

West Nile disease: sorveglianza integrata in Regione Lombardia
Brescia, 12 dicembre 2014



Diagnostica ed epidemiologia della West Nile Disease

Davide Lelli



IZSLER, Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Reparto di Virologia, Via Bianchi 9 – 25124 Brescia Tel. 0302290289, e-mail: virologia@izsler.it

West Nile Disease

- Inquadramento storico
- Il virus
- Il ciclo epidemiologico
- La malattia
- L' approccio diagnostico



West Nile Disease

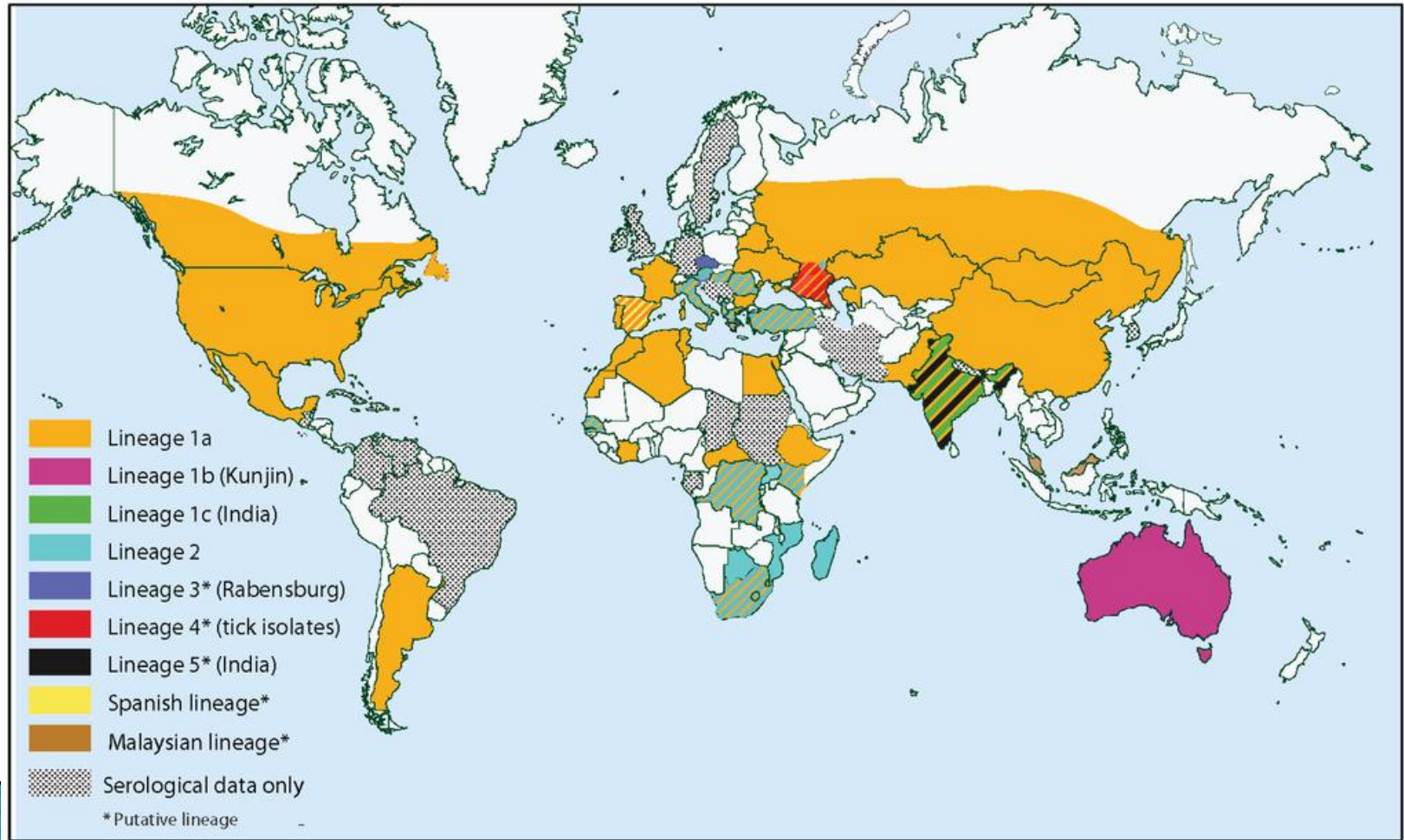
- **1937:** Isolato per la prima in Uganda (distretto di West Nile) dal sangue di una donna con sintomatologia febbrile.
- **1950:** Egitto, WNV nel sangue di tre bambini apparentemente sani.
- **1960-80:** isolato da zanzare, uccelli e mammiferi in diversi paesi dell'Europa (Spagna, Portogallo, Romania, Repubblica Ceca, Slovacchia, Polonia, Russia), Africa, Medio Oriente ed India. (1974, Sudafrica).
- **Dagli anni 90:** costante aumento nel numero delle epidemie nei paesi del Bacino del Mediterraneo (1996 Ungheria).
- **1998:** Italia, Padule del fucecchio
- **1999:** New York (dal 2003 endemica negli USA)



West Nile Disease

...Oggi

WNV presente in tutti i continenti ad eccezione dell'Antartide



West Nile Virus

Family **Flaviviridae** ssRNA, 40-60 nm, envelope

- **Genus Flavivirus**

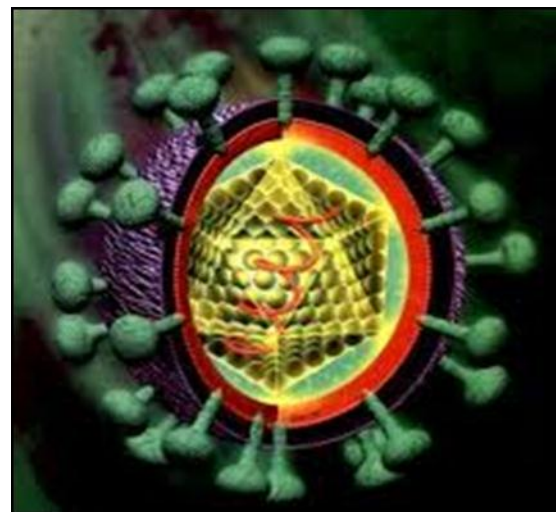
- Mosquito-borne flaviviruses
- Tick-borne flaviviruses
- Virus with no known arthropod vector
- Tentative species in the genus

- **Genus Pestivirus**

- Border disease virus
- Bovine viral diarrhea virus 1
- Classical swine fever virus

- **Genus Hepacivirus**

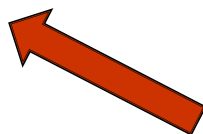
- Hepatitis C virus



West Nile Virus

MOSQUITO-BORNE FLAVIVIRUSES:

- **Aroa virus group**
 - Aroa virus (AROAV)
 - Bussuquara virus (BSQV)
 - Iguape virus (IGUV)
 - Naranjal virus (NJLV)
- **Dengue virus group**
 - Dengue virus 1, 2, 3, 4 (DENV-1, 2, 3, 4)
 - Kedougou virus (KEDV)
- **Japanese encephalitis virus group**
 - Cacipacore virus (CPCV)
 - Koutango virus (KOUV)
 - Japanese encephalitis virus (JEV)
 - Murray Valley encephalitis virus (MVEV)
 - Alfuy virus (ALFV)
 - St. Louis encephalitis virus (SLEV)
 - Usutu virus (USUV)
 - Younde virus (YAOV)
 - kunjin virus (KUNV)
 - West Nile virus (WNV)
- **Yellow fever virus group**
 - Banzi virus (BANV)
 - Bauboui virus (BOUV)
 - Edge Hill virus (EHV)
 - Jugra virus (JUGV)
 - Saboya virus (SABV)
 - Potiskum virus (POTV)
 - Sepik virus (SEPV)
 - Uganda S virus (UGSV)
 - Wesselsbron virus (WESSV)
 - Yellow fever virus (YFV)
- **Kokobera virus group**
 - Kokobera virus (KOKV)
 - Stratford virus (STRV)
- **Nataya virus group**
 - Bagaza virus (BAGV)
 - Ilheus virus (ILHV)
 - Rocio virus (ROCV)
 - Israel turkey meningoencephalomyelitis (ITV)
 - Ntaya virus (NTAV)
 - Tembusu virus (TMUV)



West Nile Virus

MOSQUITO-BORNE FLAVIVIRUSES

Japanese encephalitis virus group

Cacipacore virus (CPCV)

Koutango virus

Japanese encephalitis virus

Murray Valley encephalitis virus

Alfuy virus

St. Louis encephalitis virus

West Nile virus

Usutu virus

Younde virus



Lineage 1

Classe A: Europa, Africa, Medio Oriente, North America (6 clusters)

Classe B: Australia (Kunjin)

Classe C: India

Lineage 2: B 956, Africa Subsahariana e Madagascar. Hungary (2004), Russia (2007), Romania e Grecia (2010), Italia (2011-2014)

Lineage 3: Rabensburg virus (from mosquitoes in the Czech Republic 1997)

Lineage 4: Caucasus region (1988 from tick)

Lineage 5: India

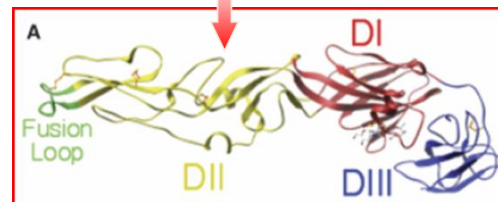
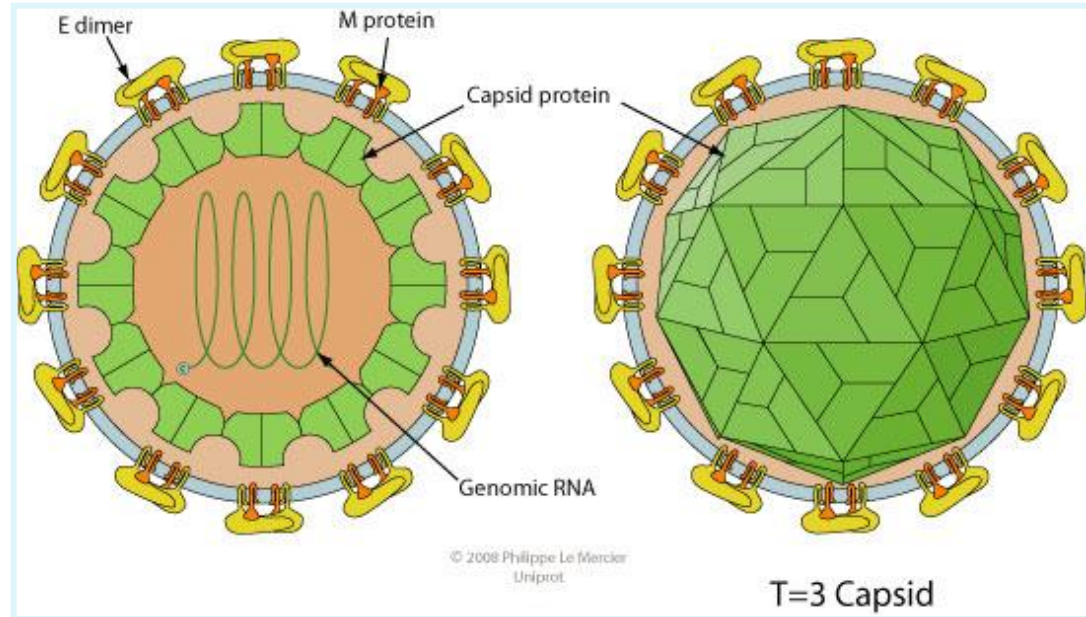
Lineage 6: Sarawak Kunjin (Australia)

Lineage 7: Koutango virus (Africa)



West Nile Virus

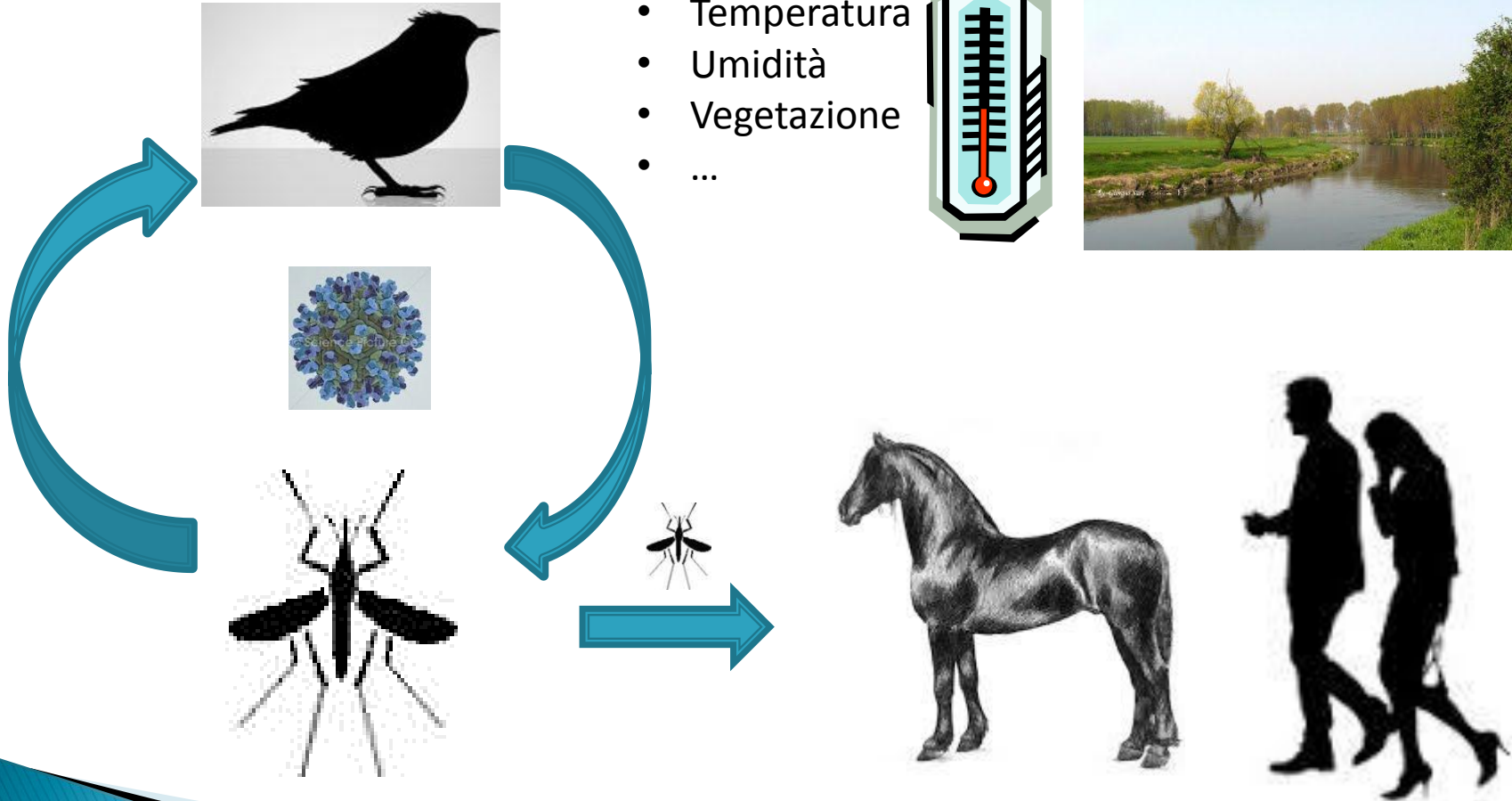
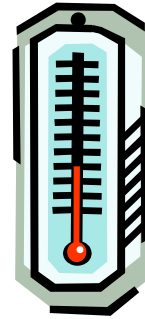
- ssRNA
- capside a simmetria icosaedrica
- con envelope
- 12 kDa
- 3 proteine strutturali: C, E, M
- 7 proteine non strutturali: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5



Ciclo di trasmissione

CONDIZIONI CLIMATICHE E AMBIENTALI

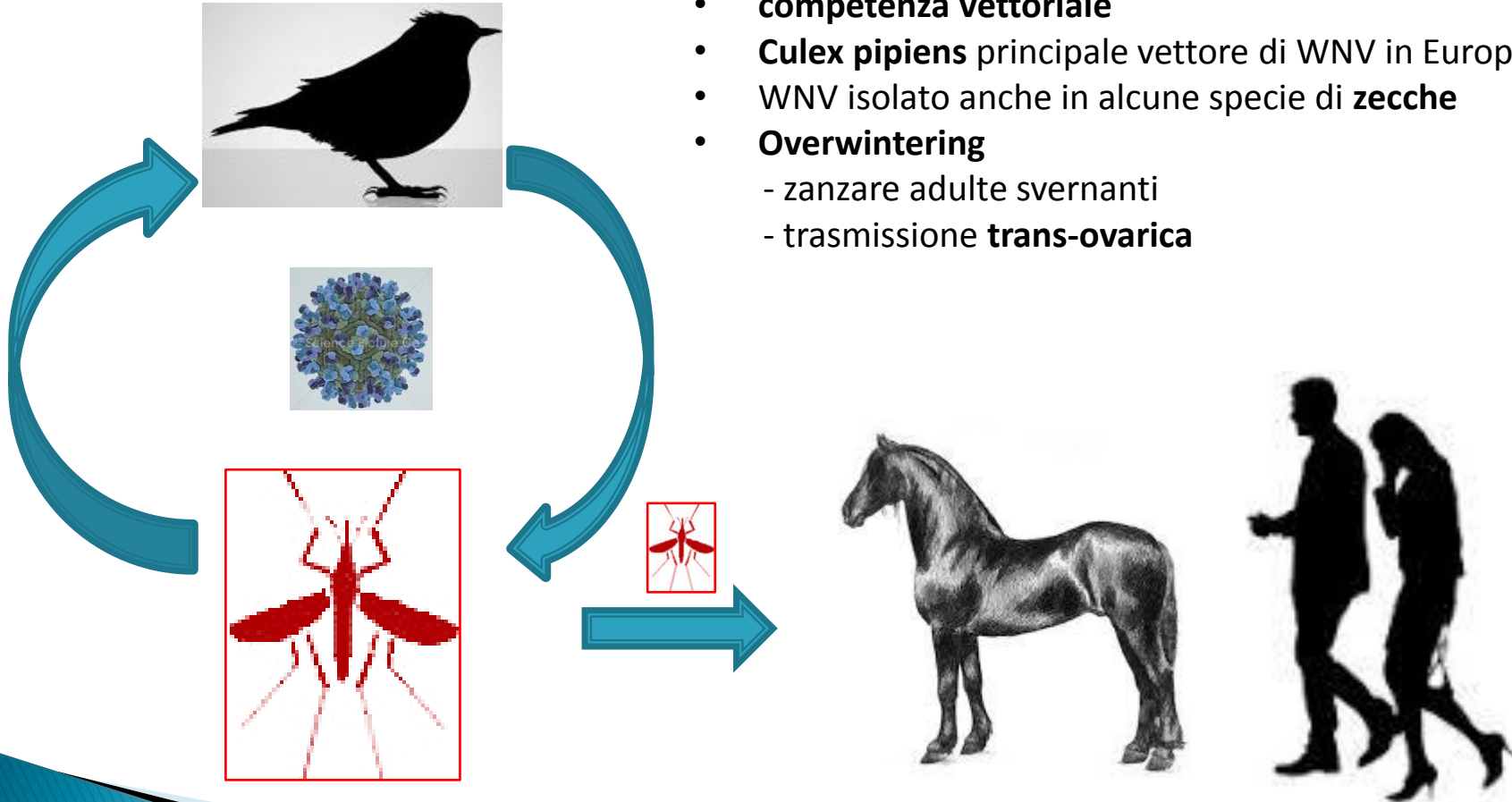
- Temperatura
- Umidità
- Vegetazione
- ...



Ciclo di trasmissione

VETTORE

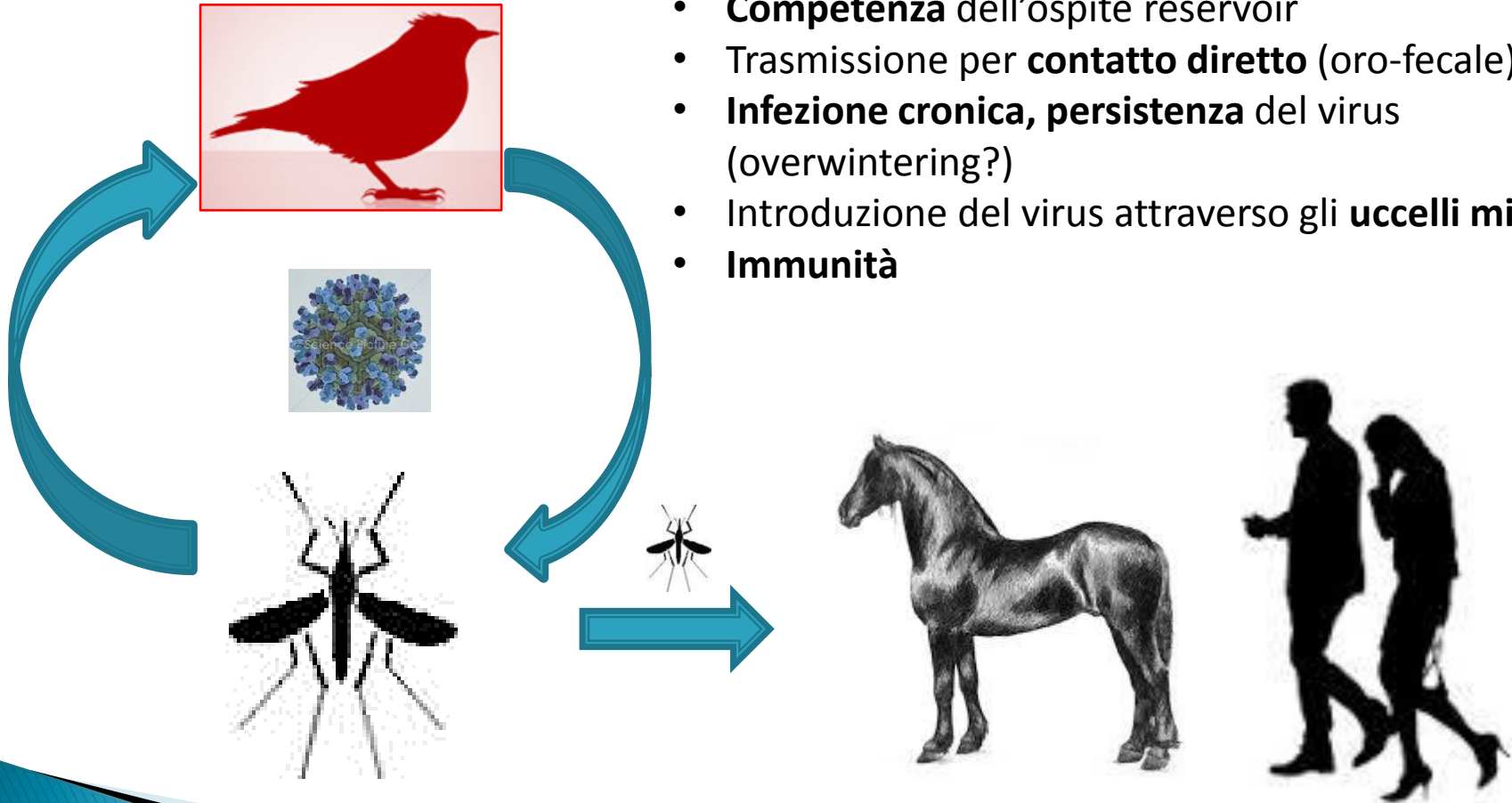
- WNV identificato in più di **60 specie** di zanzare (11 generi)
- **competenza vettoriale**
- **Culex pipiens** principale vettore di WNV in Europa
- WNV isolato anche in alcune specie di **zecche**
- **Overwintering**
 - zanzare adulte svernanti
 - trasmissione **trans-ovarica**



Ciclo di trasmissione

OSPITE RESERVOIR

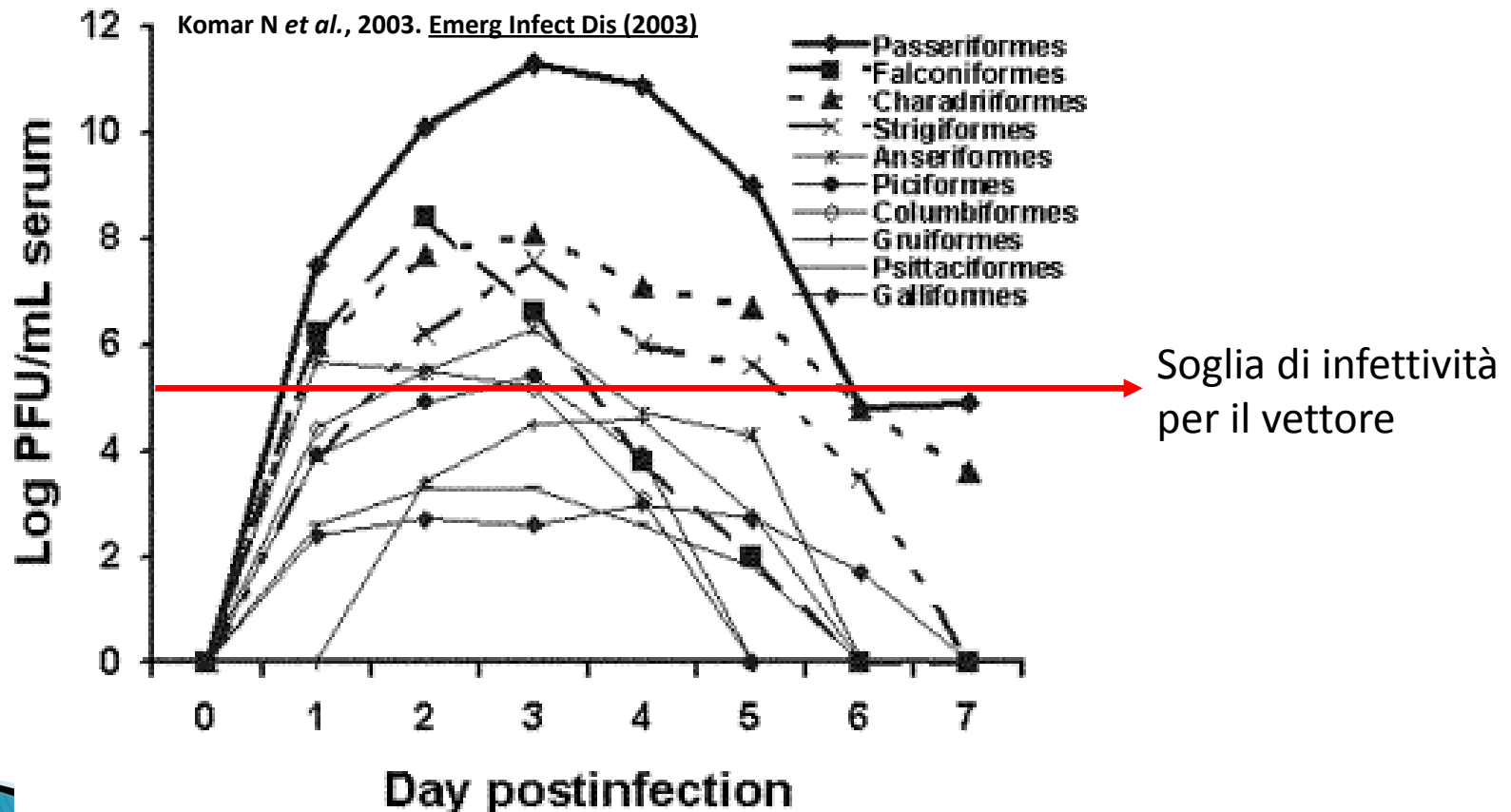
- WNV identificato in più di **300 specie** di uccelli
- **Competenza** dell'ospite reservoir
- Trasmissione per **contatto diretto** (oro-fecale)
- **Infezione cronica, persistenza** del virus (overwintering?)
- Introduzione del virus attraverso gli **uccelli migratori**
- **Immunità**



Ospiti reservoir

Il Titolo virale ematico è un fattore fondamentale per la trasmissione del virus

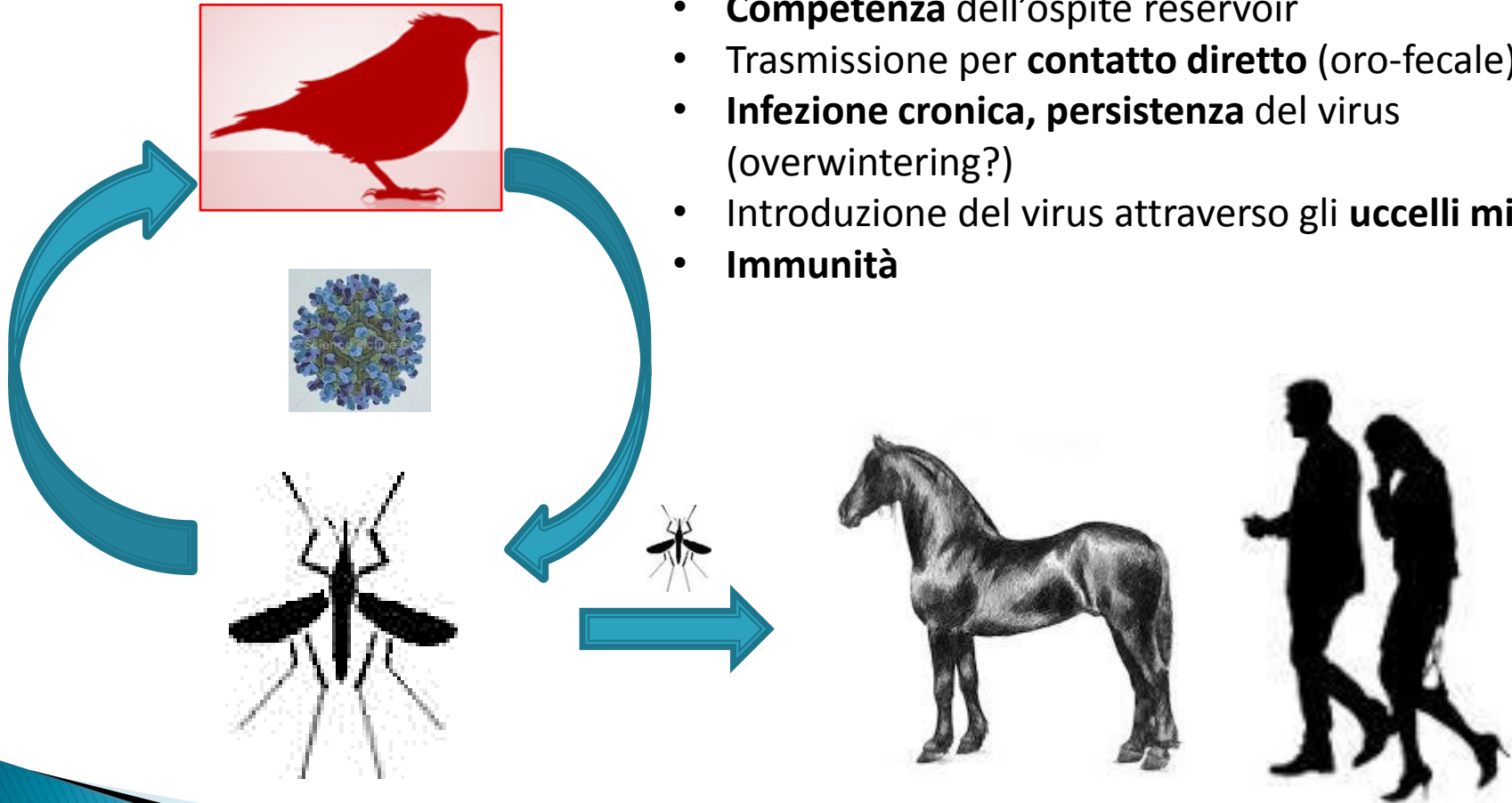
- Si considera infettante per il vettore un titolo virale di 10^5 PFU/ml
- Uomo, Cavallo: titolo max rilevato $\sim 10^3$ PFU/ml



Ciclo di trasmissione

OSPITE RESERVOIR

- WNV identificato in più di **300 specie** di uccelli
- **Competenza** dell'ospite reservoir
- Trasmissione per **contatto diretto** (oro-fecale)
- **Infezione cronica, persistenza** del virus (overwintering?)
- Introduzione del virus attraverso gli **uccelli migratori**
- **Immunità**



Ospiti reservoir

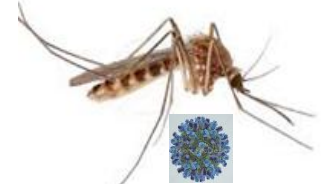
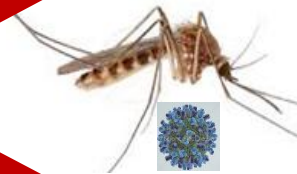
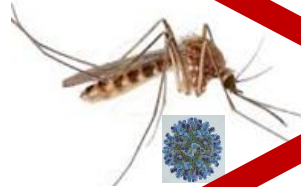
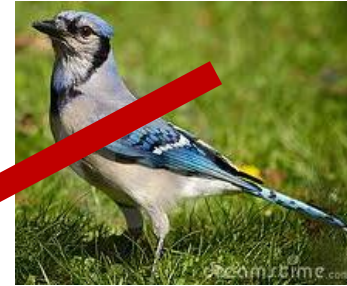
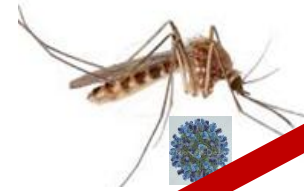
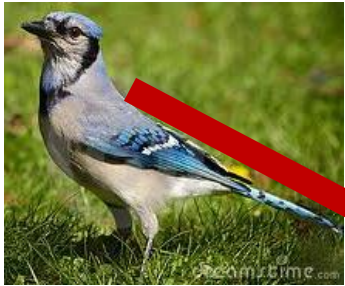
Introduzione del virus attraverso gli uccelli migratori

- Durante lo svernamento in aree endemiche gli uccelli possono infettarsi
- Migrazione primaverile (aprile-maggio)
- Trasmissione dell' infezione alla popolazione autoctona di vettori
- Infezione degli uccelli stanziali (ospiti amplificatori).
- Ciclo endemico e di amplificazione tra di uccelli selvatici e vettori
- L'infezione può accidentalmente trasmettersi a mammiferi incluso l'uomo ed il cavallo, dove l'infezione si rende clinicamente manifesta.

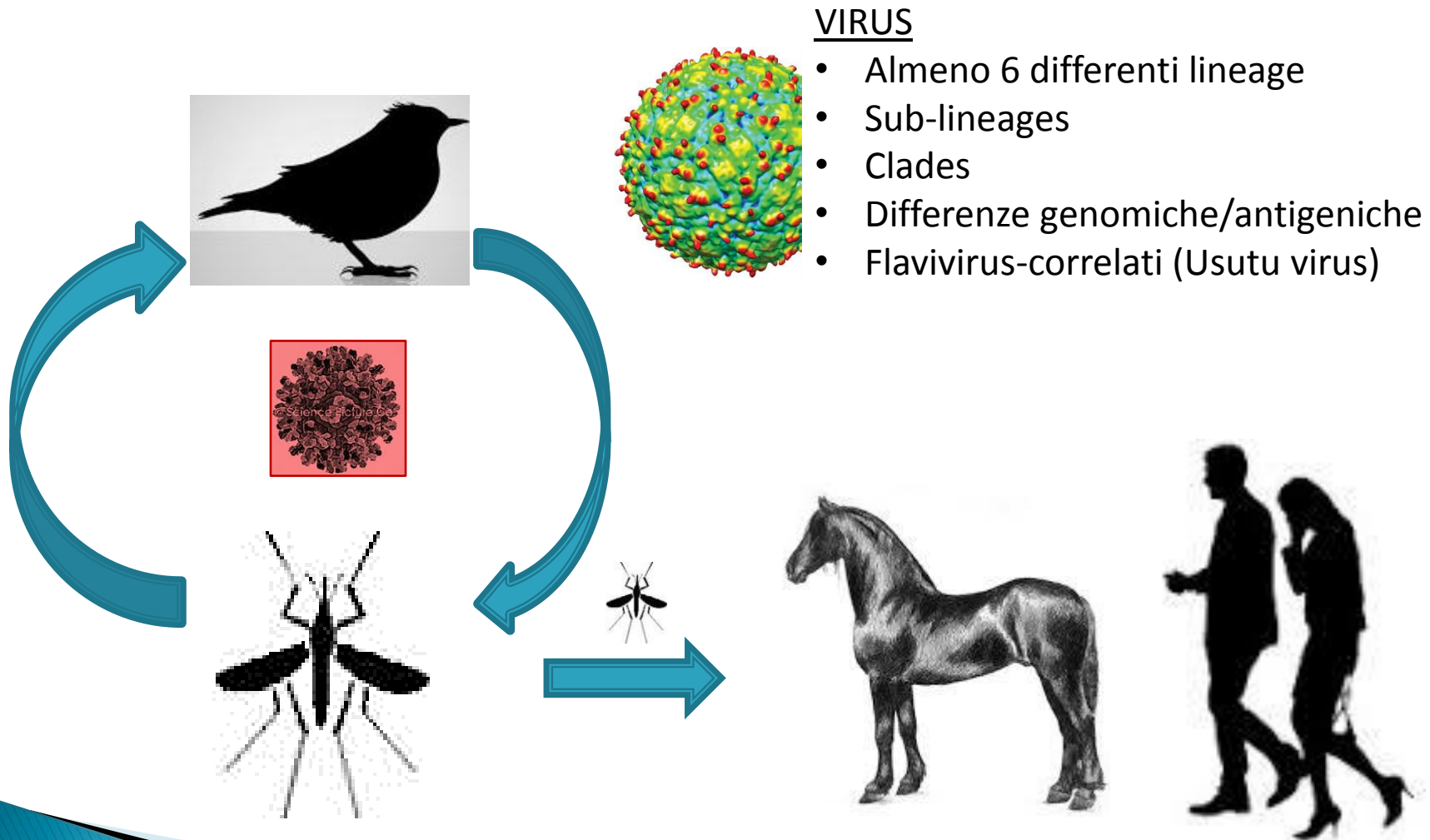


Ospiti reservoir

Immunità



Ciclo di trasmissione

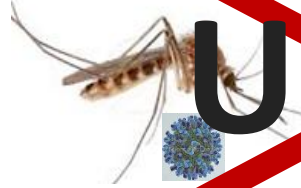
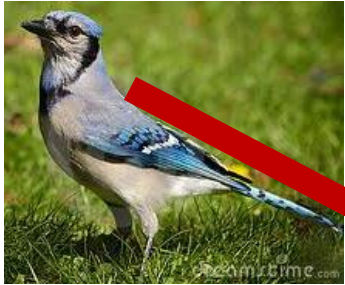


VIRUS

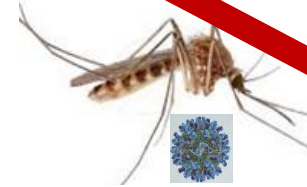
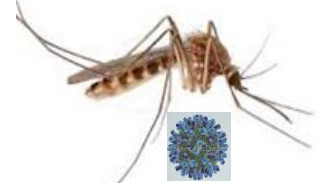
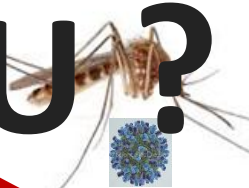
- Almeno 6 differenti lineage
- Sub-lineages
- Clades
- Differenze genomiche/antigeniche
- Flavivirus-correlati (Usutu virus)

Ospiti reservoir

Immunità



USUTU?



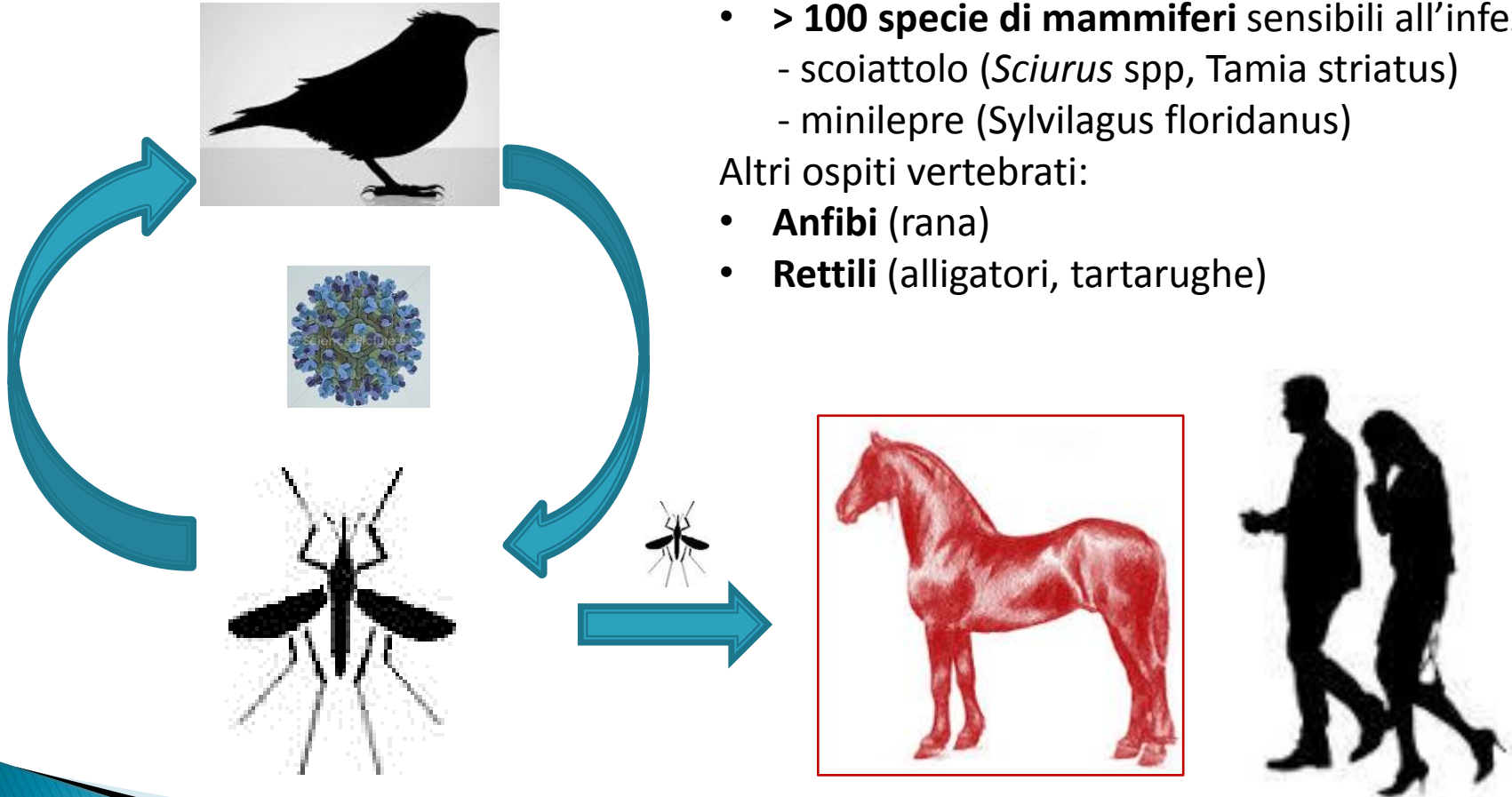
Ciclo di trasmissione

OSPITI ACCIDENTALI

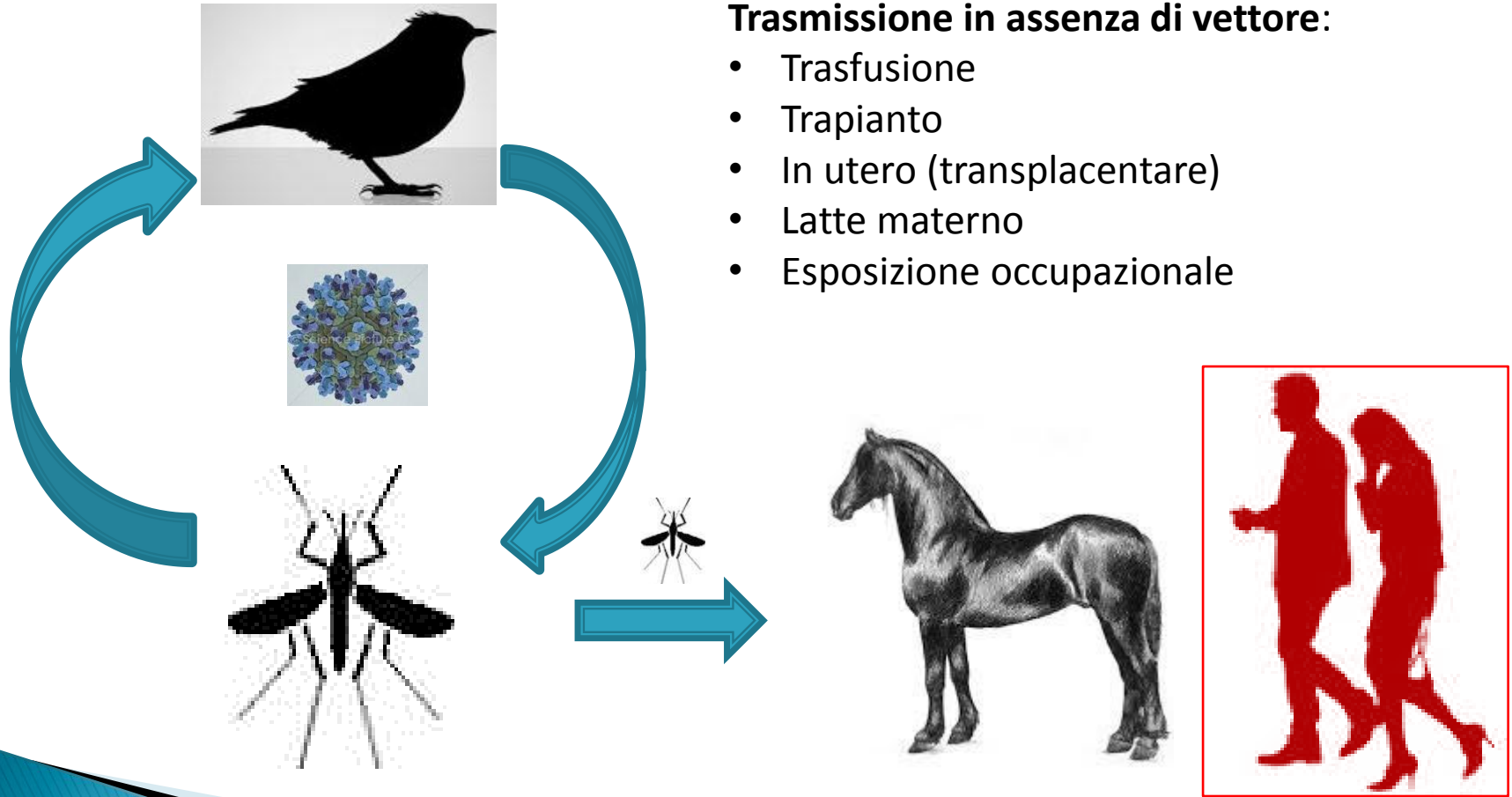
- > **100 specie di mammiferi** sensibili all'infezione
 - scoiattolo (*Sciurus* spp, *Tamias striatus*)
 - minilepre (*Sylvilagus floridanus*)

Altri ospiti vertebrati:

- **Anfibi** (rana)
- **Rettili** (alligatori, tartarughe)



Ciclo di trasmissione

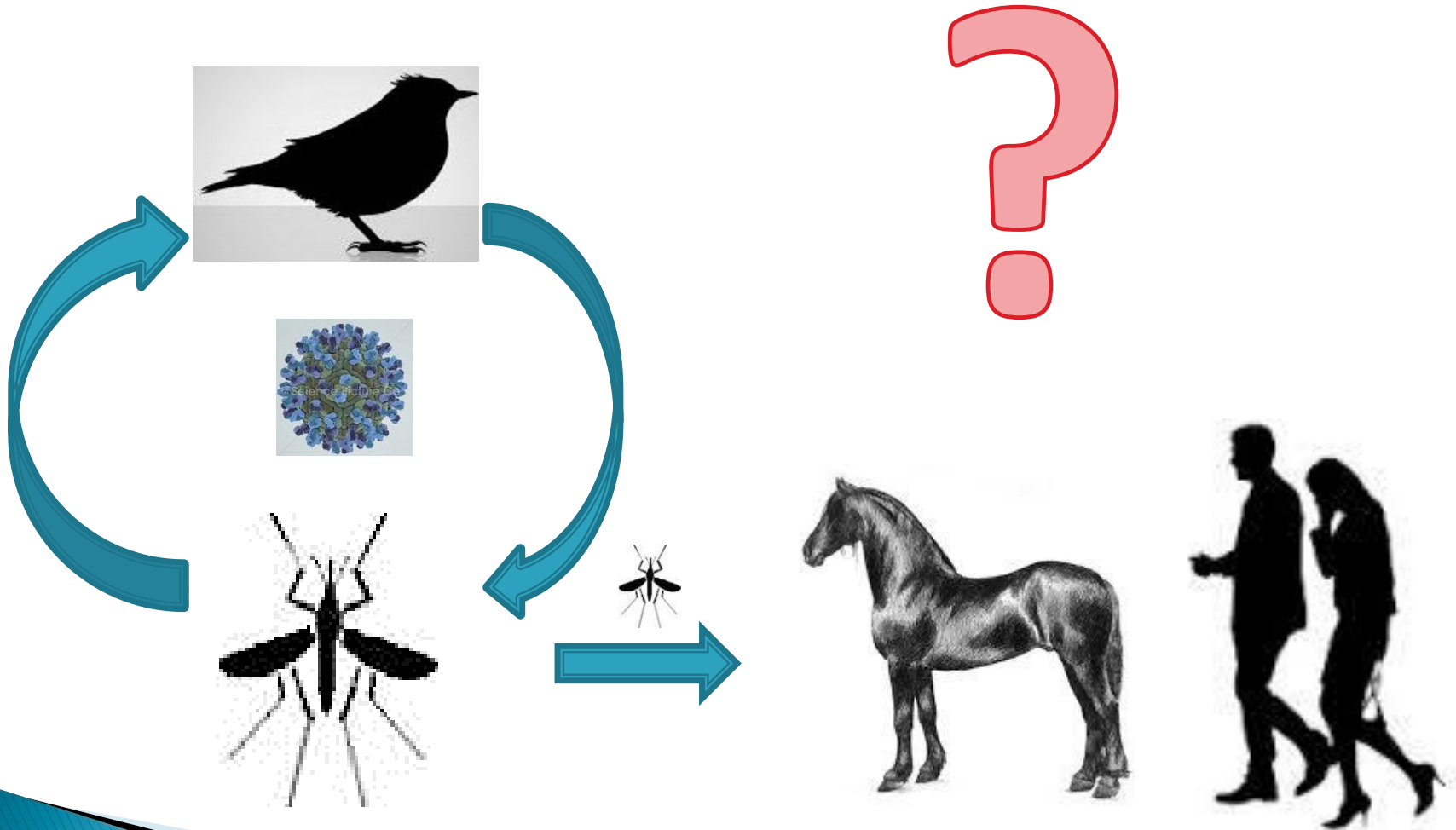


OSPITI ACCIDENTALI

Trasmissione in assenza di vettore:

- Trasfusione
- Trapianto
- In utero (transplacentare)
- Latte materno
- Esposizione occupazionale

Ciclo di trasmissione



La malattia negli equidi

- **Periodo di incubazione** : 3-15 gg.
- **Sintomi:**
 - debolezza arti posteriori
 - incapacità a mantenere la stazione quadrupedale
 - paralisi/paresi degli arti
 - fascicolazioni muscolari
 - deficit propriocettivi
 - cecità
 - ptosi del labbro inferiore o paralisi dei muscoli labiali e facciali
 - digrignamento dei denti(febbre, talvolta dismetria, sonnolenza, ipereccitabilità o aggressività)
- **Guarigione** in 5 - 15 gg
- **Letalità** : 30% - 40% dei soggetti.



La malattia negli equidi

Un cavallo ammalato non costituisce pericolo, né per i propri simili, né per l'uomo.

- Non esiste una terapia specifica, ma solo terapie di supporto
- Vaccinazione: doppia somministrazione a distanza di 4-6 settimane
- Impiego di prodotti repellenti, ricovero notturno dei cavalli, uso di zanzariere, luci spente nei box, allontanamento degli uccelli fuori dalle scuderie.



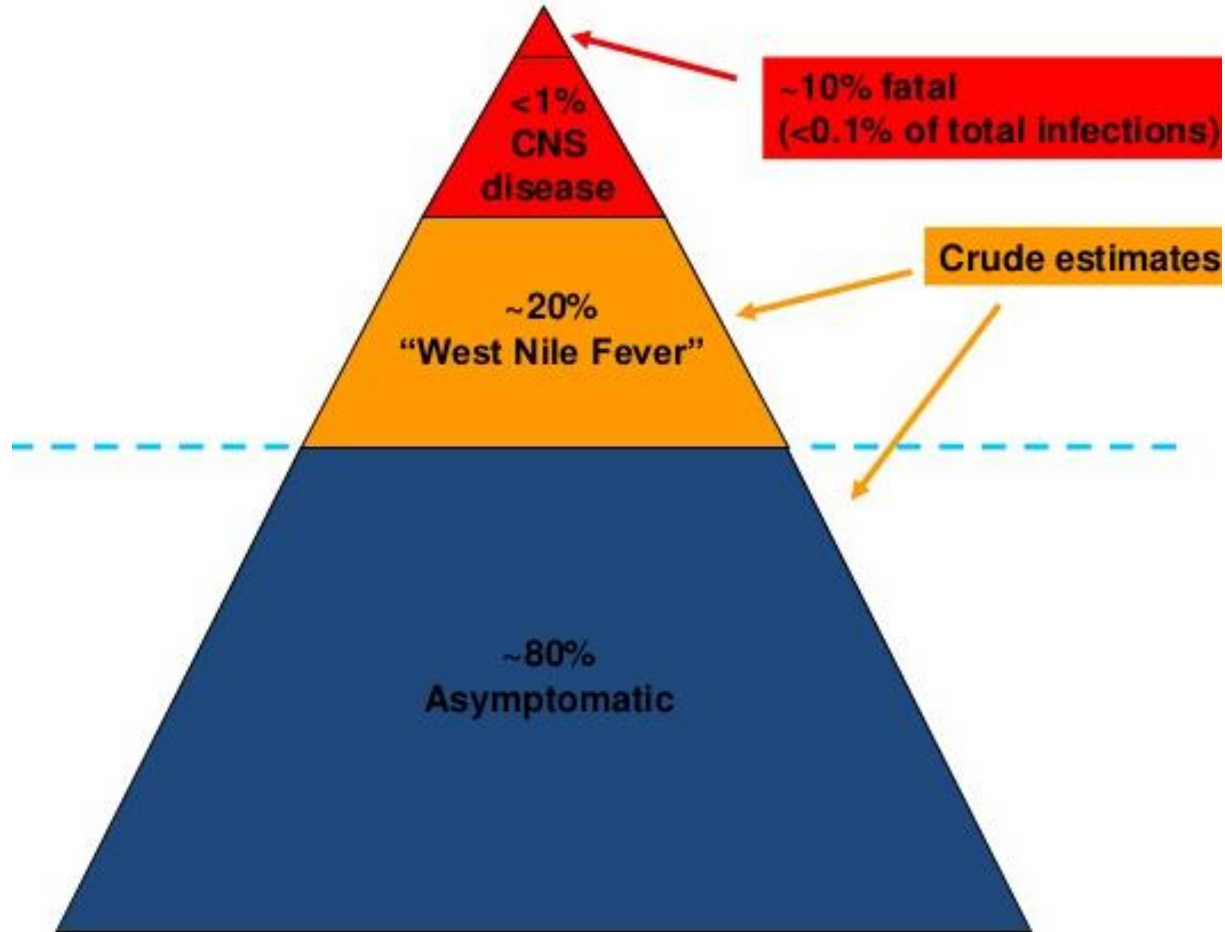
Sintomatologia negli uccelli

- Generalmente forma asintomatica o subclinica
- Periodo di incubazione: 3-4 giorni
- Soggetti giovani più sensibili
- Sintomi neurologici: atassia, paralisi, torcicollo, incoordinazione motoria, depressione, letargia, perdita di peso.
- La morte in genere sopraggiunge a distanza di 24 ore dalla comparsa dei sintomi nervosi (corvidi, cicogne, oche)
- Nei sopravvissuti si instaura una immunità di lunga durata

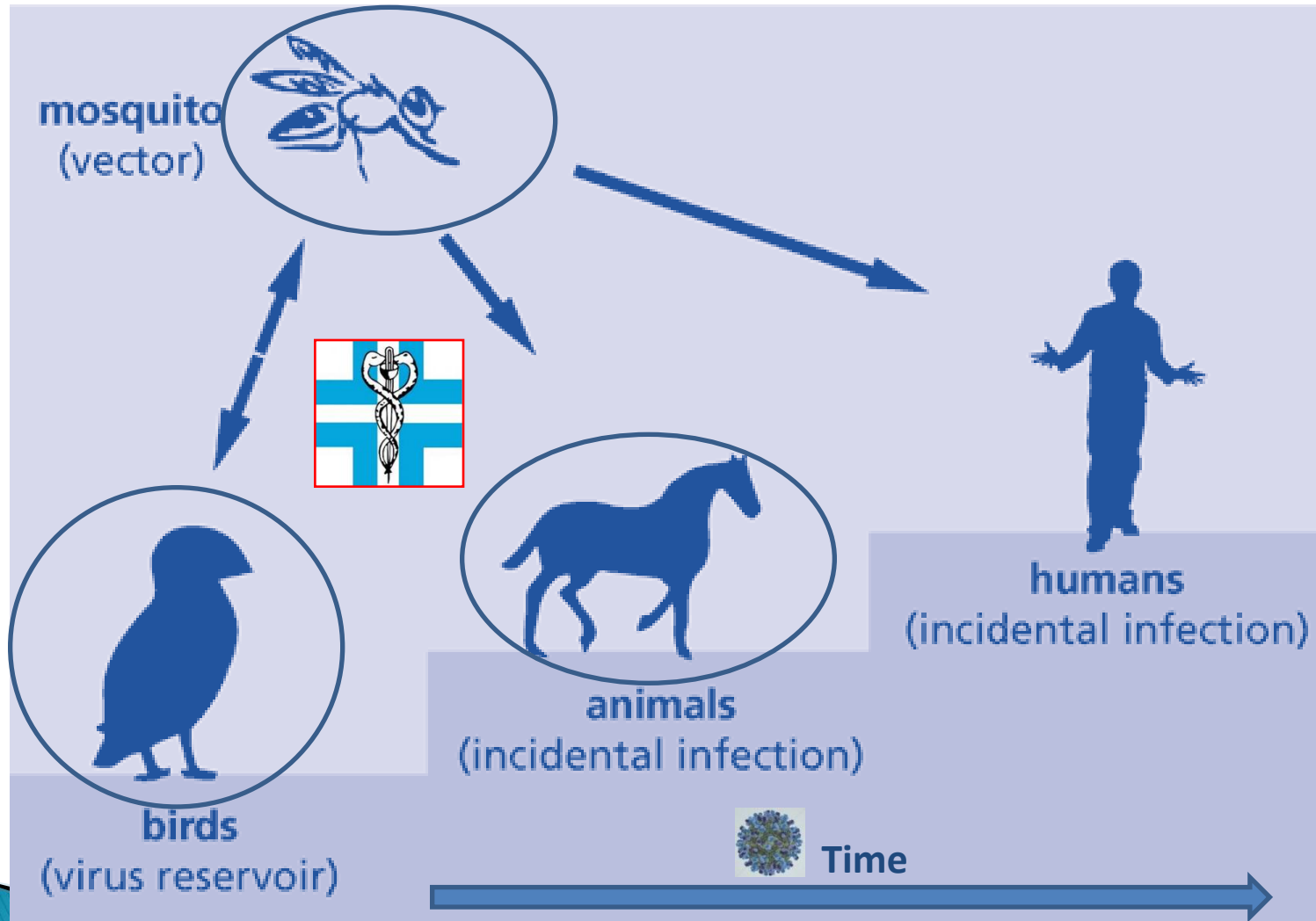


La malattia nell'uomo

WNV Human Infection "Iceberg"



Sorveglianza veterinaria



WNV – Attività diagnostica



Sorveglianza entomologica

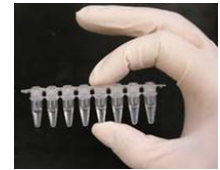
Identificazione morfologica



Preparazione del campione



PCR



Sorveglianza entomologica



Culex pipiens

Aedes vexans



Aedes (Ochlerotatus) caspius



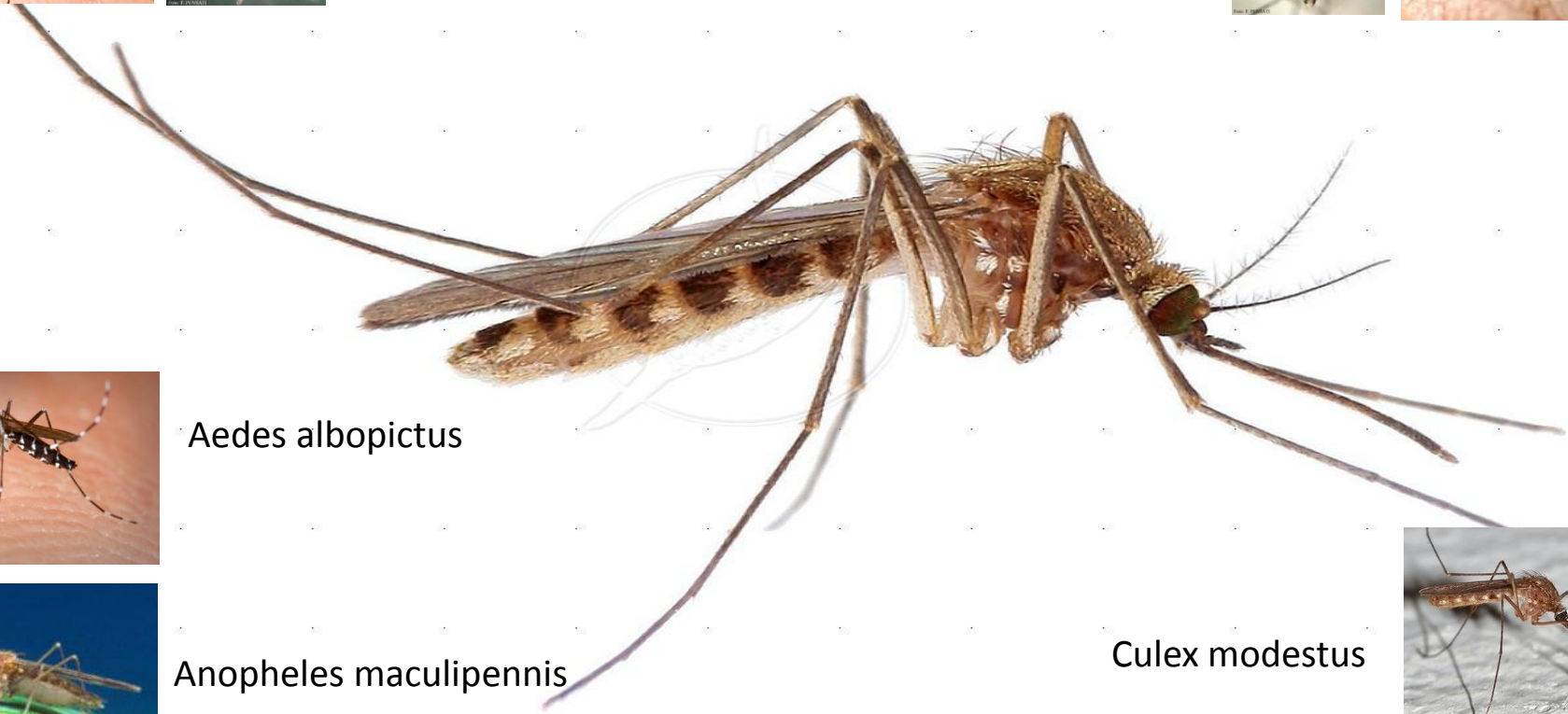
Aedes albopictus



Anopheles maculipennis



Culex modestus



Diagnosi virologica

PCR

- WNV NC 3' (Tang *et al.*, 2006. *J Clin Virol* 36:177–182)
- USUV NS5 gene (Cavrini *et al.*, 2011. *J Clin Virol* 50:221–223)
- Flivirus NS5 gene (Scaramozzino *et al.*, 2001)
- WNV NC 3' (Del Amo *et al.* 2013. *J Virol Methods*, 189:321– 327)



Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA

Yanlin Tang*, C. Anne Hapip, Bin Liu, Chyang T. Fang

*Jerome H. Holland Laboratory for the Biomedical Sciences, American Red Cross,
15601 Crabbs Branch Way, Rockville, MD 20855, USA*

A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid

Francesca Cavrini^a, Maria Elena Della Pepa^b, Paolo Gaibani^a, Anna Maria Pierro^a, Giada Rossini^a, Maria Paola Landini^b, Vittorio Sambri^{a,b,*}

^a Unit of Clinical Microbiology, Regional Reference Centre for Microbiological Emergencies (CRREM), St. Orsola Malpighi University Hospital, University of Bologna, Via G. Massarenti 9, 40138 Bologna, Italy

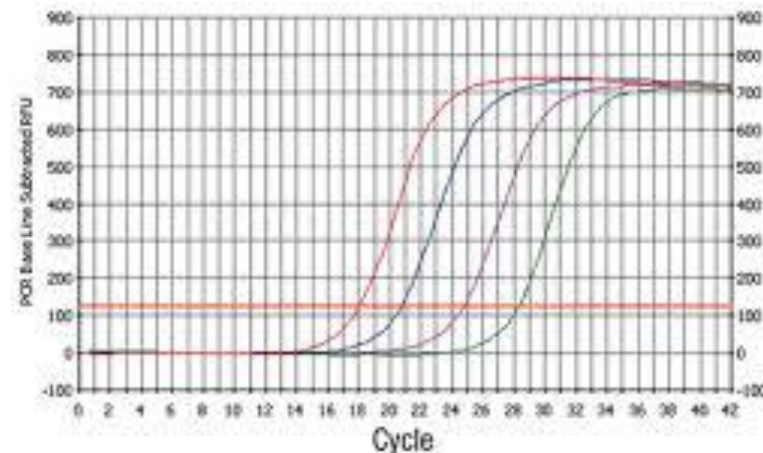
^b Department of Haematology and Oncology, Section of Microbiology, St. Orsola Malpighi University Hospital, University of Bologna, Via G. Massarenti 9, 40138 Bologna, Italy

A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus

Javier Del Amo^a, Elena Sotelo^a, Jovita Fernández-Pinero^a, Carmina Gallardo^a, Francisco Llorente^a, Montserrat Agüero^b, Miguel Angel Jiménez-Clavero^{a,*}

^a Centro de Investigación en Sanidad Animal, ISA (INIA), Valdeolmos, Spain

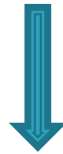
^b Laboratorio Central de Veterinaria, MAGRAMA, Algete, Spain



Sorveglianza sugli uccelli stanziali



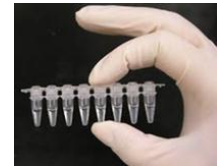
Esame anatomo-patologico
Prelievo organi (Cuore,
cervello, rene, milza)



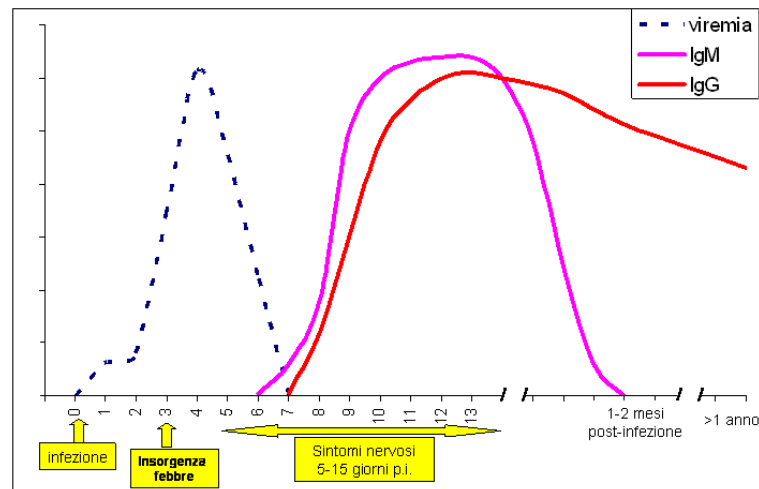
Omogenato di **pool di
visceri**



PCR



Sorveglianza negli equidi



PCR



ELISA

- Competitive ELISA
- IgG antibody detection ELISA
- IgM Antibody Capture ELISA



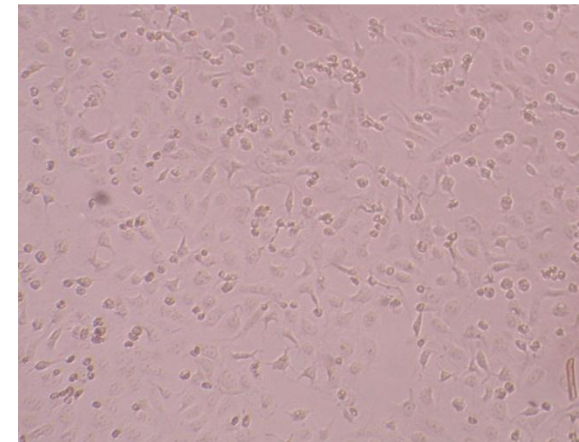
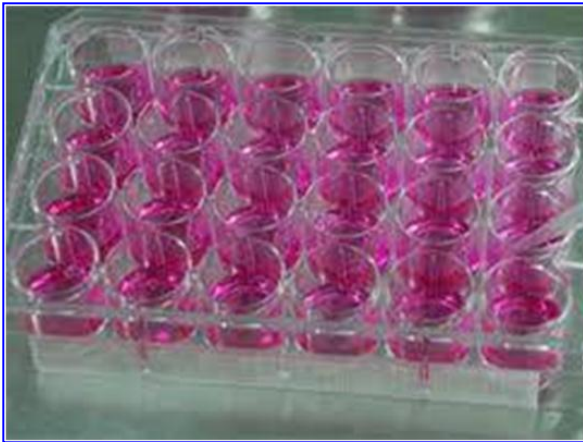
WNV – Attività diagnostica

Conferme positività da parte del CESME

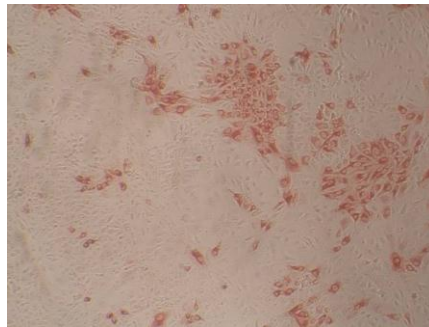


Isolamento virale

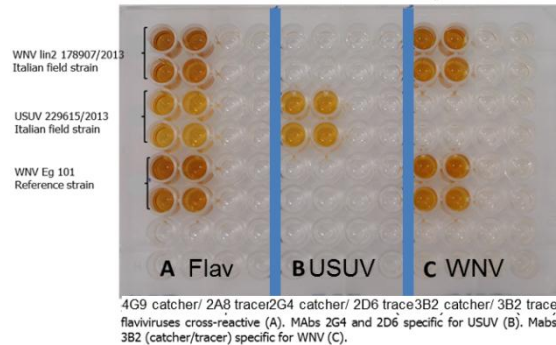
- Vero, RK13, BhK21
- C6/36, AP61
- Uep



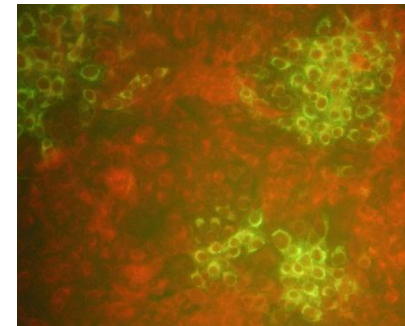
Immunoperossidasi



Sandwich ELISA for WNV/USUV antigen detection



Immunofluorescenza



WNV isolati IZSLER 2008-2014

WNV isolation: IZSLER 2008-2014					
N°	Year of isolation	Viral strains	Lineage	Species	Place of origin
1	2008	WNV 203204/2008	1	Magpie (Pica pica)	Portomaggiore (FE)
2	2008	WNV 229892/2008	1	Magpie (Pica pica)	Voghiera (FE)
3	2008	WNV 242853/2008	1	Jay (Garrulus glandarius)	Mirandola (MO)
4	2009	WNV 204146/2009	1	Crow (Corvus cornix)	Codigoro (FE)
5	2009	WNV 205417/2009	1	Horse (blood)	Roncoferraro (MN)
6	2009	WNV 208659/2009	1	Horse (brain)	Noceto (PR)
7	2009	WNV 208846/2009	1	Magpie (Pica pica)	Luzzara (RE)
8	2009	WNV 233184/2009	1	Seagulls (Larus ridibundus)	Codigoro (FE)
9	2009	WNV 225677/2009	1	Jay (Garrulus glandarius)	Ferrara
10	2009	WNV 204913/2009	1	Mosquitoes (<i>Culex pipiens</i>)	Montecchio Emilia (RE)
11	2013	WNV 178907/2013	2	Mosquitoes (<i>Culex pipiens</i>)	Soresina (CR)
12	2013	WNV 205087/2013	2	Crow (Corvus cornix)	Cento (FE)
13	2013	WNV 210912-1/2013	2	Magpie (Pica pica)	Castel Franco E. (MO)
14	2013	WNV 218203/2013	2	Mosquitoes (<i>Culex pipiens</i>)	Parma
15	2013	WNV 223278-3/2013	2	Crow (Corvus cornix)	Rivolta d'Adda (CR)
16	2013	WNV 230043/2013	2	Mosquitoes (<i>Culex pipiens</i>)	Remedello (BS)
17	2013	WNV 244558/2013	2	Mosquitoes (<i>Culex pipiens</i>)	Leno (BS)
18	2013	WNV 225284/2013	2	Upupa (Upupa epops)	Ferrara
19	2013	WNV 225303/2013	2	Jay (Garrulus glandarius)	Ferrara
20	2013	WNV 225301/2013	2	Blackbird (Turdus merula)	Ferrara
21	2013	WNV 231763/2013	2	Magpie (Pica pica)	Poggio Renatico (BS)
22	2013	WNV 225263/2013	2	Assiolo (Otus scops)	Ferrara
23	2013	WNV 251643-1/2013	2	Mosquitoes (<i>Culex pipiens</i>)	San Giovanni del Dosso (MN)
24	2013	WNV 253901-9/2013	2	Magpie (Pica pica)	Novellara (RE)
25	2014	WNV 191997/4	2	Mosquitoes (<i>Culex pipiens</i>)	Borgetto Lodigiano (LO)
26	2014	WNV 203929/6	2	Mosquitoes (<i>Culex pipiens</i>)	Borgetto Lodigiano (LO)
27	2014	WNV 192173/1	2	Magpie (Pica pica)	Guastalla (RE)
28	2014	WNV 221558	2	Crow (Corvus cornix)	Milano
29	2014	WNV 214495/5	2	Mosquitoes (<i>Culex pipiens</i>)	Soresina (CR)
30	2014	WNV 221996/10	2	Magpie (Pica pica)	San Cesario sul Panaro (MO)



West Nile virus

Grazie per l'attenzione



West Nile disease: sorveglianza integrata in Regione Lombardia
Brescia, 12 dicembre 2014



Diagnostica ed epidemiologia della West Nile Disease

Davide Lelli



IZSLER, Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Reparto di Virologia, Via Bianchi 9 – 25124 Brescia Tel. 0302290289, e-mail: virologia@izsler.it