I risultati della ricerca corrente condotta
dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale
dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale Anno 2013
Teramo, 6 Giugno 2014

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Il virus Usutu in Italia: emergenza o infezione silente?

Massimo Spedicato
Reparto di Virologia – IZSAM «G. Caporale»
Responsabile: Giovanni Savini

Infezioni emergenti

L'Organizzazione Mondiale della Sanità definisce emergente una malattia che:

- *appare per la prima volta in una popolazione o in una determinata area geografica*
- *è sempre esistita ma aumenta improvvisamente in incidenza e diffusione*

Possibili cause

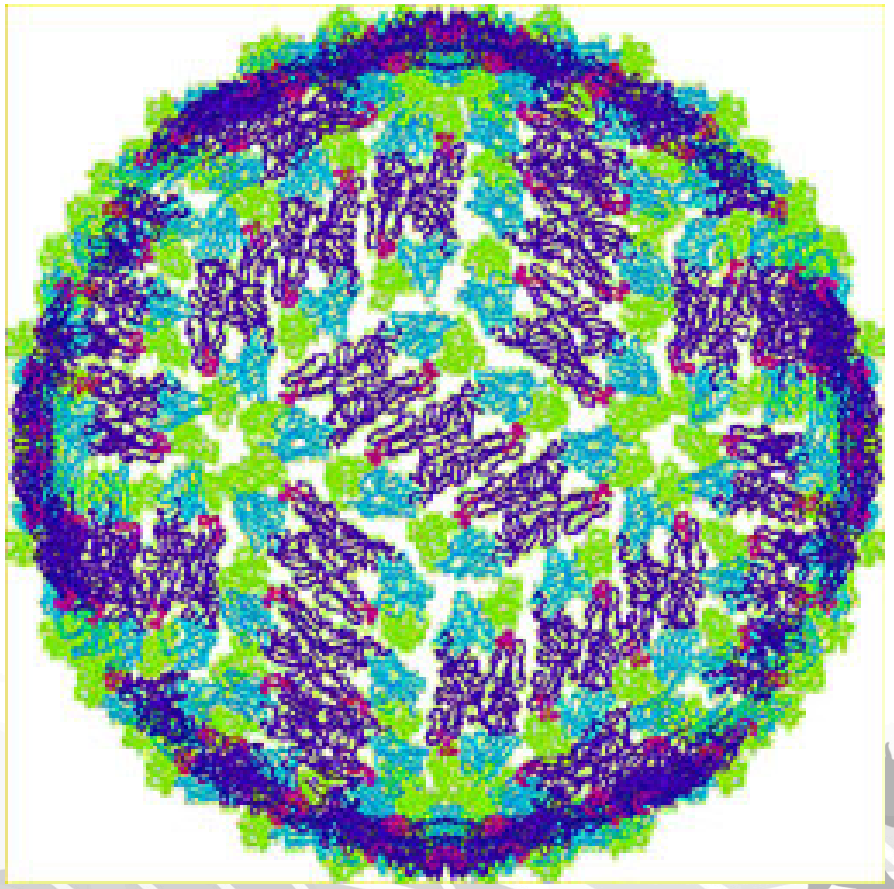
- *Aumento degli spostamenti sia individuali che di massa*
- *Insorgenza di varianti genetiche nei microrganismi patogeni*
- *Aumento della suscettibilità dell'ospite*
- *Adattamento dell'agente infettivo a nuove specie*
- *Cambiamenti ambientali che possono offrire ai patogeni nuove opportunità di adattarsi*

ARBOVIROSI

Lederberg, 1997;
Gould and Higgs, 2009;
Sutherst, 2004;
Tabachnick, 2010

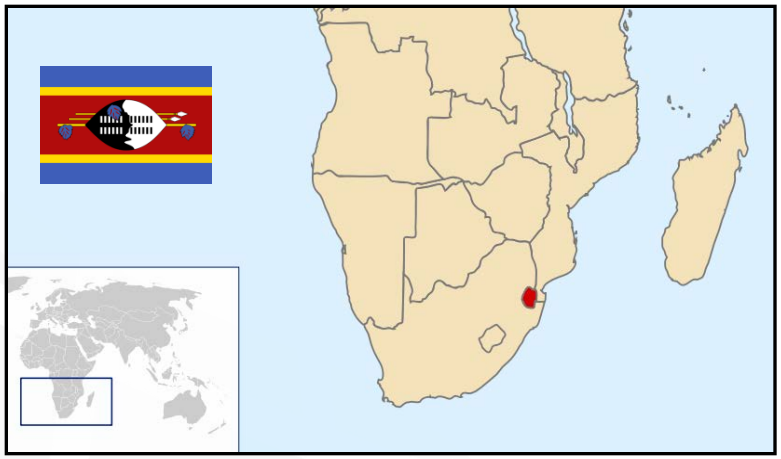
Virus Usutu

La definizione di “malattia emergente” si applica bene al *virus Usutu* (USUV)



Isolato per la prima volta nel 1959 da una zanzara della specie *Culex neavei* in Swaziland

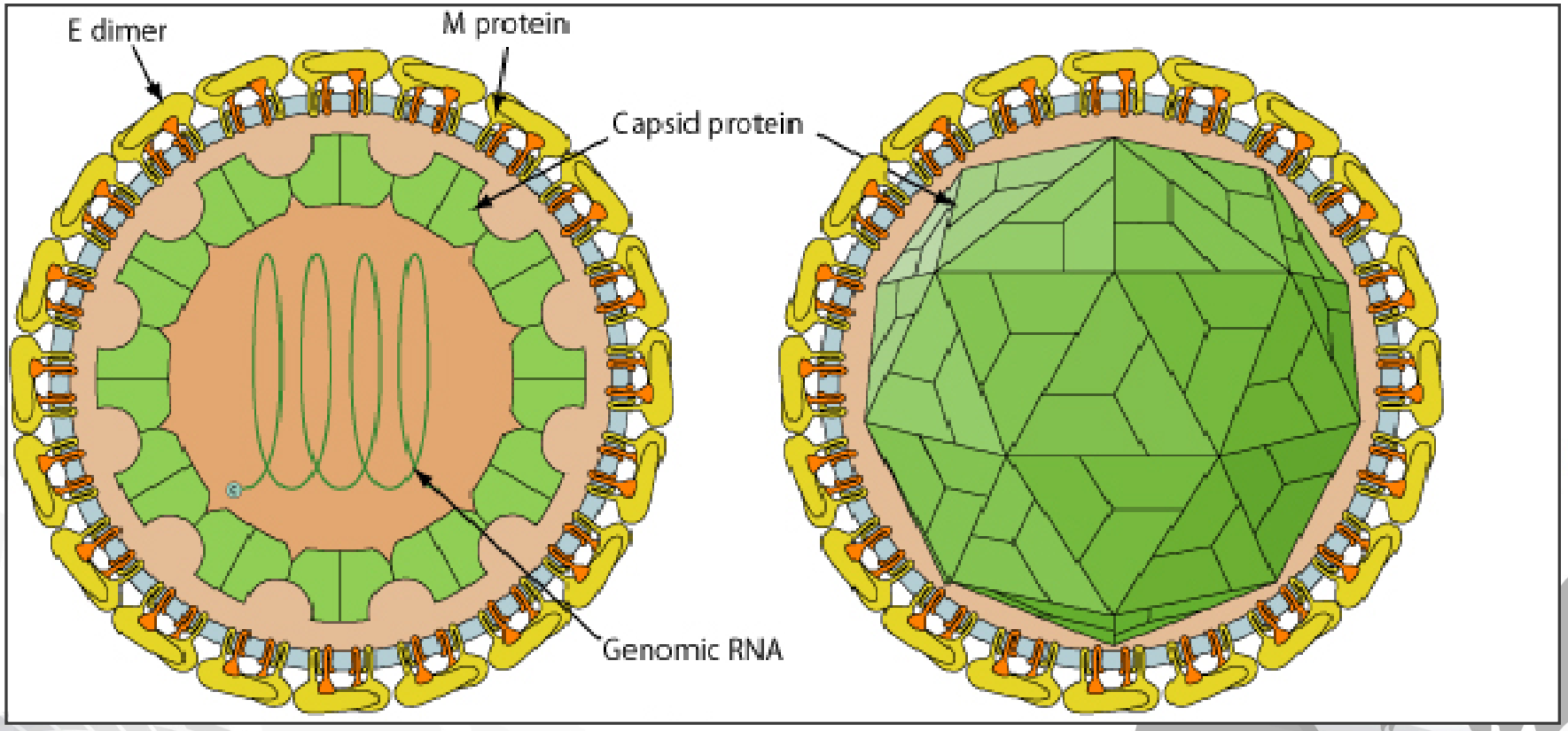
(ceppo di referenza SAAR-1776)



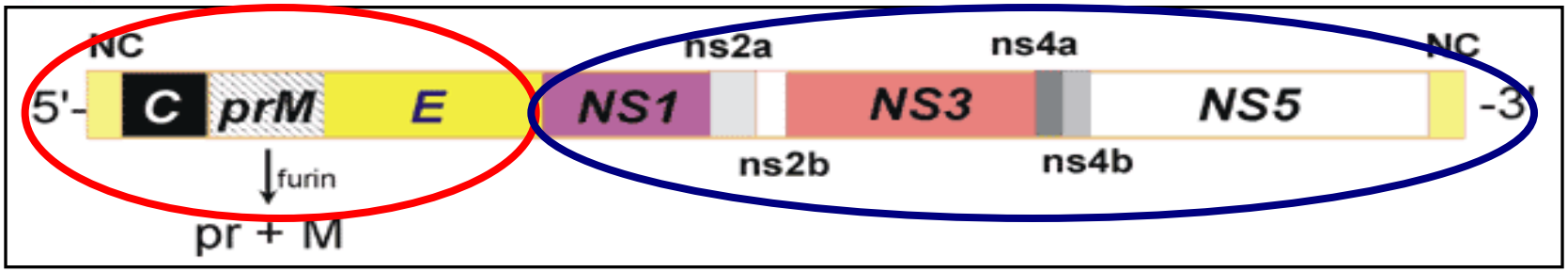
Williams et al., 1964

Famiglia: Flaviridae
Genere: *Flavivirus*

-Virione sferico (50nm)
-Dotato di envelope (M,E)



Bakonyi et al., 2004



Proteine strutturali

Proteine non strutturali

Bakonyi et al., 2004

-Trasmesso principalmente da zanzare del genere *Culex*
-Malattia clinica principalmente negli uccelli *(+++Turdus merula)*

Nikolay et al., 2011

Prima del 2001…

considerato un virus esotico di minore importanza, dotato di scarsa patogenicità, la cui circolazione era limitata al continente africano

Nel 2001…

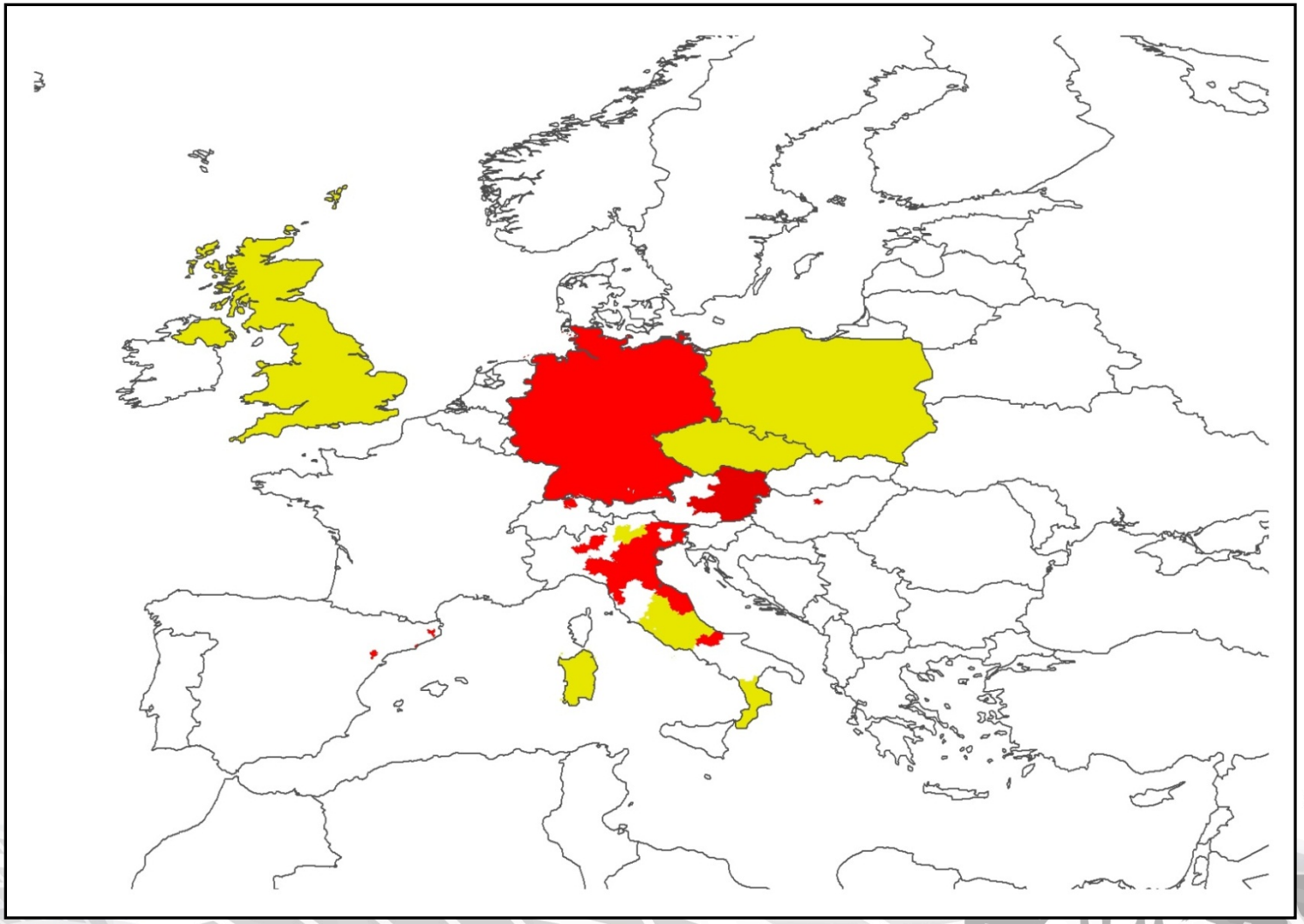
Nel periodo agosto/settembre 2001 si osservò in Austria la morte di un notevole numero di merli

Contemporaneamente, 5 allocchi di Lapponia trovati morti nello zoo di Vienna

USUV come agente causale

Primo episodio di USUV fuori dai confini africani

Successivamente isolato in Ungheria, Svizzera, Spagna, Germania e Italia



IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Usutu Virus, Italy, 1996

Herbert Weissenböck, Tamás Bakonyi, Giacomo Rossi, Paolo Mani, and Norbert Nowotny

Retrospective analysis of archived tissue samples from bird deaths in the Tuscany region of Italy in 1996 identified Usutu virus. Partial sequencing confirmed identity with the 2001 Vienna strain and provided evidence for a much earlier introduction of this virus into Europe than previously assumed.

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 19, No. 2, February 2013

Analisi retrospettiva eseguita su campioni di tessuto prelevato da merli morti in Toscana nel 1996 ha rilevato la presenza del virus Usutu

Il sequenziamento parziale del gene che codifica l'*NS3* ha evidenziato una completa omologia con lo stesso segmento del ceppo Austria 2001, dimostrando che USUV è entrato in Europa molto prima del 2001

USUV in Italia

Nel 2005 circolazione di USUV evidenziata in polli sentinella in Trentino

Tra il 2006 e 2008 sono state descritte sindromi neuropatiche e mortalità in civette e merli nei pressi di Milano

Rizzoli et al., 2007
Lelli et al. 2008
Manarolla et al., 2010
Savini et al., 2011

USUV in Italia

Agosto ed Ottobre 2009

osservata un'elevata morìa di merli in 6 comuni della provincia di Treviso

Agosto ed Ottobre 2010

È stata osservata un'elevata moria di merli in 3 province delle Marche

(Pesaro, Ancona e Macerata)

OGNI FOCOLAIO HA CAUSATO LA MORTE DI QUASI UN MIGLIAIO DI SOGGETTI

***Sintomi*: anoressia, abbattimento del sensorio, piumaggio arrufato, aumento assunzione di acqua, blocco della fuga, tremori**

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

….. nel 2009 …..

Rapid communications

First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009

M Pecorari (pecorari.monica@policlinico.mo.it)[1], G Longo[2], W Gennari[1], A Grottola[1], A MT Sabbatini[1], S Tagliazucchi[1], G Savini[3], F Monaco[3], M L Simone[4], R Lelli[3], F Rumpianesi[1]

Eurosurveillance, Volume 14, Issue 50, 17 December 2009

Rapid communications

USUTU VIRUS INFECTION IN A PATIENT WHO UNDERWENT ORTHOTROPIC LIVER TRANSPLANTATION, ITALY, AUGUST-SEPTEMBER 2009

F Cavrini[1,2], P Gaibani[1,2], G Longo[3], A M Pierro[1], G Rossini[1], P Bonilauri[4], G E Gerunda[5], F Di Benedetto[5], A Pasetto[6], M Girardis[6], M Dottori[4], M P Landini[1], V Sambri (vittorio.sambri@unibo.it)[1]

Così come quelli isolati in Austria ed in Ungheria, anche i ceppi di USUV che hanno circolato in Italia hanno evidenziato elevata patogenicità (sopratutto nei merli)

A differenza degli altri ceppi europei, i ceppi Italiani sono stati in grado di infettare e causare encefaliti nell'uomo

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Che impatto ha il virus Usutu in Sanità Pubblica?

Campioni

Tra il 2008 ed il 2011, il *Policlinico di Modena* ha stoccato (–80°C), 609 sieri e 306 campioni di liquido cerebrospinale (LCS) prelevati da pazienti al momento del ricovero

Il siero proveniva da pazienti con anamnesi diverse *(fratture, problemi dermatologici, etc.)*, il LCS derivava da pazienti con problemi neurologici più o meno gravi

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

campioni di LCS e siero

campioni di siero

RT-PCR per rilevare la presenza di RNA di USUV e del virus della malattia di West Nile (WNV)

sieroneutralizzazione per evidenziare la presenza di anticorpi neutralizzanti nei confronti di USUV e WNV

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

I campioni di *LCS* e *siero* positivi in PCR sono stati sottoposti a conferma diagnostica mediante sequenziamento dei prodotti PCR

(450 nucleotidi gene NS5)

Le *sequenze* ottenute sono state allineate con sequenze note di diversi ceppi di USUV che hanno circolato in Europa

Effettuata un'*analisi filogenetica* su un dataset di 29 sequenze

ANNO	ID CAMPIONE	GenBank	MATRICE BIOLOGICA	SPECIE	ORIGINE GEOGRAFICA
2008	MO1_08_Hu_CSF		Liquor	Uomo	Modena (Emilia)
2008	MO2_08_Hu_CSF		Liquor	Uomo	Modena (Emilia)
2008	MO3_08_Hu_CSF		Liquor	Uomo	Modena (Emilia)
2008	MO4_08_Hu_CSF		Liquor	Uomo	Modena (Emilia)
2008	MO5_08_Hu_CSF		Liquor	Uomo	Modena (Emilia)
2008	MO6_08_Hu_CSF		Liquor	Uomo	Modena (Emilia)
2009	MO7_09_Hu_CSF		Liquor	Uomo	Modena (Emilia)
2008	MO1_08_Hu_serum		Siero	Uomo	Modena (Emilia)
2008	MO2_08_Hu_serum		Siero	Uomo	Modena (Emilia)
2010	MC_10_Tm		Organo	Merlo (*T.merula*)	Macerata (Marche)
2010	PU_10_Tm		Organo	Merlo (*T.merula*)	Urbino (Marche)
2011	FE_11_Pc		Organo	Fagiano (*P.colchicus*)	Ferrara (Emilia)
2011	MO_11_Gg		Organo	Ghiandaia (*G. glandarius*)	Modena (Emilia)
2012	FE_12_Sv		Organo	Storno (*S.vulgaris*)	Ferrara (Emilia)
2010	AN_10_Cp		Zanzara	*Culex pipiens*	Ancona (Marche)
2010	AN1_10_Tm		Organo	Merlo (*T.merula*)	Ancona (Marche)
2010	AN2_10_Tm		Organo	Merlo (*T.merula*)	Ancona (Marche)
2010	AN3_10_Tm		Organo	Merlo (*T.merula*)	Ancona (Marche)
2009	MO_09_Hu	JF331434	Liquor	Uomo	Modena (Emilia)
2009	RA_09_Tm	JF331436	Organo	Merlo (*T.merula*)	Ravenna (Emilia)
2009	TV1_09_Tm	JF331432	Organo	Merlo (*T.merula*)	Treviso (Veneto)
2009	TV2_09_Tm	JF331431	Organo	Merlo (*T.merula*)	Treviso (Veneto)
2009	TV3_09_Tm	JF331437	Organo	Merlo (*T.merula*)	Treviso (Veneto)
2009	UD_09_Tm	JF331435	Organo	Merlo (*T.merula*)	Udine (Friuli)
2009	VE_09_Tm	JF331433	Organo	Merlo (*T.merula*)	Venezia (Veneto)
2009	PI_09_Cp	JF331430	Zanzara	*Culex pipiens*	Pistoia (Toscana)
2001	Vienna 01	AY453411	Organo	Merlo (*T.merula*)	Austria
2005	Budapest 05	EF206350	Organo	Merlo (*T.merula*)	Ungheria
1959	SAAR 1776	AY453412	Zanzara	*Culex neavei*	Sudafrica

Risultati sierologici

Anno	Sieroneutralizzazione		Totale testati	Campioni positivi (%)	IC95%
	Pos.	Neg.			
2008	14	230	244	5,74	3,47-9,40
2009	21	285	306	6,86	4.55-10.27
2010	4	41	45	8,89	3.62-20.79
2011	1	13	14	7,14	1.66-31.95
Totale testati	40	569	609	6,57	4.87-8.82

Ab anti-USUV

USUV 6.57%

WNV 2.96%

$p<0.05\%$

Ab anti-WNV

Anno	Sieroneutralizzazione		Totale testati	Campioni positivi (%)	IC95%
	Pos.	Neg.			
2008	5	239	244	2,05	0.90-4.70
2009	11	295	306	3,59	2.04-6.32
2010	1	44	45	2,22	0.53-11.53
2011	1	13	14	7,14	1.66-31.95
Totale testati	18	591	609	2,96	1,89-4,62

Risultati virologici

USUV Onestep RT-PCR					
Tipo di campione	RT-PCR		Totale campioni	Campioni positivi (%)	IC 95%
	Campioni positivi	Campioni negativi			
CSF	7 *	299	306	2.29	1.13-4.64
SIERO	2 * *	607	609	0.33	0.10-1.18

Nessun campione di siero o LCS è risultato positivo al virus della malattia di West Nile

Rilevata associazione significativa ($\chi 2$= 8,027; P=0,005%) tra pazienti che soffrono di disturbi neurologici e presenza di USUV nel LCS

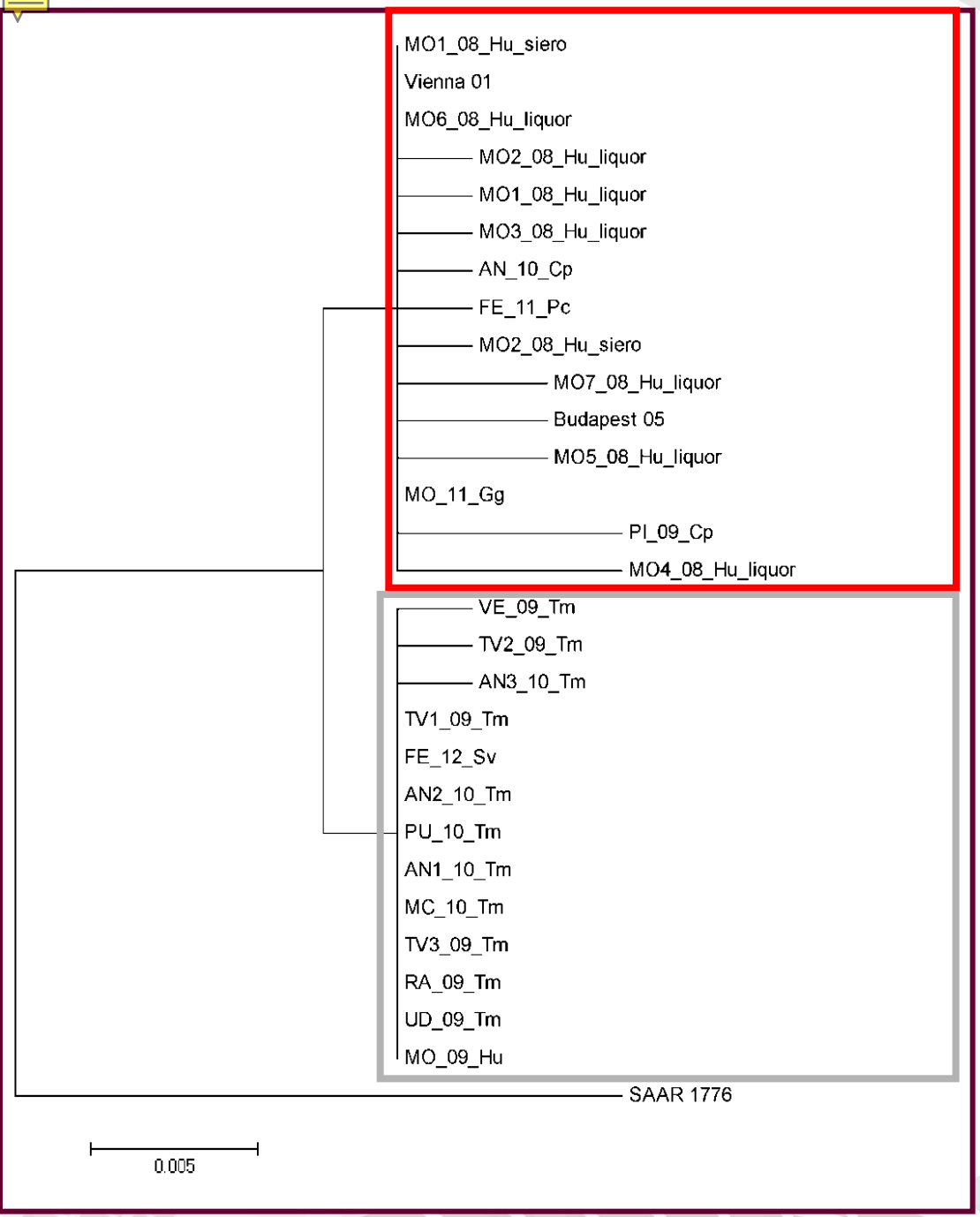
* 6 LCS 2008 , 1 LCS 2009

** 2 Sieri 2009

Sequenziamento

Le sequenze di RNA hanno mostrato un elevato grado di similarità con gli altri ceppi di USUV

In particolare, identità del 97% con il ceppo di referenza Sudafricano *(SAAR-1776)* e identità del 99-100% con le sequenze del ceppo *Vienna 2001*, *Budapest 2005* e con le sequenze di ceppi isolati da uccelli domestici e selvatici e da zanzare in diverse regioni italiane



Sequenziamento parziale *(450 bp)* del gene NS5

La lunghezza dei bracci dell'albero è proporzionale al numero di sostituzioni nucleotidiche per sito

Conclusioni

Nell'uomo ***(quanto meno in provincia di Modena)*****:**

-infezione da USUV non sporadica (6,7%)

-prevalenza sierologica e virologica significativamente maggiore di quelle rilevate per il WNV

-evidenziata associazione significativa tra presenza di USUV e disturbi nervosi

Conclusioni

-due popolazioni distinte di USUV hanno circolato e/o stanno circolando in Italia

-come per il virus della WND, sembrerebbe che, anche per il virus Usutu, ci siano state e ci siano continue introduzioni in Italia, a dimostrazione di un'attiva circolazione del virus in Europa

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Conclusioni

- sebbene le sequenze nucleotidiche siano pressoché simili, nei ceppi italiani, almeno quelli circolanti nel nord-est, <u>si è osservato un potenziale zoonosico non riscontrato negli altri ceppi europei</u>

Con queste premesse è auspicabile che nelle aree dove circola USUV:

-siano controllati i donatori

-sia effettuata la lotta ai vettori

-siano organizzate campagne formative ed educative per far conoscere l'importanza e l'impatto di questa infezione emergente in sanità pubblica

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Grazie per l’attenzione