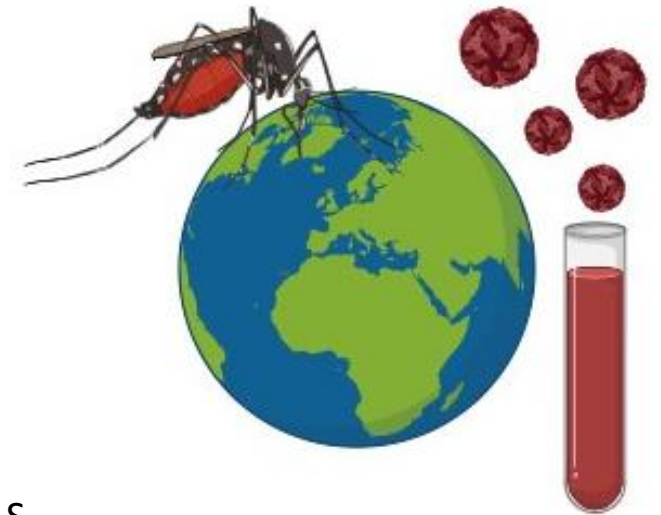


Diagnosi di Laboratorio di infezione da West Nile virus

Dr.ssa Francesca Colavita



UOC Virologia e Laboratori di Biosicurezza
Istituto Nazionale per le Malattie Infettive «L. Spallanzani» I.R.C.C.S.



WEST NILE VIRUS

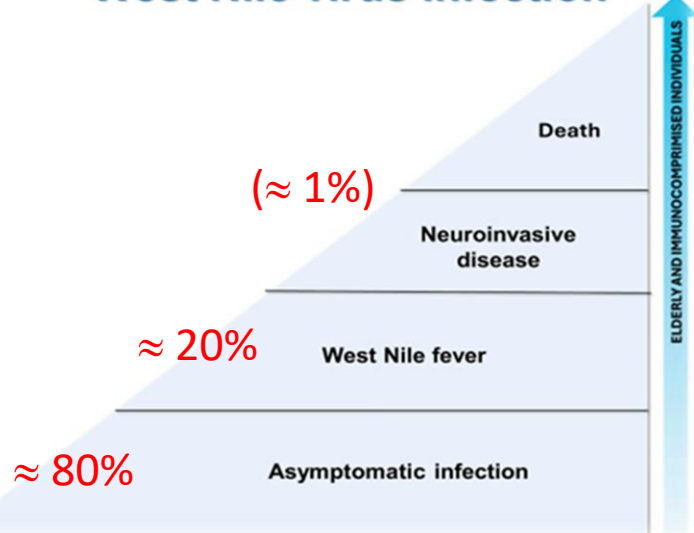
Famiglia: *Flaviviridae*
Genere: *Orthoflavivirus*

Lineage 1-9
Lineages 1 e 2 associati a
infezioni neuro-invasive
nell'uomo

Virus Family	Viral Genus	Virus	Vector Species
Bunyaviridae	Orthobunyavirus	California serogroup viruses	Mosquito (Aedes sp.)
	Phlebovirus	Rift Valley Fever virus	Mosquito (various)
	Phlebovirus	Toscana virus	Sandfly (Phelbotomus sp.)
	Phlebovirus	Phlebotomus fever virus	Sandfly (phelbotomus)
	Phlebovirus	Sandfly Fever Naples virus	Sandfly (phelbotomus)
	Phlebovirus	Sandfly Fever Sicilian virus	Sandfly (phelbotomus)
	Phlebovirus	Heartland virus	Tick (A. americanum)
	Phlebovirus	Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus	Tick (H. longicornis)
	Nairovirus	Crimean Hemorrhagic Fever virus	Tick (Hyalomma sp.)
Flaviviridae	Flavivirus	Dengue Virus	Mosquito (Aedes sp.)
	Flavivirus	Zika virus	Mosquito (Aedes sp.)
	Flavivirus	Yellow fever virus	Mosquito (Aedes sp.)
	Flavivirus	<u>West Nile Virus</u>	Mosquito (Culex sp.)
	Flavivirus	St. Louis Encephalitis virus	Mosquito (Culex sp.)
	Flavivirus	Japanese encephalitis virus	Mosquito (Culex sp.)
	Flavivirus	Murray Valley encephalitis virus	Mosquito (Culex sp.)
	Flavivirus	Usutu	Mosquito (various)
	Flavivirus	Omsk Hemorrhagic fever virus	Tick (dermacentor)
	Flavivirus	Kyasanur Forest Disease virus	Tick (Haemaphysalis sp.)
	Flavivirus	Tick-borne encephalitis virus	Tick (Ixodes and Haemaphysalis sp.)
	Flavivirus	Powassan virus	Tick (Ixodes sp.)
Orthomyxoviridae	Thogotovirus	Bourbon virus	Tick (A. americanum)
Reoviridae	Coltivirus	Colorado tick fever	Tick (dermacentor)
Rhabdoviridae	Vesiculovirus	Vesicular Stomatitis (New Jersey) virus	Sandflies (Lutz. Sp.) Mosquitos (various)
	Vesiculovirus	Chandipura	Sandfly (Phlebotomus Sp.)
Togaviridae	Alphavirus	Barmah Forest Virus	Mosquito (Aedes and Culex sp.)
	Alphavirus	Chikungunya virus	Mosquito (Aedes sp.)
	Alphavirus	Venezuelan equine encephalitis virus	Mosquito (Culex sp.)
	Alphavirus	Sindbis virus	Mosquito (Culex sp.)
	Alphavirus	Equine encephalitis virus	Mosquito (Culex sp.)
	Alphavirus	Mayaro virus	Mosquito (Haemagogus sp.)

Sospetto clinico e diagnosi differenziale delle arbovirosi

West Nile virus infection



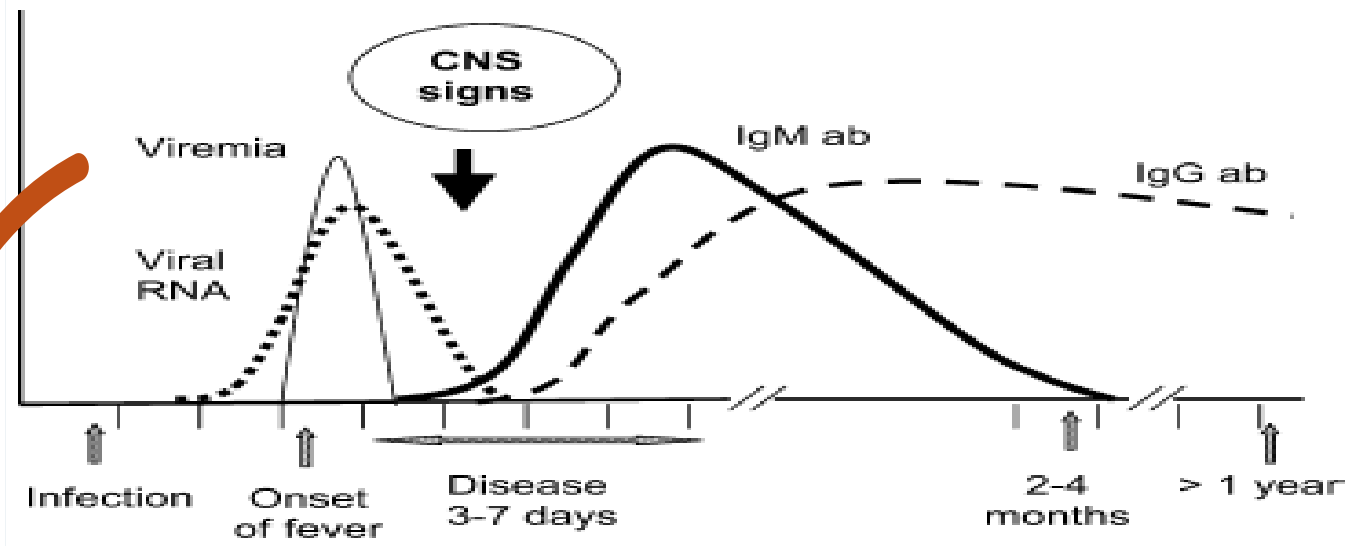
- Nella maggior parte dei casi, asintomatici o con sintomatologia non specifica ("simil-influenzale"), **comune a molte altre condizioni patologiche**, spesso con distribuzione ed epidemiologia simile
- A seconda della provenienza geografica del paziente, devono essere escluse altre eziologie epidemiologicamente correlate e clinicamente simili.

List of pathogens to be considered in the differential diagnosis of patients presenting with acute febrile illness

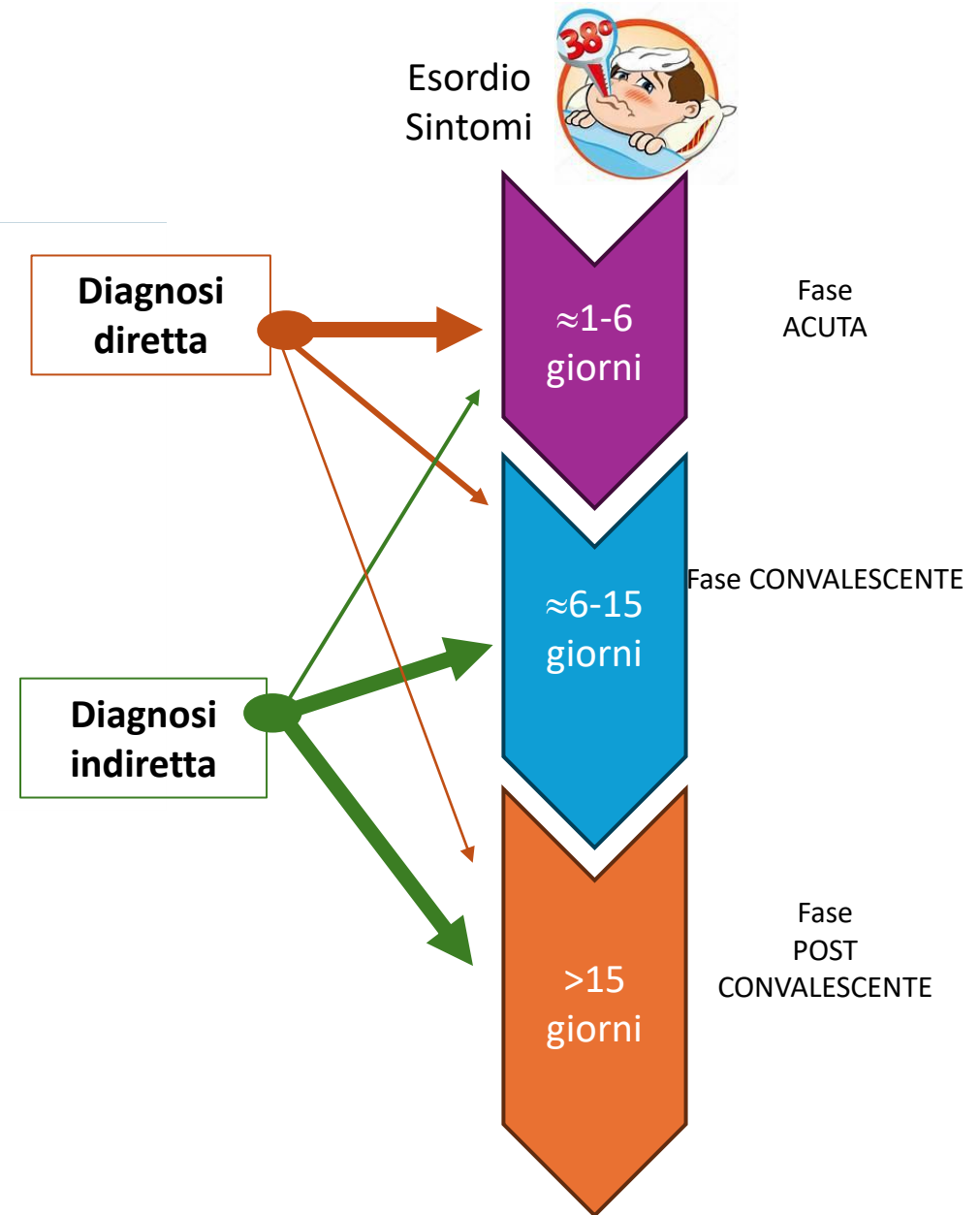
Pathogen classification	List of pathogens
Arthropod-borne viruses	DENV, Chikungunya virus, West Nile virus, Yellow fever virus, Zika virus, Japanese encephalitis virus, Tick-borne encephalitis virus, Oropouche virus, Crimean-Congo haemorrhagic fever virus, St. Louis encephalitis virus, Mayaro virus
Other viral pathogens	Measles virus, Rubella virus, Epstein-Barr virus, Enteroviruses, Influenza virus, Hepatitis A virus, Hantavirus, Arenavirus, SARS-CoV-2
Bacterial pathogens	<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Leptospira</i> spp., <i>Salmonella typhi</i> , <i>Burkholderia pseudomallei</i> , <i>Rickettsial</i> species, <i>Streptococcus pyogenes</i>
Parasitic pathogens	<i>Plasmodium</i> spp.

Approccio integrato di differenti metodi diagnostici

Viremia e cinetica anticorpale nell'infezione da WNV



Viremia generalmente bassa e breve

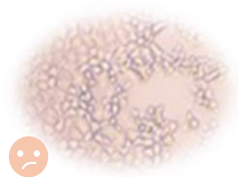


Principali metodiche per la diagnosi virologica delle infezioni da WNV

Diagnosi diretta

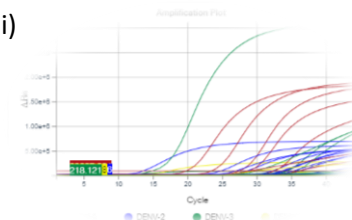
■ Isolamento Virale

- In-vitro su linee cellulari (mammifero e di zanzara)
- Tempi lunghi e expertise/capacità strutturali (BSL-3) 😞
- Rischio di falsi negativi per presenza di Ab (immunocomplessi) 😞



■ Test molecolare per ricerca dell'RNA virale

- Alta sensibilità e specificità
- Applicabile su diversi fluidi biologici
- Diverse tipologie di test ed approcci (Real Time PCR, PCR genere-specifica, multiplex, NAT per donazioni)
- Possibilità di analisi filogenetica
- Expertise e costo 😞



Caso confermato

Diagnosi indiretta

■ Sierologia IgM/IgG

- IgM a partire in media da $\approx 5-6$ gg dai sintomi a $\approx 2-3$ mesi o più a lungo (es. WNV, ZIKV)
- Cross-reattività tra virus correlati (pregresse infezioni/vaccinazioni) 😞
- Sensibilità/specificità variabile 😞

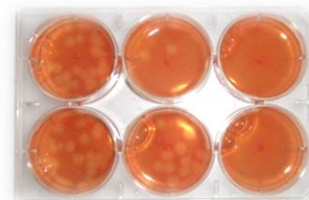


Caso probabile

-IgM su un unico campione

■ Siero-neutralizzazione (*test di conferma*)

- Alta specificità
- Tempi lunghi e expertise/capacità strutturali (BSL-3) 😞



Caso confermato

- IgM+neutralizzazione
- IgM specifiche su liquor
- Sieroconversione nel siero acuto e convalescente

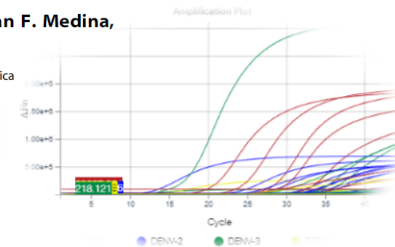
Diagnosi molecolare specifica

- Ricerca diretta del genoma virale in **diversi fluidi biologici**
- Informazione quantitativa o semi-quantitativa della carica virale
- Possibilità di caratterizzazione filogenetica
- Diverse tipologie di test ed approcci (Real Time PCR, Nested PCR genere specifica, multiplex, NAT per donazioni)

Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus

Gilberto A. Santiago, Edgardo Vergne, Yashira Quiles, Joan Cosme, Jesus Vazquez, Juan F. Medina, Freddy Medina, Candimar Colón, Harold Margolis, Jorge L. Muñoz-Jordán*

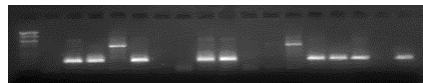
Centers for Disease Control and Prevention, Division of Vector-Borne Diseases, Dengue Branch, San Juan, Puerto Rico, United States of America



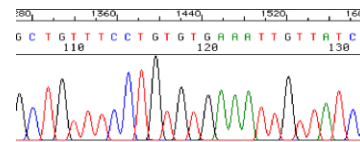
Test di screening dei donatori basato su real-time PCR per chikungunya e virus dengue



Nested PCR genere-specifica



es. pan-alphavirus o pan-orthoflavivirus
[sequenza genomica altamente conservata]



sequenziamento Sanger

(caratterizzazione molecolare dell'amplicone consentendo
l'identificazione del virus presente in un campione biologico)

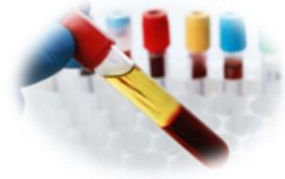
Test NAT commerciali per donazioni, marcati CE IVD:
1) real time PCR – kit cobas® (Roche)/cobas® 6800/8800
2) TMA - Procleix (Grifols)/Procleix Panther System.

Principali Campioni Biologici per la Diagnosi di infezione da WNV

Diagnosi diretta

- ☐ **Campione ematico** (plasma/sangue intero)

provette con anticoagulante, preferibilmente EDTA o sodio citrato; non utilizzare provette contenenti eparina



utilizzo di più matrici biologiche

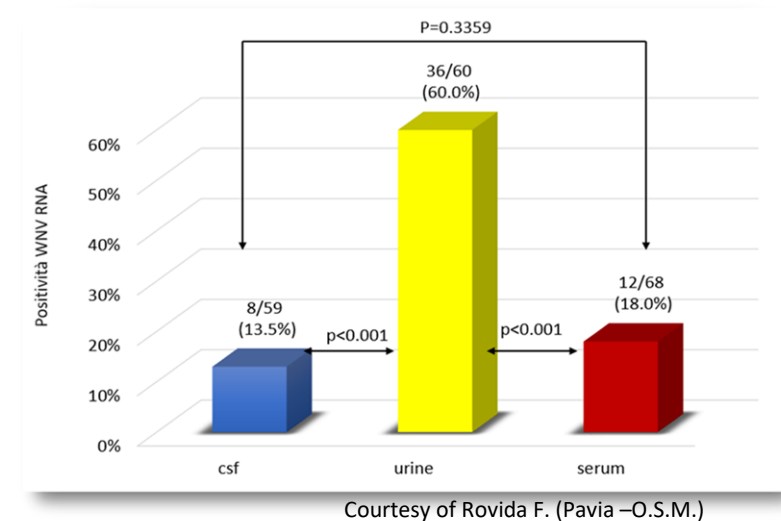
- ☐ **Liquor**

Nei casi di manifestazioni neurologiche, tramite puntura lombare o rachicentesi
Per le analisi virologiche, refrigerato e volume minimo 1 ml in provette sterili



- ☐ **Urine**

Generalmente maggiore carica virale e rilevazione più prolungata
Utilizzare provette o contenitori per urine, sterili ed infrangibili



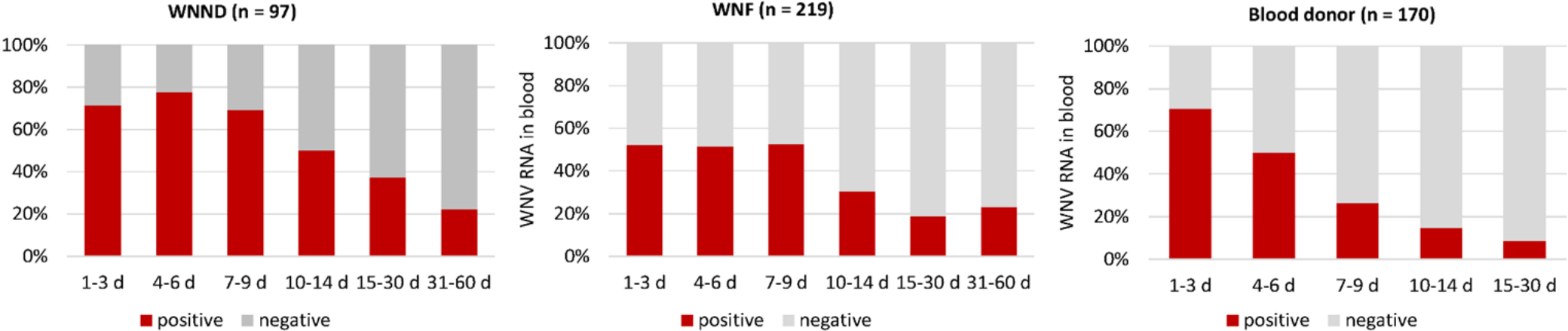
Carica virale

Materiale biologico	WNV-RNA Mediana (copie/mL)	WNV-RNA Range (copie/mL)
Urine	76.657	90 - 109.474.200
Plasma	180	20 - 80.520
Liquor	620	80 - 1.760

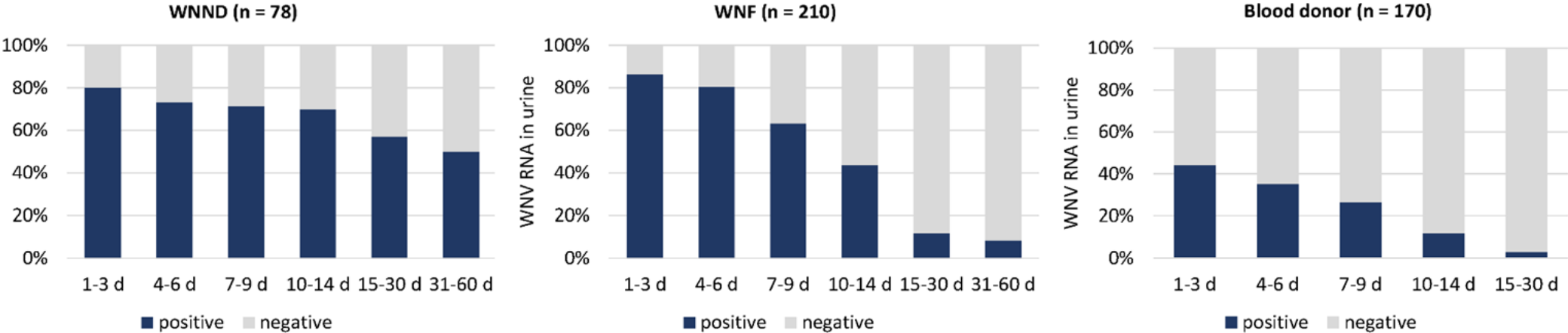
RNA virale in pazienti con infezione da WNV

% of WNV RNA positivity

Blood



Urine





Sequenziamento virale NGS

Supporto per la diagnosi e sorveglianza, ma non idoneo come test di prima linea per la complessità, le risorse e le tempistiche necessarie



≈ 4-5 giorni

- Approccio ad ampliconi (targeted)

Sequenziamento di una specifica regione genica (o più regioni per l'intero genoma) mediante metodica Sanger o NGS (maggiore profondità di sequenziamento)

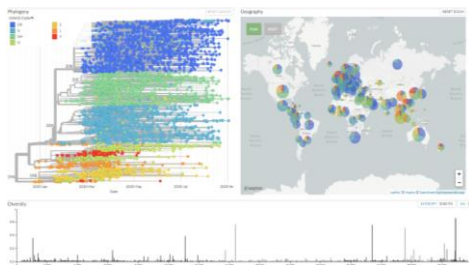


≈ 6-10 giorni

- Approccio shot-gun (unbiased)

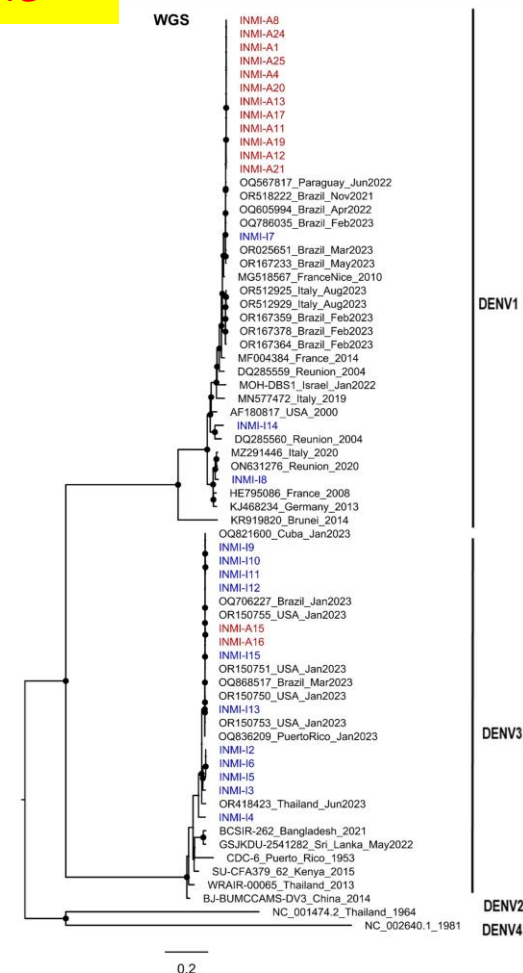
Sequenziamento di tutto il materiale genomico del campione

- Caratterizzazione genetica del patogeno
- Conferma diagnostica
- Filogenesi ed epidemiologia molecolare (es., cluster, fonte)



https://nextstrain.org/ncov/global?c=GISAID_clade&label=clade:19A

Le sequenze ottenute vengono rese disponibili alla comunità scientifica tramite le banche dati

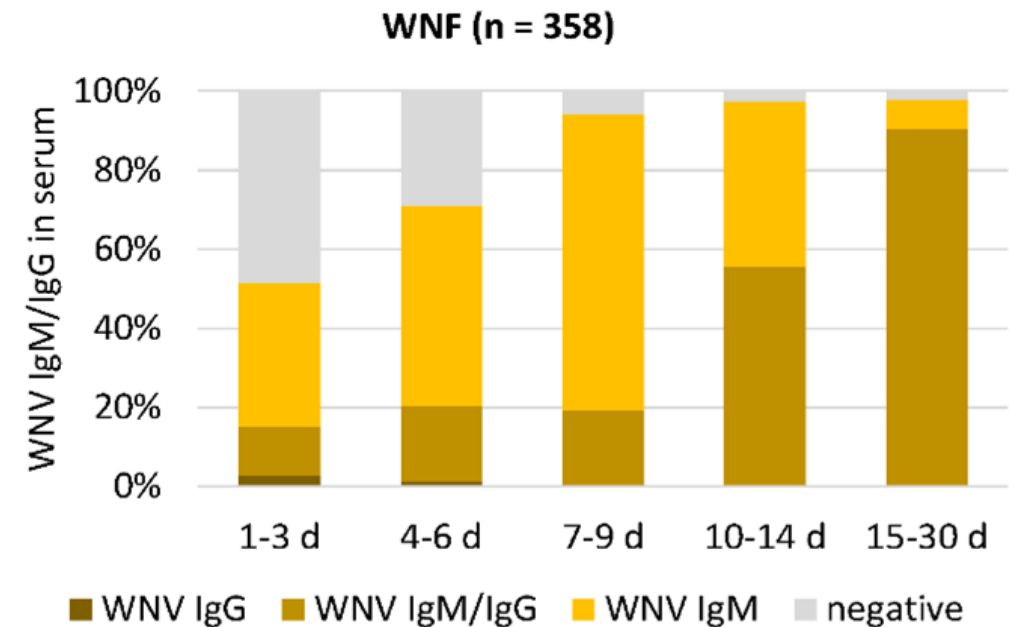
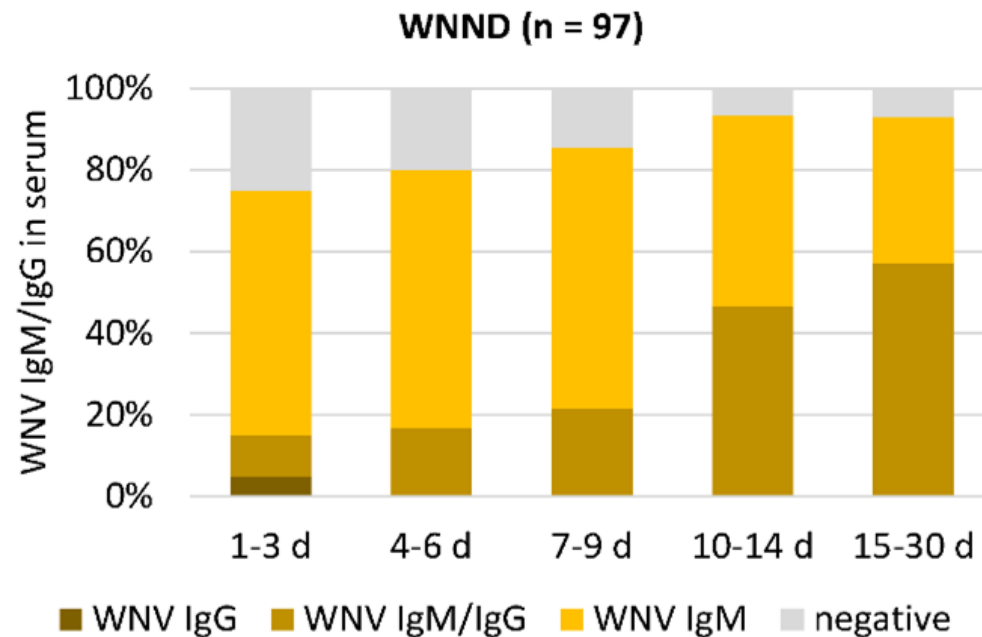


DENV cases in Lazio, 2023

Diagnosi sierologica

- **Sierologia:** Ricerca degli anticorpi specifici (IgM e IgG) in campioni di siero

- rilevazione delle **IgM specifiche** nel campione di siero raccolto a partire in media da $\approx 5-6$ giorni dai sintomi (in media fino a $\approx 2-3$ mesi)
- evidenza di **sieroconversione** in due campioni di siero raccolti a distanza di almeno 15 giorni (IgM $\rightarrow$ IgG, oppure incremento del titolo delle IgG di 4 volte)



Utilità delle IgM già nei primi giorni dai sintomi

Principali Campioni Biologici per la Diagnosi di infezione da WNV

Diagnosi indiretta

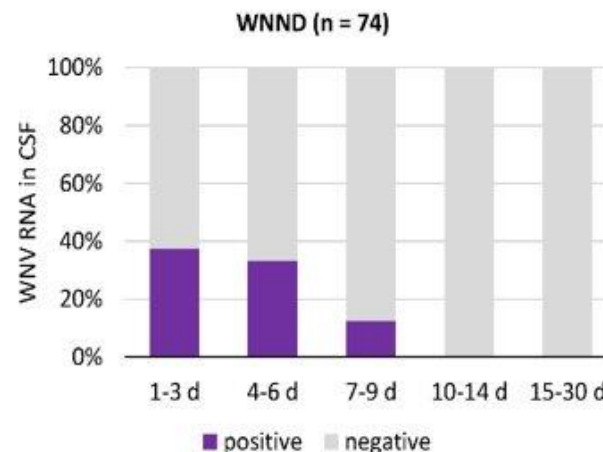
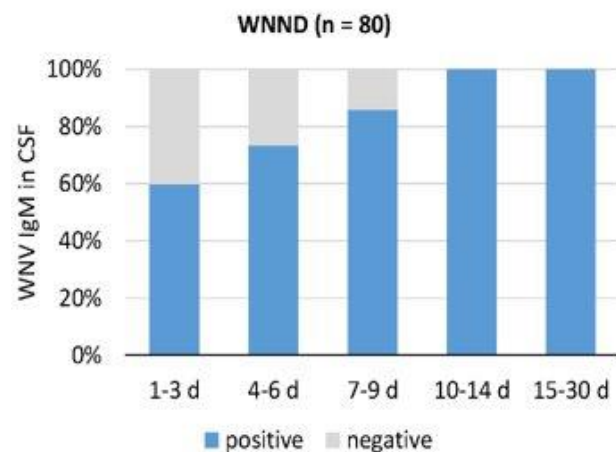


☐ Siero

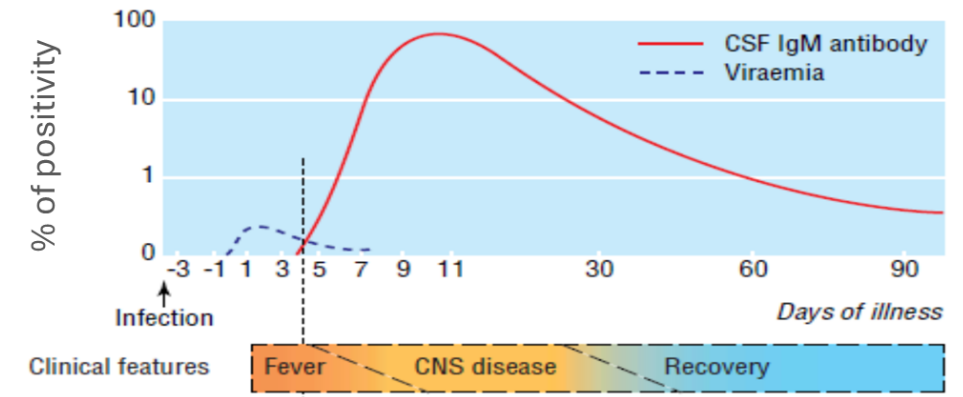
Sangue in provette per sierologia, preferibilmente contenenti gel separatore

☐ Liquor

Nei casi di manifestazioni neurologiche, tramite puntura lombare o rachicentesi
Per le analisi virologiche, refrigerato e volume minimo 1 ml in provette sterili



utilizzo di più matrici biologiche



IgM su liquor aumenta la sensibilità diagnostica per le infezioni neuroinvasive da WNV

Attenzione: rischio cross-reattività !!!

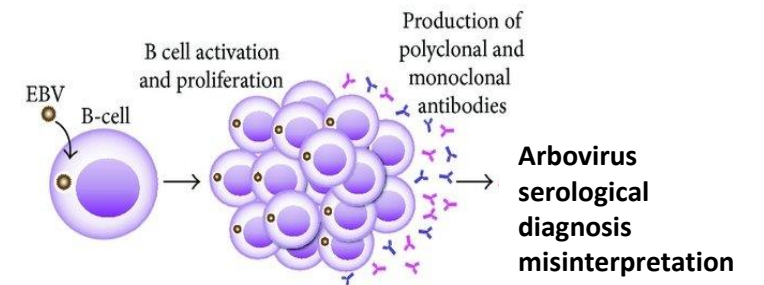
Criticità diagnosi sierologica delle arbovirosi

- **Cross-reattività della risposta immunitaria contro virus della stessa famiglia**
 - Omologia antigenica ed identità di sequenza
 - “Original antigenic sin” (propensione del sistema immunitario ad utilizzare preferenzialmente la memoria immunologica di una precedente infezione/vaccinazione quando si incontra un virus correlato)

- **Stimolazione policlonale delle cellule B**

I test sierologici possono essere influenzati anche da infezioni con agenti patogeni completamente diversi, potenzialmente a causa della stimolazione policlonale delle cellule B

- Virus (EBV, CMV, HIV, Morbillo, Parvovirus B19)
- Bacteria/parasites (TB, Leptospira spp., T. pallidum, Borrelia spp., Plasmodium spp.)

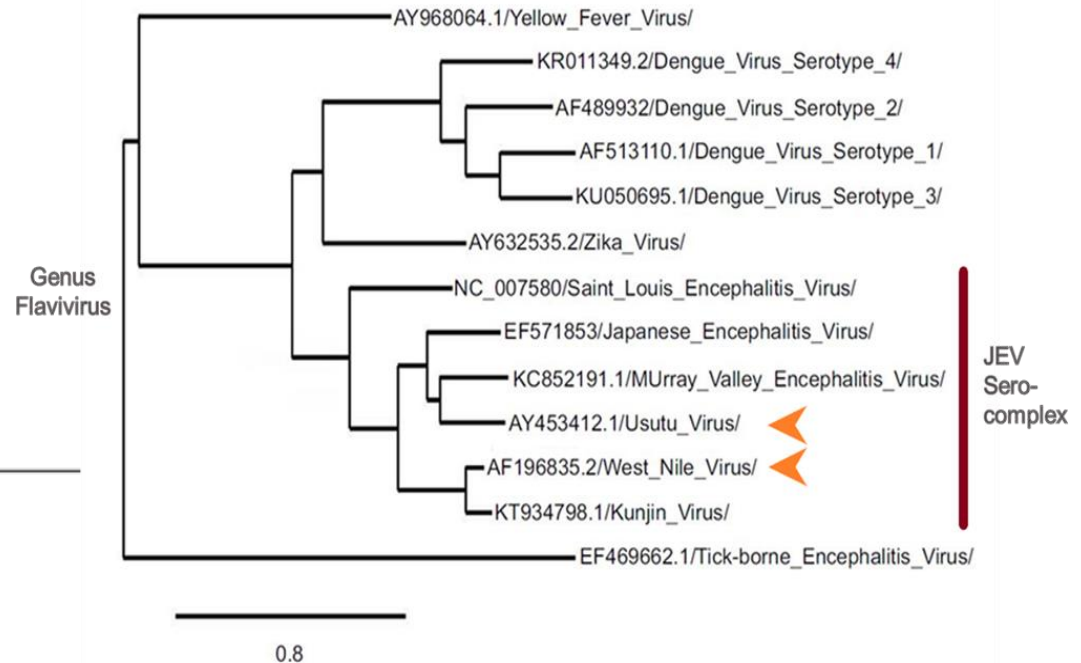


→ **Rischio di falsi positivi !!!**

WNV e USUV

<i>West Nile</i>	<i>Usutu</i>
<u>Test di laboratorio per caso probabile:</u> - Risposta anticorpale IgM specifica al WNV nel siero;	N.B: non disponibili in commercio test per la rilevazione di IgM specifiche per USUV: si raccomanda l'invio dei campioni ai Laboratori di Riferimento per l'esecuzione di saggi in house eventualmente disponibili.
<u>Test di laboratorio per caso confermato (almeno uno dei seguenti):</u> - isolamento del WNV nel siero, nelle urine e/o nel liquor; - identificazione dell'acido nucleico del WNV nel sangue, nelle urine e/o nel liquor; - risposta anticorpale specifica al WNV (IgM) nel liquor; - titolo elevato di IgM WNV e identificazione di IgG WNV nel siero e conferma mediante neutralizzazione.	

- Casi sporadici di malattia neuro-invasiva correlata a USUV – maggior parte casi asintomatici
- Forte cross-reattività tra USUV e WNV



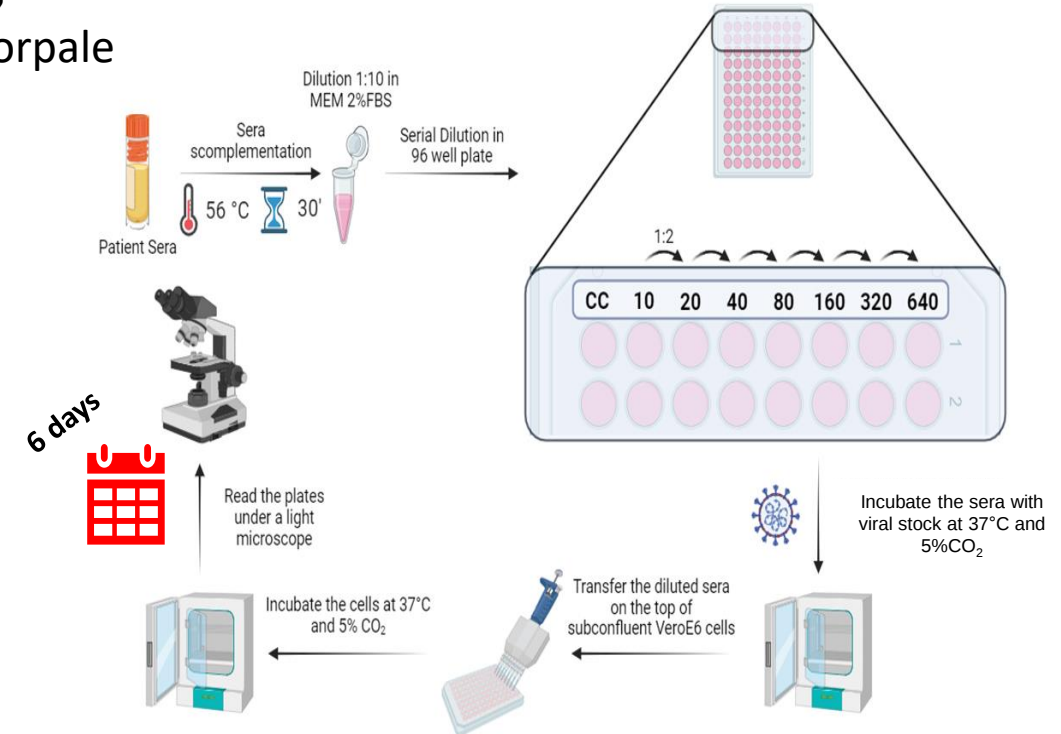
Diagnosi sierologica: Importanza dell'analisi longitudinale e differenziale

Se positività solo in sierologia → **Test di conferma in siero-neutralizzazione**
[alta specificità; immunità funzionale=anticorpi neutralizzanti]

- Raccolta di una coppia di sieri a distanza di almeno 2-3 settimane, per poter rilevare la sieroconversione o l'aumento del titolo anticorpale
- Analisi simultanea di virus correlati

Considerare dati epidemiologici per l'interpretazione dei risultati:

- provenienza,
- inizio sintomatologia
- infezioni pregresse o vaccinazioni per altri flavivirus
- informazioni sullo stato di salute del paziente (es., gravidanza, immunosoppressioni, immunodeficienze, autoimmunità...)



Conferma diagnosi sierologica mediante test di sieroneutralizzazione



- Patient with meningo-encephalitis
- No travel history
- Common neurotropic pathogens: negative



Clinical suspect for WNV infection



rtPCR WNV and Pan-flavi PCR: negative



	WNV	USUV
CLIA IgM (serum)	Positive (8.6)	N.A.
CLIA IgG (serum)	Positive (1.1)	N.A.
IFA IgM (serum)	Positive ($\geq 1:80$)	Positive ($\geq 1:80$)
IFA IgG (serum)	Positive ($\geq 1:8$)	Positive ($\geq 1:8$)
IFA IgM (liquor)	Positive ($\geq 1:80$)	Positive ($\geq 1:80$)
IFA IgG (liquor)	Positive ($\geq 1:8$)	Positive ($\geq 1:8$)
Neutralization test (serum)	Negative ($< 1:10$)	Positive (1:80)



USUV infection

Conferma diagnosi sierologica mediante valutazione longitudinale



- Patient with meningo-encephalitis
- Travel history (Romania)
- Common neurotropic pathogens: negative

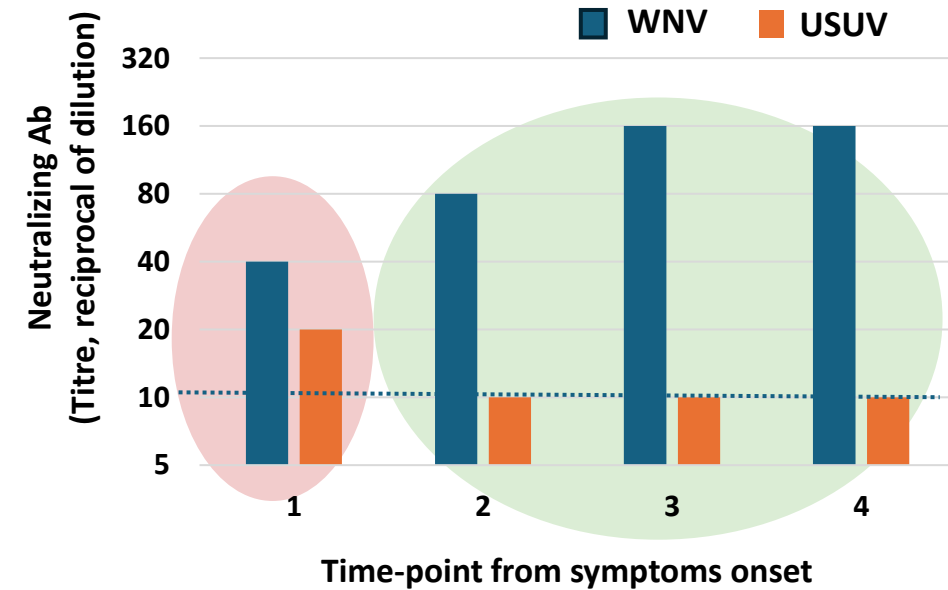


Clinical suspect for WNV infection



First testing

	WNV	USUV
CLIA IgM (serum/liquor)	Positive	N.A.
CLIA IgG (serum/liquor)	Positive	N.A.
IFA IgM (serum/liquor)	Positive	Positive
IFA IgG (serum/liquor)	Positive	Positive
Neutralization test (serum)	Positive	Positive



WNV infection



TAKE HOME MESSAGE

- ✓ **Diagnosi di laboratorio cruciale per la conferma del caso – invio al LRR per test diagnostici di conferma**
- ✓ Integrare diagnosi **diretta e indiretta**, ed utilizzare un algoritmo con più metodi e con test di conferma
 - Test molecolare specifico
 - Test sierologico
- ✓ Associare **diverse tipologie di campioni** per massimizzare la probabilità di rilevazione diretta (importanza delle urine)
- ✓ Per la conferma sierologica, necessità di **campioni sequenziali a distanza di tempo**
- ✓ In caso di infezioni neuro-invasive, utile la ricerca di **IgM nel liquor**
- ✓ Importante ampia **diagnosi differenziale** (non solo altri arbovirus) in considerazione dei dati epidemiologici e presentazione clinica



INFORMAZIONI PRATICHE

- Avvisare il Laboratorio di Virologia dell'invio di campioni (h24/7/365)

Contatti: acceviro@inmi.it

Numero urgenze: 06.55170666; 3204343793

- Inviare preferibilmente **2 provette per ciascuna tipologia di campione:**

- **Siero** (almeno 4 ml; provette gel separatore)
- **Sangue/EDTA** (almeno 4 ml; provette emocromo, NO eparina)
- **Urine** (almeno 4 ml; provette/contenitori sterili)
- **Liquor**, ove disponibile (almeno 1 ml; provette/contenitori sterili)

- I campioni vanno mantenuti a +4° C prima dell'invio.

Il trasporto al Laboratorio effettuato nel più breve tempo possibile, preferibilmente entro le 24 ore e a temperatura refrigerata.

Per tempi di consegna più prolungati, vanno presi accordi diretti con il laboratorio.

[per liquor, ove possibile, consigliato dividere aliquota per analisi virologiche, refrigerato]

- Il trasporto dei campioni al laboratorio va eseguito secondo le correnti raccomandazioni per il trasporto di campioni a rischio biologico seguendo il principio del triplo involucre

L'indirizzo a cui inviare i campioni:

Laboratorio di Virologia

Pad. Baglivi

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive «L. Spallanzani»

Via Portuense 292, 00149 – Roma

(ingresso carrabile: via G. Folchi 6 A)





INFORMAZIONI PRATICHE

I prelievi devono essere accompagnati da:

- **Allegato A/2 Arbovirosi**

- Tipologia campioni inviati
- Test diagnostici richiesti e su quali campioni
- Contatti telefonici ed e-mail (istituzionale) per eventuale richiesta di informazioni e per invio del referto

- **Scheda di notifica e sorveglianza**

(Allegato 1 del Piano Regionale «Scheda di segnalazione di caso umano di infezione da virus WNV e USUTU»)

ALLEGATO "A"/2 (Arbovirus)

DA	RICHIEDENTE: _____ RAGIONE SOCIALE (SE DIVERSA DAL RICHIEDENTE): _____ INDIRIZZO: _____ PARTITA IVA: _____
A	ISTITUTO NAZIONALE PER LE MALATTIE INFETTIVE LAZZARO SPALLANZANI - I.R.C.C.S.

Identificazione del Paziente:
Cognome _____ Nome _____ Data di nascita _____

Reparto di provenienza _____

Motivo della richiesta di test:

☐ Screening pre-trapianto

☐ Diagnosi di infezione

Campioni inviati:

☐ Siero

☐ Saliva

☐ Tampone rettale

☐ Urine

☐ Liquor

☐ Striscio di sangue

☐ Sangue/EDTA

☐ Tampone faringeo

☐ Goccia spessa

☐ Altro

(specificare) _____

ESAMI RICHIESTI	

IL MEDICO RICHIEDENTE
(Nome in stampatello) _____

firma del richiedente _____

DATA _____

Recapiti per le comunicazioni: _____

N. di fax al quale inviare il referto: _____

FIRMA E TIMBRO DEL DIRETTORE SANITARIO DELLA STRUTTURA RICHIEDENTE

PARTE DA COMPILARE A CURA DELL'U.O. DELL'ISTITUTO "L. SPALLANZANI" - CHE EFFETTUA LA PRESTAZIONE

PRESTAZIONI ESEGUITE IL: _____

PRESTAZIONI ESEGUITE	IMPORTO	PRESTAZIONI ESEGUITE	IMPORTO

FIRMA E TIMBRO DI CHI EFFETTUA LA PRESTAZIONE

FIRMA E TIMBRO DEL DIRETTORE DEL DIPARTIMENTO

West Nile Virus ☐ Usutu Virus ☐ Coinfezione WNV/USUV ☐Contatti medico
richiedente —

Dati anagrafici

Viaggi all'estero, date e
provenienza _____

Vaccinazioni e gravidanza

Contatti: **SERESMI**; via mail: seresmi@pec.inmi.it

+
Approccio
sindromico]

- Eventuali test per arbovirosi già eseguiti con risultato

[Approfondimenti
con test di 2^a livello
(dato preliminare).
Caso probabile?]

Percorso diagnostico: linee guida



Percorso Diagnostico **MENINGOENCEFALITI CAUSATE DA VIRUS EMERGENTI ENDEMICI DEL BACINO MEDITERRANEO**

Prima edizione maggio 2023

I virus **West Nile (WNV)**, **Usutu (USUV)**, Toscana (TOSV) ed il virus dell'encefalite da zecca (TBEV) sono i principali arbovirus associati a meningoencefaliti, endemici in Europa e nel bacino del Mediterraneo.

E' necessario, pertanto, porre particolare attenzione all'identificazione di tali infezioni, includendo nella diagnosi differenziale delle encefaliti, meningiti a liquor limpido ed altre sindromi neurologiche acute (es. paralisi flaccida acuta) in particolar modo nei periodi di attività dei vettori.

La diagnosi di laboratorio, seppur attualmente di non comune accesso, svolge un importante ruolo per la conferma dei casi per i quali gli aspetti clinici e i dati epidemiologici sono suggestivi di infezione da arbovirus neurotropi.