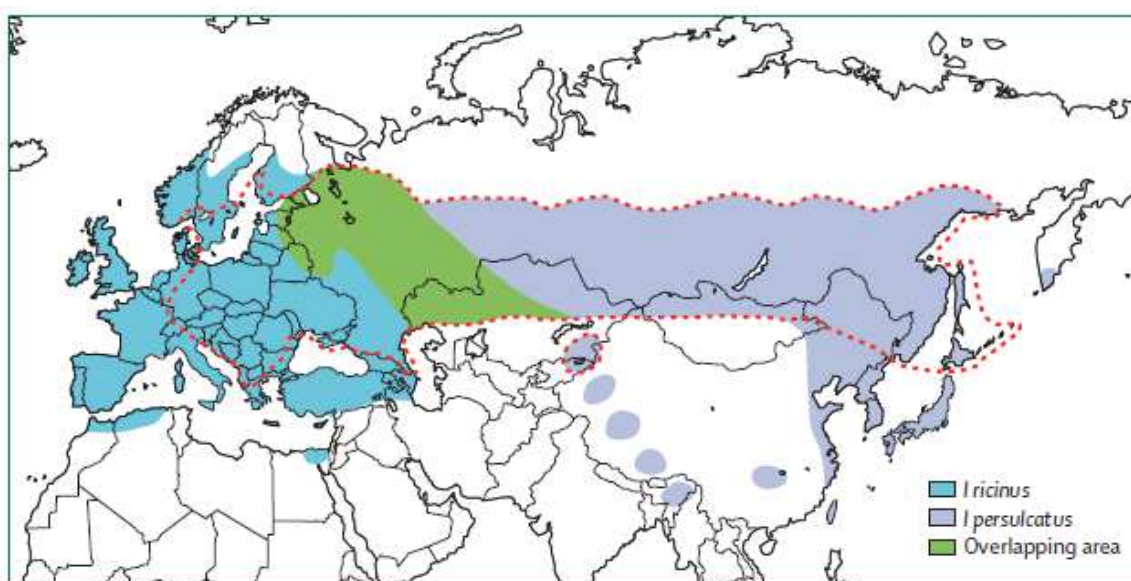


Figura 7. Distribuzione geografica dei sottotipi del TBEV e dei rispettivi vettori [Lindquist et al., 2008].

La variabilità intra-sottotipo è del 2.2%, mentre quella tra sottotipi è del 2-5.2% [Ecker et al., 1999]. I tre sottotipi sono correlati sia antigenicamente che filogeneticamente, ma mostrano patogenicità e decorso di malattia differenti [Bogovic et al., 2010; Gaumann et al., 2010]. È importante ricordare che il sottotipo European include i ceppi Neudoerfl, isolato in Austria nel 1971 da una zecca [Heinz et al., 1981], Hypr, isolato da sangue umano in Cecoslovacchia nel 1953, e altri ceppi isolati in Svizzera, Francia, Germania, Ungheria, Slovenia, Croazia, Finlandia. Al sottotipo Far Eastern appartengono i ceppi N132 (isolato nel 1997 a Wladiwostok), Absettarov, N256, Sofjin e altri ceppi provenienti dall'Europa dell'Est (Russia, Ucraina, Lituania), dalla Cina e dal Giappone. Il sottotipo Siberian, più vicino filogeneticamente al Far Eastern, include principalmente i ceppi Aina e Vasilchenko (Figura 8) [Ecker et al., 1999].

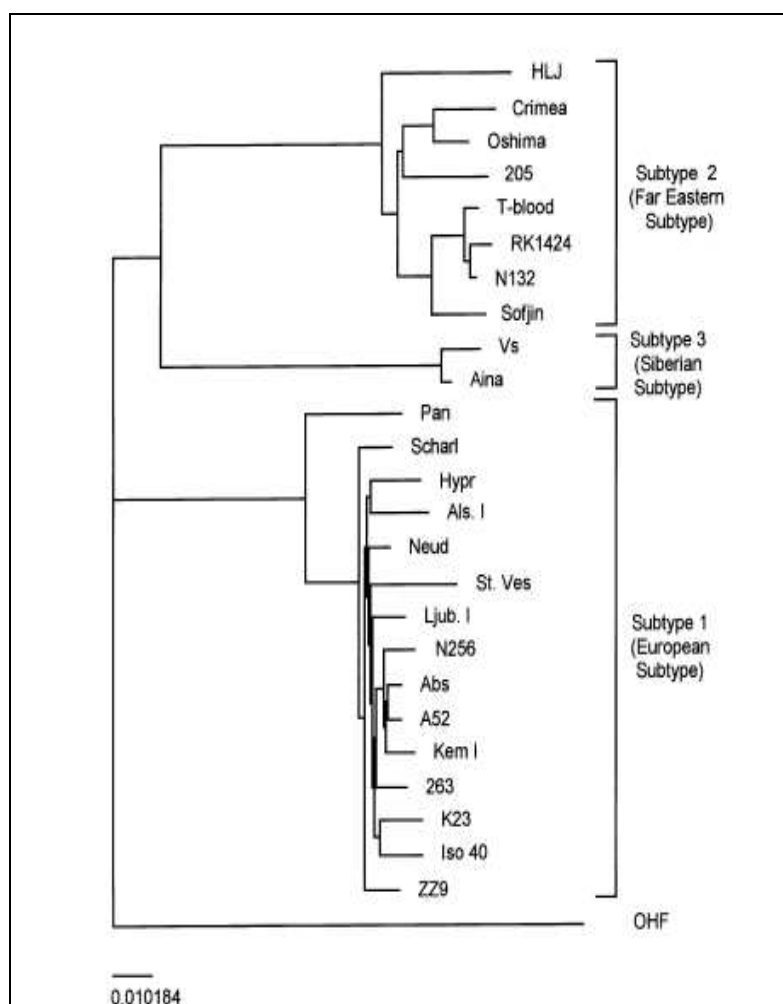


Figura 8. Albero filogenetico dei ceppi isolati di TBEV [Ecker et al., 1999].

1.3.1. GENOMA E STRUTTURA

Dal punto di vista strutturale il TBEV ha un diametro di 50 nm, simmetria icosaedrica e comprende il capsido che è costituito dal genoma ad RNA e dai dimeri della proteina C ed è circondato dall'envelope a cui sono ancorate due proteine E e prM. Quest'ultima subisce un taglio proteolitico che rende il virione maturo e quindi capace di liberarsi dalla cellula ed infettarne altre.

Il genoma, come per tutti i Flavivirus, è costituito da un singolo filamento lineare di RNA a polarità positiva di circa 11 kb. Si distingue un unico segmento ORF incluso tra due regioni non codificanti e altamente conservate alle due estremità. La ORF codifica per una poliproteina che viene scissa in 10 proteine da proteasi virali e dell'ospite. Le proteine più importanti dal punto di vista patogenetico e diagnostico sono la proteina strutturale E e la proteina non strutturale NS5. La prima consente il legame al recettore dell'ospite e costituisce il principale determinante antigenico, mentre la seconda è la proteina

maggiormente conservata tra i Flavivirus ed ha attività metiltransferasica e polimerasica [Lindquist et al., 2008].

1.3.2. PATOGENESI E MANIFESTAZIONI CLINICHE

Il TBE virus è trasmesso all'uomo attraverso due vie:

- * mediante morso di zecca infetta
- * per via alimentare (più raro), tramite ingestione di latte o formaggio non pastorizzato [Cisak et al., 2010].

L'infezione da TBEV può causare un ampio spettro di manifestazioni cliniche che vanno dall'infezione asintomatica alla meningoencefalite grave con o senza paralisi dipendenti dal sottotipo virale. Nel 70% dei casi l'infezione rimane silente dal punto di vista clinico, anche se possono essere dimostrati la viremia e la formazione di anticorpi. Solo il 10-30% degli infettati ha manifestazioni cliniche dopo un periodo di incubazione di 7-14 giorni o di 3-4 giorni nel caso in cui l'infezione sia avvenuta per via alimentare. Infatti l'attività del virus può essere osservata nel succo gastrico entro due ore dall'ingestione di tali alimenti [Bogovic et al., 2010].

La malattia causata dai due sottotipi orientali ha un andamento monofasico con coinvolgimento del sistema nervoso centrale e solo una piccola percentuale di casi presenta stati febbrili con mal di testa [Bogovic et al., 2010; Gaumann et al., 2010]; il sottotipo europeo mostra invece un andamento bifasico [Kaiser, 1999; Gritsun et al., 2003].

Dopo il morso della zecca, il virus del sottotipo europeo, si replica localmente a livello delle cellule epiteliali, migra ai linfonodi regionali da cui accede al torrente circolatorio determinando viremia (Figura 9). In seguito il virus raggiunge ed infetta diversi organi e tessuti e a questo corrisponde la prima fase clinica della malattia con sintomi simil-influenzali della durata di 2-7 giorni; segue un periodo di remissione con guarigione.

In una parte di pazienti dopo 2-4 settimane di benessere il virus può superare la barriera emato-encefalica, replicarsi nell'endotelio dei capillari cerebrali coinvolgendo il sistema nervoso centrale determinando l'insorgenza di meningite (50% dei casi), encefalite (40%) e meningo-encefalomielite (10%). La gravità della malattia aumenta con l'età: nei bambini e negli adolescenti la forma che predomina è la meningite. Nel 40-50% dei casi si possono avere sequele neurologiche per lungo tempo (mesi, anche anni), che si manifestano con paralisi, atassia e altri disturbi neurologici.

Le encefaliti causate dal sottotipo di TBEV centro-europeo sono fatali nell'1-2% dei casi, mentre quelle causate del sottotipo orientale nel 20-60%. Il terzo sottotipo invece è meno letale (1-3%), ma ha una tendenza maggiore a sviluppare forme di infiammazione cronica a causa di mutazioni nel gene NS1 [Bogovic et al., 2010; Gaumann et al., 2010; Kaiser, 2012].

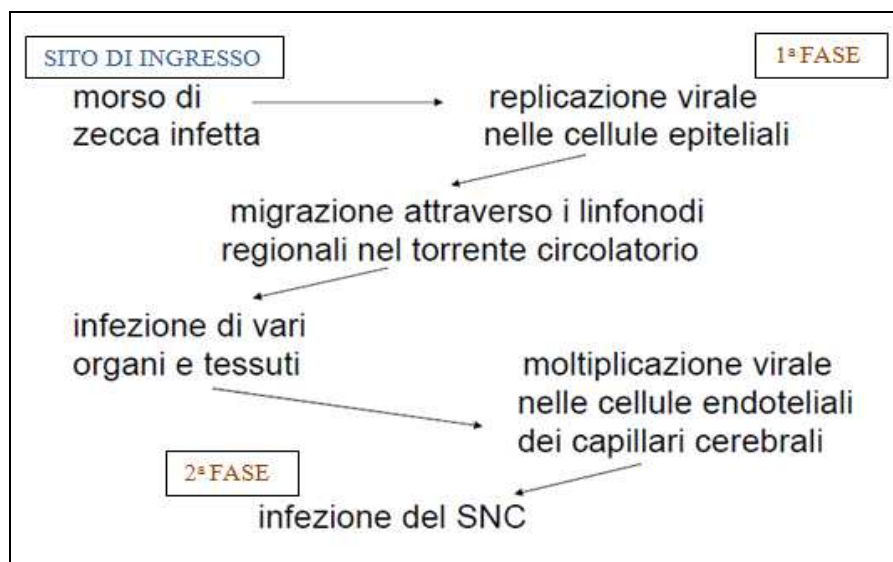


Figura 9. Diffusione del TBE Virus nell'organismo.

1.3.3. DIAGNOSI E TERAPIA

Un caso di TBE è definito dalla presenza di segni/sintomi clinici di meningite o meningo-encefalite e da una conferma microbiologica dell'infezione (dimostrazione di anticorpi specifici). I valori della Proteina C Reattiva e la sedimentazione eritrocitaria risultano leggermente aumentati; l'analisi del liquido cerebrospinale mostra un aumento dei leucociti (pleocitosi), accompagnato da normali livelli di glucosio e lattato [Bogovic et al., 2010].

La clinica unitamente al dato anamnestico della puntura di zecca pone il sospetto, ma la diagnosi di certezza è solo laboratoristica. La diagnosi dell'infezione da TBEV può essere talvolta complicata poiché:

- dal punto di vista clinico molti pazienti non mostrano sintomatologia fino ad un tardo decorso della malattia quando sono ormai evidenti i segni neurologici;
- si può riscontrare reattività crociata con anticorpi nei confronti di altri Flavivirus, che rende le analisi difficilmente interpretabili.

La diagnosi sierologica si basa sulla ricerca di anticorpi (IgM e IgG) diretti contro la proteina E utilizzando tecniche immunoenzimatiche ELISA o RIA (fissazione del

complemento, neutralizzazione anticorpale, inibizione dell'emoagglutinazione). Queste analisi vengono eseguite sul siero e sul liquido cerebrospinale e presentano una specificità e sensibilità maggiori del 99% [Bogovic et al., 2010]. I test sierologici sono molto sensibili ma purtroppo danno luogo a reazioni di reattività crociata tra i vari membri del genere *Flavivirus* poiché sono simili tra loro antigenicamente.

Nella fase acuta di infezione si dispone di tecniche di biologia molecolare per poter identificare il genoma virale mediante real-time RT-PCR su sangue intero, liquido cerebrospinale e urine, nelle quali recentemente si è scoperta la presenza del virus [Veje et al., 2014; Caracciolo et al., 2015]. Si può inoltre isolare il virus su colture cellulari in Laboratorio di Biosicurezza di livello 3 (Figura 10).

La dimostrazione della presenza del TBE virus nelle urine rappresenta un importante miglioramento dal punto di vista diagnostico perché questo tipo di campione è ottenibile in maniera non invasiva e in quantità cospicua. Tuttavia sono necessari ulteriori studi per capire se la presenza del virus nelle urine sia confinata a casi particolari, come ad esempio in soggetti immunodepressi, oppure possa essere ricercata nella diagnosi di routine.

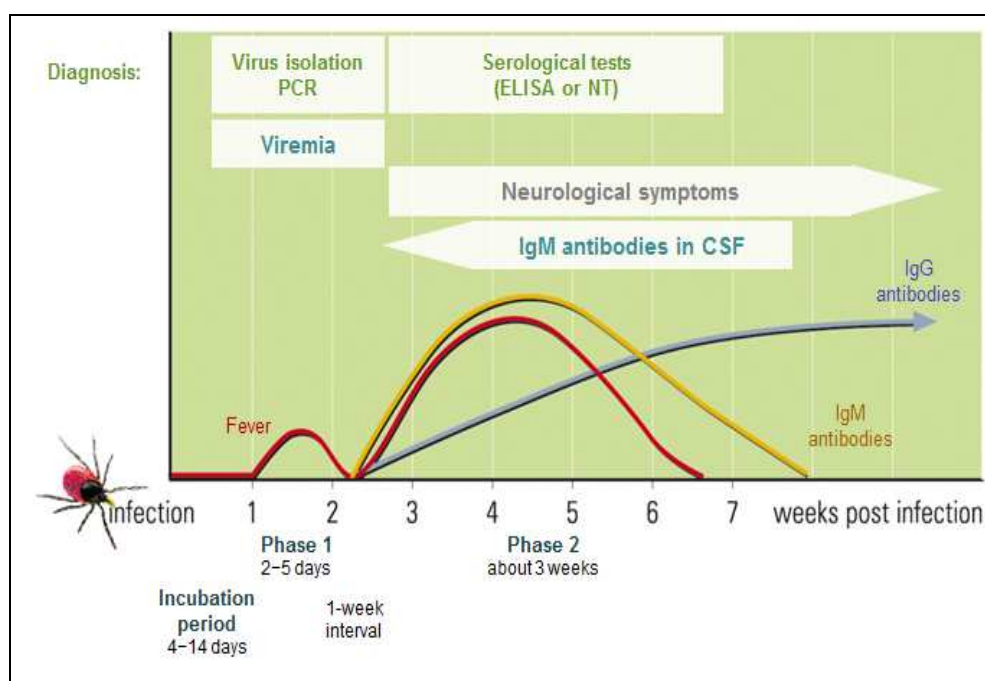


Figura 10. Tecniche diagnostiche e fasi cliniche del TBEV.

Diagnosi differenziale

La diagnosi differenziale è piuttosto estesa e complessa poiché include un'ampia varietà di

infezioni a carico del sistema nervoso e patologie che non vedono coinvolti agenti infettivi. Nella fase iniziale della TBE, ovvero la fase viremica, la diagnosi differenziale comprende diverse sindromi virali a causa dei sintomi aspecifici; se sono presenti nausea, vomito e diarrea, la gastroenterite potrebbe essere una possibile spiegazione. Quando iniziano a svilupparsi sintomi neurologici, la TBE ha bisogno di essere distinta da encefaliti o meningiti asettiche causate da altri virus, come ad esempio il West Nile virus. La diagnosi differenziale racchiude anche altre patologie causate da morso di zecca come la borelliosi di Lyme, babesiosi, anaplasmosi, rickettsiosi e tularemia. In molte regioni endemiche, inoltre, il TBEV si sovrappone geograficamente alla presenza di agenti batterici come *Anaplasma phagocytophilum* e *Borrelia burgdorferi*. Queste patologie sono entrambe trattabili con antibiotici perciò è utile poterle distinguere dalla TBE [Bogovic et al., 2015].

Terapia

Attualmente non esiste terapia eziologica ma solo sintomatica. Nella gestione dei casi clinici è indispensabile il mantenimento dell'equilibrio idrico e degli elettroliti, la somministrazione di antipiretici ed analgesici e, se necessario, di anticonvulsivi. Nei casi di meningite e/o encefalite è richiesto il ricovero ospedaliero e la fisioterapia degli arti paralizzati per prevenire l'atrofia muscolare [Kaiser, 2008].

1.3.4. EPIDEMIOLOGIA

Nel corso degli ultimi 20 anni si è osservato un aumento della prevalenza di zecche infette e parallelamente di incidenza della malattia nell'uomo con un ampliamento delle aree endemiche. Questo fenomeno dipende da una complessa interazione tra fattori climatici, umani, sociali ed economici. L'aumento della temperatura e delle precipitazioni influisce sul ciclo di sviluppo del vettore. L'abbandono delle aree coltivate ed il rimboschimento hanno creato un habitat adatto per la sopravvivenza e la diffusione dei vettori. Inoltre, l'incremento di viaggi ed attività lavorative/ricreative in aree endemiche favorisce l'esposizione al TBEV [Randolph et al., 2000; Randolph, 2008; Bogovic et al., 2015].

L'infezione da TBEV si trova solamente in piccole aree dove esistono le condizioni ideali per il suo mantenimento. Un'area endemica per TBEV è definita come una zona con comprovata circolazione di TBEV tra zecche e ospiti vertebrati o in cui vi è la conferma di almeno 20 anni di infezioni autoctone in animali o nell'uomo. Lo sviluppo di una foce naturale dipende da una varietà di fattori, tra cui la dinamica di popolazione dei vettori e

dei loro ospiti e la presenza di ospiti suscettibili al virus [Süss, 2011].

Cenni storici e distribuzione

Il TBEV è stato identificato per la prima volta nell'Unione Sovietica nel 1937 [Gritsun et al., 2003]. La trasmissione Ixodidi-mammiferi venne invece rivelata due anni dopo [Lindsquit et al., 2008] e il primo isolamento è avvenuto in Russia nel 1949 [Amicizia et al., 2013]. Data la stagionalità dell'attività delle zecche, da aprile a luglio, inizialmente la malattia venne chiamata meningo-encefalite primaverile-estiva (in tedesco Frühsommer-Meningoenzephalitis, da cui la sigla FSME), ma assume ormai più comunemente il nome di encefalite da zecche (in inglese Tick-Borne Encephalitis, da cui l'abbreviazione TBE).

La TBE è frequente in molti paesi dell'Europa (Figura 11) e del centro Asia. L'incidenza stimata è tra i 10 mila e i 15 mila casi all'anno, ma si tratta sicuramente di cifre sottostimate poiché la malattia non viene sempre notificata. Attualmente in molti Paesi europei, come nei Paesi Baltici, in Repubblica Ceca, in Russia ed in Slovenia, la TBE costituisce un importante problema di sanità pubblica poiché è in costante aumento [Amicizia et al., 2013; Bogovic et al., 2015]. In Austria, dove è stata realizzata un'intensa campagna vaccinale, morbosità e mortalità sono state drasticamente ridotte: prima dell'introduzione della vaccinazione nel 1981, l'incidenza della TBE era di circa 700 casi all'anno mentre oggi grazie alla intensiva copertura vaccinale si è ridotta del 90% [Donoso Mantke et al., 2011]. Questo può essere facilmente appreso da uno studio condotto tra il 1972 ed il 2011, e pubblicato di recente da Heinz e colleghi nel 2015. L'Austria rimane comunque un Paese ad alto rischio di contrarre la TBE per i turisti. Anche in Svizzera la vaccinazione di massa e la caratterizzazione di aree di rischio hanno diminuito notevolmente il tasso di incidenza [Gaumann et al., 2010]. La Germania è sicuramente uno degli stati dell'Europa occidentale più colpiti da TBE. In Francia il primo caso è stato diagnosticato nel 1968 e l'incidenza sembra essere di 5-10 casi all'anno, mentre sono stati documentati anche casi associati al consumo di latte crudo nella zona alpina. Negli Stati Baltici, soprattutto in Lettonia, l'incidenza è molto alta e, come già descritto, circolano tutti e tre i sottotipi virali. In Finlandia vengono registrati 20-40 casi all'anno ed in Norvegia circa 50, mentre in Svezia e Danimarca la TBE è meno diffusa ma è comunque presente. In Slovenia invece la TBE è considerata endemica a causa dell'alta incidenza e della bassa copertura vaccinale, soprattutto nella zona settentrionale (regioni Carinzia e Alta Carniola). Recentemente l'infezione si è diffusa nella costiera adriatica arrivando a colpire anche la

Croazia, la Serbia e la Bosnia-Herzegovina, dove sono stati documentati anche casi legati alla via alimentare. Anche in Albania e in Romania la TBE è endemica in particolare nella parte nord-est; alcuni studi hanno dimostrato una sieroprevalenza dello 0.6% nella popolazione romena. Nel nord della Grecia pare circolare un Flavivirus del sierogruppo del TBEV che a Salonicco ha generato casi clinici sporadici. Nell'Europa dell'Est, come Repubblica Ceca e Slovacchia, l'incidenza è piuttosto elevata fin dal 1997-98, mentre in Ungheria vi sono delle zone considerate endemiche e negli ultimi anni alcuni casi sono stati collegati all'assunzione di latte crudo. In Polonia sembrano essere più colpite le aree a nord-est e sud-ovest, in Ucraina sono state identificate tre aree endemiche, mentre in Bielorussia il virus circola sull'intero territorio. La Russia è considerato lo stato europeo a più alta incidenza: la TBE è endemica in almeno 44 degli 83 soggetti federali. Infine, fino ad oggi, in Belgio, Regno Unito, Irlanda, Lussemburgo, Paesi Bassi, Spagna, Portogallo e Malta non sono stati mai registrati casi autoctoni [Amicizia et al., 2013].

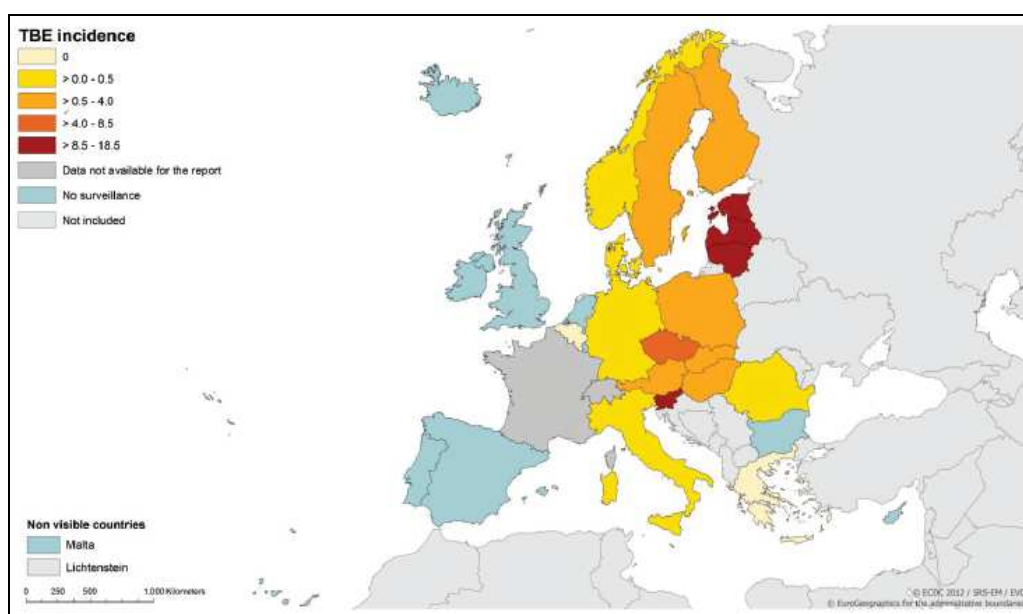


Figura 11. Incidenza di TBE per 100 mila abitanti nell'Unione Europea [Fonte ECDC].

In Italia la presenza di TBE è nota fin dagli anni '70 anche se ha un'importanza secondaria per la salute pubblica rispetto alla borreliosi di Lyme, infezione batterica causata dallo stesso vettore. Come per il resto dell'Europa i cambiamenti climatico-ambientali e l'abbondanza di ungulati hanno portato ad un aumento della popolazione delle zecche e secondariamente dell'incidenza dell'infezione [Rizzoli et al., 2009].

Il primo caso clinico di TBE è stato documentato in Toscana nel 1975; da allora casi sporadici sono stati riportati in Trentino-Alto Adige e Veneto. Tra il 1995-2001 il numero di casi è aumentato arrivando a 102 casi registrati e tra il 2003 ed il 2005 si sono confermati 17 casi. Il primo caso autoctono in FVG è stato segnalato nel 2003, in provincia di Udine, in una donna di 36 anni. Come in altri Paesi è stata attuata una campagna di prevenzione regionale grazie alla quale nella popolazione residente si è verificato un calo dell'infezione, mentre risulta aumentata l'incidenza nei turisti [Beltrame et al., 2005; Beltrame et al., 2006].

Recentemente è stato condotto un interessante studio retrospettivo nelle tre regioni in cui l'infezione è presente (Friuli Venezia Giulia, Trentino-Alto Adige e Veneto) per poter stabilire l'incidenza di TBE dal 2000 al 2013. Nell'area di studio sono stati segnalati 367 casi (0.38/100000 abitanti); per la maggior parte di questi i sintomi si sono presentati tra aprile e ottobre (con due picchi in giugno e luglio) e l'età è risultata compresa tra 30 e 70 anni per circa il 70%. L'encefalite si è dimostrata la manifestazione clinica più frequente, mentre in 60 soggetti si sono manifestate sequele neurologiche come paralisi, tremori, disturbi di memoria e di concentrazione. Solo in due casi l'esito è risultato fatale. Quasi tutti i soggetti non erano vaccinati ed alcuni ricordavano di essere stati morsi da una zecca. La distribuzione geografica dei casi è risultata piuttosto eterogenea e le province maggiormente colpite dall'infezione sono risultate Pordenone (Tramonti di Sopra), Belluno (Limana), Udine (Resiutta) e Trento (Tres) [Rezza et al., 2015]. Questi dati dimostrano l'utilità degli studi entomologici in quanto dimostrano la circolazione del virus. Il TBEV è stato trovato nel 2.1% delle zecche raccolte tra Veneto e Friuli Venezia Giulia (Vicenza, Verona, Treviso, Pordenone e Udine) tra aprile e giugno 2006-2008, come sottolineato da Capelli et al., in uno studio pubblicato nel 2012; in un lavoro pubblicato nel 2009 da D'Agaro e collaboratori la prevalenza è risultata dello 0.21% nelle zecche raccolte tra il 2005 ed il 2006 nell'area alpina dell'estremo nord-est della regione FVG [D'Agaro et al., 2009; Capelli et al., 2012; Rezza et al., 2015].

Tuttavia, l'incidenza di TBE in Italia è piuttosto bassa se si paragona agli altri stati europei ed è limitata ad alcune zone del nord-est Italia; i casi clinici sono infatti circoscritti a livello regionale: le principali foci segnalate sono la provincia di Trento, la provincia di Belluno e la zona nord-est del Friuli Venezia Giulia. L'episodio toscano viene considerato isolato, in quanto il virus, nonostante fosse stato trovato anche nei vettori, non è più ricomparso. Sono stati segnalati inoltre alcuni casi sporadici in Lombardia, regione che confina con la Svizzera, altro paese europeo con alta incidenza del virus. Appare evidente che

l'epidemiologia del TBEV è strettamente correlata con l'ecologia e la biologia delle zecche *I. ricinus* sia per quanto riguarda la loro distribuzione sia per la loro attività stagionale. Bisogna inoltre ricordare che il Triveneto confina con Austria e Slovenia, paesi in cui il virus è endemico [Beltrame et al., 2005, Beltrame et al., 2006, Cruciatti et al., 2006, Caracciolo et al., 2015, Rezza et al., 2015]. Nelle altre regioni italiane non c'è evidenza della patologia, ma non ci sono nemmeno dati per poterla escludere.

Vettore del TBEV: morfologia, ciclo biologico e ospiti della zecca *Ixodes ricinus*

Le zecche sono artropodi ectoparassiti ematofagi obbligati, appartenenti alla famiglia degli Ixodidae, zecche dure, così definite per la presenza di uno scudo dorsale chitinoso. Come accennato, i principali vettori del TBEV sono *Ixodes ricinus* per il sottotipo europeo ed *Ixodes persulcatus* per i due sottotipi orientali. Il primo è diffuso in Europa, arrivando fino in Turchia, nelle zone settentrionali dell'Iran e del sud-est del Caucaso, mentre l'altro circola nell'Europa dell'Est, in Siberia e in Asia (Cina e Giappone). In alcune aree della Siberia e della Cina, dove *I. persulcatus* non è la specie predominante, sono state associate altre famiglie di zecche come le Dermacentor e le Haemaphysalis [Süss, 2011]. Ci sono poi delle zone di overlap dei due vettori tra gli Stati Baltici e gli Urali e di conseguenza si ha la circolazione di tutti e tre i sottotipi (Figura 12).

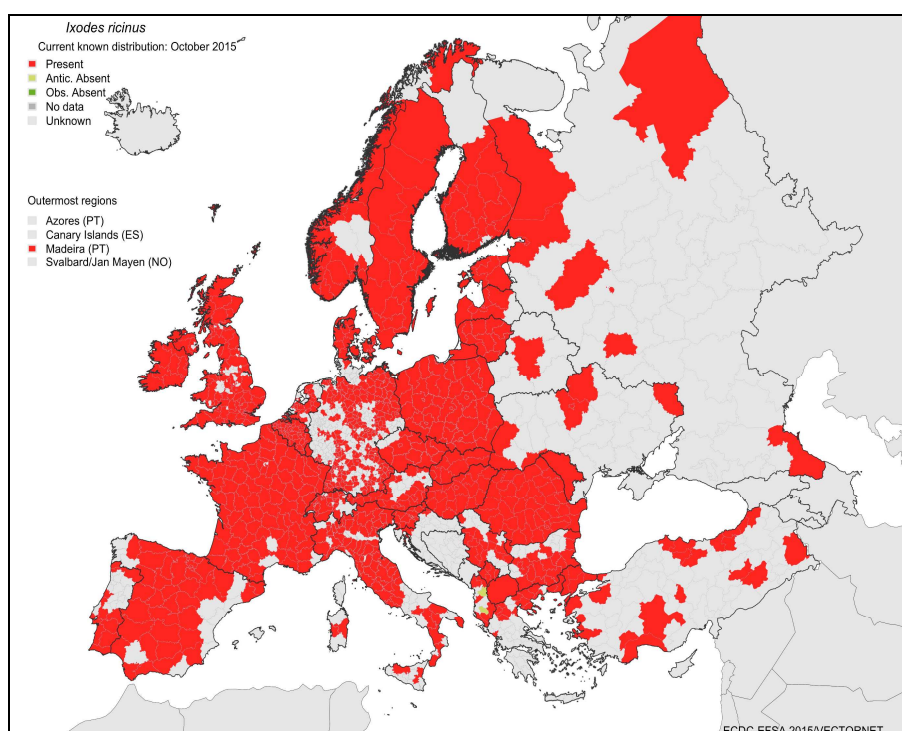


Figura 12. Distribuzione della Zecca *I. ricinus* in Europa [Fonte ECDC].

I. ricinus è una zecca ad esoscheletro chitinoso ben differenziata sessualmente: la femmina è di dimensioni maggiori (3-4.5 mm) e presenta uno scudo che ricopre parzialmente il dorso, mentre il maschio (2-3.5 mm) possiede un esoscheletro duro che lo ricopre completamente (Figura 13).



Figura 13. *I. ricinus* femmina e maschio visti dal dorso.

L'apparato boccale, chiamato rostro o capitulum, è di tipo pungente-succhiatore e mobile rispetto al corpo. Le ghiandole salivari, annesse all'apparato digerente, secernono sostanze anestetiche per ridurre il dolore al momento del morso, anticoagulanti che favoriscono il prelievo di sangue, antiinfiammatorie e immunosoppressive che contrastano la risposta dell'ospite (Figura 14).

La zecca, diversamente dalla zanzara, minimizza il costo energetico mentre succhia il sangue perché sfrutta l'attività cardiocircolatoria dell'animale parassitato; dopo aver succhiato, trattiene la parte corpuscolata e rigurgita la frazione liquida per poter mantenere il suo equilibrio idrostatico [Süss, 2003].



Figura 14. Apparato boccale di *I. ricinus*.

Il ciclo biologico degli Ixodidae presenta quattro stadi di sviluppo: uovo, larva, ninfa e adulto (Figura 15). Per passare da uno stadio al successivo, la zecca necessita di un pasto di sangue, che può compiere su uno stesso ospite (parassiti monoxeni) o, più frequentemente, su due o più ospiti (dixeni ed eteroxeni).

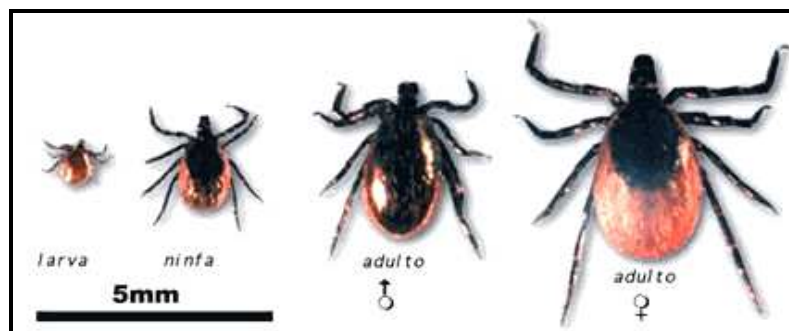


Figura 15. Stadi di sviluppo di *I. ricinus*.

Ad ogni pasto la zecca si stacca, effettua la muta nell'ambiente ed in seguito cerca un altro ospite su cui nutrirsi. La nutrizione nelle larve e nelle ninfe avviene generalmente senza interruzioni, mentre nelle femmine adulte avviene in due fasi. In ogni stadio della crescita, la zecca compie un unico pasto ematico di diversa durata: qualche ora nella fase larvale, 12 ore circa nella fase ninfa e 24-48 ore quando l'acaro è adulto.

La riproduzione è sessuata e può avvenire sia sull'ospite parassitato che nell'ambiente esterno, quindi prima dell'aggressione. Il ciclo vitale (Figura 16) si compie mediamente in uno-tre anni, a seconda della temperatura e della reperibilità degli ospiti [Moshkin et al., 2009; Süss, 2003].

La metamorfosi da larve a ninfe, dopo il pasto, può avvenire entro un periodo compreso tra 2 settimane e 5 mesi. Le ninfe, che presentano otto zampe, come gli adulti, restano attive tutta l'estate parassitando caprioli, cervi, topi, ed eventualmente l'uomo. Una volta trovato l'ospite adatto su cui nutrirsi, si trasformano in adulti dopo un tempo variabile da 2 settimane a 7 mesi di tempo. Gli stadi immaturi si nutrono su piccoli mammiferi e insettivori (uccelli e lucertole), mentre gli adulti utilizzano come ospiti i mammiferi più grandi (caprioli, daini e cervi), compreso l'uomo [Gray et al., 2009].

I principali ospiti e serbatoi in natura sono rappresentati da piccoli roditori. È possibile identificare tre tipi di ospiti (Figura 16):

- ospiti serbatoio (reservoir): sono animali infetti che pur essendo asintomatici trasmettono

l'infezione poiché agiscono da serbatoi. Vengono classificati in questo gruppo roditori, insetti e carnivori;

- ospiti indicatori: animali infetti che non possono trasmettere il virus ad altri vettori a causa della bassa carica virale. Tra questi si trovano ungulati selvatici (caprioli, daini e cervi), ovini, carnivori (volpe), pipistrelli ed uccelli. In particolare il capriolo (*Capreolus capreolus*), l'ungulato maggiormente diffuso in Europa, sembra essere fondamentale nel mantenimento della popolazione delle zecche [Labuda et al., 1997; Rizzoli et al., 2009]. Gli uccelli, molto probabilmente, contribuiscono a trasportare passivamente zecche infette anche a notevole distanza durante le loro migrazioni [Mansfield et al., 2009];
- ospiti accidentali o occasionali: possono essere infettati sviluppando viremia ma non contribuiscono alla circolazione del virus; in questa categoria è incluso l'uomo [Süss, 2003].

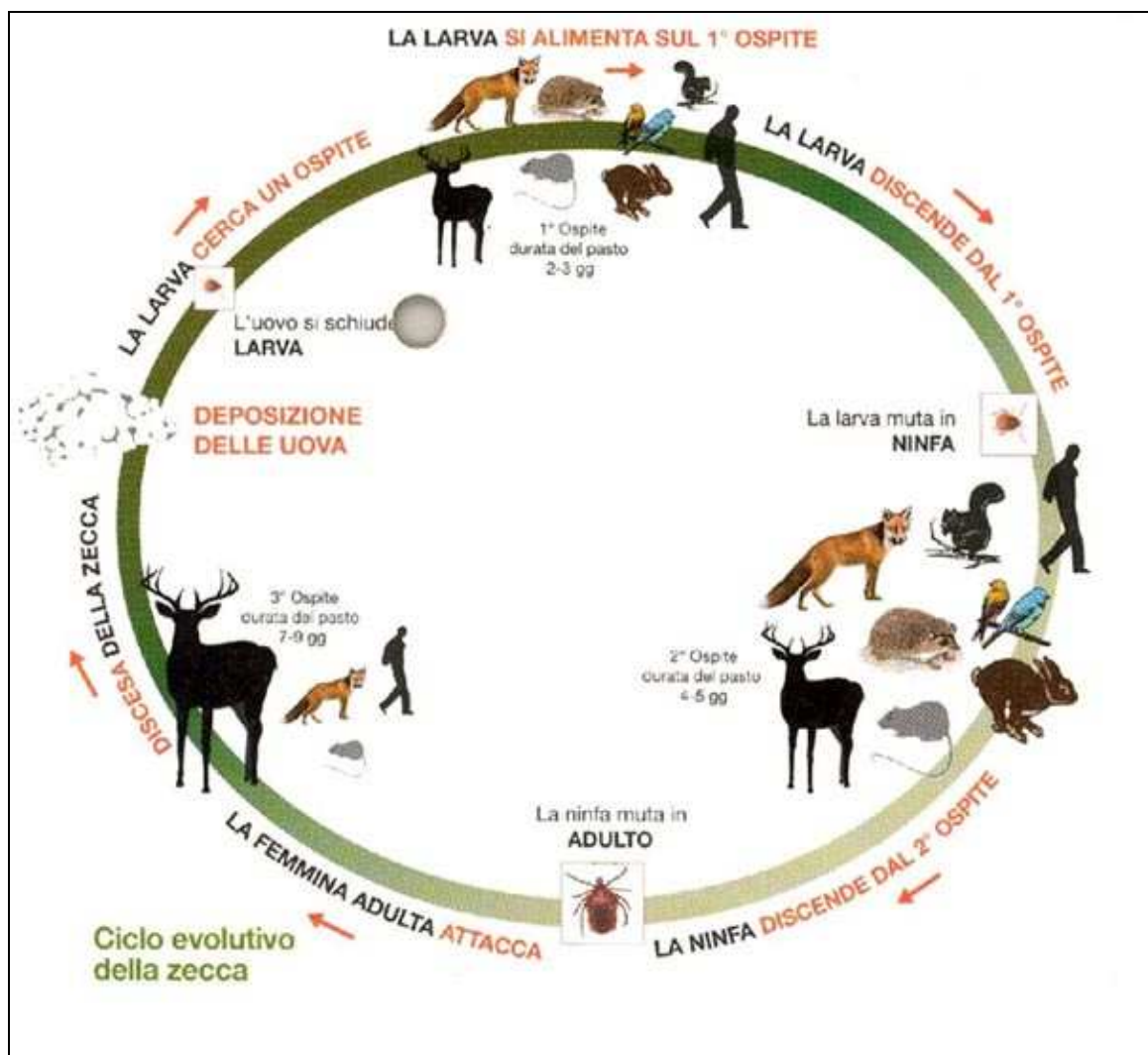


Figura 16. Ciclo biologico ed ospiti di *I. ricinus*.

La TBE mostra un tipico andamento stagionale di tipo bimodale, con picchi di incidenza nel periodo primaverile-estivo (maggio/giugno) e primo autunnale (settembre/ottobre), corrispondenti ai periodi di massima attività delle zecche. La loro presenza è condizionata dai seguenti fattori climatico-ambientali:

- ✓ fattori abiotici come la temperatura (6-25°C), l'umidità relativa (>85%) e l'uso del suolo;
- ✓ fattori biotici, quali la disponibilità di ospiti vertebrati da parassitare e la vegetazione.

I. ricinus è una specie dotata di elevata plasticità ecologica; l'habitat preferito è rappresentato da luoghi ricchi di vegetazione erbosa ed arbustiva, con microclima preferibilmente fresco ed umido, ma è frequente anche nella fascia ecotonale bosco-prato/pascolo [Moshkin et al., 2009]. Le zecche amano appunto gli ambienti ombreggiati con vegetazione bassa ed un letto di foglie secche, meglio se boschivi e con erba incolta, come pure le zone di confine tra prato e bosco soprattutto se con presenza d'acqua.

Le mutate condizioni ambientali, che hanno favorito il proliferare delle popolazioni di ospiti naturali, l'elevata capacità riproduttiva (una femmina adulta depone fino a diverse migliaia di uova), la scarsità di antagonisti naturali e la resistenza ai pesticidi ed alle condizioni ambientali sfavorevoli spiegano la crescente diffusione delle zecche osservata da alcuni anni in molti paesi.

La specie *Ixodes* è nota per la trasmissione simultanea di diversi patogeni durante il pasto di sangue. L'animale ospite può quindi sviluppare contemporaneamente i quadri clinici delle patologie da essi provocate (Tabella 1). I microrganismi di solito non interferiscono tra loro nella stessa zecca poiché occupano diversi organi, tessuti o strutture cellulari che fungono così da nicchie ecologiche [Süss, 2011].

L'eziologia di queste malattie comprende diversi microrganismi: batteri, protozoi e virus; tra questi un cenno particolare meritano: *Anaplasma phagocytophilum* (Anaplasmosi), *Babesia divergens* (Babesiosi), *Borrelia burgdorferi* (morbo di Lyme), *Coxiella burnetii* (Febbre Q), *Francisella tularensis* (tularemia), *Rickettsia helvetica* (febbre bottonosa). Le zecche inoltre possono essere dirette responsabili di paralisi negli animali, provocata da una tossina neurotrofa prodotta dalle ghiandole salivari. Si tratta di una paralisi motoria ascendente che insorge alcuni giorni dopo il morso, anche dopo che la zecca è stata rimossa e che in alcuni casi può risultare fatale o lasciare degli esiti permanenti.

Nel Friuli Venezia Giulia la patologia più nota e diffusa (> 20%) è la borreliosi di Lyme, una malattia infiammatoria multisistemica che causa un'eruzione cutanea (rash) denominato eritema cronico migrante, che può essere seguito dopo settimane o mesi da alterazioni neurologiche, cardiache o articolari [Stinco et al., 2014].

Agente infettivo	Agente eziologico	Patologia	Vettore
Batteri	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	Malattia di Lyme	<i>Ixodes ricinus</i> ,
	<i>Borrelia</i> spp.	Febbre ricorrente	<i>I. scapularis</i>
	<i>Rickettsia conorii</i>	Febbre bottonosa mediterranea	<i>I. ricinus</i> , <i>R. sanguineus</i>
	<i>R. rickettsii</i>	Febbre purpurica delle montagne rocciose	<i>I. ricinus</i> , <i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i>
	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Ehrlichiosi monocitica	<i>I. ricinus</i> , <i>R. sanguineus</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>A. americanum</i>
	<i>Ehrlichia phagocytophila</i>	Ehrlichiosi granulocitica	
	<i>Francisella tularensis</i>	Tularemia	<i>I. ricinus</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>D. andersonii</i>
	<i>Coxiella burnetii</i>	Febbre Q	<i>I. ricinus</i> , <i>R. sanguineus</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>D. Andersonii</i>
Virus	TBEV	Meningo-encefalite	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>
Protozoi	<i>Babesia divergens</i> e <i>B. microti</i>	Babesiosi	<i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i>
Proteina	Neurotossina	Paralisi flaccida	-

Tabella 1. Quadro riassuntivo delle patologie trasmesse dalla zecca *Ixodes ricinus*.

Trasmissione virale

L'epidemiologia del TBEV è strettamente correlata con l'ecologia e la biologia delle zecche sia per quanto riguarda la loro distribuzione che per la loro attività stagionale [Charrel et al., 2004]. Gli Ixodidae rappresentano degli amplificatori dell'infezione e fungono da serbatoi in cui il virus sopravvive nei periodi in cui non è possibile la trasmissione [Lasala et al., 2010]. Il TBEV presenta un ciclo di trasmissione che coinvolge vertebrati come ospiti e gli artropodi come vettori biologici e serbatoi capaci di veicolare il patogeno da un ospite all'altro.

Il mantenimento in natura del TBEV e la potenziale esposizione umana dipendono da diversi fattori:

- * densità e distribuzione di zecche (vettori);

- * presenza di ospiti intermedi che forniscono alle zecche il pasto di sangue;
- * ambiente;
- * frequenza e permanenza dell'uomo negli habitat delle zecche;
- * presenza di agenti patogeni trasmissibili con il morso di zecca [Lasala et al., 2010].

Si possono identificare diverse modalità di trasmissione del TBEV (Figura 17):

- trasmissione sistemica: le zecche possono infettarsi con l'agente patogeno durante un pasto di sangue su un reservoir e trasmetterlo poi allo stesso modo ad un altro ospite; più a lungo permangono negli ospiti, maggiore sarà la probabilità di infettarsi [Ostfeld et al., 2000]. Il sangue viene succhiato attraverso la micro ferita prodotta dal rostro; segue una fase di rigurgito della parte liquida in cui il potenziale trasferimento di microrganismi è attivo e avviene in entrambi i sensi (ospite $\Leftrightarrow$ zecca);
- trasmissione transovarica: le femmine adulte infette possono trasmettere l'infezione alle successive generazioni quando depongono le uova;
- trasmissione transtadiale: il passaggio dell'infezione da uno stadio di sviluppo al successivo provvede alla trasmissione orizzontale estendendone la distribuzione. Questo fenomeno sembra essere più importante per il mantenimento naturale del virus tra le zecche rispetto al precedente;
- trasmissione tramite co-feeding: il co-feeding consiste nella trasmissione del virus da una zecca infetta ad una non infetta qualora si cibino simultaneamente sullo stesso ospite, in assenza di una infezione sistemica. Tale fenomeno avviene poiché il punto di inoculo rappresenta un sito di replicazione virale. Questa è la via di trasmissione principale per il TBEV, anche in ospiti immuni, poiché questo virus non è in grado di produrre viremie rilevanti nei micro mammiferi. Questi, se sopravvivono, sono fondamentali per la persistenza del virus nel ciclo silvestre così come l'abbondanza di altri ospiti vertebrati come gli ungulati selvatici che garantiscono la sopravvivenza ed il completamento del ciclo biologico di *Ixodes ricinus* [Labuda et al., 1997; Randolph et al., 2000];
- trasmissione per via alimentare: è possibile tramite ingestione di latte non pastorizzato e/o di formaggi di animali infetti (caprini, ovini, bovini), poiché il succo gastrico non è in grado di inattivare rapidamente il virus. Questa via è documentata soprattutto nei Paesi dell'Europa orientale; per esempio in Repubblica Ceca circa lo 0.9% dei casi è avvenuto per via alimentare, mentre durante un'epidemia in Ungheria sono stati confermati 7 casi e sospettati 4 collegati al consumo di latte non pastorizzato [Amicizia et al., 2013]. Questa modalità è altamente improbabile nelle regioni dell'Europa centrale interessate da TBE

(Austria e Germania) e nel nostro Paese vista la presenza di rigorose norme di igiene, anche se non è da escludere [Cisak et al., 2010; Caracciolo et al., 2015].

Inoltre è importante sottolineare che non può verificarsi una trasmissione interumana dell'encefalite da zecche poiché gli ospiti non possono infettarsi tra loro [Nonaka et al., 2010]. Sono stati trovati anticorpi specifici in donatori di sangue in Germania, Norvegia e Turchia [Ergünay et al., 2011; Larsen et al., 2014]. Tuttavia, non sono stati documentati casi di infezione mediante trasfusioni. In letteratura sono infine documentati alcuni casi di infezione avvenuta in laboratorio [Amicizia et al., 2013; Bogovic et al., 2015].

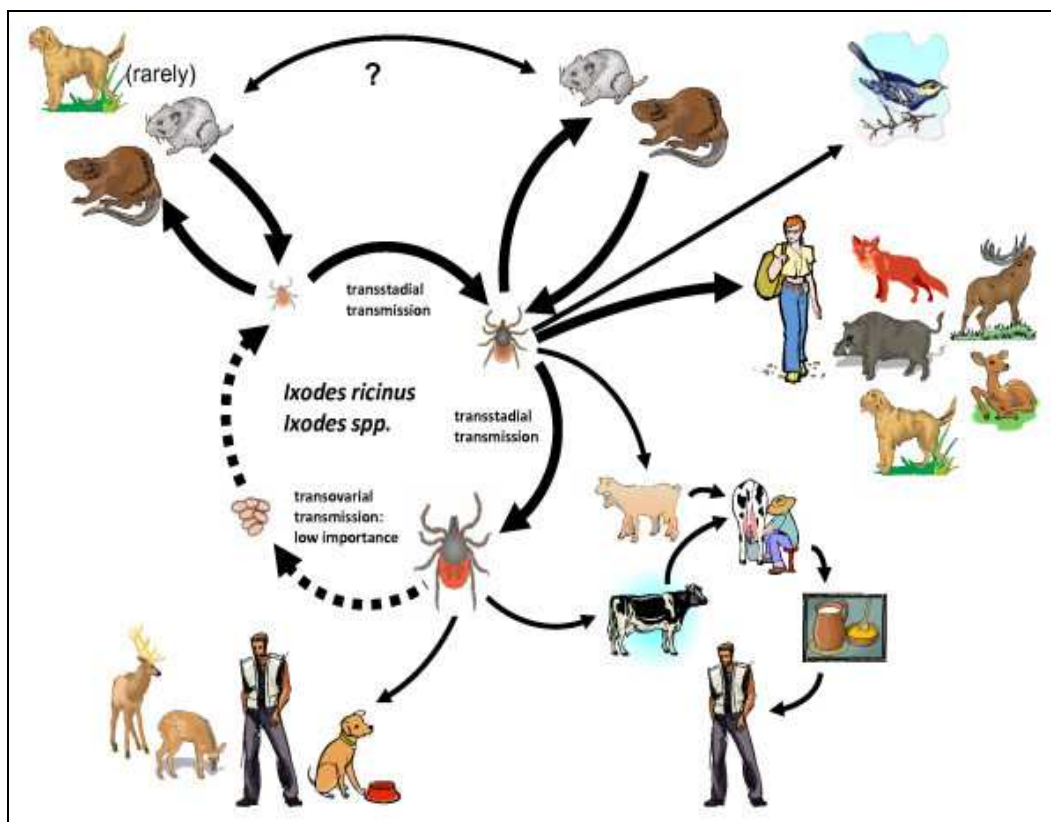


Figura 17. Modalità di trasmissione del TBEV.

Prevenzione e sorveglianza

L'infezione da TBEV rappresenta un problema emergente di sanità pubblica poiché è in costante aumento in diversi paesi europei. Vista la gravità della patologia e la sua progressiva diffusione anche in nuove foci, è importante avvalersi di diversi strumenti di profilassi e prevenzione quali:

- interventi sull'ambiente: mirano soprattutto a ridurre il numero delle zecche nelle zone residenziali mediante disinfestazione su larga scala e per mezzo di disboscamento selettivo di vegetazione incolta;
- misure individuali di carattere generale e comportamentale: sono fondate sull'informazione e sull'educazione sanitaria della popolazione generale e delle categorie professionali maggiormente esposte al rischio. Negli habitat dove vivono le zecche (foreste e radure) ad esempio si suggerisce l'utilizzo di un abbigliamento adeguato e di repellenti riducendo così l'esposizione al contagio. Inoltre è opportuno divulgare le conoscenze atte a riconoscere precocemente i sintomi e insegnare il giusto ricorso alle strutture sanitarie.
- somministrazione di profilassi immunitaria specifica (vaccinazione).

Il periodo ottimale per avviare la vaccinazione contro la TBE è quello invernale, in modo che il soggetto sia già protetto nel periodo di massima attività delle zecche e di incidenza di TBE [Kaiser, 2008]. Il ciclo vaccinale di base prevede la somministrazione di tre dosi per via intramuscolare, seguite da una dose booster ogni tre anni. In caso di necessità è possibile ravvicinare le tre dosi di base grazie alla schedula rapida. In entrambi i casi ogni tre anni c'è la necessità di eseguire un richiamo per rafforzare l'immunità già acquisita, mediante una dose dello stesso vaccino precedentemente eseguito (Figura 18).

Attualmente i vaccini in uso sono:

- a) FSME-Immun ® (prodotto da Baxter, in Austria);
- b) Encepur ® (prodotto da Novartis Vaccines, in Germania);
- c) EnceVir ® (prodotto da Scientific Production Association Microgen, in Russia);
- d) TBE vaccine Moscow ® (prodotto da Federal State Enterprise of Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russian Academy of Medical Sciences, in Russia).

Nell'Unione Europea i vaccini disponibili e approvati dalla European Medicines Agency (EMA) sono FSME-Immun® ed Encepur®. In Italia il vaccino più utilizzato è FSME-Immun®, denominato anche Ticovac, costituito da virus inattivato con formalina (ceppo Neudoerfl, sottotipo europeo). L'Encepur® vaccine è prodotto a partire dal ceppo K23, appartenente sempre al sottotipo europeo, e in commercio in Germania dal 1991. La schedula vaccinale è simile a quella per il vaccino austriaco.

I vaccini russi sono invece basati su ceppi appartenenti al sottotipo orientale: ovvero ceppo

205 per EnceVir® e ceppo Sofjin per TBE vaccine Moscow®. Per entrambi la schedula prevede una seconda dose dopo 5-7 mesi ed una terza dopo 6-12 mesi e le dosi booster vengono effettuate ogni 3 anni [Amicizia et al., 2013].

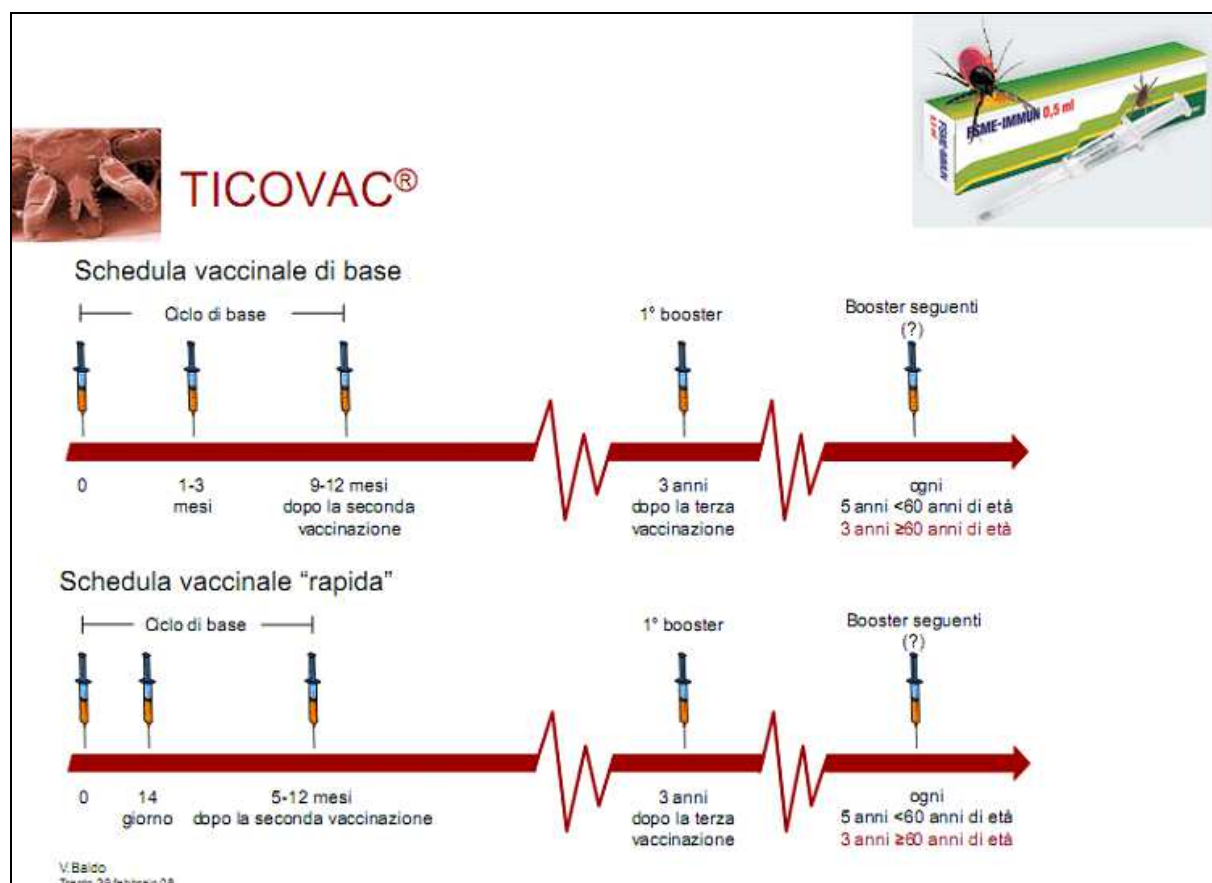


Figura 18. Rappresentazione grafica delle schedule vaccinali di base (o tradizionale) e rapida.

I vaccini sono da considerarsi sicuri ed efficaci con una protezione del 98%; la prima dose può dare esclusivamente un imprinting al sistema immunitario, mentre la seconda aumenta notevolmente il numero di anticorpi presenti. Tuttavia, sono stati segnalati pochi casi di infezione in cui si è verificato il fallimento del vaccino. In questi soggetti (soprattutto anziani) si è osservata una risposta anticorpale anomala caratterizzata da assenza di IgM ma presenza di IgG con fenomeni di mancata neutralizzazione degli anticorpi. Questo tipo di risposta potrebbe essere falsamente interpretata come un'immunità post-vaccinazione [Andersson et al., 2010]. Le motivazioni di questa mancanza di efficacia della vaccinazione possono essere diverse: per prima cosa nessun vaccino garantisce una copertura al 100%; può ad esempio verificarsi una non-responsività per l'antigene presente

nel vaccino (non-responders); oppure si può avere la perdita di antigenicità e/o infettività a causa di uno stoccaggio inadeguato; o infine la risposta immunitaria potrebbe essere insufficiente o inappropriata a causa di carenze di antigeni per inadeguata esecuzione del vaccino [Stiasny et al., 2009].

La vaccinazione è consigliata a tutte le categorie di soggetti a rischio per motivi lavorativi (esempio guardie forestali), turistico/ricreativi (scout) e di residenza in cui potenzialmente si può essere esposti al vettore. In uno studio condotto in FVG ad esempio è emerso che la sieroprevalenza nelle guardie forestali è dello 0.6% [Beltrame et al., 2006]. Alla luce di quanto detto, in questa regione la vaccinazione è stata resa gratuita dal 2013.

L'aumento dei casi ha suscitato un notevole interesse ed è quindi emersa la necessità di ampliare le conoscenze riguardo l'ecologia di *I. ricinus* e l'epidemiologia del TBE virus. L'opera di prevenzione e controllo dell'infezione può essere condotta su più piani:

- ✓ attività di ricerca e raccolta dati per la definizione e il monitoraggio del problema; l'indagine su casi clinici;
- ✓ monitoraggio dei vettori, presenza e determinazione della distribuzione geografica e valutazione della densità vettoriale;
- ✓ monitoraggio del virus nelle popolazioni di zecche in aree a rischio e promozione delle attività di sorveglianza su animali sentinella.

1.4. WEST NILE VIRUS

1.4.1. CLASSIFICAZIONE E LINEAGE DEL WEST NILE VIRUS

Il West Nile virus (WNV) appartiene alla famiglia Flaviviridae, genere Flavivirus. È compreso nel sierocomplex del virus dell'Encefalite Giapponese (JEV) insieme ai virus dell'encefalite di Murray Valley (MVEV) e dell'encefalite di St. Louis (SLEV), Kunjin virus (KUNV), Usutu virus (USUV), Rabensburg Virus (RABV), Koutango virus (KOUV), Cacipacore virus (CPCV), Alfuy virus (ALFV) e Yaounde virus (YAOV) virus [Kuno et al., 1998; Pauli et al., 2013]. Questi Flavivirus hanno un ciclo biologico che comprende principalmente zanzare e uccelli ma anche l'uomo ed altri mammiferi possono essere infettati (Tabella 2). Fatta eccezione per il West Nile, il Rabensburg e l'Usutu, i virus di questo sierocomplex non sono presenti né in Italia né in Europa.

Virus	Distribuzione	Patologia nell'uomo	Animali infettati	Reservoir	Vettori
Japanese encephalitis Virus (JEV)	Asia sud orientale, India, Giappone, Korea, Filippine	febbre, encefalite, meningite	maiali, cavalli	maiali, uccelli	zanzare
West Nile Virus (WNV)	Tutto il mondo	febbre, encefalite, meningoencefalite	uccelli, mammiferi, rettili	uccelli	zanzare (zecche)
Murray Valley encephalitis Virus (MVEV)	Australia	febbre, encefalite, meningoencefalite	pecore, uccelli	Uccelli acquatici	zanzare
St. Louis encephalitis Virus (SLEV)	USA, America centrale e meridionale	febbre, encefalite	-	uccelli	zanzare
Usutu Virus (USUV)	Africa, Austria, Ungheria, Europa meridionale, Germania	febbre, encefalite in immunocompromessi	uccelli	roditori, uccelli	zanzare
Rabensburg Virus (RABV)	Austria/Cepubblica Ceca	-	-	-	zanzare
Koutanga Virus (KOUV)	Senegal, Somalia, Repubblica Centrafricana	-	-	(roditori)	Zanzare, zecche
Alfuy Virus (ALFV)	Australia	febbre	-	uccelli	zanzare
Yaounde Virus (YAOUV)	Cameroon, Senegal, Repubblica Centrafricana, Congo	-	-	(roditori)	zanzare
Cacipacore Virus (CPCV)	Brasile	(febbre)	(cavalli)	uccelli	-

Tabella 2. Siero-complex del Japanese Encephalitis Virus, al quale appartiene il WNV [Pauli et al., 2013].

Il WNV dal punto di vista genetico è molto variabile; le analisi delle sequenze nucleotidiche degli isolati hanno consentito di definirne le relazioni filogenetiche con conseguente raggruppamento dei ceppi in diversi lineage (Figura 19):

- Lineage 1 → suddiviso in almeno 3 classi:
 - Classe A: ceppi provenienti dall'Europa, Africa, Medio Oriente e America;
 - Classe B: ceppi provenienti dall'Australia (Kunjin);
 - Classe C: ceppi provenienti dall'India; per alcuni viene classificato come lineage 5.
- Lineage 2 → contiene il ceppo prototipo B 956 e altri ceppi isolati nell'Africa Subsahariana e in Madagascar, ma ha causato sporadiche epidemie anche nell'Africa settentrionale. Recentemente i ceppi di questo genotipo sono stati

associati a epidemie negli uccelli e nell'uomo in Europa meridionale e orientale; dal 2004 è stato isolato anche in Indonesia;

- Lineage 3 → comprende il ceppo virale isolato nella Repubblica Ceca nel 1997, in prossimità del confine con l'Austria (Rabensburg) da zanzare *Culex pipiens*, viene appunto chiamato Rabensburg virus;
- Lineage 4 → circola in Russia dal 1988 e include un isolato da zecche del Caucaso (specie *Dermacentor marginatus*) e alcuni ceppi ottenuti da zanzare e rettili.

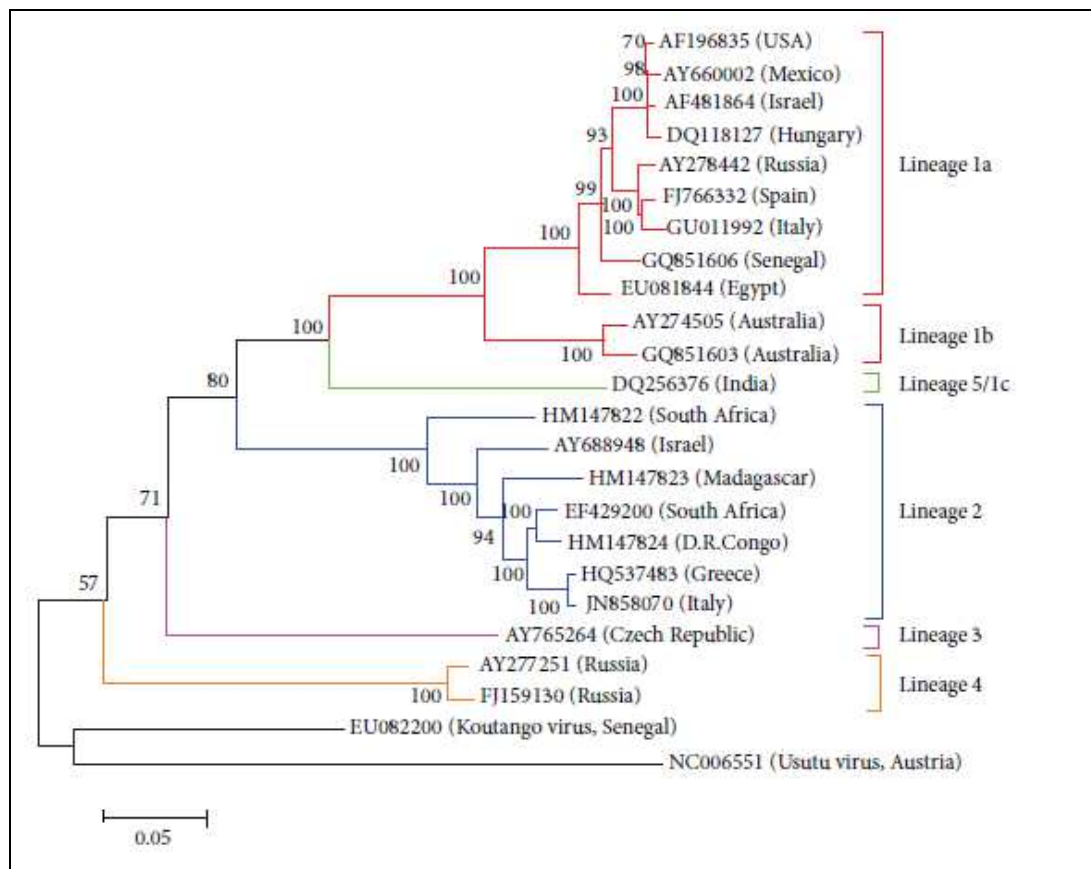


Figura 19. Principali lineage del WNV [Chancey et al., 2015].

I lineage 1 e 2 sembrano coinvolgere maggiormente l'uomo e i cavalli, mentre i virus appartenenti ai lineage 3 e 4 sembrano interessare meno l'uomo. I lineage 3 e 4, caratterizzati da scarsa patogenicità, sono stati descritti recentemente e presentano notevoli differenze genetiche con i ceppi dei lineage 1 e 2. Le analisi filogenetiche hanno dimostrato che il lineage 1A ha avuto origine nell'Africa subsahariana o settentrionale; questo clade è emerso all'inizio del Ventesimo secolo e si è poi diffuso tra gli anni

Settanta-Ottanta anche in Europa principalmente ad opera di uccelli migratori. Negli anni Novanta un ceppo appartenente a questo genotipo è comparso in Marocco e nell'Europa dell'Est, dove il virus è diventato endemico, causando piccoli focolai di infezione. Nel 1999 si è poi propagato, probabilmente dal Medioriente, fino in America del Nord, da dove si è successivamente diffuso anche nell'America Latina, diventando così un problema di sanità pubblica globale. Tra i ceppi del lineage 2 troviamo oltre a quelli africani, molti ceppi europei isolati soprattutto negli ultimi anni: il virus isolato dagli uccelli trovati morti in Ungheria nel 2004 appartiene a questo lineage, dimostrando la diffusione al di fuori dell'Africa e la potenzialità di divenire virulento nei vertebrati. A partire da allora sono stati isolati ceppi appartenenti al lineage 2 in diversi stati europei, Italia inclusa [Barzon et al., 2013a; Donadieu et al. 2013; Sambri et al., 2013; Chancey et al., 2015]. Le analisi filogenetiche effettuate utilizzando una sequenza nucleotidica del gene codificante per la proteina E dei virus isolati in Italia nel 1998 e nel 2008 hanno permesso di rilevare un elevato grado di omologia (98.8%) tra i due virus che, a loro volta, sono risultati simili a quelli circolanti da circa un decennio nel bacino del Mediterraneo ed in alcuni paesi africani ed entrambi ascrivibili al Lineage 1 [Savini et al., 2008].

1.4.2. REPLICAZIONE, PATOGENESI E MANIFESTAZIONI CLINICHE

Il virus entra nelle cellule tramite endocitosi mediata da recettore (DC-SIGN, recettore del mannosio, diversi glicosamminoglicani); a seguito di un cambio conformazionale della proteina E, avviene la fusione tra le membrane del virus e dell'endosoma; il nucleocapside virale viene poi rilasciato nel citoplasma. Il virus replica a livello del reticolo endoplasmatico generando l'RNA a polarità negativa che funge da stampo per la sintesi del filamento positivo definitivo. Il genoma viene quindi impacchettato all'interno della progenie virale oppure utilizzato per la sintesi di proteine virali. Il virione immaturo viene trasportato attraverso il network trans-Golgi; a seguito della trasformazione di prM in proteina M avviene la maturazione del virione che assume quindi le capacità infettive e viene rilasciato per esocitosi (Figura 20) [Samuel et al., 2006; Colpitts et al., 2012; De Filette et al., 2012].

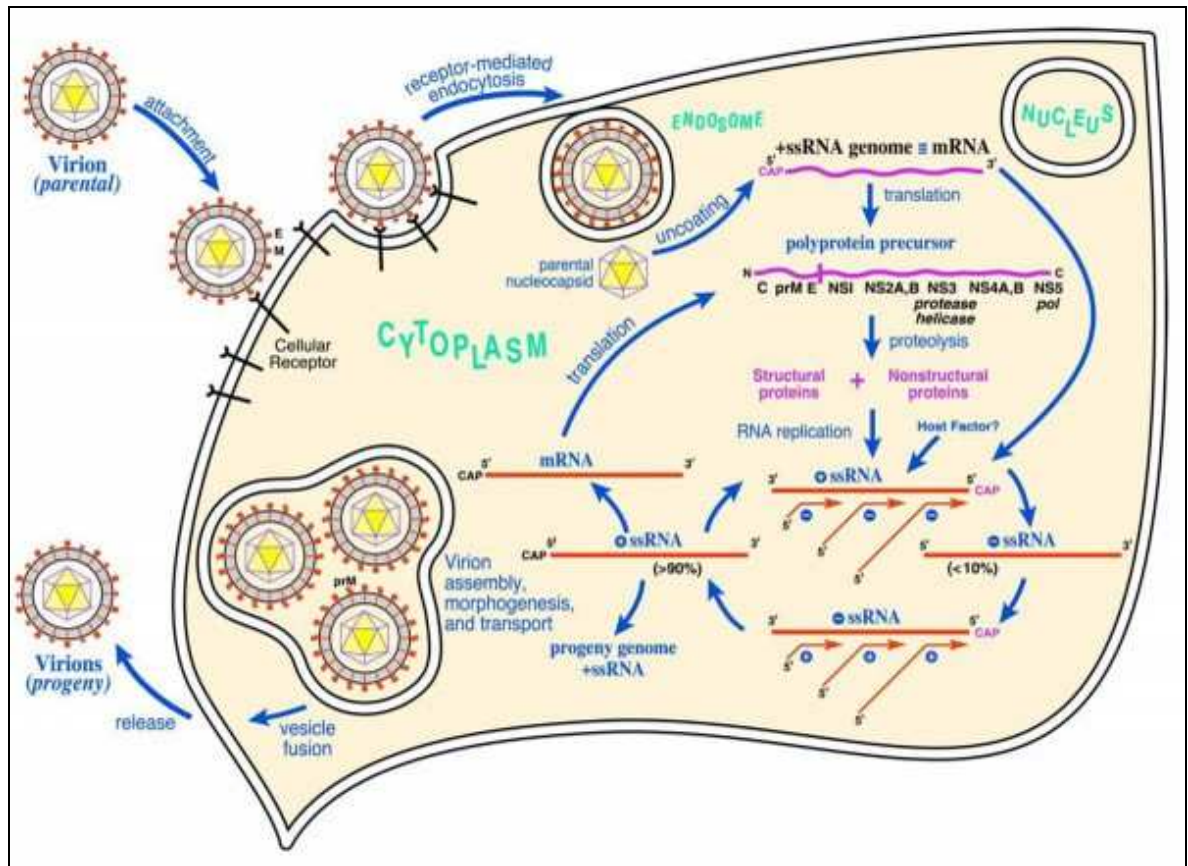


Figura 20. Ciclo vitale del WNV [De Filette et al., 2012].

Nell'uomo, dopo la puntura del vettore, il virus infetta i cheratinociti e le cellule di Langerhans, migrando poi verso i linfonodi regionali dove inizia la replicazione. Il virus si diffonde attraverso il torrente circolatorio arrivando a diversi organi, come rene e milza, dove avviene una seconda replicazione. A seconda del genotipo e del livello e della durata della viremia, il WNV può oltrepassare la barriera ematoencefalica causando meningo-encefalite (Figura 21).

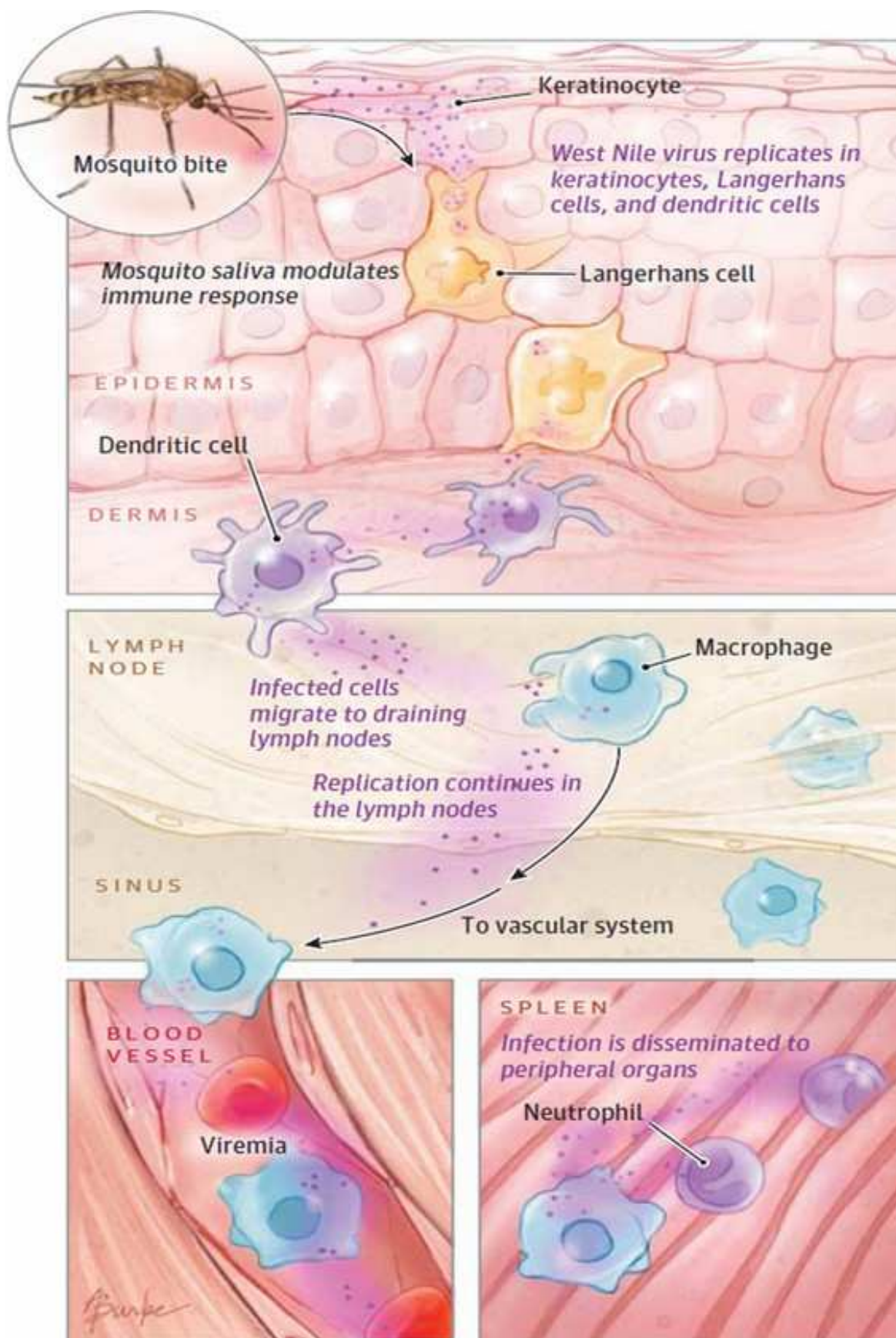


Figura 21. Patogenesi dell'infezione da WNV [Petersen et al., 2013].

Sembra che la glicoproteina E, in particolare il dominio III, che costituisce il sito di legame del recettore, sia implicata nella neuroinvasività del virus. Alcuni studi dimostrano tre distinte vie per il raggiungimento del sistema nervoso centrale:

1. attraversamento della barriera ematoencefalica mediante leucociti infetti;
2. attraversamento diretto della barriera ematoencefalica, a seguito di compromissione della sua integrità e infezione delle cellule endoteliali dell'encefalo;
3. ingresso attraverso il trasporto assonale retrogrado a seguito dell'infezione del sistema nervoso periferico.

Di queste tre ipotesi le prime due sono le più supportate [Beasley et al., 2002; Lim et al., 2011; Donadieu et al., 2013].

Il periodo di incubazione dal momento della puntura della zanzara varia fra 2 e 14 giorni, ma può essere anche di 21 giorni nei soggetti con deficit a carico del sistema immunitario. La maggior parte delle persone infettate non sviluppa segni clinici (Figura 22). Circa il 20-30% dei soggetti infettati sviluppa sintomi simil-influenzali, quali febbre, mal di testa, nausea, vomito, tremore, linfonodi ingrossati, sfoghi cutanei. Questo quadro clinico, che prende il nome di West Nile fever (WNF) o West Nile Disease (WND), dura in genere pochi giorni, in rari casi qualche settimana. I sintomi possono variare molto a seconda dell'età della persona: nei bambini è più frequente una febbre leggera, nei giovani la sintomatologia è caratterizzata da febbre mediamente alta, arrossamento degli occhi, mal di testa e dolori muscolari; negli anziani e nelle persone debilitate, invece, la sintomatologia può essere più grave e risultare fatale. Un'infezione da WNV in gravidanza può causare aborto, meningite congenita e disturbi legati alla crescita. I sintomi più gravi si presentano in media in meno dell'1% delle persone infette (1 persona su 150), manifestandosi come malattia neuro-invasiva (West Nile Neurological Disease, WNND) che può generare encefalite, meningo-encefalite, poliomielite (paralisi flaccida). Il rischio di contrarre la forma neurologica aumenta all'aumentare dell'età, soprattutto nei soggetti di età superiore ai 60 anni, e negli immunocompromessi. Le sequele neurologiche possono durare per periodi lunghi nel 50% dei casi e spesso possono essere permanenti. Il tasso di mortalità nei casi ospedalizzati di encefalite è del 10% ed è correlato all'età, alla compromissione del sistema immunitario e a particolari malattie come il diabete mellito [Campbell et al., 2002; Samuel et al., 2006; Lim et al., 2011; Sambri et al., 2013]. Dati recenti indicano una correlazione tra infezione neuroinvasiva da WNV e sviluppo di malattia cronica renale, ma non è ancora chiara la relazione causa-effetto [Nolan et al., 2012].

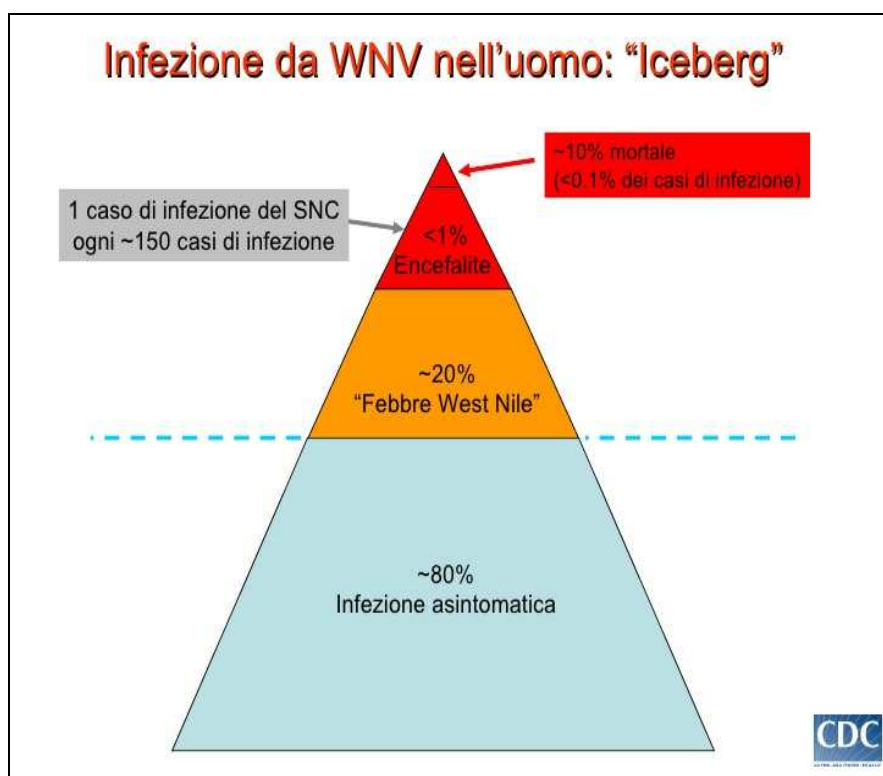


Figura 22. Rappresentazione ad iceberg dell'infezione da WNV nell'uomo.

1.4.3. DIAGNOSI E TERAPIA

L'infezione da WNV, generalmente presenta una sintomatologia sovrapponibile ad altre sindromi neurologiche, ma si possono anche avere infezioni inapparenti. Per questi motivi, i criteri diagnostici devono includere una combinazione di valutazioni cliniche e di prove di laboratorio. La conferma di WND può essere fatta direttamente, rilevando la presenza del virus nel sangue o negli organi bersaglio, o indirettamente, attraverso la ricerca di anticorpi specifici.

Nella prima fase della malattia la diagnosi può essere effettuata attraverso la ricerca dell'RNA virale su sangue intero, liquido cerebrospinale e urine o mediante isolamento virale in colture cellulari o dimostrando la risposta immunitaria specifica contro il WNV. L'identificazione del genoma virale mediante tecniche molecolari è però complicata dal fatto che la viremia è piuttosto breve o assente quando insorgono i sintomi e il titolo del virus è basso. Con la comparsa degli anticorpi anche l'isolamento virale risulta piuttosto complesso; a rendere difficile la diagnosi vi sono anche le reazioni di cross-reattività con altri Flavivirus, che richiedono la conferma con test di neutralizzazione, e la persistenza delle IgM per diversi mesi dopo l'infezione. La breve durata della viremia e la bassa carica del virus rappresentano un problema anche per la ricerca del WNV mediante test di

amplificazione di acidi nucleici (NAAT) in sangue e organi dei donatori: sono stati infatti documentati casi in cui si è avuta la trasmissione del virus attraverso donazioni di organi in soggetti che erano risultati negativi alle analisi molecolari [Barzon et al., 2013b].

Gli anticorpi di classe IgM sono determinati a partire dal secondo giorno dalla comparsa dei primi sintomi, attraverso test sierologici (ELISA o immunofluorescenza) effettuati su siero e, dove indicato, su liquido cerebrospinale. Questi anticorpi possono persistere per periodi anche molto lunghi nei soggetti malati (fino a un anno), pertanto la positività a questi test può indicare anche un'infezione pregressa. Talvolta i campioni raccolti entro 8 giorni dall'insorgenza dei sintomi potrebbero risultare negativi, pertanto è consigliabile ripetere a distanza di tempo il test prima di escludere la malattia. Gli anticorpi di classe IgG sono determinabili invece 2 giorni dopo la comparsa delle IgM. La differenziazione tra infezioni acute e quelle passate avviene con il test di avidità delle IgG: l'identificazione di anticorpi IgG a bassa avidità prova un'infezione primaria o acuta, mentre quella ad alta avidità indica un'infezione passata o una riattivazione dell'infezione da WNV. Poiché le specie appartenenti ai Flavivirus sono correlate tra loro, sono possibili cross-reazioni e di conseguenza si consiglia di titolare e analizzare i campioni positivi anche per le IgM/IgG specifiche per tutti Flavivirus; il confronto del titolo permette di confermare o meno il risultato iniziale [Levett et al., 2005].

Diagnosi differenziale

I sintomi sono simili a quelli causati da altri virus come TBEV, JEV o MVEV o altri Arbovirus o da batteri che causano meningiti a liquor limpido (Toxoplasma, trichine, leptospire, Borrelia, Rickettsie, infezioni tubercolari e da Candida spp.). La diagnosi differenziale è necessaria quando un paziente presenta febbre improvvisa, encefalite o forte cefalea o meningite [Rossi et al., 2010].

Terapia

Non esiste una terapia specifica per il West Nile virus. Nella maggior parte dei casi, i sintomi scompaiono da soli dopo qualche giorno o possono protrarsi per qualche settimana. Nei casi più gravi è invece necessario il ricovero in ospedale, dove i trattamenti somministrati comprendono fluidi intravenosi e respirazione assistita.

1.4.4. EPIDEMIOLOGIA DEL WEST NILE VIRUS

Il West Nile virus è tra gli Arbovirus maggiormente distribuiti nel mondo essendo presente

in tutti i continenti ad eccezione dell'Antartide (Figura 23); è diffuso non solo nelle aree tropicali ma anche nelle zone a clima moderato.

Cenni storici e distribuzione geografica

Il WNV è stato isolato per la prima volta nel 1937 in Uganda, nel distretto West Nile (da cui prende il nome), in un campione di sangue appartenente ad una donna che presentava febbre di natura sconosciuta accompagnata da problemi neurologici. Nel 1950 il virus è stato isolato da uomini, zanzare e uccelli in Egitto, dove è diffuso endemicamente, con sintomatologia lieve e aspecifica. Nel 1957 in Israele il virus fu responsabile di una dozzina di casi di encefalite nell'uomo, mentre casi di encefalite negli equini furono osservati per la prima volta nel 1960 in Egitto e in Francia. In un'epidemia scoppiata nel 1974 in Sudafrica il numero dei casi è stato stimato in circa 18 mila, senza morti. Dagli anni Novanta sono stati segnalati diversi focolai nel bacino del Mediterraneo e, dal 1999, soprattutto in America. Nel 1996 in Romania il virus West Nile fu responsabile di oltre 350 casi umani di cui 20 mortali. Altri focolai umani sono stati segnalati nella Repubblica Ceca nel 1997 (5 casi), in Russia nel 1999 (826 pazienti ricoverati, 183 casi confermati e 40 morti) e in Francia nel 2003 (7 casi).

Nel 1999 WNV è stato isolato in Nord America da corvi trovati morti; prima di allora il virus non era mai stato evidenziato nell'emisfero occidentale. Dal 2000 la diffusione in America è drammaticamente aumentata con numerosi casi di encefalite e meningite, con elevata letalità. Negli anni successivi il virus si è diffuso da costa a costa interessando sia il confine canadese che quello messicano e causando numerosi casi di encefalite nell'uomo. Nel 2002 è stato rilevato un nuovo genotipo che l'anno dopo ha causato l'epidemia più grande di WNV osservata nell'uomo (quasi 10 mila casi accertati, dei quali 262 mortali). Dal 2003 è considerato endemico nel Nord America ed è presente in Canada, Messico, Porto Rico, Repubblica dominicana, Giamaica, Guadalupa e El Salvador. Non si è mai capito come il virus abbia raggiunto il territorio americano ma analisi filogenetiche dimostrano che il ceppo isolato a New York nel 1999 (NY99) risulta molto simile a quelli isolati in Israele. La diffusione del WNV negli Stati Uniti ha dimostrato che gli Arbovirus sono in grado di insediarsi in una nuova area, trovando vettori efficienti e vertebrati suscettibili in cui replicarsi riescono a generare un ciclo di trasmissione e meccanismi di mantenimento virale [Lanciotti et al., 1999; Giladi et al., 2001; Campbell et al., 2002].

Dal 1958, oltre alla determinazione degli anticorpi diretti contro il WNV nel siero di due albanesi, si sono verificati diversi casi in Europa meridionale e orientale e

contemporaneamente in Europa centrale e occidentale. Il primo caso è stato segnalato nel sud della Francia (Camargue) nel 1962 in un cavallo; in questa zona il virus è poi ricomparso nel 2000 e si sono susseguiti tre focolai di infezione nel 2003, 2004 e 2006 [Murgue et al., 2001]. Tra gli anni '60-'80 il WNV è stato isolato da zanzare, uccelli e mammiferi in diversi paesi dell'Europa (Spagna, Portogallo, Romania, Repubblica Ceca, Slovacchia, Polonia, Russia), ma non si sono verificati casi umani fino 1985 quando il virus ha fatto la sua comparsa in Ucraina. Successivamente si sono verificate due principali epidemie in Romania nel 1996 (835 casi e 17 morti) e in Russia nel 1999 (826 casi e 40 morti) [Cernescu et al., 2000; Platonov et al., 2008]. Dal 2003 WNV si è diffuso anche in Ungheria e nel 2007 il virus è stato isolato in Spagna ed in Grecia. Nel 2008 la presenza del WNV è stata segnalata anche in Austria, dove il virus è stato isolato in uccelli selvatici, mentre in Ungheria e Romania sono stati segnalati casi nell'uomo [Zehender et al, 2011; Bakonyi et al, 2013; Engler et al, 2013]. Nei paesi del Bacino del Mediterraneo dagli anni '90 il numero delle epidemie e la gravità della sintomatologia hanno registrato un costante aumento. Tra il 2010 e il 2013 numerosi casi umani sono stati segnalati in Austria, Bosnia e Herzegovina, Croazia, Grecia, Kosovo, Italia, Montenegro, Serbia, Spagna, Russia, Ucraina ed Ungheria. Si è poi confermata la presenza del virus anche in Portogallo, Repubblica Ceca e Turchia.

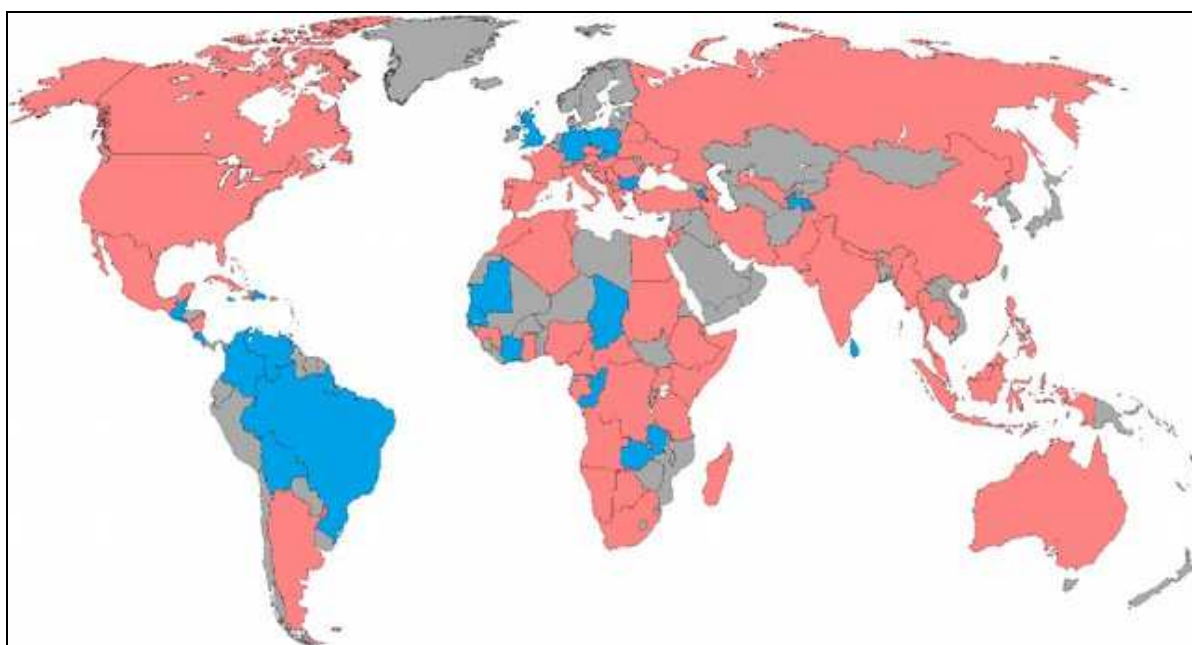


Figura 23. Distribuzione globale del WNV: in rosso sono indicate le aree in cui sono stati segnalati i casi o le sieropositività nell'uomo; in blu i casi e le sieropositività su animali e vettori; in grigio le aree dove non vi sono riportati dati o positività; le linee nere evidenziano le aree in cui si trovano principalmente i vettori; i numeri cerchiati rappresentano i Lineage più frequenti in quella zona [Chancey et al., 2015].

Dati i recenti focolai, è stato ipotizzato che i possibili turbamenti dell'ecosistema dell'Europa meridionale dovuti ai cambiamenti climatici, hanno favorito la diffusione del WNV nelle aree in cui è nota la presenza di vettori competenti [Di Sabatino et al., 2014; Chancey et al., 2015].

In Italia, dal 1998 ad oggi sono stati segnalati 2 focolai epidemici. Il primo si è verificato in Toscana (Palude di Fucecchio) dove ha causato 14 casi clinici in cavalli, di cui 6 mortali. Nel corso dell'epidemia, pur in assenza di malattia conclamata, vennero rilevate positività anticorpali in persone che condividevano con i cavalli il rischio delle punture di zanzara [Cantile et al., 2000; Autorino et al., 2002].

A distanza di 10 anni dalla prima notifica, nell'agosto 2008 il virus ha fatto la sua ricomparsa in Italia nell'area del delta del Po, interessando i territori delle province di Ferrara, Bologna, Modena, Rovigo, Padova e Mantova, con casi confermati di infezione in cavalli e volatili. Successivamente sono stati segnalati tre casi umani di malattia di West Nile (WNV): uno in provincia di Bologna e due in provincia di Ferrara. Nello stesso anno si sono verificati per la prima volta casi di malattia neuro-invasiva di West Nile (WNIN) nell'uomo in alcune province dell'Emilia Romagna e del Veneto.

Nel 2009 si sono verificati 16 casi di WNIN (il doppio rispetto all'anno precedente) nell'uomo nelle regioni Emilia Romagna (8 casi), Veneto (6 casi) e Lombardia (2 casi) [Mancini et al., 2008; Barzon et al., 2009; Rizzo et al., 2009; Busani et al., 2011].

Nel 2010 si sono riportati focolai di infezione nelle province di Trapani, Campobasso, Bologna e Venezia (cavalli), di Modena (ghiandai), di Rovigo, Modena e Venezia (zanzare) e in Veneto (uomo).

Nel 2011 la presenza del virus è stata confermata in Veneto e ha fatto la sua comparsa in Sicilia.

Durante il 2012 sono stati segnalati 28 casi confermati di malattia neuro invasiva da WNV (WNIN) in Basilicata, Friuli Venezia Giulia, Sardegna e Veneto. Sono risultati positivi allo screening 14 donatori di sangue asintomatici.

Nel 2013 sono stati confermati 40 casi (ultimo caso a settembre) in Emilia-Romagna, Lombardia, Puglia e Veneto. Tra i donatori asintomatici sono state trovate 12 positività.

Per il 2014 i casi confermati sono stati 21 in Emilia-Romagna, Lombardia e Veneto.

Nel 2015 infine sono stati segnalati 35 casi confermati di malattia neuro-invasiva da West Nile Virus (Emilia-Romagna, Lombardia e Veneto) e 10 casi confermati di febbre con infezione da WNV (8 in Emilia-Romagna e 2 in Lombardia). Inoltre sono risultati positivi

allo screening 13 donatori di sangue: 6 in Emilia Romagna, 7 in Lombardia [Di Sabatino et al., 2014; Reparto di Epidemiologia delle Malattie Infettive, CNESPS - Istituto Superiore di Sanità, <http://www.epicentro.iss.it/problemi/westNile/westNile.asp>; European Centre for Disease Prevention and Control, http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever_maps/pages/index.aspx].

Vettori e ospiti del West Nile virus

Una delle peculiarità di questo Flavivirus è la possibilità di essere trasmesso da differenti generi e specie di zanzare. Le specie di zanzare dalle quali il WNV è stato isolato sono almeno 65; la maggior parte appartiene al genere *Culex*, in particolare *Culex pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tarsalis*, *Cx. univittatus*, *Cx. antennatus* e *Cx. modestus*. In Europa *Cx. pipiens* è considerato il principale vettore, e probabilmente la specie coinvolta nell'epidemia toscana del 1998, mentre in America sembra essere *Cx. tarsalis*. Diversi studi hanno riportato che anche le zanzare del genere *Aedes* possono essere coinvolte nel ciclo di trasmissione del West Nile virus [Colpitts et al., 2012; Petersen et al., 2013].

Il WNV può infettare una grande varietà di specie selvatiche e domestiche di uccelli e di mammiferi, ma anche anfibi e rettili [Klenk et al., 2003; Klenk et al., 2004]. Tuttavia tra i vertebrati i principali ospiti reservoir ed amplificatori del WNV sono gli uccelli poiché sviluppano elevati e persistenti livelli di viremia; le specie maggiormente colpite sono gazze, corvi, ghiandaie, passeri, fringuelli e merli. Una delle ipotesi che spiegherebbe il verificarsi di sporadici focolai di WNV in Europa, anche in aree distanti tra di loro, è la presenza di uccelli migratori. Durante lo svernamento in Africa, gli uccelli possono infettarsi e, con la migrazione primaverile nei mesi di aprile-maggio, trasportare il virus verso Nord in Europa. Il virus, nel giro di 2-3 mesi, è così trasmesso agli uccelli di specie stanziali (ospiti amplificatori) grazie alla presenza della popolazione autoctona di vettori. Una volta stabilito il ciclo endemico e di amplificazione tra la popolazione di uccelli selvatici e di vettori, l'infezione può accidentalmente trasmettersi attraverso la puntura delle zanzare anche a mammiferi presenti nella stessa area geografica, incluso l'uomo ed il cavallo, dove l'infezione si rende clinicamente manifesta. L'interessamento, quindi, delle specie di mammiferi avviene tardivamente nel corso della stagione epidemica, e ciò spiega il motivo per cui in Europa i focolai clinici di WND si evidenziano tra luglio e settembre. Gli equidi e l'uomo sono ospiti terminali dell'infezione o a fondo cieco epidemiologico in quanto non sviluppano una viremia tale da infettare i vettori e contribuire così alla prosecuzione del ciclo di trasmissione [Bowen et al., 2007].

La sintomatologia clinica riconducibile a WNV, oltre che nell'uomo come già descritto, è riscontrabile anche negli equidi e negli uccelli; tuttavia, generalmente, la maggior parte delle infezioni decorre in modo asintomatico. Negli uccelli le lesioni più importanti sono caratterizzate da meningoencefalite con uno spiccato coinvolgimento delle cellule del Purkinje del cervelletto, emorragie a carico dell'encefalo, splenomegalia, miocardite e coinvolgimento epatico e renale. Nei cavalli non sono presenti lesioni macroscopiche a carico degli organi, le lesioni sono visibili solo a livello microscopico e sono esclusivamente a carico del sistema nervoso centrale [Pauli et al., 2013; Chancey et al., 2015].

Trasmissione virale

Il ciclo di trasmissione di WNV coinvolge artropodi (vettori) e vertebrati (ospiti). La trasmissione nei vettori può avvenire sia per via transovarica che transtadiale. L'uomo è coinvolto dall'infezione solo accidentalmente. Il WNV è mantenuto in natura da due diversi cicli:

- ciclo primario o ciclo endemico: prevede la trasmissione zanzara-uccello-zanzara; esso avviene attraverso il continuo passaggio tra i vettori ematofagi e gli uccelli (reservoir di infezione o ospiti amplificatori). Il WNV, quindi, una volta ingerito, è in grado di diffondere nell'organismo della zanzara, dove si moltiplica localizzandosi a livello delle ghiandole salivari per poi essere trasmesso all'ospite vertebrato. Il periodo di tempo che intercorre dall'assunzione del virus sino alla sua localizzazione nelle ghiandole salivari viene definito periodo di incubazione estrinseca, che dura circa 10-14 giorni. Questo periodo identifica il tempo che trascorre tra il pasto infettante e il momento in cui la zanzara è di nuovo in grado di trasmettere il virus all'ospite vertebrato.

- ciclo secondario o ciclo epidemico: si manifesta quando, a causa di particolari condizioni ecologiche, ospiti accidentali, come il cavallo e l'uomo, entrano nel ciclo di trasmissione. In questo caso gli artropodi vengono chiamati vettori ponte. I mammiferi infettati si comportano come ospiti accidentali a fondo cieco in quanto la viremia non presenta un titolo tale da poter infettare nuovamente un vettore competente. Gli animali possono inoltre infettarsi nutrendosi con prede infette [Campbell et al., 2002; Colpitts et al., 2012].

Le zanzare cessano la loro attività durante i mesi freddi; tuttavia è stata dimostrata la capacità del virus di sopravvivere, durante questo periodo, nelle zanzare infette che superano l'inverno in luoghi chiusi [Petersen et al., 2013].

In Europa il ciclo di trasmissione del WNV può essere confinato in due principali

ecosistemi: rurale o selvatico che si instaura in prossimità delle zone umido-paludose tra uccelli selvatici e zanzare ornitofile, e sinantropico/urbano che si instaura tra uccelli sinantropici o domestici e zanzare, che possono effettuare il pasto di sangue sia sugli uccelli che sull'uomo (Figura 24).

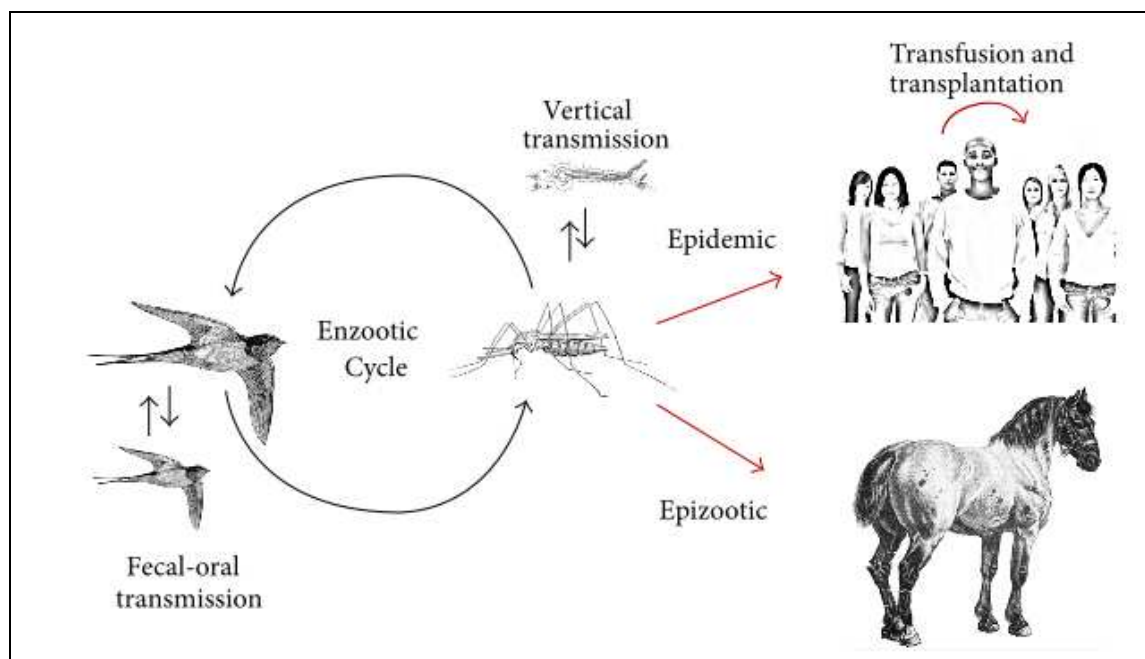


Figura 24. Cicli di trasmissione del WNV [Chancey et al., 2015].

È importante sottolineare che il virus non si trasmette da persona a persona, né da cavallo a persona a causa dei bassi livelli di viremia. Altre modalità di infezione, che non prevedono il coinvolgimento diretto del vettore, anche se molto più rare, sono trapianti di organi, trasfusioni di sangue, allattamento al seno e la trasmissione madre-feto in gravidanza. Sono documentati anche casi di infezione dovuti ad incidenti in laboratori attraverso ferite aperte che sono venute in contatto con tessuti cerebrali infetti o tramite placenta [Campbell et al., 2002; Zhang et al., 2009; Pauli et al., 2013; Peterson et al., 2013].

Prevenzione e sorveglianza

Attualmente non ci sono vaccini approvati per l'uomo, ma ne esistono tre per cavalli: immunizzazione con WNV inattivato con formalina (West Nile-Innovator®), vaccino con virus ucciso (Vetera® WNV vaccine) e vaccino ricombinante (Recombitek® Equine West Nile Virus Vaccine) [De Filette et al., 2012]. Si stanno studiando delle alternative anche per

l'uomo: diversi vaccini sono stati testati in studi pre-clinici e ad oggi ci sono stati 8 studi clinici, con risultati promettenti in termini di sicurezza ed induzione dell'immunità [Amanna et al, 2014]. Tuttavia per il momento la prevenzione consiste soprattutto nel ridurre l'esposizione alle punture di zanzare [Campbell et al., 2002; Pauli et al., 2013]. L'eradicazione del WNV è impossibile a causa del ciclo biologico uccello-zanzara che lo mantiene in natura, ma la formazione delle persone (campagna di prevenzione), le misure individuali precauzionali e la protezione diretta contro i morsi degli insetti (pantaloni lunghi, zanzariere, repellenti, pesticidi, rimozione di acque stagnanti) sono contributi essenziali per le misure di profilassi dirette contro le infezioni da WNV.

A seguito dei casi riportati, i sistemi di sorveglianza sia umana che animale sono stati implementati. Tutti i casi sospetti di meningoencefalite vengono analizzati mediante indagini sierologiche e molecolari; per quanto riguarda gli animali si sono attivati sistemi di sorveglianza su cavalli, uccelli selvatici e zanzare. In Emilia-Romagna ad esempio, nella stagione 2009, 9 casi sono risultati positivi su 78 sospettati con sintomatologia neurologica (3 morti), 26 casi su 46 cavalli sono stati confermati e 44 di 1218 uccelli analizzati sono risultati positivi per il genoma virale. La sorveglianza entomologica e il programma di sorveglianza veterinario hanno mostrato la presenza di positività circa 2-3 settimane prima dell'insorgenza del primo caso neurologico umano. Anche la sorveglianza passiva sui cavalli si è dimostrata uno strumento utile e precoce per l'identificazione dell'attività del WNV sui cavalli (la siero-conversione è risultata del 13%) ma sembra essere meno sensibile in quanto dal 2009 è stato proposto un intensivo programma di vaccinazione per cavalli [Angelini et al., 2010]. Negli anni successivi, Bellini e collaboratori hanno condotto uno studio in cui venivano illustrati risultati soddisfacenti ottenuti dalla successiva implementazione dei sistemi di sorveglianza sia ambientale (zanzare e uccelli) che umana per aumentare la conoscenza sulla circolazione del WNV e ridurre la possibilità di trasmettere l'infezione tramite trasfusioni di sangue e donazioni di organi e tessuti [Bellini et al., 2014].

I donatori asintomatici che presentano viremia in assenza di anticorpi specifici contro il WNV sono da considerare infetti e hanno un alto rischio di trasmettere l'infezione; per tale motivo tutti i campioni devono essere testati per escludere la presenza del virus. Ogni anno, durante la stagione estivo-autunnale, vengono fornite dal Ministero della Salute delle indicazioni per la sorveglianza e la prevenzione della trasmissione trasfusionale del WNV [<http://www.centronazionalesangue.it/notizie/west-nile-virus-stagione-2015>].

In particolare si raccomanda di sospendere le donazioni di sangue ed emocomponenti temporaneamente (28 giorni) se il soggetto ha soggiornato anche solo per una notte in un luogo in cui si è confermata la presenza del virus (nell'area occidentale della Sardegna, nella pianura padana e in alcune aree del Friuli Venezia Giulia). La stessa profilassi viene adoperata per soggetti che hanno soggiornato in Canada, Stati Uniti e alcuni Paesi dell'Ue (Romania, Israele, Austria, Serbia, Ungheria, Portogallo). L'elenco completo dei luoghi considerati a rischio di contrarre l'infezione viene tenuto aggiornato e si può consultare nel sito sopra citato.

1.5. DENGUE VIRUS

1.5.1. CLASSIFICAZIONE E SIEROTIPI DEL DENGUE VIRUS

Il Dengue virus è un virus a RNA appartenente alla famiglia delle Flaviviridae, genere Flavivirus [Kuno et al., 1998]. Grazie ai test di neutralizzazione, sono stati individuati quattro diversi sierotipi, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, ciascuno dei quali può essere ugualmente causa della malattia.

Si ritiene che l'infezione con un sierotipo conferisca un'immunità a vita per il sierotipo in questione, ma solo a breve termine nei confronti degli altri. L'ulteriore infezione con un altro sierotipo comporta un aumento del rischio di complicanze gravi. La forma severa della malattia in caso di infezione secondaria avviene in particolar modo per gli individui esposti a DENV-1 che contraggano l'infezione da DENV-2 o DENV-3, oppure in persone esposte prima a DENV-3 e poi a DENV-2 [Guzman et al., 2010].

Recentemente è stato identificato un quinto sierotipo (DENV-5), isolato da una persona affetta da Dengue in Malesia. Si tratta di un virus geneticamente divergente dagli altri sierotipi e la risposta anticorpale è ben distinguibile da quella nei confronti di DENV-4. I dati però non sono ancora stati pubblicati

1.5.2. GENOMA

Il genoma del virus contiene 11 mila paia di basi e codifica per tre proteine strutturali che formano il virione (C, prM, E) e sette diverse proteine non strutturali necessarie per la replicazione virale (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [Gubler et al., 1998]. NS1 è una proteina altamente conservata e fortemente immunogenica: stimola infatti gli

anticorpi con attività di fissazione del complemento.

1.5.3. PATOGENESI E MANIFESTAZIONI CLINICHE

La virulenza e la diffusione dell'infezione da Dengue virus dipendono dalla risposta dell'ospite, dai diversi sierotipi e dalle condizioni favorevoli che permettono la replicazione virale nei vettori [Gurugama et al., 2010]. Quando la zanzara infetta punge un essere umano, il virus penetra la cute insieme alla saliva dell'insetto. Una volta all'interno dell'organismo, si lega ai leucociti e si riproduce al loro interno. In particolare il virus lega le cellule di Langerhans, entrandovi tramite endocitosi mediata dall'interazione tra proteine virali e specifiche proteine di membrana della cellula (lectina DC-SIGN, CLEC5A e recettore per il mannosio). Il leucocita si sposta verso il linfonodo più vicino, mentre al suo interno il virus replica, in vescicole legate al reticolo endoplasmatico, dove il genoma virale viene copiato e vengono prodotte le proteine virali. Il virione immaturo si sposta dunque all'apparato di Golgi dove avviene la maturazione definitiva grazie alla glicosilazione delle proteine virali ed esce dalla cellula mediante esocitosi. Oltre alle cellule di Langerhans, vengono infettati anche monociti e macrofagi.

I leucociti infetti rispondono con la produzione di numerosi fattori, tra cui l'interferone, responsabili della maggior parte delle manifestazioni cliniche, quali febbre, dolore e altri sintomi simil-influenzali. La produzione di interferone aumenta il livello di difesa da infezioni virali, favorendo la produzione di proteine del sistema di trasduzione mediato da JAK; alcuni sierotipi di Dengue virus sembrano avere la capacità di inibire questo segnale. La produzione di interferone attiva anche la produzione di anticorpi diretti contro antigeni virali, che mediano l'attivazione dei linfociti T contro le cellule infette. Gli anticorpi permettono l'opsonizzazione e la conseguente fagocitosi da parte di cellule specializzate; alcuni di essi però, non legando completamente l'antigene, trasportano il virus lontano dai lisosomi del fagocita, in modo che esso non sia distrutto ma possa, bensì, continuare a replicare [Martina et al., 2009].

Nelle infezioni gravi la replicazione virale è molto aumentata, avviene anche in organi quali il fegato e il midollo osseo e causa il passaggio di liquidi dal torrente circolatorio alle cavità corporee, attraverso l'endotelio dei piccoli vasi sanguigni [Varatharaj et al., 2010]. Ciò causa una riduzione del sangue circolante e la conseguente riduzione della pressione arteriosa, che può portare a uno stato di shock ipovolemico. D'altro canto la replicazione virale a livello del midollo osseo causa una disfunzione dell'emopoiesi, cui consegue la piastrinopenia responsabile delle emorragie tipiche della Dengue. La morte delle cellule

infette a livello di questi organi può portare a un grande rilascio di citochine e fattori fibrinolitici, che peggiorano il quadro emorragico e favoriscono ulteriormente il danno endoteliale [Martina et al., 2009]. Non è del tutto chiaro perché un'infezione secondaria dovuta a un diverso sierotipo porti a sviluppare un rischio sensibilmente aumentato di forma grave della malattia. L'ipotesi maggiormente condivisa si basa su un potenziamento mediato da anticorpi che si suppone possa essere causato dallo scarso legame di anticorpi non neutralizzanti e un direccionamento dei virioni verso il compartimento cellulare errato nei globuli bianchi che hanno fagocitato il virus per permetterne la distruzione [Guzman et al., 2010]. Si ritiene tuttavia che questo possa non essere l'unico meccanismo patogenetico delle forme gravi di Dengue; altri possibili fattori che potrebbero avere un ruolo sono i linfociti T, alcune citochine e proteine del sistema del complemento [Martina et al., 2009]. In alcuni pazienti la malattia progredisce in una fase critica, successiva alla normalizzazione della temperatura corporea, che dura tipicamente uno o due giorni. Durante questa fase si può presentare un accumulo di liquidi nel torace (versamento pleurico) e nell'addome (ascite) in conseguenza dell'aumento della permeabilità dei capillari. Questo può generare una condizione di ipovolemia e di scarsa perfusione degli organi vitali, spesso associata a disfunzione organica ed emorragie, in particolar modo digestive. La condizione di shock o di febbre emorragica si manifesta in meno del 5% dei pazienti e sono in particolar modo quelli infettati una seconda volta da un diverso sierotipo del Dengue virus a essere a rischio.

Il periodo di incubazione dura tra 3-14 giorni, ma è solitamente compreso tra i 4-7 giorni; è possibile quindi escludere la presenza della malattia in pazienti che manifestino sintomi oltre due settimane dopo il ritorno da un soggiorno in un'area endemica.

Tipicamente i soggetti infettati da DENV sono asintomatici nell'80% dei casi (Figura 25); nella restante percentuale presentano manifestazioni cliniche leggere, quali febbre (spesso superiore ai 40°C), cefalea, dolori attorno e dietro agli occhi, forti dolori muscolari e alle articolazioni, nausea e vomito, oltre al caratteristico esantema cutaneo che inizia tipicamente durante il 1° o 2° giorno (Figura 26). Questa forma di infezione dura solitamente tra i 2 e i 7 giorni ed è conosciuta come Dengue fever (DF).

In una piccola percentuale dei casi si sviluppa una forma di febbre emorragica (Dengue hemorrhagic fever, DHF), con trombocitopenia, emorragie e perdita di liquidi, che può evolvere in shock circolatorio e morte (Dengue shock syndrome, DSS). La forma emorragica viene suddivisa dalla WHO (World Health Organization) in quattro gradi di

gravità:

- grado I: ecchimosi e positività alla prova del laccio in un paziente con febbre;
- grado II: emorragia spontanea a carico di cute o altri organi;
- grado III: shock;
- grado IV: shock grave, con polso e pressione arteriosa non rilevabili.

I gradi III e IV sono definiti sindrome da shock Dengue. In Asia sono i bambini a sviluppare le forme più severe di infezione, mentre nelle Americhe si osservano forme di DHF e DSS nella popolazione adulta [Martina et al., 2009].

L'infezione può risultare particolarmente pericolosa in individui affetti da malattie croniche, quali il diabete mellito e l'asma bronchiale. Anche se il DENV non è considerato un virus neurotrope, occasionalmente può causare disturbi neurologici come encefaliti, meningiti, encefalopatie, ictus e la sindrome di Guillain-Barré [Rao et al., 2013; Madi et al., 2014; Ralapanawa et al., 2015]. Altre complicanze che possono verificarsi sono insufficienza epatica e miocarditi [Gurugame et al., 2010]. Studi recenti hanno evidenziato che il polimorfismo di alcuni geni umani risulta correlato a maggior rischio di malattia grave. Tra questi sono compresi mutazioni del $TNF\alpha$, del CTLA-4, del $TGF\beta$ e particolari forme alleliche del complesso maggiore di istocompatibilità; la carenza di glucosio-6-fosfato deidrogenasi, molto comune nei paesi africani, sembra anch'essa aumentare i rischi [Martina et al., 2009].

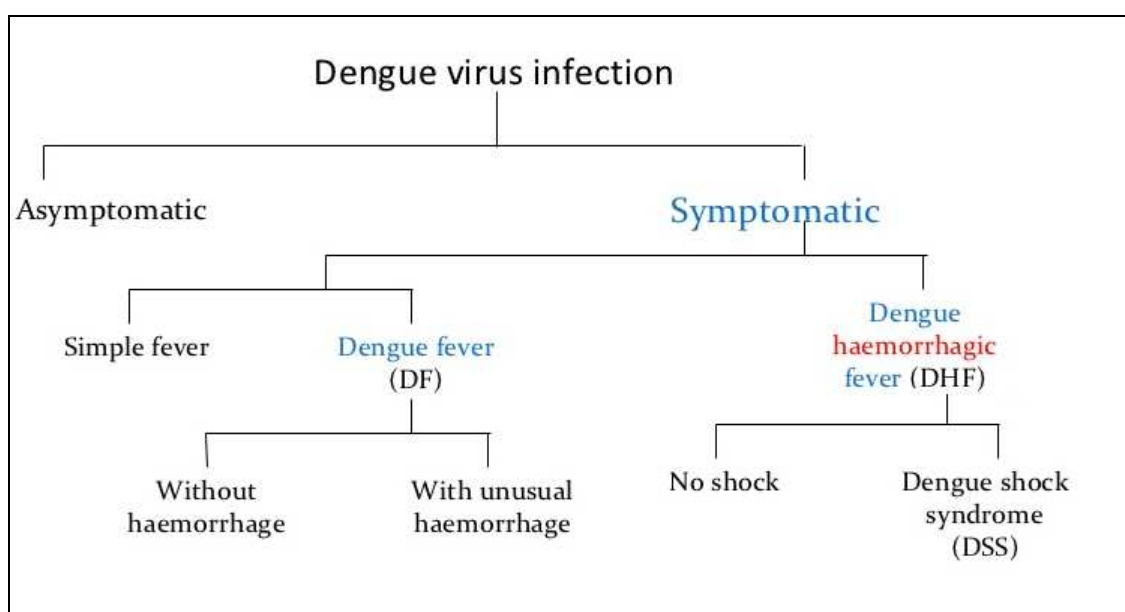


Figura 25. Classificazione delle infezioni da Dengue virus

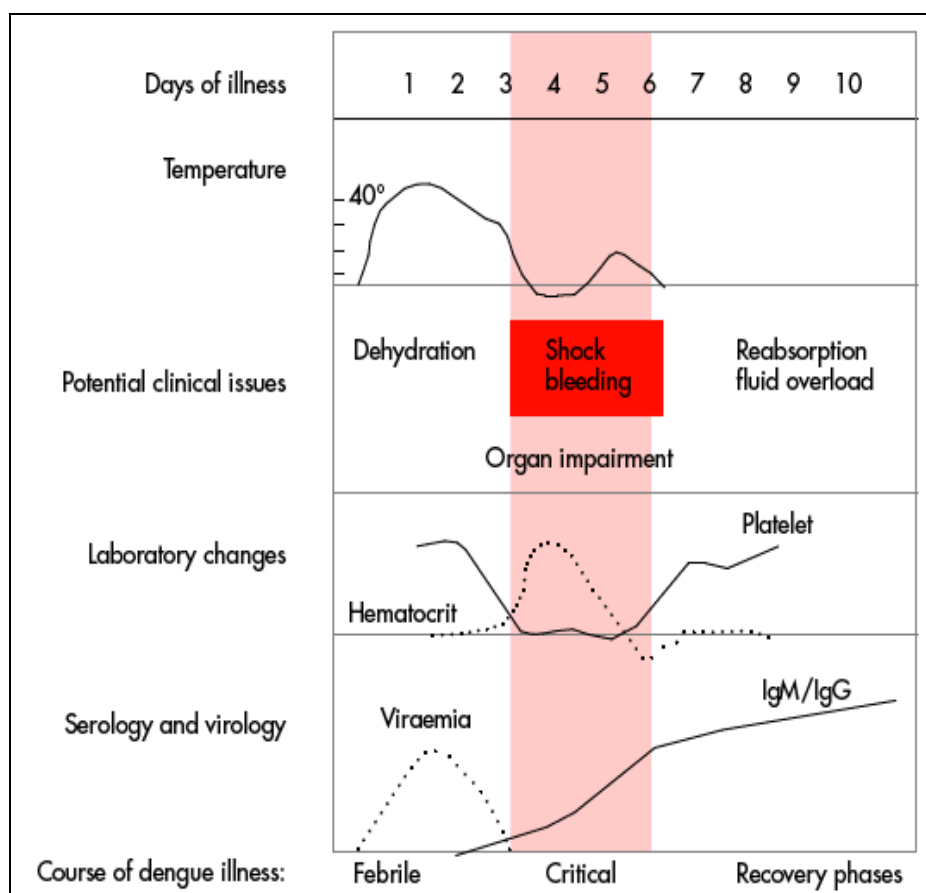


Figura 26. Decorso dell'infezione da DENV [World Health Organization, 2009].

1.5.4. DIAGNOSI E TERAPIA

La diagnosi è probabile se vengono rilevati in un paziente residente in un'area endemica, oltre alla febbre elevata, due tra i seguenti: nausea e vomito, esantema, dolore generalizzato, leucopenia, positività alla prova del laccio. Questi segnali d'allarme si presentano tipicamente prima dell'esordio della forma grave di Dengue. La prova del laccio, particolarmente utile quando non sono disponibili esami di laboratorio, si esegue con l'applicazione per cinque minuti di uno sfigmomanometro al braccio e tramite la conta delle emorragie petecchiali che si presentano: maggiore è il loro numero, più probabile è la diagnosi di malattia.

La diagnosi è normalmente effettuata in base ai sintomi, ma può essere più accurata con la ricerca del virus o di anticorpi specifici in campioni di sangue.

La prima alterazione visibile agli esami di laboratorio è il ridotto numero di globuli bianchi, condizione spesso seguita da un calo del numero di piastrine e acidosi metabolica. Nella forma grave la perdita di liquidi porta a emoconcentrazione, con aumento

dell'ematocrito, e a riduzione dell'albumina circolante. Versamento pleurico e ascite possono essere rilevati clinicamente solo quando importanti, mentre l'ecografia permette una diagnosi più precoce, anche se il suo utilizzo è limitato dalla scarsa disponibilità delle apparecchiature in alcuni paesi [Gurugama et al., 2010].

L'RNA virale o lo stesso virus possono essere evidenziati solamente durante la fase viremica entro i primi 2-7 giorni della malattia utilizzando metodiche molecolari su siero o sangue intero (real time RT-PCR) o eseguendo una coltura virale in vitro. Recentemente si è trovato il genoma virale anche su campioni di urina e saliva, permettendo di eseguire una diagnosi precoce anche quando non è possibile effettuare un prelievo di sangue come spesso accade per i bambini o nei casi in cui i pazienti presentano sindrome emorragica [Drosten et al., 2002; Poloni et al., 2010; Hirayama et al., 2012; Andries et al., 2015].

Ultimamente si sono resi disponibili dei kit commerciali in grado di rilevare precocemente l'antigene NS1 del Dengue virus nel siero umano prima della comparsa degli anticorpi specifici. Tuttavia, questi test non permettono di distinguere quale sia il sierotipo responsabile dell'infezione. L'antigene NS1 può essere rilevato nel siero durante l'infezione acuta a partire dal primo giorno e fino a 9-10 giorni dall'insorgenza dei sintomi sia nei casi di infezione primaria che secondaria. Da uno studio recente è emerso che l'antigene NS1 può essere rilevato anche nelle urine e nella saliva [Korhonen et al., 2014].

La ricerca delle IgG e IgM specifiche, può essere utilizzata per confermare la diagnosi di Dengue anche nelle fasi tardive. Nell'80% dei casi di infezione primaria, gli anticorpi di classe IgM compaiono dal 5° giorno dall'inizio dei sintomi, per quanto riguarda l'infezione secondaria hanno invece titoli più bassi e durano di meno: diventano infatti non rilevabili 30-90 giorni dopo l'infezione primaria, ma in caso di infezioni successive, scompaiono più rapidamente. Le IgG invece rimangono rilevabili per più di sessant'anni, anche in assenza di sintomi, è quindi risultano un ottimo indicatore di infezioni pregresse. Dopo l'infezione primaria raggiungono il loro picco nell'arco di 2-3 settimane, mentre in corso di infezioni successive il picco è raggiunto prima e il titolo è solitamente più alto. Sia le IgG che le IgM provvedono all'immunità nei confronti di un determinato sierotipo. In test di laboratorio queste immunoglobuline possono legare altri Flavivirus, rendendo difficile l'interpretazione dell'esame. La rilevazione unicamente delle IgG non è considerata diagnostica a meno che il loro titolo non quadruplichi in campioni di sangue raccolti ad almeno due settimane di distanza dalla precedente raccolta. In una persona sintomatica, la rilevazione delle sole IgM è considerata diagnostica [Gurugama et al., 2010; Hirayama et al., 2012].

Diagnosi differenziale

L'infezione da Dengue virus, a causa della sintomatologia aspecifica, soprattutto nelle fasi precoci, è difficile da distinguere da altre infezioni virali. La Dengue entra in diagnosi differenziale in ciascun individuo che manifesti febbre entro due settimane da un soggiorno in aree tropicali e subtropicali. Altri Flavivirus che causano una sintomatologia simile sono Yellow fever virus, Japanese encephalitis virus, St Louis encephalitis virus, Zika virus e West Nile virus. È difficilmente distinguibile anche da sintomatologia causata da alcuni Alphavirus come ad esempio dal Sinbis virus ma soprattutto dal Chikungunya virus, che genera una malattia virale simile alla Dengue sia per manifestazioni cliniche, sia per localizzazione delle aree endemiche. Spesso l'iter diagnostico è orientato a escludere altre malattie simili, quali malaria, leptospirosi, febbre tifoide e meningite meningococcica, rickettsiosi ((*Rickettsia prowazeki*, *R. mooseri*, *R. conori*, *R. rickettsi*, *Orientia tsutsugamushi*, *Coxiella burnetii*, etc.), morbillo, enterovirus, influenza ed infezioni simil-influenzali [World Health Organization, 2009].

Terapia

La terapia è di supporto e si basa sull'idratazione in caso di una forma lieve-moderata di malattia, mentre nei casi più gravi, sulla somministrazione endovenosa di liquidi e sull'emotrasfusione. Procedure più invasive quali l'inserimento di un sondino nasogastrico, l'iniezione intramuscolare e le punture arteriose devono essere evitate a causa del rischio di sanguinamento. Il paracetamolo viene utilizzato per il trattamento sintomatico della febbre e del dolore, mentre i FANS come l'aspirina o l'ibuprofene vanno evitati per non peggiorare il rischio di emorragia. La trasfusione di sangue, sangue intero o globuli rossi concentrati, viene richiesta precocemente nei pazienti con segni vitali instabili e con ematocrito diminuito [Gurugama et al., 2010].

1.5.5. EPIDEMIOLOGIA

L'infezione da Dengue virus è tra le più importanti arbovirosi e come malattia tropicale la Dengue è ritenuta seconda in importanza solo alla malaria; l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) la considera una delle sedici malattie tropicali neglette. Nel 2009 ha stimato che 2.5 bilioni di persone vivono in aree in cui è possibile contrarre il Dengue virus e circa 50 milioni di persone vengono infettate ogni anno.

Cenni storici e distribuzione

Le origini del termine Dengue non sono note, ma sembra che derivi dalla frase “ka kadinga pepo” in lingua swahili (lingua africana) che significa convulsioni simil-crampi causate da uno spirito maligno. Il termine dinga potrebbe aver dato origine alla parola spagnola Dengue, che significa fastidioso o attento, aggettivi che descrivono il dolore alle ossa caratteristico della malattia. Gli schiavi delle Indie Occidentali erano chiamati dandy (damerino, in italiano) a causa della postura e dell'andatura, pertanto la malattia è conosciuta anche come febbre dandy. Il termine febbre spaccaossa fu invece utilizzato per la prima volta durante l'epidemia del 1789-90 a Filadelfia. Il termine Dengue divenne il più utilizzato solo a partire dal 1828.

Il primo caso di Dengue mai documentato risale probabilmente all'enciclopedia medica cinese realizzata durante la Dinastia Jin, tra il 265 e il 420, in riferimento a un veleno acquoso associato a insetti. Numerose epidemie sono state descritte durante il XVII secolo, ma la prima documentata è quella che, tra il 1779 e il 1780 colpì Africa, America Settentrionale e gran parte dell'Asia. Nel 1906 fu confermata la trasmissione della malattia mediata da zanzare del genere *Aedes* e, nel 1907, la Dengue divenne la seconda malattia dopo la febbre gialla dove fosse stata dimostrata un'eziologia virale. Fino agli anni quaranta del XX secolo, le epidemie furono infrequenti. La diffusione della Dengue durante e dopo la seconda guerra mondiale è stata attribuita al dissesto ecologico causato dalla guerra stessa, che portò alla propagazione della malattia in varie aree del mondo prima risparmiate e alla comparsa della forma emorragica. Questa forma è stata descritta per la prima volta nelle Filippine nel 1953, diventando, a partire dagli anni Settanta, una delle principali cause di mortalità infantile nelle Americhe e nelle isole dell'Oceano Pacifico. Nel 1981 si è sviluppata un'epidemia da virus DENV-2 in pazienti dell'America Centrale e Meridionale che avevano contratto il DENV-1 diversi anni prima e ha fatto per la prima volta la sua comparsa lo shock caratteristico della fase critica della malattia [Gubler et al., 1998].

Il Dengue virus è ampiamente diffuso in tutto il mondo ed è particolarmente presente durante e dopo la stagione delle piogge nelle zone tropicali e subtropicali di Africa (Burkina Faso, Costa d'Avorio, Kenya, Mozambico, Nigeria, Senegal, Somalia), Sudest asiatico (Bangladesh, Birmania, Korea, India, Indonesia, Maldive, Nepal, Pakistan, Sri Lanka, Thailandia, Timor Est), Cina, Medioriente (Arabia Saudita, Egitto, Yemen), America latina e centrale (Argentina, Barbados, Bolivia, Brasile, Cile, Colombia, Costa

rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guyana francese, Messico, Paraguay, Perù, Porto Rico, Repubblica dominicana, Uruguay, Venezuela), Nord America (Hawaii, Texas), Australia (Queensland) e diverse zone del Pacifico (Cambogia, Filippine, Malesia, Micronesia, Nuova Caledonia, Polinesia francese, Vietnam) [World Health Organization, 2009].

Inizialmente si registravano lunghi intervalli di tempo tra un'epidemia e l'altra (10-40 anni) poiché vi erano meno possibilità di esporsi al virus e ai nuovi sierotipi, soprattutto perché i viaggi intercontinentali erano limitati. Il trasporto del virus e dei suoi vettori via mare era piuttosto lento, compromettendo quindi la loro capacità di sopravvivenza. Nel 1950 infatti, l'infezione da Dengue virus interessava solo 9 stati, ma al giorno d'oggi la sua presenza è riportata in oltre 100 paesi in tutto il mondo. Dal 1975 il Dengue virus viene considerato una causa frequente di morbidità e mortalità, soprattutto nei bambini, nel sud-est asiatico. Negli ultimi anni sono aumentate anche le epidemie causate da più di un sierotipo (iperendemicità) e la popolazione è a rischio nelle aree urbane sia tropicali che subtropicali. Ogni anno si registrano 100 milioni di casi di Dengue fever e mezzo milione di Dengue hemorrhagic fever, con una percentuale di mortalità che si aggira sui 5%. Il 90% dei pazienti con DHF sono bambini che hanno meno di 15 anni. Nelle regioni asiatiche il sierotipo predominante era il DENV-2, come è stato documentato nella prima grande epidemia indiana che si è verificata nel 1991; nel 2003 si è verificata la co-circolazione di tutti e quattro i sierotipi ma il maggiormente diffuso attualmente è il DENV-3. Nel corso degli anni l'epidemiologia è mutata ad esempio in base ad aspetti demografici, economici, comportamentali e sociali: crescita della popolazione, urbanizzazione incontrollata delle zone tropicali e subtropicali, aumento della proliferazione e della diffusione delle zanzare della specie *Aedes*, assenza di meccanismi di controllo dei vettori [Guha-Sapir et al., 2005; Gurugama et al., 2010].

Negli ultimi decenni, la diffusione della Dengue è aumentata non solo in molte regioni tropicali ma anche in paesi dell'emisfero nord ed in particolare in Europa costituisce un pericolo di salute globale, dato che si manifesta soprattutto come malattia di importazione (Figura 27).

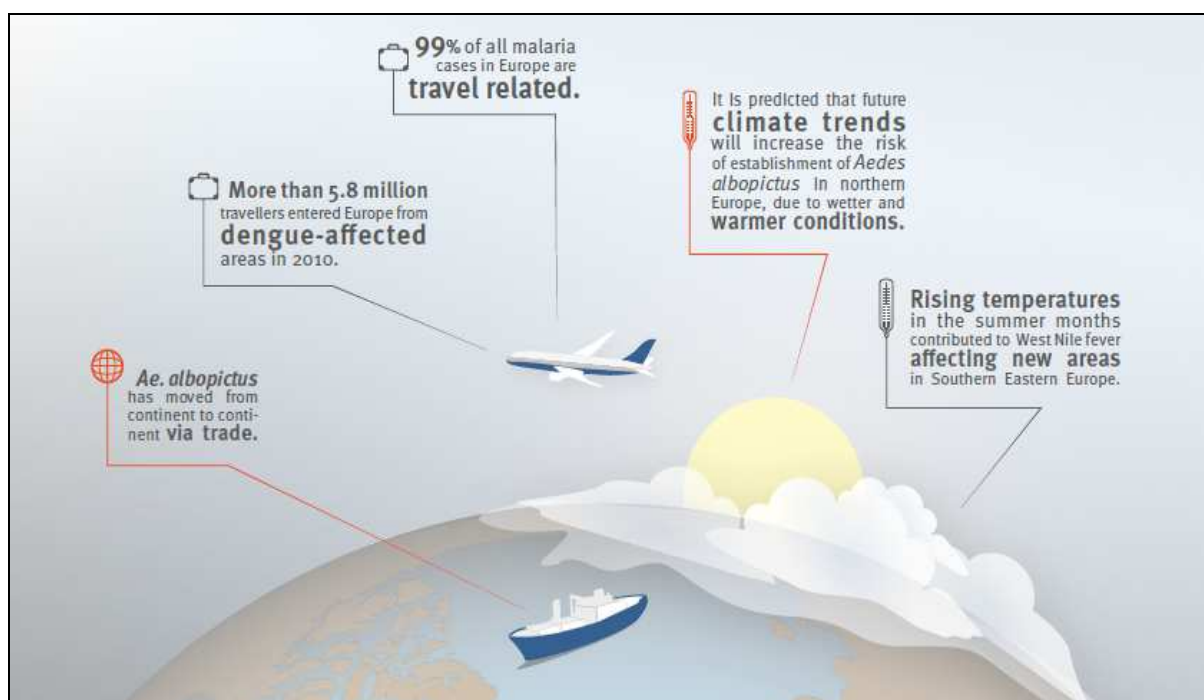


Figura 27. Viaggi, commercio e clima influenzano la distribuzione delle zanzare e dell'infezione da DENV.

In passato, la Dengue era endemica nei paesi balcanici e nell'area del Mediterraneo e probabilmente i casi importati con la presenza del vettore hanno contribuito al diffondersi del virus anche in questa zona. L'ultima epidemia è stata registrata in Grecia tra il 1927 e il 1928, in cui si è avuta un'alta mortalità ed il vettore responsabile era stato *Aedes aegypti*. Dal 1970, ha iniziato a diffondersi anche la specie *Aedes albopictus* in vari paesi europei, come Francia, Grecia, Italia, Paesi Bassi, Slovenia e Spagna. Soprattutto negli ultimi anni, sono stati documentati diversi casi di Dengue fever importati in Europa. I primi casi autoctoni di Dengue virus sono stati segnalati nel sud est della Francia nel settembre 2010 (2 casi) e successivamente in Croazia in un turista tedesco, sempre nello stesso periodo. In Francia i due casi sono stati riportati a Nizza, dove *Ae. albopictus* è particolarmente diffuso; la presenza sporadica del vettore era già stata segnalata in Normandia nel 1999, ma dal 2004 si è stabilita nel sud est francese. Tra il 2006 ed il 2009 sono stati importati circa 350-400 casi all'anno, e nel 2010, fino a settembre ne erano stati segnalati 120 [La Ruche et al., 2010]. Un altro caso autoctono di Dengue è stato diagnosticato, sempre nel sud della Francia, nel 2013 [Marchand et al., 2013]. In Croazia la presenza della zanzara *Ae. albopictus* era già stata riportata nel 2004, mentre ancora prima in uno studio sierologico condotti nel 1980 erano stati trovati anticorpi specifici per il DENV2 (3.9%) e DENV1 (2.1%) nella popolazione sana. Durante il biennio 2011-2012, sono stati raccolti e testati 1180 sieri di residenti della Croazia: in 7 campioni sono stati riscontrati gli anticorpi specifici di classe IgG per il DENV. In Turchia, da uno studio è emerso che lo

0.9% dei donatori di sangue presentava le IgG specifiche [Gjenero-Margan et al., 2011; Pem-Novosel et al., 2015].

Vettori e trasmissione del Dengue virus

Come molti Arbovirus, il virus della Dengue permane in natura in quanto utilizza vettori ematofagi e ospiti vertebrati. Il Dengue virus è trasmesso soprattutto dalle zanzare del genere *Aedes*, in particolar modo la specie *Aedes aegypti*, ma anche *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes scutellaris* (Figura 28) [Gubler et al., 1998]. Gli esseri umani sono gli ospiti primari del virus il quale può però essere rinvenuto anche in altri primati. Il virus si riproduce attraverso la proliferazione delle zanzare che avviene principalmente nei pressi di pozze d'acqua (acqua stagnante), sia in ambienti aperti che chiusi. Il clima influenza in modo diretto le caratteristiche biologiche dei vettori e di conseguenza la loro abbondanza e distribuzione. Si ritiene quindi che la trasmissione di questa infezione dipenda molto dalle caratteristiche climatiche [Baba et al., 2011].

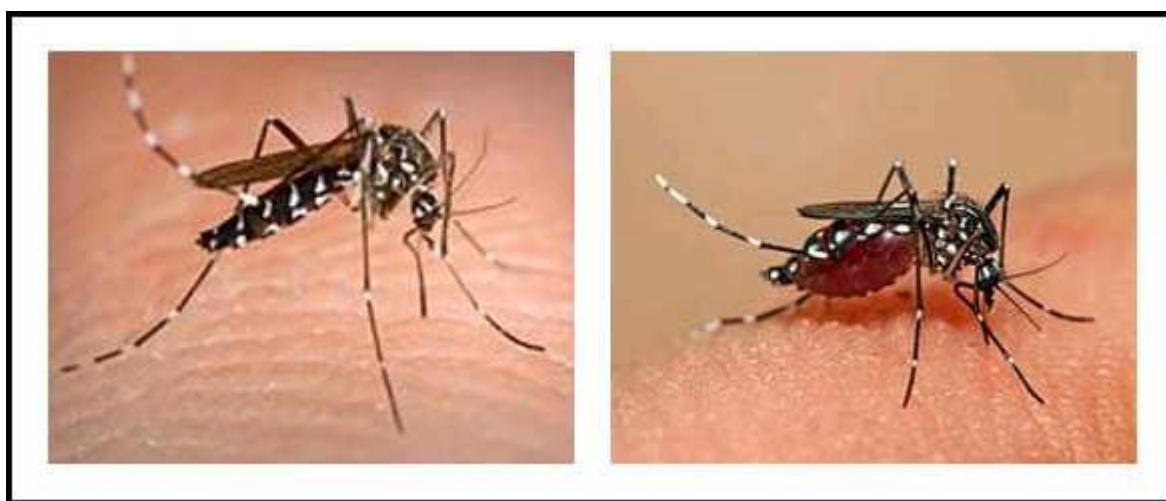


Figura 28. I principali vettori del Dengue virus: *Aedes aegypti* (a sinistra) e *Aedes albopictus* (a destra).

Una femmina di zanzara che acquisisce sangue umano infetto diventa a sua volta infetta, con il virus localizzato a livello dell'apparato digerente. Circa 8-10 giorni dopo, il virus invade e colonizza le cellule di altri tessuti, in particolar modo le ghiandole salivari, dalle quali è espulso insieme alla saliva. L'infezione non sembra avere effetti sulla zanzara, che rimane portatrice della malattia per il resto della propria vita. *Aedes aegypti*, a differenza delle altre, preferisce vivere e deporre le proprie uova in stretto rapporto con gli esseri

umani, che rappresentano la sua fonte preferenziale di nutrimento rispetto ad altri vertebrati. Non si ha quindi contagio diretto tra esseri umani, anche se l'uomo è il principale ospite del virus. Il virus circola nel sangue della persona infetta per 2-7 giorni, e in questo periodo, vista la viremia piuttosto alta (circa 10^9 copie genomiche virali/mL), la zanzara può prelevare e trasmetterlo ad altri [Gubler et al., 1998].

Nelle zone rurali la trasmissione avviene solitamente tramite puntura da parte di *Aedes aegypti* e altre specie del genere *Aedes*, tra le quali *Ae. albopictus*, mentre nelle città avviene quasi esclusivamente tramite *Ae. aegypti*, che risulta molto addomesticata (Figura 29) [Gubler et al., 1998].

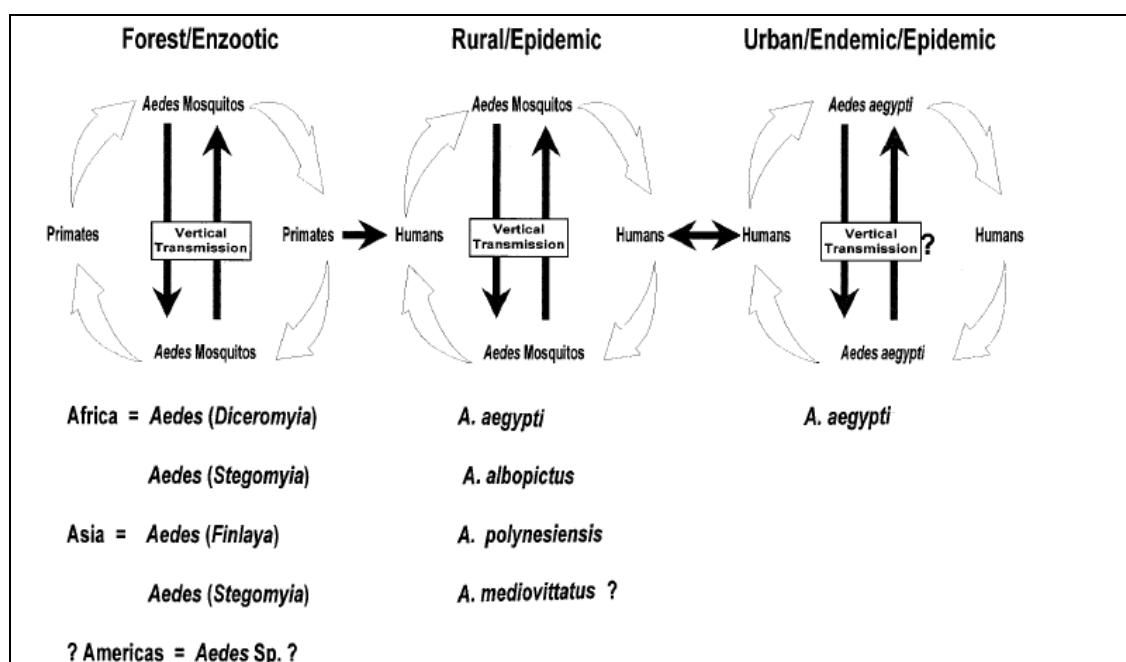


Figura 29. Cicli di trasmissione del Dengue virus [Gubler et al., 1998].

L'infezione da DENV può essere trasmessa anche tramite infusione di emocomponenti o emoderivati e attraverso il trapianto di organi. In paesi dove la malattia è endemica, come nel caso di Singapore, il rischio di infezione tramite trasfusioni di sangue è abbastanza elevato. Inoltre sono stati documentati casi di trasmissione verticale durante la gravidanza o l'allattamento.

Prevenzione e sorveglianza

Gli sforzi della ricerca scientifica per prevenire e trattare la Dengue si basano sul controllo del vettore, sullo sviluppo di un vaccino efficace e sullo studio di farmaci antivirali.

Attualmente si stanno studiando una serie di vaccini, anche se la conoscenza del virus e del suo meccanismo di azione sono aumentate solo negli ultimi anni, dopo che si è registrato un incremento della diffusione della malattia. Il meccanismo immunologico primario che conferisce protezione dal Dengue virus è la neutralizzazione mediata da anticorpi: i vari vaccini candidati attualmente in studio hanno infatti lo scopo di suscitare alti livelli di anticorpi neutralizzanti. L'aumento della co-circolazione di tutti i sierotipi implica la necessità di avere un vaccino tetravalente. Inoltre, l'aver contratto la Dengue protegge la persona solo contro il sottotipo che l'ha causata ma non contro gli altri tre sottotipi virali. Questo fattore sta sicuramente aumentando le difficoltà nello sviluppo di un vaccino specifico ed efficace. L'induzione di protezione, la risposta degli anticorpi neutralizzanti contro tutti e 4 i sierotipi contemporaneamente dovrebbe evitare il rischio teorico di valorizzazione anticorpo-dipendente indotta dal vaccino in soggetti vaccinati. I vaccini in via di sviluppo al momento sono di quattro tipi: vivo attenuato, chimerico vivo- attenuato, inattivato o sub-unità, e a base di acidi nucleici [World Health Organization, 2009].

Non essendoci attualmente vaccini approvati per il Dengue virus, la prevenzione della malattia si basa quindi sul controllo della popolazione della zanzara vettrice e sulla protezione dal contatto dei residenti delle zone endemiche.

Il principale metodo di controllo di *Aedes aegypti* consiste nell'eliminazione del suo habitat, cioè mediante svuotamento dei contenitori di acqua e l'utilizzo di agenti di controllo, ovvero specie animali la cui presenza riduca quella del vettore, o di insetticidi, anche se gli organofosfati o piretroidi non risultano efficaci. La riduzione dei ristagni di acqua all'aria aperta attraverso interventi ambientali è il metodo più utilizzato, dati gli effetti negativi sulla salute da parte degli insetticidi e le maggiori difficoltà logistiche per l'uso gli agenti di controllo. La popolazione può prevenire le punture da parte del vettore utilizzando abiti che coprano completamente la cute, zanzariere o repellenti per insetti [Gubler et al., 1998; Gurugama et al., 2010].

La sorveglianza entomologica, infine, è un utile strumento per determinare i cambiamenti nella distribuzione geografica del vettore, per monitorare e valutare l'efficacia dei programmi di controllo, per ottenere misure relative sulla popolazione del vettore nel corso del tempo e per facilitare le decisioni appropriate e tempestive per quanto riguarda gli

interventi. Inoltre, con i sistemi di sorveglianza si possono identificare le aree ad alta intensità di zanzare e i periodi in cui la popolazione di queste cresce e si sviluppa [World Health Organization, 2009].

1.6. FLAVIVIRUS EMERGENTI

1.6.1. USUTU VIRUS

L'Usutu virus (USUV) è un virus della famiglia Flaviviridae, genere Flavivirus, trasmesso da zanzare. È un membro del gruppo del Japanese encephalitis virus (JEV) assieme al Japanese encephalitis virus (JEV), Murray Valley encephalitis virus (MVEV), Saint Louis encephalitis virus (SLEV) e West Nile virus (WNV). L'USUV è strettamente correlato al WNV [Kuno et al., 1998; Pauli et al., 2014]. Come tutti i membri di questo gruppo, il virus è mantenuto in natura attraverso un ciclo biologico uccelli-zanzare; gli uccelli migratori giocano un ruolo fondamentale nella propagazione di questa zoonosi. Anche se è raggruppato con importanti patogeni per l'uomo, USUV è stato considerato per molti anni un virus esotico di minore importanza, confinato ad una piccola area dell'Africa e caratterizzato da bassa patogenicità per l'uomo e per gli animali [Weissenböck et al., 2009; Nikolay et al., 2011; Savini et al., 2011].

Per la diagnosi, vista l'elevata cross-reattività tra i membri del sierogruppo JEV, sono da preferire i test molecolari a quelli sierologici, anche se questi ultimi sono fondamentali per le infezioni che non sono in fase viremica. L'unico metodo per poter identificare correttamente la risposta anticorpale è il test di neutralizzazione di riduzione delle placche (PRNT), come per tutti i Flavivirus [Cavrini et al., 2011].

Epidemiologia

L'Usutu virus, il cui nome deriva da quello di un fiume in Swaziland, è stato isolato per la prima volta da zanzare della specie *Culex neavei* in Sudafrica nel 1959 e da allora è stato descritto in molti Paesi dell'Africa sub-Sahariana. Nell'uomo è stato isolato per la prima volta nel 1982 nella Repubblica Centro-Africana; il paziente mostrava sintomatologia febbrile e rash cutaneo. Il virus è stato riscontrato nei roditori e negli uccelli di vari paesi africani e sembra essere piuttosto diffuso anche in Europa centrale e occidentale [Nikolay et al., 2011; Vazquez et al., 2011].

Nel 2001 il virus è stato identificato per la prima volta in Europa centrale, in Austria (Vienna e zone limitrofe), in merli (*Turdus merula*), in allocchi di Lapponia (*Strix nebulosa*) e in rondini (*Hirundo rustica*) trovati morti. Al tavolo anatomo-patologico gli uccelli mostravano congestione epatica e splenica con vari gradi di necrosi multifocale acuta ed enterite sieromucoide. Le uniche lesioni a livello nervoso erano presenti nei rapaci dove si evidenziavano encefaliti caratterizzate da aree multifocali di neuronofagia e microgliosi. Il ceppo virale isolato in Austria ha mostrato similitudini con il ceppo Africano (97% di omologia) e il coinvolgimento di rondini confermava l'ipotesi di trasmissione virale attraverso le migrazioni di questi uccelli o altri grandi migratori con successivo passaggio a popolazioni locali di zanzare [Bakonyi et al., 2004; Chavala et al., 2004; Weissenböck et al., 2003].

Dopo diverse segnalazioni in Austria e Ungheria [Chavala et al., 2004; Bakonyi et al., 2007], il virus ha fatto la sua comparsa anche in Italia: nel 2005 è stato identificato in polli sentinella in Trentino [Savini et al., 2011]. Successivamente nel 2006, vicino Milano, è stato isolato per la prima volta in un allocco di Lapponia e successivamente in una coppia di civetta capogrosso (*Aegolius funereus*) e in un merlo catturati sempre nella stessa zona. Anche in questi casi, come per gli uccelli austriaci, le principali lesioni macroscopiche risultavano in epato-splenomegalia mentre l'istologia mostrava quadri di encefalite, miocardiopatia e necrosi epatica e splenica. Il virus ha rilevato un'elevata affinità con il ceppo virale austriaco dimostrando la possibilità di una lenta trasmissione da questo paese verso l'Italia attraverso movimenti di uccelli per lo più stanziali che compiono brevi migrazioni [Manarolla et al., 2010].

In realtà, l'Usutu virus è comparso prima in Italia diffondendosi poi in Austria ed in altri paesi europei. I risultati ottenuti da Weissenböck e colleghi hanno fornito evidenze di un'introduzione molto più precoce (1996) del virus in Europa rispetto a quanto fin ad ora ritenuto (2001). Lo studio descrive l'analisi retrospettiva dei campioni tissutali di numerosi uccelli morti, principalmente merli, nel 1996 in Toscana (nelle province di Firenze e Pistoia) e ha consentito di identificare un Usutu virus identico al ceppo Vienna 2001 [Weissenböck et al., 2013].

Tra il 2008 ed il 2009 è stato condotto uno studio per monitorare la circolazione dell'USUV in Italia (Figura 30): sono state condotte analisi molecolari e sierologiche in cavalli e polli sentinella, uccelli selvatici e zanzare. Si è visto che il virus era presente in Toscana, Emilia-Romagna, Veneto e Friuli Venezia Giulia. In Veneto ha causato la morte di circa 100 esemplari. Sono stati identificati 11 ceppi virali negli organi di merli e gazze del

Veneto e dell'Emilia-Romagna. Il virus è stato riscontrato anche in pool di *Culex pipiens* catturate in Toscana. Confrontando le sequenze ottenute, nelle varie regioni non si sono notate variazioni notevoli dei ceppi circolanti: nel nord-est Italia hanno mostrato parecchie omologie con quelli austriaci isolati a Vienna e a Budapest, mentre qualche differenza si è notata con i ceppi ottenuti dai pool di zanzare [Savini et al., 2011].

Nel 2009 durante uno studio di sorveglianza per stabilire gli Arbovirus trasmessi da zanzare in Emilia-Romagna, è stata rilevata la presenza dell'USUV, oltre che del WNV: 56 pool di zanzare sono risultati positivi per USUV, mentre il WNV è stato trovato in 27 pool. L'USUV è stato riscontrato sia nelle zanzare *Culex pipiens* che nella specie *Aedes albopictus*. Inoltre in 8 pool si è osservata la co-circolazione di entrambi i virus [Calzolari et al., 2010].

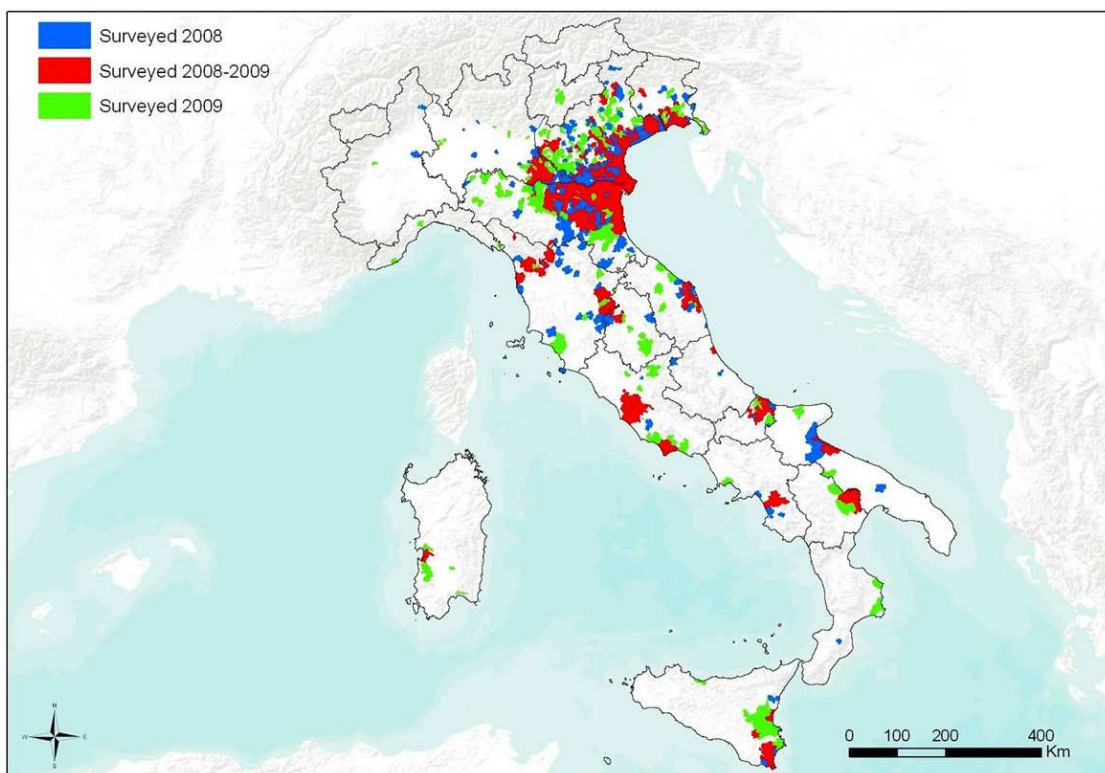


Figura 30. Aree italiane in cui nel 2008-2009 si sono effettuati gli studi di sorveglianza per verificare la presenza dell'USUV [Savini et al., 2011].

A questi casi negli animali hanno fatto seguito due isolamenti virali in due pazienti donne: una sessantenne in Emilia Romagna, dove nello stesso periodo era in corso una importante epidemia di West Nile, ed una quarantenne di ritorno da un viaggio in Egitto, colpite rispettivamente da meningo-encefalite ed encefalite gravi. Entrambe le pazienti avevano

ricevuto una trasfusione di sangue nello stesso periodo (agosto 2009) e avevano il sistema immunitario compromesso da patologie concomitanti; questo potrebbe aver amplificato l'effetto patogeno del virus che nell'uomo non aveva mai provocato sintomatologia grave.

Nel primo caso la paziente era affetta da un linfoma B a grosse cellule recatasi dal medico per la presenza di febbre e sintomi neurologici; gli è stata quindi diagnostica una meningo-encefalite. Il liquido cerebrospinale era positivo per USUV, così come il siero e il plasma analizzati mediante real-time RT-PCR e sequenziamento. Si è ipotizzato che il virus fosse stato trasmesso dalle zanzare [Pecorari et al., 2009].

Nel secondo caso, la donna, tornata da un viaggio in Egitto ha ricevuto una trasfusione di plasma dopo aver sviluppato la porpora trombotica trombocitopenica (TTP). Dopo due settimane presentava febbre, mal di testa, rash ed è stata ricoverata. Gli esami hanno escluso qualsiasi segno di ricaduta di TTP. In breve tempo ha sviluppato un'epatite fulminante e sintomatologia nervosa, ricevendo quindi un trapianto di fegato. Si sta ancora approfondendo l'ipotesi di trasmissione virale attraverso donazioni di sangue sottoponendo a screening sierologico i campioni ematici dei donatori. Inoltre è ancora in corso uno studio per identificare l'USUV in plasma e tessuti ottenuti dalla stessa paziente per quantificare la carica virale, la sua persistenza nella fase viremica e per capire il possibile coinvolgimento del virus nel decorso della malattia epatica [Cavirini et al., 2009]. Le sequenze parziali ottenute dal liquido cerebrospinale e dal plasma delle due pazienti hanno mostrato un'omologia del 98% con i ceppi isolati a Vienna e Budapest. Grazie ad ulteriori studi filogenetici si è potuta individuare una distribuzione del virus in Europa raggruppando in un unico cluster i ceppi circolanti in zanzare e uccelli e quelli ottenuti dalle sequenze umane [Vazquez et al., 2011].

L'USUV è stato segnalato anche in altri Paesi europei come Svizzera, Spagna, Repubblica Ceca, Germania. Nell'estate del 2006 l'USUV è stato identificato in uccelli morti in Svizzera (Zurigo); il ceppo circolante ha mostrato parecchie omologie con quello isolato a Vienna nel 2001 e a Budapest nel 2005 [Steinmetz et al., 2011]. In Spagna ha fatto la sua comparsa nel 2006 analizzando dei pool di *Culex* e nel 2009 in pool di *Culex perexiguus*. [Busquets et al., 2008; Vazquez et al., 2011]. In Repubblica Ceca il virus è stato isolato da due uccelli trovati morti a Brno nel 2011 e nel 2012 [Rudolf et al., 2015]. In Germania il virus è stato identificato e isolato da varie specie di uccelli e pool di zanzare nel 2010-2011 [Jöst et al., 2011; Becker et al., 2012], mentre tra settembre-ottobre 2013 è stato isolato dai tessuti cerebrali di due pipistrelli trovati morti nel sud-est della Germania. I due genotipi

risultanti hanno mostrato un'identità nucleotidica del 99.9% e hanno mostrato un'omologia tra il 78.3% e il 99.3% comparati ai vari ceppi isolati in Europa da uccelli, zanzare e dall'uomo [Cadar et al., 2014]. I pipistrelli risultano quindi essere ospiti reservoir anche dell'Usutu virus; questi animali sono infatti considerati reservoir di molti Flavivirus in quanto contribuiscono a mantenere, diffondere e far replicare i patogeni grazie alle loro caratteristiche: scelte alimentari, durata della vita, elevata densità di popolazione, natura coloniale o solitaria, capacità di volare, migrazione stagionale e modelli di movimento quotidiano, torpore e ibernazione [Calisher et al. 2006].

Studi sierologici che hanno dimostrato la presenza di USUV in uccelli selvatici sono stati effettuati in Repubblica Ceca (2005), Inghilterra (2001-2002), Germania (2007), Italia (2007), Polonia (2006), Spagna (2003-2006) e Svizzera (2006). Nella Figura 31 possiamo vedere una rappresentazione dei Paesi europei del network European Network for Diagnostics of Imported Viral Diseases (ENVID) in cui è stata verificata la presenza del virus in zanzare, uccelli, cavalli e/o uomo. Vengono indicati di colori diversi i territori in cui si sono utilizzati metodi diretti (colture cellulari o amplificazione del genoma virale) e/o metodi indiretti (presenza di anticorpi in risposta all'infezione). I simboli degli animali in bianco indicano dove si è identificato l'RNA virale mentre in grigio scuro dove è stata verificata la presenza di anticorpi neutralizzanti [Vazquez et al., 2011]. Recentemente, in Croazia, in tre pazienti con sindrome neurologica sono stati riscontrati gli anticorpi specifici dell'Usutu virus [Rudolf et al., 2015].

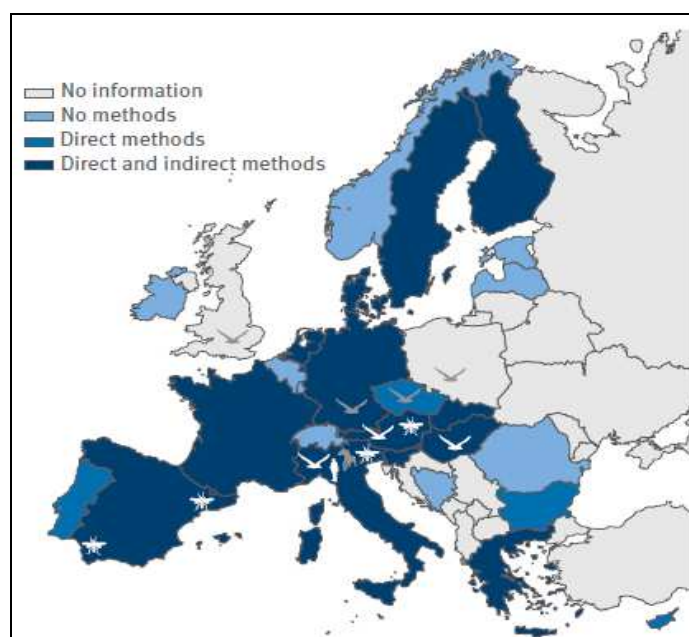


Figura 31. Rappresentazione dei Paesi europei del network ENVID in cui è stata verificata la presenza del virus in zanzare, uccelli, cavalli e/o uomo [Vazquez et al., 2011].

Trasmissione, vettori ed ospiti

Il virus viene trasmesso da un ciclo silvestre che coinvolge le zanzare come vettori e i volatili come ospiti reservoir; negli uccelli causa una blanda o addirittura assente sintomatologia clinica, mentre altre specie fungono da ospiti accidentali e come tali possono essere più o meno resistenti o sensibili all'infezione, con possibilità di originare episodi di malattia conclamata [Chavala et al., 2004].

Le zanzare del genere *Culex* sembrano essere i principali vettori dell'infezione, in particolare la zanzara della specie *Cx. perfuscus*. Altre specie di vettori da cui è stato isolato il virus sono *Cx. neavei*, *Mansonia africana* nella Repubblica Centro-Africana e *Coquilletidia aurites* in Uganda. Recentemente l'USUV è stato identificato nella specie *Cx. modestus* ed è emerso che può co-circolare con il WNV nello stesso ciclo silvestre nello stesso habitat, suggerendo che entrambi i virus possono essere mantenuti in due ecosistemi: uno silvestre tra *Cx. pipiens/Cx. modestus* e gli uccelli acquatici e uno urbano che coinvolge *Cx. pipiens* e i merli o occasionalmente altre specie [Rudolf et al., 2015].

1.6.2. ZIKA VIRUS

Lo Zika virus (ZIKV) è un mosquito-borne flavivirus che causa infezione nell'uomo in Africa e in Asia ed è fortemente legato filogeneticamente al Dengue virus [Kuno et al., 1998]. Questo virus rappresenta un problema attuale di sanità pubblica in quanto le persone che ritornano infette (in fase viremica) dai paesi in cui lo Zika virus è endemico, possono innescare una trasmissione locale vista la disponibilità di vettori suscettibili nel nostro territorio.

Si stima che in circa il 18% delle infezioni umane da ZIKV si sviluppino delle manifestazioni cliniche; i sintomi sono simili a quelli causati da Dengue e Chikungunya virus, anche se più lievi, quali febbre, dolori articolari e muscolari, eruzioni cutanee, congiuntivite, linfadenopatia e diarrea. Un'infezione da Zika virus potrebbe quindi passare inosservata o essere addirittura attribuita a uno degli altri virus citati. Dopo una puntura di zanzara infetta, i sintomi compaiono solitamente dopo un periodo di incubazione dai 3 ai 12 giorni e possono durare da 2 a 7 giorni. Vi sono dati a favore del fatto che il virus infetti le cellule dendritiche nel sito di inoculo arrivando poi ai linfonodi e in circolo. La malattia raramente richiede il ricovero ospedaliero [Faye et al., 2013]. Durante alcune epidemie si è osservato una correlazione tra l'infezione da ZIKV e la

sindrome di Guillain-Barré [Cardoso et al., 2015]. Nella Polinesia Francese infatti, su 8503 casi, 74 hanno sviluppato complicanze neurologiche su base immunitaria, di cui 41 Guillain-Barré. Nonostante i sintomi legati alla malattia siano decisamente lievi e simil-influenzali, il virus sembra collegato alla nascita di neonati con deformità encefaliche (microcefalia). Secondo il ministero della Salute brasiliano, infatti, da ottobre 2015 sono 3530 i bambini nati con microcefalia. Si sta ancora indagando in merito

La diagnosi risulta essere abbastanza impegnativa, come per tutti i Flavivirus: utilizzando tecniche sierologiche bisogna tener conto delle reazioni crociate con altri Flavivirus e/o dell'assenza o basso titolo di anticorpi IgM e IgG nella fase precoce di infezione; l'isolamento virale è laborioso e lungo e richiede strutture adeguate. La real-time RT-PCR è rapida, sensibile e specifica ma consente di identificare l'infezione in fase viremica. In ogni caso le tecniche molecolari consentono di identificare con precisione l'agente eziologico in zone in cui sono presenti focolai di infezione causate da altri Arbovirus come Dengue e Chikungunya [Faye et al., 2013].

Epidemiologia

Lo Zika virus è mantenuto in natura grazie ad un ciclo biologico che coinvolge come vettori le zanzare della specie *Aedes*, in particolare *Aedes aegypti* e *Ae. Africanus*, e come ospiti reservoir varie specie di scimmie e forse anche i roditori. Il virus prende il nome dalla foresta dell'Uganda in cui venne identificato per la prima volta nel sangue di una scimmia sentinella (*rhesus macaque*, *Macaca mulatta*); è stato poi isolato da un pool di zanzare raccolte nella stessa foresta nel 1948. Negli esseri umani è invece stato isolato per la prima volta negli anni Settanta [Haddow et al., 1964; Duffy et al., 2009].

Successive analisi sierologiche ed entomologiche hanno riportato la presenza del virus in diverse parti dell'Africa: Burkina Faso, Costa d'Avorio, Egitto, Mozambico, Nigeria, Uganda, Repubblica dell'Africa centrale e Senegal [Faye et al., 2013]. La sua virulenza è emersa solo con le recenti epidemie. Una delle più rappresentative si è registrata nel 2007 in Micronesia (Stato di Yap), dove si sono confermati 49 casi. I pazienti presentavano rash, febbre, dolori articolari e congiuntivite; non sono state riportate manifestazioni emorragiche o casi fatali [Lanciotti et al., 2008; Duffy et al., 2009]. I recenti focolai di febbre da ZIKV al di fuori dell'Asia e dell'Africa, le epidemie in Polinesia francese e Nuova Caledonia e la sua presenza incipiente nelle Americhe, mostrano che questo virus ha il potenziale per divulgarsi in aree dove sono presenti zanzare *Aedes* (Figura 32)

[Lanciotti et al., 2008; Duffy et al., 2009].

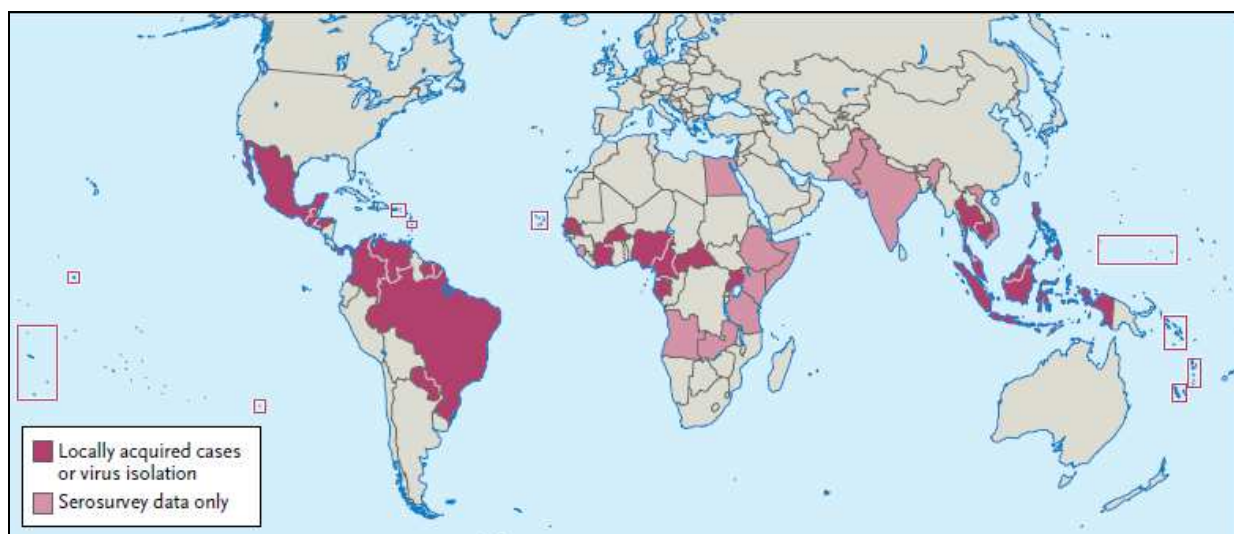


Figura 32. Distribuzione dello Zika virus (dati aggiornati a dicembre 2015) [Fauci et al., 2016]

Sono stati riportati dei casi importati in Italia (Firenze) dopo un viaggio tra dicembre 2013 e gennaio 2014 nella Polinesia francese. Entrambi i pazienti, una coppia di circa 30 anni, presentavano febbre, malessere, congiuntivite, mialgia, artralgia, edema alle caviglie e linfadenopatia ascellare ed inguinale. Uno dei due mostrava inoltre leucopenia con monocitosi e trombocitopenia. La donna ha manifestato sanguinamenti alle gengive dopo qualche giorno dall'inizio dei sintomi. Febbre e rash sono scomparsi dopo due giorni ma il malessere, la debolezza e i dolori muscolari sono durati una settimana circa. La diagnosi si è basata per entrambi i casi sulla sieroconversione degli anticorpi IgG ed IgM e in un caso è stato possibile identificare l'RNA virale tramite real-time RT-PCR. Durante i test sierologici si sono verificate reazioni di reattività crociata con gli antigeni del Dengue virus [Zammarchi et al., 2015].

Recentemente (2014-2015), le autorità sanitarie del Brasile hanno confermato la trasmissione del virus nella parte nord-orientale del Paese [Cardoso et al., 2015]. I ricercatori dell'Institut de recherche pour le développement di Marsiglia e del Centre International de Recherches Medicales de Franceville (Gabon) hanno analizzato il sangue di più di 4000 pazienti colpiti da Dengue o Chikungunya in Gabon, dal 2007 al 2010, anni in cui in questo Paese si sono verificati numerosi casi. Hanno analizzato anche i vettori prelevati nello stesso periodo, appartenenti a nove specie. I risultati mostrano che lo ZIKV era presente in numerosi sieri, ed è quindi probabile che abbia avuto un ruolo importante, e

sottovalutato, nelle epidemie attribuite alle altre febbri. Il virus è stato trovato anche nelle zanzare, e in particolare in numerosi campioni di *Ae. albopictus* [Grard et al., 2014].

Nel marzo 2014, il Cile ha riferito alle organizzazioni PAHO/OMS (Pan American Health Organization/Organizzazione Mondiale della Sanità) la conferma di un caso di trasmissione indigena di febbre da Zika virus nell'Isola di Pasqua, in concomitanza con la presenza di altri focolai nelle isole del Pacifico della Polinesia francese, Nuova Caledonia e Isole Cook. Nel novembre 2015 sono stati identificati dei casi autoctoni di infezione da Zika virus nel Suriname (America latina).

Data la maggiore trasmissione del virus nella regione delle Americhe, PAHO/OMS ha raccomandato agli Stati Membri di identificare e confermare i casi di infezione e di implementare una strategia di comunicazione pubblica efficace per ridurre le zanzare che trasmettono la malattia, in particolare nelle aree in cui questo vettore è presente.

In Italia, la diffusione di questi virus è monitorata da programmi specifici, come indicato nella circolare del Ministero della Salute "Sorveglianza dei casi umani delle malattie trasmesse da vettori con particolare riferimento a Chikungunya, Dengue, Zika virus e West Nile Disease - 2014".

In letteratura si possono trovare documentati dei casi di ZIKV in cui chiaramente la trasmissione non è avvenuta per opera del vettore. Nel 2008 è stata riportata una probabile trasmissione intraumana quando due scienziati americani hanno contratto il virus mentre lavoravano nel sud-est del Senegal. Uno dei due, una volta tornato nel paese d'origine, ha poi contagiato la moglie, la quale non aveva appunto viaggiato in zone in cui il virus è endemico. Si ipotizza che la trasmissione del virus sia avvenuta per via sessuale [Foy et al., 2011]. La trasmissione di un Arbovirus per via sessuale non era stata finora documentata. Tuttavia, vi sono studi che dimostrano che il Japanese encephalitis virus si ritrova nello sperma di maiali infettati sperimentalmente ed è in grado di infettare femmine di maiale via inseminazione artificiale.

Nel 2014, nella Polinesia francese, subito dopo l'epidemia di ZIKV, sono stati descritti due casi di infezione perinatale, in cui probabilmente la trasmissione è avvenuta per via transplacentare o durante il parto. Nel primo caso la madre presentava rash senza febbre ma il neonato non ha mostrato nessun sintomo; nel secondo caso il neonato ha manifestato una severa ipotrofia e ipoglicemia e la conferma di infezione da ZIKV è stata effettuata grazie a indagini molecolari sul siero del neonato prelevato 4 giorni dopo il parto. Altri Arbovirus in cui è stata documentata la trasmissione perinatale sono Dengue virus,

Chikungunya virus, West Nile virus e Yellow Fever virus. Ci sono anche casi in cui DENV e WNV si sono trasmessi durante l'allattamento. In alcuni neonati si sono riscontrate delle gravi complicanze: encefalopatia e febbre emorragica per il CHIKV, parto pretermine, morte, basso peso alla nascita, anomalie fetali, distress fetale per il DENV [Besnard et al., 2014]. Sono stati inoltre riportati casi in cui la trasmissione è avvenuta in laboratorio [Zammarchi et al., 2015].

1.6.3. MARISMA VIRUS

Recentemente, durante la sorveglianza entomologica per West Nile Virus, è stata rilevata la presenza di un altro Flavivirus, chiamato Marisma virus (MMV), appartenente ai mosquito-borne virus (MBV). Da vari studi emerge che il Marisma virus è correlato filogenicamente a Yellow Fever virus, mentre i vettori principalmente coinvolti sono le zanzare della specie *Ochlerotatus caspius*.

Il Marisma virus è stato identificato per la prima volta nel 2012 nel sud della Spagna e nel 2013 è stato rinvenuto in Piemonte (provincia di Alessandria) ed Emilia Romagna [Rizzo et al., 2014]. Analisi retrospettive hanno dimostrato la sua presenza nel Friuli Venezia Giulia già nel 2011. Infatti in un lavoro recente basato su analisi di zanzare raccolte nel Nord-Est Italia tra il 2010 e il 2014, 105 pool sono risultati positivi per MBF e tra questi in 10 pool è stato identificato il MMV.

Dagli alberi filogenetici, i 10 ceppi isolati sembrano essere suddivisi in due cluster, entrambi correlati ai ceppi del virus trovato in Spagna (Figura 33).

Inoltre, è emerso che oltre dalla specie sopra citata, il virus in questione può essere trasmesso anche da *Ae. albopictus* e *Ae. vexans* (Figura 34).

Attualmente il MMV risulta essere presente nel Nord Italia, in Spagna ed in Portogallo [Vázquez et al., 2012]. Non è però ancora chiara la sua patogenicità nell'uomo e negli animali.

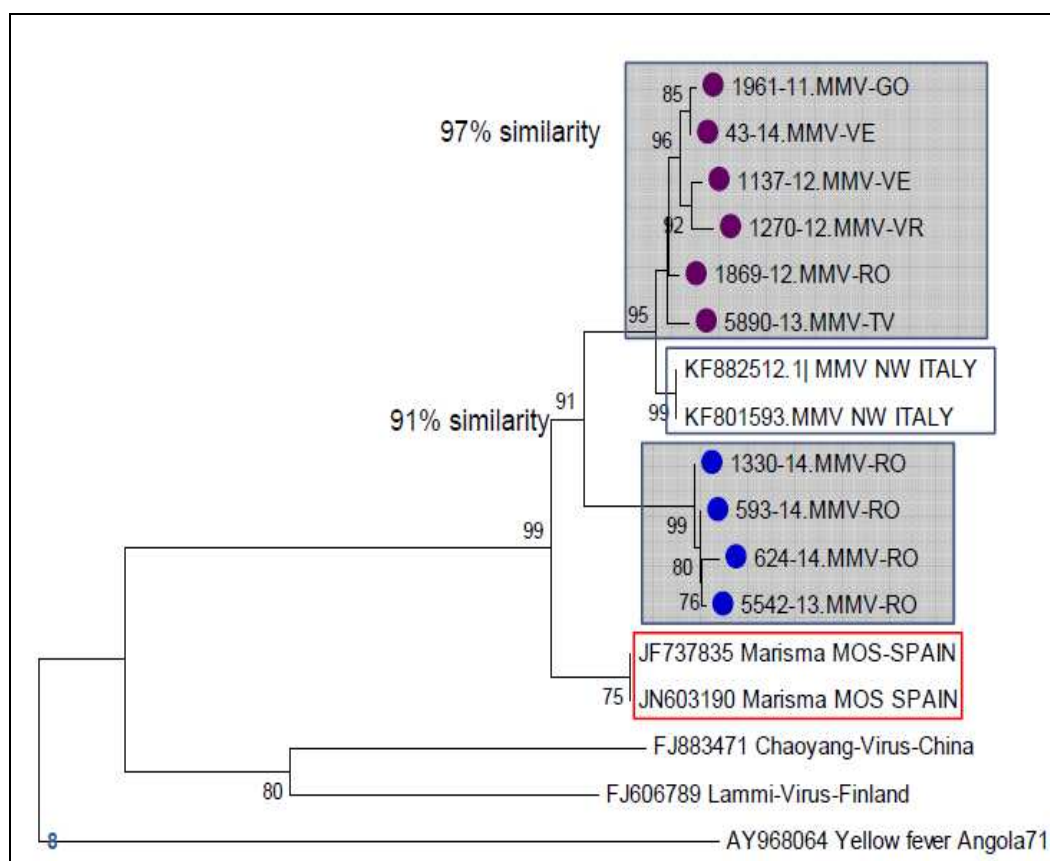


Figura 33. Albero filogenetico basato sulle sequenze del gene NS5 del MMV.

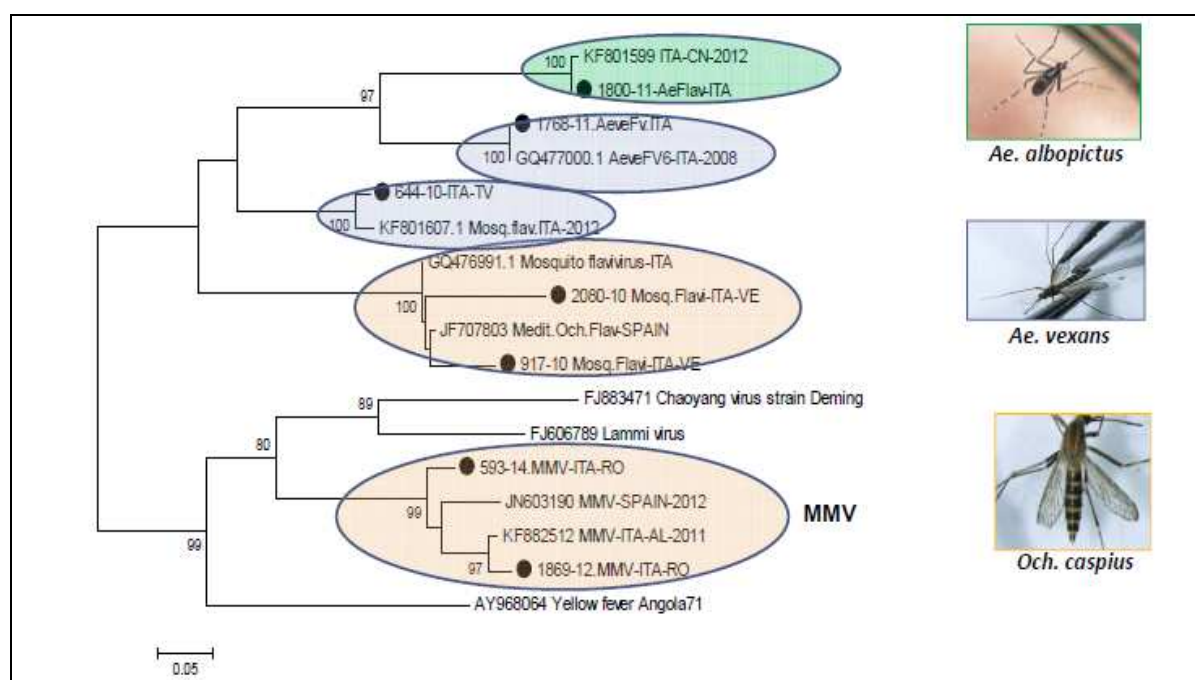


Figura 34. Rappresentazione degli specifici mosquito-borne virus correlati alle specie di zanzare coinvolte nella trasmissione del MMV.

1.7. FAMIGLIA TOGAVIRIDAE, GENERE ALPHAVIRUS

La famiglia Togaviridae si divide in due generi: gli Alphavirus, a cui appartiene il Chikungunya virus, e i Rubivirus, tra i quali vi è il Rubella virus, l'agente eziologico della rosolia. In questa tesi i Rubivirus non vengono trattati in quanto non appartengono alla grande famiglia degli Arbovirus.

Il genere Alphavirus è rappresentato da una trentina di specie di virus trasmessi da zanzare, distribuiti in sette gruppi in base alla cross-reattività sierologica (Tabella 3). Questi virus sono diffusi in tutto il mondo e sono in grado di infettare numerosi vertebrati tra i quali anche l'uomo.

Complesso antigenico	Specie
Barmah Forest	Barmah Forest virus (BFV)
Eastern equine encephalitis	Eastern equine encephalitis virus (EEEV)
Middelburg	Middelburg virus (MIDV)
Ndumu	Ndumu virus (NDUV)
Semliki Forest	Bebaru virus (BEBV) Chikungunya virus (CHIKV) Getah virus (GETV) Mayaro virus (MAYV) O'nyong nyong virus (ONNV) Ross River virus (RRV) Semliki Forest virus (SFV) Una virus (UNAV)
Venezuelan equine encephalitis	Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) Mosso das Pedras virus (MDPV) Everglades virus (EVEV) Mucambo virus (MUCV) Tonate virus (TONV) Pixuna virus (PIXV) Cabassou virus (CABV) Rio Negro virus (RNV)
Western equine encephalitis	Aura virus (AURAV) Sindbis virus (SINV) Whataroa virus (WHAV) Fort Morgan virus (FMV) Highlands J virus (HJV) Western equine encephalitis virus (WEEV)
Unclassified	Trocar virus (TROV) Salmon pancreas disease virus (SPDV) Southern elephant seal virus (SESV)

Tabella 3. Classificazione delle specie degli Alphavirus [Powers et al., 2007]

Le analisi filogenetiche hanno portato alla suddivisione degli Alphavirus in due gruppi:

- * virus appartenenti al Vecchio Mondo (Asia, Australia, Europa ed Africa): Sindbis virus, Chikungunya virus, O'Nyong Nyong virus, Middelburg virus, Ross River virus e Semliki Forest virus;
- * virus appartenenti al Nuovo Mondo (Nord e Sud America): Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), Eastern equine encephalitis virus (EEEV) e Western equine encephalitis virus (WEEV) [Luers et al., 2005].

1.7.1. GENOMA, CARATTERISTICHE STRUTTURALI E REPLICAZIONE

Il genoma degli Alphavirus è costituito da un singolo filamento positivo di RNA di circa 11-12 kb; è organizzato in due regioni principali: un dominio non strutturale, posto verso l'estremità 5', che codifica per le proteine non strutturali e un dominio strutturale verso il 3' che codifica per tre proteine strutturali (Figura 35).

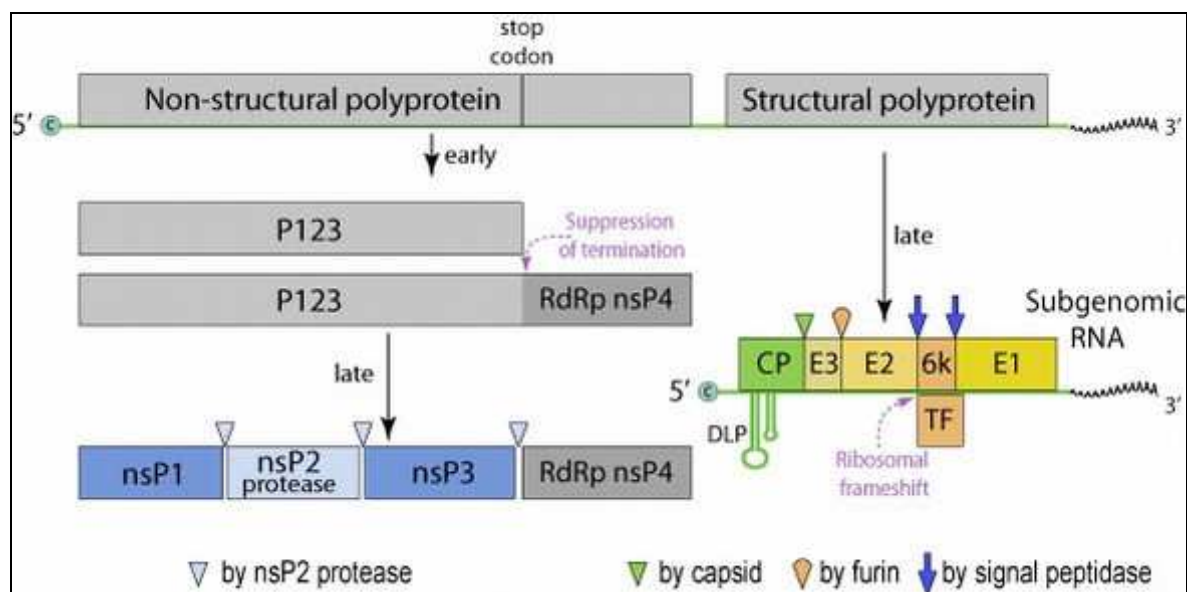


Figura 35. Genoma lineare a singolo filamento a polarità positiva (ssRNA+) di circa 11-12 kb.

Le proteine non strutturali vengono tradotte in una o due poliproteine che vengono poi scisse per produrre quattro proteine denominate nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. Il dominio strutturale invece viene tradotto a partire da un mRNA sub-genomico (26S mRNA di circa 4100 nucleotidi) in un'unica poliproteina. Quest'ultima viene processata per produrre le proteine dell'enviluppo (E1 e PE2, precursore di E2), la proteina del capside (proteina C) e

due piccoli polipeptidi chiamati E3 e 6K. La proteina C viene subito assemblata con l'RNA genomico nel nucleocapside, PE2 e E1 vengono trasportate con 6K alla membrana plasmatica attraverso la pathway di secrezione cellulare; successivamente PE2 viene processata in E2 [Luers et al., 2005; Strauss et al., 1994].

I virioni degli Alphavirus sono costituiti da un nucleocapside a simmetria icosaedrica avvolto da una membrana lipoproteica virale, denominata envelope. Al microscopio elettronico, appaiono di forma sferica (diametro di circa 40 nm) o pleiomorfi (diametro di circa 60-70 nm) e sono localizzati nel citoplasma della cellula ospite (Figura 36). Sulla sua superficie appaiono prolungamenti lunghi circa 10 nm costituiti da glicoproteine virali, di cui due (denominate E1 ed E2) sono antigenicamente ben caratterizzate e permettono una classificazione sierologica degli Alphavirus [Strauss et al., 1994].

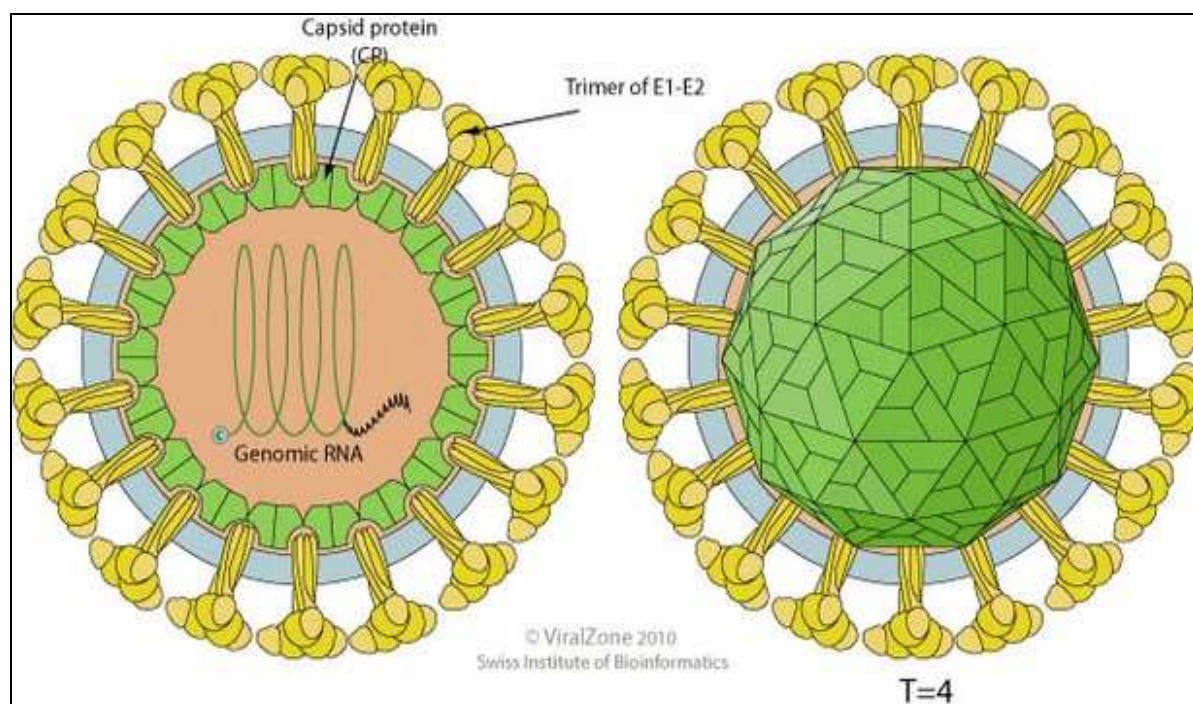


Figura 36. Virione degli Alphavirus sferico, a simmetria icosaedrica. L'envelope contiene 80 prolungamenti (spikes) formati da trimeri delle proteine E1/E2.

Gli Alphavirus replicano sia negli artropodi che negli ospiti vertebrati, producendo un'infezione persistente nei primi, mentre nei secondi di breve durata. Questo si presenta anche nelle colture cellulari: nelle cellule di zanzara si ha un'infezione lunga dove le cellule sopravvivono e si continua a produrre virus, mentre nelle cellule di vertebrati si ha

un'infezione breve di tipo citolitico [Strauss et al., 1994].

Dopo la penetrazione nella cellula infettata, l'RNA virale scapsidato funziona da RNA messaggero, dirigendo la sintesi delle proteine virali. Viene sintetizzato un singolo lungo polipeptide che successivamente viene tagliato in frammenti per formare un certo numero di proteine più piccole. Si ha prima la traduzione dell'estremità 5', che codifica per le proteine funzionali; dopo la replicazione del genoma vengono prodotti mRNA subgenomici che produrranno le proteine strutturali corrispondenti all'estremità 3' [ten Dam et al., 1999]. I nucleocapsidi completi acquistano l'involucro dalla membrana plasmatica cellulare e solo allora il virione diviene infettivo (Figura 37).

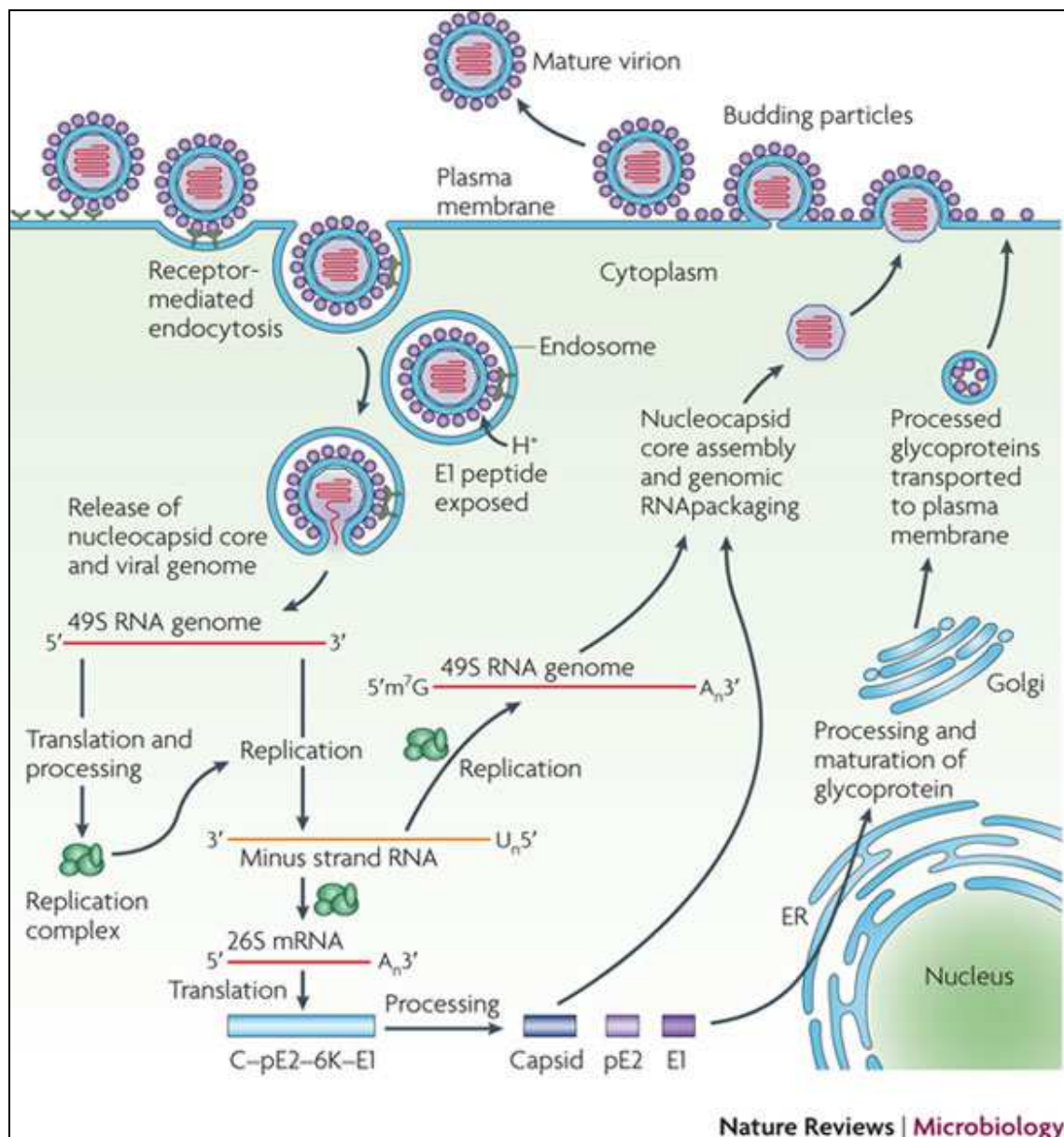


Figura 37. Replicazione degli Alphavirus.

1.7.2. PATOGENESI E MANIFESTAZIONI CLINICHE

Una volta che un vertebrato viene morso dalla zanzara infetta, il virus può entrare nel flusso sanguigno, provocando viremia; a loro volta le zanzare acquisiscono il virus ingerendo sangue di un ospite viremico; il virus si moltiplica nei tessuti e negli organi della zanzara, comprese le ghiandole salivari. Nella maggior parte dei casi l'infezione nei vertebrati è asintomatica: per esempio gli uccelli che hanno contratto la Western equine encephalitis virus appaiono sani e non infetti. Altre volte, tuttavia, compaiono malattie (Tabella 4). Nell'uomo queste ultime sono essenzialmente di due categorie:

1. sindromi febbrili con eruzioni cutanee e poliartriti, causate ad esempio da Chikungunya virus, Ross River virus, Sindbis virus, ovvero dagli Alphavirus appartenenti al Vecchio Mondo [Harley et al., 2001];
2. encefaliti talora mortali, come nel caso del VEEV, EEEV o WEEV, ovvero Alphavirus appartenenti al Nuovo Mondo [Steele et al., 2010].

Alphavirus	Malattia umana	Serbatoio (vertebrato)	Diffusione geografica
Sindbis virus	Rush, artrite	Uccelli	Europa, Africa, Australia
Semliki forest virus	Rush, artrite	Uccelli	Africa
O'nyong'nyong virus	Rush, artrite	primati, Uomo	Africa
Chikungunya virus	Febbre di Chikungunya (rash, artrite)	Primati, Uomo	Africa, India, SE Asia
Mayaro virus	Rash, artrite	Primati, Uomo	Sud America
Ross River virus	Rash, artrite	Mammiferi, Uomo	Australia, Sud Pacifico
Barmah Forest virus	Febbre, malessere, rash, dolore articolare, debolezza muscolare	Uomo	Australia
Eastern equine encephalitis virus	Encefaliti	Uccelli	Americhe
Western equine encephalitis virus	Encefaliti	Uccelli, Mammiferi	Nord America
Venezuelan equine encephalitis virus	Encefaliti	Roditori, Cavalli	Americhe

Tabella 4. Alcuni dei più importanti Alphavirus patogeni per l'uomo

Gli Alphavirus hanno un range di ospiti molto vasto che comprende sia ospiti invertebrati (zanzare o altri insetti ematofagi che fungono da vettori) sia vertebrati (volatili, mammiferi, rettili e anfibi). La replicazione virale avviene in vari tipi cellulari, compresi neuroni e cellule della glia, cellule muscolari, cellule sinoviali, cellule del tessuto adiposo. I vari

recettori che vengono espressi sulla superficie di tutti questi tipi cellulari sono condivisi da più Alphavirus; inoltre da alcuni studi è emerso che un singolo virus può utilizzare recettori differenti. Una o più mutazioni sulle glicoproteine dell'envelope possono incidere sulla scelta del recettore da parte del virus. La natura del recettore può determinare in parte la virulenza. Per quanto riguarda i mammiferi, i recettori che mostrano un'affinità più elevata sono quelli della laminina.

L'infezione da Alphavirus può essere impedita dal sistema immunitario producendo interferone [Griffin et al., 2010]; nell'immunità specifica sono invece coinvolti anticorpi neutralizzanti e cellule T.

La diagnosi viene effettuata dall'evidenza clinica considerando il rischio di essere stati esposti al virus. La conferma viene effettuata mediante isolamento ed identificazione virale (real-time RT-PCR) e con la valutazione della presenza di anticorpi specifici.

1.8. CHIKUNGUNYA VIRUS

1.8.1. CLASSIFICAZIONE E SOTTOTIPI DEL CHIKUNGUNYA VIRUS

Il Chikungunya virus (CHIKV) appartiene alla famiglia *Togaviridae*, genere *Alphavirus*. Alcuni studi di microscopia elettronica hanno dimostrato che la morfologia del virus nelle colture di cellule VERO è quella caratteristica degli Alphavirus, mentre la cross-reattività sierologica osservata pone il CHIKV all'interno del sierocomplesso del Semliki Forest virus (SFV) [Powers et al., 2007].

Basandosi sulle sequenze di una parte o dell'intero genoma della glicoproteina strutturale E1 di campioni raccolti durante le epidemie nella Réunion e di altre isole dell'Oceano Indiano, sono stati identificati quattro sottotipi di CHIKV (Figura 38) [Parola et al., 2006]:

- ✓ East/Central African;
- ✓ Eastern/Southern Africa;
- ✓ West African;
- ✓ Asian.

L'East/Central African e l'Eastern/Southern Africa spesso vengono raggruppati nello stesso genotipo: East-Central-South-African (ECSA) [Thiberville et al., 2013]. L'Asian e l'ECSA sembrano essere più vicini antigenicamente rispetto al terzo genotipo, al punto che, divergendo di circa il 15% dal West African, per alcuni vengono considerati appartenenti allo stesso lineage [Powers et al., 2007].

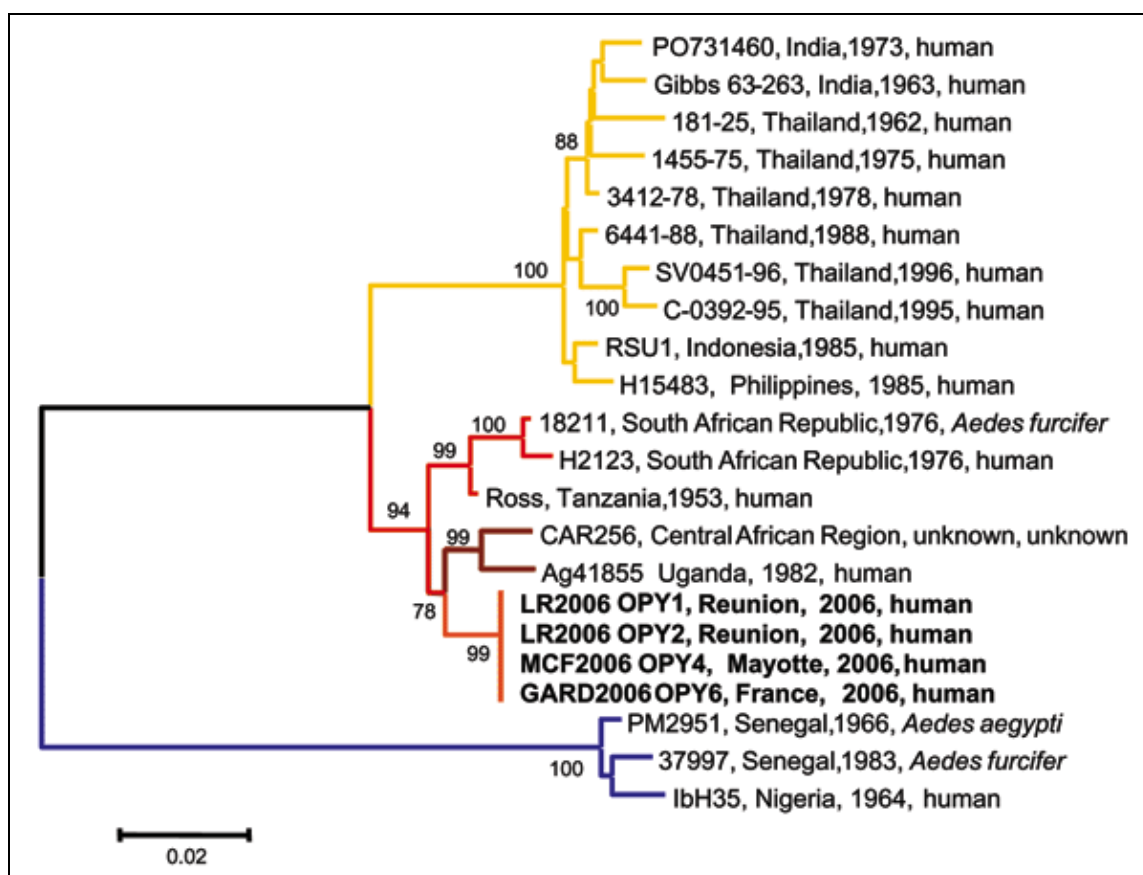


Figura 38. Analisi filogenetiche di CHIKV relative ad un frammento di 1044 nucleotidi (posizione genomica 10243-11286 nt) del gene E1 di campioni raccolti durante le epidemie nella Réunion e in altre isole dell'Oceano Indiano. Nell'albero filogenetico vengono rappresentati i principali lineage evolutivi: East/Central African (marrone), eastern/southern Africa (rosso), West African (blu) ed Asian (giallo) [Parola et al., 2006].

1.8.2. GENOMA E REPLICAZIONE

Il genoma del CHIKV, come per tutti gli Alphavirus, è lineare ed è costituito da un singolo filamento di RNA a polarità positiva di circa 11.8 kb (Figura 39). A racchiudere le due ORF, alle due estremità vi sono le regioni non codificanti 5'NCR e 3'NCR; anche le regioni di giunzione (J) sono non codificanti. L'ORF al 5' viene tradotto dall'RNA genomico e codifica per 4 proteine non strutturali (nsP1, 2, 3 e 4); l'ORF al 3' invece viene tradotto dall'RNA 26S sub-genomico e codifica per la proteina C del capsido, due glicoproteine dell'envelope (E1 ed E2) e due piccoli peptidi chiamati E3 e 6K. Le varie proteine vengono generate dopo il taglio proteolitico dei precursori delle poliproteine [Powers et al., 2013].

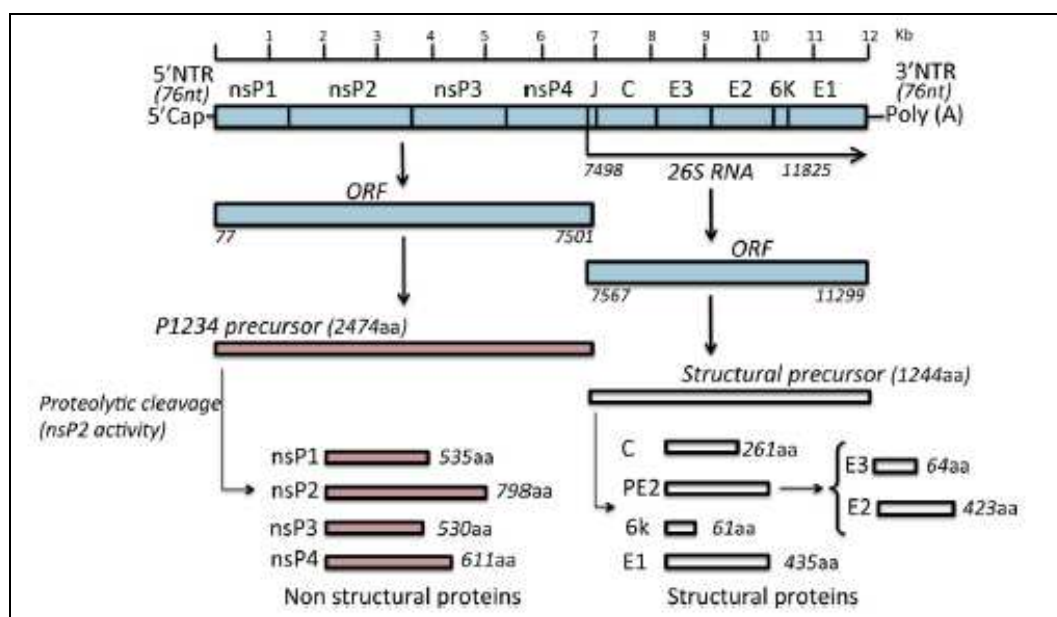


Figura 39. Organizzazione del genoma del CHIKV [Thiberville et al., 2013].

Il virus entra nelle cellule mediante endocitosi, con un meccanismo dipendente dal pH, che culmina con la fusione ed il successivo rilascio del nucleocapside nel citoplasma. Il processo comincia con l'ancoraggio di E2 ai recettori cellulari e la fusione delle particelle virali con la membrana delle cellule ospiti. Il peptide di fusione è localizzato nel dominio II di E1, in prossimità dell'aminoacido 226. Dopo l'entrata del virus, l'RNA genomico a viene usato direttamente come messaggero e parzialmente tradotto (estremità 5') per produrre le proteine non strutturali. Queste saranno responsabili della replicazione e della formazione del filamento negativo complementare, template per la successiva sintesi del filamento positivo. La replicazione dell'mRNA sub-genomico (26S) avviene attraverso la sintesi dell'intero RNA a polarità positiva, regolata da nsP4 e il precursore p123 nella prima fase dell'infezione e più tardi dalle proteine non strutturali mature. Si ha la produzione di 5 proteine strutturali (C, E3, E2, 6k ed E1) che serviranno per l'incapsidazione e la generazione dell'envelope. Il rilascio e la maturazione avvengono quasi contemporaneamente.

1.8.3. MANIFESTAZIONI CLINICHE

Dopo un periodo di incubazione di 3-12 giorni, si manifesta una sintomatologia simil-influenzale che include febbre alta, brividi, cefalea, nausea, vomito e soprattutto importanti artralgie, tali da limitare molto i movimenti (Figura 40): i pazienti tendono a rimanere

assolutamente immobili, in posizione antalgica. La febbre si risolve dopo 4 giorni. Si può sviluppare anche una seconda fase della malattia un esantema maculopapulare pruriginoso su tutto il corpo e dalla ricomparsa della febbre. Le complicanze più gravi sono rare e sono di natura emorragica (ma non in modo così grave come nella dengue) entro 3-5 giorni, o neurologica, principalmente nei bambini. Durante l'epidemia nello Sri Lanka nel 1972 è stato riportato un caso di miocardite dopo la fase febbrile [Powers et al., 2007]. In rari casi può essere fatale, soprattutto in soggetti anziani con sottostanti patologie di base. La malattia si risolve spontaneamente, ma i dolori articolari possono persistere per mesi.

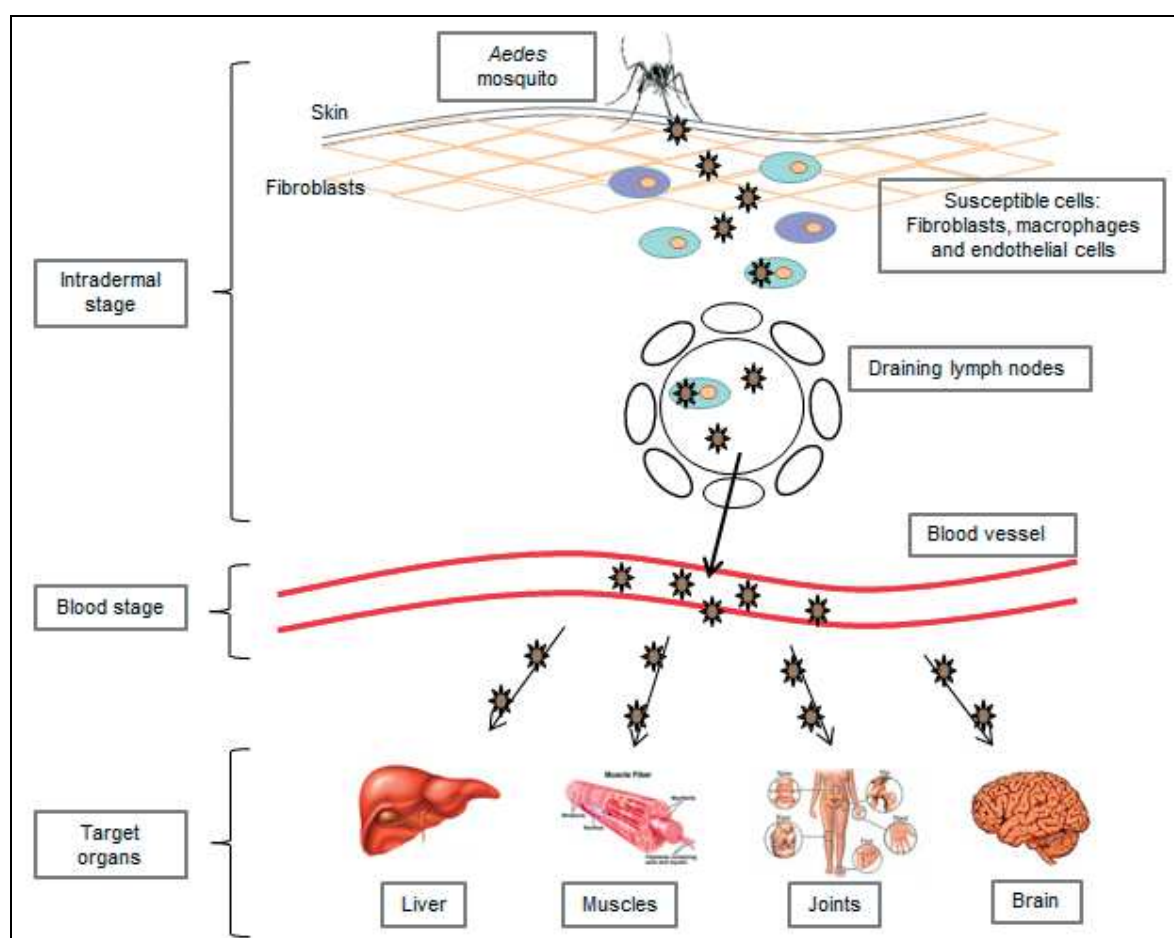


Figura 40. Rappresentazione di organi e tessuti coinvolti nell'infezione da CHIKV [Caglioti et al., 2013]

1.8.4. DIAGNOSI E TERAPIA

La diagnosi è sospettata sulla base della clinica e dell'epidemiologia del virus, cioè se vi è una malattia febbrile con artralgie in pazienti di ritorno da Africa o da Asia in

concomitanza di un'epidemia. Clinicamente, si può manifestare una modesta leucopenia con linfocitosi relativa e un importante aumento della velocità di eritrosedimentazione (VES) e della proteina C reattiva (PCR).

La diagnosi viene confermata con test sierologici. Per un'ulteriore conferma è necessario rilevare gli anticorpi specifici in un secondo prelievo di siero. Vi sono a disposizione anche metodiche molecolari (real-time RT-PCR) e di isolamento virale su coltura cellulare.

La terapia è sintomatica e si basa sul controllo delle artralgie. Per trattare l'infezione vengono utilizzati paracetamolo o acetaminofene come antipiretici e farmaci antinfiammatori non steroidei. Recenti studi hanno portato all'individuazione di nuovi antivirali candidati che inibiscono il meccanismo virale nei sistemi cellulari e nei modelli animali. Protocolli terapeutici per i casi più gravi prevedono l'uso di immunoglobuline o di molecole che possono interferire con alcuni aspetti della risposta infiammatoria; per le manifestazioni croniche reumatiche e poliartriche che perdurano per più di 2-3 mesi viene consigliata la somministrazione di metotrexato [Thiberville et al., 2013].

1.8.5. EPIDEMIOLOGIA

Cenni storici e distribuzione

Il termine chikungunya significa ciò che piega o contorce e fu impiegato durante la prima epidemia, avvenuta in Tanzania (Makonde Plateau) nel 1952, a causa delle limitazioni articolari dovute alle importanti artralgie che caratterizzano la malattia. Inizialmente si pensava fosse un'epidemia di Dengue virus ma le analisi sierologica e la caratterizzazione dei ceppi isolati hanno dimostrato la vicinanza antigenica al Mayaro virus e al Semliki Forest virus, appartenenti al siero gruppo Semliki Forest degli Alphavirus. Analisi retrospettive hanno ipotizzato che probabilmente si era già avuta un'epidemia di Chikungunya in Indonesia nel 1779. A partire dagli anni Cinquanta, varie epidemie si sono verificate in Asia e in Africa. Tra gli anni Sessanta e Novanta infatti il virus è stato isolato da numerose zone dell'Africa centrale e meridionale, come Sudan, Uganda, Congo, Repubblica dell'Africa Centrale, Malawi, Zimbabwe, Kenya e Sud Africa. Il CHIKV è stato isolato anche da casi dell'Africa occidentale (Nigeria, Senegal, Costa d'Avorio). Nel sud est asiatico sono state riportate varie epidemie tra il 1960 ed il 2003 in India, Malesia, Indonesia, Cambogia, Vietnam, Myanmar, Pakistan e Thailandia. In numerose città come Calcutta e Bangkok sono stati identificati dei siti attivi di trasmissione del CHIKV. Tra le

epidemie più importanti ricordiamo quelle documentate in Senegal nel 1986 e nel 1996-97, in Costa d'Avorio nel 1996-97, in Indonesia nel 2003, in Kenya nel 2004, nelle isole Seychelles, Mauritius e Réunion (Oceano Indiano) ed in Madagascar tra il 2005 e il 2006. Tra il 2004 e il 2007 sono stati segnalati centinaia di migliaia di casi e sono state coinvolte nuove aree geografiche (Figura 41).

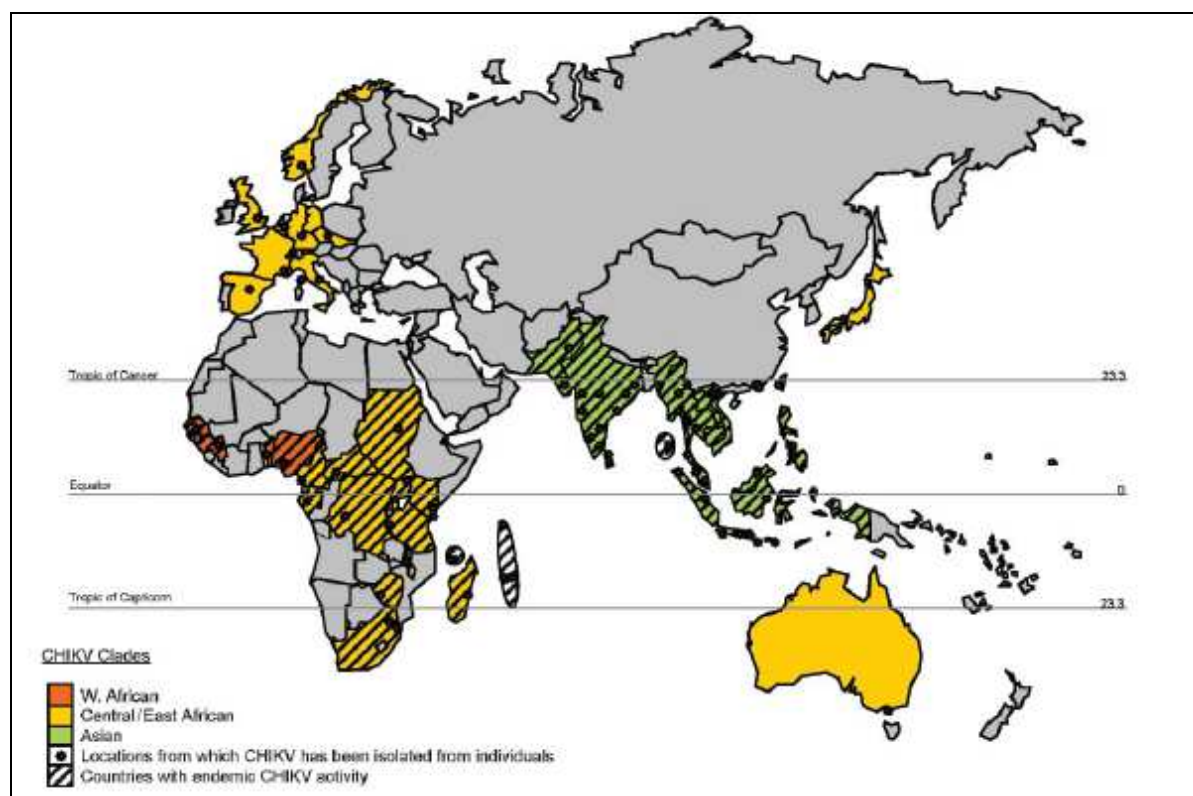


Figura 41. Distribuzione geografica del CHIKV [Powers et al., 2007].

Prima del 2013 epidemie di Chikungunya sono state identificate in Africa, Asia, Europa e nell'Oceano Indiano e Pacifico. La prima trasmissione locale del virus nelle Americhe è stata riportata nei Caraibi verso la fine del 2013 [Fauci et al., 2016]. Prima di allora il virus era stato trovato solo in casi di viaggiatori tornati da Paesi affetti. Nella figura 42 si possono vedere i territori in cui è stata riportata la presenza del virus fino ad ottobre 2015 [Fonte CDC, <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>].

In Europa (Belgio, Francia, Germania, Inghilterra, Italia, Norvegia, Repubblica Ceca e Spagna) sono stati riportati alcuni casi importati da turisti rientrati da India e dalle isole dell'Oceano Indiano, dagli Stati Uniti, Hong Kong, Canada, Taiwan e Sri Lanka [Panning

et al., 2008; Powers et al., 2007; Thiberville et al., .2013].

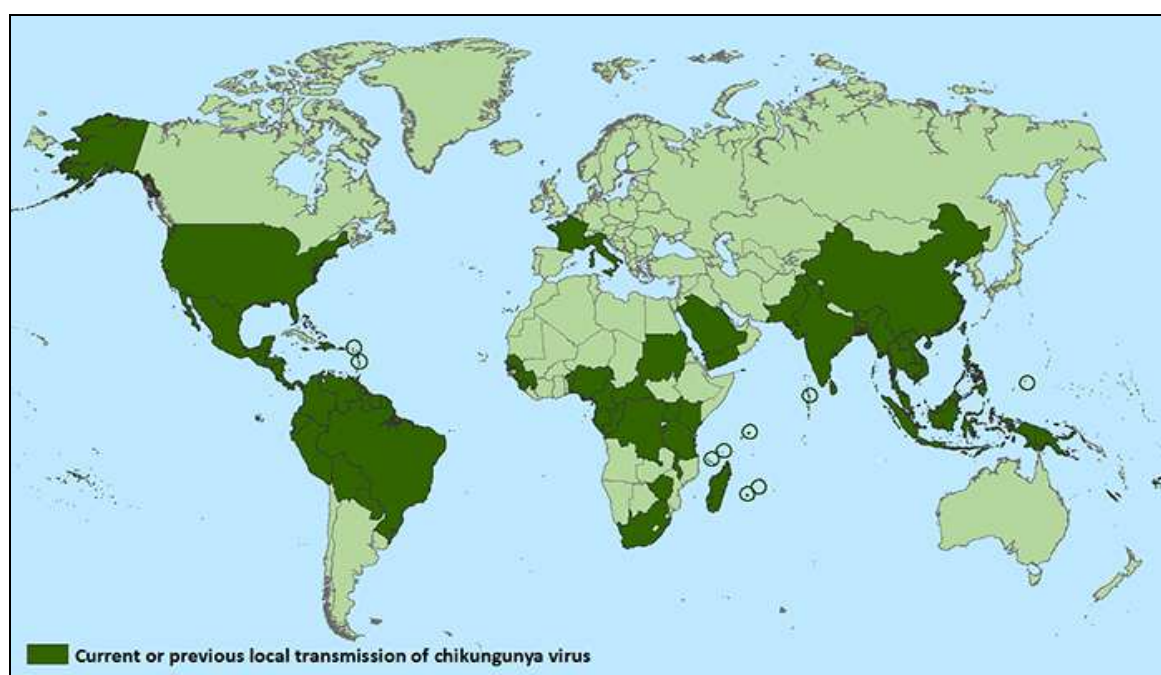


Figura 42. Territori in cui è stato riportato il CHIKV fino ad Ottobre 2015
[Fonte CDC, <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/>]

In Italia nell'estate 2007 sono stati notificati i primi casi autoctoni in Emilia Romagna, a Castiglione di Cervia e Castiglione di Ravenna (ambedue in provincia di Ravenna). Sono stati identificati 205 casi tra luglio e settembre; quasi tutti i pazienti hanno mostrato una sintomatologia lieve (febbre e artralgia), tranne un anziano che è deceduto. Le analisi molecolari e sierologiche sui campioni clinici e sulle zanzare catturate nell'area in questione hanno permesso di stabilire con certezza che si è trattato di Chikungunya virus. Il presunto responsabile della diffusione dell'infezione sembra essere un uomo indiano rientrato in Italia dopo avere contratto la malattia nel suo paese natale. Le analisi filogenetiche relative alla regione del gene E1 hanno mostrato un'elevata omologia tra le sequenze ottenute dai ceppi isolati in Italia e quelli identificati durante l'epidemia nell'Oceano Indiano. Non si è esclusa l'ipotesi che alcuni casi possano essersi diffusi per contagio interumano, in quanto un piccolo numero di contagiati aveva riferito di non avere subito (o quanto meno avvertito) punture della temibile zanzara. In ogni caso questo focolaio di infezione in una zona non-tropicale sottolinea la necessità di preparazione e risposta alle malattie infettive emergenti nell'era della globalizzazione [Rezza et al., 2007].

Trasmissione e vettori

L'infezione viene trasmessa dalla puntura di zanzare infette del genere *Aedes*, presenti soprattutto in zone rurali. Il ciclo di trasmissione del Chikungunya virus richiede un pasto di sangue viremico da parte di zanzare femmine su un ospite vertebrato, seguito da un periodo di incubazione e di trasmissione ad un altro ospite vertebrato durante il pasto successivo [Thiberville et al., 2013].

Vi sono due diversi cicli di trasmissione per questo virus:

- * ciclo silvestre presente in Africa; il virus è trasmesso da *Ae. africanus*, *Ae. neoafricanus*, *Ae. furcifer*, *Ae. taylori* e *Ae. Luteocephalus* e viene mantenuto in natura da primati non umani, come cercopitechi e babbuini, e probabilmente roditori [Diallo et al., 1999; Powers et al., 2007].
- * ciclo urbano diffuso in Asia, nell'Oceano Indiano, in Africa ed in Europa; è caratterizzato dall'assenza di animali reservoir durante il periodo epidemico (trasmissione uomo-zanzara-uomo), mentre durante i periodi inter-epidemici vengono coinvolti scimmie, roditori e volatili come ospiti. Il vettore principale è la zanzara *Aedes aegypti* (la stessa che trasmette la febbre gialla e la Dengue), attivo soprattutto in Asia. Un altro importante vettore è *Aedes albopictus*, comunemente chiamata zanzara tigre, poiché è caratterizzata dalla presenza di strisce bianche sul corpo e sulle zampe di colore nero [Figura 43]. Questo vettore è il responsabile della diffusione del virus nelle isole dell'area indiana ed è presente anche nei centri abitati del nostro paese. Nelle recenti epidemie *Ae. albopictus* ha assunto un ruolo importante a causa di mutazioni adattative nel genoma virale, in particolare la mutazione A226V nella glicoproteina E1, che aumenta la replicazione virale nel vettore [Caglioti et al., 2013; Thiberville et al., 2013].



Figura 43. Il vettore *Ae. albopictus*.

Alcuni studi hanno dimostrato che anche varie specie del genere *Culex* sono potenziali vettori per il CHIKV.

A differenza di altre specie (come quelle indigene dell'Europa), la zanzara tigre è attiva durante il giorno, e non solamente all'alba o al tramonto. Le zanzare tigre depongono le uova spesso in piccoli contenitori con quantità di acqua: vasi, sottovasi, fognature otturate, grondaie, recipienti di scarto. La zanzara tigre ha un limitato raggio d'azione (meno di 200 metri): i luoghi di deposizione delle uova sono vicini dunque a dove si osservano le zanzare [Caglioti et al., 2013].

Sebbene *Ae. albopictus* sia indigena in zone tropicali e subtropicali, si sta adattando con successo anche a climi più freddi. Nelle zone tropicali calde e umide è attiva tutto l'anno, in regioni più temperate sverna. Le uova delle varietà presenti nelle zone temperate tollerano meglio il freddo (temperature sotto zero, neve) di quelle presenti in regioni più calde. Inoltre, le zanzare tigre adulte possono sopravvivere durante l'inverno in microhabitat adeguati.

I primi esemplari di *Ae. albopictus* in Europa si sono osservati in Albania, probabilmente il mezzo responsabile fu una nave cargo proveniente dalla Cina attraccata a Durazzo. In Italia ha fatto la sua comparsa nel 1990 a Genova, in un deposito di pneumatici usati importati dagli Stati Uniti (Georgia), e l'anno dopo a Padova. Si è poi diffusa praticamente in tutta la penisola in particolare in Emilia Romagna, sconfinando fino in Francia, Spagna e Svizzera e nei porti delle città europee, dimostrando quindi un'alta capacità di ambientazione [Rezza et al., 2007].

Anche se la trasmissione avviene tramite puntura di zanzara infetta, non si esclude a priori la possibilità di un contagio interumano (per via aerea, per contatto con fluidi biologici...) specialmente tra soggetti che restano in prolungato contatto con malati. Sono stati descritti anche casi di trasmissione tramite donatori automatici di sangue e di organi e tessuti (per esempio trapianto di cornea) [Thiberville et al., 2013].

Prevenzione

Non esiste ancora un vaccino per il CHIKV, ma sono stati fatti vari tentativi, utilizzando sia virus inattivati che attenuati, proteine ricombinanti, vaccini a DNA. Si è sviluppato un vaccino umano che prevede l'uso di un virus inattivato con formalina; gli effetti sono stati testati su cellule di rene di scimmia (green monkey kidney cells, GMKC): i livelli degli

anticorpi sono elevati, non vi è viremia e sembra proteggere le scimmie dall'infezione. Sembra però che gli effetti indesiderati siano parecchi. Si è allora passati ad utilizzare il siero di un paziente (Tahilandia) che sembra non avere effetti collaterali in topi e nei pazienti volontari; tutti i soggetti sviluppano anticorpi neutralizzanti. A partire dal ceppo isolato si è provato a sviluppare un vaccino di seconda generazione che sembra garantire un'alta protezione. Si stanno ancora effettuando ulteriori trial clinici [Caglioti et al., 2013; Powers et al., 2007].

1.8. FAMIGLIA BUNYAVIRIDAE, GENERE BUNYAVIRUS

La famiglia Bunyaviridae comprende una serie di arthropod-borne e rodent-borne virus; prende il nome da Bunyamwera (Uganda) dove, dalle zanzare, è stato isolato il primo virus. Questi virus sono responsabili di patologie febbrili nell'uomo ed in altri vertebrati. Il ciclo biologico comprende un ospite roditore o un vettore artropode e un ospite vertebrato. La maggior parte sono Arbovirus (arthropod-borne viruses) essendo prevalentemente diffusi tramite artropodi (zanzare, zecche, flebotomi). Fanno eccezione gli Hantavirus - Robovirus (rodent borne virus) - che infettano solo i mammiferi e sono diffusi tramite le urine e le feci di roditori.

Le analisi filogenetiche hanno consentito la suddivisione in 4 generi principali di interesse medico: Bunyavirus, Phlebovirus, Nairovirus e Hantavirus (Tabella 5). Questi virus sono suddivisi in 35 sierogruppi con oltre 330 tipi e sottotipi. Esiste anche un quinto genere, Tospovirus, che recentemente ha suscitato notevole interesse in campo botanico.

Genere	Principali virus	Patologia	Vettore/serbatoi	Distribuzione geografica
Bunyavirus	California LaCrosse Tahyna	meningo-encefalite encefalite febbre, esantema	zanzara	Stati Uniti, Europa
Phlebovirus	Toscana virus, Napoli virus, Sicilian virus Febbre della Rift Valley	febbre, encefalite, meningite febbre emorragica	flebotomo	Centro e nord Africa, Asia medio-orientale e meridionale, area mediterranea
Nairovirus	Virus della febbre emorragica Crimea- Congo	Febbre emorragica	zecca	Africa centrale, Asia, Europa orientale

Genere	Principali virus	Patologia	Vettore/serbatoi	Distribuzione geografica
Hantavirus	Belgrado, Hantaan	Febbre emorragica con sindrome renale (HFRS); sindrome polmonare da Hantavirus; nefropatia epidemica	roditore	Asia, Nord e Sud America, Europa
Tospovirus	Tomato spotted wilt virus	virus delle piante, nessuna patologia umana conosciuta	-	-

Tabella 5. Generi della famiglia Bunyaviridae.

1.8.1. GENOMA, CARATTERISTICHE STRUTTURALI E REPLICAZIONE

I Bunyavirus sono particelle sferiche dotate di envelope aventi un diametro di 80-120 nm (Figura 44). Il genoma, contenuto in nucleocapsidi elicoidali, è costituito da RNA singolo filamento a polarità negativa (ssRNA-), di 11-12 kb, segmentato in tre parti (Figura 44):

- segmento L (large) di 6400-6700 nucleotidi che contiene una singola ORF che codifica per la RNA polimerasi-RNA dipendente (proteina L);
- segmento M (medium) di circa 4215 nucleotidi che codifica per le proteine superficiali G1 e G2 e per una proteina non strutturale NSm;
- segmento S (small) di 1869 nucleotidi che codifica per la proteina nucleocapsidica N e proteine non strutturali NS.

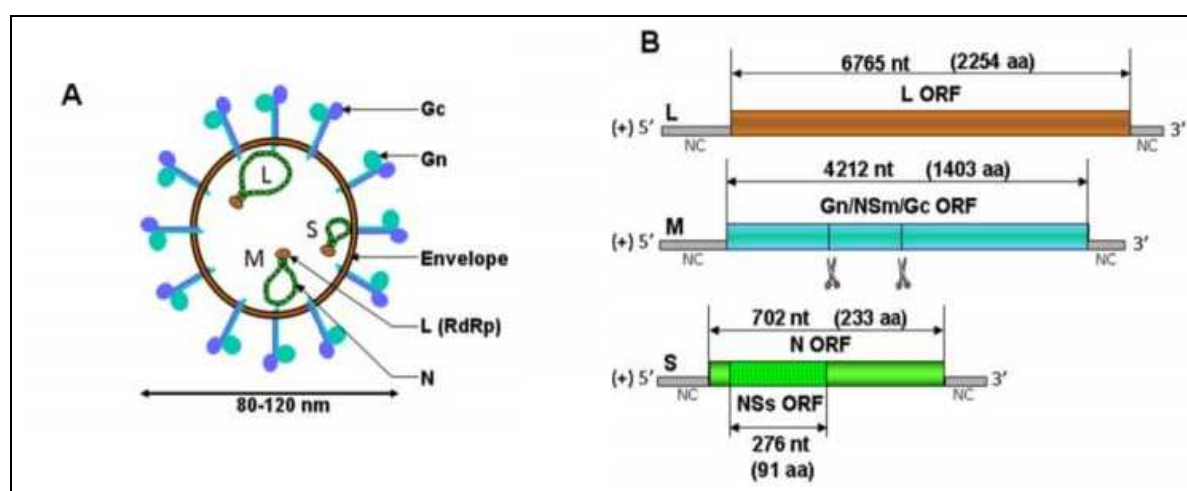


Figura 44. Rappresentazione del virione (A) e del genoma (B) dei Bunyavirus.

Sulla superficie (pericapside) sono espresse due glicoproteine virus specifiche, G1 e G2, che formano proiezioni superficiali, hanno come bersaglio anticorpi neutralizzanti, capacità emoagglutinanti e sono responsabili dell'interazione del virus con la cellula ospite [Di Bonito et al., 1997; Lappin et al., 1994; Valassina et al., 2003].

La replicazione dei Bunyavirus avviene nel citoplasma. L'interazione di G1 con i recettori cellulari permette la penetrazione per fusione (endocitosi recettore mediata); il PH basso induce la fusione del virus con la membrana della vescicola, rilasciando il genoma virale nel citoplasma. L'RNA genomico è poi trascritto in mRNA dalla polimerasi virale (RdRp). Dalla traduzione degli mRNA si ottengono le proteine virali: il filamento M codifica la proteina NS e le glicoproteine G1 e G2 vengono glicosilate nel Golgi ed espresse sulla membrana; il filamento L codifica invece la proteina L (polimerasi), mentre il tratto S codifica per le proteine non strutturali NS e N. La replicazione citoplasmatica dell'RNA genomico (ssRNA-) avviene attraverso la produzione di un intermedio di RNA complementare a polarità positiva ssRNA+(cRNA). Avviene dunque l'assemblaggio della proteina N con il genoma virale neoformato (ssRNA+) generando il nucleocapside. Questo viene trasportato al Golgi o alla membrana citoplasmatica. Dopo la maturazione le particelle virali (nucleocapside + proteine dell'envelope) vengono rilasciate per gemmazione intracellulare nel Golgi. In alternativa la liberazione dei virioni può avvenire tramite lisi cellulare.

1.8.2. PATOGENESI E MANIFESTAZIONI CLINICHE

I Bunyavirus si replicano negli artropodi. La persistenza in natura è legata alla possibilità di instaurare un ciclo artropode vettore (zanzara, zecca o flebotomo) - ospite vertebrato (generalmente piccoli mammiferi ma anche uccelli) che diventa quindi il serbatoio del virus. Nell'artropode l'infezione persiste in assenza di malattia. Alcuni Bunyavirus (per esempio il virus della febbre da flebotomi, presente in Italia, tipo napoletano o tipo siciliano), sono trasmessi per via transovarica: in questo caso l'artropode e insieme serbatoio e vettore. Nel ciclo naturale l'uomo si ammala quando è punto da un artropode infetto, ma il sangue umano raramente può infettare l'artropode, cosicché l'uomo rappresenta l'ospite terminale.

Il virus si moltiplica nelle cellule epiteliali del tratto digerente dell'artropode, infetta le ghiandole salivari e si moltiplica. Quando il vettore punge l'ospite, rigurgita la saliva

contenente i virioni; la saliva infetta penetra nei capillari e nei vasi linfatici. L'endotelio vascolare della cute e i linfonodi regionali rappresentano quindi il sito primario di replicazione del virus che giunge al circolo sanguigno generando viremia. Al termine della viremia, vi è la comparsa degli anticorpi e l'ospite va incontro a guarigione.

L'infezione è generalmente asintomatica, a meno che non sia stato infettato uno specifico organo (endotelio vascolare, fegato, encefalo, reni, polmoni). Il danno è prevalentemente attribuibile alla diretta invasione dei tessuti da parte del virus, piuttosto che ad una reazione infiammatoria mediata dall'ospite. La risposta iniziale all'infezione da Bunyavirus consiste nella produzione di interferone (IFN). La scomparsa del virus nel sangue si accompagna alla comparsa di anticorpi. L'IFN, unitamente all'immunità umorale, svolge un ruolo protettivo sull'andamento dell'infezione.

I Bunyavirus causano febbre talvolta con rash. In aggiunta, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus può causare emorragie; Rift Valley fever virus può causare epatiti emorragiche, encefaliti o cecità; La Crosse virus e virus simili possono causare encefaliti; Hantaan River virus causa emorragie e danni renali o la sindrome polmonare da Hantavirus che ha un tasso di mortalità del 36%.

1.8.3. DIAGNOSI E PREVENZIONE

La diagnosi sierologica viene effettuata mediante riscontro di anticorpi delle classi IgM o IgG (ELISA o immunofluorescenza indiretta). La presenza di IgM nei sieri di pazienti in fase acuta deve essere confermata da IgG in prelievo effettuato dopo circa 2 settimane. Nella fase viremica è possibile applicare tecniche immunoenzimatiche (ELISA) per il rilevamento di antigeni virali o indagini molecolari (RT-PCR) per l'amplificazione di sequenze specifiche. Si moltiplicano in colture cellulari di diverse specie animali (vertebrati e invertebrati), in particolare in un'ampia varietà di linee cellulari d'origine renale, incluse le cellule VERO e in cellule macrofagiche di topo, dove sono in grado di produrre un evidente effetto citopatico. Per alcuni virus particolarmente pericolosi si rende indispensabile la disponibilità di un laboratorio autorizzato al trattamento di agenti infettanti di classe 3 (es. Febbre della Valle del Rift) e 4 (Virus della febbre emorragica di Crimea/Congo).

Per il virus della Rift Valley (Phlebovirus) sono stati allestiti vaccini per uso umano

preparati con virus inattivati con formalina. Questi vaccini non sono ancora ottimali, poiché sono necessari diversi richiami per ottenere un'adeguata risposta anticorpale. Per la febbre emorragica con sindrome renale (Hantavirus) sono stati utilizzati diversi tipi di vaccini inattivati nei confronti dei virus Hantaane Seoul e numerosi vaccini ricombinanti sono attualmente in studio. In assenza di vaccini efficaci in commercio, la prevenzione verso l'infezione da Bunyavirus (esclusi gli Hantavirus) consiste nell'evitare il contatto tra l'uomo e l'artropode vettore (repellenti, insetticidi, vestiti protettivi, zanzariere, tende). Per quanto riguarda la prevenzione dell'infezione da Hantavirus deve essere effettuata principalmente con il controllo dei roditori.

1.8.4. PHLEBOVIRUS

I Phlebovirus comprendono circa 37 specie, raggruppate in 9 sierotipi; tra questi abbiamo i Sandfly fever virus, che sono trasmessi ai vertebrati da flebotomi. I Phlebovirus sono geograficamente distribuiti in Europa (Italia inclusa, Tabella 6), Africa, Asia centrale e Nord e Sud America.

Famiglia/genere	Virus	Anno	Luogo	Identificazione virale
Bunyaviridae/ Phlebovirus	Arbia	1981	Toscana, Marche	P. perniciosus, P. perfliewi
	Sandfly fever Naples	1944	Campania	uomo
	Sandfly fever Sicilian	1943	Sicilia	uomo
	Toscana	1971	Italia centrale e meridionale	P. perniciosus, P. perfliewi, uomo

Tabella 6. Sandfly-borne virus isolati in Italia.

Si conosce ancora poco sugli ospiti reservoir e sembra che il ruolo degli animali sulla sopravvivenza del virus sia secondario all'amplificazione orizzontale che comunque garantisce la trasmissione transovarica e venerea. Tra i Phlebovirus i più importanti sono il virus della Rift Valley e i virus da febbre da flebotomi (Sandfly fever virus). Quest'ultimi circolano in Europa e sono responsabili di sintomatologia simil-influenzale: in particolare, abbiamo i sierotipi Sicilian virus, Naples virus e Toscana virus (TOSV). I primi due sono presenti in Asia centrale e medio-orientale e hanno la stessa distribuzione dei vettori. Il

Toscana virus è invece presente in Italia, Algeria, Spagna, Portogallo e Cipro (Eitrem et al., 1991). Il TosV e il Rift Valley virus sono gli unici del genere ad essere neurotropi. A differenza di Sicilian virus e Naples virus, che causano patologia febbrile, il Toscana virus è responsabile di febbre alta, cefalea grave, meningite asettica con prognosi benigna seguita da convalescenza di media-lunga durata.

1.8.5. TOSCANA VIRUS

Il Toscana virus (TOSV), appartenente alla famiglia Bunyaviridae, genere Phlebovirus, è un Sandfly fever virus responsabile di infezioni neurologiche nell'uomo. Viene trasmesso da flebotomi, in particolare *Phlebotomus perniciosus* e *P. perfiliewi*; il virus può essere trasmesso per via transovarica tra i vettori, ma non sono ancora stati identificati gli ospiti serbatoio. Dato che il TOSV è stato isolato dal cervello di un pipistrello (*Pipistrellus kuhli*) potrebbe esserci un possibile coinvolgimento di questa specie nell'ecologia del virus. Da uno studio condotto in Turchia è emerso che i cani potrebbero essere candidati come ospiti reservoir poiché sono stati identificati sia l'RNA virale che gli anticorpi neutralizzanti in campioni raccolti durante la stagione estiva [Dincer et al., 2015].

L'incubazione del virus va da pochi giorni a due settimane. Nella maggior parte dei casi determina solo un'infezione in forma leggera, asintomatica o paucisintomatica con sintomatologia simil-influenzale (febbre, cefalea, nausea, vomito, mialgia e rigidità al collo). Nei casi più gravi questo Arbovirus può causare meningite con o senza sintomatologia encefalitica (meningo-encefalite). La prognosi è favorevole.

Non esiste una terapia specifica ma solo un trattamento sintomatico.

La diagnosi viene effettuata mediante test molecolari ed immunoenzimatici, i quali sono rapidi e sensibili. La diagnosi diretta prevede metodiche come la nested PCR e la real-time RT-PCR, che oltre a permettere una rapida identificazione hanno permesso di dimostrare la circolazione di diversi ceppi di Toscana virus [Valassina et al., 1998]. La diagnosi indiretta è utile invece sia per identificare l'infezione in acuto (IgM) sia in fase cronica ma con i test sierologici si possono avere reazioni di cross-reattività con gli altri due sierotipi circolanti, Naples e Sicilian virus [Eitrem et al., 1991].

Recenti studi hanno dimostrato le proprietà antigeniche delle proteine virali (nucleoproteina N e glicoproteine di superficie G1 e G2) per capire meglio il loro ruolo immunogenico [Ciufolini et al., 1999; Valassina et al., 1998].

Il Toscana virus può essere isolato in vitro su colture cellulari di Vero [Verani et al., 1984]

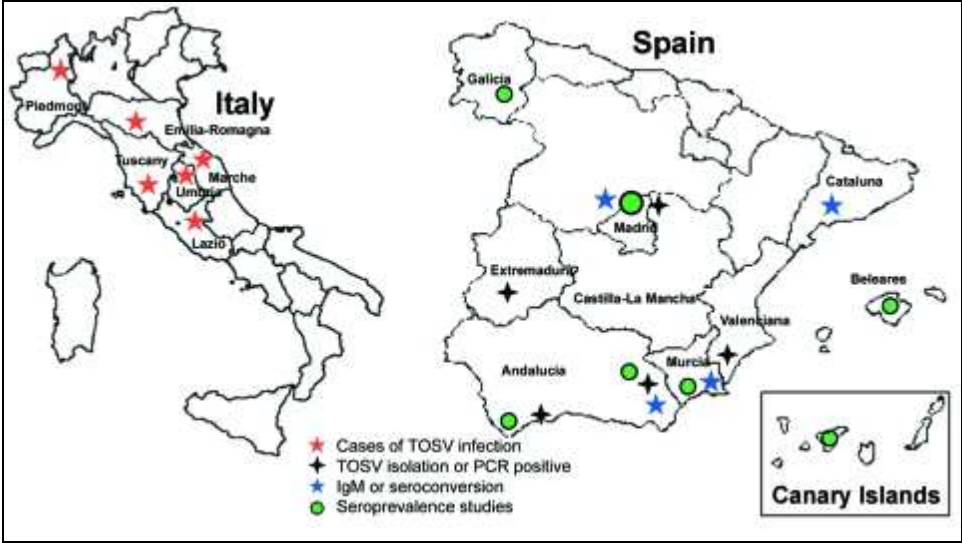
oppure mediante inoculazione intracerebrale in topi.

La frequenza di questa infezione aumenta nel periodo estivo, con picchi in agosto nelle aree mediterranee endemiche ovvero Italia, Portogallo, Spagna e Cipro (Figura 45) [Cusi et al., 2010]. In Portogallo è stato condotto uno studio retrospettivo su campioni di liquido cerebrospinale di pazienti con diagnosi di meningite: il 5.6% rivelava la presenza di TOSV [Santos et al., 2007]. Una sieroprevalenza ancora più elevata, 24.9%, è stata osservata in Spagna; il virus però sembra essere meno virulento di quello che circola in Italia [Cusi et al., 2010]. Durante un programma di sorveglianza per il WNV nel sud della Francia, diversi campioni di pazienti con meningite sono risultati positivi per TOSV [Peyrefitte et al., 2005]. Il virus è stato poi isolato su colture cellulari da campioni clinici e dai vettori [Charrel et al., 2007]. Da uno studio è emerso che tra i donatori di sangue il 12% presentava IgG per TOSV; un'alta percentuale di anticorpi è stata trovata anche tra pazienti ospedalizzati con sindrome neurologica. Inoltre è stato descritto anche un caso importato in Germania dalla Francia. Grazie a queste evidenze è stato possibile dimostrare la circolazione del Toscana virus sul territorio francese [Cusi et al., 2010; De Lamballerie et al., 2007].

Sono poi documentati vari casi importati dall'Italia in altri paesi europei e in America, alcuni dei quali vengono elencati qui di seguito:

- un caso importato in Svizzera dall'Isola d'Elba nell'agosto 2008 [Sonderegger et al., 2009] e uno nell'agosto 2009 [Gabriel et al., 2010];
- un americano di 66 anni tornato da Roma [Calisher et al., 1987], uno di 65 anni recatosi in Sicilia nell'estate del 2009 [Kay et al., 2010] e uno di 82 anni in vacanza sulla costiera amalfitana nel 2014 [Howell et al., 2015].

Vari ceppi di TOSV sono stati isolati sia da campioni clinici che da *Phlebotomus spp.* e i loro genomi sono stati sequenziati parzialmente o per intero descrivendo un quadro dei ceppi circolanti nell'area Mediterranea. Sono stati identificati due principali genotipi (Figura 46): il genotipo A circola principalmente in Italia, mentre il B in Spagna, suggerendo che la distribuzione geografica probabilmente è legata alla circolazione dei vettori. Questa distribuzione ha implicazioni nell'epidemiologia del TOSV poiché è in continua evoluzione in quanto correlata con il clima, la globalizzazione e la modificazione degli habitat [Cusi et al., 2010].



In Italia il Toscana Virus è stato isolato per la prima volta nel 1971 a Monte Argentario (Grosseto, Toscana). Nel 1983 è stato per la prima volta associato a patologia neurologica, quando è stato isolato da una giovane donna con meningite linfocitaria [Nicoletti et al., 1991]. Tra il 1995 e 1998 è stato condotto uno studio epidemiologico su pazienti ospedalizzati residenti in Toscana: circa l'80% dei casi di meningite asettica è stato attribuito al TOSV [Cusi et al., 201]. Successivi studi hanno poi sottolineato il ruolo di questo virus come agente eziologico di patologie neurologiche. Analisi sierologiche sono state condotte su popolazione ad alto rischio di contrarre il virus in Toscana e Piemonte (esempio guardie forestali); in queste regioni, dove il vettore è molto presente, si è osservato che l'infezione può manifestarsi in maniera asintomatica o può generare una sintomatologia lieve [Valassina et al., 2003b]. Un altro studio condotto a Siena tra il 1993 ed il 2008 ha mostrato un'alta incidenza di TOSV (399 casi) con un picco nel 2005 e nel 2006, forse a causa dell'aumento delle temperature. Successivamente il virus è stato riscontrato in Piemonte ed Emilia Romagna, ed in altre regioni come Marche, Umbria, Lazio, Campania, Sardegna (la sieroprevalenza è maggiore nell'Italia Centrale) [Cusi et al., 2010; Di Nicuolo et al., 2005; Remoli et al., 2014].

Tra il 2010 ed il 2012 è stato condotto uno studio interessante in varie province dell'Emilia Romagna: sono stati analizzati i campioni raccolti all'interno della sorveglianza delle infezioni da WNV (pazienti con meningite asettica) con metodiche sierologiche e molecolari. In totale sono stati testati 120 campioni: 37 sono risultati positivi per IgG anti-TosV e di questi 14 presentavano anche IgM anti-TosV, 1 paziente mostrava solo IgM positive. Di questi 37 era disponibile anche il CSF per 11 pazienti. Alle analisi molecolari gli 8 pazienti che avevano IgM ed IgG positive sono risultati positivi anche in RT-PCR; nei 3 casi rimanenti non erano stati riscontrati anticorpi specifici. Basandosi su questi dati, 18 pazienti su 120 (15%) erano in fase acuta dell'infezione da TosV (15 IgM positivi, 3 RT-PCR positivi senza anticorpi specifici). 11 pazienti erano della provincia di Bologna. 13 casi sono stati definiti come autoctoni mentre per i restanti 5 sono stati descritti viaggi precedenti alla comparsa dei sintomi in zone in cui il virus è presente. Non si è riscontrata nessuna associazione significativa tra infezione ed età dei pazienti; la durata media della sintomatologia è stata di 8 giorni e i sintomi maggiormente riscontrati sono stati febbre e cefalea; 14 presentavano meningite, 2 encefalite e 2 meningoencefalite. La prognosi è stata positiva per tutti i casi [Vocale et al., 2012].

2. SCOPO DELLA TESI

L'insorgenza e la diffusione delle patologie trasmesse da vettori rappresentano un problema attuale di sanità pubblica in costante aumento in diverse aree geografiche, Italia inclusa. Nel corso degli ultimi 20 anni si è infatti osservato un notevole incremento della prevalenza di vettori infetti, dell'incidenza delle patologie associate nell'uomo e di un ampliamento delle aree endemiche. Secondo una valutazione promossa dall'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), i cambiamenti climatici e ambientali, sotto forma di temperatura e umidità più elevate, favoriscono il diffondersi di vettori e ospiti intermedi e in ultima analisi delle infezioni stesse. La comparsa e la rapida diffusione di queste infezioni sono dovute anche all'aumento di viaggi a lunga distanza e alla globalizzazione del commercio. In particolare, in Europa e in Italia, si è assistito al progressivo aumento di casi importati ed autoctoni di alcune malattie virali di origine tropicale trasmesse da zanzare oggi molto diffuse anche in questi territori.

Per una corretta identificazione degli Arbovirus occorrono più metodiche, sia sierologiche che molecolari. La diagnosi sierologica di queste infezioni si basa principalmente su tecniche immuno-enzimatiche. Questi saggi talvolta possono dare problemi di reattività crociata tra i membri della famiglia Flavivirus. Questo fenomeno avviene perché nella risposta immunitaria vengono prodotte immunoglobuline specifiche, principalmente dirette verso la proteina E che contiene determinanti antigenici comuni a tutti i Flavivirus. Per ovviare questo problema che talvolta si verifica con le attuali metodiche, si rende necessario introdurre nuovi metodi come il test di riduzione di neutralizzazione delle placche (PRNT).

Alla luce di quanto detto, questo progetto di ricerca si propone di monitorare e migliorare i sistemi di sorveglianza delle arbovirosi nella regione Friuli Venezia Giulia, mediante:

- * determinazione del potenziale epidemico di TBEV nei vettori (zecca *I. ricinus*), verificando nel tempo la frequenza dell'infezione, la sua distribuzione e le caratteristiche dei ceppi presenti nell'area di studio;

- * monitoraggio delle infezioni da TBE e West Nile virus in campioni di pazienti con encefalite e/o meningite;
- * monitoraggio delle infezioni da Dengue e Chikungunya virus in pazienti con patologia febbrile in rientro da viaggi in aree endemiche;
- * miglioramento e ottimizzazione delle metodiche esistenti e introduzione di nuovi test sia per garantire un'identificazione più sensibile e specifica delle arbovirosi (test di riduzione di neutralizzazione delle placche, PRNT), sia per ridurre i tempi di screening;
- * ricerca di nuovi bersagli per il sequenziamento (caratterizzazione molecolare) per determinare e monitorare la distribuzione dei ceppi virali circolanti nel territorio e per ampliare le conoscenze riguardo l'epidemiologia di tali virus.

3. MATERIALI E METODI

3.1. IDENTIFICAZIONE DEL TBEV NEI VETTORI

Il flusso di lavoro seguito nell'analisi di ciascun campione è stato il seguente:

- raccolta delle zecche e campionamento;
- suddivisione in pool e omogeneizzazione;
- estrazione degli acidi nucleici;
- controllo di estrazione (gene 16S);
- indagini molecolari;
- sequenziamento e analisi filogenetica;
- colture cellulari.

I campioni risultati positivi in real-time RT-PCR sono stati ulteriormente testati mediante sequenziamento del gene NS5 e del gene E per la genotipizzazione e la successiva costruzione di alberi filogenetici. Inoltre sono stati condotti tentativi di isolamento in colture cellulari Vero E6, eseguite in laboratorio di biosicurezza BSL-3.

Tutte le analisi mediante real-time RT-PCR sono state condotte con lo strumento LC480 II (Roche Italia, Monza, Italia).

3.1.1. RACCOLTA DELLE ZECCH E CAMPIONAMENTO

Metodo di raccolta di *Ixodes ricinus*

Il campionamento delle zecche è stato eseguito da ricercatori del Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piant e dell'Università degli Studi di Udine. Il metodo impiegato è denominato dragging sample (trascinamento) o flagging o metodo della coperta strisciata, che consiste nel raccogliere le zecche allo stato libero trascinando lentamente un telo di pile bianco (1m²) con delle aste, su una superficie di terreno di 100m²; le zecche che si trovano attaccate vengono prelevate con delle pinzette e conservate all'interno di una provetta. Il metodo si basa sul caratteristico comportamento (ambushing) di molti Ixodidi, tra cui anche *I. ricinus*, che attendono appostati sull'erba o sui cespugli, il passaggio di un

potenziale ospite su cui attaccarsi.

Allo scopo di seguire la dinamica stagionale delle popolazioni di zecche e determinarne l'abbondanza nei vari ambienti, sono stati eseguiti due tipi di campionamento:

- campionamento mensile: effettuato ogni 30 giorni circa dall'inizio della primavera all'autunno inoltrato, solo in alcuni siti rappresentativi, sia in ecotoni che in boschi;
- campionamento di massa: in concomitanza con i picchi di attività primaverile e autunnale delle zecche, in tutti i siti, su una superficie di alcune centinaia di metri quadrati, sia in ecotoni che in boschi. Per ecotoni si intendono prati dove non vengono eseguiti sfalci periodici; si presentano con erbe alte e arbusti; al suolo c'è uno spesso strato di vegetazione; sono normalmente adiacenti a boschi.

Gli esemplari raccolti sono stati catalogati per stadio maturativo (adulto o ninfa), sesso (se l'individuo è adulto), sito di prelievo (Tabella 8) e tipologia del territorio (B=bosco, E=ecotono, X=non specificato). Ad ogni singolo acaro è stato attribuito un codice univoco composto da quattro cifre: la prima corrispondente alla data di raccolta, la seconda alla sede, la terza allo stadio e l'ultima al numero di zecche contenute nella provetta. Le provette sono state conservate a -80°C fino al momento dell'analisi.

Campionamento periodico delle zecche e area di studio

Il Friuli Venezia Giulia è una regione estremamente eterogenea dal punto di vista geografico, climatico e della distribuzione della vegetazione; infatti ciascuna delle aree campionate può essere collocata all'interno di una specifica area geoclimatica (Tabella 7 e Figura 47).

Sono state identificate 7 zone:

1. Zona alpina, che comprende la Carnia Occidentale e Centro-Orientale
2. Zona prealpina, che comprende le Prealpi Carniche e le Prealpi Giulie
3. Zona valliva, che comprende Canal del Ferro-Valcanale
4. Zona collinare, che prevede sia colline moreniche che eoceniche
5. Zona pianeggiante, che comprende alta e bassa pianura
6. Zona carsica
7. Zona lagunare, che racchiude il litorale

CODICE	ZONA	SITI
CO	Carnia Occidentale	Forni di Sopra, Forni di Sotto
CC	Carnia Centro-orientale	Amaro, Ampezzo, Imponzo, Ovaro, Paluzza, Paularo, Ravascletto, Rigolato, Socchieve, Val Apua
PC	Prealpi Carniche	Bordano, Claut, Clauzetto, Tramonti di Sopra, Trasaghis
VC	Valcanale	Fusine, San Leopoldo, Tarvisio, Valbruna
CF	Canal del Ferro	Pontebba, Raccolana, Roveredo
PG	Prealpi Giulie	Gemona del Friuli, Lusevera, Montenars, Povici, Pulfero, Taipana,
CM	Colline Moreniche	Pagnacco, Rive D'Arcano
CE	Colline Eoceniche	Buttrio, Cividale, Gorizia, Medea, Tarcento
AP	Alta Pianura	Flaibano, Martignacco, Polcenigo
BP	Bassa Pianura	Bertiolo, Chions, Muzzana
CG	Carso Goriziano	Doberdò del Lago, Redipuglia
LI	Litorale	Grado, Lignano

Tabella 7. Suddivisione delle aree geo-climatiche.

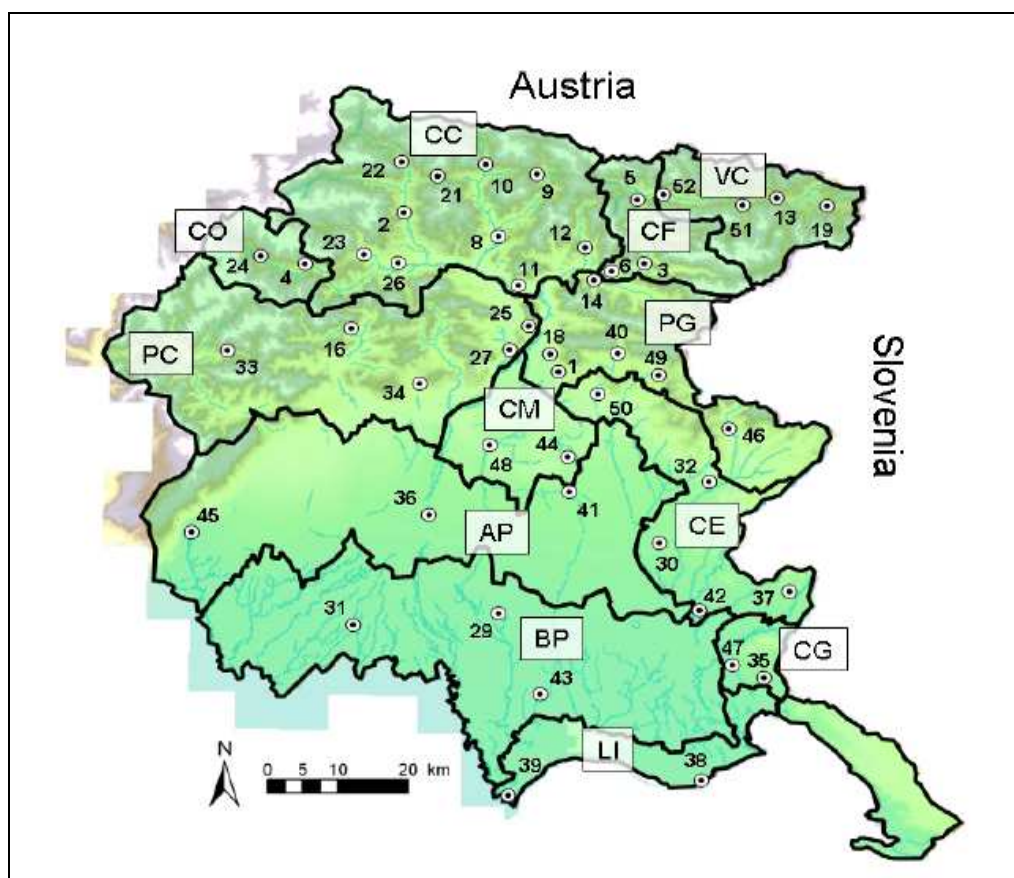


Figura 47. Rappresentazione delle stazioni di prelievo (numerate dall'1 al 52; vedi tabella 7) e loro raggruppamento in area geografica di appartenenza. [Per gentile concessione del Dip. di Biologia e Protezione delle Piante dell'Università degli Studi di Udine].

CODICE	SITO	CODICE	SITO
1	MONTENARS	27	TRASAGHIS
2	OVARO	28	ARTEGNA
3	RACCOLANA	29	BERTIOLO
4	FORNI DI SOTTO	30	BUTTRIO
5	PONTEBBA	31	CHIONS
6	ROVEREDO	32	CIVIDALE
7	ENEMONZO	33	CLAUT
8	IMPONZO	34	CLAUZETTO
9	PAULARO	35	DOBERDÒ DEL LAGO
10	PALUZZA	36	FLAIBANO
11	AMARO	37	GORIZIA
12	VAL AUPA	38	GRADO
13	TARVISIO	39	LIGNANO
14	POVICI	40	LUSEVERA
15	TRAMONTI DI MEZZO	41	MARTIGNACCO
16	TRAMONTI DI SOPRA	42	MEDEA
17	TRAMONTI DI SOTTO	43	MUZZANA
18	GEMONA DEL FRIULI	44	PAGNACCO
19	FUSINE	45	POLCENIGO
20	ORIGNE	46	PULFERO
21	RAVASLETTO	47	REDIPUGLIA
22	RIGOLATO	48	RIVE D'ARCANO
23	AMPEZZO	49	TAIPANA
24	FORNI DI SOPRA	50	TARCENTO
25	BORDANO	51	VALBRUNA
26	SOCCHIEVE	52	SAN LEOPOLDO

Tabella 8. Elenco delle stazioni di campionamento nelle stagioni 2011-14.

3.1.2. SUDDIVISIONE IN POOL E OMOGENEIZZAZIONE

Le zecche adulte sono state analizzate singolarmente, mentre le ninfe sono state raggruppate in pool da 2 a 10 esemplari; questa scelta è stata determinata dai seguenti fattori:

- numero notevolmente inferiore di adulti rispetto alle ninfe;
- le tecniche utilizzate sono caratterizzate da elevata sensibilità che può determinare false positività che abbassano la predittività positiva dell'analisi.

L'omogeneizzazione è stata condotta sotto preparando per ogni ciclo 48 provette con:

- * due biglie metalliche per l'omogeneizzazione;
- * 500 µL di terreno di trasporto;
- * 1 adulto oppure 2-10 ninfe prelevati con delle pinze di plastica sterili.

L'omogeneizzazione è stata condotta in laboratorio BSL3 con il dispositivo Tissue Liser (QIAGEN), impostando i seguenti parametri:

- * frequenza (1/s) → 300
- * time (min/sec) → 30 minuti.

Le biglie metalliche, dopo l'utilizzo, sono state sottoposte a lavaggi di sterilizzazione con una soluzione di ipoclorito 50% per 20/30 minuti, risciacquate in acqua ed infine autoclavate.

L'omogenato è stato poi suddiviso in due aliquote:

1. una per l'estrazione e i test molecolari;
2. una per ulteriori indagini molecolari o per isolamento virale.

Tutte le aliquote sono state conservate a - 80°C.

3.1.3. ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

L'estrazione degli acidi nucleici è stata effettuata mediante due metodiche:

1. estrazione manuale per i pool di zecche;
2. estrazione con estrattore automatico per surnatanti e campioni biologici umani.

Estrazione manuale

L'estrazione degli acidi nucleici è stata eseguita con il kit commerciale QIAamp® Viral RNA Mini Kit Qiagen RNA Extraction (QIAGEN), seguendo il protocollo suggerito dalla ditta. L'eluato (70 µL), contenente l'estratto, è stato utilizzato per le analisi molecolari oppure conservato a -80°C se queste venivano effettuate in un secondo momento.

Estrazione con estrattore automatico NucliSENS® easyMAG®

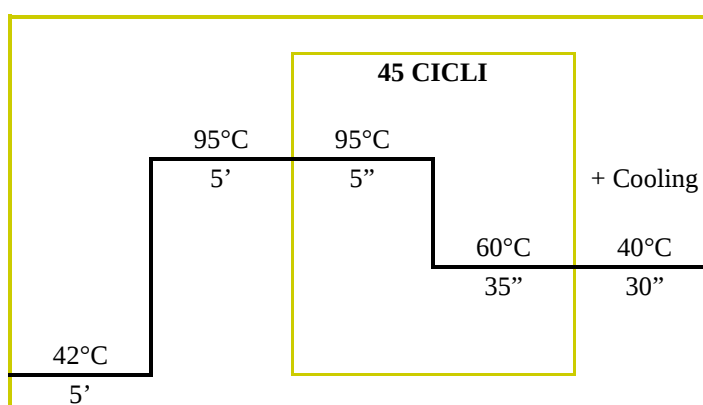
L'RNA è stato estratto mediante l'estrattore automatico NucliSENS® easyMAG®, della ditta Biomerieux. Lo strumento esegue uno step di pre-lisi per favorire la rottura capsidica e il rilascio degli acidi nucleici; successivamente attua cicli di adsorbimento ed eluizione del DNA/RNA mediante microbeads di silice paramagnetica e buffer di estrazione. Tale metodica è comparabile al protocollo dell'estrazione manuale con il kit QIAGEN.

Prima di procedere con l'estrazione i campioni sono stati pre-lisati con un tampone di lisi impiegato dallo strumento (NucliSENS easyMAG Lysis Buffer, Biomerieux). Tale fase, che rende inattivo il virus, viene necessariamente svolta nel laboratorio BSL-3 al fine di garantire la sicurezza degli operatori. Al termine dell'estrazione gli acidi nucleici ottenuti sono stati utilizzati per le analisi molecolari oppure conservato a -80°C se queste venivano effettuate in un secondo momento.

3.1.4. CONTROLLO DI ESTRAZIONE

Il controllo dell'efficienza dell'estrazione e della valutazione della presenza di potenziali inibitori della PCR è stato effettuato mediante l'amplificazione di una regione di 110 bp dell'RNA ribosomiale 16S di *Ixodes ricinus* [Nilsson et al., 1999], mediante una real-time RT-PCR con il kit Kapa Probe Fast Universal One-step qRT-PCR kit (Kapa Biosystems, Inc. Wilmington, MA), seguendo le indicazioni di Shwaiger et al., 2003. Sono stati impiegati i primer e la sonda Taqman (10 pmol/μL) e il profilo termico sotto elencati:

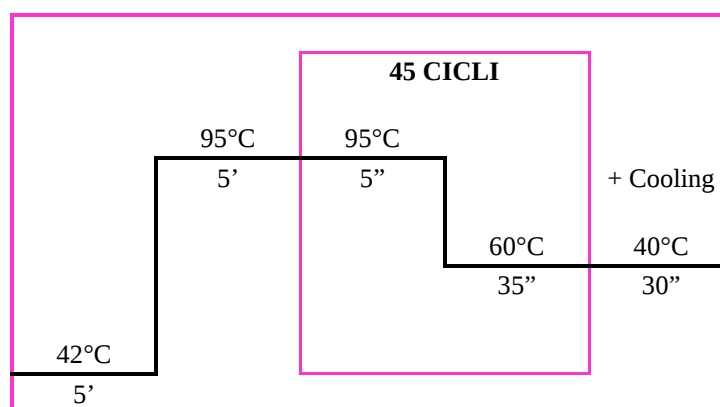
	Primer e TaqMan probe (5' → 3')	Posizione	pb
F-16S Ixodes	AAAAAAATACTCTAGGGATAACAGCGTAA	254-282	
R-16S Ixodes	ACCAAAAAGAATCCTAATCCAACA	327-351	110
P-16S Ixodes	6FAM-TTTTGGATAGTTCATATAGATAAAATAGTTTGCGACCTCG-TAMRA	286-325	



3.1.5. INDAGINI MOLECOLARI

La ricerca delle sequenze genomiche del virus TBE sulla prima aliquota di omogenato è stata effettuata mediante real-time RT-PCR, con il kit Kapa Probe Fast Universal One-step qRT-PCR kit (Kapa Biosystems, Inc. Wilmington, MA). Il target di amplificazione è stato identificato in una sequenza di 70 pb della regione 3'-non coding (3' NCR) del genoma virale altamente conservata tra i diversi ceppi appartenenti al sottotipo Europeo e a quello FarEastern [Shwaiger et al., 2003]. Sono stati impiegati i primer e la sonda Taqman (concentrazione di 10 pmol/μL) e il profilo termico sotto elencati:

	Primer e TaqMan probe (5' → 3')	Posizione	pb
F-TBE	GGCGGTTCTTGTCTCC	11054-11071	70 pb
R-TBE	ACACATCACCTCCTTGTCAGACT	11099-11121	
PROBE-TBE	FAM-TGAGCCACCATCACCCAGACACA-TAMRA	11073-11095	

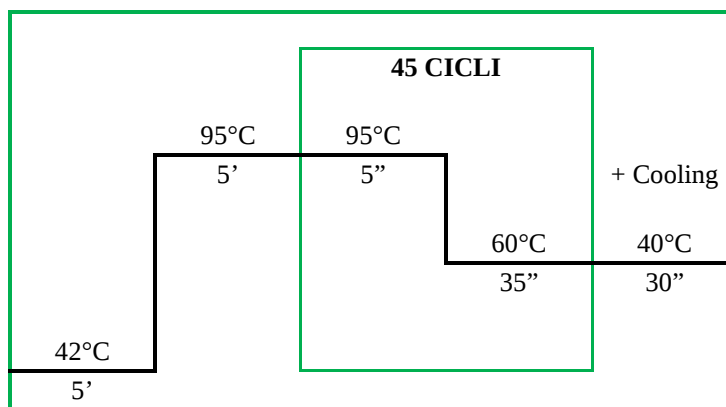


Per la conferma della positività è stata utilizzata una seconda real-time diretta ad una regione di 87 pb del gene E [Gaumann et al., 2010].

Le cariche virali sono state quantificate grazie alla creazione di una curva standard con un plasmide di concentrazione a noi nota. Il plasmide è stato realizzato in collaborazione con il gruppo di Virologia molecolare dell'ICGEB di Trieste.

Sono stati impiegati i primer e la sonda Taqman (concentrazione di 10 pmol/μL) e il profilo termico sotto elencati:

	Primer e TaqMan probe (5' → 3')	Posizione	pb
TBEE-F6	GGCTTGTGAGGCAAAAAGAA	1329-1349	87 pb
TBEE-R2	TCCCGTGTGTGGTTGCGACTT	1397-1416	
TBEE-P4	FAM-AAGCCACAGGACATGTGTACGACGCC-BHQ1	1349-1374	



3.1.6. SEQUENZIAMENTO ED ANALISI FILOGENETICA

Per la caratterizzazione molecolare dei campioni risultati positivi allo screening per TBEV e dei surnatanti ottenuti dalle colture cellulari sono state analizzate le seguenti regioni del genoma del virus: una porzione del gene NS5, una in corrispondenza alla giunzione tra i geni NS4 e NS5 (regione NS4/5) ed una regione parziale del gene codificante per la glicoproteina E dell'envelope. I protocolli sono stati ottimizzati a partire da primer e condizioni termiche descritti in letteratura [Puchhammer et al., 1995; Haglund et al., 2003; Melik et al., 2007]. È stato seguito il flusso di lavoro sottostante:

- a) PCR di sequenziamento;
- b) purificazione della PCR;
- c) PCR di marcatura;
- d) purificazione della marcatura;
- e) sequenziamento capillare, assemblaggio ed editing.

Tutte le reazioni di PCR end point (PCR tradizionali) sono state condotte con i termociclatori GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystem - Life Technologies).

La presenza degli amplificati è stata verificata su gel di agarosio all'1% previa aggiunta di 6X Loading Buffer (blu bromofenolo, xilene cianolo, glicerolo), utilizzando come peso molecolare il DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche).

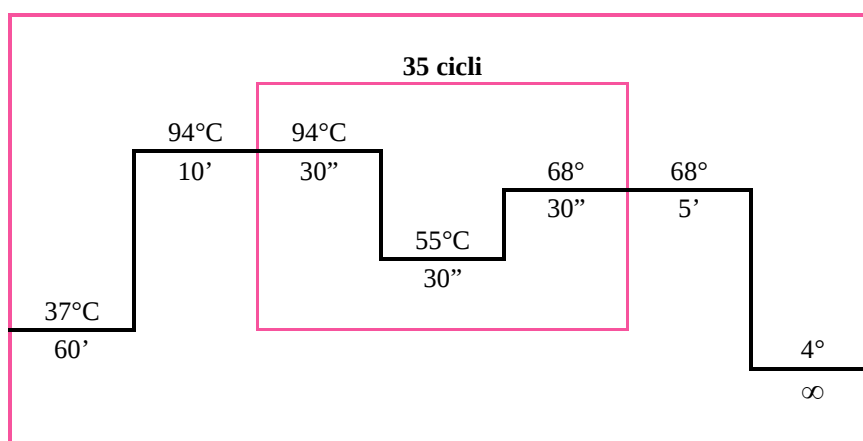
La corsa elettroforetica è stata eseguita a voltaggio costante di 200 V, per circa 20 minuti, usando come tampone di corsa TBE 1X. I gel sono stati poi colorati per 10 minuti in una soluzione contenente un colorante fluorescente, Gel Red 10000X (Diatech).

a) PCR DI SEQUENZIAMENTO

Amplificazione del gene NS5

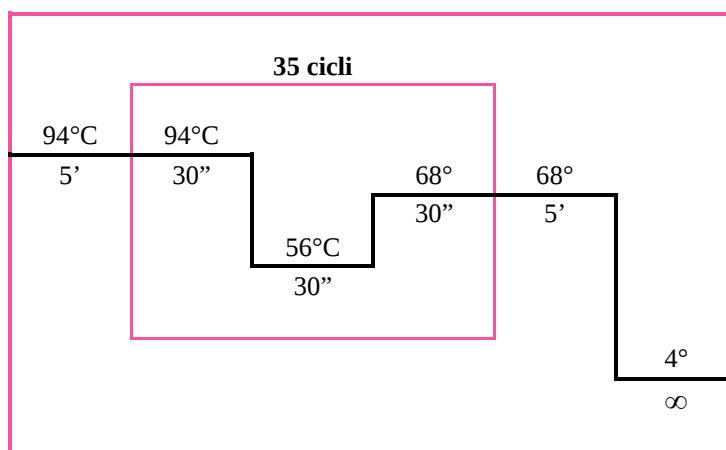
È stata amplificata una regione di 252 bp del gene della polimerasi NS5, utilizzando una RT-Nested PCR [Puchhammer et al., 1995; Jaakselainen et al., 2006]. Per la prima reazione si è utilizzato il kit Ready-to-go RT-PCR Beads (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, UK) e i seguenti primer (10 pmol/μL) e profilo termico:

	Primer (5' → 3')	Posizione	pb
FSM1	GAGGCTGAACAACTGCACGA	7687-7706	357
FSM2	GAACACGTCCATTCCTGATCT	8024-8044	



Per il secondo step si è adoperato il kit Ready-to-go PCR Beads (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, UK) e i seguenti primer (10 pmol/μL) e profilo termico:

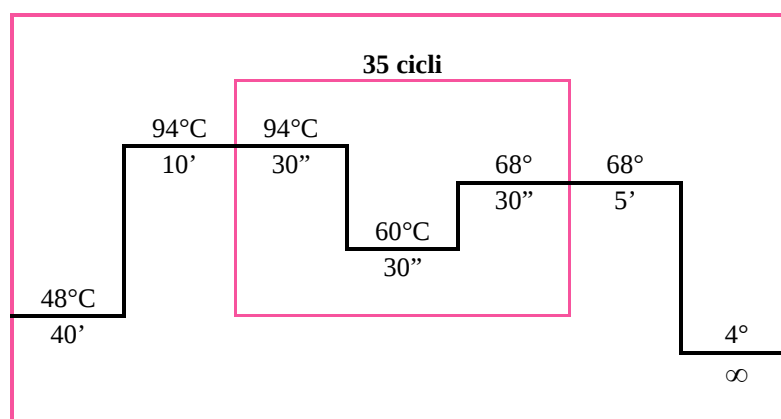
	Primer (5' → 3')	Posizione	pb
FSM1 interno	ACGGAACGTGACAAGGCTAG	7748-7768	252
FSM2 interno	GCTTGTTACCATCTT TGGAG	7980-7999	



Amplificazione della regione NS4/5

Con una RT-PCR one step si è amplificata una regione dei geni NS4/5 di 1186 pb, con il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum Taq System (Invitrogen - Life Technologies) e i seguenti primer (10 pmol/μL) e profilo termico [Kupca et al., 2010]:

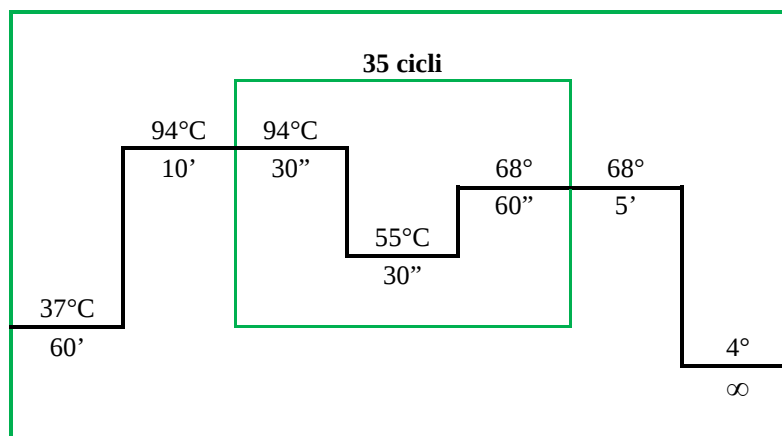
	Primer (5' → 3')	Posizione	pb
TBE-7547	CTGACACGTTGTGGACGATG	7547-7567	1186
TBE-c8732	AACACTCTCTGCTGTCCGAAAG	8732-8710	



Amplificazione del gene E

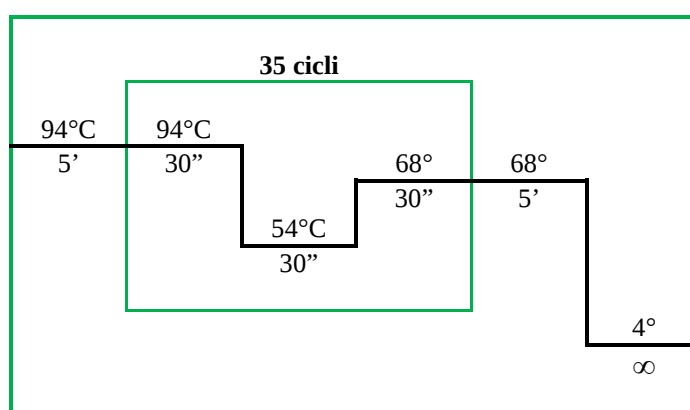
I campioni positivi sono stati anche testati per il gene che codifica per la glicoproteina E dell'envelope, andando ad amplificare una regione di 1621 pb. In questo caso sono state effettuate un'unica reazione di retro-trascrizione e quattro Nested PCR. Per il primo step si è utilizzato il kit Ready-to-go RT-PCR Beads (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, UK) e i seguenti primer (10 pmol/μL) e profilo termico [Melik et al., 2007]:

	Primer (5' → 3')	Posizione	pb
ENV outF	CGGGGAGGGGACACAAATGG	785-804	1775
ENV outR	AGGCATAGTTGTCATACC	2543-2560	



Per il secondo step si sono amplificati quattro diversi frammenti del gene E con il kit Ready-to-go PCR Beads (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, UK), usando i seguenti primer (10 pmol/ μ L) e profilo termico [Haglund et al., 2003]:

Frammento	Primer	Sequenza (5' → 3')	pb
1	F-B1	CTTGCCCTGGCAATGGTTA	417
	R-B2	CTACCCCTTCCAAACAGTCC	
2	F-B3	TGCCCCAACAATGGGACCAGC	465
	R-B4	GTTCCAGTTTTGCGCTCCCT	
3	F-B5	CTTGCCCCAGACCGTCATCCTT	447
	R-B6	ATCCATGTGCCACTGCCCTG	
4	F-B7	CTGCGAAGTGGGACTGGAAAACTG	625
	R-B8	TCGCCACAGCGGAGCTCCAT	



b) Purificazione della PCR

I prodotti di amplificazione ottenuti seguendo i protocolli precedentemente descritti, sono stati purificati con il kit Microcon centrifugal filter Devices (MILLIPORE) con il seguente protocollo:

1. in ciascuna provetta da 1.5 mL è stata inserito una colonna con filtro fornito dal kit e 460 μ L di H₂O;
2. sono stati aggiunti 40 μ L di prodotto di PCR;
3. le provette sono state centrifugate a 14000 rcf per 10 minuti;
4. al termine, ogni colonnina con filtro è stata capovolta in una nuova provetta contenente 20 μ L di H₂O;
5. le provette sono state centrifugate a 1000 rcf per 2 minuti;
6. al termine, ogni filtro è stato eliminato e il purificato è stato utilizzato per gli step successivi.

I purificati presenti nell'eluato sono stati diluiti in modo opportuno a seconda dell'intensità della banda visualizzata nell'elettroforesi e processati per la marcatura.

c) PCR di marcatura

Nella marcatura sono stati impiegati gli stessi primer utilizzati nell'amplificazione genica, diluiti ad una concentrazione di 3.2 pmol/ μ L.

d) Purificazione della marcatura

I prodotti di marcatura sono stati purificati utilizzando il kit BigDye®X-Terminator™ (Applied Biosystems), che consiste in due soluzioni:

- * X-terminator™ solution, in grado di rimuovere i terminatori (ddNTPs) non incorporati evitando la formazione di dye blobs e di catturare sali e altre molecole che potrebbero andare ad interferire nella corretta interpretazione dei segnali fluorescenti durante il sequenziamento automatizzato;
- * SAM™ solution, contiene un detergente che favorisce l'azione della prima soluzione.

I campioni sono stati posti in agitazione per 30 minuti, a temperatura ambiente, e successivamente centrifugati per 1 minuto, per favorire la precipitazione della resina sul fondo della provetta.

e) Sequenziamento capillare, assemblaggio ed editing

Le sequenze dei campioni sono state caricate nel sequenziatore automatico ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (*Applied Biosystem*) a 4 capillari, analizzate utilizzando il software SeqAnalysis ed assemblate con Sequencher v4.5 (*Gene Codes Corporation*).

Le sequenze assemblate e sottoposte ad editing venivano quindi convertite in un file di testo, formato FASTA, per poter essere analizzate nel programma BLAST disponibile online (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e successivamente confrontate con quelle presenti in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

3.1.7. ANALISI FILOGENETICA

L'analisi filogenetica permette di seguire l'evoluzione di organismi che mutano rapidamente, come i virus, poiché consente di confrontare specifiche sequenze genomiche o proteiche appartenenti a specie diverse. Grazie a tale analisi, è possibile definire i rapporti evolutivi e stabilire se esiste un antenato comune. L'analisi filogenetica è stata eseguita con il software Mega 6 che utilizza l'algoritmo ClustalX per l'allineamento multiplo e il metodo Neighbor-Joining per la costruzione degli alberi filogenetici.

3.1.8. COLTURE CELLULARI

I campioni positivi con una carica virale adeguata (>100 cp/ μ L) sono stati sottoposti alla ricerca del virus mediante isolamento su colture cellulari. L'isolamento del TBEV è stato condotto in laboratorio di sicurezza BSL-3 con un protocollo messo a punto dall'UCO Igiene che utilizza la linea cellulare Vero clone E6, suscettibile agli Arbovirus, derivata da cellule di rene di scimmia verde africana (African green monkey kidney).

Per l'isolamento del TBEV si sono seguiti i seguenti passaggi:

- allestimento della linea cellulare;
- semina dei campioni positivi;
- estrazione degli acidi nucleici da surnatante;
- analisi molecolari;
- sequenziamento.

Allestimento della linea cellulare

Per effettuare l'isolamento virale si è adoperata la linea cellulare Vero clone E6, suscettibile agli Arbovirus, con morfologia simile ai fibroblasti e cariotipo 2n.

Le Vero E6 sono state coltivate in terreno di crescita Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM, SIGMA-Aldrich), arricchito con 10% di siero fetale bovino (FCS, SIGMA-Aldrich) e soluzione di L-Glutamina 200 mM (SIGMA-Aldrich). Lo stesso terreno con una

ridotta concentrazione di FCS (2%) e l'aggiunta di soluzione antibiotica e antimicotica 100X (SIGMA-Aldrich) all'1%, è stato impiegato come mezzo di mantenimento.

Semina dei campioni positivi e successive analisi

Per effettuare l'isolamento virale si è utilizzata la seconda aliquota di 300 µL conservata a -80°C e mai scongelata:

- 200 µL di omogenato sono stati incubati con una miscela di antibiotici/antimicotici (Antibiotic Antimycotic Solution; Gentamicin Solution, SIGMA-Aldrich) per evitare contaminazioni da batteri e miceti. Successivamente i campioni sono stati seminati su Trac Bottles con Vero E6, centrifugati per 1 ora a 1500g (rcf) ed incubati a 37°C in atmosfera di CO₂ al 5%.
- 100 µL di omogenato sono stati messi in estrazione seguendo il protocollo già descritto (paragrafo 3.1.3) per verificare la presenza del virus.

Le cellule inoculate sono state quotidianamente osservate al microscopio per la ricerca dell'effetto citopatico (CPE), tipico dell'infezione da TBE virus, che consiste nella formazione di sincizi e cellule giganti multinucleate.

I surnatanti delle colture, prelevati dopo 3, 6, 10, 20 e 28 giorni, sono stati analizzati per la ricerca del genoma virale mediante amplificazione genica in tempo reale per 3'NCR ed env, previa estrazione degli acidi nucleici mediante estrazione semi-automatica (da 200 µL in 110 µL). I surnatanti positivi alla real-time RT-PCR sono stati sottoposti ad analisi genica per la regione NS4/5 e gene E e successivamente sequenziati con i protocolli precedentemente descritti.

3.1.9. ANALISI STATISTICA

La prevalenza di TBEV nei pool di zecche è stata calcolata utilizzando EpiTools epidemiological calculators della AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease [<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=home>].

3.2. IDENTIFICAZIONE DEL TBEV IN CAMPIONI UMANI

Sono stati raccolti campioni biologici di siero, sangue intero, liquido cerebrospinale (CSF) ed urine di soggetti con sintomatologia neurologica.

I campioni sono stati estratti con lo strumento NucliSENS® easyMAG® (Biomerieux). I campioni di sangue (100 µL) sono stati pre-lisati con 900 µL dello stesso tampone di lisi impiegato dallo strumento ed eluiti in volume finale di 50 µL; i campioni di CSF sono stati eluiti in 110 µL partendo da un volume di 500 µL, mentre i campioni di urine sono stati estratti in 50 µL partendo da un volume di 500 µL.

Sangue, liquor ed urine sono invece stati analizzati con tecniche molecolari: due real-time RT-PCR dirette alla regione 3'NCR e al gene E con lo strumento LC480 II (Roche Italia, Monza, Italia).

I campioni positivi sono stati inoltre sequenziati ed isolati su colture cellulari di Vero E6. Nel siero e nel CSF si sono cercati anticorpi IgM e IgG specifici mediante test ELISA. Le letture dell'assorbanza sono state eseguite con lo strumento GloMax® (Promega, Italia).

3.2.1. DIAGNOSI SIEROLOGICA

Ricerca di anticorpi IgM ed IgG nel siero

La rilevazione qualitativa/quantitativa degli anticorpi IgG ed IgM specifici contro il virus TBE nel siero o nel plasma umani è stata condotta con il kit Enzygnost® Anti-TBE Virus (Siemens) seguendo le indicazioni fornite dalla ditta.

Dopo aver calcolato il cut-off aggiungendo 0.200 al valore dell'assorbanza del riferimento N/N (controllo negativo), si sono confrontati i valori di assorbanza dei vari campioni: se l'assorbanza superava il valore dato da cut-off + 0.100 i campioni sono stati considerati positivi; sono poi stati calcolati gli indici: se l'indice superava il valore 1.4 allora il campione era positivo.

Ricerca di anticorpi IgM nel CSF

Le indagini condotte sul liquido cerebrospinale (CSF) hanno un valore diagnostico decisivo nei processi infiammatori acuti o cronici del sistema nervoso centrale: infatti, in presenza di un'infezione del sistema nervoso centrale, gli anticorpi patogeno-specifici si accumulano nel CSF. Per la rilevazione quantitativa di anticorpi IgM nel CSF di pazienti con TBE si è utilizzato un test immunoenzimatico (ELISA) con il kit commerciale CSF: Anti-TBE Virus ELISA (EUROIMMUN), specifico per IgM, seguendo il protocollo

fornito dalla ditta.

Test di avidità

L'avidità di un anticorpo nei confronti di un antigene esprime la capacità che ha l'anticorpo stesso di formare legami stabili con l'antigene. Il sistema immunitario reagisce all'infezione formando prima anticorpi a bassa-avidità, col perdurare dell'infezione le IgG si adattano all'antigene e l'avidità aumenta.

Per determinare l'avidità degli anticorpi anti TBE Virus (IgG) è stato utilizzato il test ELISA, AVIDITY determination of antibodies against TBE Virus ELISA (IgG) della ditta EUROIMMUN, seguendo il protocollo allegato.

L'avidità delle IgG con test ELISA si ottiene confrontando le densità ottiche ottenute con e senza lavaggio del campione con soluzioni dissocianti di urea. La presenza di anticorpi a bassa avidità viene quindi dimostrata se la densità ottica è ridotta dal trattamento con urea. L'indice relativo di avidità (RAI) viene calcolato ed espresso in percentuale usando i valori con e senza trattamento con urea, con la seguente formula:

$$\text{RAI} = \text{Valore con trattamento urea} * 100 / \text{Valore senza trattamento urea}$$

Se l'indice RAI è minore del 40%, significa che gli anticorpi sono a bassa avidità e coincide con un'infezione acquisita negli ultimi due-tre mesi; se è compreso tra il 40 e 60% il risultato è dubbio; se è maggiore del 60%, gli anticorpi hanno invece alta avidità e quindi l'infezione è in uno stato tardivo.

3.2.2. DIAGNOSI MOLECOLARE

Per la ricerca dell'RNA del TBEV nei campioni clinici si è adoperata una real-time RT-PCR diretta alla regione 3'NCR e una real-time RT-PCR di conferma diretta al gene E. Entrambe le metodiche sono state precedentemente descritte al paragrafo 3.1.3.

3.2.3. GENOTIPIZZAZIONE DEI CAMPIONI POSITIVI

Il TBEV è stato sequenziato per una regione del gene env e una di NS4/5. I protocolli sono stati illustrati al paragrafo 3.1.6.

3.2.4. ISOLAMENTO VIRALE

Si è inoltre isolato il virus su colture cellulari di Vero E6 e la carica virale è stata monitorata in Real-Time RT-PCR.

Dopo aver preparato le trac bottles come già descritto (paragrafo 3.1.8), i campioni di urina sono stati trattati con la soluzione antibiotico/antimicotico 100X e aggiunti allo strato di cellule confluenti. Le provette sono state centrifugate a 3000 g per 60 minuti e incubate a 35°C per 1 ora. Dopo aver sostituito il terreno, le colture sono state lasciate incubare per una settimana a 35°C e giornalmente sono state osservate al microscopio per verificare l'effetto citopatico. I surnatanti sono stati prelevati e testati per la presenza del genoma virale mediante real-time RT-PCR per la regione 3'NCR, previa estrazione degli acidi nucleici.

3.2.5. TEST DI RIDUZIONE DI NEUTRALIZZAZIONE DELLE PLACCHE

Per confermare le positività di TBEV si è utilizzata la metodica delle placche messa a punto durante il secondo anno di dottorato. Il test di neutralizzazione di riduzione delle placche (Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT) è utile per rilevare gli anticorpi neutralizzanti, incrementare la sensibilità e la specificità ovviando il problema della cross-reattività degli anticorpi tra i diversi Flavivirus. Precedentemente il TBEV è stato titolato mediante test delle placche. Il ceppo utilizzato appartiene al sottotipo europeo, isolato da un pool di zecche raccolte a Raccolana durante la stagione 2011 (TP165/2011).

Titolazione virale

Il ceppo scelto per la metodica PRNT è stato messo in coltura. I surnatanti sono stati prelevati ogni 3-4 giorni e sottoposti a real-time RT-PCR per verificare la positività e la concentrazione. Raggiunta una carica virale elevata, i surnatanti sono stati raccolti e stoccati in crio vials e conservati a -80°C; si sono piastrate le cellule VERO in una 12 well-plate. Il giorno successivo un'aliquota di surnatante è stata scongelata e si è poi passati ad eseguire la metodica delle placche per la titolazione virale secondo il seguente protocollo:

1. sono state preparate diluizioni 10-fold col virus in DMEM w/o FBS (100 µL di virus + 900 µL di DMEM);
2. dopo aver rimosso il terreno dalle cellule, sono stati aggiunti in doppio 200 µL di diluizione (partendo da 1E-03); è stato messo anche un controllo negativo (solo terreno DMEM). Le piastre sono state incubate 1h a 37°C e al 5% di CO₂;

3. dopo aver rimosso il terreno, sono stati aggiunti 1 mL di 6%CMC/DMEM4%FBS; si sono incubate le piastre a 37°C e al 5% di CO₂ per 5 giorni fino alla formazione delle placche,;
4. dopo 5 giorni sono stati aggiunti 1 mL di PBS per diluire CMC (1:1);
5. dopo aver aspirato, si è aggiunta 1 mL di colorante crystal violetto e si sono lasciate incubare le piastre per 30' a TA;
6. sono stati effettuati vari lavaggi con H₂O (almeno 3) finché le placche non erano ben visibili;
7. una volta asciugate le piastre, si è infine passati a determinare il titolo del virus contando il numero di placche prodotte da ogni diluizione.

Test PRNT

Si sono piastrate le cellule VERO in una 12 well-plate. Prima di procedere, i sieri sono stati inattivati, per bloccare l'attività del complemento; questo processo è stato eseguito riscaldando per 30 minuti il siero alla temperatura di 56°C. Il protocollo ha previsto poi i seguenti passaggi:

1. si sono diluiti i sieri utilizzando come il terreno DMEM w/o FBS (diluizioni 1:5, 1:10 e 1:40);
2. ad ogni diluizione è stata aggiunta la stessa quantità di virus (ceppo aliquotato e conservato a -80°C); il virus è stato aggiunto anche ad una quantità di DMEM come controllo; le diluizioni siero-virus e il controllo DMEM-virus sono stati lasciati incubare 1-2 h a 37°C;
3. dopo aver rimosso il terreno dalle cellule, sono stati inoculati 200 µL delle diluizioni siero-virus e del controllo DMEM-virus (in doppio); le piastre sono state incubate 1-2 h a 37°C e al 5% di CO₂;
4. dopo aver rimosso il terreno, sono stati aggiunti 1 mL di 6%CMC/DMEM4%FBS; si sono incubate le piastre per 5 giorni a 37°C e al 5% di CO₂ fino alla formazione delle placche;
5. trascorsi i 5 giorni, sono stati aggiunti 1 mL di PBS per diluire CMC (1:1);
6. dopo aver aspirato, si è aggiunto 1mL di colorante crystal violetto e si sono lasciate incubare le piastre per 30' a TA;
7. sono stati effettuati vari lavaggi con H₂O (almeno 3) finché le placche non erano ben visibili;
8. una volta asciugate le piastre, si è infine passati a determinare il valore di riduzione

di neutralizzazione delle placche.

L'attività neutralizzante del siero è stata determinata dalla sua abilità di ridurre il numero di placche virali rispetto a quelle contate nel pozzetto con il controllo con virus-diluent.

3.2.6. CENTRIFUGAZIONE IN GRADIENTE DI DENSITÀ

I campioni di sangue-EDTA sono stati centrifugati in gradiente di densità mediante Ficoll per verificare in quale frazione cellulare era presente il TBE virus.

I campioni sono stati trattati con 6%Dextrano (1:5) e lasciati sedimentare per 20 minuti a temperatura ambiente. Sono stati centrifugati (400 g per 5 minuti a 6°C) e lavati prima in cloruro di ammonio allo 0.9% per l'emolisi degli eritrociti, successivamente con PBS (phosphate buffered saline). Si sono prelevate le cellule polimorfo nucleate (PMNC). A 5 mL di sangue-EDTA si sono aggiunti 10 mL di Lymphoprep® e si è centrifugato a 400 g per 30 minuti. Dalla stratificazione si sono così ottenute le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) che sono state raccolte e lavate con PBS. Dopo la centrifuga e la rimozione della frazione di PBMC, dal pellet si sono poi ottenuti i globuli rossi (RBC). Lo strato superficiale è stato eliminato e gli RBC, sul fondo della provetta, sono stati raccolti e diluiti 1:2 con PBS.

A questo punto 100 µL di ogni popolazione cellulare sono stati sottoposti ad estrazione degli acidi nucleici (con estrattore automatico) e successivamente analizzata in real-time RT-PCR diretta alla regione 3'NCR del TBEV.

3.3. IDENTIFICAZIONE DEL WEST NILE VIRUS

Sono stati raccolti campioni biologici di siero, sangue intero, liquido cerebrospinale ed urine di soggetti con sintomatologia neurologica.

I campioni sono stati estratti con lo strumento NucliSENS® easyMAG® (Biomerieux). I campioni di sangue (100 µL) sono stati pre-lisati con 900 µL dello stesso tampone di lisi impiegato dallo strumento ed eluiti in volume di finale di 50 µL; i campioni di CSF sono stati eluiti in 110 µL partendo da un volume di 500 µL, mentre i campioni di urine sono stati estratti in 50 µL partendo da un volume di 500 µL.

Sangue, liquor ed urine sono invece stati analizzati con tecniche molecolari con lo strumento LC480 II (Roche Italia, Monza, Italia).

I campioni positivi sono stati inoltre sequenziati ed isolati su colture cellulari di Vero E6.

Nel siero e nel CSF si sono cercati anticorpi IgM e IgG specifici mediante test ELISA. Le letture dell'assorbanza sono state eseguite con lo strumento GloMax® (Promega, Italia).

3.3.1. DIAGNOSI SIEROLOGICA

Ricerca di anticorpi IgM ed IgG nel siero

Per la ricerca degli anticorpi di classe IgM è stato utilizzato il kit WN-IgM (FOCUS Diagnostic, DxSelecttm) e per quella degli anticorpi di classe IgG il kit WN-IgG (FOCUS Diagnostic, DxSelecttm). Si sono seguiti i protocolli forniti dalla ditta.

Per calcolare i valori, è stata divisa la densità ottica rilevata del campione per la media dei valori di assorbanza del cut-off (indice). I campioni sono considerati positivi per un indice di IgM maggiore di 1.10 e di 1.50 per le IgG.

Da settembre 2015, la diagnosi sierologica è stata effettuata con il kit Anti-WNV ELISA IgG/IgM (EUROIMMUN), per ottimizzare i tempi di esecuzione del test. Per valutare la sensibilità del nuovo kit si sono testati alcuni campioni già analizzati in precedenza per garantire la riproducibilità delle analisi. I valori ottenuti sono risultati sovrapponibili.

I nuovi parametri per valutare la positività dei campioni variano in base alla classe di anticorpo esaminata: l'assorbanza delle IgM del controllo o dei campioni è stata divisa per l'assorbanza del calibratore (utilizzato come cut-off); per le IgG, come cut-off si è utilizzato il calibratore 2. In entrambi i casi, l'indice maggiore di 1.10 indica positività.

Test di avidità

I campioni in cui si sono riscontrate le IgG positive sono stati poi sottoposti al test di avidità, per stabilire se l'infezione era più o meno recente. Il kit utilizzato è AVIDITY determination of antibodies against WN Virus ELISA (EUROIMMUN), seguendo il protocollo fornito dalla ditta. I valori dell'indice RAI si calcolano come per il kit del TBE.

3.3.2. DIAGNOSI MOLECOLARE

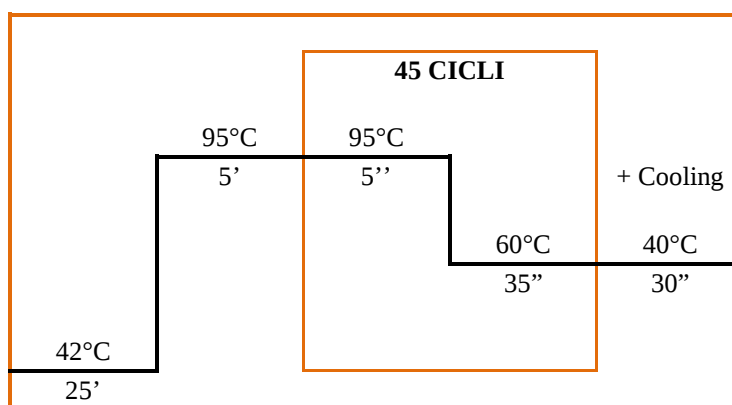
Per la ricerca del WNV si sono utilizzate una real-time RT-PCR home made, specifica per i Lineage 1 e 2, e due kit commerciali in grado di rilevare e quantificare l'RNA. Si tratta di saggi molto sensibili e specifici che consentono di riscontrare tutti i vari Lineage del WNV circolanti in Italia e nelle zone limitrofe. La riproducibilità dei risultati ottenuti dalle varie

metodiche è stata verificata testando i pannelli per proficiency test QCMD 2011-2013-2014-2015 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito). Ogni 1-2 anni, infatti, vengono inviati presso il nostro laboratorio controlli di qualità, denominati Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD), per il miglioramento della qualità della diagnostica molecolare.

Real-time RT-PCR home made

La presenza del WNV è stata rilevata mediante real-time RT-PCR diretta ad una zona altamente conservata del genoma del WNV del Lineage 1 e 2, in prossimità della regione 5' NCR e del gene della proteina C. È stato usato il kit Kapa Probe Fast Universal One-step qRT-PCR kit (Kapa Biosystems, Inc. Wilmington, MA), seguendo le indicazioni di Linke et al. (2007). Primer, sonda TaqMan e profilo termico vengono riportati qui di seguito:

	Primer/TaqMan probe (5' → 3')	Posizione	pb
ProC-F	CCTGTGTGAGCTGACAAACTTAGT	10-33	
ProC-R	GCGTTTTAGCATATTGACAGCC	132-153	144
ProC-Probe	6FAM-CCTGGTTTCTTAGACATCGAGATCT-TAMRA	89-113	

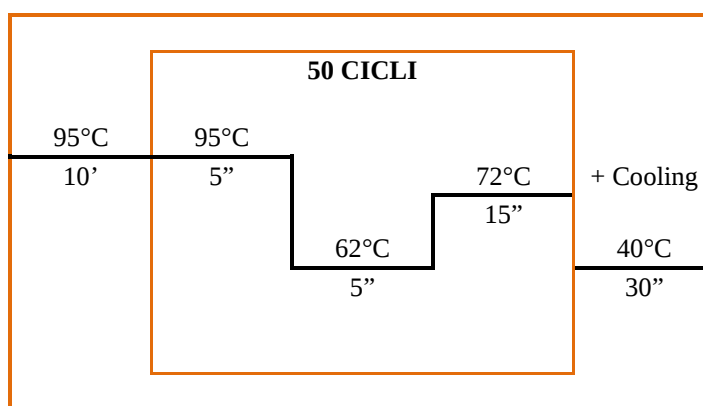


Real-time con kit commerciale LightMix® Kit West Nile Virus (Roche)

La retrotrascrizione è stata eseguita con il kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche) seguendo le indicazioni fornite dalla ditta.

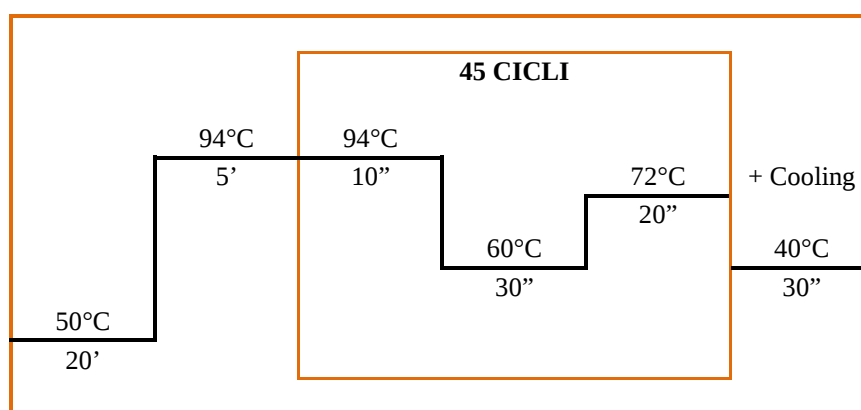
La real-time PCR è stata eseguita amplificando un frammento di 111 pb del gene NS5 del genoma del WNV con il kit commerciale LightMix® Kit West Nile Virus (Roche), seguendo le indicazioni fornite dalla ditta. Il kit prevedeva anche una reazione di controllo e quattro standard a concentrazione nota per permettere la quantificazione.

Il profilo termico viene riportato qui di seguito:



Real-time con kit commerciale ELITE MGB® (ELITechGroup)

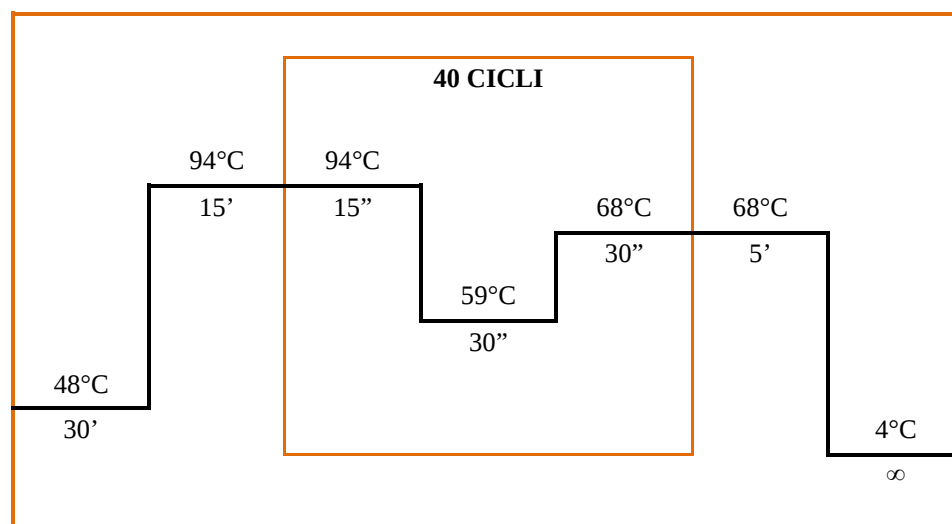
Da luglio 2015 è stato sostituito il kit commerciale in uso con il kit West Nile Virus ELITE MGB® (ELITechGroup). Questo cambiamento è stato effettuato per ottimizzare i tempi di esecuzione del test e minimizzare le contaminazioni. La riproducibilità delle metodiche è stata garantita testando i controlli QCMD come già descritto sopra. Anche questo test amplifica una regione del gene NS5 del genoma del WNV e utilizza quattro standard a concentrazione nota per permettere la quantificazione. Sono state seguite le indicazioni fornite dalla ditta sia per la preparazione dei reagenti che per il profilo termico sotto indicato.



3.3.3. GENOTIPIZZAZIONE DEI CAMPIONI POSITIVI

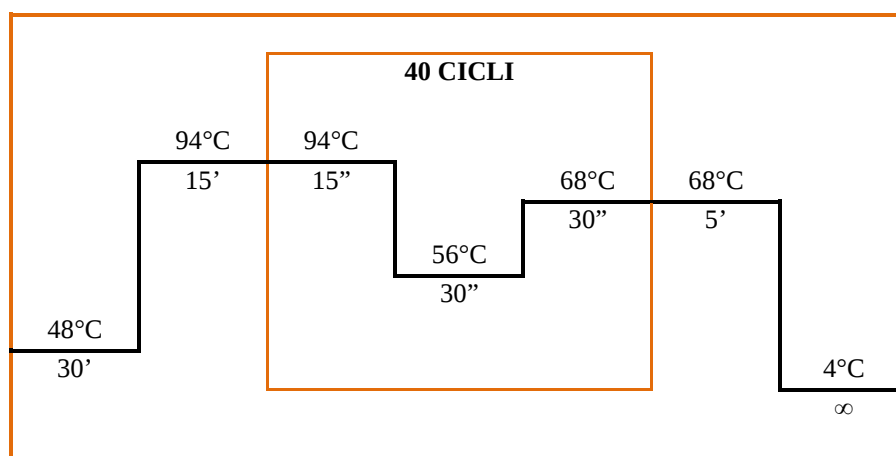
La caratterizzazione molecolare è stata ottimizzata a partire da lavori presenti in letteratura [Vinayagamoorthy et al., 2005]. È stata amplificata una regione di 250 pb della proteina C del Capside (Anchored Core Protein) con il kit SuperScript III One-Step RT-PCR system with Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen). I primer (10 pmol/μL) e il profilo termico utilizzati sono i seguenti:

	Primer (5' → 3')	Posizione	pb
WNV1F	GCCGGGCTGTCAATATGCTAAAA	10-33	250
WNV1R	GCACTGGTCAAGGTCCCTAGTTC	132-153	



La regione di amplificazione è stata poi ampliata a 513 pb (arrivando a coprire anche una porzione del gene E) utilizzando una nuova combinazione di primer [Lanciotti et al., 2002; Vinayagamoorthy et al., 2005]. Si è utilizzato il kit SuperScript III One-Step RT-PCR system with Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen). I primer (10 pmol/μL) e il profilo termico utilizzati sono i seguenti:

	Primer (5' → 3')	Posizione	pb
WNV1F	GCCGGGCTGTCAATATGCTAAAA	10-33	513
WNV640R	CAGCCGACAGCACTGGACATTCATA	615-640	



Per il sequenziamento e l'analisi filogenetica si è proceduto come già descritto al paragrafo 3.1.6.

3.3.4. ISOLAMENTO VIRALE

L'isolamento virale su campioni di urina è stato eseguito in maniera analoga a quello del TBEV (paragrafo 3.2.4.).

3.3.5. TEST DI RIDUZIONE DI NEUTRALIZZAZIONE DELLE PLACCHE

Per confermare le positività di WNV, si è utilizzata la metodica delle placche messa a punto durante il secondo anno di dottorato; si è titolato il virus mediante test delle placche. Il ceppo utilizzato appartiene al Lineage 1. Il protocollo osservato è analogo a quello per il test PRNT per il TBEV (descritto al paragrafo 3.2.5.); l'unica variante è il tempo di incubazione per la formazione delle placche: il WNV impiega solo 3 giorni, mentre il TBEV, come abbiamo visto, 5 giorni.

3.4. IDENTIFICAZIONE DEL DENGUE VIRUS

Sono stati raccolti campioni biologici di siero e sangue di soggetti con sintomatologia febrile rientrati da aree endemiche per Dengue virus.

100 µL di sangue-EDTA o di siero sono stati estratti con l'estrattore automatico, dopo trattamento con tampone di lisi ed eluiti in volume di finale di 50 µL. L'indagine molecolare è stata eseguita con lo strumento LC480 II (Roche Italia, Monza, Italia).

I campioni positivi sono stati genotipizzati.

Gli anticorpi specifici sono stati ricercati su siero mediante immunofluorescenza indiretta.

3.4.1. DIAGNOSI SIEROLOGICA

La determinazione degli anticorpi nel siero o nel plasma umano è stata eseguita mediante immunofluorescenza indiretta con il kit Mosaico: Dengue virus tipo 1-4 (EUROIMMUN), seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Questo kit fornisce dei vetrini commerciali a mosaico che permettono di rilevare gli anticorpi diretti contro tutti e quattro i sierotipi del DENV. Nei casi di positività si è osservato un pattern di fluorescenza nell'area del

citoplasma delle cellule infettate.

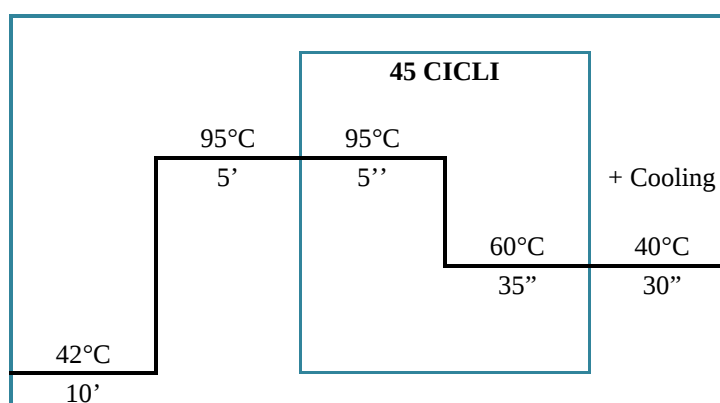
I quattro diversi sierotipi del DENV sono morfologicamente e immunologicamente simili, pertanto sono prevedibili eventuali cross-reazioni. Tuttavia, si può distinguere i sierotipi comparando i diversi titoli anticorpali.

3.4.2. DIAGNOSI MOLECOLARE

L'analisi per la presenza dell'RNA del Dengue virus nei campioni clinici di sangue intero e/siero è stata eseguita mediante real-time RT-PCR, con il kit Kapa Probe Fast Universal One-step qRT-PCR kit (Kapa Biosystems, Inc. Wilmington, MA).

A seconda del sierotipo, sono state usate diverse coppie di primer della regione 3' NCR: una per i sierotipi da DENV1 a DENV-3) e una per DENV4 [Drosten et al., 2002; Azhar et al., 2010]. I primer (10 pmol/μL) e il profilo termico utilizzati sono i seguenti:

		Primer e TaqMan probe (5' → 3')	Posizione	pb
	DenS2	GGATAGACCAGAGATCCTGCTGT	10615-10636	
DENV1-3	DenAS1-3	CATTCCATTTTCTGGCGTTC	10675-10694	79
	DenP1-3	6FAM-CAGCATCATTCCAGGCACAG-TAMRA	10656-10675	
	DenS2	GGATAGACCAGAGATCCTGCTGT	10615-10636	
DENV4	DenAS4	CAATCCATCCATCTTGCGGCGCTC	10671-10694	83
	DenP4	6FAM-CAGCATCATTCCAGGCACAG-TAMRA	10656-10675	

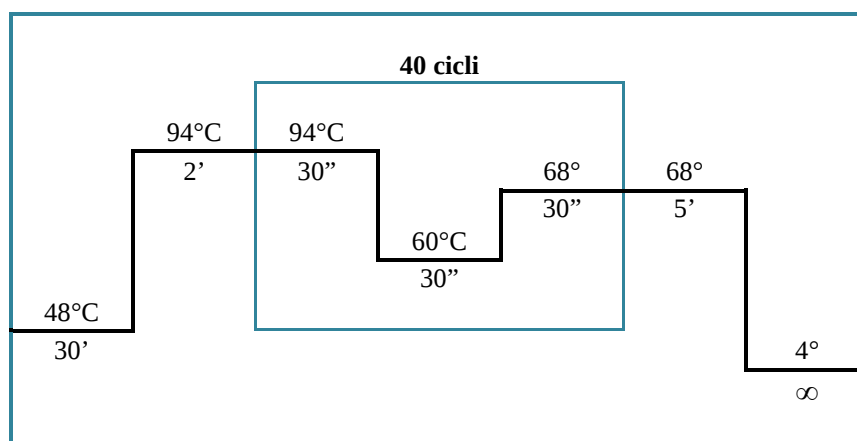


3.4.3. GENOTIPIZZAZIONE DEI CAMPIONI POSITIVI

Per determinare il sottotipo di DENV è stato amplificato un frammento di 511 pb del gene E [Lanciotti et al., 1992], con il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum Taq

System (Invitrogen - Life technologies). I primer (10 pmol/μL) e il profilo termico utilizzati sono i seguenti:

	Primer (5' → 3')	Posizione	pb
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	134-161	511
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	616-644	



Per il sequenziamento e la successiva analisi filogenetica si è proceduto come già descritto al paragrafo 3.1.6.

3.5. IDENTIFICAZIONE DEL CHIKUNGUNYA VIRUS

Sono stati raccolti campioni biologici di siero e sangue di soggetti con sintomatologia febrile rientrati da aree endemiche per Chikungunya virus.

100 μL di sangue-EDTA o di siero sono stati estratti con l'estrattore automatico, dopo trattamento con tampone di lisi ed eluiti in volume finale di 50 μL. L'indagine molecolare è stata eseguita con lo strumento LC480 II (Roche Italia, Monza, Italia).

Gli anticorpi specifici sono stati ricercati su siero mediante immunofluorescenza indiretta.

3.5.1. DIAGNOSI SIEROLOGICA

La determinazione degli anticorpi nel siero o nel plasma umano è stata eseguita mediante immunofluorescenza indiretta con il kit Anti-Chikungunya IFA (EUROIMMUN),

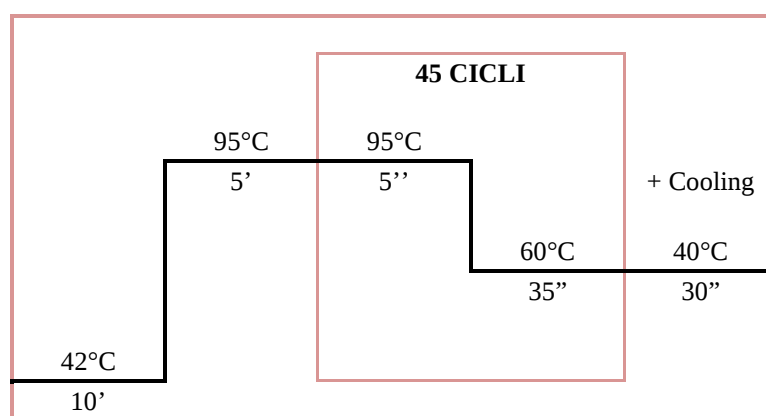
seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Nei casi di positività si è osservato un pattern di fluorescenza nell'area del citoplasma delle cellule infettate.

3.5.2. DIAGNOSI MOLECOLARE

L'analisi per la presenza dell'RNA del CHIKV nei campioni di sangue intero o siero è stata eseguita mediante real-time RT-PCR, con lo strumento LC480 II (Roche Italia, Monza, Italia) e con il kit Kapa Probe Fast Universal One-step qRT-PCR kit (Kapa Biosystems, Inc. Wilmington, MA).

Sono state utilizzate due coppie di primer: una per individuare una regione di 82 pb del gene nsp2 del genotipo universale, l'altra per identificare un frammento di 77 pb genotipo Indian Ocean, sempre del gene nsp2 [Panning et al., 2008]. I primer (10 pmol/μL) e il profilo termico utilizzati sono i seguenti:

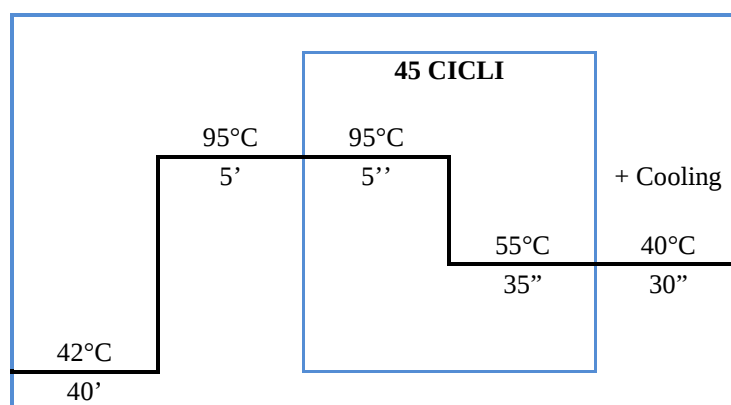
	Primer e TaqMan probe (5' → 3')	Posizione	pb
ChikSI	TGATCCCGACTCAACCATCCT	241-261	82
ChikASI	GGCAAACGCAGTGGTACTTCCT	323-302	
ChikP	6FAM-TCCGACATCATCCTCCTTGCTGGC-BHQ1	300-277	
ChikSII	CCGACTCAACCATCCTGGAT	246-265	77
ChikASII	GGCAGACGCAGTGGTACTTCCT	323-302	
ChikP	6FAM-TCCGACATCATCCTCCTTGCTGGC-BHQ1	300-277	



3.6. REAL-TIME RT-PCR PER ZIKA VIRUS

Sono stati fatti dei tentativi per l'ottimizzazione di una real-time RT-PCR per una regione di 76 pb del gene E dello Zika virus [Lanciotti et al., 2008]. Le analisi sono state condotte con lo strumento LC480 II (Roche Italia, Monza, Italia) e con il kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen - Life technologies). I primer (10 pmol/μL) e il profilo termico utilizzati sono i seguenti:

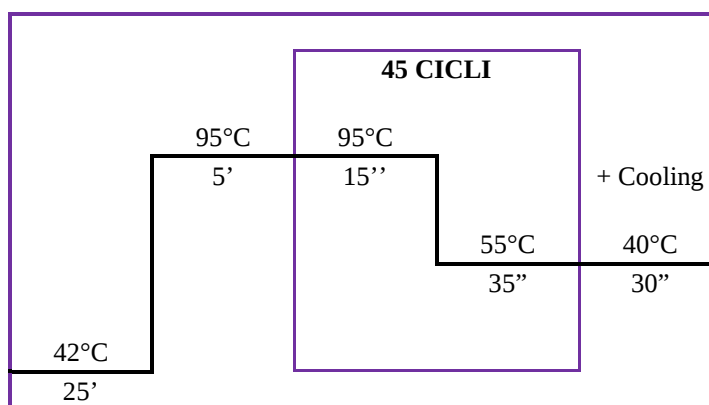
	Primer e TaqMan probe (5' → 3')	Posizione	pb
ZIKV 835	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	835-857	
ZIKV 911c	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC	911-890	76
ZIKV 860	6FAM-CGGCATAACAGCATCAGGTGCATAGGAG-TAMRA	860-886	



3.7. REAL-TIME RT-PCR FLAVIVIRUS UNIVERSALI (Pan-Flavi)

È stato messo a punto un protocollo di real-time RT-PCR per l'identificazione di Flavivirus emergenti (Pan-Flavi). Per questa metodica sono stati impiegati dei primer degenerati diretti ad una regione del gene NS5, la cui sequenza è altamente conservata tra i Flavivirus [Patel et al., 2013]. Le analisi mediante real-time RT-PCR sono state condotte con lo strumento LC480 II (Roche Italia, Monza, Italia). Il kit utilizzato è Kapa Probe Fast Universal One-step qRT-PCR kit (Kapa Biosystems, Inc. Wilmington, MA). I primer (10 pmol/μL) e il profilo termico utilizzati sono i seguenti:

	Primer e TaqMan probe (5' → 3')	Posizione
Flavi all S	TACAACATGATGGGGAARAGAGARAA	8993-9019
DEN4 F	TACAACATGATGGGAAAACGTGAGAA	8996-9019
Flavi all AS 1	GAYACMGCHGGNTGGGAC	9236-9253
	GATGAYACMGCTGGATGGGAC	9236-9256
Flavi all AS 2	GCWGATGACACMGCNNGCTGGGACAC	9232-9260
Flavi all probe 1	6FAM-AARGGHAGYMGNGCCATHTGGT-BHQ	9044-9065
Flavi all probe 2	6FAM-TGGTWYATGTGGYTNGGRGC-BHQ	9062-9082
	6FAM-TGGTWYATGTGGYTNGGRGC-BHQ	9062-9082
Flavi all probe 3 mix	6FAM-CCGTGCCATATGGTATATGTGGCTGGGAGC-BHQ	9052-9081
	6FAM-TTTCTGGAATTTGAAGCCCTGGGTTT-BHQ	9086-9012
Flavi all S2	TACAACATGATGGGMAAACGYGARAA	8996-9019
Flavi all AS 4	GAYGAYACMGCNNGCTGGGACAC	9235-9260



4. RISULTATI

4.1. IDENTIFICAZIONE DEL TBEV NEI VETTORI

In questo lavoro vengono presentati i risultati delle indagini finalizzate allo studio dell'epidemiologia del Tick-borne encephalitis virus nella regione Friuli Venezia Giulia durante gli anni 2011, 2012, 2013 e 2014. Lo studio della presenza di TBEV è stato valutato con la distribuzione geografica delle sedi di prelievo, con lo stadio maturativo della zecca e con il periodo in cui sono stati effettuati i campionamenti.

Le zecche sono state prelevate in 52 sedi di campionamento del Friuli Venezia Giulia (Tabella XX, paragrafo XX). Sulla base delle caratteristiche morfologiche, tutti gli esemplari raccolti sono stati classificati come *I. ricinus* dai ricercatori dell'Università di Udine. Inoltre, prima di procedere con le analisi molecolari per testare la presenza del genoma virale, per tutti i campioni è stata verificata l'efficienza dell'estrazione e la valutazione della presenza di potenziali inibitori della PCR. Tutti i campioni sono risultati positivi per la regione di 110 bp dell'RNA ribosomiale 16S di *Ixodes ricinus* e quindi ritenuti idonei per le successive indagini molecolari.

Stagioni 2011-2012

Complessivamente, per la stagione 2011 sono state raccolte ed analizzate 4628 zecche, di queste 4298 ninfe e 330 adulti (125 femmine e 169 maschi). Per semplificare le analisi le zecche sono state suddivise in pool considerato anche che, in uno studio precedente, la prevalenza di TBEV nelle zecche era risultata inferiore al 1%.

Nella tabella 9 vengono riportati il numero di pool analizzati per ogni area geoclimatica e i siti dove sono stati registrati il numero più alto e più basso di pool nell'area considerata. Come aree geoclimatiche le Prealpi Giulie, il Canal del Ferro e le Prealpi Carniche presentano i valori più elevati di zecche campionate rispettivamente con 287, 232 e 207 pool. Un numero relativamente elevato di pool è stato registrato anche nella Carnia Centro-orientale (123). Le aree in cui vi sono stati meno pool sono invece la Valcanale e il Carso Goriziano, con 14 e 17 pool rispettivamente. Nell'ambito di ciascuna area geoclimatica si è osservata un'elevata variabilità della numerosità del campione, particolarmente evidente nelle seguenti aree:

- * nella Carnia Centro-orientale varia da 2 pool a Ravascletto a 33 pool di Amaro;
- * nelle Prealpi Carniche varia da 27 pool a Clauzetto a 95 pool di Tramonti di Sopra;
- * nel Canal del Ferro varia da 38 a Pontebba a 110 di Roveredo.

AREA GEOCLIMATICA	N. Siti/area	Totale Pool	MINIMO		MASSIMO	
			N. Pool	Sito	N. Pool	Sito
Carnia Occidentale	2	27	7	Forni di Sopra	20	Forni di Sotto
Carnia Centro-orientale	10	123	2	Ravascletto	33	Amaro
Prealpi Carniche	5	207	27	Clauzetto	95	Tramonti di Sopra
Valcanale	4	14	2	Valbruna	5	Tarvisio
Canal del Ferro	3	232	38	Pontebba	110	Roveredo
Prealpi Giulie	6	287	24	Gemona del Friuli	84	Lusevera
Colline Moreniche	2	35	17	Pagnacco	18	Rive d'Arcano
Colline Eoceniche	5	87	11	Gorizia	26	Medea
Alta Pianura	3	47	4	Flaibano	35	Polcenigo
Bassa Pianura	3	43	7	Chions	22	Muzzana
Carso Goriziano	2	17	8	Redipuglia	9	Doberdò del Lago
Litorale	2	29	2	Grado	27	Lignano

Tabella 9. Distribuzione per area geoclimatica dei pool di zecche nella stagione 2011 con indicazioni del range e dei siti di raccolta.

Allo screening molecolare, mediante real-time RT-PCR (3'NCR) sono risultati positivi 6 pool di zecche del 2011. La positività dei campioni è stata confermata mediante una seconda real-time RT-PCR per il gene *env*. Tutti i sei pool positivi erano composti da ninfe, raccolte tra marzo e maggio 2011. Le sedi in cui si sono riscontrate le positività sono Bordano (1 pool), Pontebba (1 pool) e Raccolana (4 pool). Sono risultati positivi ulteriori 5 pool di zecche raccolte a Raccolana il 18 aprile e il 16 maggio ma queste positività non

sono state prese in considerazione perché presentavano una carica virale molto bassa con un threshold cycle, o ciclo soglia, maggiore a 35 (ct>35).

Di seguito, nella tabella 10, sono riassunti i pool positivi, la data del prelievo, la sede, lo stadio maturativo e i risultati delle due real-time RT-PCR con i relativi threshold cycle.

STAGIONE	POOL +	PRELIEVO	SEDE	STADIO	Real-Time NCR	Real-Time ENV
2011	165	16-mag-11	RACCOLANA	NINFA	Positivo ct=20	Positivo ct=20
	296	18-apr-11	RACCOLANA	NINFA	Positivo ct=25	Positivo ct=27
	299	18-apr-11	RACCOLANA	NINFA	Positivo ct=22	Positivo ct=22
	302	18-apr-11	RACCOLANA	NINFA	Positivo ct=35	Positivo ct=35
	364	22-mar-11	BORDANO	NINFA	Positivo ct=20	Positivo ct=21
	644	23-apr-11	PONTEBBA	NINFA	Positivo ct=24	Positivo ct=24

Tabella 10. Pool positivi della stagione 2011.

La prevalenza complessiva dell'infezione da TBE virus nel vettore è stata del 1.13% nel 2011 con un intervallo di confidenza 95% compreso tra 0.05 e 3.9% (Tabella 11). Le prevalenze riscontrate in ciascun sito risultano rispettivamente dello 0.9% a Pontebba (0.05-3.9%), dell'1.3% a Raccolana (0.42-3.07%) e dello 0.74% a Bordano (0.04-3.22%).

STAGIONE	SEDE	POSITIVI	CI 95% (%)		PREVALENZA (%)
2011	PONTEBBA	1	0.05	3.9	0.9
	RACCOLANA	4	0.42	3.07	1.3
	BORDANO	1	0.04	3.22	0.74
	TOTALE	6	0.45	2.27	1.13

Tabella 11. Prevalenze per la stagione 2011.

Per la stagione 2012 sono state testate 3849 zecche comprendenti 3577 ninfe e 272 adulti (109 femmine e 163 maschi). La numerosità del campione è inferiore a quella dell'anno precedente. Si sono ottenuti 838 pool, dei quali 566 erano costituiti da ninfe. Come già detto, gli adulti sono stati analizzati singolarmente, mentre le ninfe sono state raggruppate in pool da 2-10, fatta eccezione per una ninfa esaminata in singolo. Il numero dei pool risulta nettamente inferiore rispetto al numero di quelli del 2011 (1148 pool).

AREA GEOCLIMATICA	N. Siti/area	Totale Pool	MINIMO		MASSIMO	
			Pool	Sito	Pool	Sito
Carnia Occidentale	2	15	5	Forni di Sopra	10	Forni di Sotto
Carnia Centro-orientale	10	89	2	Ravascletto	22	Amaro
Prealpi Carniche	5	145	10	Bordano	47	Claut
Valcanale	4	11	2	Fusine, Tarvisio, Valbruna	5	San Leopoldo
Canal del Ferro	3	112	32	Raccolana, Roveredo	48	Pontebba
Prealpi Giulie	6	169	11	Gemona del Friuli	47	Pulfero
Colline Moreniche	2	60	20	Rive d'Arcano	40	Pagnacco
Colline Eoceniche	5	77	9	Gorizia, Tarcento	24	Buttrio
Alta Pianura	3	38	8	Flaibano	18	Martignacco
Bassa Pianura	3	56	8	Chions	34	Muzzana
Carso Goriziano	2	39	8	Doberdò del Lago	31	Redipuglia
Litorale	2	27	2	Grado	25	Lignano

Tabella 12. Distribuzione per area geoclimatica dei pool di zecche nella stagione 2012 con indicazioni del range e dei siti di raccolta.

Nella tabella 12 viene riportato il numero di pool analizzato per ogni area geoclimatica i siti dove sono stati registrati il numero più alto e più basso di pool nell'area considerata. Le aree geoclimatiche che presentano i valori più elevati di pool sono le Prealpi Giulie, le

Prealpi Carniche e il Canal del Ferro, rispettivamente con 169, 145 e 112 pool analizzati. Le aree in cui vi sono i numeri minori di pool sono la Valcanale e la Carnia Occidentale, con 11 e 15 pool rispettivamente. I siti in cui sono registrati meno pool sono Ravascletto appartenente alla Carnia Centro-orientale (2 pool), Fusine, Tarvisio e Valbruna dell'area geoclimatica della Valcanale (2 pool in ciascun sito) e Grado appartenente al Litorale (2 pool). Al contrario, siti che possiedono i pool più numerosi sono Pontebba appartenente al Canal del Ferro (48 pool), Claut dell'area delle Prealpi Carniche (47 pool) e Pulfero delle Prealpi Giulie (47 pool).

Allo screening molecolare mediante real-time RT-PCR 3 dei 838 pool analizzati sono risultati positivi per la regione 3'NCR del genoma del TBEV. Le tre positività sono state confermate mediante la real-time RT-PCR per il gene env. Il virus è stato identificato in 2 pool di ninfe di Tarvisio e Tramonti di Sopra, rispettivamente di maggio e ottobre 2012, e in un esemplare adulto di sesso maschile raccolto a Pontebba nel mese di maggio. Anche nel 2012 sono risultati positivi ulteriori 4 pool di zecche raccolte a Pontebba il 15 maggio, positività non prese in considerazione per la carica virale molto bassa ($ct > 35$).

Nella tabella 13 sono indicati i pool positivi per la stagione 2012, la data del prelievo, la sede, lo stadio maturativo e i risultati delle real-time RT-PCR con i relativi ct.

STAGIONE	POOL +	PRELIEVO	SEDE	STADIO	Real-Time NCR	Real-Time ENV
2012	458	15-mag-12	PONTEBBA	ADULTO (M)	Positivo ct=18	Positivo ct=19
	462	15-mag-12	TARVISIO	NINFA	Positivo ct=34	Positivo ct=35
	817	29-ott-12	TRAMONTI DI SOPRA	NINFA	Positivo ct=21	Positivo ct=20

Tabella 13. Pool positivi della stagione 2012.

Per la stagione 2012 la prevalenza complessiva dell'infezione da TBE virus nel vettore è stata dello 0.8%, valore inferiore di quello trovato nell'anno precedente (Tabella 14) e con un intervallo di confidenza 95% compreso tra 0.2 e 2.21%. Le prevalenze riscontrate nei singoli siti positivi sono risultate rispettivamente a Pontebba dello 0.5% (0.03-2.34%), a Tarvisio dell' 1% (0.06-4.43%) e a Tramonti di Sopra dello 0.4% (0.02-1.76%).

STAGIONE	SEDE	POSITIVI	CI 95%		PREVALENZA (%)
2012	PONTEBBA	1	0.03	2.34	0.5
	TARVISIO	1	0.06	4.43	1
	TRAMONTI DI SOPRA	1	0.02	1.76	0.4
	TOTALE	3	0.2	2.21	0.8

Tabella 14. Prevalenze per la stagione 2012.

Nella tabella 15 vengono riportate le principali caratteristiche dei campioni risultati positivi nel biennio 2011-12. Le cariche virali osservate sono, ad eccezione dei campioni FVG.Raccolana/T-302/2011 e FVG.Tarvisio/T-462/2012, molto elevate superando i valori di 1E+06.

Anno	Pool	Data prelievo	Sito	Stadio	Carica Virale	Isolamento virale
2011	FVG.Bordano/T-364/2011	22-mar	Bordano	Ninfa	1.49E+07	Si
	FVG.Raccolana/T-296/2011	18-apr	Raccolana	Ninfa	3.26E+06	Si
	FVG.Raccolana/T-299/2011	18-apr	Raccolana	Ninfa	1.19E+07	Si
	FVG.Raccolana/T-302/2011	18-apr	Raccolana	Ninfa	4.48E+03	No
	FVG.Pontebba/T-644/2011	23-apr	Pontebba	Ninfa	1.25E+08	Si
	FVG.Raccolana/T-165/2011	16-mag	Raccolana	Ninfa	1.01E+08	Si
2012	FVG.Pontebba/T-458/2012	15-mag	Pontebba	Adulto	1.94E+09	Si
	FVG.Tarvisio/T-462/2012	15-mag	Tarvisio	Ninfa	3.97E+02	No
	FVG.TramontiDiSopra/T-817/2012	31-ott	Tramonti di Sopra	Ninfa	1.75E+07	Si

Tabella 15. Caratteristiche dei campioni risultati positivi nel biennio 2011-2012.

È stato possibile isolare in colture cellulari 7 dei 9 campioni positivi: in particolare sono stati isolati 5 dei 6 campioni positivi del 2011 e 2 su 3 di quelli del 2012. Non è stato possibile isolare il virus dai campioni FVG.Raccolana/T-296/2011 e FVG.Tarvisio/T-462/2012 poiché entrambi aventi carica virale sensibilmente più bassa di quella dei

campioni che hanno consentito l'isolamento del TBE virus.

Per tutti i campioni è stato possibile ottenere la sequenza di 252 paia di basi del gene NS5 e successivamente estendere la regione alla zona di giunzione NS4/5, per consentire un'analisi filogenetica più approfondita. Tutti i campioni positivi inoltre sono stati sequenziati per la regione env e sottoposti ad analisi filogenetica.

Le sequenze dei ceppi sono state allineate con alcune sequenze depositate in GenBank rappresentative dei 3 sottotipi e con sequenze ottenute negli anni precedenti in uno studio condotto nella stessa area (mostrate in viola, [FVG.Sito/T cod/2007:Zecche 2007](#), Figura 48). Vengono mostrati in blu e in verde i ceppi da noi isolati dai vettori in questo studio per il biennio 2011 e 2012 ([FVG.Sito/T cod/2011:Zecche 2011](#), [FVG.Sito/T cod/2012:Zecche 2012](#)), mentre in rosso si possono notare le sequenze ottenute dai pazienti con TBE del 2012 e del 2013 e di uno del 2004 ([FVG.H-Iniziali cod/anno](#)).

L'analisi molecolare e lo studio filogenetico relativo al gene NS5 dei campioni 2011-2012 confermano la circolazione nell'area studiata di virus appartenenti al sottotipo europeo occidentale. Le differenze nucleotidiche riscontrate tra i diversi campioni escludono la possibilità di contaminazione di laboratorio. Le sequenze ottenute si raggruppano in cluster evolutivi differenti: il principale presenta un elevato grado di identità con il ceppo finlandese Isosaari; un altro gruppo comprende ceppi in parte riconducibili alla variante Hypr circolante nei paesi vicini, Slovenia e Austria; in particolare vi sono delle similitudini con il ceppo sloveno Cerkno H55. I campioni positivi degli anni precedenti (2005, 2006 e 2007) vengono invece raggruppati con il prototipo Neudoerfl, ceppo vaccinale.

Nell'albero filogenetico relativo al gene env (Figura 49) si possono distinguere in rosa ed in verde le sequenze ottenute nel biennio 2011-2012 ([FVG.Sito/Tcod/2011:Zecche2011](#), [FVG.Sito/Tcod/2012:Zecche2012](#)), in rosso quelle ottenute dai casi umani ([FVG.H-Iniziali cod/anno](#)), in viola invece quelle degli anni precedenti ([FVG.Sito/Tcod/2007:Zecche 2007](#)).

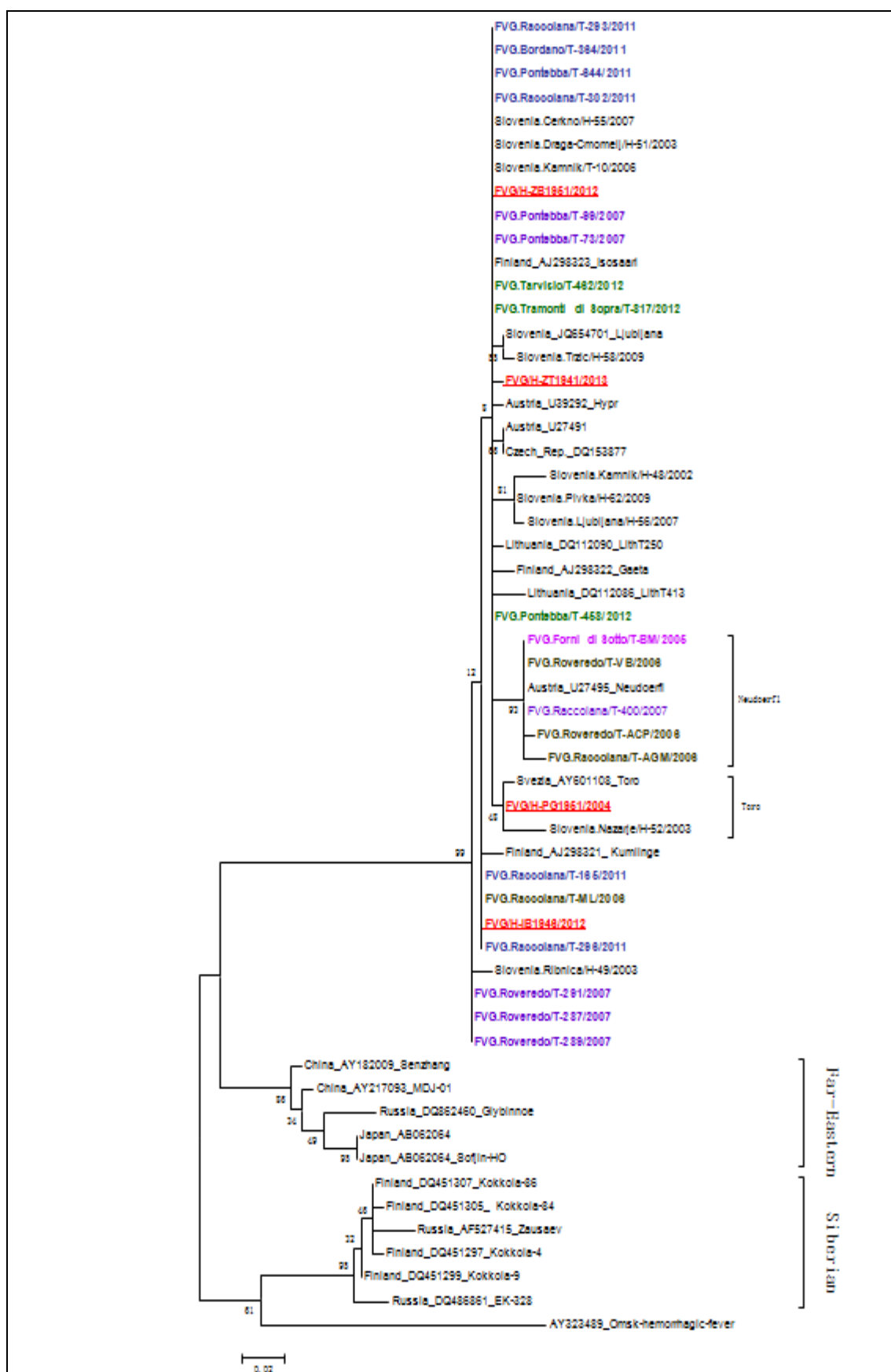


Figura 48. Albero filogenetico di una regione di 252 paia di basi nel gene NS5 dei campioni di zecche risultati positivi nel periodo di studio confrontate con i campioni di zecche positive delle stagioni precedenti, con campioni di pazienti positivi e con sequenze di riferimento dei tre sottotipi.

I ceppi ottenuti dai pool positivi del 2011 si raggruppano assieme ai ceppi ottenuti nella stessa area geoclimatica (Canal del Ferro) e a quelli identificati nella stessa area negli anni precedenti e hanno elevate omologie con ceppi sloveni (Slovenia.Trzic/H-58/2009 e JQ654701 Ljubljana) e con il ceppo tedesco EU872053/T1401/Germania. Il ceppo ottenuto dal campione del 2012 si raggruppa invece con un ceppo ceco, HM46819 Unterengstringen (CH), molto simile al ceppo da noi isolato da un campione umano del 2013 (FVG/H-ZT1941/2013).

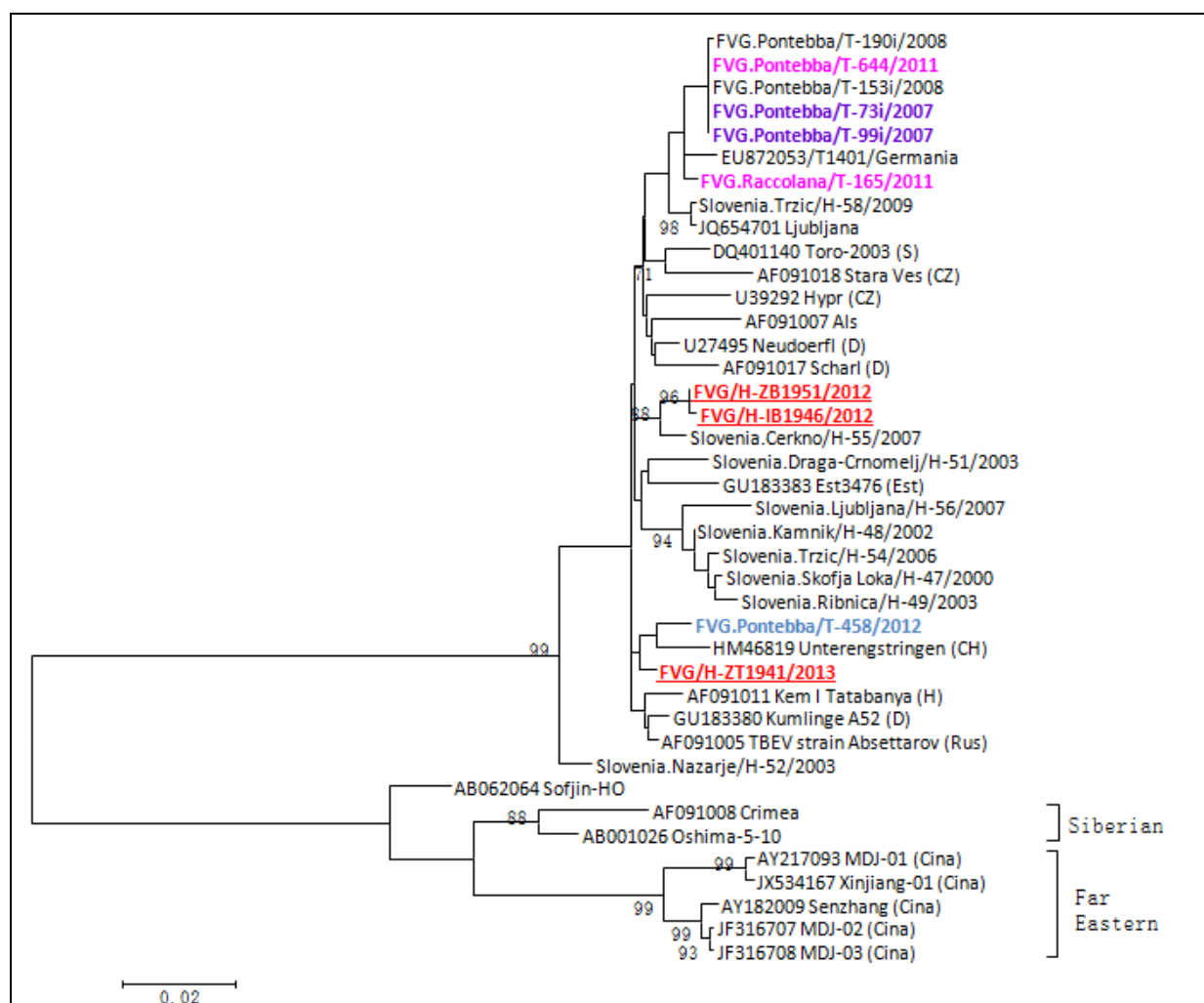


Figura 49. Albero filogenetico di una regione di 1322 paia di basi nel gene Env degli isolati virali da campioni di zecche delle stagioni 2011-2012; le sequenze vengono confrontate con campioni di pazienti con TBE e con sequenze di riferimento dei tre sottotipi.

Stagioni 2013-2014

Nel 2013-2014 è proseguita la ricerca del TBE virus nei vettori raccolti nel FVG, nelle stesse sedi di campionamento delle stagioni precedenti. Le zecche sono state sempre suddivise in pool ed omogenate. Per la ricerca del TBEV si è utilizzato lo stesso protocollo di screening delle stagioni precedenti mediante real-time RT-PCR diretta alla regione 3'NCR altamente conservata tra i diversi ceppi appartenenti al sottotipo europeo occidentale e a quello Far-Eastern. Per la conferma della positività è stata utilizzata una seconda real-time RT-PCR diretta ad una regione del gene E. Per la caratterizzazione molecolare sono state analizzate una regione parziale del gene codificante per la glicoproteina E dell'envelope ed una in corrispondenza alla giunzione tra i geni NS4 e NS5.

Complessivamente per la stagione 2013 sono state raccolte e analizzate 5097 zecche, di cui 4743 ninfe e 354 adulti (161 femmine e 193 maschi). Sono stati formati 701 pool, 347 costituiti da ninfe e i restanti 354 da adulti. Il numero di pool è risultato inferiore rispetto a quello delle stagioni precedenti, rispettivamente 1148 pool nel 2011 e 838 pool nel 2012.

Nella tabella 16 possiamo vedere il numero di pool analizzato per ogni area geoclimatica e i siti dove sono stati registrati il numero più alto e più basso di pool nell'area considerata. Come aree geoclimatiche le Prealpi Giulie, le Prealpi Carniche e il Carnia Centro-orientale presentano i valori più elevati di zecche campionate rispettivamente con 137, 124 e 108 pool. Le aree in cui vi sono stati meno pool sono invece la Carnia Occidentale e il Carso Goriziano, con 10 e 12 pool rispettivamente. Nell'ambito di ciascuna area geoclimatica si è osservata un'elevata variabilità della numerosità del campione, particolarmente evidente nelle seguenti aree:

- * nelle Prealpi Carniche varia da 2 pool di Trasaghis a 60 di Tramonti di Sopra;
- * nella Carnia Centro-orientale varia da 3 pool di Ovaro a 21 di Paluzza;
- * nelle Prealpi Giulie varia da 4 pool di Montenars a 55 di Lusevera.

AREA GEOCLIMATICA	N. Siti/area	Totale Pool	MINIMO		MASSIMO	
			Pool	Sito	Pool	Sito
Carnia Occidentale	2	10	2	Forni di Sotto	8	Forni di Sopra
Carnia Centro-orientale	10	108	3	Ovaro	21	Paluzza
Prealpi Carniche	5	124	2	Trasaghis	60	Tramonti di Sopra
Valcanale	4	7	1	Fusine, Valbruna	3	San Leopoldo
Canal del Ferro	3	50	4	Raccolana	38	Pontebba
Prealpi Giulie	6	137	4	Montenars	55	Lusevera
Colline Moreniche	2	37	17	Rive d'Arcano	20	Pagnacco
Colline Eoceniche	5	56	6	Gorizia	18	Buttrio
Alta Pianura	3	58	4	Flaibano	45	Martignacco
Bassa Pianura	3	52	9	Muzzana	21	Bertiolo
Carso Goriziano	2	12	5	Doberdò del Lago	7	Redipuglia
Litorale	2	50	3	Grado	47	Lignano

Tabella 16. Distribuzione per area geoclimatica dei pool di zecche nella stagione 2013 con indicazioni del range e dei siti di raccolta.

Allo screening molecolare sono risultati positivi 4 pool di zecche del 2013. I campioni risultati positivi sono stati confermati mediante una seconda real-time RT-PCR per il gene env. Le cariche virali sono state quantificate grazie alla creazione di una curva standard con un plasmide avente concentrazione nota. Anche per la stagione 2013 sono risultati positivi ulteriori quattro pool di zecche raccolte il 14 maggio ad Amaro, sette pool di zecche raccolte a Lusevera il 15 maggio e due pool di zecche raccolte a Pontebba il 18 maggio. Queste positività, come in precedenza, non sono però state prese in esame nell'elaborazione dei dati perché presentavano una carica virale molto bassa ($ct > 35$).

Tra i pool positivi 3 erano composti da ninfe e uno da un esemplare adulto di sesso femminile, tutti raccolti tra aprile e maggio 2013. Le sedi in cui si sono riscontrate le positività sono Tramonti di Sopra, Amaro, Lusevera e Pontebba (esemplare adulto).

La semina dei campioni in colture cellulari, non ha consentito l'isolamento del TBE nonostante le cariche virali fossero piuttosto elevate ($1.83E+09$, $3.44E+06$, $3.85E+07$ e $3.00E+07$ copie/ μ L). Di seguito sono riassunti nella tabella 17 i pool positivi, la data del prelievo, la sede, lo stadio maturativo e i risultati della real-time RT-PCR (3'NCR) con i relativi ct e concentrazioni (copie/ μ L):

STAGIONE	POOL +	PRELIEVO	SEDE	STADIO	real-time NCR	COPIE/ μ L
2013	9	26-apr	TRAMONTI DI SOPRA	NINFA	Positivo ct=19	1.83E+09
	214	14-mag	AMARO	NINFA	Positivo ct=21	3.44E+06
	282	15-mag	LUSEVERA	NINFA	Positivo ct=21	3.85E+07
	341	18-mag	PONTEBBA	ADULTO (F)	Positivo ct=20	3.00E+07

Tabella 17. Pool positivi della stagione 2013.

Per la stagione 2013 la prevalenza complessiva dell'infezione da TBE virus nel vettore è stata dello 0.13%, con un intervallo di confidenza 95% compreso tra 0.04 e 3.00%, valore inferiore di quello trovato nelle stagioni precedenti (Tabelle 11 e 14). Le prevalenze riscontrate nei singoli siti positivi sono risultate rispettivamente a Tramonti di Sopra dello 0.21% (0.01-0.93%), ad Amaro dello 0.82% (0.05-3.50%), a Lusevera dello 0.24% (0.01-1.03%) e a Pontebba del 2.94% (1.18-5.87%) (Tabella 18).

STAGIONE	SEDE	POSITIVI	CI 95%		PREVALENZA (%)
2013	TRAMONTI DI SOPRA	1	0.01	0.93	0.21
	AMARO	1	0.05	3.50	0.82
	LUSEVERA	1	0.01	1.03	0.24
	PONTEBBA	1	1.18	5.87	2.94
	TOTALE	4	0.04	3.00	0.13

Tabella 18. Prevalenze per la stagione 2013.

Complessivamente per la stagione 2014 sono stati analizzati 621 pool (255 composti da ninfe) corrispondenti a 2513 zecche, di queste 2149 ninfe e 366 adulti (149 femmine e 217 maschi).

Nella tabella 19 possiamo vedere il numero di pool analizzato per ogni area geoclimatica e il range con indicazione del sito dove è stato registrato il numero più alto e più basso di

pool nell'area considerata. Come aree geoclimatiche le Prealpi Giulie, il Canal del Ferro e le Prealpi Carniche presentano i valori più elevati di zecche campionate rispettivamente con 120, 114 e 103 pool. Le aree in cui vi sono stati meno pool sono invece il Carso Goriziano e il Litorale, con 9 e 18 pool rispettivamente.

AREA GEOCLIMATICA	N. Siti/area	Totale Pool	MINIMO		MASSIMO	
			Pool	Sito	Pool	Sito
Carnia Occidentale	2	22	7	Forni di Sopra	15	Forni di Sotto
Carnia Centro-orientale	10	64	4	Ampezzo, Paularo, Ravascletto	12	Imponzo
Prealpi Carniche	5	103	12	Bordano	30	Clauzetto
Valcanale	4	31	5	Fusine, Valbruna	15	Tavasio
Canal del Ferro	3	114	13	Pontebba	66	Raccolana
Prealpi Giulie	6	120	6	Gemona del Friuli	50	Lusevera
Colline Moreniche	2	23	7	Pagnacco	16	Rive d'Arcano
Colline Eoceniche	5	60	3	Cividale	28	Buttrio
Alta Pianura	3	27	6	Flaibano	14	Martignacco
Bassa Pianura	3	30	5	Chions	19	Muzzana
Carso Goriziano	2	9	4	Doberdò del Lago	5	Redipuglia
Litorale	2	18	2	Grado	16	Lignano

Tabella 19. Distribuzione per area geoclimatica dei pool di zecche nella stagione 2014 con indicazioni del range e dei siti di raccolta.

Per la stagione 2014, allo screening molecolare non sono stati rilevati pool positivi.

Per tutti i campioni positivi del 2013 è stato possibile ottenere la sequenza di 252 paia di basi del gene NS5 e in alcuni casi estendere la regione alla zona di giunzione NS4/5, per consentire un'analisi filogenetica più approfondita. Tutti i campioni positivi inoltre sono

stati sequenziati per la regione env e sottoposti a successiva analisi filogenetica. Le sequenze dei campioni positivi del 2013 sono state allineate con alcune sequenze depositate in GenBank rappresentative dei tre sottotipi e con sequenze ottenute negli anni precedenti in uno studio condotto nella stessa area, mostrate in blu (FVG.Sito/T cod/2005: Zecche 2005, FVG.Sito/T cod/2006: Zecche 2006, FVG.Sito/T cod/2007: Zecche 2007, Figura 50). Vengono mostrati in giallo e in verde i ceppi da noi isolati dai vettori in questo studio per il biennio 2011 e 2012 (FVG.Sito/T cod/2011: Zecche 2011, FVG.Sito/T cod/2012: Zecche 2012), mentre in rosso si possono notare le sequenze ottenute dai pazienti con TBE (FVG. H cod/anno). Le sequenze ottenute nella stagione 2013 sono mostrate in rosa (FVG.Sito/T cod/2013: Zecche 2013).

L'analisi molecolare delle sequenze relative al gene NS5 dei campioni del 2013 conferma la circolazione nell'area studiata di virus appartenenti al sottotipo europeo occidentale. Le sequenze ottenute si raggruppano in cluster evolutivi differenti: la sequenza ottenuta dal pool di Lusevera si raggruppa con i campioni positivi degli anni precedenti (2005, 2006 e 2007) e mostra omologie con il ceppo Neudoerfl (ceppo vaccinale). La sequenza di Tramonti di Sopra risulta legata filogeneticamente con il ceppo Toro, mostrando omologie con ceppi del 2011 e 2012 e con un campione umano del 2004, oltre che con un campione umano del 2012. Le varianti Toro e Neudoerfl circolano entrambi in Austria e Slovenia. La sequenza del pool di Pontebba presenta un elevato grado di identità con il ceppo finlandese Isosaari. Infine, un ulteriore cluster raggruppa la sequenza di Amaro e ceppi da noi isolati nel FVG nelle stagioni precedenti, includendo anche un caso umano del 2012.



Figura 50. Albero filogenetico di una regione di 252 paia di basi nel gene NS5 dei campioni di zecche risultati positivi nel periodo di studio (2013) confrontate con i campioni di zecche positive delle stagioni precedenti, con campioni di pazienti positivi e con sequenze di riferimento dei tre sottotipi.

Nell'albero filogenetico relativo al gene env si possono distinguere in giallo ed in verde le sequenze ottenute nel biennio 2011-2012 (FVG.Sito/T cod/2011:Zecche2011, FVG.Sito/T cod/2012:Zecche2012, Figura 51), in rosso quelle ottenute dai casi umani (FVG. H cod/anno), in rosa quelle della stagione 2013 (FVG.Sito/T cod/2013:Zecche 2013).

Possiamo vedere come le sequenze di Amaro e Pontebba si raggruppano in un cluster evolutivo legato a ceppi isolati in Slovenia (Ljubljana-like). Il pool di Pontebba è legato filogeneticamente ai campioni umani del 2012 e al ceppo sloveno Cerkno/H-55/2007. Infine la sequenza di Lusevera mostra elevate omologie con i ceppi appartenenti al cluster cecoslovacco Stara Ves.

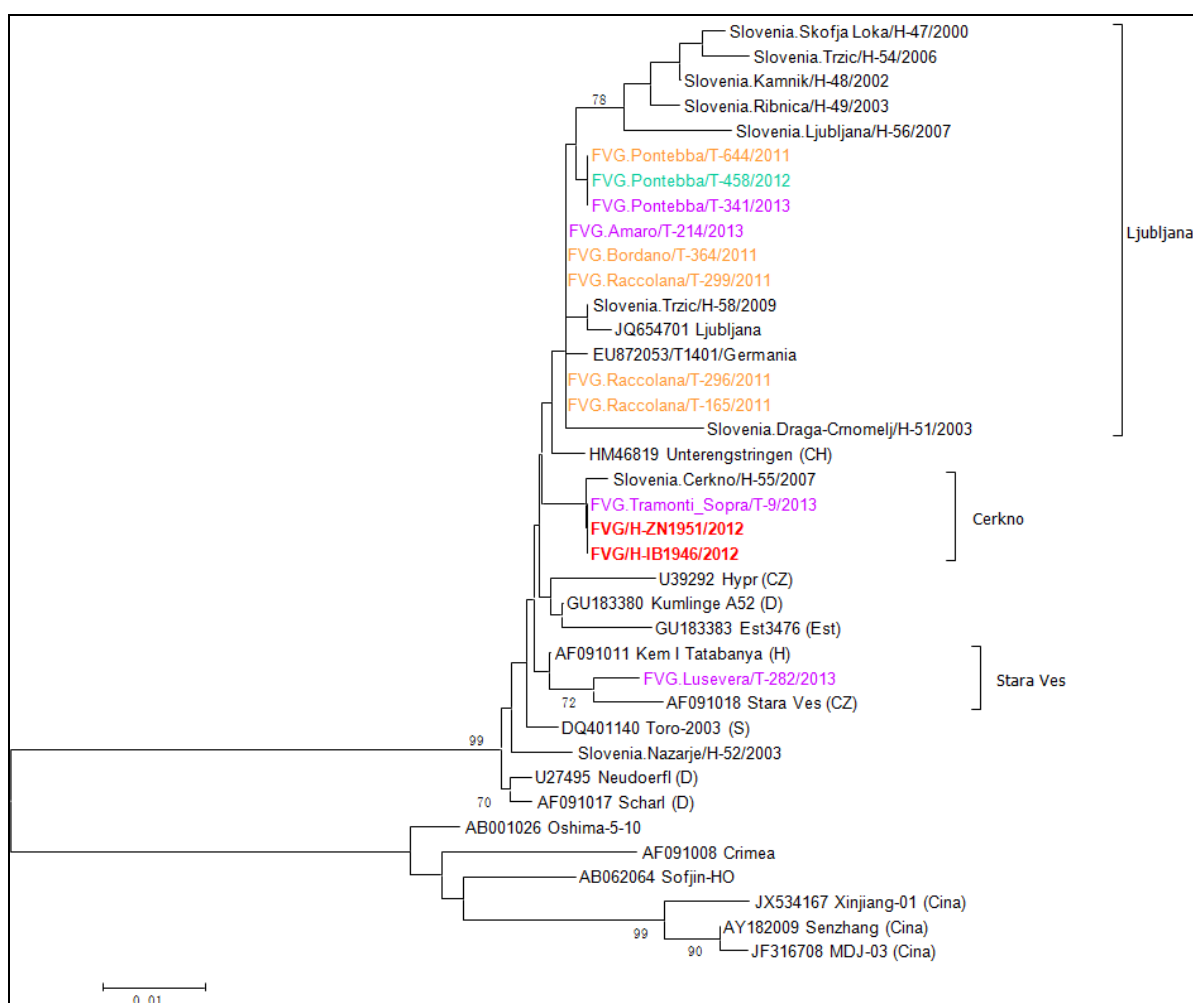


Figura 51. Albero filogenetico di una regione di 1322 paia di basi nel gene Env degli isolati virali da campioni di zecche del 2013; le sequenze vengono confrontate con campioni di pazienti con TBE e con sequenze di riferimento dei tre sottotipi.

Nelle tabelle riportate qui di seguito possiamo vedere il numero di pool analizzati in ogni sede di campionamento per ogni stagione (Tabella 20) e il numero di zecche (ninfe e adulti) analizzate per ogni stagione di studio (Tabella 21). Nella tabella 22 sono indicate invece le prevalenze relative alle diverse aree geoclimatiche.

SITO	2011	2012	2013	2014
AMARO	33	22	15	10
AMPEZZO	5	5	6	4
BERTIOLO	14	14	21	6
BORDANO	41	10	7	12
BUTTRIO	24	24	18	28
CHIONS	7	8	22	5
CIVIDALE	12	19	13	3
CLAUT	35	47	27	17
CLAUZETTO	27	25	28	30
DOBERDÒ DEL LAGO	9	8	5	4
FLAIBANO	4	8	4	6
FORNI DI SOPRA	7	5	8	7
FORNI DI SOTTO	20	10	2	15
FUSINE	3	2	1	5
GEMONA DEL FRIULI	24	11	15	6
GORIZIA	11	9	6	4
GRADO	2	2	3	2
IMPONZO	5	5	11	12
LIGNANO	27	25	47	16
LUSEVERA	84	42	55	50
MARTIGNACCO	35	18	45	14
MEDEA	26	16	8	9
MONTENARS	72	36	4	15
MUZZANA	22	34	9	19
OVARO	17	12	3	5
PAGNACCO	17	40	20	7
PALUZZA	23	9	21	7
PAULARO	6	4	6	4
POLCENIGO	8	12	9	7
PONTEBBA	38	48	38	13
POVICI	36	18	13	0
PULFERO	40	47	28	38
RACCOLANA	84	32	4	66
RAVASCLETTO	2	2	4	4

SITO	2011	2012	2013	2014
REDIPUGLIA	8	31	7	5
RIGOLATO	5	4	9	5
RIVE D'ARCANO	18	20	17	16
ROVEREDO	110	32	8	35
SAN LEOPOLDO	4	5	3	6
SOCCHIEVE	9	20	19	5
TAIPANA	31	15	22	11
TARCENTO	14	9	11	16
TARVISIO	5	2	2	15
TRAMONTI DI SOPRA	95	38	60	26
TRASAGHIS	9	25	2	18
VAL AUPA	18	6	14	8
VALBRUNA	2	2	1	5
TOTALE POOL	1148	838	701	621

Tabella 20. Numero dei pool di zecche analizzati durante le stagioni 2011, 2012, 2013 e 2014

ANNO	NINFE	ADULTI	TOTALE ZECCH/ANNO
2011	4298	330	4628
2012	3577	272	3849
2013	4743	354	5097
2014	2149	364	2513
TOTALE	14767	1320	16087

Tabella 21. Numero delle zecche analizzate durante le stagioni 2011, 2012, 2013 e 2014.

Stagione	area geoclimatica	N. pool	N. positivi	prevalenza (%)	CI 95% (‰)	
2011	Carnia Occidentale	27				
	Carnia Centro-orientale	123				
	Prealpi Carniche	207	1	0.12	0.1	5.2
	Valcanale	14				
	Canal del Ferro	232	5	0.5	1.8	10.6
	Prealpi Giulie	287				
	Colline Moreniche	35				
	Colline Eoceniche	87				
	Alta Pianura	47				
	Bassa Pianura	43				
	Carso Goriziano	17				
	Litorale	29				
	Totale 2011	1148	6	1.13	4.5	22.7
2012	Carnia Occidentale	15				
	Carnia Centro-orientale	89				
	Prealpi Carniche	145	1	0.15	0.1	6.6
	Valcanale	11	1	1.46	0.8	62.6
	Canal del Ferro	112	1	0.17	0.1	7.5
	Prealpi Giulie	169				
	Colline Moreniche	60				
	Colline Eoceniche	77				
	Alta Pianura	38				
	Bassa Pianura	56				
	Carso Goriziano	39				
	Litorale	27				
	Totale 2012	838	3	0.8	2	22.1
2013	Carnia Occidentale	10				
	Carnia Centro-orientale	108	1	0.99	3.5	21.1
	Prealpi Carniche	124	1	0.14	0.1	6.3
	Valcanale	7				
	Canal del Ferro	50	1	3.02	21.1	60.1
	Prealpi Giulie	137	1	1.18	5.7	21.1
	Colline Moreniche	37				
	Colline Eoceniche	56				
	Alta Pianura	58				
	Bassa Pianura	52				
	Carso Goriziano	12				
	Litorale	50				
	Totale 2013	701	4	0.13	0.4	30.0

Tabella 22. Prevalenze nelle aree geoclimatiche delle zecche analizzate delle stagioni 2011, 2012, 2013.

4.2. IDENTIFICAZIONE DEL TBEV IN CAMPIONI UMANI

A inizio 2013, il TBEV è stato identificato e sequenziato retrospettivamente in due pazienti del 2012, uno della provincia di Udine (anno di nascita 1951) e uno della provincia di Pordenone (anno di nascita 1946). Per il primo paziente è stato possibile raccogliere 3 campioni di siero (prelevati a distanza di qualche giorno), sangue intero in EDTA, liquido cerebrospinale (CSF); per il secondo paziente invece solo un campione di siero (siero 5). Di seguito vediamo riportati i risultati relativi alle due real-time RT-PCR (Tabella 23) e ai test immunoenzimatici (Tabella 24).

	CAMPIONE	REAL-TIME 3'NCR (CT)	REAL-TIME ENV (CT)
Paziente 1	SANGUE-EDTA	-	-
	CSF	-	-
	SIERO 1	29	30
	SIERO 2	40	40
	SIERO 3	-	38
Paziente 2	SIERO 5	38	40

Tabella 23. Risultati alle indagini molecolari (real-time RT-PCR) dei campioni dei due pazienti del 2012.

	CAMPIONE	DATA PRELIEVO	IgM	INDICE	IgG	INDICE
Paziente A	SIERO1	27/10/2012	NEG	-	NEG	-
	SIERO2	31/10/2012	POS	4.93	NEG	-
	SIERO3	02/11/2012	POS	4.99	POS	1.73
	CSF	16/11/2012	-	-	-	-
Paziente B	SIERO5	21/11/2012	POS	1.93	NEG	-

Tabella 24. Risultati alle indagini sierologiche (Test ELISA) dei campioni dei due pazienti del 2012.

I campioni sono stati sottoposti ad amplificazione del gene NS5, ed è stato possibile dimostrare la presenza dell'RNA virale solo nel sangue e nel 1° siero del paziente A e nel siero del paziente B. Si è quindi proceduto al sequenziamento e all'analisi filogenetica. Le sequenze relative al gene NS5 e al gene env sono state allineate con le sequenze dei campioni di zecche delle varie stagioni (Figura 48, 49, 50 e 51): sequenza **FVG/H-ZN1951/2012** relativa al paziente A (Udine) e sequenza **FVG/H-IB1946/2012** relativa al paziente B (Pordenone).

A maggio 2013 è stato da noi diagnosticato il primo caso di TBEV nella provincia di Trieste in un paziente immunodepresso, con linfoma a cellule B. Il paziente, di 71 anni, era in cura chemioterapica per una neoplasia a cellule dendritiche plasmocitoidi blastiche recidivante. Nel 2010 gli era stato diagnosticato un linfoma a cellule B di basso grado. All'inizio di maggio 2013 ha sviluppato debolezza senza dolore o parestesie, e febbre (38°C) e non rispondeva al trattamento con Levofloxacin. Alcuni giorni dopo, la debolezza agli arti superiori è peggiorata ed è comparsa la paralisi all'arto superiore sinistro e opsoclono, ovvero un movimento involontario incontrollato degli occhi, caotico e multivettoriale. Gli esami del liquido cerebrospinale mostravano alterazioni con un fenotipo cellulare suggestivo di neoplasia a cellule dendritiche plasmocitoidi blastiche. Nel giugno 2013, il quadro neurologico è peggiorato rapidamente con disorientamento, afasia, movimenti involontari. Il paziente è morto di sepsi ad ottobre 2013.

Qui di seguito vengono riportati i parametri di laboratorio del paziente in un campione del 5 giugno 2013:

- Eritrociti $3.23 \times 10^6/\text{mL}$,
- Emoglobina 11.5 g/dL,
- Ht 34.6%, piastrine $109 \times 10^3/\text{mL}$,
- Globuli bianchi $3.67 \times 10^3/\text{mL}$,
- Neutrofili $3.13 \times 10^3/\text{mL}$,
- Linfociti $0.21 \times 10^3/\text{mL}$,
- Monociti $0.32 \times 10^3/\text{mL}$,
- CD4 $82 \times 10^3/\text{mL}$,
- CD4+ percentuale 39.2%,
- Rapporto CD4+/CD8+ 0.95,
- IgG 1810 mg/dL,
- IgA 148 mg/dL,

- IgM 192 mg/dL.

Nel maggio 2013 il paziente aveva riportato un morso di zecca mentre praticava un'escursione nei boschi attorno alla città di Trieste (Carso triestino). L'infezione da TBEV è stata dimostrata mediante real-time RT-PCR quantitativa (bersaglio 3'NCR) su campioni di sangue intero, liquido cerebrospinale e urine. La conferma è stata realizzata con la real-time RT-PCR diretta al gene env. Da sottolineare che oltre che nel sangue e nel CSF il TBEV era presente anche nelle urine. I test sierologici su siero e CSF dimostravano la presenza di anticorpi di classe IgM e IgG specifiche (ELISA e test dell'avidità delle IgG). L'infezione si è manifestata con viremia persistente e IgM positive per oltre 4 mesi. La presenza del virus nel sangue è stata riscontrata diverse volte fino al 30 luglio, mentre nelle urine fino al 5 luglio. Il CSF già dal secondo prelievo è risultato invece negativo. Nel grafico seguente possiamo vedere l'andamento dei valori sierologici (IgM e IgG) e della viremia (real-time RT-PCR su sangue e urine) del paziente (Figura 52):

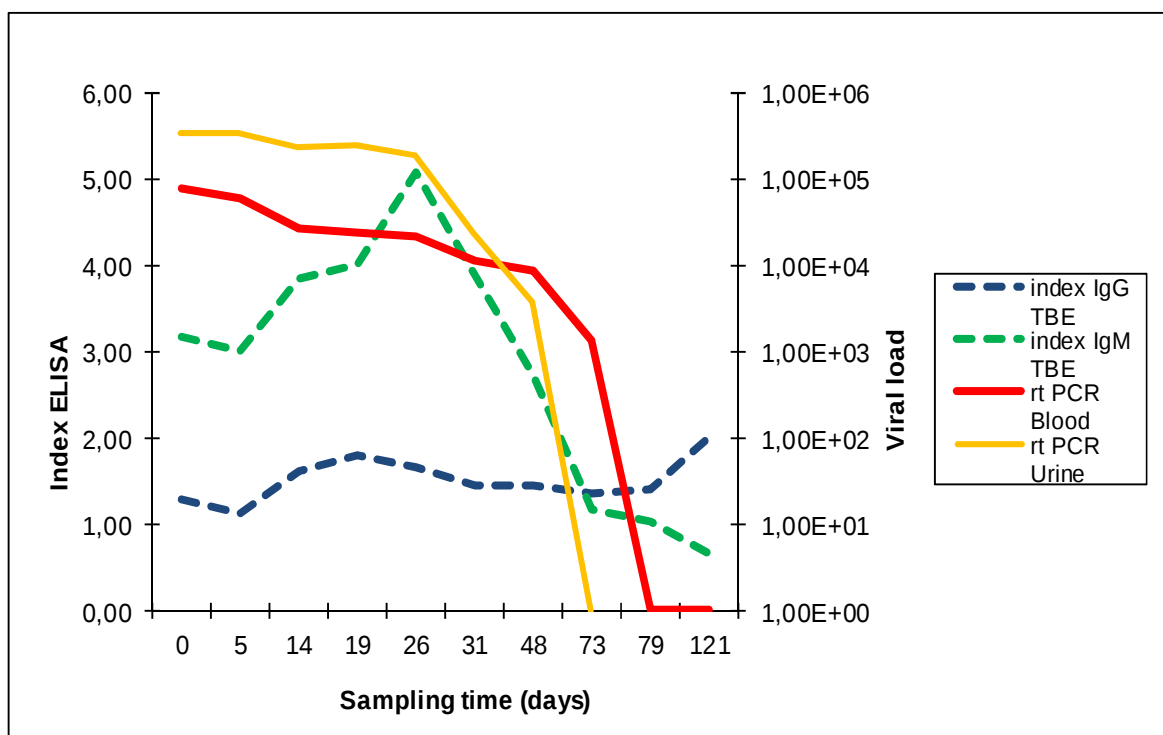


Figura 52. Rappresentazione della valutazione sierologica e virologica di infezione da TBEV in un paziente immunocompromesso. Gli indici IgG e IgM sono il rapporto tra i valori di assorbanza dei campioni ed il cut-off. La carica virale di TBEV è stata calcolata moltiplicando il valore ottenuto dalle analisi molecolari per il fattore di concentrazione di estrazione dell'RNA (100/50 e 500/50 per il sangue per l'urina, rispettivamente).

Per ricercare in quale frazione cellulare fosse presente il TBE virus si sono separate le popolazioni cellulari mediante Ficoll e si è osservato che la presenza del virus era dimostrabile solo nella frazione eritrocitaria. Nella figura sottostante viene riportata l'immagine del gel di agarosio ottenuto con i campioni del paziente immunocompromesso. Si possono vedere il sangue intero e le varie frazioni cellulari ottenute con il Ficoll e il campione di urine (Figura 53). I campioni sono stati raccolti il 25 giugno 2013, più di un mese dopo la diagnosi di TBE.

Il controllo positivo è stato ottenuto inserendo un inserto di 20 pb alla sequenza del TBEV (ceppo Neudoerfl) grazie alla realizzazione di un plasmide (pBluescript II phagemid vector), effettuata in collaborazione con il gruppo di ricerca di Virologia Molecolare dell'ICGEB di Trieste.

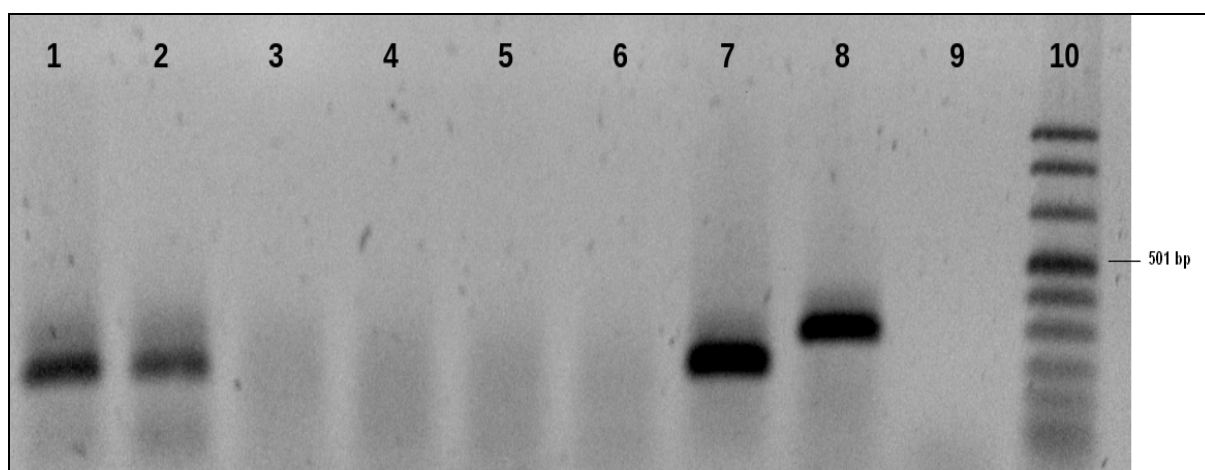


Figura 53. Gel di agarosio 1X con i campioni di un paziente con TBEV: 1.sangue intero-EDTA, 2.eritrociti, 3.plasma, 4.linfociti, 5.granulociti, 6.siero, 7.urine, 8.controllo positivo, 9.controllo negativo, 10.DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche Life Science).

Il TBEV è stato quindi sequenziato per una regione del gene env e una di NS4/5. Si è inoltre isolato il virus su colture cellulari di Vero E6 e la carica virale è stata monitorata in real-time RT-PCR prelevando i surnatanti. Dalle analisi filogenetiche si è riscontrata una forte omologia tra le sequenze del paziente e quelle dei ceppi isolati in Slovenia e in Europa centrale e settentrionale, appartenenti al sottotipo europeo (Figura 54).

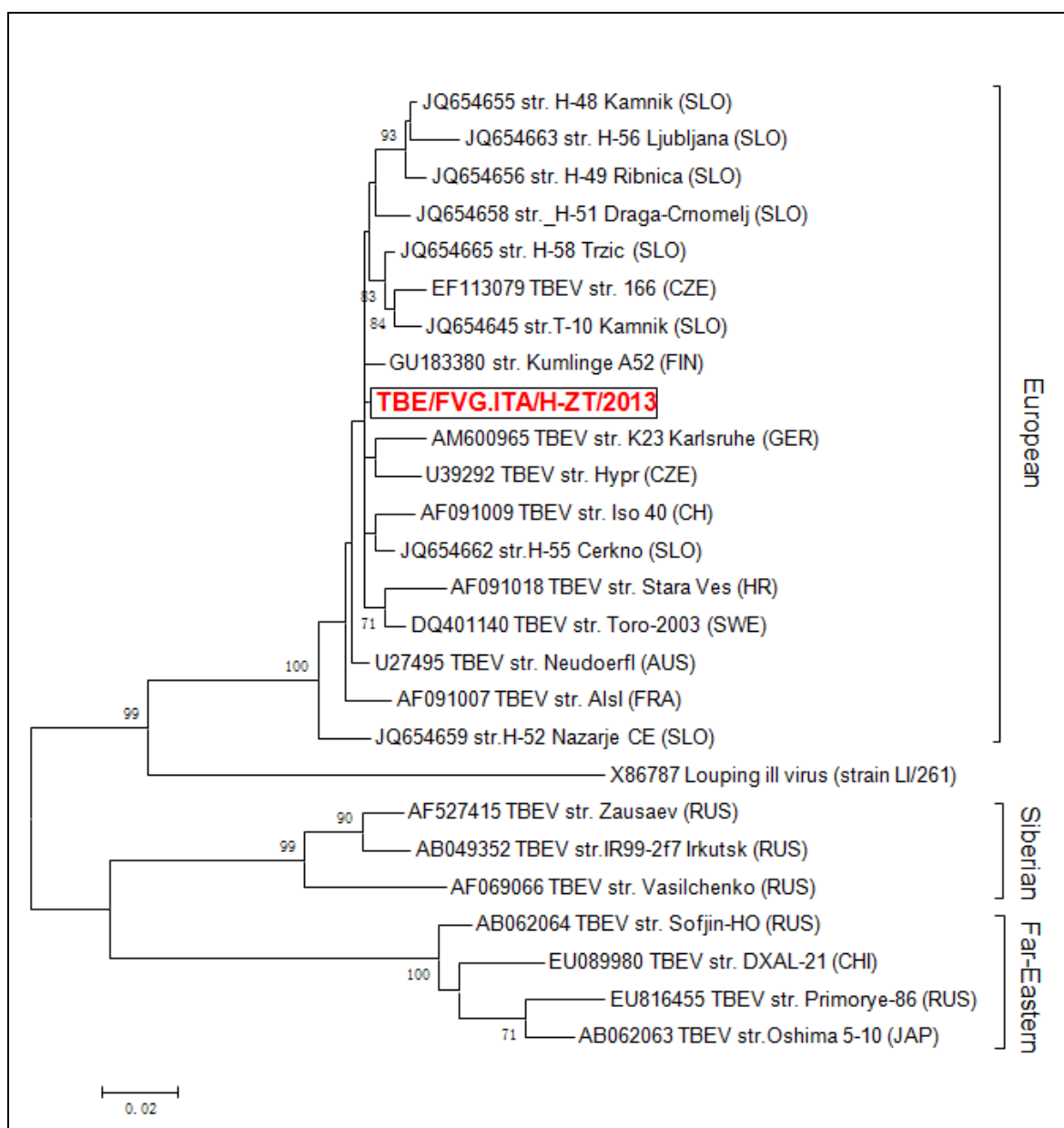


Figura 54. Albero filogenetico ottenuto da una sequenza di 1077 pb di una regione del gene env.

Nel 2013 sono stati segnalati altri due casi di infezione TBE nella provincia di Trieste. Un secondo caso è stato dimostrato nel giugno 2013 in un paziente di 68 anni, sempre della provincia di Trieste. L'uomo ricordava di essere stato morso da una zecca in un prato a 7 km di distanza dall'area frequentata dal caso precedente. Nei campioni di siero e CSF sono state dimostrati gli anticorpi IgM ed IgG specifici mediante ELISA.

Infine, un terzo caso ha coinvolto un ragazzo di 15 anni, proveniente dalla stessa area dei casi precedenti, che mostrava febbre e cefalea; nel siero sono stati trovati anticorpi specifici anti-TBEV. Il paziente, riferiva di non aver subito punture di zecche, ma di essere abituale consumatore di latte crudo.

In entrambi i casi erano stati raccolti campioni di sangue intero, CSF ed urine per la ricerca del genoma virale mediante tecniche molecolari, ma purtroppo non è stato possibile identificare l'RNA del TBEV, forse perché non erano più in fase viremica dato che erano già comparse le IgG. Di seguito vediamo riportati i valori ottenuti con i test ELISA:

DATA PRELIEVO	ANNO- MESE	ETÀ	CAMPIONE	IgM	INDICE	IgG	INDICE	real-time 3'NCR
01/07/13	2013-LUG	68	SIERO	POS	5.36	POS	2.22	-
01/07/13	2013-LUG	68	SANGUE EDTA	-	-	-	-	NEG
01/07/13	2013-LUG	68	CSF	POS		NEG	-	NEG
01/07/13	2013-LUG	68	URINE	-	-	-	-	NEG
20/12/13	2013-DIC	68	SIERO	Debolmente reattivo	1.36	POS	3.14	-
10/07/13	2013-LUG	16	SANGUE EDTA	-	-	-	-	NEG
10/07/13	2013-LUG	16	CSF	POS	-	NEG	-	NEG
10/07/13	2013-LUG	16	URINE	-	-	-	-	NEG
10/07/13	2013-LUG	16	SIERO	POS	5.48	Debolmente reattivo	0.98	-
17/09/13	2013-SET	16	SIERO	POS	5.00	POS	3.64	-

Tabella 25. Riassunto dei risultati (test sierologici e molecolari) dei campioni di due pazienti con TBEV del 2013. Gli indici IgG e IgM sono il rapporto tra i valori di assorbanza dei campioni ed il cut-off.

I test ELISA possono presentare reattività crociata tra anticorpi diretti nei confronti di membri della famiglia Flavivirus. Per ovviare a questo è stato introdotto il test di neutralizzazione di riduzione delle placche PRNT (Plaque Reduction Neutralization Test). La metodica PRNT è stata applicata per la prima volta nel caso di TBEV nel paziente immunocompromesso. Il siero ha mostrato capacità di inibizione virale. Il ceppo utilizzato per la metodica è quello ottenuto dall'isolamento del pool di zecche raccolte a Raccolana nel 2011, il cui titolo è stato calcolato e risulta $1.1E+07$ (Figura 55). Nell'immagine possiamo veder nei primi due pozzetti il controllo negativo (solo cellule) e a seguire le varie diluizioni di virus da $1E-01$ a $1E-05$ analizzate in duplicato (due pozzetti per ogni diluizione) per aumentare la riproducibilità del metodo.

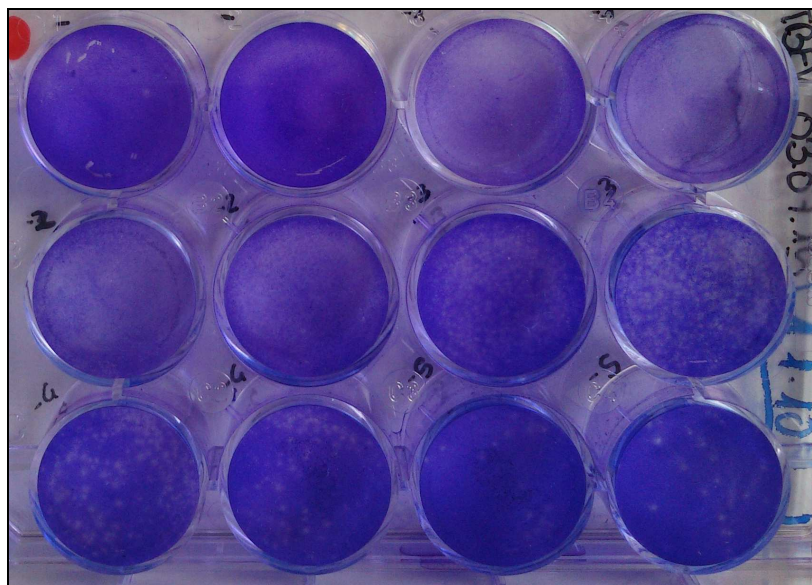


Figura 55. Titolazione del TBEV mediante test delle placche.

4.3. IDENTIFICAZIONE DEL WNV

La presenza del West Nile virus nella regione Friuli Venezia Giulia è stata riportata per la prima volta nel 2011 (2 casi). Da allora sono stati implementati i sistemi di sorveglianza sia veterinaria che su campioni umani.

Tra settembre e ottobre 2012 nel nostro laboratorio sono stati osservati complessivamente 7 casi di infezione da WNV: 5 presentavano una forma neuro invasiva e due, asintomatici, sono stati individuati nelle analisi di screening dei donatori di sangue. I casi erano localizzati nelle province di Udine, Gorizia e Pordenone e nella parte meridionale della regione FVG.

Nel 2013 è stato possibile caratterizzare il virus di uno dei casi del 2012, una paziente, che presentava sintomatologia neurologica ed era residente nella provincia di Gorizia. È stata dimostrata la presenza del virus nelle urine (campione del 7/09/2012) mediante real-time RT-PCR (ct=35) e PCR di sequenziamento. La sequenza di una regione di 930 pb del gene env è stata allineata con alcuni ceppi ottenuti in Italia (Veneto e Ancona) negli anni precedenti (mostrati in blu, Figura 56). L'analisi filogenetica ha rivelato che il virus appartiene al Lineage 1 ed ha un'elevata identità con il ceppo Italy/2012/Livenza/31.1 identificato in provincia di Venezia nel 2012.

Non è stato possibile isolare il virus dal campione di urine su colture cellulari di Vero E6.

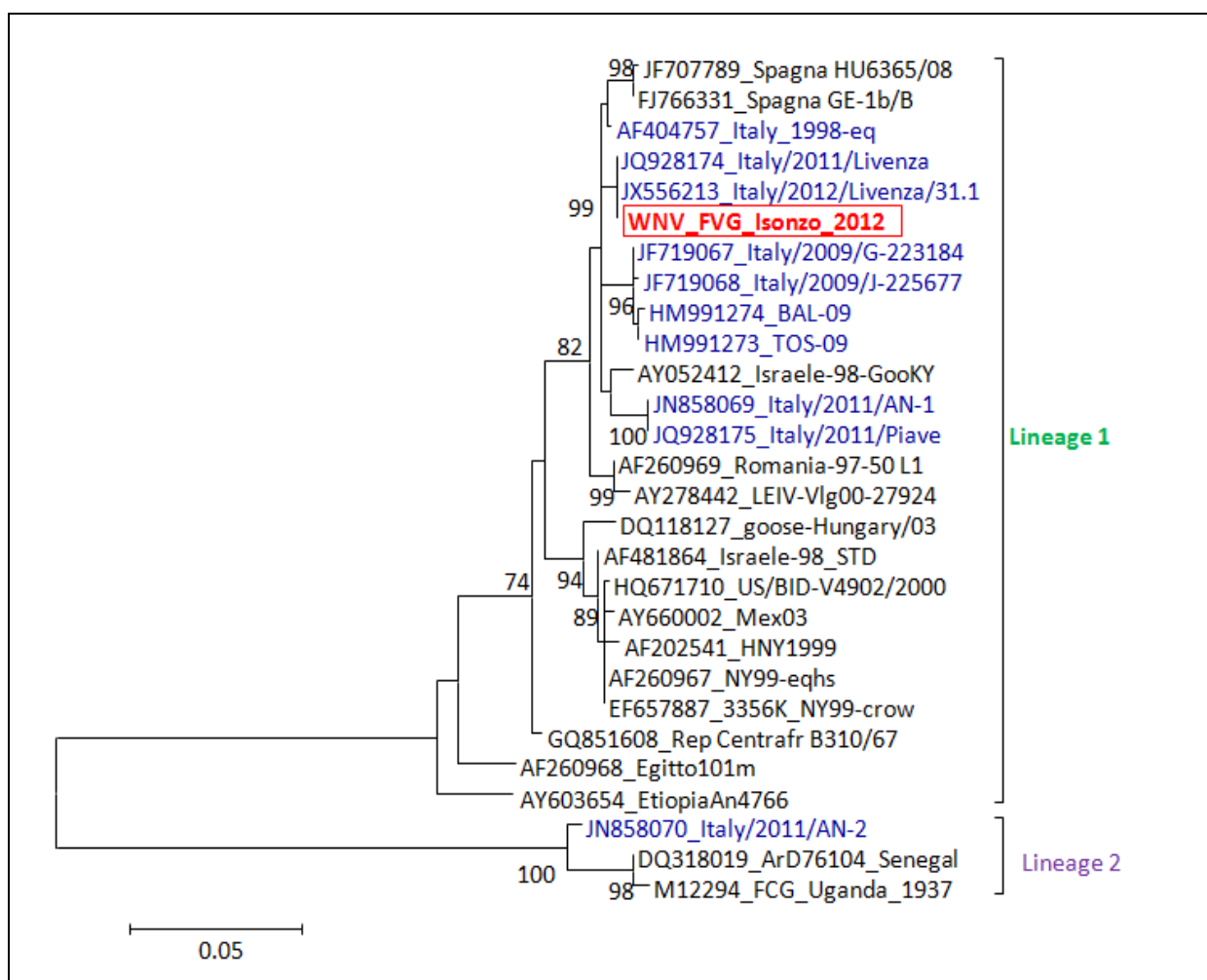


Figura 56. Albero filogenetico di una regione di 930 pb del gene env del WNV. In rosso si può vedere la sequenza della paziente del 2012 da noi ottenuta retrospettivamente, allineata con alcuni ceppi ottenuti in Italia (Veneto e Ancona) negli anni precedenti (blu).

Nella stagione 2013 in un solo caso, un paziente della provincia di Pordenone, si sono riscontrate IgM (indice 1.51) ed IgG (indice 2.45) specifiche nel siero (prelievo del 23/10/2013) ma non è stato possibile dimostrare la presenza del virus a livello molecolare anche perché il titolo anticorpale IgG era ormai elevato. Per escludere la possibilità di cross-reattività con altri Flavivirus si è utilizzata la tecnica di PRNT e si è riscontrata una neutralizzazione quasi completa (80%), come si può notare nella figura 57. Questo conferma l'infezione di WNV anche se non è stato trovato l'RNA virale.

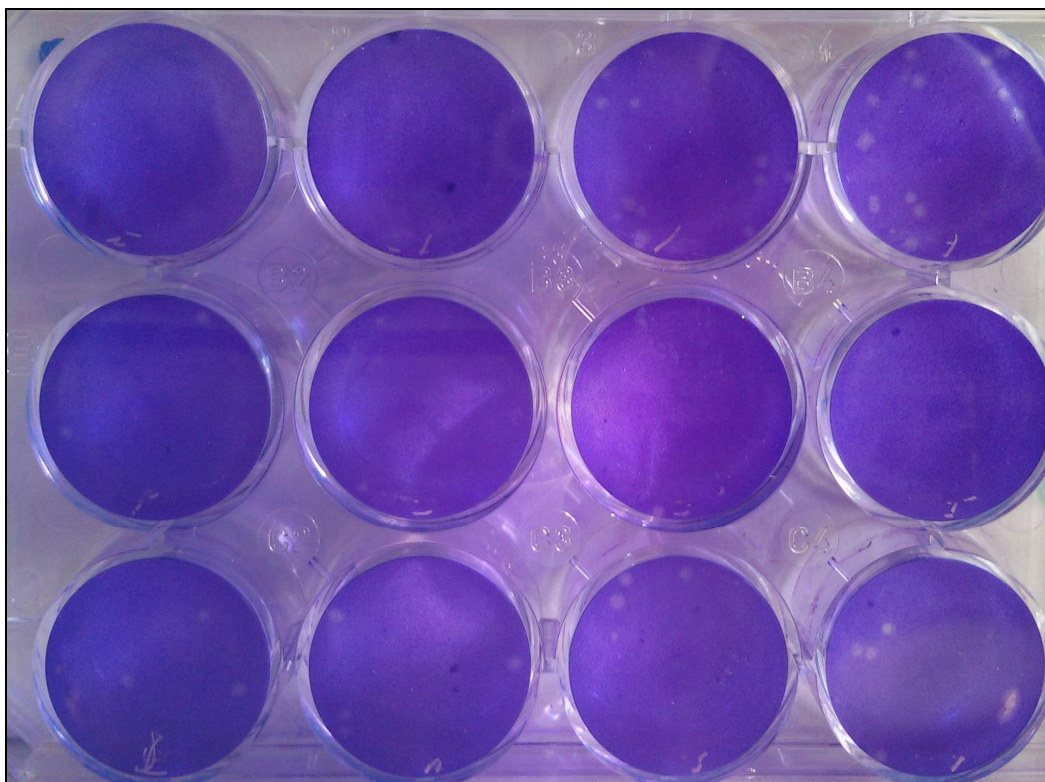


Figura 57. Test PRNT con il campione di siero del paziente del 2013 affetto da WNV.

Durante la stagione di sorveglianza del 2014 per due pazienti sono state trovate IgM ed IgG specifiche. Si tratta per entrambi i casi di infezioni contratte all'estero.

Il primo caso riguarda un uomo di 28 anni originario del Burkina Faso. Il paziente, in Italia dal 2009, è stato ricoverato per febbre dopo qualche giorno dal rientro dal paese natale dove era soggiornato nei mesi di luglio e agosto. Agli esami ematochimici presentava leuco-piastrinopenia e alterazione delle transaminasi. Mostrava inoltre epatosplenomegalia. Dopo aver escluso la diagnosi per malaria, essendo risultato negativo al test specifico, il sospetto diagnostico era orientato su un'infezione da Dengue o Chikungunya virus. Anche in questo caso il paziente è risultato negativo sia ai test molecolari che sierologici. Sono invece risultati positivi gli anticorpi specifici per West Nile virus su siero (IgM positive con indice di 1.85, IgG debolmente positive con indice di 0.46). Non è stato però possibile trovare il virus in real-time RT-PCR. Non è esclusa una possibile reattività crociata con altri Flavivirus.

Per il secondo caso, un signore di 47 anni appena tornato dalla Serbia (paese d'origine), l'RNA virale è stato invece identificato su sangue-EDTA, liquido cerebrospinale ed urine. Le cariche virali nei vari campioni biologici sono state determinate grazie all'uso di campioni a concentrazione nota forniti di origine commerciale e la creazione di una curva

standard.

DATA PRELIEVO	ANNO-MESE	ETÀ	CAMPIONE	IgM	INDICE	IgG	INDICE
26/08/14	2014-AGO	28	SIERO	POS	1.85	Debolmente positivo	0.46
26/08/14	2014-AGO	28	URINE	-	-	-	-
05/09/14	2014-SET	28	SIERO	Debolmente positivo	0.95	Debolmente positivo	1.38
15/09/14	2014-SET	47	SIERO	POS	2.91	POS	1.38
15/09/14	2014-SET	47	CSF	Debolmente positivo	0.66	NEG	-
15/09/14	2014-SET	47	SANGUE EDTA	-	-	-	-
15/09/14	2014-SET	47	URINE	-	-	-	-

DATA PRELIEVO	ANNO-MESE	ETÀ	CAMPIONE	REAL-TIME	CT	copie/μL
26/08/14	2014-AGO	28	SIERO	-	-	-
26/08/14	2014-AGO	28	URINE	NEG	-	-
05/09/14	2014-SET	28	SIERO	-	-	-
15/09/14	2014-SET	47	SIERO	-	-	-
15/09/14	2014-SET	47	CSF	POS	36	7.78E+01
15/09/14	2014-SET	47	SANGUE EDTA	POS	32	1.26E+03
15/09/14	2014-SET	47	URINE	POS	22	1.46E+06

Tabella 26. Riassunto dei risultati (test sierologici e molecolari) dei campioni di due pazienti del 2014. Gli indici IgG e IgM sono il rapporto tra i valori di assorbanza dei campioni ed il cut-off.

Per entrambi i pazienti si è adoperata la metodica PRNT per confermare la diagnosi di West Nile virus, previa titolazione (Figura 58). Il ceppo adoperato appartiene al Lineage1. Per il primo paziente, il ragazzo rientrato dal Burkina Faso, non è stata osservata riduzione di neutralizzazione; infatti come si può vedere dalla figura 59 il numero di placche è

praticamente invariato per le diverse diluizioni del siero.

Il test PRNT è stato effettuato anche per il secondo paziente del 2014. In questo caso invece la riduzione di neutralizzazione evidenziava un tasso di inibizione dell'85% (Figura 60).

Di seguito vengono riportate la piastra della titolazione del virus (Figura 58), la PRNT per il paziente del Burkina Faso (Figura 59) e la piastra con la PRNT relativa al paziente della Serbia (Figura 60). In ciascuna piastra, nei pozzetti 1 e 2 si trova il controllo negativo con solo cellule, nei pozzetti 3 e 4 il controllo positivo con il virus WNV precedentemente titolato, nei pozzetti 5 e 6 il virus più il terreno, nei pozzetti 7 e 8, 9 e 10 e 11 e 12 rispettivamente il virus più la diluizione 1: 5, 1: 10 e 1: 40 del siero. Nell'ultima diluizione il numero di placche è uguale a quello del controllo virus+terreno.

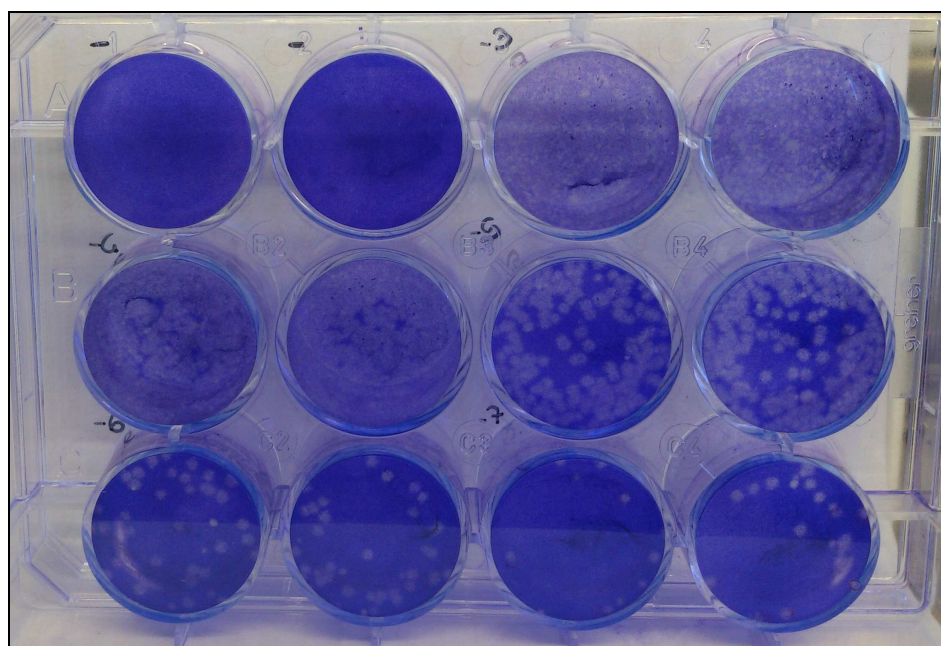


Figura 58. Titolazione del WNV mediante test delle placche.

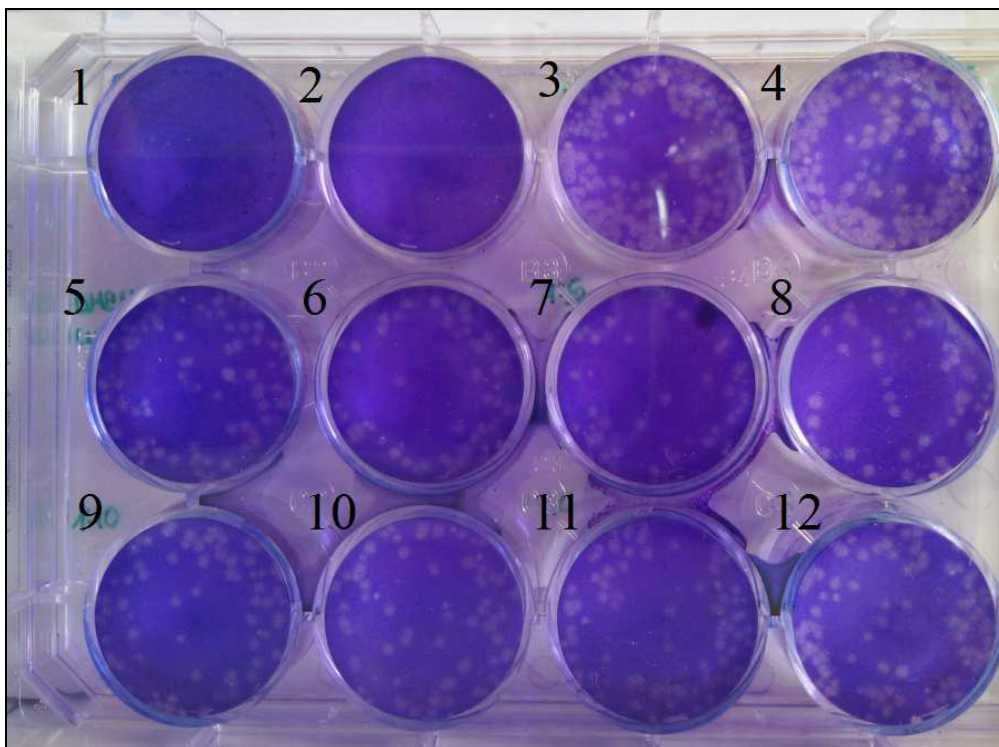


Figura 59. PRNT con il siero di un paziente rientrato dal Burkina Faso. La riduzione di carica da neutralizzazione non si è osservata; probabile reattività crociata con altri Flavivirus.

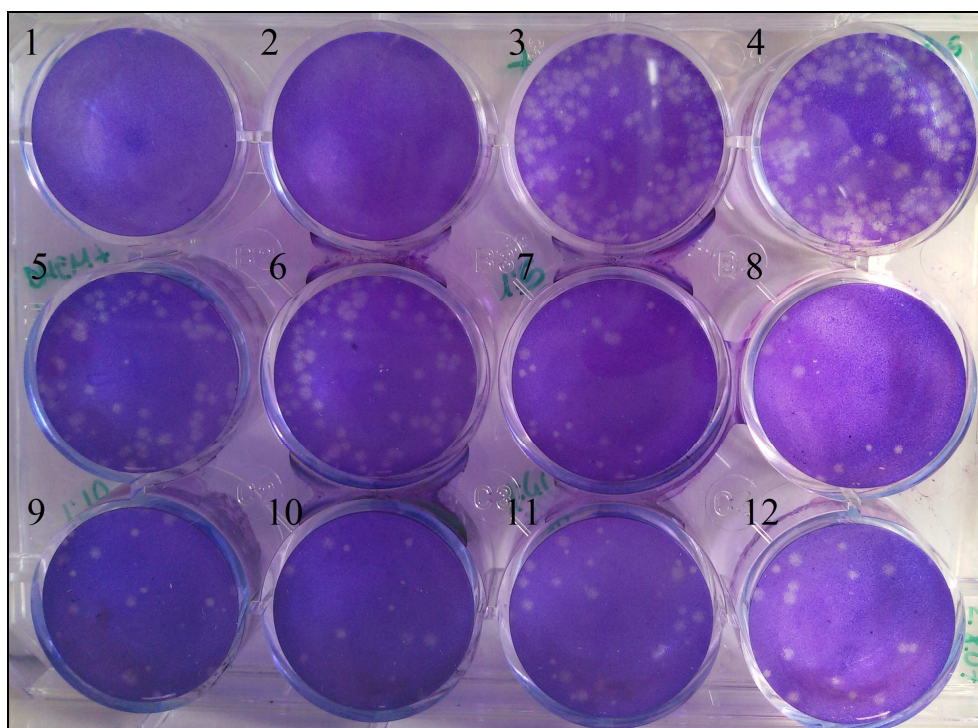


Figura 60. PRNT con il siero di un paziente rientrato dalla Serbia. La riduzione di neutralizzazione è avvenuta in quanto il numero di placche contato nelle varie diluizioni di siero è particolarmente ridotto rispetto ai controlli.

Nel caso del paziente rientrato dalla Serbia, vista l'alta carica di WNV presente nelle urine ($1.46E+06$), è stato possibile isolare il virus su colture cellulari di Vero E6. I surnatanti sono stati prelevati e sequenziati. La sequenza ottenuta dall'amplificazione di una porzione del gene C del capsido è stata sottoposta ad analisi filogenetica per avere informazioni sull'origine e l'evoluzione del ceppo virale responsabile, il quale è risultato appartenere al Lineage 2. Vi sono omologie con i ceppi circolanti in Europa centrale e anche in Italia e viene raggruppato nel cluster detto greco/ungherese (Figura 61).

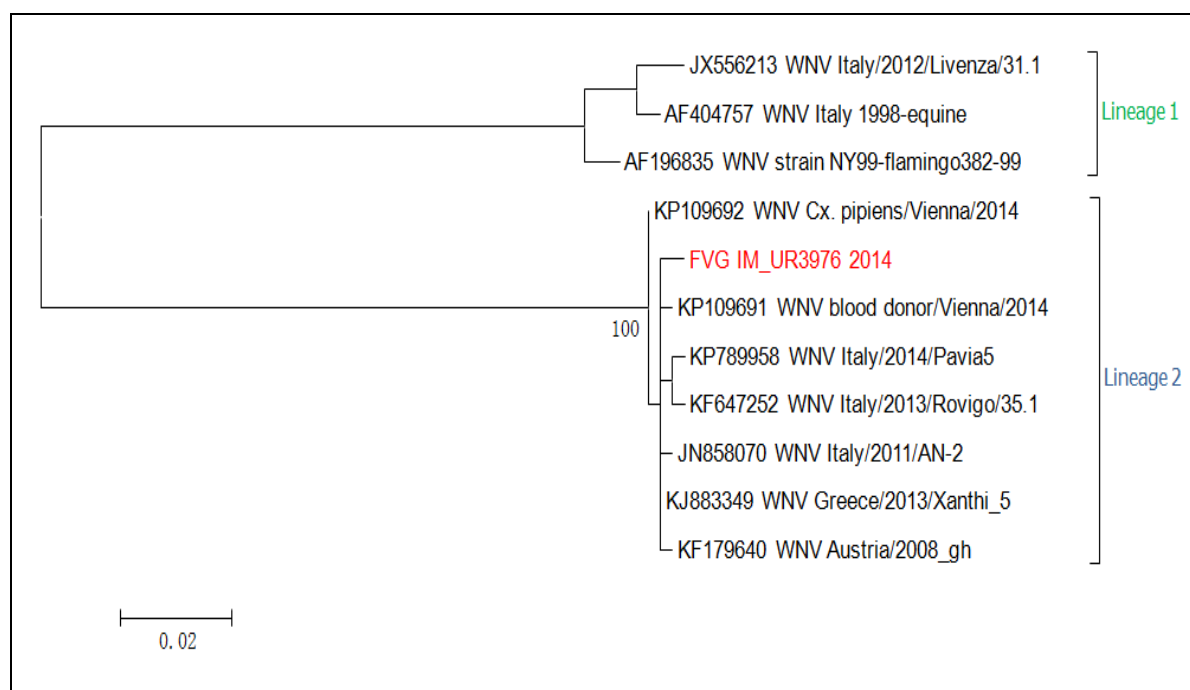


Figura 61. Albero filogenetico di una regione del gene env del WNV. In rosso si può vedere la sequenza della paziente del 2014, allineata con alcuni ceppi appartenenti al Lineage 1 e al Lineage.

Inoltre, il ceppo ottenuto è stato titolato mediante tecnica delle placche (titolo di $2.35E+07$) e successivamente utilizzato nella metodica PRNT per verificare se i diversi lineage (1 e 2) agiscono allo stesso modo nella neutralizzazione. Questo perché in letteratura non sono descritte le caratteristiche lineage-specifiche della risposta neutralizzante, ma che per analogia con altri Flavivirus, come ad esempio il Dengue virus, potrebbero condizionare il test di PRNT. Gli esperimenti effettuati non hanno evidenziato differenze di neutralizzazione in funzione del lineage di WNV utilizzato.

Nella stagione di sorveglianza del 2015 sono stati trovati gli anticorpi specifici in tre

donatori di sangue asintomatici (Tabella 27, 28). Per due casi sono state rilevate le IgM mentre in un caso solo le IgG specifiche. L'RNA virale non è stato però riscontrato, forse perché i campioni sono stati prelevati quando la fase viremica era ormai terminata.

	CAMPIONE	DATA PRELIEVO	REAL-TIME
Donatore 1	PLASMA	27/08/2015	NEG
	PLASMA	08/09/2015	NEG
	SANGUE-EDTA	08/09/2015	NEG
	SANGUE-EDTA	10/09/2015	NEG
Donatore 2	PLASMA	10/09/2015	NEG
	URINE	10/09/2015	NEG
	SIERO	10/09/2015	NEG
	SIERO	12/09/2015	NEG
Donatore 3	SANGUE-EDTA	12/09/2015	NEG
	URINE	12/09/2015	NEG
	SIERO	17/09/2015	NEG
	SANGUE-EDTA	18/09/2015	NEG
	URINE	18/09/2015	NEG
	SANGUE-EDTA	23/09/2015	NEG

Tabella 27. Campioni dei donatori asintomatici analizzati in real-time RT-PCR.

	CAMPIONE	DATA PRELIEVO	IgM	INDICE	IgG	INDICE
Donatore 1	PLASMA	27/08/2015	NEG	-	NEG	-
	PLASMA	08/09/2015	NEG	-	NEG	-
	SIERO	23/09/2015	NEG	-	POS	1.71
Donatore 2	SIERO	10/09/2015	NEG	-	NEG	-
	SIERO	12/09/2015	Debolmente POS	1.02	NEG	-
Donatore 3	SIERO	10/09/2015	Debolmente POS	0.76	NEG	-
	SIERO	12/09/2015	POS	1.60	NEG	-
	SIERO	17/09/2015	POS	2.78	NEG	-

Tabella 28. Campioni dei donatori asintomatici analizzati in ELISA.

Per escludere una possibile reattività crociata con altri Flavivirus, nel caso con IgG positive è stata effettuata la metodica PRNT: sono stati rilevati gli anticorpi neutralizzanti quindi si tratta sicuramente di un caso di WNV (Figura 62). La metodica PRNT è stata effettuata con il protocollo standard: nei pozzetti 1 e 2 si trova il controllo negativo con solo cellule, nei pozzetti 3 e 4 c'è il controllo positivo al titolo utilizzato nel test, nei pozzetti 7 e 8, 9 e 10 e 11 e 12 rispettivamente il virus più la diluizione 1:5, 1:10 e 1:40 del siero.

Negli altri due casi dei donatori non è stato possibile effettuare la conferma con la PRNT perché non presentavano anticorpi di classe IgG e rimane pertanto il dubbio che possa trattarsi di casi di cross-reattività.

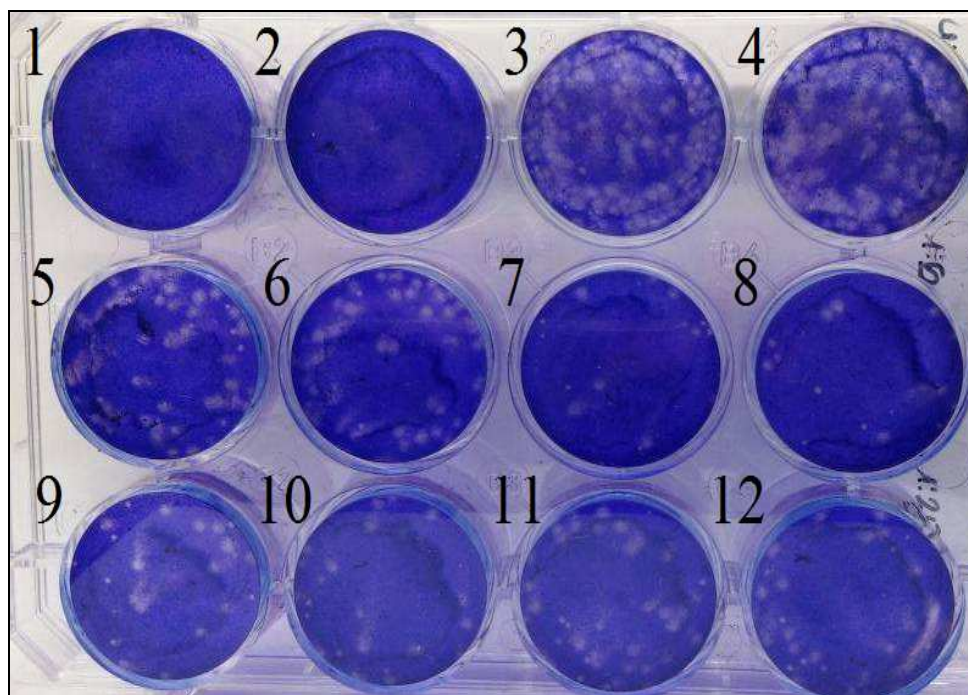


Figura 62. PRNT con il siero di un donatore di sangue asintomatico che presentava IgG specifiche anti-WNV. La riduzione della neutralizzazione è del 70%.

4.4. IDENTIFICAZIONE DI CHIKUNGUNYA E DENGUE VIRUS

Negli ultimi anni si è verificato un incremento di casi importati di Dengue virus e Chikungunya virus; al fine di monitorare la circolazione di queste infezioni si è attuato un sistema di sorveglianza.

Chikungunya virus

Nell'agosto 2014, una ragazza di 24 anni rientrata dalla Thailandia è risultata positiva alle analisi di Chikungunya virus. In questo caso è stato possibile trovare l'RNA virale in real-time RT-PCR, probabilmente perché l'infezione era ancora in fase acuta visto che sono stati rilevati solo gli anticorpi di fase IgM (titolo maggiore di 40). Nelle cellule infettate si è infatti osservato un pattern di fluorescenza a livello del citoplasma.

Sempre nello stesso periodo una donna di 45 anni mostrava nel siero anticorpi specifici contro il CHIKV (sia IgM che IgG), ma non si è identificato il virus a livello molecolare.

Nell'ultimo anno abbiamo trovato altri 2 casi di CHIKV: un signore di 45 anni e uno di 52. Per entrambi sono stati determinati gli anticorpi specifici con il test sierologico dell'immunofluorescenza indiretta, ma non si è trovato l'RNA virale forse perché erano già presenti elevati titoli di IgG. Nella tabella sottostante possiamo vedere riassunti i risultati ai test sia sierologici che molecolari per i pazienti risultati positivi per CHIKV nel corso di

questi anni.

DATA PRELIEVO	ANNO- MESE	ETÀ	CAMPIONE	IgM	TITOLO	IgG	TITOLO	real-time
06/08/2014	2014-AGO	24	SIERO	POS	>1:40	NEG	-	POS
06/08/2014	2014-AGO	45	SIERO	POS	<1:20	POS	>1:128	NEG
17/06/2015	2015-GIU	52	SIERO	POS	>1:160	POS	>1:256	NEG
08/07/2015	2015-AGO	45	SIERO	POS	>1:160	POS	>1:256	NEG

Tabella 29. Riassunto dei risultati (test sierologici e molecolari) dei campioni dei pazienti con CHIKV.

Dengue virus

In real-time RT-PCR negli anni precedenti erano stati trovati 2 casi di pazienti positivi per DENV nel 2010 e 3 casi DENV nel 2011 (Tabella 30). Non sono state possibili ulteriori analisi molecolari retrospettive poiché i campioni non erano più disponibili.

DATA PRELIEVO	ANNO- MESE	ETÀ	CAMPIONE	IgM	TITOLO	IgG	TITOLO	real-time
18/08/2010	2010-AGO	52	SIERO	POS	1:160	POS	1:80	-
18/08/2010	2010-AGO	52	SANGUE-EDTA	-	-	-	-	POS
20/08/2010	2010-AGO	52	SANGUE-EDTA	-	-	-	-	POS
10/09/2010	2010-SET	52	SIERO	POS	1:80	POS	>1:200	-
23/12/2010	2010-DIC	35	SIERO	POS	1:160	POS	1:128	-
23/12/2010	2010-DIC	35	SANGUE-EDTA	-	-	-	-	POS
05/09/2011	2011-SET	-	SANGUE-EDTA	-	-	-	-	POS
05/09/2011	2011-SET	-	SANGUE-EDTA	-	-	-	-	POS
05/09/2011	2011-SET	-	SANGUE-EDTA	-	-	-	-	POS

Tabella 30. Riassunto dei risultati (test sierologici e molecolari) dei campioni dei 5 pazienti con infezione da Dengue virus del 2010 e 2011.

Altri 6 casi di DENV sono stati diagnosticati solo con tecniche sierologiche e i risultati vengono di seguito riportati:

DATA PRELIEVO	ANNO- MESE	ETÀ	CAMPIONE	IgM	TITOLO	IgG	TITOLO
23/12/2008	2008-DIC	52	SIERO	POS	1:40	POS	>1:160
23/12/2008	2008-DIC	53	SIERO	POS	1:40	POS	>1:160
18/05/2009	2009-MAG	53	SIERO	NEG	-	POS	>1:160
09/09/2010	2010-SET	57	SIERO	POS	1:40	POS	>1:100
04/10/2010	2010-OTT	46	SIERO	POS	1:80	POS	1:800
28/02/2011	2011-FEB	36	SIERO	POS	1:20	NEG	-
17/04/2013	2013-APR	40	SIERO	POS	<1:10	NEG	-

Tabella 31. Riassunto dei risultati dei campioni dei 6 pazienti con infezione da Dengue virus diagnosticati tra il 2008 e il 2013 con test sierologici.

Tra il 2014 e l'inizio del 2016 sono stati identificati 5 casi di Dengue virus:

- * un ragazzo di 23 anni ricoverato per febbre Dengue, rientrato da un viaggio in India (vicino Calcutta) a metà ottobre 2014; presentava febbre, artromialgie, rash eritematoso diffuso, irritazione congiuntivale, e, agli esami ematochimici, leuco-piastripenia e PCR negativa. Sono stati ritrovati anticorpi specifici (IgM con titolo maggiore di 1:80 e IgG con titolo 1:128) e l'RNA virale (ct=35); il campione di sangue-EDTA è stato poi sottoposto a genotipizzazione;
- * un 26enne rientrato da un viaggio in Costa Rica (ottobre-novembre 2014), ricoverato per febbre Dengue; il paziente presentava gli stessi sintomi del precedente e in aggiunta linfadenomegalie laterocervicali e retrocervicali; sono stati inoltre riportati due episodi di scariche diarroiche e un episodio di vomito in corso di febbre. Anche in questo caso sono stati ritrovati anticorpi specifici (IgM con titolo minore di 1:20 e IgG con titolo 1:512) e l'RNA virale (ct=33); il campione di sangue-EDTA è stato poi sottoposto a genotipizzazione;
- * un uomo di 39 anni anche lui rientrato dalla Costa Rica (ottobre-novembre 2014); il paziente mostrava una chiara sintomatologia riconducibile ad un'infezione da febbre Dengue con febbre, artromialgie, rash eritematoso diffuso, irritazione congiuntivale; agli

esami ematochimici si sono riscontrate leuco-piastrinopenia e PCR negativa. Con il test dell'immunofluorescenza sono stati individuati anticorpi di classe IgM (titolo 1:10) ma le IgG non erano ancora comparse. È stato possibile quindi individuare il genoma virale sul campione di sangue-EDTA mediante real-time RT-PCR (ct=31) e successivamente è stata condotta la caratterizzazione molecolare mediante sequenziamento;

- * un ragazzo di 23 anni rientrato dal Bangladesh nell'ottobre 2015. Il paziente ha mostrato un titolo anticorpale maggiore di 1:100 sia per le IgM che per le IgG. Si è riscontrato l'RNA virale in real-time RT-PCR (ct=37) e RT-PCR di sequenziamento. Il campione è stato quindi genotipizzato.
- * una donna di 38 anni, tornata da un viaggio in Thailandia e Cambogia ad inizio gennaio 2016. Alle indagini molecolari il campione è di sangue-EDTA è risultato positivo (ct=37). Sono ancora in corso le analisi per la genotipizzazione.

Per alcuni di questi campioni, ovvero per i due pazienti tornati dalla Costa Rica e per il ragazzo rientrato da Calcutta, si è tentato di isolare il virus su colture cellulari di Vero E6 ma senza successo.

DATA PRELIEVO	ANNO-MESE	ETÀ	CAMPIONE	IgM	TITOLO	IgG	TITOLO	real-time
19/11/2014	2014-NOV	23	SANGUE-EDTA	-	-	-	-	POS
18/11/2014	2014-NOV	23	SIERO	POS	>1:80	POS	1:128	-
19/11/2014	2014-NOV	26	SANGUE-EDTA	-	-	-	-	POS
18/11/2014	2014-NOV	26	SIERO	POS	<1:20	POS	>1:512	-
05/12/2014	2014-DIC	26	SIERO	POS	1:320	POS	1:1048	POS
19/11/2014	2014-NOV	39	SANGUE-EDTA	-	-	-	-	POS
18/11/2014	2014-NOV	39	SIERO	POS	1:10	NEG	-	-
23/10/2015	2015-OTT	23	SANGUE-EDTA	-	-	-	-	POS
12/11/2015	2015-NOV	23	SIERO	POS	>1:100	POS	>1:100	-
14/01/2016	2016-GEN	38	SANGUE-EDTA	-	-	-	-	POS
14/01/2016	2016-GEN	38	SIERO	POS	1:100	POS	>1:100	-

Tabella 31. Riassunto dei risultati dei campioni dei 5 pazienti con infezione da Dengue virus diagnosticati tra il 2014 e l'inizio del 2016 con test sierologici.

DATA PRELIEVO	ANNO-MESE	ETÀ	CAMPIONE	real-time	CT	RT-PCR	SIEROTIPO
19/11/2014	2014-NOV	23	SANGUE-EDTA	POS	35	POS	DEN1
19/11/2014	2014-NOV	26	SANGUE-EDTA	POS	33	POS	DEN1
19/11/2014	2014-NOV	39	SANGUE-EDTA	POS	31	POS	DEN1
23/10/2015	2015-OTT	23	SANGUE-EDTA	POS	37	POS	DEN1
14/01/2016	2016-GEN	38	SANGUE-EDTA	POS	37	-	-

Tabella 32. Riassunto dei risultati ai test molecolari dei campioni dei 5 pazienti con infezione da Dengue virus diagnosticati tra il 2014 e l'inizio di gennaio 2016 in cui si è riscontrato l'RNA virale.

I campioni positivi alla real-time RT-PCR sono stati sottoposti a RT-PCR di sequenziamento. Dalle analisi delle sequenze è emerso il sierotipo DEN1 in tutti e tre i casi. Nell'albero filogenetico relativo al gene E del Dengue virus possiamo vedere le sequenze di 3 pazienti del 2014 e di 1 del 2015 allineate con alcune sequenze rappresentative dei vari sierotipi. Le sequenze da noi ottenute vengono mostrate in viola e sono (Figura 63):

- ✓ DEN/FVG.ITA/47.2014/2/5057;
- ✓ DEN/FVG.ITA/47.2014/3/9176;
- ✓ DEN/FVG.ITA/47.2014/1/5056;
- ✓ DEN/FVG.ITA/43.2015/1/5184.

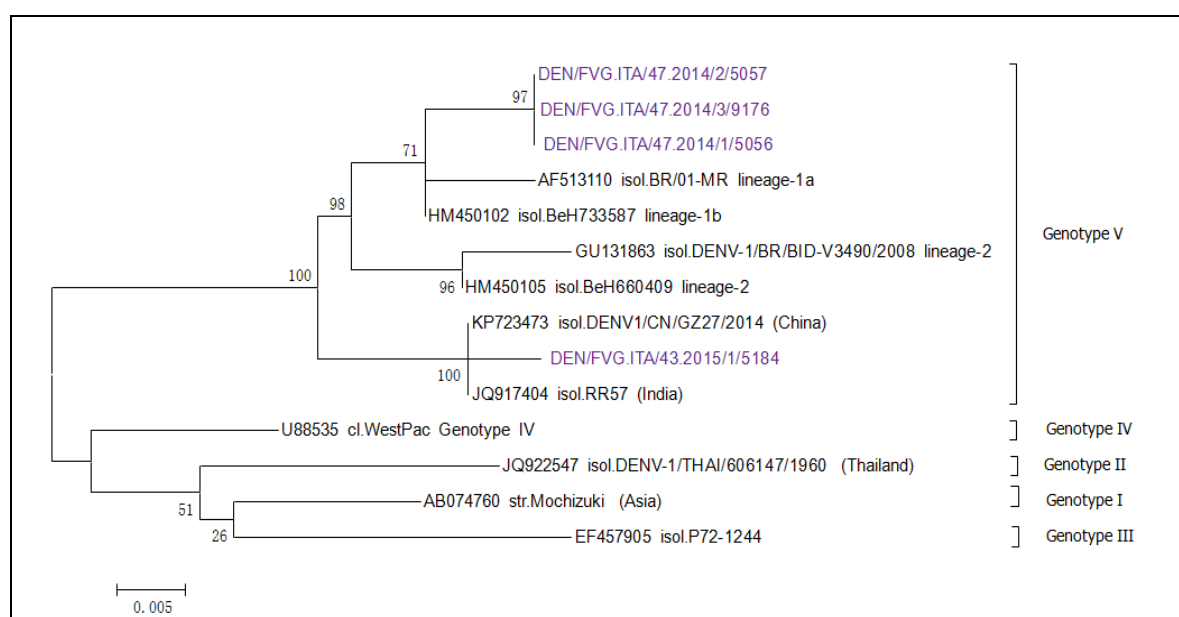


Figura 63. Albero filogenetico relativo alle sequenze dei pazienti del 2014 e di uno del 2015.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo progetto di dottorato di ricerca confermano che le arbovirosi rappresentano un problema emergente di sanità pubblica per il nostro Paese e in particolare per la regione Friuli Venezia Giulia. L'aumento dei viaggi internazionali e del commercio ha cambiato la distribuzione di queste infezioni a livello globale, facilitando la diffusione dei vettori e dei virus in nuove aree, con caratteristiche climatiche e geografiche piuttosto diverse da quelle di origine. Gli Arbovirus infatti possono essere introdotti da viaggiatori, uccelli migratori o vettori trasportati attraverso gli scambi tra le nazioni. La zanzara tigre ne costituisce sicuramente un esempio paradigmatico: la zanzara asiatica, *Aedes albopictus*, è stata infatti introdotta in Italia tramite il commercio di pneumatici e si è poi diffusa su tutto il territorio. In Emilia-Romagna è stata coinvolta in un'epidemia causata dal Chikungunya virus a partire da un caso importato dall'India. La stessa specie di zanzara è stata responsabile di casi autoctoni di Dengue virus in Francia ed in Croazia [Roiz et al., 2012].

La sinergia tra sorveglianza entomologica, veterinaria e umana risulta essere un importante strumento di monitoraggio delle arbovirosi, soprattutto nel caso di virus emergenti. Per capire meglio la diffusione e distribuzione dei virus studiati nella nostra regione è utile trattarli separatamente.

Nel corso di questi ultimi dieci anni l'attività di sorveglianza ha dimostrato che in Friuli Venezia Giulia la TBE è endemica solo in alcune aree della regione, come le Prealpi Orientali, la Valcanale, le Alpi Carniche e la zona dell'Alto Tagliamento. Il primo caso autoctono di TBEV in FVG è stato riportato nel 2001; da allora sono stati identificati 86 casi di infezione, distribuiti prevalentemente nell'area alpina settentrionale. Nel 2013 sono stati segnalati per la prima volta dei casi in provincia di Trieste, in particolare nell'altopiano carsico [Caracciolo et al., 2015]. Analizzando i dati raccolti per la SIR FVG (Sistema Informativo Regionale Friuli Venezia Giulia), si è osservato che il numero dei casi risulta aumentato nel 2005 (11 casi), nel 2006 (10 casi), nel 2009 (10 casi), nel 2012 (11 casi) e nel 2013 (10 casi). La sintomatologia predominante è stata quella neurologica (70 casi) e nella maggior parte i soggetti avevano più di 60 anni. Circa 1/3 dei pazienti ricordava di aver subito un morso di zecca, 1/3 non ricordava di essere stato esposto al

vettore e alcuni hanno riportato di essere stati in zone a rischio. I casi sono stati poi suddivisi in base alla zona di esposizione al vettore dichiarata dall'anamnesi, così da delineare la distribuzione geografica del rischio: la maggior parte delle infezioni è stata contratta nelle Prealpi Carniche (17 casi), nella Valcanale (14 casi) e nel Canal del Ferro (19 casi), zone in cui sono state rinvenute zecche positive grazie agli studi sui vettori da noi effettuati nel corso degli anni. Alcuni contagi sono avvenuti al di fuori del FVG ovvero in Austria, Slovenia e Ungheria, aree endemiche per TBEV.

La sorveglianza su *Ixodes ricinus*, vettore del sottotipo europeo del virus, si è dimostrata un indicatore precoce e sensibile di malattia in quanto si è visto che le positività riscontrate nei vettori nei siti campionati hanno preceduto l'insorgenza di nuovi casi di infezione nell'uomo. Dagli studi condotti sui vettori nel corso degli anni si è dimostrata la presenza del TBE virus in FVG in forma endemica. Un primo studio nel biennio 2005-06 aveva evidenziato una prevalenza del virus nel vettore dello 0.27%, con una distribuzione geografica concentrata in Canal del Ferro nei siti di Roveredo e Val Raccolana e con una positività isolata a Forni di Sotto [D'Agaro et al., 2009], inizialmente considerata un falso positivo e successivamente rivalutata alla luce del caso di TBE del 2009. Nel 2007 si è evidenziata una prevalenza dello 0.28%, nel 2008 dello 0.48% e nel 2009 dello 0.58%, con un apparente trend in crescita. La distribuzione delle zecche infette era inizialmente raggruppata in una zona ben delimitata nella regione alpina del FVG, dove si erano verificati i primi casi umani di TBE. L'area si è poi allargata fino a comprendere l'area prealpina. La prevalenza di TBEV nelle zecche nelle stagioni 2011, 2012 e 2013 è risultata complessivamente dell'1.3% nel 2011 (CI 95% 4.5 e 22.7%), dello 0.8% nel 2012 (CI 95% 2 e 22.1%) e dello 0.13% nel 2013 (CI 95% 0.4 e 30%). Valutando le prevalenze nelle diverse aree geoclimatiche si possono osservare valori diversi e variabili. Nelle Prealpi Carniche la prevalenza registrata nel corso degli anni è rimasta costante, ovvero è stata di 0.12% nel 2011 (CI 95% 0.1 e 5.2‰), 0.15% nel 2012 (CI 95% 0.1 e 6.6‰) e 0.14% nel 2013 (CI 95% 0.1 e 6.3‰). Nel Canal del Ferro invece i valori sono risultati di 0.5% nel 2011 (CI 95% 1.8 e 10.6‰), di 0.17% nel 2012 (CI 95% 0.1 e 7.5‰) e di 3.02% nel 2013 (CI 95% 21.1 e 60.1‰). Nel 2013 positività si sono registrate anche nella Carnia Centro-orientale, con una prevalenza dello 0.99% (CI 95% 3.5 e 21.1‰), e nelle Prealpi Giulie, con una prevalenza dell'1.18% (CI 95% 5.7 e 21.1‰). Questi valori sono comparabili a quelli descritti in altre aree dell'Europa occidentale dove si rileva una prevalenza generalmente compresa tra lo 0.2 ed il 2% [Suss et al., 2006].

Allo screening molecolare, sono risultati positivi ulteriori 5 pool di zecche raccolte a

Raccolana il 18 aprile e il 16 maggio 2011. Anche per la stagione 2012 sono risultati positivi alle indagini molecolari ulteriori 4 pool di zecche raccolte a Pontebba il 15 maggio. Per la stagione 2013 sono risultati positivi ulteriori 13 quattro pool di zecche ripettivamente quattro ad Amaro (raccolte il 14 maggio), sette a Lusevera (raccolte il 15 maggio) e due a Pontebba (raccolte il 18 maggio). Queste positività non sono però state prese in considerazione nell'elaborazione dei dati perché presentavano una carica virale molto bassa. Queste zecche erano contenute nelle stesse provette di zecche positive ad elevata carica virale e le sequenze ottenute da questi pool erano identiche a quelle dei pool con carica virale elevata. Riteniamo queste positività come effetto di una contaminazione superficiale da parte della saliva infetta delle zecche positive ad elevata carica in un momento successivo alla raccolta nella provetta o nella manipolazione dei vettori durante la loro identificazione/classificazione.

Nel 2014 non ci sono state positività ma i dati sono parziali e non confrontabili con quelli delle stagioni precedenti in quanto è stato effettuato un singolo campionamento stagionale e non due come di routine. Infatti i pool, e quindi il numero di zecche, sono inferiori rispetto alle altre stagioni: le zecche analizzate complessivamente sono state 2513, quasi la metà rispetto alla stagione precedente (5097).

Per avere risultati affidabili sulle prevalenze totali è quindi necessario analizzare un numero consistente di campioni.

La prevalenza per area geoclimatica invece non sembra essere correlata alla numerosità delle zecche campionate; infatti zecche infette con TBEV sono state riscontrate sia in aree come il Canal del Ferro dove in ogni stagione sono state raccolte quantità elevate di zecche, sia in Valcanale dove ne sono state campionate il numero minore. È interessante notare come aree in cui vi è un'abbondante densità del vettore, ovvero nelle Prealpi Giulie e nelle Prealpi Carniche si siano trovate zecche infette solo nel 2013. A Lusevera infatti, fino al 2013, non erano mai state rilevate positività nonostante l'elevato numero di vettori campionati ogni stagione.

La distribuzione geografica dei campioni positivi conferma quindi la presenza di un'area endemica che comprende il Canal del Ferro e le aree vicine della Valcanale, oltre ad identificare un allargamento dell'area alla fascia prealpina della regione che coinvolge le Prealpi Carniche e le Prealpi Giulie.

L'analisi molecolare ha evidenziato la circolazione di diverse varianti distinte del sottotipo europeo occidentale. La differenze nelle sequenze ottenute, soprattutto quelle del gene Env che sono più significative perché più lunghe, sembrano suggerire un'evoluzione dei virus

in relazione all'area di campionamento e quindi alla loro diffusione.

Le differenze nucleotidiche riscontrate tra i diversi campioni non solo sono importanti per lo studio dell'evoluzione e dell'epidemiologia molecolare dei virus circolanti ma perché confermano indirettamente la validità dei risultati escludendo la presenza di false positività da contaminazione di laboratorio. Infatti, le tecniche di amplificazione molecolare utilizzate per l'identificazione del TBEV nei campioni sono caratterizzate da un'elevata sensibilità analitica essendo in grado di riconoscere poche copie di templatato. La bassa prevalenza e l'elevata sensibilità analitica possono comportare una drammatica riduzione della predittività positiva legata principalmente a problemi di contaminazione da ampliconi nelle tecniche di PCR tradizionale. Per ovviare a questo problema sono state utilizzate nello studio due Real-time RT-PCR per l'amplificazione di regioni del 3' NCR e del gene E. La real-time RT-PCR infatti, essendo un sistema di amplificazione chiuso, è meno soggetta a problemi di contaminazione e di false positività e semplifica la quantificazione del templatato presente nel campione.

L'analisi molecolare e lo studio filogenetico relativo al gene NS5 dei campioni 2011-2012 confermano la circolazione nell'area studiata di virus appartenenti al sottotipo europeo occidentale. Le sequenze ottenute si raggruppano in cluster evolutivi differenti: il principale presenta un elevato grado di identità con il ceppo finlandese Isosaari; un altro gruppo comprende ceppi in parte riconducibili alla variante Hypr circolante nei paesi vicini, Slovenia e Austria; in particolare vi sono delle similitudini con il ceppo sloveno Cerkno H55.

Nell'analisi molecolare relativa al gene env, i ceppi identificati nei pool del 2011 si raggruppano assieme a quelli ottenuti nella stessa area geoclimatica (Canal del Ferro) negli anni precedenti e hanno elevate omologie con ceppi sloveni (Slovenia.Trzic/H-58/2009 e Ljubljana) e con il ceppo tedesco EU872053/T1401/Germania. Il ceppo ottenuto dal campione del 2012 si raggruppa invece con un ceppo svizzero, HM46819 Unterengstringen (CH), molto simile al ceppo da noi isolato da un campione umano del 2013 (FVG/H-ZT1941/2013).

La sequenza relativa al gene NS5 ottenuta dal pool di Lusevera del 2013 si raggruppa invece con i campioni positivi degli anni precedenti (2005, 2006 e 2007) e mostra omologie con il ceppo Neudoerfl (ceppo vaccinale). La sequenza di Tramonti di Sopra del 2013 risulta legata filogeneticamente con il ceppo Toro, mostrando omologie con ceppi del 2011 e 2012 e con un campione umano del 2004, oltre che con un campione umano del 2012. Le varianti Toro e Neudoerfl circolano entrambi in Austria e Slovenia. La sequenza

del pool di Pontebba (sempre del 2013) presenta un elevato grado di identità con il ceppo finlandese Isosaari. Un ulteriore cluster evolutivo raggruppa la sequenza di Amaro del 2013 e ceppi da noi isolati nel FVG nelle stagioni precedenti, includendo anche un caso umano del 2012.

Per quanto riguarda il gene *env*, le sequenze di Amaro e Pontebba 2013 si raggruppano in un cluster evolutivo legato a ceppi isolati in Slovenia (Ljubljana-like). Il pool di Tramonti di Sopra è legato filogeneticamente ai campioni umani del 2012 e al ceppo sloveno Cerkno/H-55/2007. Infine la sequenza di Lusevera mostra elevate omologie con i ceppi appartenenti al cluster ceco Stara Ves.

Come già detto, le aree più interessate dall'infezione sono risultate essere la zona alpina e prealpina delle province di Udine e di Pordenone. Fino al 2013 non era stato documentato nessun caso autoctono di TBE nelle province di Gorizia e di Trieste. Quest'ultima è caratterizzata da un'elevata diffusione della zecca *Ixodes ricinus*, spesso portatrice di *Borrelia burgdorferi*, agente eziologico della malattia di Lyme. La prevalenza di *B. burgdorferi* nelle zecche del Carso triestino è la più alta della regione ($\geq 40\%$). I tre casi diagnosticati nel 2013 nella provincia di Trieste potrebbero essere associati ad una diffusione di zecche infette provenienti da aree limitrofe confinanti con la Slovenia, zona endemica per il virus [Knap et al., 2013].

Il primo caso diagnosticato in provincia di Trieste vede coinvolto un paziente con linfoma a cellule B e neoplasia a cellule dendritiche plasmocitoidi blastiche. L'infezione si è caratterizzata da una prolungata presenza del virus nel sangue e nelle urine. L'infezione è stata confermata con metodi sierologici evidenziando una chiara positività per gli anticorpi di classe IgM, mentre le IgG hanno mostrato un decorso atipico: il paziente aveva un deficit di produzione di IgG specifiche. Da quanto emerge dalla letteratura, questo è anche il primo caso riportato di infezione persistente di TBEV in un paziente immunodepresso. Vi sono infatti documentate infezioni più brevi in animali con sistema immunitario compromesso come criceti e topi diabetici affetti da WNV [Mateo et al., 2006; Kumar et al., 2012], ma si sa ancora poco di quanto accade nell'uomo. Inoltre va sottolineato che l'escrezione urinaria del TBEV è stata dimostrata solo recentemente [Veje et al., 2014] e che la viremia è stata identificata nella frazione eritrocitaria, mentre solitamente il bersaglio dei Flavivirus è costituito dalla linea monocito-macrofagica. Quest'ultima interessante caratteristica era già stata descritta precedentemente in merito a infezioni da WNV in donatori di sangue [Rios et al., 2007]. Si pensa che la presenza del virus a livello

eritrocitario potrebbe determinare un rischio di trasmissione attraverso trasfusioni nelle aree endemiche per TBE virus. La dimostrazione della presenza del TBE virus nelle urine, invece, potrebbe diventare un utile strumento per la diagnosi e per gli studi di epidemiologia molecolare. Tuttavia rimane da chiarire se la presenza del virus nelle urine sia confinata a casi particolari, come ad esempio in soggetti immunodepressi, oppure possa essere ricercata nella diagnosi di routine. Dalle analisi filogenetiche si è riscontrata sia una forte omologia tra le sequenze del paziente e quelle dei ceppi isolati in Slovenia e in Europa centrale e settentrionale (sottotipo europeo) sia una somiglianza con i ceppi da noi isolati dai vettori.

Dopo i tre casi di TBE del 2013 non sono stati segnalati altri casi, probabilmente perché osservando i dati di copertura vaccinale della regione FVG, c'è stato un aumento di vaccinazioni. Il numero dei soggetti vaccinati è più elevato nella provincia di Udine (più di 31 mila dal 2006 al 2014), seguito da Pordenone (oltre gli 11 mila), mentre la copertura vaccinale in provincia di Gorizia e di Trieste è minore, con circa 3 mila e 5 mila soggetti vaccinati rispettivamente. Nella provincia di Trieste nel 2013 e 2014 la percentuale di vaccinati è aumentata del 50% (936 vaccinazioni nel 2013 e 869 nel 2014). Il calo di incidenza dell'infezione potrebbe essere peraltro spiegato anche da una diminuzione di positività nei vettori.

Il West Nile virus è presente in Italia dal 1998 (epidemia in cavalli in Toscana). Nel 2008 sono stati segnalati i primi casi di forme neuro invasive in Emilia-Romagna (FE e BO) e in Veneto (RO), in concomitanza di un'estesa epidemia nei cavalli (più di 700). Nel 2009 l'infezione si è diffusa alle province di Modena, Mantova e Venezia seguita da un rallentamento nel 2010 con soli tre casi in Veneto. Nel 2011 si sono avuti invece 8 casi in Veneto, 4 in Sardegna e 2 nel Friuli Venezia Giulia. Dal 2009 è stato attuato, nelle zone di circolazione virale, lo screening delle donazioni di sangue con NAT (Nucleic acid testing). Tra settembre e ottobre 2012 nel nostro laboratorio sono stati osservati complessivamente 7 casi di infezione da WNV. Negli anni successivi si sono riportati 1 caso per il 2013, 2 per il 2014 (casi importati) e 3 casi in donatori di sangue asintomatici nel 2015.

La sorveglianza ha potuto identificare e confermare nel corso degli anni la circolazione del WNV sul territorio regionale. L'analisi filogenetica delle sequenze del paziente del 2012 condotta retrospettivamente ha rivelato che il virus appartiene al Lineage 1 ed ha un'elevata identità con il ceppo Italy/2012/Livenza/31.1 (Venezia 2012). Il ceppo di West Nile virus da noi isolato nel 2014 mostra invece forti omologie con i ceppi del Lineage 2

circolanti in Europa centrale (Austria 2008 e Serbia 2013) e meridionale (Grecia e Italia 2013), raggruppandosi nel così detto cluster greco/ungherese. I diversi lineage sono in circolazione da diversi anni e si diffondono lentamente ad aree vicine. In questa trasmissione e diffusione gioca un ruolo fondamentale il fatto che il virus sopravvive nelle zanzare durante la stagione invernale e si amplifica nelle popolazioni di volatili locali, mentre la reintroduzione del virus da parte di uccelli migranti dalla lunga distanza Africa-Europa sembra essere associata all'introduzione di nuovi virus (lineaggi). Infatti il WNV è mantenuto in natura da un ciclo di trasmissione zanzara-volatile-zanzara, in particolare del genere *Culex*.

Da segnalare inoltre che per l'anno 2014, nei paesi europei e del bacino mediterraneo, sono stati riportati 136 casi. Di questi, 51 sono stati segnalati in Serbia, paese d'origine del paziente preso da noi in esame e 9 in Italia Settentrionale.

Una particolare attenzione va posta alla questione dei donatori di sangue asintomatici: solo nel 2015 l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha segnalato 13 positività per WNV in donatori di sangue in Emilia Romagna ed in Lombardia. Nella nostra regione sono stati evidenziati nello stesso anno 3 casi, solo con diagnosi sierologica e in un unico caso anche mediante conferma con test PRNT.

Si rende quindi necessario segnalare tempestivamente i casi di infezione in modo da poter aggiornare l'elenco dei Paesi esteri e delle zone italiane a rischio per il diffondersi del virus. Infatti le donazioni vanno sospese per 28 giorni dopo aver lasciato una zona con casi di malattia nell'uomo nell'anno in corso nei periodi di endemia o dopo la risoluzione dei sintomi se il donatore ha contratto l'infezione. Per ciò che riguarda l'Italia, nel 2015, non hanno potuto donare sangue per 28 giorni tutti i soggetti che hanno soggiornato anche solo per una notte nell'area occidentale della Sardegna, nella pianura padana e in alcune aree del Friuli Venezia Giulia. Stessa profilassi è stata adottata per Canada, Stati Uniti e alcuni Paesi dell'Unione Europea (Romania, Israele, Austria, Serbia, Ungheria, Portogallo).

È importante sottolineare che generalmente le arbovirosi causate da TBE e WN virus rimangono asintomatiche. Infatti solo una minoranza dei pazienti sviluppa una sintomatologia, che è spesso aspecifica e può facilmente essere confusa con una generica infezione da virus influenzale. La patologia si risolve spontaneamente nel giro di qualche giorno e non si ha bisogno di cure mediche specialistiche. Nei casi più gravi, in cui vi è coinvolgimento neurologico, la sintomatologia non è specifica ed è spesso sovrapponibile ad altre sindromi neurologiche. Per questi motivi, i criteri diagnostici devono includere una

combinazione di valutazioni cliniche e di prove di laboratorio ad ampio spettro. L'identificazione del genoma virale mediante tecniche molecolari è complicata dal fatto che la viremia è piuttosto breve, che generalmente è assente quando insorgono i sintomi e che il titolo del virus è basso. Spesso i campioni vengono prelevati quando la viremia è già terminata e il titolo anticorpale è ormai elevato, rendendo difficile l'identificazione dei patogeni. La diagnosi sierologica di queste infezioni, che si basa principalmente su tecniche immuno-enzimatiche, può dare problemi di reattività crociata tra membri della famiglia Flavivirus filogenicamente correlati. Questo fenomeno avviene perché nella risposta immunitaria vengono prodotte immunoglobuline specifiche, principalmente dirette verso la proteina E che contiene determinanti antigenici comuni a tutti i Flavivirus. Il test di neutralizzazione di riduzione delle placche (PRNT) si è dimostrato utile per rilevare gli anticorpi neutralizzanti, incrementando la specificità e superando il problema della cross-reattività degli anticorpi. Questa metodica è stata particolarmente utile ad esempio nell'escludere la diagnosi di WNV in un paziente del 2014 rientrato dal Burkina Faso, nel cui siero erano stati identificati anticorpi specifici anti-WNV. Si tratta però di una metodica più lunga e laboriosa che richiede l'uso di colture cellulari in strutture adeguate (laboratorio di biosicurezza di livello 3). Questo test purtroppo non può essere facilmente impiegato nelle analisi di routine e in qualunque struttura sanitaria. La tempestiva raccolta di campioni è quindi fondamentale per la diagnosi e per successivi studi epidemiologici. Inoltre, vista la sintomatologia simile tra le diverse arbovirosi, si ritiene fondamentale implementare le metodiche per poter identificare diversi patogeni emergenti. Si sta già cercando infatti di mettere a punto dei protocolli per l'identificazione ed il sequenziamento di Flavivirus emergenti e Toscana Virus, di cui è documentata la presenza in Europa e soprattutto in Italia.

La diffusione di patologie trasmesse da vettori è sicuramente aumentata a causa della globalizzazione, dell'incremento dei trasporti internazionali (scambio di merci) e di viaggi in aree endemiche, dell'introduzione di specie esotiche di zanzare in aree in cui possono costituire i potenziali vettori di infezioni esotiche, dell'inadeguato controllo dei vettori, dei cambiamenti climatici. Questo ad esempio è avvenuto in Asia dove si è ormai diffusa la Yellow Fever, infezione trasmessa da *Ae. Aegypti* in Africa e Sud America. Anche la diffusione del WNV nel 1999 negli Stati Uniti, come già detto, ha dimostrato che gli Arbovirus sono in grado di insediarsi in una nuova area, se trovano vettori efficienti e vertebrati suscettibili [Lanciotti et al., 1999]. Altro esempio è la diffusione della Dengue

fever arrivata nelle Americhe, del Chikungunya virus nei Caraibi e in America Centro-meridionale nel 2013 e dello Zika virus in Brasile e in America Centro-meridionale [Fauci et al., 2016]. Per quanto riguarda il Dengue virus sono aumentate anche le epidemie causate da più di un sierotipo (iperendemicità) e la popolazione è a rischio sia nelle aree tropicali che subtropicali.

Negli ultimi anni si è verificato un incremento di casi importati di Dengue virus e Chikungunya virus anche nel nostro Paese. Tra il 2014 ed il 2015 si sono riportati infatti 4 casi di infezione da Chikungunya virus e 5 da Dengue virus. Altri 6 casi di Dengue virus erano stati diagnosticati nell'arco di 5 anni (dal 2008 al 2013).

Con l'immunofluorescenza indiretta vengono rilevati gli anticorpi diretti contro tutti e 4 i sierotipi del DENV. Questi sono morfologicamente ed immunologicamente simili, pertanto sono prevedibili eventuali cross-reazioni. Una differenziazione è stata possibile però comparando i diversi titoli anticorpali. Solo con il sequenziamento si è potuto individuare con certezza il sierotipo. Nei casi in cui è stata possibile la genotipizzazione, il sierotipo identificato è stato il Dengue 1.

I viaggiatori infetti rappresentano un problema di sanità pubblica perché, ritornando nelle città natali ancora viremici, possono dar luogo ad infezioni autoctone in quanto nel nostro Paese le zanzare del genere *Aedes* sono ormai molto diffuse.

Concludendo, i risultati dello studio del TBE virus nelle zecche *I. ricinus* evidenziano un progressivo incremento della prevalenza nel vettore dal 2005 al 2011, per poi diminuire nei due anni successivi. Durante il corso degli anni si è osservato anche un allargamento dell'area interessata dall'infezione da TBEV alla fascia prealpina della regione. La sorveglianza entomologica si conferma quindi un buon indicatore (precoce e sensibile) di circolazione virale. I dati relativi alla caratterizzazione molecolare dei campioni positivi confermano la circolazione di virus appartenenti al sottotipo europeo nell'area studiata. Le differenze nucleotidiche riscontrate tra i diversi campioni confermano la validità dei risultati e permettono di raggruppare le sequenze in cluster evolutivi in parte riconducibili alle varianti circolanti nei paesi vicini (Austria e Slovenia), ma anche in territori più distanti come la Germania e la Repubblica Ceca. Inoltre, i tre casi di TBE identificati nel corso del 2013 nella provincia di Trieste suggeriscono una recente diffusione di zecche infette da TBEV anche nel territorio, finora indenne, della provincia di Trieste ed in particolare nell'area del Carso triestino.

Dal piano regionale delle vaccinazioni per TBEV si è notato un aumento del numero di

vaccinati negli ultimi tre anni: rimane da capire se è per questo che è calata l'incidenza o se è reale il calo della prevalenza del virus nel vettore osservato negli ultimi anni. Si conferma in ogni caso l'importanza della profilassi vaccinale nella regione FVG, resa gratuita per tutti i residenti dal 2012 (DGR n.1311).

Grazie all'attiva sorveglianza si è potuta identificare e confermare nel corso degli anni la circolazione del WNV sul territorio regionale. Il ceppo di West Nile virus del 2012 (Lineage 1) e quello da noi isolato nel 2014 (Lineage 2), dimostrano la circolazione di virus diversi legati in parte alla sopravvivenza del virus nei vettori durante la stagione invernale ma anche all'introduzione nel territorio di nuove varianti.

Negli ultimi anni i cambiamenti climatici e la globalizzazione hanno aumentato il rischio di introduzione e di diffusione anche di patologie trasmesse da vettori di origine tropicale. Si è infatti verificato un incremento di casi importati di infezioni causate da virus quali Dengue virus e Chikungunya virus.

Rimane tutt'oggi il problema della tempestiva raccolta di campioni per la diagnosi di infezione da Arbovirus e per successivi studi epidemiologici e la necessità di implementare le metodiche per poter diagnosticare con certezza questi patogeni. La tecnica PRNT messa appunto si è dimostrata una metodica specifica consentendo di superare (anche se ancora non del tutto) il problema di cross-reattività tra Flavivirus. Sono in corso ulteriori studi per poter identificare altri Flavivirus emergenti tramite metodiche molecolari.

Alla luce di quanto è emerso in questa tesi, risulta importante continuare l'attività di sorveglianza delle Arbovirosi sia per problemi legati alla sanità (donatori infetti asintomatici) sia per la possibile insorgenza di casi autoctoni a partire da casi importati viremici.

6. BIBLIOGRAFIA

- Allison SL, Stadler K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX.** Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. *J Virol.* 1995 Sep;69(9):5816-20.
- Allison SL, Stiasny K, Stadler K, Mandl CW, Heinz FX.** Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. *J Virol.* 1999 Jul;73(7):5605-12.
- Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Heinz FX.** Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J Virol.* 2001 May;75(9):4268-75.
- Amanna IJ, Slifka MK.** Current Trends in West Nile Virus Vaccine Development. *Expert Rev Vaccines.* 2014 May; 13(5): 589-608.
- Amicizia D, Domnich A, Panatto D, Lai PL, Cristina ML, Avio U, Gasparini R.** Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2013 May;9(5):1163-71.
- Andersson CR, Vene S, Insulander M, Lindquist L, Lundkvist A, Günther G.** Vaccine failures after active immunisation against tick-borne encephalitis. *Vaccine.* 2010 Apr 1;28(16):2827-31
- Andries AC, Duong V, Ly S, Cappelle J, Kim KS, Lorn Try P, Ros S, Ong S, Huy R, Horwood P, Flamand M, Sakuntabhai A, Tarantola A, Buchy P.** Value of Routine Dengue Diagnostic Tests in Urine and Saliva Specimens. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Sep 25;9(9):e0004100.
- Angelini P, Tamba M, Finarelli AC, Bellini R, Albieri A, Bonilauri P, Cavrini F, Dottori M, Gaibani P, Martini E, Mattivi A, Pierro AM, Rugna G, Sambri V, Squintani G, Macini P.** West Nile virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: the integrated surveillance system 2009. *Euro Surveill.* 2010 Apr 22;15(16).
- Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, Lelli R, Murri S, Scicluna MT.** West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2002 Dec;8(12):1372-8.
- Azhar E., Kao M., Niedrig M., Masri B., Godus A., Badierah R., Khan N., Almazrooa A., Ashshi A and Jamjoom G.** Virological diagnosis of dengue fever in Jeddah, Saudi Arabia: Comparison between RT-PCR and virus isolation in cell culture *J Infect. Dis.*

Immun. 2010 Nov; 2(2):pp 24-29.

Baba MM, Talle M. The Effect of Climate on Dengue Virus Infections in Nigeria. New York Science Journal, 2011;4(1).

Bakonyi T, Gould EA, Kolodziejek J, Weissenböck H, Nowotny N. Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: comparison with the South African strain SAAR-1776 and other flaviviruses. Virology. 2004 Oct 25;328(2):301-10.

Bakonyi T, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Csörgo T, Lussy H, Chvala S, Bukovsky C, Meister T, Weissenböck H, Nowotny N. Emergence of Usutu virus in Hungary. J Clin Microbiol. 2007; 45(12): 3870-74.

Bakonyi T, Ferenczi E, Erdélyi K, Kutasi O, Csörgő T, Seidel B, Weissenböck H, Brugger K, Bán E, Nowotny N. Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. Vet Microbiol. 2013 Jul 26;165(1-2):61-70.

Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. Science. 1999 Dec 17;286(5448):2333-7.

Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Lavezzo E, Masi G, Squarzon L, Pagni S, Toppo S, Russo F, Cattai M, Cusinato R, Palu G. Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 1 and lineage 2 from human cases of infection, Italy, August 2013. Euro Surveill. 2013 (a) Sep 19;18(38).

Barzon L, Squarzon L, Cattai M, Franchin E, Pagni S, Cusinato R, Palu G. West Nile virus infection in Veneto region, Italy, 2008-2009. Euro Surveill. 2009 Aug 6;14(31).

Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Cattai M, Cusinato R, Palù G. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. J Infect Dis. 2013 (b) Oct 1;208(7):1086-92.

Beasley DW, Li L, Suderman MT, Barrett AD. Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype. Virology. 2002 Apr 25;296(1):17-23.

Becker N, Jöst H, Ziegler U, Eiden M, Höper D, Emmerich P, Fichet-Calvet E, Ehichioya DU, Czajka C, Gabriel M, Hoffmann B, Beer M, Tenner-Racz K, Racz P, Günther S, Wink M, Bosch S, Konrad A, Pfeffer M, Groschup MH, Schmidt-Chanasit J. Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. PLoS ONE. 2012;7:e32604.

Bellini R, Calzolari M, Mattivi A, Tamba M, Angelini P, Bonilauri P, Albieri A,

- Cagarelli R, Carrieri M, Dottori M, Finarelli AC, Gaibani P, Landini MP, Natalini S, Pascarelli N, Rossini G, Velati C, Vocale C, Bedeschi E.** The experience of West Nile virus integrated surveillance system in the Emilia-Romagna region: five years of implementation, Italy, 2009 to 2013. *Euro Surveill.* 2014 Nov 6;19(44).
- Beltrame A, Cruciatti B, Ruscio M, Scudeller L, Cristini F, Rorato G, Gigli GL, Viale P.** Tick-borne encephalitis in Friuli Venezia Giulia, northeastern Italy. *Infection.* 2005 Jun;33(3):158-9.
- Beltrame A, Ruscio M, Cruciatti B, Londero A, Di Piazza V, Copetti R, Moretti V, Rossi P, Gigli GL, Scudeller L, Viale P.** Tickborne encephalitis virus, northeastern Italy. *Emerg Infect Dis.* 2006 Oct;12(10):1617-9.
- Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D.** Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill.* 2014 Apr 3;19(13). pii: 20751.
- Bogovic P, Lotric-Furlan S, Strle F.** What tick-borne encephalitis may look like: clinical signs and symptoms. *Travel Med Infect Dis.* 2010 Jul;8(4):246-50.
- Bogovic P, Strle F.** Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases.* 2015 May 16;3(5):430-41.
- Bowen RA, Nemeth NM.** Experimental infections with West Nile virus. *Curr Opin Infect Dis.* 2007 Jun;20(3):293-7.
- Busani L, Capelli G, Cecchinato M, Lorenzetto M, Savini G, Terregino C, Vio P, Bonfanti L, Pozza MD, Marangon S.** West Nile virus circulation in Veneto region in 2008-2009. *Epidemiol Infect.* 2011 Jun;139(6):818-25.
- Busquets N, Alba A, Allepuz A, Aranda C, Ignacio Nuñez J.** Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerg Infect Dis.* 2008 May;14(5):861-3.
- Cadar D, Becker N, Campos Rde M, Börstler J, Jöst H, Schmidt-Chanasit J.** Usutu Virus in Bats, Germany, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014 Oct;20(10):1771-3.
- Caglioti C, Lalle E, Castilletti C, Carletti F, Capobianchi MR, Bordi L.** Chikungunya virus infection: an overview. *New Microbiol.* 2013 Jul;36(3):211-27.
- Calisher CH, Weinberg AN, Muth DJ, Lazuick JS.** Toscana virus infection in United States citizen returning from Italy. *Lancet* 1987 Jan 17;1(8525):165-6.
- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T.** Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:531-45.
- Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Albieri A, Defilippo F, Maioli G, Galletti G, Gelati A, Barbieri I, Tamba M, Lelli D, Carra E, Cordioli P, Angelini P, Dottori M.** Evidence

of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. *PLoS One*. 2010 Dec 15;5(12):e14324.

Calzolari M, Angelini P, Finarelli AC, Cagarelli R, Bellini R, Albieri A, Bonilauri P, Cavrini F, Tamba M, Dottori M, Gaibani P, Natalini S, Maioli G, Pinna M, Mattivi A, Sambri V, Pierro A, Landini MP, Rossini G, Squintani G, Cinotti S, Varani S, Vocale C, Bedeschi E. Human and entomological surveillance of Toscana virus in the Emilia-Romagna region, Italy, 2010 to 2012. *Euro Surveill*. 2014 Dec 4;19(48):20978.

Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *Lancet Infect Dis*. 2002 Sep;2(9):519-29.

Cantile C, Di Guardo G, Eleni C, Arispici M. Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet J*. 2000 Jan;32(1):31-5.

Capelli G, Ravagnan S, Montarsi F, Ciocchetta S, Cazzin S, Porcellato E, Babiker AM, Cassini R, Salviato A, Cattoli G, Otranto D. Occurrence and identification of risk areas of *Ixodes ricinus*-borne pathogens: a cost-effectiveness analysis in north-eastern Italy. *Parasit Vectors*. 2012 Mar 27;5:61.

Caracciolo I, Bassetti M, Paladini G, Luzzati R, Santon D, Merelli M, Sabbata GD, Carletti T, Marcello A, D'Agaro P. Persistent viremia and urine shedding of tick-borne encephalitis virus in an infected immunosuppressed patient from a new epidemic cluster in North-Eastern Italy. *J Clin Virol*. 2015 Aug;69:48-51.

Cardoso CW, Paploski IA, Kikuti M, Rodrigues MS, Silva MM, Campos GS, Sardi SI, Kitron U, Reis MG, Ribeiro GS. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015 Dec;21(12):2274-6.

Cavrini F, Della Pepa ME, Gaibani P, Pierro AM, Rossini G, Landini MP, Sambri V. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J Clin Virol*. 2011 Mar;50(3):221-3.

Cavrini F, Gaibani P, Longo G, Pierro AM, Rossini G, Bonilauri P, Gerunda GE, Di Benedetto F, Pasetto A, Girardis M, Dottori M, Landini MP, Sambri V. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill*. 2009 Dec 17;14(50).

Cernescu C, Nedelcu NI, Tardei G, Ruta S, Tsai TF. Continued transmission of West Nile virus to humans in southeastern Romania, 1997-1998. *J Infect Dis*. 2000 Feb;181(2):710-2.

Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. The global ecology and epidemiology of West

Nile virus. *Biomed Res Int*. 2015;2015:376230.

Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, Clegg JC, Deubel V, Frolova TV, Gould EA, Gritsun TS, Heinz FX, Labuda M, Lashkevich VA, Loktev V, Lundkvist A, Lvov DV, Mandl CW, Niedrig M, Papa A, Petrov VS, Plyusnin A, Randolph S, Süss J, Zlobin VI, de Lamballerie X. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Dec;10(12):1040-55.

Charrel RN, Bichaud L, de Lamballerie X. Emergence of Toscana Virus in Europe. *Emerg Infect Dis*. 2005 November; 11(11): 1657-1663.

Charrel RN, Izri A, Temmam S, Delaunay P, Toga I, Dumon H, Marty P, de Lamballerie X, Parola P. Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:465-8.
Chvala S, Kolodziejek J, Nowotny N, Weissenböck H. Pathology and viral distribution in fatal Usutu virus infections of birds from the 2001 and 2002 outbreaks in Austria. *J Comp Pathol*. 2004; 131(2-3): 176-85.

Cisak E, Wójcik-Fatla A, Zając V, Sroka J, Buczek A, Dutkiewicz J. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2010 Dec;17(2):283-6.

Ciufolini MG, Fiorentini C, di Bonito P, Mochi S, Giorgi C. Detection of Toscana virus-specific immunoglobulins G and M by an enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant viral nucleoprotein. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2010-2012.

Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E. West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Oct;25(4):635-48.

Cruciatti B, Beltrame A, Ruscio M, Viale P, Gigli GL. Neurological manifestation of tick-borne encephalitis in North-Eastern Italy. *Neurol Sci*. 2006 Jun;27(2):122-4.

D'Agaro P, Martinelli E, Burgnich P, Nazzi F, Del Fabbro S, Iob A, Ruscio M, Pischiutti P, Campello C. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* from a novel endemic area of North Eastern Italy. *J Med Virol*. 2009 Feb;81(2):309-16.

De Filette M, Ulbert U, Diamond M, Sanders NN. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet Res*. 2012; 43(1): 16.

De Lamballerie X, Tolou H, Durand JP, Charrel RN. Prevalence of Toscana virus antibodies in volunteer blood donors and patients with central nervous system infections in southeastern France. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7: 275-7.

Di Bonito P, Mochi S, Grò MC, Fortini D, Giorgi C. Organization of the M genomic segment of Toscana phlebovirus. *J Gen Virol*. 1997 Jan;78 (Pt 1):77-81.

Di Nicuolo G, Pagliano P, Battisti S, Starace M, Mininni V, Attanasio V, Faella FS.

Toscana virus centralnervous system infections in southern Italy. *J Clin Microbiol* 2005;43: 6186-8.

Di Sabatino D, Bruno R, Sauro F, Danzetta ML, Cito F, Iannetti S, Narcisi V, De Massis F, Calistri P. Epidemiology of West Nile Disease in Europe and in the Mediterranean Basin from 2009 to 2013. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 907852.

Diallo M, Thonnon J, Traore-Lamizana M, Fontenille D. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60, 281-286.

Dincer E, Gargari S, Ozkul A, Ergunay K. Potential animal reservoirs of Toscana virus and coinfections with *Leishmania infantum* in Turkey. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Apr;92(4):690-7.

Donadieu E, Bahuon C, Lowenski S, Zientara S, Coulpier M, Lecollinet S. Differential virulence and pathogenesis of West Nile viruses. *Viruses*. 2013 Nov 22;5(11):2856-80.

Donoso Mantke O, Escadafal C, Niedrig M, Pfeffer M, Working Group For Tick-Borne Encephalitis Virus C. Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. *Euro Surveill*. 2011 Sep 29;16(39).

Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Günther S. Rapid Detection and Quantification of RNA of Ebola and Marburg Viruses, Lassa Virus, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Rift Valley Fever Virus, Dengue Virus, and Yellow Fever Virus by Real-Time Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2002 Jul;40(7):2323-30.

Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009;360:2536-43.

Dumpis U, Crook D, Oksi J. Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis*. 1999 Apr;28(4):882-90.

Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol*. 1999 Jan;80 (Pt 1):179-85.

Eitrem R, Stylianou M, Niklasson B. High prevalence rates of antibody to three sandfly fever viruses (Sicilian, Naples, and Toscana) among Cypriots. *Epidemiol Infect*. 1991 Dec; 107(3): 685-691.

Engler O, Savini G, Papa A, Figuerola J, Groschup MH, Kampen H, Medlock J, Vaux

- A, Wilson AJ, Werner D, Jöst H, Goffredo M, Capelli G, Federici V, Tonolla M, Patocchi N, Flacio E, Portmann J, Rossi-Pedruzzi A, Mourelatos S, Ruiz S, Vázquez A, Calzolari M, Bonilauri P, Dottori M, Schaffner F, Mathis A, Johnson N.** European surveillance for West Nile virus in mosquito populations. *Int J Environ Res Public Health*. 2013 Oct 11;10(10):4869-95.
- Ergünay K, Saygan MB, Aydoğan S, Litzba N, Sener B, Lederer S, Niedrig M, Hasçelik G, Us D.** Confirmed exposure to tick-borne encephalitis virus and probable human cases of tick-borne encephalitis in Central/Northern Anatolia, Turkey. *Zoonoses Public Health*. 2011 May;58(3):220-7.
- Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA.** Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virol J*. 2013 Oct 22;10:311.
- Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas - Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med*. 2016 Jan 13.
- Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, Lanciotti RS, Tesh RB.** Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado USA. *Emerg Infect Dis* 2011, 17:5.
- Gabriel M, Resch C, Günther S, Schmidt-Chanasit J.** Toscana virus infection imported from Elba into Switzerland. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jun;16(6):1034-6.
- Gäumann R, Mühlemann K, Strasser M, Beuret CM.** High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Jul;76(13):4241-9.
- Gaunt MW, Sall AA, de Lamballerie X, Falconar AK, Dzhivanian TI, Gould EA.** Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J Gen Virol*. 2001 Aug;82(Pt 8):1867-76.
- Geiss BJ, Thompson AA, Andrews AJ, Sons RL, Gari HH, Keenan SM, Peersen OB.** Analysis of flavivirus NS5 methyltransferase cap binding. *J Mol Biol*. 2009 Feb 6;385(5):1643-54.
- Giladi M, Metzkor-Cotter E, Martin DA, Siegman-Igra Y, Korczyn AD, Rosso R, Berger SA, Campbell GL, Lanciotti RS.** West Nile Encephalitis in Israel, 1999: The New York Connection. *Emerg Infect Dis*. 2001 Jul-Aug;7(4):659-61.
- Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, Lesnikar V, Klobučar A, Pem-Novosel I, Kurečić-Filipović S, Komparak S, Martić R, Duričić S, Betica-Radić L, Okmadžić J, Vilibić-Čavlek T, Babić-Erceg A, Turković B, Avsić-Županc T, Radić I, Ljubić M,**

- Sarac K, Benić N, Mlinarić-Galinović G.** Autochthonous Dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill.* 2011 Mar 3;16(9). pii: 19805.
- Go YY, Balasuriya UBR, Lee C.** Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin Exp Vaccine Res.* 2014 Jan;3(1):58-77.
- Gould EA, Solomon T.** Pathogenic flaviviruses. *Lancet.* 2008 Feb 9;371(9611):500-9.
- Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Ondo SM, Jiolle D, Fontenille D, Paupy C, Leroy EM.** Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Feb; 8(2): e2681.
- Gray JS, Dautel H, Estrada-Peña A, Kahl O, Lindgren E.** Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009;2009:593232.
- Griffin DE.** Recovery from viral encephalomyelitis: immune-mediated noncytolytic virus clearance from neurons. *Immunol Res.* 2010 Jul;47(1-3):123-33.
- Gritsun TS, Nuttall PA, Gould EA.** Tick-borne flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003; 61: 317-371.
- Grò MC, Di Bonito P, Fortini D, Mochi S, Giorgi C.** Completion of molecular characterization of Toscana phlebovirus genome: nucleotide sequence, coding strategy of M genomic segment and its amino acid sequence comparison to other phleboviruses. *Virus Res.* 1997 Sep, 51(1): 81-91.
- Gubler DJ.** Dengue/Dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp.* 2006;277:3-16; discussion 16-22, 71-3, 251-3.
- Guha-Sapir D, Schimmer B.** Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol.* 2005 Mar 2;2(1):1.
- Guirakhoo F, Heinz FX, Mandl CW, Holzmann H, Kunz C.** Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis viruses. *J Gen Virol.* 1991 Jun;72 (Pt 6):1323-9.
- Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A, Seneviratne SL.** Dengue viral infections. *Indian J Dermatol.* 2010;55(1):68-78.
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW.** Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Dec;8(12 Suppl):S7-16.
- Haddow AJ, Williams MC, Woodall JP, Simpson DI, Goma LK.** Twelve Isolations of Zika Virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda

Forest. Bull World Health Organ. 1964;31:57-69.

Haglund M, Vene S, Forsgren M, Günther G, Johansson B, Niedrig M, Plyusnin A, Lindquist L, Lundkvist A. Characterisation of human tick-borne encephalitis virus from Sweden. J Med Virol. 2003 Dec;71(4):610-21.

Harley D, Sleight A, Ritchie S. Ross River virus transmission, infection, and disease: a cross-disciplinary review. Clin Microbiol Rev. 2001 Oct;14(4):909-32.

Heinz FX, Kunz C. Homogeneity of the structural glycoprotein from European isolates of tick-borne encephalitis virus: comparison with other flaviviruses. J Gen Virol. 1981 Dec;57(Pt 2):263-74.

Heinz FX, Stiasny K, Holzmann H, Kundi M, Sixl W, Wenk M, Kainz W, Essl A, Kunz C. Emergence of tick-borne encephalitis in new endemic areas in Austria: 42 years of surveillance. Euro Surveill. 2015 Apr 2;20(13):9-16.

Heinz FX. Molecular aspects of TBE virus research. Vaccine. 2003 Apr 1;21 Suppl 1:S3-S10.

Hemmersbach-Miller M, Parola P, Charrel RN, Paul Durand J, Brouqui P. Sandfly fever due to Toscana virus: an emerging infection in southern France. Eur J Intern Med. 2004 Aug;15(5):316-317.

Hernandez R, Brown DT, Paredes A. Structural differences observed in arboviruses of the alphavirus and flavivirus genera. Adv Virol. 2014;2014:259382.

Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, Sano K, Kurane I, Takasaki T. Detection of Dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. J Clin Microbiol. 2012 Jun;50(6):2047-52.

Howell BA, Azar MM, Landry ML, Shaw AC. Toscana virus encephalitis in a traveler returning to the United States. J Clin Microbiol. 2015 Apr;53(4):1445-7.

Jääskeläinen AE, Tikkakoski T, Uzcátegui NY, Alekseev AN, Vaheri A, Vapalahti O. Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. Emerg Infect Dis. 2006 Oct;12(10):1568-71.

Jöst H, Bialonski A, Maus D, Sambri V, Eiden M, Groschup MH, Günther S, Becker N, Schmidt-Chanasit J. Isolation of Usutu virus in Germany. Am J Trop Med Hyg. 2011;85:551-3.

Kaiser R. Tick-borne encephalitis. Infect Dis Clin North Am. 2008 Sep;22(3):561-75.

Kaiser R. Tick-borne encephalitis: Clinical findings and prognosis in adults. Wien Med Wochenschr. 2012 Jun;162(11-12):239-43.

- Kay MK, Gibney KB, Riedo FX, Kosoy OL, Lanciotti RS, Lambert AJ.** Toscana virus infection in American traveler returning from Sicily, 2009. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:1498-1500.
- Klenk K, Komar N.** Poor replication of West Nile virus (New York 1999 strain) in three reptilian and one amphibian species. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Sep;69(3):260-2.
- Klenk K, Snow J, Morgan K, Bowen R, Stephens M, Foster F, Gordy P, Beckett S, Komar N, Gubler D, Bunning M.** Alligators as West Nile virus amplifiers. *Emerg Infect Dis.* 2004 Dec;10(12):2150-5.
- Knap N, Avšič-Županc T.** Correlation of TBE incidence with red deer and roe deer abundance in Slovenia. *PLoS One.* 2013 Jun 11;8(6):e66380.
- Korhonen EM, Huhtamo E, Virtala AM, Kantele A, Vapalahti O.** Approach to non-invasive sampling in Dengue diagnostics: exploring virus and NS1 antigen detection in saliva and urine of travelers with Dengue. *J Clin Virol.* 2014 Nov;61(3):353-8.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH.** Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 2002 Mar 8;108(5):717-25.
- Kumar M, Roe K, Nerurkar PV, Namekar M, Orillo B, Verma S, Nerurkar VR.** Impaired virus clearance, compromised immune response and increased mortality in type 2 diabetic mice infected with West Nile virus. *PLoS One.* 2012;7(8):e44682.
- Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB.** Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol.* 1998 Jan;72(1):73-83.
- Kupča AM, Essbauer S, Zoeller G, de Mendonça PG, Brey R, Rinder M, Pfister K, Spiegel M, Doerrbecker B, Pfeffer M, Dobler G.** Isolation and molecular characterization of a tick-borne encephalitis virus strain from a new tick-borne encephalitis focus with severe cases in Bavaria, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 2010 Mar;1(1):44-51.
- La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P, Lenglet A, Jourdain F, Leparç-Goffart I, Charlet F, Ollier L, Mantey K, Mollet T, Fournier JP, Torrents R, Leitmeyer K, Hilairet P, Zeller H, Van Bortel W, Dejour-Salamanca D, Grandadam M, Gastellu-Etchegorry M.** First two autochthonous Dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 2010 Sep 30;15(39):19676.
- Labuda M, Kozuch O, Zuffová E, Elecková E, Hails RS, Nuttall PA.** Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent

hosts. *Virology*. 1997 Aug 18;235(1):138-43.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992 Mar;30(3):545-51.

Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R, Bowen M, McKinney N, Morrill WE, Crabtree MB, Kramer LD, Roehrig JT. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*. 2002 Jun 20;298(1):96-105.

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika Virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008, 14(8):1232–1239.

Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Lappin DF, Nakitare GW, Palfreyman JW, Elliott RM. Localization of Bunyamwera bunyavirus G1 glycoprotein to the Golgi requires association with G2 but not with Nsm. *J Gen Virol* 1994, 75 (Pt 12): 3441-3451.

Larsen AL, Kanestrøm A, Bjørland M, Andreassen A, Soleng A, Vene S, Dudman SG. Detection of specific IgG antibodies in blood donors and tick-borne encephalitis virus in ticks within a non-endemic area in southeast Norway. *Scand J Infect Dis*. 2014 Mar;46(3):181-4.

Lasala PR, Holbrook M. Tick-borne flaviviruses. *Clin Lab Med*. 2010 Mar;30(1):221-35.

Laurent-Rolle M, Boer EF, Lubick KJ, Wolfenbarger JB, Carmody AB, Rockx B, Liu W, Ashour J, Shupert WL, Holbrook MR, Barrett AD, Mason PW, Bloom ME, García-Sastre A, Khromykh AA, Best SM. The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. *J Virol*. 2010 Apr;84(7):3503-15.

Levett PN, Sonnenberg K, Sidaway F, Shead S, Niedrig M, Steinhagen K, Horsman GB, Drebot MA. Use of Immunoglobulin G Avidity Assays for Differentiation of Primary from Previous Infections with West Nile Virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(12):5873-5875.

Lim SM, Koraka P, Osterhaus ADME, Martina BEE. West Nile Virus: Immunity and Pathogenesis. *Viruses*. 2011;3(6):811-828.

Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In *Fields Virology*, 2007, 5th Edition, Cap. 33. Eds. Lippincott-Raven Publishers,

Philadelphia.

Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet*. 2008 May 31;371(9627):1861-71.

Liu WJ, Chen HB, Wang XJ, Huang H, Khromykh AA. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J Virol*. 2004 Nov;78(22):12225-35.

Luers AJ, Adams SD, Smalley JV, Campanella JJ. A phylogenomic study of the genus Alphavirus employing whole genome comparison. *Comp Funct Genomics*. 2005;6(4):217-27.

Macini P, Squintani G, Finarelli AC, Angelini P, Martini E, Tamba M, Dottori M, Bellini R, Santi A, Loli Piccolomini L, Po C. Detection of West Nile virus infection in horses, Italy, September 2008. *Euro Surveill*. 2008 Sep 25;13(39).

Madi D, Achappa B, Ramapuram JT, Chowta N, Laxman M, Mahalingam S. Dengue encephalitis-A rare manifestation of Dengue fever. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014 May;4(Suppl 1):S70-2.

Manarolla G, Bakonyi T, Gallazzi D, Crosta L, Weissenböck H, Dorrestein GM, Nowotny N. Usutu virus in wild birds in Northern Italy. *Vet Microbiol*. 2010; 141 (2010) 159-163.

Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol*. 2009 Aug;90(Pt 8):1781-94.

Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol*. 2009 Aug;90(Pt 8):1781-94.

Marchand E, Prat C, Jeannin C, Lafont E, Bergmann T, Flusin O, Rizzi J, Roux N, Busso V, Deniau J, Noel H, Vaillant V, Leparç-Goffart I, Six C, Paty MC. Autochthonous case of Dengue in France, October 2013. *Euro Surveill*. 2013 Dec 12;18(50):20661

Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Oct;22(4):564-81.

Mateo R, Xiao SY, Guzman H, Lei H, Da Rosa AP, Tesh RB. Effects of immunosuppression on West Nile virus infection in hamsters. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Aug;75(2):356-62.

Mavtchoutko V, Vene S, Haglund M, Forsgren M, Duks A, Kalnina V, Hörling J, Lundkvist A. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia. *J Med Virol*.

2000 Feb;60(2):216-22.

Moshkin MP, Novikov EA, Tkachev SE, Vlasov VV. Epidemiology of a tick-borne viral infection: theoretical insights and practical implications for public health. *Bioessays*. 2009 Jun;31(6):620-8.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Jan;3(1):13-22.

Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martínez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, García-Sastre A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol*. 2005 Jul;79(13):8004-13.

Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis*. 2001 Jul-Aug;7(4):692-6.

Nicoletti L, Verani P, Caciolli S, Ciufolini MG, Renzi A, Bartolozzi D, Paci P, Leoncini F, Padovani P, Traini E, Baldereschi M, Balducci M. Central nervous system involvement during infection by *Phlebovirus toscana* of residents in natural foci in central Italy (1977-1988). *Am J Trop Med Hyg*. 1991 Oct;45(4):429-34.

Nikolay B, Diallo M, Boye CS, Sall AA. Usutu virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011 Nov;11(11):1417-23.

Nilsson K, Lindquist O, Liu AJ, Jaenson TG, Friman G, Pålsson C. *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J Clin Microbiol*. 1999 Feb;37(2):400-3.

Nolan MS, Podoll AS, Hause AM, Akers KM, Finkel KW, Murray KO. Prevalence of chronic kidney disease and progression of disease over time among patients enrolled in the Houston West Nile virus cohort. *PLoS One*. 2012;7(7):e40374.

Ostfeld RS, Keesing F. The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can. J. Zool*. Dec 2000;78(12):2061-2078.

Panning M, Grywna K, van Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C. Chikungunya Fever in travelers returning to Europe from the Indian ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2008;14: 416-422.

Parola P, de Lamballerie X, Jourdan J, Rovey, C, Vaillant, V, Minodier, P, Brouqui, P, Flahault, A, Raoult D, Charrel RN. Novel chikungunya virus variant in travellers returning from Indian Ocean islands. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12, 1493-1499.

Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T, Lass U, Sall AA, Niedrig M. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virol J*. 2013 Feb 14;10:58.

Pauli G, Bauerfeind U, Blümel J, Burger R, Drosten C, Gröner A, Gürtler L, Heiden M, Hildebrandt M, Jansen B, Montag-Lessing T, Offergeld R, Seitz R, Schlenkrich U,

- Schottstedt V, Strobel J, Willkommen H.** West Nile virus. *Transfus Med Hemother*. 2013 August; 40(4): 265-284.
- Pecorari M, Longo G, Gennari W, Grottola A, Sabbatini A, Tagliazucchi S, Savini G, Monaco F, Simone M, Lelli R, Rumpianesi F.** First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill*. 2009 Dec 17;14(50).
- Pem-Novosel I, Vilibic-Cavlek T, Gjenero-Margan I, Kaic B, Babic-Erceg A, Merdic E, Medic A, Ljubic M, Pahor D, Erceg M.** Dengue virus infection in Croatia: seroprevalence and entomological study. *New Microbiol*. 2015 Jan;38(1):97-100.
- Petersen LR, Brault AC, Nasci RS.** West Nile virus: review of the literature. *JAMA*. 2013 Jul 17;310(3):308-15.
- Peyrefitte CN, Devetakov I, Pastorino B, Villeneuve L, Bessaud M, Stolidi P, Depaquit J, Segura L, Gravier P, Tock F, Durand F, Vagneur JP, Tolou HJ, Grandadam M.** Toscana virus and acute meningitis, France. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 778-80.
- Platonov AE, Fedorova MV, Karan LS, Shopenskaya TA, Platonova OV, Zhuravlev VI.** Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitol Res*. 2008 Dec;103 Suppl 1:S45-53.
- Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvão LR, Amarilla AA, Poloni DF, Figueiredo LT, Aquino VH.** Detection of Dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virol J*. 2010 Jan 27;7:22.
- Powers, A.M., Logue, C.H.** Changing patterns of chikungunya virus: reemergence of a zoonotic arbovirus. *J. Gen. Virol*. 2007, 88, 2363-2377.
- Puchhammer-Stockl E, Kunz C, Mandl CW, Heinz FX.** Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clin Diagn Virol*. 1995 Dec;4(4):321-6.
- Ralapanawa DM, Kularatne SA, Jayalath WA.** Guillain-Barre syndrome following Dengue fever and literature review. *BMC Res Notes*. 2015 Nov 27;8:729.
- Randolph SE, Rogers DJ.** Fragile transmission cycles of tick-borne encephalitis virus may be disrupted by predicted climate change. *Proc Biol Sci*. 2000 Sep 7;267(1454):1741-4.
- Randolph SE.** Tick-borne encephalitis virus, ticks and humans: short-term and long-term dynamics. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 Oct;21(5):462-7.
- Rao S, Kumar M, Ghosh S, Gadpayle AK.** A rare case of Dengue encephalitis. *BMJ*

Case Rep. 2013 Feb 13;2013.

Remoli ME, Fortuna C, Marchi A, Bucci P, Argentini C, Bongiorno G, Maroli M, Gradoni L, Gramiccia M, Ciufolini MG. Viral isolates of a novel putative phlebovirus in the Marche Region of Italy. *Am J Trop Med Hyg.* 2014 Apr;90(4):760-3.

Rezza G, Farchi F, Pezzotti P, Ruscio M, Lo Presti A, Ciccozzi M, Mondardini V, Paternoster C, Bassetti M, Merelli M, Scotton PG, Luzzati R, Simeoni J, Mian P, Mel R, Carraro V, Zanin A, Ferretto R, Francavilla E; TBE Virology Group. Tick-borne encephalitis in north-east Italy: a 14-year retrospective study, January 2000 to December 2013. *Euro Surveill.* 2015 Oct 8;20(40).

Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A; CHIKV study group. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet.* 2007 Dec 1;370(9602):1840-6.

Rios M, Daniel S, Chancey C, Hewlett IK, Stramer SL. West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood. *Clin Infect Dis.* 2007 Jul 15;45(2):181-6.

Rizzo C, Vescio F, Declich S, Finarelli AC, Macini P, Mattivi A, Rossini G, Piovesan C, Barzon L, Palù G, Gobbi F, Macchi L, Pavan A, Magurano F, Ciufolini MG, Nicoletti L, Salmaso S, Rezza G. West Nile virus transmission with human cases in Italy, August - September 2009. *Euro Surveill.* 2009 Oct 8;14(40). pii: 19353.

Rizzo F, Cerutti F, Ballardini M, Mosca A, Vitale N, Radaelli MC, Desiato R, Prearo M, Pautasso A, Casalone C, Acutis P, Peletto S, Mandola ML. Molecular characterization of flaviviruses from field-collected mosquitoes in northwestern Italy, 2011-2012. *Parasit Vectors.* 2014 Aug 26;7:395.

Rizzoli A, Hauffe HC, Tagliapietra V, Neteler M, Rosà R. Forest structure and roe deer abundance predict tick-borne encephalitis risk in Italy. *PLoS One.* 2009;4(2):e4336.

Robert E. Shope. Capitolo 56: Bunyaviruses. *Medical Microbiology*. 4th edition.

Roiz D, Vázquez A, Rosso F, Arnoldi D, Girardi M, Cuevas L, Perez-Pastrana E, Sánchez-Seco MP, Tenorio A, Rizzoli A. Detection of a new insect flavivirus and isolation of Aedes flavivirus in Northern Italy. *Parasit Vectors.* 2012 Oct 8;5:223.

Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West Nile Virus. *Clinics in laboratory medicine.* 2010;30(1):47-65.

Rudolf I, Bakonyi T, Šebesta O, Mendel J, Peško J, Betášová L, Blažejová H, Venclíková K, Straková P, Nowotny N, Hubálek Z. Co-circulation of Usutu virus and West Nile virus in a reed bed ecosystem. *Parasit Vectors.* 2015 Oct 12;8:520.

- Sambri V, Capobianchi MR, Cavrini F, Charrel R, Donoso-Mantke O, Escadafal C, Franco L, Gaibani P, Gould EA, Niedrig M, Papa A, Pierro A, Rossini G, Sanchini A, Tenorio A, Varani S, Vázquez A, Vocale C, Zeller H.** Diagnosis of west nile virus human infections: overview and proposal of diagnostic protocols considering the results of external quality assessment studies. *Viruses*. 2013;14:2329–2348.
- Samuel MA, Diamond MS.** Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol*. 2006 Oct;80(19):9349-60.
- Santos L, Simões J, Costa R, Martins S, Lecour H.** Toscana virus meningitis in Portugal, 2002-2005. *Euro Surveill* 2007; 12: e3-4.
- Savini G, Monaco F, Calistri P, Lelli R.** Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008. *Euro Surveill*. 2008 Nov 27;13(48).
- Savini G, Monaco F, Terregino C, Di Gennaro A, Bano L, Pinoni C, De Nardi R, Bonilauri P, Pecorari M, Di Gialleonardo L, Bonfanti L, Polci A, Calistri P, Lelli R.** Usutu virus in Italy: an emergence or a silent infection? *Vet Microbiol*. 2011 Aug 5;151(3-4):264-74.
- Schwaiger M, Cassinotti P.** Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol*. 2003 Jul;27(2):136-45.
- Selisko B, Wang C, Harris E, Canard B.** Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication. *Curr Opin Virol*. 2014 Dec;9:74-83.
- Sonderegger B, Hachler H, Dobler G, Frei M.** Imported aseptic meningitis due to Toscana virus acquired on the island of Elba, Italy, August 2008. *Euro Surveill*. 2009 Jan 8;14(1).
- Stadler K, Allison SL, Schlich J, Heinz FX.** Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol*. 1997 Nov;71(11):8475-81.
- Steele KE, Twenhafel NA.** Review paper: pathology of animal models of alphavirus encephalitis. *Vet Pathol*. 2010 Sep;47(5):790-805.
- Steinmetz HW, Bakonyi T, Weissenböck H, Hatt JM, Eulenberger U, Robert N, Hoop R, Nowotny N.** Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland--genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Vet Microbiol*. 2011 Mar 24;148(2-4):207-12.
- Stiasny K, Holzmann H, Heinz FX.** Characteristics of antibody responses in tick-borne encephalitis vaccination breakthroughs. *Vaccine*. 2009 Nov 23;27(50):7021-6.

- Stinco G, Ruscio M, Bergamo S, Trotter D, Patrone P.** Clinical features of 705 *Borrelia burgdorferi* seropositive patients in an endemic area of northern Italy. *ScientificWorldJournal*. 2014 Jan 16;2014:414505.
- Strauss J, Strauss E.** The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev*. 1994 Sep;58(3):491-562.
- Süss J.** Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*. 2003 Apr 1;21 Suppl 1:S19-35.
- Süss J.** Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-An overview. *Ticks Tick Borne Dis*. 2011 Mar;2(1):2-15
- Ten Dam E, Flint M, Ryan MD.** Virus-encoded proteinases of the *Togaviridae*. *J Gen Virol*. 1999 Aug;80 (Pt 8):1879-88.
- Thiberville SD, Moyen N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairède A, Gould EA, Roques P, de Lamballerie X.** Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Res*. 2013 Sep;99(3):345-70.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA.** Eighth Report of the International 91 Committee on Taxonomy of Viruses. London; San Diego: Elsevier, 2005.
- Turell MJ.** Experimental Transmission of Karshi (Mammalian Tick-Borne Flavivirus Group) Virus by *Ornithodoros* Ticks >2,900 Days after Initial Virus Exposure Supports the Role of Soft Ticks as a Long-Term Maintenance Mechanism for Certain Flaviviruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Aug 18;9(8):e0004012.
- Valassina M, Cusi MG, Valensin PE.** Rapid identification of Toscana virus by nested PCR during an outbreak in the Siena area of Italy. *J Clin Microbiol*. 1996 Oct;34(10):2500-2.
- Valassina M, Soldateschi D, Dal Maso GM, Santini L, Bianchi S, Valensin PE, Cusi MG.** Diagnostic potential of Toscana virus N protein expressed in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1998;36:3170-3172.
- Valassina M, Cuppone AM, Bianchi S, Santini L, Cusi MG.** Evidence of Toscana virus variants circulating in Tuscany, Italy, during the summers of 1995 to 1997. *J Clin Microbiol*. 1998 Jul;36(7):2103-4.
- Valassina M, Cusi MG, Valensin PE.** A Mediterranean arbovirus: The Toscana virus. *J Neurovirol*. 2003 Dec;9(6):577-83.
- Valassina M, Valentini M, Pugliese A, Valensin PE, Cusi MG.** Serological survey of Toscana virus infections in a high-risk population in Italy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003b; 10: 483-4.

- Varatharaj A.** Encephalitis in the clinical spectrum of Dengue infection. *Neurol India*. 2010 Jul-Aug;58(4):585-91.
- Vazquez A, Jimenez-Clavero M, Franco L, Donoso-Mantke O, Sambri V, Niedrig M, Zeller H, Tenorio A.** Usutu virus: potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveill*. 2011 (a) Aug 4;16(31). pii: 19935.
- Vazquez A, Ruiz S, Herrero L, Moreno J, Molero F, Magallanes A, Sánchez-Seco MP, Figuerola J, Tenorio A.** West Nile and Usutu viruses in mosquitoes in Spain, 2008-2009. *Am J Trop Med Hyg*. 2011(b);85(1):178-81.
- Vázquez A, Sánchez-Seco M-P, Palacios G, Molero F, Reyes N, Ruiz S, Aranda C, Marque E, Escoosa R, Moreno J, Figuerola J, Tenorio A.** Novel Flaviviruses Detected in Different Species of Mosquitoes in Spain. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 2012;12(3):223-229.
- Veje M, Studahl M, Norberg P, Roth A, Möbius U, Brink M, Bergström T.** Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in urine. *J Clin Microbiol*. 2014 Nov;52(11):4111-2.
- Verani P, Nicoletti L, Marchi A.** Establishment and Maintenance of Persistent Infection by the Phlebovirus Toscana in Vero Cells. *J Gen Virol.*, 1984 Feb;65 (Pt 2):367-75.
- Villordo SM, Gamarnik AV.** Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res*. 2009 Feb;139(2):230-9.
- Vocale C, Bartoletti M, Rossini G, Macini P, Pascucci MG, Mori F, Tampieri A, Lenzi T, Pavoni M, Giorgi C, Gaibani P, Cavrini F, Pierro AM, Landini MP, Viale P, Sambri V.** Toscana virus infections in northern Italy: laboratory and clinical evaluation. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012 Jun;12(6):526-9.
- Weissenböck H, Kolodziejek J, Fragner K, Kuhn R, Pfeffer M, Nowotny N.** Usutu virus activity in Austria, 2001-2002. *Microbes Infect*. 2003 Oct;5(12):1132-6.
- Weissenböck H, Hubálek Z, Bakonyi T, Nowotny N.** Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: Worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Vet. Microbiol*. 2009; Aug 26.
- Weissenböck H, Bakonyi T, Rossi G, Mani P, Nowotny N.** Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg Infect Dis*. 2013 Feb;19(2):274-7.
- Wilson JR, de Sessions PF, Leon MA, Scholle F.** West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J Virol*. 2008 Sep;82(17):8262-71.
- World Health Organization.** Dengue guidelines, for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition, WHO Press, Geneva, 2009.
- Zammarchi L, Stella G, Mantella A, Bartolozzi D, Tappe D, Günther S, Oestereich L,**

Cadar D, Muñoz-Fontela C, Bartoloni A, Schmidt-Chanasit J. Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *J Clin Virol.* 2015 Feb;63:32-5.

Zehender G, Ebranati E, Bernini F, Lo Presti A, Rezza G, Delogu M, Galli M, Ciccozzi M. Phylogeography and epidemiological history of West Nile virus genotype 1a in Europe and the Mediterranean basin. *Infect Genet Evol.* 2011 Apr;11(3):646-53.

Zhang W, Wu J, Li Y, Li F, Njoo H. Rapid and accurate in vitro assays for detection of West Nile virus in blood and tissues. *Transfus Med Rev.* 2009 Apr;23(2):146-54.

PUBBLICAZIONI

Caracciolo I, Bassetti M, Paladini G, Luzzati R, Santon D, Merelli M, Sabbata GD, Carletti T, Marcello A, D'Agaro P. Persistent viremia and urine shedding of tick-borne encephalitis virus in an infected immunosuppressed patient from a new epidemic cluster in North-Eastern Italy. J Clin Virol. 2015 Aug;69:48-51.

Caracciolo I., Santon D., Francesco N., Del Fabbro S., Iob A., Pischutti P., Ruscio M., D'Agaro P. Prevalenza di TBEV in Ixodes Ricinus raccolte in Friuli Venezia Giulia nel periodo 2005-2009.

45° Congresso Nazionale SITI - Cagliari, 3-6 ottobre 2012.

Simone Del Fabbro, Tatiana Trifonova, Pierlanfranco D'Agaro, Ilaria Caracciolo, Francesco Nazzi. Borrelia burgdorferi s.l. infection and questing activity of Ixodes ricinus nymphs: preliminary data.

XII International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Weimar, Germany, 21-23 Marzo 2013 (poster P17).

Ilaria Caracciolo, Manlio Palei, Nora Coppola, Tolinda Gallo, Massimo Zuliani, Luigi Donadoni, Daniela Santon, Elena Samar, Giulia Alberi, Pierlanfranco D'Agaro. L'infezione da West Nile Virus si sposta ad Est; sorveglianza dell'infezione nel Friuli Venezia Giulia.

46° Congresso Nazionale SITI -Taormina, 17-20 ottobre 2013 (comunicazione B19).

Ilaria Caracciolo, Matteo Bassetti, Roberto Luzzati, Giorgio Paladini, Daniela Santon, Elena Samar, Giulia Alberi, Pierlanfranco D'agaro. Una nuova area endemica per l'infezione da TBE nel Friuli Venezia Giulia.

46° Congresso Nazionale SITI -Taormina, 17-20 ottobre 2013 (poster 3.23).

D'Agaro Pierlanfranco, Saraceni Silva, Del Savio Rossella, Papa Nicole, Caracciolo Ilaria, Santon Daniela, Comar Manola. HPV genotypes distribution in Chlamydia Trachomatis and HPV co-infection in a large cohort of women from North-East Italy.

48° congresso nazionale SItI 2015 - Milano 14-17 Ottobre (Poster T06-P163).

RINGRAZIAMENTI

Non sono mai stata brava a esprimere a parole l'affetto che provo per le persone che mi circondano, ma mi rendo conto che talvolta è importante farlo e questa mi pare un'ottima occasione. Il mio pensiero va quindi a tutte le persone che mi sono state vicine, a tutti quelli che hanno creduto (e credono!!) in me e mi hanno sostenuta, in diversi modi e misure, in questo lungo percorso.

Vorrei ringraziare in particolare il Prof. D'Agaro per avermi dato la possibilità di lavorare a questo progetto presso il Laboratorio di Virologia, per avermi aiutata a formarmi professionalmente grazie alla sua competenza e agli utili suggerimenti e consigli.

Ringrazio la mia correlatrice, la Dott.ssa Santon (AuarDani), nonché amica e compagna di banco, per il prezioso supporto e per aver sempre creduto in me, accompagnandomi in tutti questi anni.

Un grazie va anche a Elena e Sara, non solo per il supporto tecnico, ma soprattutto per l'affetto e l'amicizia che non mi hanno mai fatto mancare, per le pause-merenda, per i caffè e per gli attesissimi panino-day!

Ringrazio infinitamente i miei genitori per il loro sostegno e per avermi dato tutti i mezzi possibili per arrivare fin qui.

Ringrazio tutti i miei amici, quelli veri; sono consapevole di essere molto fortunata ad essere circondata da persone splendide su cui posso contare in ogni istante; ognuno di loro a suo modo ha contribuito a rendermi migliore e a fare di me quella che sono oggi.

Infine, the last but not the least, un pensiero speciale va al mio ragazzo Marco per essermi sempre stato accanto e per avermi incoraggiata ad andare avanti nonostante le difficoltà incontrate, sopportandomi e supportandomi. È a lui, l'altra parte di me, il mio punto di riferimento, il mio futuro, che dedico questo successo.

Grazie di cuore a tutti!