

Ricerca corrente anno finanziario 2009

Valutazione di nuove strategie per la sorveglianza dell'infezione da virus West Nile (WNDV)

Responsabile scientifico: Dr. Gian Luca Autorino

Durata del progetto: 24 mesi

Elenco delle Unità Operative (U.O.) impegnate nel progetto:

- 1) Dr. Gian Luca Autorino – IZSLT Direzione Operativa Diagnostica delle malattie virali CERME
- 2) D.ssa Maria Teresa Scicluna – IZSLT Direzione Operativa Diagnostica delle malattie virali CERME
- 3) Dr. Ugo Marchesi – IZSLT Ufficio di Staff Biotecnologie
- 4) Dr. Marcello Sala – IZSLT Ufficio di Staff Osservatorio Epidemiologico
- 5) Dr. Giorgio Saralli - IZSLT Sezione di Latina
- 6) Dr. Dario Deni – IZSLT Sezione di Arezzo
- 7) D.ssa Maira Guidoni – IZSLT Sezione di Grosseto
- 8) Dr. Claudio De Liberato – IZSLT Direzione operativa Diagnostica Generale
- 9) Dr. Luciano Toma – Istituto Superiore di Sanità
- 10) Dr. Marco Reitano - Centro Quadrupedi Esercito Italiano Grosseto
- 11) Dr. Carlo Bernardi - Asl Latina
- 12) Dr. Ettore Barneschi - Asl Arezzo
- 13) Dr. Domenico Vicari - IZS della Sicilia

Razionale del progetto

La West Nile Disease (WND) è una malattia sostenuta dal virus West Nile (WNDV), un arbovirus della famiglia dei *Flaviviridae* composto da un RNA a singolo filamento. Vettori appartenenti a diversi generi della famiglia *Culicidae* sono in grado di diffondere l'infezione. Tra di essi il genere *Culex* è risultato essere il più rilevante dal punto di vista epidemiologico. Passeriformi, Caradriformi e rapaci sono riconosciuti come i principali reservoirs. Occasionalmente, può essere trasmesso ad altre specie animali; equini e uomo risultano ospiti accidentali, sviluppando occasionalmente sindromi neurologiche. In Italia il VNDV è stato identificato per la prima volta nel 1998 in Toscana ed è ricomparso successivamente nel 2008 in Emilia Romagna, diffondendosi poi in Veneto e Lombardia. La segnalazione nel 2009, di nuovi focolai indicherebbe la sua endemizzazione nella stessa area. Quest'anno la circolazione virale è stata segnalata anche in Toscana e nel Lazio.

In Italia è attivo dal 2002 un Piano di Sorveglianza volto a rilevare la presenza e la diffusione di VNDV. Tuttavia, alla luce della recente diffusione della malattia, si rendono necessarie l'acquisizione di maggiori informazioni sull'epidemiologia dell'infezione e la disponibilità di ulteriori strumenti per la sorveglianza e la diagnostica da integrare a quelli attualmente in uso.

Le esperienze condotte nel corso della sorveglianza hanno dimostrato l'utilità degli equini ai fini della rilevazione della circolazione virale. A causa delle elevate prevalenze osservate nelle aree dove l'infezione è divenuta endemica e dell'impiego della vaccinazione, anche in altre zone del territorio non interessate da circolazione di VNDV ma comunque sottoposte a sorveglianza, potrebbe venire meno la disponibilità di tale indicatore.

Il progetto è particolarmente coerente rispetto alle linee guida 2009-2011 della ricerca corrente proponendo: a) lo studio di aspetti epidemiologici e fattori di rischio, relativi ad una malattia trasmessa da vettori biologici, emergente nei paesi del mediterraneo in particolare e, in generale, in quelli comunitari che costituisce un importante problema di Sanità Pubblica; b) il miglioramento dell'efficienza dell'attuale sistema di sorveglianza.

Gli obiettivi di breve termine sono:

individuare nuove specie animali da utilizzare come sentinelle nei piani di sorveglianza valutando la sensibilità per WNDV soprattutto in aree in cui si verificano infezioni sostenute da virus con caratteristiche di scarsa patogenicità nei confronti delle specie aviarie, concentrando l'attenzione sul suino e sul cane e verificando la propensione delle diverse specie di vettori a nutrirsi su di essi.

Fornire informazioni utili alla valutazione del rischio attraverso il miglioramento delle conoscenze sull'epidemiologia, ecologia ed evoluzione del WNDV.

Gli obiettivi di medio termine sono:

la produzione di proteine ricombinanti e anticorpi monoclonali per lo sviluppo di metodi diagnostici innovativi alternativi/integrativi a quelli disponibili per la diagnosi d'infezione in soggetti vaccinati.

Bibliografia di riferimento essenziale:

1) *Exposure of Domestic Mammals to West Nile Virus during an Outbreak of Human Encephalitis, N Y City, 1999.* Komar N. et Al. *Em. Infect. Dis.* Vol. 7, No. 4, July–August 2001, 736-738 2) *Experimental infection of pigs with West Nile virus.* M. L. Teehee, et Al. *Arch Virol* (2005) 150: 1249–1256 3) *Experimental Infection of Cats and Dogs with W N V.* Austgen L-E. et Al. *Em. Infect. Dis.* Vol. 10, No. 1, January 2004 4) *Juvenile Dogs as Potential Sentinels for WNV Surveillance.* Resnick M. P. et Al. *Zoonoses Public Health.* 55 (2008) 443–447 5) *Secretion of flaviviral non-structural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis.* Alcon-LePoder S et Al. 2006 *Novartis Found Symp.*; 277:233-47; discussion 247-53. 6) *Detection of antibodies to West Nile virus in equine sera using microsphere immunoassay* Balasuriya UB et Al. 2006. *J Vet Diagn Invest.*;18(4):392-5. 7) *Conservation and variability of WNV Proteins.* Koo Q.Y. et al. (2009) *PLoS one* Vol. 4, Issue 4 8) *Lardeux F. et Al. (2007) Host choice and human blood index of Anopheles pseudopunctipennis in a village of the Andean valleys of Bolivia.* *Malaria Journal*, 6: 8-22 9) *Richards S.L. et Al. (2006) Host-feeding patterns of Aedes albopictus in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes.* *Journal of Medical Entomology* 43 (3): 543-551 10) *Kay B.H. et Al. (2007) Mosquito feeding patterns and natural infection of vertebrates with Ross River and Barmah Forest viruses in Brisbane.* *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76 (3): 417-423

Descrizione complessiva del progetto

Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento

Per la sorveglianza della WND una specie animale sentinella ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche (CDC, 2003): a) essere sensibile all'infezione; b) sopravvivere all'infezione sviluppando anticorpi facilmente rivelabili; c) non costituire un rischio d'infezione per gli operatori con cui hanno contatti; d) non sviluppi mai una viremia sufficiente per infettare gli insetti vettori. Ad oggi, i cavalli sono stati per le caratteristiche sopra descritte, i mammiferi maggiormente impiegati in piani di sorveglianza. Indagini di prevalenza hanno messo in evidenza che circa il 30% della popolazione canina del Sud Africa aveva anticorpi sieroneutralizzanti nei confronti di WNDV ed anche ricerche condotte nel 1999 hanno messo in evidenza prevalenze superiori che nei cavalli residenti nelle aree limitrofe alla città di New York e che anche questa specie può essere considerata ospite terminale dell'infezione. Inoltre, le sier conversionsi nei cani precederebbero di circa 6 settimane la comparsa dei casi umani e, condividendo lo stesso habitat dell'uomo, potrebbe rappresentare una sentinella ideale da utilizzare in piani di sorveglianza. Minori sono le informazioni relative all'infezione nella specie suina in cui è stato comunque osservato che a seguito di infezione sperimentale, animali esposti al pasto di vettori infetti, tuttavia presentavano una modesta viremia e sier convertivano senza presentare sintomi di malattia.

Relativamente alle conoscenze di ordine entomologico, nel mondo, WNDV è stato isolato da zanzare appartenenti ad almeno 75 specie di 10 generi diversi. Per quanto riguarda l'Europa, il genere *Culex* è ritenuto quello epidemiologicamente più rilevante. In particolare 2 specie, *Cx. modestus* e *Cx. pipiens* (nelle sue 2 forme biologiche *Cx.p. pipiens* e *Cx. p. molestus*) sono risultate essere i principali vettori in diversi episodi epidemici verificatisi nel nostro continente. In Italia nel 1998 *Cx. impudicus* è stata ritenuta probabile vettore di trasmissione enzootica.

In letteratura sono descritti diversi metodi biomolecolari, basati sul sequenziamento del DNA, con cui è possibile identificare specie animali appartenenti ai diversi gruppi tassonomici. Un simile metodo è stato sviluppato in Istituto e potrebbe essere utilmente impiegato per verificare la propensione alimentare dei differenti vettori sulle specie animali candidate come sentinelle. Tra i test diagnostici, l'OIE riporta sia metodi di identificazione diretta, con tecniche molecolari, immunologiche, ed isolamento virale, sia differenti metodi indiretti, sierologici, prevalentemente in grado di rilevare anticorpi delle classi IgM ed IgG. Il plaque reduction neutralization test (PRNT) è considerato il "gold standard" e quindi sempre utilizzato per la conferma di risultati altrimenti ottenuti. In ogni caso, i test sierologici attualmente in uso permettono di rilevare gli anticorpi nei confronti delle proteine pericapsidiche virali, la glicoproteina E e la proteina M. Essi, tuttavia, non consentono di distinguere anticorpi vaccinali da anticorpi indotti da infezione naturale. L'impiego del vaccino ostacolerà, di conseguenza, la diagnosi dell'infezione e la sorveglianza della stessa. Lo studio ed il confronto delle proprietà immunogeniche delle proteine non strutturali (NS) di WNDV rispetto a quelle, già note, delle proteine strutturali potrebbe costituire l'approccio per superare tale limite. Le proteine non-strutturali NS1, NS2b, NS3 ed NS5 contengono sequenze aminoacidiche altamente conservate nei ceppi WNDV appartenenti al lineage 1 e 2. In letteratura sono riportate osservazioni che confermano la capacità di epitopi appartenenti a proteine non strutturali di indurre immunità sia cellulo-mediata, sia umorale. In particolare, le proteine NS1 ed NS3 risulterebbero, ai fini diagnostici, delle ottime candidate per la ricerca di anticorpi diretti contro WNDV in seguito ad infezione naturale.

Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre

Verificare la propensione di *Cx. pipiens*, ed eventualmente di altre zanzare dello stesso genere, a nutrirsi sulle specie considerate come possibili sentinelle (cane, maiale), anche rispetto ad altre notoriamente attrattive nei confronti di questi culicidi, mediante catture, trials sperimentali sul campo e successive analisi dei pasti di sangue. Valutare la possibilità che zanzare adulte possano veicolare il virus tra aree con presenza di avifauna selvatica ed allevamenti suini intensivi o canili.

Valutare la sensibilità delle specie suina e canina quali possibili mammiferi "sentinella" alternativi o complementari agli equidi nell'ambito dell'attività di sorveglianza sierologica della WND, dapprima verificando la sensibilità relativa rispetto agli equidi in aree con attiva circolazione virale, successivamente, sulla base delle stime degli indici epidemiologici, sperimentando un modello di sorveglianza parallelo a quello attualmente operativo, in aree pilota individuate sulla base del rischio. In tali aree verranno valutate, sensibilità, specificità, precocità e Valori Predittivi del sistema di sorveglianza applicato sulle popolazioni Canine e Suine.

Verificare la possibilità che sieri ottenuti da soggetti vaccinati e con infezione naturale reagiscano in modo differente con epitopi di proteine non strutturali di WNDV, essendo quest'ultime associate alla replicazione attiva del virus.

Metodologia

Individuazione delle aree con attiva circolazione virale nel 2009. Definizione delle aree per la conduzione dello studio pilota sulle specie canina e suina. Raccolta dati relativi a demografia delle specie suina e canina. Stratificazione della popolazione suina in funzione della numerosità di capi e dell'orientamento produttivo con scelta dei criteri di eleggibilità della tipologia di soggetti da

arruolare nello studio. Per i cani sarà operata una stratificazione della popolazione al fine di individuare le classi di esposizione più idonee. Calcolo del campione di soggetti da sottoporre a test sierologico per lo studio retrospettivo, assumendo valori di prevalenza attesa e precisione a priori delle stime di prevalenza tarate sulle sieroprevalenze osservate negli equidi nel corso del 2009, assicurando un livello di confidenza delle stime pari al 95%. Attraverso l'applicazione di idonee metodologie dell'epidemiologia analitica sarà operato un confronto tra le sieroprevalenze osservate nelle specie alternative e quelle note per il 2009 negli equidi presenti nelle aree con attiva circolazione virale. Sperimentazione sistema di sorveglianza (studio prospettico), sulle specie canina e suina e definendo il campione di suini e cani sentinella sieronegativi necessari a garantire adeguata sensibilità al sistema di sorveglianza nonché in grado di effettuare la stima dell'incidenza di sieroconversioni nel periodo a rischio- inferenza sulla popolazione generale.

Per gli studi entomologici saranno selezionati i siti dove effettuare le catture in base alla presenza delle specie animali domestiche oggetto di osservazione, all'abbondanza dei vettori e alla disponibilità di siti di riposo per le zanzare dove effettuare le catture mediante aspirazione. In un'area di 0.5 km di raggio intorno al sito prescelto verrà effettuato un censimento degli animali domestici presenti, mediante questionario e/o sopralluogo diretto. Le catture saranno effettuate con diversi metodi descritti in letteratura: trappole tipo CDC innescate con CO₂, gravid trap e aspirazione nei siti di riposo. Quest'ultima modalità sarà privilegiata, essendo la più indicata per la cattura di femmine replete. L'attività di cattura verrà effettuata nel periodo Giugno-Ottobre, con cadenza quindicinale. I Culicidi catturati verranno identificati morfologicamente a livello di specie mediante esame microscopico. Le femmine replete del genere *Culex*, una volta identificate, verranno dissezionate per effettuare le prove bio-molecolari sugli addomi contenenti sangue. Le analisi dei pasti di sangue per l'identificazione delle specie animali interessate, saranno eseguite sequenziando specifici tratti di DNA e confrontando in Genbank le sequenze ottenute.

Per evidenziare l'attrattività differenziale dei diversi ospiti, i risultati dell'analisi dei pasti di sangue verranno utilizzati per il calcolo dell'Host Feeling Index (HFI), secondo la seguente formula: $HFI = O_x/P_x$, dove O_x è la percentuale dei pasti di sangue sulla specie X, P_x la frequenza della specie X. P_x verrà calcolato sia prendendo in considerazione i numeri "assoluti" di animali appartenenti alle diverse specie, sia convertendoli mediante un fattore che tenga in considerazione il peso degli animali. Altre formule analoghe potranno di volta in volta essere utilizzate.

Per la verifica della risposta anticorpale nei confronti di proteine non strutturali del virus, differenti dai target comunemente impiegati attraverso i test attualmente disponibili, sarà costituita una banca di campioni di tre differenti tipologie: a) equini sicuramente negativi al test di riferimento mantenuti in zone indenni da infezione; b) equini positivi a seguito di infezione naturale; c) soggetti negativi e sottoposti a vaccinazione secondo i protocolli indicati dal produttore del vaccino, su cui effettuare prelievi con periodicità definita dal protocollo operativo predisposto.

Gli epitopi potenzialmente immunogeni di proteine NS di WNDV saranno ricercati integrando i dati bibliografici disponibili con specifici riscontri su fonti bioinformatiche, attraverso il confronto delle sequenze depositate in banca dati. Peptidi sintetici rappresentativi degli epitopi così individuati saranno acquistati da ditte specializzate.

Lo screening sperimentale degli epitopi, in base alla loro effettiva immunogenicità, avverrà cimentando in dot blot i peptidi sintetici acquistati con le batterie di sieri precedentemente raccolti.

Sulla scorta delle informazioni ottenute in sede di screening si procederà al clonaggio di sequenze nucleotidiche contenenti le regioni codificanti per i peptidi risultati immunogeni, in appropriati sistemi di espressione, scelti caso per caso in base alle caratteristiche delle regioni clonate e dei relativi prodotti proteici, in modo da garantirne la sintesi, la corretta maturazione post-traduzionale, nonché il recupero.

Gli antigeni prodotti per via ricombinante saranno utilizzati per produzione degli anticorpi monoclonali mediante la tecnica degli ibridomi. Gli anticorpi monoclonali ottenuti saranno caratterizzati attraverso la determinazione dell'isotipo e la valutazione della capacità di riconoscere epitopi conformazionali o lineari.

Descrizione dei criteri di trasferibilità e di diffusione dei prodotti e dei risultati da conseguire

Il contributo fornito da ciascuna unità operativa sarà utile per il miglioramento della conoscenza dei fattori di rischio relativi alla diffusione di WNDV.

Qual'ora la sperimentazione del sistema di sorveglianza sulle specie canina e suina si dimostrasse sensibile, efficiente e di pratico approccio, potrà utilmente essere integrato nei piani di sorveglianza nazionale. In particolare la specie suina, a motivo della brevità del ciclo produttivo, potrebbe costituire un buon indicatore anche nelle zone ad elevata prevalenza.

I prodotti biologici sviluppati dal progetto potranno essere utilizzati per lo sviluppo di nuovi metodi di utile impiego sia a scopo diagnostico sia ai fini del miglioramento della sorveglianza da parte della rete nazionale dei Laboratori Ufficiali e costituirà un supporto indispensabile per la diagnosi dell'infezione nella popolazione equina vaccinata presente sia in aree libere da WNDV, sia in zone a diffusione endemica.

I risultati delle diverse attività saranno pubblicati su riviste scientifiche, presentati nell'ambito di manifestazioni scientifiche, eventi formativi per il personale del SSN e per i professionisti operanti nel settore e resi disponibili agli Uffici competenti del Ministero della Salute, alle Regioni ed ai referenti degli Istituti Zooprofilattici.

Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto

Le differenti Unità Operative partecipanti sono in grado di apportare specifici contributi per la realizzazione di tutte le attività specialistiche previste dal progetto, garantendo, attraverso il coinvolgimento di epidemiologi, virologi, immunologi, biologi molecolari ed entomologi, un approccio multidisciplinare integrato ai fini dello sviluppo di attività di sorveglianza e di ricerca nei confronti di malattie trasmesse da vettori.

Descrizione e spiegazione dell'articolazione del programma in fasi fra le varie UU.OO

WP1 Individuazione sistemi di sorveglianza integrativi

Disegno dello studio trasversale retrospettivo nelle specie suina e canina e calcolo del campione necessario. Elaborazione dei risultati dello studio pilota (1 mese - UO 1, 2, 4)

Individuazione delle aree a rischio e definizione del campione di suini e cani sentinella (1 mese - UO 1, 2, 4)

Valutazione della prevalenza dell'infezione da WNDV nel suino e nel cane mediante ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi in sieri di animali mantenuti in zone in cui sia stata accertata circolazione virale in altre specie. (5 mesi - UO 1, 2, 4, 5, 6, 11, 12)

Verifica della specificità di eventuali positività sierologiche mediante impiego di test di conferma (1 mese - UO 14 – al termine della fase c)

Analisi comparativa dei risultati rispetto alle prevalenze sierologiche osservate nel corso dei Piani di sorveglianza e definizione di eventuali popolazioni da sottoporre a controllo ai fini della sorveglianza attiva (1 mese - UO 1, 2, 4)

Sperimentazione e valutazione della sensibilità di un sistema di sorveglianza su altre specie (mesi 12 - UO 1, 2, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 14)

Valutazione delle abitudini alimentari di *Culex pipiens* e di altri possibili vettori responsabili di trasmissione: Scelta dei siti di cattura e censimento delle specie ospiti presenti (3 mesi - UO 8, 9)

Valutazione delle abitudini alimentari di *Culex pipiens* e di altri possibili vettori responsabili di trasmissione: Catture, trials sul campo, identificazione di specie e del genoma di specie su cui abbiano effettuato pasti di sangue mediante l'impiego di tecniche biomolecolari (12 mesi UO 3, 8, 9)

WP 2 Studio e sviluppo di prodotti utilizzabili come strumenti diagnostici innovativi

Raccolta di campioni di sangue da equini risultati naturalmente infetti, da soggetti sieronegativi sottoposti a vaccinazione secondo protocolli predefiniti e da soggetti vaccinati e successivamente esposti ad infezione (4 mesi UO 1, 2, 5, 6, 7, 10 11, 12, 13).

- Selezione delle proteine non strutturali in grado di indurre una risposta immune: ricerca bibliografica (1 mese UO 3);
- acquisizione presso ditte specializzate di peptidi sintetici selezionati in base a quanto definito nel punto precedente (3 mesi UO 3);
- saggio dei peptidi di cui alla lettera c) con sieri di cui alla lettera a) (2 mesi UO 3);
- clonaggio di porzioni immunogene delle proteine non strutturali in differenti sistemi di espressione (5 mesi UO 3);
- verifica, in dot blot, del mantenimento dell'immunogenicità da parte delle proteine ricombinanti ottenute nella fase e), cimentandole con sieri di cui alla lettera a) (2 mesi UO 3);
- produzione degli anticorpi monoclonali mediante la tecnica degli ibridomi (da avviare contestualmente alla fase f) (mesi 6 UO 3);
- caratterizzazione degli anticorpi monoclonali prodotti, attraverso la determinazione dell'isotipo ed eventuale valutazione della capacità di riconoscere epitopi conformazionali o lineari (2 mesi UO 3);
- valutazione delle potenzialità diagnostiche dei prodotti ottenuti dal WP2 e stesura relazione finale (4 mesi UO 1, 2, 3).

WP 3 Divulgazione risultati della ricerca

Raccolta, elaborazione dati e stesura relazione finale (3 mesi UO 1, 2, 3, 4, 8, 9)

Output del programma

13° mese - Produzione del report intermedio e dell'elaborato finale del progetto di ricerca

20° mese - Sperimentazione di sistemi di sorveglianza nei mammiferi complementari a quelli attualmente disponibili

22° mese - Sviluppo di reagenti da utilizzare in campo diagnostico

Comunicazione dei risultati nell'ambito di eventi formativi e convegni scientifici (mese in relazione a periodo di partecipazione)

Pubblicazione di lavori scientifici relativi ai risultati ottenuti (mese in relazione ad accettazione e pubblicazione elaborati)

Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati raggiunti

Obiettivo: valutare la sensibilità di nuove specie di mammiferi all'infezione da WNDV –

Indicatore: numero di suini e cani positivi / numero di suini e cani controllati

Obiettivo: confrontare la sensibilità di tali specie rispetto agli equini –Indicatore rapporto di prevalenza

Obiettivo: valutare la propensione delle diverse specie di vettori a nutrirsi sul suino e sul cane –

Indicatore: rapporto fra numero di pasti di sangue effettuati su tali specie e numero di pasti di sangue

Obiettivo: sperimentazione di protocolli di sorveglianza – Indicatori: misurazione della sensibilità delle specie considerate rispetto ad altri sistemi di rilevazione in termini di precocità

Obiettivo: sviluppo di prodotti utilizzabili come strumenti diagnostici innovativi – Indicatori: numero proteine ricombinanti espresse; numero anticorpi monoclonali prodotti.