associazione microbiologi clinici italiani

Ente del Terzo Settore

Rif.2023-12

PERCORSO DIAGNOSTICO

MENINGOENCEFALITI CAUSATE DA VIRUS EMERGENTI ENDEMICI DEL BACINO MEDITERRANEO

Gruppo di Lavoro Organizzativo dei Percorsi Diagnostici (GLOPD)

Coordinatore: Cristina Giraldi
c.giraldi54@gmail.com
Proprietà intellettuale di AMCLI ETS.

Nel caso i contenuti siano utilizzati è necessario citare il Percorso Diagnostico nel seguente modo: AMCLI ETS. Percorso Diagnostico - Meningoencefaliti causate da virus emergenti endemici del bacino mediterraneo Rif. 2023-12.

Associazione Microbiologi Clinici Italiani ETS (AMCLI ETS)
Via C. Farini 81 - 20159 Milano - T. 02 66801190 - segreteriaamcli@amcli.it N. 26168 iscrizione RUNTS - sez. "G - altri enti del Terzo Settore" - Iscrizione REA MI - 1969948 C.F. 06653690153 - P.I. 12404560158

REFERENTE

Concetta Castilletti, UO Virologia e Patogeni Emergenti, Dipartimento di Malattie Infettive Tropicali e Microbiologia, IRCCS Sacro Cuore Don Calabria, Negrar di Valpolicella, Verona

ESTENSORI DEL DOCUMENTO:

Luisa Barzon, Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Padova; UOC Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera - Università di Padova

Grazia Cusi, Dipartimento di Biotecnologie Mediche, Università degli studi di Siena; UOC Microbiologia e virologia, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena

Francesca Colavita, Laboratorio di Virologia, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani, IRCCS, Roma

Giada Rossini, Unità di Microbiologia, IRCCS Policlinico di Sant'Orsola, Università degli di Bologna

Francesca Rovida, Dipartimento di Scienze Clinico-Chirurgiche, Diagnostiche e Pediatriche, Università degli Studi di Pavia
UOC Microbiologia e Virologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

REVISORI ESTERNI

Maria Rosaria Capobianchi, Saint Camillus International University of Health Sciences, Roma; Dipartimento di Malattie Infettive Tropicali e Microbiologia, IRCCS Sacro Cuore Don Calabria, Negrar di Valpolicella, Verona

AMCLI Associazione Microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

Sommario

1. RAZIONALE 4
2. MALATTIA NEUROINVASIVA DA WEST NILE VIRUS (WNVND) 5
2.1 AGENTE EZIOLOGICO 5
2.2 EPIDEMIOLOGIA 5
2.3 ASPETTI CLINICI E TERAPEUTICI 6
2.4 PREVENZIONE E SORVEGLIANZA 7
• DEFINIZIONE DI CASO AI FINI DELLA SORVEGLIANZA 7
2.5 DIAGNOSI DI LABORATORIO 7
• FASE PREANALITICA 8
• FASE ANALITICA 8
• REFERTAZIONE ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI 10
3. INFEZIONE DA USUTU VIRUS (USUV) 11
3.1 AGENTE EZIOLOGICO 11
3.2 EPIDEMIOLOGIA 11
3.3 ASPETTI CLINICI E TERAPEUTICI 11
3.4 PREVENZIONE E SORVEGLIANZA 11
• DEFINIZIONE DI CASO AI FINI DELLA SORVEGLIANZA 12
3.5 DIAGNOSI DI LABORATORIO 12
• FASE PREANALITICA 12
• FASE ANALITICA 12
• FASE POST ANALITICA 13
4. ENCEFALITE DA VIRUS TOSCANA (TOSV) 14
4.1 AGENTE EZIOLOGICO 14
4.2 EPIDEMIOLOGIA 14
4.3 ASPETTI CLINICI E TERAPEUTICI 15
4.4 PREVENZIONE E SORVEGLIANZA 15
• DEFINIZIONE DI CASO AI FINI DELLA SORVEGLIANZA 15
4.5 DIAGNOSI DI LABORATORIO 16
• FASE PREANALITICA 16
• FASE ANALITICA 16
• FASE POST ANALITICA 17
5. ENCEFALITE VIRALE DA ZECCA (TBE) 18
5.1 AGENTE EZIOLOGICO 18
5.2 EPIDEMIOLOGIA 18
5.3 ASPETTI CLINICI E TERAPEUTICI 18
5.4 PREVENZIONE E SORVEGLIANZA 19
• DEFINIZIONE DI CASO AI FINI DELLA SORVEGLIANZA 19
5.5 DIAGNOSI DI LABORATORIO 20
• FASE PREANALITICA 20
• FASE ANALITICA 21
• FASE POST ANALITICA 22
6. BIBLIOGRAFIA 23

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

1. RAZIONALE

Tra i virus emergenti, alcuni dei virus trasmessi da artropodi (arbovirus) sono in grado di raggiungere il sistema nervoso centrale e causare sindromi neurologiche severe. Tra questi, i virus West Nile (WNV), Usutu (USUV), Toscana (TOSV) ed il virus dell'encefalite da zecca (TBEV) sono i principali arbovirus zoonotici associati a meningoencefaliti, endemici in Europa e nel bacino del Mediterraneo. Negli ultimi decenni, fattori come il riscaldamento climatico, la globalizzazione dei viaggi e del commercio e le attività dell'uomo sull'ambiente, hanno causato un'espansione geografica della presenza e dell'attività dei vettori artropodi (zanzare, flebotomi, zecche), con un numero crescente di casi e focolai di arbovirosi durante le stagioni di trasmissione nell'uomo e negli animali anche in Italia. E' necessario, pertanto, porre particolare attenzione all'identificazione di tali infezioni, includendole 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. Per gli aspetti generali della diagnosi di infezioni del SNC si fa riferimento al percorso diagnostico "LE INFEZIONI DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE". 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. Al riguardo, per favorire sia la scelta del tipo di test da effettuare, compreso un eventuale pannello per la diagnosi differenziale, sia l'interpretazione dei risultati, è importante che la richiesta di test per la diagnosi di meningoencefaliti causate da virus emergenti sia accompagnata da una **dettagliata informativa** relativa a:

- sintomatologia e data di insorgenza dei sintomi,
- eventuali viaggi,
- circostanze compatibili con l'esposizione ad artropodi vettori,
- dati anamnestici quali pregresse vaccinazioni o infezioni (in particolare per la febbre gialla, il cui agente eziologico presenta importanti crossreattività sierologiche con gli altri flavivirus trasmessi da artropodi)
- altre eventuali informazioni che possono essere concordate di volta in volta fra il laboratorio ed il medico richiedente

Per queste infezioni, ancora più che per tutta la diagnostica microbiologica in generale, è importante quindi che vi sia un canale diretto di comunicazione fra clinica e laboratorio per la condivisione e l'interpretazione finale dei dati di laboratorio sulla base del quadro clinico ed epidemiologico.

Non esistono metodi standardizzati e commerciali per tutti i casi oggetto di questo percorso, pertanto spesso si deve far ricorso a metodi allestiti in house. I laboratori che svolgono questa attività utilizzano metodi validati tramite la partecipazione a reti di collaborazione internazionale, e partecipano regolarmente a verifiche esterne della qualità (VEQ) organizzate dalle stesse reti in modo da garantire la qualità delle attività diagnostiche, come avviene in generale nell'ambito della diagnosi di infezioni da virus emergenti.

Negli ultimi anni, inoltre, si è sempre più affermata l'analisi di campioni clinici mediante sequenziamento di nuova generazione (NGS) con approccio metagenomico con l'obiettivo di rilevare agenti patogeni sconosciuti o inaspettati, senza la necessità di conoscere a priori la sequenza del genoma. D'altra parte l'applicazione di un approccio metagenomico alla diagnosi delle malattie infettive è ancora limitata a casi particolari,

mentre invece il sequenziamento genomico mirato, mediante NGS applicato a prodotti di PCR, o a preparazioni di acidi nucleici arricchite mediante cattura con sonde specifiche, è ampiamente utilizzata per il sequenziamento del genoma completo, soprattutto per WNV.

Le infezioni da virus trasmessi da vettori, tra cui si annoverano tutti i virus considerati in questo percorso diagnostico, sono soggette a notifica, e oggetto di **sorveglianza**, come previsto dal "Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi 2020 – 2025" del Ministero della Salute (Ministero della Salute, 2020). In questo ambito, e ai fini degli adempimenti di notifica, sono state elaborate apposite definizoni di caso, che verranno indicate nei paragrafi successivi, per ogni singolo virus. Inoltre, considerate le peculiarità delle procedure diagnostiche, ai fini della sorveglianza il Ministero della Salute prevede che la diagnosi venga confermata da un laboratorio di riferimento regionale (il cui elenco viene aggiornato periodicamente) o nazionale (quest'ultimo presso l'Istituto Superiore di Sanità).

Il presente percorso diagnostico riporta le caratteristiche virologiche, cliniche, ed epidemiologiche dei principali virus emergenti endemici del bacino Mediterraneo causa di meningoencefaliti nell'uomo, per i quali è attiva una sorveglianza anche sul territorio italiano, ed ha l'obiettivo di fornire indicazioni e procedure sulla relativa diagnosi di laboratorio.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

2. MALATTIA NEUROINVASIVA DA WEST NILE VIRUS (WNVND)

2.1 AGENTE EZIOLOGICO

Il virus del Nilo Occidentale (WNV, West Nile virus) è virus a RNA a singolo filamento provvisto di *envelope*, appartenente al sierocomplesso del virus dell'encefalite giapponese (JEV) all'interno del genere *Flavivirus*, famiglia *Flaviviridae* (Suthar et al. 2013). Dopo l'adesione, il virus entra nelle cellule attraverso l'endocitosi mediata da recettore. Molte molecole sono state implicate come recettori per WNV, tra cui DC-SIGN, il recettore del mannosio, e diversi glicosaminoglicani che interagiscono con la proteina dell'envelope E. Nella cellula il genoma virale è tradotto in una singola poliproteina, la quale è scissa da proteasi virali e dell'ospite in tre proteine strutturali (C, capside; prM, membrana; E, *envelope*) e sette proteine non strutturali (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), coinvolte nella sintesi dell'RNA virale e nell'evasione della risposta immunitaria innata. La neuropatogenesi del WNV dipende dalla capacità del virus di entrare nel sistema nervoso centrale e di propagarsi in modo efficiente all'interno delle cellule bersaglio, compresi i neuroni e le cellule mieloidi.
I meccanismi di invasione del SNC includono: 1) aumento delle permeabilità vascolare nella della barriera emato-encefalica mediata da citochine; 2) passaggio attraverso l'endotelio della barriera emato-encefalica; 3) trasporto attraverso la barriera emato-encefalica veicolato da macrofagi tissutali infetti (cavallo di Troia); 4) trasporto assonale retrogrado del virus al SNC tramite infezione dei neuroni olfattivi o periferici.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Nel ciclo enzootico, WNV è trasmesso tra gli uccelli da diverse specie di zanzare del genere *Culex*. Gli uccelli selvatici sono considerati i principali ospiti vertebrati serbatoio e amplificatori di WNV in natura. Infatti, gli uccelli (*Strigiformes, Accipitriformes,* e

Passeriformes) sono in grado di sviluppare una carica virale nel sangue elevata e prolungata nel tempo e sono in grado di infettare le zanzare che li pungono (Trogu et al. 2021). Gli esseri umani, gli equidi e altri mammiferi, invece, possono essere accidentalmente infettati dalla puntura delle zanzare, ma sono considerati ospiti a vicolo cieco perché la bassa carica virale nel sangue non è sufficiente per infettare le zanzare (Martina et al. 2017).
In Europa, *Culex pipiens* (Cx. *P. pipiens* e *Cx. P. molestus*) è il principale vettore di WNV.
Scoperto per la prima volta in Uganda nel 1937 (Smithburn et al. 1940), almeno dalla fine degli anni '50 WNV circola in Europa e nel bacino del Mediterraneo, dove ha causato sporadiche infezioni ed epidemie nell'uomo e negli animali (Zeller et al. 2004). Negli ultimi 30 anni, WNV si è diffuso a livello globale, diventando endemico in diversi Paesi europei. L'analisi filogenetica delle sequenze del genoma di WNV hanno identificato nove diversi lignaggi evolutivi (*lineage*), di cui solo i *lineage* 1 e 2 sono stati associati alla malattia nell'uomo (Rizzoli et al. 2015).
Nelle Americhe (Ronca et al. 2021), dal Canada all'Argentina, tutte le epidemie umane e animali sono causate da un ceppo di WNV *lineage* 1 che è stato rilevato per la prima volta a New York nel 1999 e si è rivelato quasi identico a un ceppo neurovirulento di WNV circolante in Israele nel 1998 (Lanciotti et al. 1999). Diversi ceppi di WNV *lineage* 1 hanno causato epidemie nell'Europa meridionale e nel bacino del Mediterraneo fino alla comparsa di WNV *lineage* 2. Originariamente isolato nell'Africa sub-sahariana e per lo più associato a un ciclo endemico e a una lieve malattia febbrile (Hernández-Triana et al. 2014), WNV *lineage* 2 è stato trovato in un astore in Ungheria nel 2004 (Bakonyi et al. 2006), rappresentando il primo rilevamento di questo ceppo in Europa. Attualmente, due diversi ceppi di WNV *lineage* 2 circolano in Europa, dove sono stati associati a focolai umani di malattia neuroinvasiva rispettivamente nei paesi dell'Europa centrale e meridionale (dal 2004) e nella Russia meridionale (dal 2007) (Rizzoli et al. 2015; Hernández-Triana et al. 2014). I ceppi di WNV *lineage* 1b (virus Kunjin) e 1c sono stati finora trovati solo in Australia e in India, rispettivamente (Coia et al. 1988; Bondre et al. 2007).
Nel 2021, in Veneto, è stato identificato un nuovo ceppo di WNV *lineage* 1 (Barzon et al. 2022a), il quale si è espanso nel 2022 causando molti casi di malattia neuroinvasiva (Barzon L, 2022b)

2.3 ASPETTI CLINICI E TERAPEUTICI

L'infezione da WNV nell'uomo avviene attraverso la puntura di una zanzara infetta. Tuttavia, la trasmissione può avvenire anche attraverso donazioni di sangue e componenti del sangue o trapianto di cellule, tessuti e organi (Nanni Costa et al. 2011).

La trasmissione transplacentare verticale da madre a figlio e la trasmissione attraverso l'allattamento al seno sono estremamente rare (Barzon et al. 2015).

L'infezione da WNV nell'uomo è generalmente asintomatica; Il 20-30% dei casi sviluppa una malattia simil-influenzale, definita febbre del Nilo occidentale (WNF, *West Nile fever*), mentre meno dell'1% degli individui infetti, principalmente gli anziani, gli immunocompromessi e quelli con condizioni mediche preesistenti, sviluppa una malattia neuroinvasiva, caratterizzata da encefalite, meningite, paralisi flaccida acuta o poliradicoloneurite. Un rash, tipicamente maculopapulare, può essere presente nel 25-50% dei casi ed è meno frequente nei pazienti con malattia neuroinvasiva. Nei pazienti con malattia neuroinvasiva, la mortalità varia dal 10% al 20% (Pacenti et al. 2020; Vahey

et al. 2019) e gravi sequele persistono nel 20-40% dei sopravvissuti (Sejvar et al. 2007). La malattia da WNV è più frequente nei maschi rispetto alle femmine e il sesso maschile è considerato un fattore di rischio per lo sviluppo della malattia neuroinvasiva (Pacenti et al. 2020; Jean et al. 2007). L'infezione da WNV nei bambini è meno grave che negli adulti ed è raramente associata a sintomi neurologici (Barzon et al. 2015). Non sono disponibili vaccini per WNV né farmaci antivirali specifici per l'uomo (Boldescu et al. 2017; Sinigaglia et al. 2020).

2.4 PREVENZIONE E SORVEGLIANZA

La malattia neuroinvasiva da WNV è soggetta ad obbligo di notifica ed è oggetto di sorveglianza come previsto dal "Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi 2020 – 2025" del Ministero della Salute (Ministero della Salute, 2020). La sorveglianza dei casi umani importati e autoctoni si attua per tutto l'anno su tutto il territorio nazionale, con particolare attenzione nel periodo di maggiore attività del vettore.

- DEFINIZIONE DI CASO AI FINI DELLA SORVEGLIANZA

Caso probabile: Il caso è classificato come probabile se sono rilevati anticorpi IgM anti-WNV nel siero, in presenza di sintomi clinici o un nesso epidemiologico.

Caso confermato: La definizione di caso confermato di infezione da WNV richiede almeno uno dei seguenti criteri di laboratorio:

- isolamento di WNV da sangue, liquido cerebrospinale, urina o altro campione biologico; rilevamento di WNV RNA nel sangue, liquor, urina o altro campione biologico;
- risposta anticorpale specifica per WNV (IgM) nel liquido cerebrospinale;
- titolo elevato di IgM WNV e rilevazione di IgG WNV e conferma mediante test di neutralizzazione.

Un caso confermato di infezione da WNV deve essere immediatamente segnalato dal laboratorio al Servizio Igiene e Sanità Pubblica competente, secondo le modalità previste dal Piano Nazionale di Sorveglianza delle Arbovirosi.

2.5 DIAGNOSI DI LABORATORIO

La diagnosi di laboratorio dell'infezione da WNV si basa sulla rilevazione dell'RNA virale nei fluidi corporei e sulla dimostrazione di una specifica risposta anticorpale contro il virus nel siero o nel liquor. L'RNA del WNV può essere rilevato nel sangue pochi giorni dopo l'esposizione e per circa 8-10 giorni (Busch et al. 2008). Uno studio su donatori di sangue WNV-positivi ha dimostrato che il carico di WNV RNA era maggiore nel plasma rispetto al sangue intero prima della sieroconversione, ma inferiore rispetto al sangue intero dopo la comparsa di anticorpi specifici (Lai et al. 2012). Questa compartimentazione è riconducibile all'associazione di WNV con i globuli rossi (Rios et al. 2007) e ha implicazioni per la diagnosi di laboratorio (Lustig et al. 2016). Nei pazienti con infezione da WNV, il virus viene escreto nelle urine, dove è rilevabile a concentrazione maggiore e per un periodo più lungo (fino a un mese dopo l'insorgenza dei sintomi) rispetto al plasma (Barzon et al. 2013). In circa il 40% dei pazienti con malattia neuroinvasiva, l'RNA di WNV può essere rilevato nel liquor ma la carica è in genere molto bassa (Pacenti et al. 2020). L'isolamento del virus in coltura rappresenta una pratica diagnostica non routinaria, utile per la caratterizzazione biologica del virus.

Il virus può essere isolato da campioni di siero e di urina entro i primi 3-5 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi (Barzon et al 2014).

Gli anticorpi IgM anti-WNV diventano rilevabili nel siero a partire da 3-9 giorni dopo l'infezione, mentre gli anticorpi IgG anti-WNV vengono identificati a partire da 4-16 giorni (Prince et al. 2005). Le IgM anti-WNV generalmente persistono per oltre 6 mesi e possono essere ancora rilevabili dopo 1 anno in circa nel 20% dei donatori di sangue asintomatici (Prince et al. 2007) e in circa il 50% dei pazienti con malattia neuroinvasiva (Roehrig et al. 2003). In circa il 60-70% dei pazienti con malattia neuroinvasiva, gli anticorpi IgM specifici sono rilevabili nel liquor all'insorgenza dei sintomi neurologici; inoltre bisogna tenere in considerazione che i pazienti immunocompromessi potrebbero non sviluppare anticorpi specifici anti-WNV (Pacenti et al. 2020).

- FASE PREANALITICA

Raccolta e trasporto (preferibilmente a 4°C) di liquido cefalorachidiano (LCR), sangue, siero e urine.

LCR: prelevare tramite per puntura lombare o rachicentesi e raccogliere in provette sterili. E' preferibile dividere il campione in almeno 2 aliquote (volume complessivo 3/5 mL), una per l'esame chimico fisico e l'altra per le indagini microbiologiche. Il campione deve essere inviato al laboratorio nel più breve tempo possibile e comunque non oltre le due ore; in alternativa per le indagini virologiche può essere refrigerato. Può essere utile concordare modalità di prelievo ed invio con il laboratorio.

Sangue: prelevare in provette con anticoagulante, preferibilmente EDTA o sodio citrato, non utilizzare provette contenenti eparina.

Siero: raccogliere il sangue in provette per sierologia preferibilmente contenenti gel separatore.

Urine: raccogliere le urine in contenitori sterili.

- FASE ANALITICA

RICERCA DIRETTA

Ricerca del genoma virale

Real-time RT-PCR e PCR pan-flavivirus: La diagnosi diretta di infezione da WNV è basata sulla ricerca di WNV RNA in campioni di plasma, sangue intero, liquor, urine e altri campioni biologici mediante test di real-time RT-PCR specifica per WNV. E' possibile inoltre usare test RT-PCR pan-Flavivirus, che amplificano sequenze genomiche altamente conservate nel genere *Flavivirus*, seguiti dall'identificazione del virus mediante sequenziamento dell'amplicon.

Test WNV NAT per lo screening dei donatori di sangue, organi, cellule staminali e tessuti: A causa del basso titolo di WNV RNA nel sangue, i donatori sono sottoposti a screening utilizzando WNV NAT altamente sensibili, completamente automatizzati e specificatamente autorizzati per lo screening dei donatori. I test WNV NAT approvati per lo screening dei donatori nell'UE. Attualmente disponibili due tst approvati, ovvero il test "Cobas WNV" usato sul sistema cobas 6800/8800 di Roche e il test Procleix WNV usato nel sistema Procleix Panther di Grifols), entrambi dotati di elevata sensibilità analitica per entrambi i *lineage* di WNV (WNV-1 e WNV-2). Questi test possono fornire risultati falsi positivi a causa dell'amplificazione non specifica di altri flavivirus, come USUV, JEV, DENV, YFV.

Test antigenici

Non sono disponibili test commerciali per la ricerca nel sangue dell'antigene NS1 di WNV. I livelli ematici di WNV NS1 Ag sono molto più bassi rispetto a quelli di DENV NS1 Ag.

Isolamento virale

Il WNV può essere isolato in coltura cellulare da siero, LCR, urina e tessuti. WNV è un agente patogeno del gruppo di rischio 3 e deve essere maneggiato in una cappa a flusso laminare di sicurezza biologica di classe II all'interno di un laboratorio di livello di biosicurezza 3 (BSL3). Per isolare e propagare il virus si usano sia cellule di mammifero (Vero E6, BHK-21) che le cellule di zanzara (C6/36).

RICERCA INDIRETTA

Test sierologici

Il rilevamento di anticorpi IgM e IgG anti-WNV nel siero può essere effettuato con test immunoenzimatici, in chemiluminescenza o immunofluorescenza, che utilizzano proteine virali ricombinanti, particelle simili-virali o cellule infette come antigeni. A causa della somiglianza antigenica delle proteine strutturali dei flavivirus, gli anticorpi contro un flavivirus sono ampiamente cross-reattivi con altri flavivirus, complicando così la diagnosi sierologica. Ciò è importante nei pazienti che risiedono in aree in cui diversi flavivirus, come WNV, USUV e TBEV, circolano contemporaneamente e nei pazienti con precedente infezione o vaccinazione contro flavivirus eterologhi. Pertanto, per confermare i risultati sierologici positivi è necessario eseguire un test di neutralizzazione che prenda in esame WNV e USUV ed eventuali altri flavivirus implicati nella diagnosi differenziale. Nei pazienti con precedente immunità da flavivirus (ad es. precedente infezione da USUV), i test di neutralizzazione possono essere non conclusivi a causa della reattività crociata degli anticorpi neutralizzanti (Pacenti et al. 2020; Sinigaglia et al. 2019). Inoltre, questi pazienti possono avere una risposta IgM attenuata o assente a causa del fenomeno cosiddetto del "peccato antigenico originale". In questi casi, può essere utile testare sieri acuti e convalescenti con saggi di neutralizzazione per distinguere tra infezioni in atto e pregresse (Pacenti et al. 2020; Sinigaglia et al 2019).

A causa della persistenza degli anticorpi IgM WNV, l'analisi dell'avidità degli anticorpi IgG anti-WNV può consentire di distinguere una infezione recente da una infezione non recente.

Il rilevamento di IgM anti-WNV nel liquor è considerato un criterio diagnostico per l'infezione del sistema nervoso centrale. Gli anticorpi IgM non attraversano la barriera emato-encefalica e la loro presenza nel liquido cerebrospinale indica una produzione locale da parte dei linfociti infiltranti. Il rilevamento degli anticorpi IgM WNV nel liquor è un test molto sensibile ma, come le IgM sieriche, anche gli anticorpi IgM anti-WNV rilevati nel liquor possono reagire in modo crociato con altri flavivirus.

I test di neutralizzazione di WNV sono test biologici, da eseguire in BSL3, che valutano la capacità degli anticorpi presenti nel siero di un paziente con infezione da WNV di legarsi a un ceppo di WNV di laboratorio e inibire l'infezione cellulare in vitro. Il test di neutralizzazione basato sulla riduzione delle placche (PRNT, *plaque reduction neutralization test*) che utilizza particelle virali vive è il "gold standard". Sono inoltre stati sviluppati e ottimizzati test di neutralizzazione del virus (VNT, *virus neutralization test*) eseguiti in piastre di microtitolazione con rilevamento microscopico o colorimetrico dell'effetto citopatico causato dal virus. I test di neutralizzazione devono essere eseguiti in parallelo con ceppi rappresentativi dei flavivirus coinvolti nella

diagnosi differenziale (ovvero flavivirus co-circolanti nella stessa area di potenziale esposizione o ceppi vaccinali per un paziente vaccinato). L'utilizzo di una riduzione delle placche del 90% come endpoint per un risultato positivo garantisce risultati altamente specifici. Poiché i test di neutralizzazione possono avere una bassa sensibilità nelle prime fasi dell'infezione, il test deve essere eseguito su un campione di siero raccolto durante la fase tardiva dell'infezione o ripetuto in un campione di siero convalescente.

- REFERTAZIONE ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Ricerca di anticorpi

Nel referto devono essere presenti le seguenti informazioni:

- dati anagrafici del paziente e ID;
- data di accettazione del campione;
- matrice biologica (siero, LCR o altro);
- tipologia di esame;
- metodo (ELISA, EIA, CLIA, IFA, test di neutralizzazione mediante riduzione delle placche, PRNT, test di microneutralizzazione. MNT, ecc);
- risultato espresso nelle unità previste dal metodo, e relativo cut off;
- nel caso di test di immunofluorescenza specificare la diluizione limite alla quale si osserva la fluorescenza e specificare a partire da quale diluizione l'esito del test si considera positivo;
- per il test di neutralizzazione specificare la diluizione alla quale si osserva la riduzione del 50% (ID_{50}) o del 90% (ID_{90}) dell'effetto citopatico, e specificare a partire da quale diluizione l'esito del test si considera positivo;

Note: indicare ambiguità di interpretazione, eventuale necessità di approfondimenti, ecc.

associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

Test molecolare

Nel referto devono inserite le seguenti informazioni:

- dati anagrafici del paziente e ID;
- data di accettazione del campione;
- matrice biologica (siero, sangue intero, urine, LCR o altro);
- tipologia di esame (PCR in real time o altro test) e, se disponibile, la regione *target* rilevata dal test;
- risultato qualitativo (positivo o negativo) se il test non permette deduzioni quantitative (es. PCR end-point); se il test è quantitativo o semiquantitativo, le unità previste dal test usato, e relativo cut off;
- nel caso di test "pan-Flavirus", aggiungere, se disponibile, il risultato della caratterizzazione molecolare (sequenziamento o altro), indicando la regione genomica sottoposta a caratterizzazione.

Note: indicare ambiguità di interpretazione, eventuale necessità di approfondimenti, ecc.

3. INFEZIONE DA USUTU VIRUS (USUV)

3.1 AGENTE EZIOLOGICO

Come WNV, il virus Usutu (USUV) è un virus a ssRNA con *envelope*, appartenente al JEV serocomplex, genere *Flavivirus*, famiglia *Flaviviridae* (Clé, 2018). È trasmesso tra gli uccelli (ospiti amplificatori) da zanzare *Culex*, mentre gli esseri umani, gli equidi e altri mammiferi rappresentano ospiti accidentali a fondo cieco. La co-circolazione di WNV e USUV virus è stata segnalata in molti paesi europei (Wang et al. 2020). Le analisi filogenetiche hanno raggruppato i ceppi di USUV in otto *lineage* distinti: Africa 1, 2 e 3 ed Europa 1, 2, 3, 4 e 5 (Vilibic-Cavlek et al. 2020). Il *lineage* Europa 2 è il più comunemente rilevato nei paesi europei, compresa l'Italia.
La maggior parte delle infezioni da USUV nell'uomo è stata identificata in donatori di sangue asintomatici sottoposti a screening per WNV mediante test molecolari che cross-reagiscono con USUV. Casi sporadici di malattia neuroinvasiva correlata a USUV sono stati segnalati in diversi Paesi Europei (Pecorari et al. 2009; Cavrini et al. 2009).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

USUV è stato isolato per la prima volta da zanzare *Culex neavei* catturate vicino al fiume Usutu in Sud Africa nel 1959 (Woodall, 1964). Il virus è stato successivamente rilevato in molti paesi africani ma raramente associato a malattie nell'uomo (Nikolay et al. 201). In Europa, USUV è stato isolato per la prima volta nel 2001 da merli morti (*Turdus merula*) durante un'epizoozia in Austria. Un'analisi retrospettiva ha attribuito l'elevata mortalità dei merli in Toscana nel 1996 a USUV (Weissenböck et al 2013). Da allora il virus è stato rilevato negli uccelli, nell'uomo, nei cavalli, nelle zanzare e nei pipistrelli, indicando la sua endemizzazione in molti paesi dell'Europa occidentale, meridionale e centrale (Clé et al. 2019; Vilibic-Cavlek et al. 2020). Le zanzare *Culex* sono anche i principali vettori di USUV, sebbene il virus sia stato rilevato in zanzare di altri generi all'interno della famiglia *Culicidae* (Vogels et al. 2017).

3.3 ASPETTI CLINICI E TERAPEUTICI

La maggior parte delle infezioni da USUV nell'uomo è asintomatica, come indicato dagli studi di sieroprevalenza e dallo screening dei donatori di sangue con test di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) di WNV che cross-reagiscono con USUV (Pierro et al. 2013; Bakonyi et al. 2017; Cadar et al. 2017; Percivalle et al. 2017; Aberle et al. 2018; Faggioni et al. 2018; Carletti et al. 2019).
Le infezioni sintomatiche da USUV nell'uomo sono rare e finora in letteratura sono stati descritti solo pochi casi. Questi includono pazienti con meningoencefalite, encefalite, polineurite o paralisi facciale (Pecorari et al. 2009; Cavrini et al. 2009; Santini et al. 2015; Grottola et al. 2017; Simonin et al. 2018; Pacenti et al. 2019) e, meno frequentemente, con malattia febbrile (Nikolay et al. 2011; Pacenti et al. 2019). I soggetti immunocompromessi e gli anziani hanno un rischio più elevato di sviluppare malattia sintomatica da USUV (Pecorari et al. 2009; Cavrini et al. 2009; Pacenti et al. 2019).

3.4 PREVENZIONE E SORVEGLIANZA

In Italia, dal 2017, l'infezione da USUV è oggetto di sorveglianza, come previsto dal "Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi 2020 – 2025" del

Ministero della Salute. Nel Piano Nazione, la sorveglianza dei casi umani è integrata con la sorveglianza della circolazione virale nei vettori, negli uccelli e negli equidi (Ministero della Salute, 2020).

- DEFINIZIONE DI CASO AI FINI DELLA SORVEGLIANZA

Caso probabile: Il caso è classificato come probabile se sono rilevati anticorpi IgM anti-USUV nel siero, in presenza di sintomi clinici o un nesso epidemiologico.

Caso confermato: La definizione di caso confermato di infezione da USUV richiede almeno uno dei seguenti criteri di laboratorio:

- isolamento di USUV da sangue, liquido cerebrospinale, urina o altro campione biologico; rilevamento di USUV RNA nel sangue, liquor, urina o altro campione biologico;
- risposta anticorpale specifica per USUV (IgM) nel liquido cerebrospinale;
- titolo elevato di IgM USUV e rilevazione di IgG anti-USUV e conferma mediante test di neutralizzazione.

Un caso confermato di infezione da USUV deve essere immediatamente segnalato dal laboratorio al Servizio Igiene e Sanità Pubblica competente, secondo le modalità previste dal Piano Nazionale di Sorveglianza delle Arbovirosi.

3.5 DIAGNOSI DI LABORATORIO

La diagnosi di laboratorio dell'infezione da USUV nell'uomo si basa sul rilevamento degli acidi nucleici di USUV in campioni biologici, sull'isolamento del virus in coltura cellulare, o sulla dimostrazione di una specifica risposta anticorpale contro il virus. L'isolamento del virus in coltura rappresenta una pratica diagnostica non routinaria, utile per la caratterizzazione biologica del virus.

- FASE PREANALITICA

Raccolta e trasporto (preferibilmente a 4°C) di liquido cefalorachidiano (LCR), sangue, siero e urine.

LCR: prelevare tramite per puntura lombare o rachicentesi e raccogliere in provette sterili. E' preferibile dividere il campione in almeno 2 aliquote (volume complessivo 3/5 mL), una per l'esame chimico fisico e l'altra per le indagini microbiologiche. Il campione deve essere inviato al laboratorio nel più breve tempo possibile e comunque non oltre le due ore; in alternativa per le indagini virologiche può essere refrigerato. Può essere utile concordare modalità di prelievo ed invio con il laboratorio.

Sangue: prelevare in provette con anticoagulante, preferibilmente EDTA o sodio citrato, non utilizzare provette contenenti eparina.

Siero: raccogliere il sangue in provette per sierologia preferibilmente contenenti gel separatore.

Urine: raccogliere le urine in contenitori sterili.

- FASE ANALITICA

RICERCA DIRETTA

Ricerca del genoma virale

La presenza di USUV RNA è stata dimostrata nel sangue, nelle urine e nel liquido cefalorachidiano di pazienti con infezione acuta (Pecorari et al. 2009; Cavrini et al. 2009;

Santini et al. 2015; Grottola et al. 2017; Simonin et al. 2018; Pacenti et al. 2019). L'indagine di follow-up in tre pazienti con malattia neuroinvasiva o febbre ha dimostrato la persistenza dell'RNA di USUV nel sangue intero e nelle urine per circa un mese (Pacenti et al. 2019). Come per la diagnosi di infezione da WNV, i metodi molecolari includono saggi di real-time RT-PCR specifici per USUV, sia come test *singleplex* sia come test multiplex comprendenti altri flavivirus (per esempio USUV), e test di RT-PCR pan-flavivirus, seguiti da sequenziamento dell'amplicon per l'identificazione dei virus. Come detto sopra, i test WNV NAT convalidati per lo screening dei donatori possono anche rilevare USUV con alta sensibilità.

Isolamento virale

USUV può essere isolato e propagato *in vitro* in colture di cellule Vero, BHK-21 e C6/36.

RICERCA INDIRETTA

Test sierologici

La rilevazione di anticorpi contro USUV mediante test immunoenzimatici e di immunofluorescenza mostra reattività crociata con flavivirus eterologhi, incluso WNV (Percivalle et al. 2020; Berneck et al. 2021). Il test di microneutralizzazione virale (VNT) viene utilizzato per confermare i risultati sierologici positivi, ma, come riportato per la diagnosi di WNV, gli anticorpi neutralizzanti USUV possono reagire in modo crociato contro WNV.

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

- FASE POST ANALITICA

REFERTAZIONE ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Ricerca di anticorpi

Nel referto devono essere presenti le seguenti informazioni:

- dati anagrafici del paziente e ID;
- data di accettazione del campione;
- matrice biologica (siero, LCR o altro);
- tipologia di esame;
- metodo (ELISA, EIA, CLIA, IFA, test di neutralizzazione mediante riduzione delle placche, PRNT, test di microneutralizzazione. MNT, ecc);
- risultato espresso nelle unità previste dal metodo, e relativo cut off;
- nel caso di test di immunofluorescenza specificare la diluizione limite alla quale si osserva la fluorescenza e specificare a partire da quale diluizione l'esito del test si considera positivo;
- per il test di neutralizzazione specificare la diluizione alla quale si osserva la riduzione del 50% (ID_{50}) o del 90% (ID_{90}) dell'effetto citopatico e specificare a partire da quale diluizione l'esito del test si considera positivo.

Note: indicare ambiito di interpretazione, eventuale necessità di approfondimenti, ecc.

Test molecolare

Nel referto devono inserite le seguenti informazioni:

- dati anagrafici del paziente e ID;
- data di accettazione del campione;
- matrice biologica (siero, sangue intero, urine, LCR o altro);
- procedura d'esame (PCR in real time o altro test ;e, se disponibile, la regione *target* rilevata dal test;

- risultato qualitativo (positivo o negativo) se il test non permette deduzioni quantitative (es. PCR end-point); se il test è quantitativo o semiquantitativo, le unità previste dal test usato, e relativo cut off;
- nel caso di test "pan-Flavirus", aggiungere, se disponibile, il risultato della caratterizzazione molecolare (sequenziamento o altro), indicando la regione genomica sottoposta a caratterizzazione.

Note: indicare ambiguità di interpretazione, eventuale necessità di approfondimenti, ecc.

4. ENCEFALITE DA VIRUS TOSCANA (TOSV)

4.1 AGENTE EZIOLOGICO

Il virus Toscana (TOSV), appartenente al genere *Phlebovirus* della famiglia *Phenuiviridae*, Ordine *Bunyavirales*, è stato isolato per la prima volta da *Phlebotomus perniciosus* in Italia centrale nel 1971 (Verani et al. 1982). Il virus è stato anche isolato da *Phlebotomus perfiliewi*, sottolineando il ruolo che questi artropodi vettori del genere *Phlebotomus* hanno nella trasmissione del virus agli esseri umani. Anche il genere *Sergentomyia* include alcuni vettori per il TOSV (Charrel et al. 2005; Charrel et al. 2012; Cusi et al. 20109. TOSV è un virus provvisto di pericapside, con genoma a RNA a singolo filamento, con polarità negativa, suddiviso in tre distinti segmenti: L, che codifica per la polimerasi virale; M, che codifica per le glicoproteine strutturali Gn e Gc ed una proteina non strutturale (NSm); S, che codifica per la Nucleoproteina (N) ed una proteina non strutturale (NSs). Al genere *Phlebovirus* appartengono attualmente circa 60 virus (Abudurexiti et al. 2019), dei quali il TOSV ha la maggiore importanza dal punto di vista medico. L'infezione può causare malattie neuro-invasive, come la meningite asettica, la meningoencefalite e neuropatie periferiche, quali la sindrome di Guillan Barrè e poliradiculopatie (Rota et al 2017); più recentemente sono state riportate alcune manifestazioni cliniche insolite dovute a TOSV con gravi sequele, come complicazioni ischemiche e idrocefalo (Baldelli F, et al. 2004; Sanbonmatsu-Gamez et al. 2009). Sebbene la malattia possa essere grave, il riscontro di sequele a lungo termine o di decessi è molto raro (Ayhan et al. 2020a). Studi genetici hanno rilevato l'esistenza di tre lignaggi di TOSV (A, B e C). Ad oggi, non è nota alcuna correlazione tra virulenza o manifestazioni cliniche nell'uomo e lignaggio genetico (Ayhan et al. 2020b).

4.2 EPIDEMIOLOGIA

Il TOSV rappresenta un importante agente patogeno emergente, strettamente correlato al ciclo vitale degli insetti vettori e della loro distribuzione geografica; la sua presenza è prevalente durante l'estate e i mesi con clima temperato, nei paesi dell'area Mediterranea (Gori Savellini et al. 2020; Ayhan et al. 2020b).

In Italia, *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomous perfiliewi* rappresentano la specie di vettore predominante, particolarmente presenti nelle aree rurali e in quelle periurbane delle regioni tirreniche e meridionali che si trovano ad alta e bassa quota (1.070-17 m). L'andamento stagionale dei casi di TOSV risente di diversi fattori che vanno dai processi di urbanizzazione a quelli metereologici. I cambiamenti climatici influiscono sulla distribuzione geografica di molte specie di flebotomi che si sono diffuse nell'ultimo decennio anche nel Nord Europa (Ayhan et al. 2020a). La distribuzione del TOSV comprende Paesi dell'Europa meridionale, Italia, Spagna, Francia, Portogallo, del Mediterraneo Orientale, Turchia, Cipro, della penisola Balcanica, Grecia, Croazia, Bosnia

ed Erzegovina, Kosovo, Bulgaria e del Nord Africa, Tunisia, Marocco, Algeria (Sghaier et al. 2012; Punda-Polić et al. 2012; Ergunay et al. 2012; Anagnostou et al. 2013; Masse et al. 2019).

La diffusione del TOSV dipende dalla presenza e dall'abbondanza dei suoi vettori. La trasmissione all'uomo o ad altri animali avviene durante il pasto di sangue di flebotomi femmine, tipicamente tra maggio e ottobre. Anticorpi anti-TOSV sono stati trovati, oltre che nell'uomo, in cavalli, gatti, cani, pecore, maiali, bovini e pipistrelli (Ayhan et al. 2021). Non vi sono evidenze solide circa la presenza di reservoir dell'infezione e l'uomo è considerato un ospite terminale. Casi di infezione TOSV sono stati segnalati nei pazienti che ritornano da viaggi in paesi endemici, come l'Italia, quindi questo virus rappresenta una minaccia per la salute pubblica per molti paesi (Depaquit et al. 2010; Charrel et al. 2005).

4.3 ASPETTI CLINICI E TERAPEUTICI

L'infezione da TOSV nell'uomo è spesso asintomatica o provoca una forma febbrile e lieve autolimitante. Il tempo di incubazione varia da 10 a 7 giorni. Alcuni soggetti possono presentare sintomi qual mal di testa, febbre, nausea, vomito e dolori muscolari. Talvolta è presente anche eritema maculo-papulare. Nelle forme più gravi, quali meningite e meningo-encefalite, il soggetto presenta rigidità nucale, alterazione del sensorio, tremori, paresi e nistagmo (ECDC, *Infectious disease topics*). La sintomatologia dura in media 7-12 giorni. Il decorso è generalmente favorevole e meno frequenti i casi con manifestazioni neurologiche gravi (Laroche et al. 2021).

Il virus può essere isolato da liquor e sangue entro i primi 3-5 giorni dall'insorgenza dei sintomi. Il virus nel sangue o nel siero viene riscontrato in una bassa percentuale dei soggetti, a causa della breve viremia. In alcuni casi la presenza del virus nelle urine può essere rilevata dopo 3-8 giorni dall'inizio della manifestazione clinica. Le IgM sono presenti all'inizio della sintomatologia e permangono per circa un mese. In alcuni casi con gravi forme neurologiche, le IgM possono persistere per circa 6 mesi. Le IgG compaiono parallelamente alle IgM o dopo 2-3 giorni, con un picco al giorno 7-15 e permangono a lungo, oltre i 2 anni (Ayhan et al. 2020a; Pierro et al. 2017)

Non esiste una terapia specifica; il trattamento è sintomatologico con riposo, reintegro idro-salino, antipiretici e antinfiammatori. Nei casi più gravi sono richieste ospedalizzazione e cure specifiche.

4.4 PREVENZIONE E SORVEGLIANZA

Non esiste un vaccino per il Toscana virus, tuttavia, la prevenzione viene effettuata individualmente con misure comportamentali, in quanto intervenire sui focolai larvali di pappataci è molto difficile, a differenza di quanto avviene con le zanzare.

L'infezione da TOSV è inclusa nel Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi 2020-2025 realizzato dal Ministero della Salute con il supporto dell'ISS e di esperti delle Regioni che ha incluso anche il Toscana Virus (Ministero della Salute, 2020).

- DEFINIZIONE DI CASO AI FINI DELLA SORVEGLIANZA

Caso probabile: Persona che soddisfa il criterio clinico; il criterio di laboratorio documenta presenza di IgM specifiche nel siero.

Caso confermato: Persona che soddisfa il criterio clinico e almeno uno dei criteri di laboratorio per caso confermato:

- isolamento di TOSV nel liquor, nel sangue e/o nelle urine;
- identificazione dell'acido nucleico di TOSV nel liquor, nel sangue e/o nelle urine;
- risposta anticorpale specifica (IgM) per TOSV nel liquor;
- sieroconversione o incremento di 4 volte del titolo anticorpale per anticorpi specifici anti-TOSV in campioni consecutivi.

Un caso confermato di infezione da TOSV deve essere immediatamente segnalato dal laboratorio al Servizio Igiene e Sanità Pubblica competente, secondo le modalità previste dal Piano Nazionale di Sorveglianza delle Arbovirosi.

4.5 DIAGNOSI DI LABORATORIO

La diagnosi di laboratorio dell'infezione da TOSV si basa sul rilevamento dell'acido nucleico del virus in campioni biologici, sull'isolamento del virus in colture cellulari, o sulla dimostrazione di una specifica risposta anticorpale contro il virus. L'isolamento del virus in coltura rappresenta una pratica diagnostica non routinaria, utile per la caratterizzazione biologica del virus.

- FASE PREANALITICA

Raccolta e trasporto (preferibilmente a 4°C) di liquido cefalorachidiano (LCR), urine, sangue e siero

LCR: viene prelevato per puntura lombare (PL) o rachicentesi nello spazio tra la 4^ e la 5^ vertebra lombare, raccolto in provette sterili con tappo a vite e fondo conico. Il campione deve essere inviato al laboratorio nel più breve tempo possibile e comunque non oltre un tempo massimo di due ore. Il volume complessivo di liquor dovrebbe essere distribuito in due provette; 1 viene utilizzata per indagini chimiche, l'altra per la valutazione macroscopica, che valuta aspetto e colore (limpido, torbido, presenza di sangue, ecc.) e per indagine molecolare e isolamento su colture cellulari.

Sangue: deve essere prelevato in provetta con anticoagulante, preferibilmente sodio citrato da 4 ml

Siero: raccogliere il sangue in provette per sierologia con gel separatore, da 7-10 mL.

Urine: raccogliere le urine in contenitori sterili.

- FASE ANALITICA

Il LCR presenta conta cellulare compresa tra 30-900 cell/mm^3 con prevalenza di linfomonociti. All'inizio dell'infezione la linfocitosi può essere assente. Le proteine e i livelli di glucosio sono generalmente normali.

RICERCA DIRETTA

Isolamento virale

TOSV può essere isolato e propagato *in vitro* in colture di cellule Vero E6 da liquor e/o altri campioni biologici (sangue, urine).

Ricerca del genoma virale

Identificazione dell'acido nucleico del TOSV nel liquor e/o altri campioni biologici (sangue, urine) tramite real-time PCR (Pérez-Ruiz et al. 2007; Thirion et.al. 2021; Cusi et al. 2011). I test molecolari specifici generalmente utilizzano il gene N come target. Recentemente è stato messo a punto un test (Trio TOSV RT-qPCR) che utilizza la combinazione di tre primers e probe sullo stesso target, nella stessa reazione PCR,

prevenendo risultati falsamente negativi e con una sensibilità (Thirion et al. 2021). E' disponibile un test commerciale per la rilevazione rapida di TOSV in un pannello sindromico per virus neurotropi (Pérez-Ruiz et al. 2018).

RICERCA INDIRETTA

Test sierologici

La rilevazione di anticorpi specifici per TOSV può essere effettuata sia nel siero (Soldateschi et al. 1999; Ergünay et al. 2011) che nel liquor tramite test in immunofluorescenza o immunoenzimatico. La conferma di positività può essere effettuata mediante test di sieroneutralizzazione eseguito in parallelo con *Phlebovirus* co-circolanti nella stessa area di potenziale esposizione per confermare la specificità della risposta anticorpale. Poiché i test di neutralizzazione possono avere una bassa sensibilità nelle prime fasi dell'infezione, il test deve essere eseguito su un campione di siero raccolto durante la fase tardiva dell'infezione o ripetuto in un campione di siero convalescente.

- FASE POST ANALITICA

REFERTAZIONE ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Ricerca di anticorpi, indicare:

- dati anagrafici del paziente e ID;
- data di prelievo del campione;
- tipologia del campione (siero, LCR);
- tipo di test eseguito (ELISA, IFA, microneutralizzazione);
- risultato nelle unità di misura previste dal test utilizzato, e relativo cut off (fare riferimento ai parametri indicati nelle istruzioni del test utilizzato);
- il risultato in immunofluorescenza è qualitativo; il siero viene diluito come indicato nelle istruzioni del kit, e tale diluizione va indicata nel referto
- per il test di neutralizzazione specificare la diluizione alla quale si osserva la riduzione del 50% (ID_{50}) o del 90% (ID_{90}) dell'effetto citopatico e specificare a partire da quale diluizione l'esito del test si considera positivo.

Note: indicare eventuali ambiguità di interpretazione riscontrate in IFA, suggerendo di usare test di neutralizzazione, oppure richiedere ulteriore campione di siero, a distanza di 12 giorni dal primo prelievo, in assenza di IgM specifiche, per verificare sieroconversione.

Test molecolare, indicare:

- dati anagrafici del paziente e ID;
- data di prelievo del campione;
- tipologia del campione (siero, sangue intero, urine, LCR o altro);
- tipo di test eseguito (PCR in real time o altro test) e, se disponibile, la regione *target* rilevata dal test;
- risultato qualitativo (rilevato o non rilevato) o, se disponibile, risultato quantitativo nelle unità previste dal test.

Note: indicare ambiguità di interpretazione, eventuale necessità di approfondimenti, ecc.

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

5. ENCEFALITE VIRALE DA ZECCA (TBE)

5.1 AGENTE EZIOLOGICO

Il virus dell'encefalite da morso di zecca (*Tick borne encephalitis virus,* TBEV), appartiene genere *Flavivirus* della famiglia *Flaviviridae*; oltre ai 3 noti sottotipi: Europeo, TBEV-Eu; Siberiano, TBEV-Sib; e dell'Estremo Oriente, TBEV-FE, sono stati segnalati altri sottotipi, tra cui quelli attualmente denominati Baikalian e Himalayane (Ecker et al. 1999; Demina et al. 2010). La loro distribuzione geografica ricalca la distribuzione del vettore, ovvero *Ixodes ricinus* per il sottotipo europeo, e *I. persulcatus* per i sottotipi siberiano e dell'Estremo Oriente. Ultimamente, in Europa il TBEV è stato riscontrato anche in specie di *Dermacentor reticulatus* (Sidorenko et al. 2021). Il TBEV è un virus a RNA a singolo filamento a polarità positiva (+ssRNA) che presenta un virione sferico dotato di involucro (Füzik et al. 2018). Il genoma virale ha una lunghezza di circa 11 kb e codifica per una singola poliproteina che viene tagliata sia da proteasi virali che cellulari in tre proteine strutturali (C; prM; ed E) e sette non strutturali (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) coinvolte nella replicazione del genoma virale, e nella modulazione delle funzioni cellulari. Il virione è costituito da un nucleocapside circondato da una membrana composta da lipidi di derivazione della cellula ospite in cui sono incorporate le proteine dell'involucro virale (E) e della membrana (M). La replicazione del virus avviene attraverso la sintesi di RNA a polarità negativa (antisenso), che serve come modello per la produzione di RNA genomico.

5.2 EPIDEMIOLOGIA

L'encefalite virale da zecca (TBE), è endemica in diversi Paesi dell'Europa centrale, settentrionale e orientale, compresa l'Italia, in particolare le regioni nordorientali, con un'incidenza maggiore nei Paesi baltici e dell'Europa centrale (Beaute et al. 2018). L'infezione è trasmessa all'uomo prevalentemente attraverso il morso di zecche del genere *Ixodes*. In Italia è stata identificata per la prima volta nel 1994 in provincia di Belluno. I casi di TBE presentano generalmente un picco stagionale nei mesi di luglio e agosto, periodo in cui l'attività del vettore è maggiore. I dati ECDC relativi al 2020, hanno confermato a stagionalità prevista, con il 95% dei casi segnalati da maggio a novembre (ECDC, 2022). Nell'emisfero settentrionale eurasiatico la TBE rappresenta la più importante malattia virale trasmessa dalle zecche (Medlock et al. 2013). Il TBEV viene trasmesso dalla saliva di una zecca infetta entro pochi minuti dal morso. Sebbene la concentrazione del virus nella saliva delle zecche aumenti da dieci a cento volte durante il pasto (Alekseev et al. 1990), la rimozione precoce delle zecche dalla zona punta non previene la malattia. L'infezione può essere inoltre acquisita occasionalmente in seguito all'assunzione di latte non pastorizzato. latte crudo o prodotti lattiero-caseari, soprattutto di capra (Hudopisk et al. 2013).

5.3 ASPETTI CLINICI E TERAPEUTICI

Come nel caso delle infezioni da altri flavivirus, la maggior parte delle persone con un'infezione da TBEV potrebbe non presentare sintomi (Bogovic et al. 2015). L'infezione sintomatica può manifestarsi come una malattia febbrile senza coinvolgimento del sistema nervoso centrale (SNC), ma spesso può progredire fino alla forma encefalitica (TBE). Nel 50% circa dei casi sintomatici, infatti, la TBE causata dal sottotipo europeo si manifesta con un coinvolgimento diretto del SNC (Günther et al. 1997; Bogovič et al. 2021;

Kohlmaier et al. 2021) e nella maggior parte dei pazienti l'infiammazione del SNC è preceduta da una malattia febbrile, con un decorso bifasico. La fase iniziale, che corrisponde alla viremia, si manifesta con febbre, affaticamento, malessere, cefalea e dolori muscolari e articolari, in assenza di infiammazione del SNC; questa fase dura di solito meno di una settimana (Mickiene et al. 2002) e la sintomatologia migliora nel giro di pochi giorni. Il segno distintivo della seconda fase della malattia è il coinvolgimento del SNC. La meningite è la manifestazione predominante nei bambini. Negli adulti, la meningite si verifica nel ≈50% dei casi, la meningoencefalite nel ≈40% e la meningoencefalomielite nel ≈5%-10%. Il tasso di mortalità della TBE causata dal sottotipo di TBEV europeo è compreso tra lo 0,5% ed il 2%. Inoltre, circa il 5% dei pazienti adulti è colpito da paresi permanente e almeno un terzo soffre di sindrome postencefalitica che causa una malattia cronica progressiva (Bogovic et al. 2015. Taba et al. 2017). Non esistono farmaci antivirali specifici approvati per il trattamento della TBE (Taba et al. 2017) e l'assistenza ai pazienti è principalmente sintomatica e di supporto, compresi gli interventi di terapia intensiva nei casi più gravi. L'onere maggiore della malattia nei paesi endemici è dato dalla gestione delle disabilità neurologiche a lungo termine.

5.4 PREVENZIONE E SORVEGLIANZA

Il primo vaccino contro la TBE è stato sviluppato all'inizio degli anni '70, ha avuto un grande successo e il suo utilizzo ha portato a una significativa riduzione dell'incidenza della malattia nell'Europa centrale. Nel tempo, sono state apportate diverse modifiche al processo di produzione e alla formulazione di tale vaccino (Barrett et al. 2003).

L'attuale formulazione si basa su virus inattivato, esiste in due formulazioni, pediatrica e per adulti e conferisce un'elevata immunizzazione crociata anche verso i sottotipi virali non inclusi nel vaccino. Il ciclo vaccinale di base prevede tre dosi, da somministrare ad un intervallo di 1-3 mesi tra le prime due dosi e 9-12 mesi tra la seconda e la terza dose, con richiami a cadenza triennale, per via intramuscolare. Esiste anche la possibilità di seguire un ciclo accelerato di vaccinazione, che però non garantisce gli stessi risultati del ciclo classico, in termini di risposta anticorpale.

I residenti e i viaggiatori nelle regioni in cui la TBEV è endemica dovrebbero essere consapevoli del rischio di esposizione alle zecche e dovrebbero applicare misure di protezione personale contro le punture di zecca (ECDC, 2015), evitare il consumo di prodotti lattiero-caseari crudi e prendere in considerazione la vaccinazione contro la TBE per una protezione più efficace (in linea con le raccomandazioni nazionali), in particolare se svolgono attività all'aperto.

L'infezione da TBEV è soggetta a sorveglianza epidemiologica ed è inserita nel Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi 2020-2025 realizzato dal Ministero della Salute con il supporto dell'ISS e di esperti delle Regioni (Ministero della Salute. 2020).

- DEFINIZIONE DI CASO AI FINI DELLA SORVEGLIANZA

Caso probabile: Persona che soddisfa il criterio clinico ed il criterio di laboratorio per la presenza di IgM specifiche nel siero.

Caso confermato: Persona che soddisfa almeno uno dei criteri di laboratorio per caso confermato (ECDC, 2012), in particolare:

- presenza di IgM specifiche per TBEV nel liquor (le IgM non attraversano la barriera emato-encefalica e la loro presenza nel liquido cerebrospinale indica una produzione intratecale);
- sieroconversione o incremento di 4 volte del titolo anticorpale per anticorpi specifici anti-TBEV in campioni consecutivi, il risultato deve essere confermato mediante test di sieroneutralizzazione differenziale con altri flavivirus endemici;
- identificazione di TBEV RNA in campioni biologici (sangue, urine, liquor);
- isolamento di TBEV da campioni biologici (liquor, sangue, urine).

Un caso confermato di infezione da TBEV deve essere immediatamente segnalato dal laboratorio al Servizio Igiene e Sanità Pubblica competente, secondo le modalità previste dal Piano Nazionale di Sorveglianza delle Arbovirosi.

5.5 DIAGNOSI DI LABORATORIO

Nel sospetto di infezione da TBEV bisogna tener conto dell'andamento bifasico dell'infezione, il sospetto viene solitamente posto al momento della comparsa della sintomatologia neurologica; a questo punto, il virus grazie alla risposta del sistema immunitario è già stato eliminato sia dal sangue che dal liquido cerebrospinale. I tentativi di utilizzare i metodi molecolari su sangue e LCR per la diagnosi di TBE, nonostante l'elevata sensibilità dei test, nella stragrande maggioranza dei casi, non si sono rivelati di successo (Günther et al. 1997; Puchhammer-Stöckl et al. 1995; Holzmann, 2003); per tale motivo la ricerca degli anticorpi specifici rappresenta il test di elezione per la diagnosi di TBE. Nella seconda fase dell'infezione, sia pur raramente, è possibile ricercare il virus nelle urine (Nagy et al. 2018). L'isolamento del virus in coltura rappresenta una pratica diagnostica non routinaria, utile per la caratterizzazione biologica del virus.

I fallimenti vaccinali e le conseguenti infezioni in soggetti con documentata vaccinazione contro TBEV nonostante siano rari, possono verificarsi soprattutto nelle persone di età superiore ai 50 anni. In questi casi, si rileva una rapida risposta IgG con un titolo elevato, mentre la risposta IgM può essere ritardata o non rilevabile. La diagnosi di *breakthrough* vaccinale pone un problema diagnostico particolare in cui la rilevazione degli anticorpi specifici intratecali, la positività del test molecolare o la dimostrazione di anticorpi specifici contro l'antigene NS1 di TBEV (test non disponibile in commercio, Girl et al. 2020) diventano indispensabili per la conferma del caso (Lindquist et al. 2008; Andersson et al. 2010; Taba et al. 2017). Inoltre, l'esecuzione di un test di avidità degli anticorpi IgG anti-TBEV può consentire di distinguere un'infezione recente rispetto alla positività dovuta alla pregressa vaccinazione (Albinsson et al. 2018; Vilibic-Cavlek et al. 2016).

• FASE PREANALITICA

Raccolta e trasporto (preferibilmente a 4°C) di liquido cefalorachidiano (LCR), urine, sangue e siero.

LCR: prelevare tramite per puntura lombare o rachicentesi e raccogliere in provette sterili. E' preferibile dividere il campione in almeno 2 aliquote (volume complessivo 3/5 mL), una per l'esame chimico fisico e l'altra per le indagini microbiologiche. Il campione deve essere inviato al laboratorio nel più breve tempo possibile e comunque non oltre le due ore; in alternativa per le indagini virologiche può essere refrigerato. Può essere utile concordare modalità di prelievo ed invio con il laboratorio.

Sangue: prelevare in provette con anticoagulante, preferibilmente EDTA o sodio citrato, non utilizzare provette contenenti eparina.

Siero: raccogliere il sangue in provette per sierologia preferibilmente contenenti gel separatore.

Urine: raccogliere le urine in contenitori sterili.

- FASE ANALITICA

Nei casi di infezione da TBEV l'esame chimico fisico del LCR presenta proteine moderatamente elevate e lieve pleocitosi linfomononocitaria che varia da 6 a 1000 cellule/mm^3 con una moderata compromissione della barriera ematoencefalica (aumento del rapporto CSF/albumina sierica) (Holzmann, 2003).

RICERCA DIRETTA

Ricerca del genoma virale

Rilevamento del RNA virale di TBEV da sangue, urine o liquor mediante test di real-time RT-PCR specifica per TBEV (Veje et al. 2014). E' possibile inoltre usare test RT-PCR pan-flavivirus, che amplificano sequenze genomiche altamente conservate nel genere *Flavivirus*, seguiti dalla caratterizzazione molecolare mediante sequenziamento del tratto amplificato. La probabilità di ottenere un risultato positivo dal test molecolare è maggiore durante la prima fase febbrile della malattia.

Test antigenici

Non sono disponibili test commerciali per la ricerca di antigeni specifici per TBEV. Inoltre, data la natura bifasica dell'infezione, non è un test utile per la diagnosi di encefalite da TBEV.

Isolamento virale

Il TBEV può essere isolato su linee cellulari permissive all'infezione come Vero E6 o BHK-21 da siero, urine o liquor. TBEV è classificato come un agente di gruppo di rischio 3 (GR3) per tale motivo è necessario manipolarlo all'interno di laboratori di livello di biosicurezza 3 (BSL3).

RICERCA INDIRETTA

Test sierologici

La rilevazione di anticorpi specifici per TBEV può essere effettuata sia nel siero che nel liquor tramite test in immunofluorescenza o immunoenzimatico validato per la matrice liquor (Reusken et al. 2019). Bisogna ricordare che la positività del test anticorpale, in zone endemiche per altre infezioni da flavivirus (ad esempio, WNV ed USUV) deve essere confermata mediante test di sieroneutralizzazione differenziale per altri flavivirus endemici nell'area del contagio; d'altra parte i test di neutralizzazione potrebbero non essere conclusivi a causa della reattività crociata degli anticorpi neutralizzanti (Gomes da Silva et al. 2023); in questi casi è necessario testare due campioni consecutivi a distanza di almeno 20 giorni l'uno dall'altro. Inoltre, nei pazienti con pregressa infezione da altri flavivirus si può avere una risposta IgM attenuata o assente.

La diagnosi di *breakthrough* vaccinale pone un problema diagnostico particolare in cui la rilevazione degli anticorpi specifici intratecali o la dimostrazione di anticorpi specifici contro l'antigene NS1 di TBEV (test non disponibile in commercio, Girl et al. 2020) diventano indispensabili per la conferma del caso. L'esecuzione di un test di avidità degli

anticorpi IgG anti-TBEV può consentire di distinguere un'infezione recente rispetto alla positività dovuta alla pregressa vaccinazione (Albinsson et al. 2018; Vilibic-Cavlek et al. 2016).

Gli anticorpi IgM specifici per TBEV possono persistere fino a 10 mesi in soggetti vaccinati o che hanno acquisito l'infezione naturalmente (Taba et al. 2017).

- FASE POST ANALITICA

REFERTAZIONE ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Ricerca di anticorpi

Nel referto è necessario inserire le seguenti informazioni:

- dati anagrafici del paziente e ID;
- data di prelievo del campione;
- tipologia del campione (siero, LCR o altro);
- tipo di test eseguito (ELISA, EIA, CLIA, IF, test di neutralizzazione mediante riduzione delle placche, PRNT, test di microneutralizzazione. MNT, ecc);
- risultato espresso nelle unità di misura previste dal test utilizzato e relativo cut off
- nel caso di test in immunofluorescenza specificare a partire da quale diluizione l'esito del test si considera positivo ed indicare la diluizione sino alla quale si osserva un segnale di fluorescenza positivo qualora si tratti di un test quantitativo (diluizione limite);
- per il test di neutralizzazione specificare la diluizione alla quale si osserva la riduzione del 50% (ID_{50}) o del 90% (ID_{90}) dell'effetto citopatico e specificare a partire da quale diluizione l'esito del test si considera positivo.

Note: indicare eventuali ambiguità di interpretazione, presenza di crossreattività, necessità di ulteriori approfondimenti, ecc.

Test molecolare

Nel referto vanno inserite le seguenti informazioni:

- dati anagrafici del paziente e ID;
- data di prelievo del campione;
- dipologia del campione (siero, sangue intero, urine, LCR o altro);
- tipo di test eseguito (RT-PCR in real time o altro test) e, se disponibile, la regione target rilevata dal test;
- il risultato qualitativo (rilevato o non rilevato) se il test non permette deduzioni quantitative (es. RT-PCR end-point); se il test è quantitativo o semiquantitativo, le unità previste dal test utilizzato, e relativo cut off;
- nel caso di test "pan-flavivirus", aggiungere, se disponibile, il risultato della caratterizzazione molecolare (sequenziamento o altro, indicando la regione genomica sottoposta a caratterizzazione).

Note: indicare eventuali ambiguità di interpretazione, necessità di approfondimenti, ecc.

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

6. BIBLIOGRAFIA

- Aberle SW, Kolodziejek J, Jungbauer C, et al. Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. Euro Surveill. **2018** Oct;23(43):1800545. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1800545.
- Abudurexiti A, Adkins S, Alioto D et al. Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019. Archives of Virology **2019** 164:1949–1965 doi: 10.1007/s00705-019-04253-6
- Albinsson B, Vene S, Rombo L, et al. Distinction between serological responses following tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection vs vaccination, Sweden 2017. Euro Surveill. **2018** Jan;23(3):17-00838. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.3.17-00838.
- Alekseev AN, Chunikhin SP. [The experimental transmission of the tick-borne encephalitis virus by ixodid ticks (the mechanisms, time periods, species and sex differences)]. Parazitologiia. **1990** May-Jun;24(3):177-85. Russian. PMID: 2216530.
- Anagnostou V, Papa A. Seroprevalence of Toscana virus among residents of Aegean Sea islands, Greece. Travel Med Infect Dis. **2013** Mar-Apr;11(2):98-102. doi: 10.1016/j.tmaid.2012.11.006.
- Andersson CR, Vene S, Insulander M, et al. Vaccine failures after active immunisation against tick-borne encephalitis. Vaccine. **2010** Apr 1;28(16):2827-31. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.001.
- Ayhan N, Charrel RN. An update on Toscana virus distribution, genetics, medical and diagnostic aspects. Clin Microbiol Infect. **2020a** Aug;26(8):1017-1023. doi: 10.1016/j.cmi.2019.12.015.
- Ayhan N, Prudhomme J, Laroche L, et al. Broader Geographical Distribution of Toscana Virus in the Mediterranean Region Suggests the Existence of Larger Varieties of Sand Fly Vectors. Microorganisms **2020b** Jan 14;8(1):114. doi: 10.3390/microorganisms8010114
- Ayhan N, López-Roig M, Monastiri A, et al. Seroprevalence of Toscana Virus and Sandfly Fever Sicilian Virus in European Bat Colonies Measured Using a Neutralization Test. Viruses. **2021** Jan 11;13(1):88. doi: 10.3390/v13010088.
- Bakonyi T, Ivanics É, Erdélyi K, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. Emerg Infect Dis. **2006** Apr;12(4):618-23. doi: 10.3201/eid1204.051379.
- Bakonyi T, Jungbauer C, Aberle SW, et al. Usutu virus infections among blood donors, Austria, july and august 2017 – Raising awareness for diagnostic challenges. Euro Surveill. **2017** Oct;22(41):17-00644. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.41.17-00644.
- Baldelli F, Ciufolini MG, Francisci D, et al. Unusual presentation of life-threatening Toscana virus meningoencephalitis. Clin Infect Dis. **2004** Feb 15;38(4):515-20. doi: 10.1086/381201
- Barrett PN, Schober-Bendixen S, Ehrlich HJ. History of TBE vaccines. Vaccine. **2003** Apr 1;21 Suppl 1:S41-9. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00814-9.
- Barzon L, Pacenti M, Franchin E, et al. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. J Infect Dis. **2013** Oct 1;208(7):1086-92. doi: 10.1093/infdis/jit290.
- Barzon L, Pacenti M, Franchin E, et al. Isolation of West Nile virus from urine samples of patients with acute infection. J Infect Dis. **2013** Oct 1;208(7):1086-92. doi: 10.1093/infdis/jit290.
- Barzon L, Pacenti M, Sinigaglia A, et al. West Nile virus infection in children. Expert Rev Anti Infect Ther. **2015**;13(11):1373-86. doi: 10.1586/14787210.2015.1083859.
- Barzon L, Montarsi F, Quaranta E, et al. Early start of seasonal transmission and co-circulation of West Nile virus lineage 2 and a newly introduced lineage 1 strain, northern Italy, June 2022. Euro Surveill. **2022a** Jul;27(29):2200548. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.29.2200548
- Barzon L, Pacenti M, Montarsi F, et al. Rapid spread of a new West Nile virus lineage 1 associated with increased risk of neuroinvasive disease during a large outbreak in northern Italy, 2022: One Health analysis. J Travel Med. **2022b** Nov 4:taac125. doi: 10.1093/jtm/taac125
- Boldescu V, Behnam MAM, Vasilakis N et al. Broad-spectrum agents for flaviviral infections: Dengue, Zika and beyond. Nat Rev Drug Discov. **2017** Aug;16(8):565-586. doi: 10.1038/nrd.2017.33.

- Beaute J, Spiteri G, Warns-Petit E et al. Tick-borne encephalitis in Europe, 2012 to 2016. Euro Surveill. 2018 Nov;23(45):1800201. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.45.1800201
- Berneck BS, Rockstroh A, Barzon L, et al. Serological differentiation of West Nile virus- and Usutu virus-induced antibodies by envelope proteins with modified cross-reactive epitopes. Transbound Emerg Dis. **2022** Sep;69(5):2779-2787. doi: 10.1111/tbed.14429.
- 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. doi: 10.12998/wjcc.v3.i5.430.
- Bogovič P, Lotrič-Furlan S, Avšič-Županc T, et al. Comparison of Clinical, Laboratory and Immune Characteristics of the Monophasic and Biphasic Course of Tick-Borne Encephalitis. Microorganisms. **2021** Apr 10;9(4):796. doi: 10.3390/microorganisms9040796.
- Bondre VP, Jadi RS, Mishra AC, Yergolkar PN, Arankalle VA. West Nile virus isolates from India: Evidence for a distinct genetic lineage. J Gen Virol. **2007** Mar;88(Pt 3):875-884. doi: 10.1099/vir.0.82403-0.
- Busch MP, Kleinman SH, Tobler LH, et al. Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection. J Infect Dis. 2008 Oct 1;198(7):984-93. doi: 10.1086/591467.
- Cadar D, Maier P, Müller S, et al. Blood donor screening for west nile virus (WNV) revealed acute usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016. Euro Surveill. **2017** Apr 6;22(14):30501. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.14.30501.
- Carletti F, Colavita F, Rovida F, et al. Expanding Usutu virus circulation in Italy: Detection in the Lazio region, central Italy, 2017 to 2018. Euro Surveill. **2019** Jan;24(3):1800649. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800649.
- Cavrini F, Gaibani P, Longo G, et al. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotropic liver transplantation, Italy, August-September 2009. Euro Surveill. **2009** Dec 17;14(50):19448. doi: 10.2807/ese.14.50.19448-en
- Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari JM, et al. Emergence of Toscana virus in Europe, Emerg Infect. Dis. 11, **2005** 1657–1663. doi: 10.3201/eid1111.050869
- Charrel RN, Bichaud L, de Lamballerie X. Emergence of Toscana virus in the mediterranean area, World J. Virol. 1, **2012** 135–141. doi: 10.5501/wjv.v1.i5.135
- Clé M, Beck C, Salinas S et al. Usutu virus: A new threat? Epidemiol Infect. **2019** Jan;147:e232. doi: 10.1017/S0950268819001213.
- Coia G, Parker MD, Speight G, et al. Nucleotide and complete amino acid sequences of Kunjin virus: Definitive gene order and characteristics of the virus-specified proteins. J Gen Virol. **1988**;69(1):1–21. doi: 10.1099/0022-1317-69-1-1
- Cusi MG, Savellini GG, Zanelli G. Toscana Virus Epidemiology: From Italy to Beyond. The Open Virology Journal, **2010**, 4, 22-28. doi: 10.2174/1874357901004020022
- Cusi MG, Savellini GG. Diagnostic tools for Toscana virus infection. Expert Rev Anti Infect Ther. **2011** Jul;9(7):799-805. doi: 10.1586/eri.11.54.
- Demina TV, Dzhioev YP, Verkhozina MM et al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. J Med Virol. **2010**;82:965–76. doi: 10.1002/jmv.21765
- Depaquit J, Grandadam M, Fouque Fet al. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. Euro Surveill. **2010** Mar 11;15(10):19507. doi: 10.2807/ese.15.10.19507-en
- Ecker M, Allison SL, Meixner T, et al. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. J Gen Virol. **1999** Jan;80 (Pt 1):179-185. doi: 10.1099/0022-1317-80-1-179.
- Ergünay K, Litzba N, Lo MM, et al. Performance of various commercial assays for the detection of Toscana virus antibodies. Vector Borne Zoonotic Dis. **2011** Jun;11(6):781-7. doi: 10.1089/vbz.2010.0224.

associazione microbiologi clinici italiani AMCLI Ente del Terzo Settore

- Ergunay K, Aydogan S, Ilhami Ozcebe O, et al. Toscana virus (TOSV) exposure is confirmed in blood donors from Central, North and South/Southeast Anatolia, Turkey. Zoonoses Public Health. **2012** Mar;59(2):148-54. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01436.x

- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) Infectious disease topics - Toscana virus infection (Disponibile al seguente link: https://www.ecdc.europa.eu/en/toscana-virus-infection; Ultimo accesso: aprile 2023)

- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) Meeting Report 2011 (**2012**) Second expert consultation on tick-borne diseases with emphasis on Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. (Disponibile al seguente link: http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=584; Ultimo accesso: aprile 2023)

- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) Personal protective measures against tick bites. Stockholm: ECDC; **2015**. Disponibile al seguente link: https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/prevention-and-control/protective-measures-ticks; Ultimo accesso: aprile 2023)

- European Centre for Disease Prevention and Control. Tick-borne encephalitis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2020. Stockholm: ECDC; **2022** (Disponibile al seguente link: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tick-borne-encephalitis-annual-epidemiological-report-2020; Ultimo accesso: aprile 2023)

- Faggioni G, De Santis R, Pomponi A, et al. Prevalence of Usutu and West Nile virus antibodies in human sera, Modena, Italy, 2012. J Med Virol. **2018** Oct;90(10):1666-1668. doi: 10.1002/jmv.25230.

- Füzik T, Formanová P, Růžek D, et al. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. Nat Commun 9, 436, **2018**. doi: 10.1038/s41467-018-02882-0.

- Girl P, Bestehorn-Willmann M, Zange S, et al. Tick-Borne Encephalitis Virus Nonstructural Protein 1 IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Differentiating Infection versus Vaccination Antibody Responses. J Clin Microbiol. **2020** Mar 25;58(4):e01783-19. doi: 10.1128/JCM.01783-19.

- Gori Savellini G, Gandolfo C, Cusi MG. Epidemiology of Toscana virus in South Tuscany over the years 2011-2019. J Clin Virol. **2020** Jul;128:104452. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104452.

- Grottola A, Marcacci M, Tagliazucchi S, et al. Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. Clin Microbiol Infect. **2017** Jan;23(1):33-37. doi: 10.1016/j.cmi.2016.09.019.

- Günther G, Haglund M, Lindquist L, et al. Tick-bone encephalitis in Sweden in relation to aseptic meningo-encephalitis of other etiology: a prospective study of clinical course and outcome. J Neurol. **1997** Apr;244(4):230-8. doi: 10.1007/s004150050077.

- Hernández-Triana LM, Jeffries CL, Mansfield KL, et al. Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: A review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease. Front Public Health. **2014** Dec 8;2:271. doi: 10.3389/fpubh.2014.00271.

- Holzmann H. Diagnosis of tick-borne encephalitis. Vaccine. 2003 Apr 1;21 Suppl 1:S36-40. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00819-8.

- Hudopisk N, Korva M, Janet E, et al. Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012. Emerg Infect Dis. **2013** May;19(5):806-8. doi: 10.3201/eid1905.121442.

- Kohlmaier B, Schweintzger NA, Sagmeister MG, et al. Clinical Characteristics of Patients with Tick-Borne Encephalitis (TBE): A European Multicentre Study from 2010 to 2017. Microorganisms. **2021** Jun 30;9(7):1420. doi: 10.3390/microorganisms9071420.

- Lai L, Lee TH, Tobler L, et al. Relative distribution of West Nile virus RNA in blood compartments: Implications for blood donor nucleic acid amplification technology screening. Transfusion. **2012** Feb;52(2):447-54. doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03289.x.

- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, et al. 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. doi: 10.1126/science.286.5448.2333.

- Laroche L, Jourdain F, Ayhan N, et al. Incubation Period for Neuroinvasive Toscana Virus Infections. Emerg Infect Dis. **2021** Dec;27(12):3147-3150. doi: 10.3201/eid2712.203172.
- Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. Lancet. **2008** May 31;371(9627):1861-71. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60800-4.
- Lustig Y, Mannasse B, Koren R, et al. Superiority of west nile virus RNA detection in whole blood for diagnosis of acute infection. J Clin Microbiol. **2016** Sep;54(9):2294-7. doi: 10.1128/JCM.01283-16.
- Martina BE, Barzon L, Pijlman GP, et al. Human to human transmission of arthropod-borne pathogens. Curr Opin Virol. **2017** Feb;22:13-21. doi: 10.1016/j.coviro.2016.11.005.
- Masse S, Ayhan N, Capai L, et al. Circulation of Toscana Virus in a Sample Population of Corsica, France. Viruses. **2019** Sep 4;11(9):817. doi: 10.3390/v11090817.
- Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, et al. Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe. Parasit Vectors. **2013** Jan 2;6:1. doi: 10.1186/1756-3305-6-1.
- Mickiene A, Laiskonis A, Günther G, et al. Tickborne encephalitis in an area of high endemicity in lithuania: disease severity and long-term prognosis. Clin Infect Dis. **2002** Sep 15;35(6):650-8. doi: 10.1086/342059.
- Ministero della Salute. Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA) 2020-2025. (Disponibile al seguente link: https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2947_allegato.pdf; Ultimo accesso: aprile 2023)
- Nagy A, Nagy O, Tarcsai K, et al. First detection of tick-borne encephalitis virus RNA in clinical specimens of acutely ill patients in Hungary. Ticks Tick Borne Dis. **2018** Mar;9(3):485-489. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.12.017.
- Nanni Costa A, Capobianchi MR, Ippolito G, et al. West Nile virus: The Italian national transplant network reaction to an alert in the north-eastern region, Italy 2011. Eurosurveillance **2011**;16(41):6.
- Nikolay B, Diallo M, Boye CSB, et al. Usutu virus in Africa. Vector Borne Zoonotic Dis. **2011** Nov;11(11):1417-23. doi: 10.1089/vbz.2011.0631.
- Pacenti M, Sinigaglia A, Martello T, et al. Clinical and virological findings in patients with Usutu virus infection, northern Italy, 2018. Euro Surveill. **2019**;24(47):pii=1900180. doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.47.1900180
- Pacenti M, Sinigaglia A, Franchin E, et al. Human west nile virus lineage 2 infection: Epidemiological, clinical, and virological findings. Viruses. **2020** Apr 18;12(4):458. doi: 10.3390/v12040458.
- Pecorari M, Longo G, Gennari W, et al. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. Euro Surveill. **2009**;14(50):pii=19446. doi: 10.2807/ese.14.50.19446-en
- Percivalle E, Sassera D, Rovida F, et al. Usutu Virus Antibodies in Blood Donors and Healthy Forestry Workers in the Lombardy Region, Northern Italy. Vector Borne Zoonotic Dis. **2017** Sep;17(9):658-661. doi: 10.1089/vbz.2017.2126.
- Percivalle E, Cassaniti I, Sarasini A, et al. West nile or usutu virus? A three-year follow-up of humoral and cellular response in a group of asymptomatic blood donors. Viruses. **2020** Jan 29;12(2):157. doi: 10.3390/v12020157
- Pérez-Ruiz M, Collao X, Navarro-Marí JM, et al.. Reverse transcription, real-time PCR assay for detection of Toscana virus. J Clin Virol. **2007** Aug;39(4):276-81. doi: 10.1016/j.jcv.2007.05.003.
- Pierro A, Ficarelli S, Ayhan N, et al. Characterization of antibody response in neuroinvasive infection caused by Toscana virus. Clin Microbiol Infect. **2017** Nov;23(11):868-873. doi: 10.1016/j.cmi.2017.03.017.
- Prince HE, Tobler LH, Lapé-Nixon M, et al. Development and persistence of West Nile Virus-specific immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG in viremic blood donors. J Clin Microbiol. **2005** Sep;43(9):4316-20. doi: 10.1128/JCM.43.9.4316-4320.2005.
- Prince HE, Tobler LH, Yeh C, et a. Persistence of West Nile virus-specific antibodies in viremic blood donors. Clin Vaccine Immunol. **2007** Sep;14(9):1228-1230. DOI: 10.1128/cvi.00233-07.

- Puchhammer-Stöckl E, Kunz C, Mandl CW, et al. 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. doi: 10.1016/0928-0197(95)00022-4.
- Punda-Polić V, Mohar B, Duh D, et al. Evidence of an autochthonous Toscana virus strain in Croatia. J Clin Virol. **2012** Sep;55(1):4-7. doi: 10.1016/j.jcv.2012.06.006.
- Reusken C, Boonstra M, Rugebregt S, et al. An evaluation of serological methods to diagnose tick-borne encephalitis from serum and cerebrospinal fluid. J Clin Virol. **2019** Nov;120:78-83. doi: 10.1016/j.jcv.2019.09.009.
- Rios M, Daniel S, Chancey C, et al. West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood. Clin Infect Dis. **2007** Jul 15;45(2):181-6. doi: 10.1086/518850.
- Rizzoli A, Jiménez-Clavero MA, Barzon L, et al. The challenge of west nile virus in Europe: Knowledge gaps and research priorities. Euro Surveill. **2015** May 21;20(20):21135. doi: 10.2807/1560-7917.es2015.20.20.21135.
- Roehrig JT, Nash D, Maldin B, et al. Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases. Emerg Infect Dis. **2003** Mar;9(3):376-9. doi: 10.3201/eid0903.020531.
- Ronca SE, Ruff JC, Murray KO. A 20-year historical review of west nile virus since its initial emergence in north america: Has west nile virus become a neglected tropical disease? PLoS Negl Trop Dis. **2021** May 6;15(5):e0009190. doi: 10.1371/journal.pntd.0009190.
- Rota E, Morelli N, Immovilli P, et al. Guillain-Barré-like axonal polyneuropathy associated with Toscana virus infection: A case report. Medicine **2017** Sep;96(38):e8081. doi: 10.1097/MD.0000000000008081.
- Sanbonmatsu-Gamez S, Perez-Ruiz M, Palop-Borras B, et al. Unusual manifestation of toscana virus infection, Spain. Emerg Infect Dis. **2009** Feb;15(2):347-8. doi: 10.3201/eid1502.081001
- Santini M, Vilibic-Cavlek T, Barsic B, et al. First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August–September 2013: clinical and laboratory features. J Neurovirol. **2015** Feb;21(1):92-7. doi: 10.1007/s13365-014-0300-4.
- Sejvar JJ. The long-term outcomes of human West Nile virus infection. Clin Infect Dis. **2007** Jun 15;44(12):1617-24. doi: 10.1086/518281.
- Sghaier W, Bahri O, Kedous E, et al. [Retrospective study of viral causes of central nervous system infections in Tunisia (2003-2009)]. Med Sante Trop. **2012** Oct-Dec;22(4):373-8. French. doi: 10.1684/mst.2012.0080
- Sidorenko M, Radzijevskaja J, Mickevičius S, et al. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in questing Dermacentor reticulatus and Ixodes ricinus ticks in Lithuania. Ticks Tick Borne Dis. **2021** Jan;12(1):101594. doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101594.
- Simonin Y, Sillam O, Carles MJ, et al. Human Usutu virus infection with atypical neurologic presentation, Montpellier, France, 2016. Emerg Infect Dis. **2018**;24(5):875–8. doi:10.3201/eid2405.171122.
- Sinigaglia A, Pacenti M, Martello T, et al. West nile virus infection in individuals with preexisting usutu virus immunity, northern Italy, 2018. Euro Surveill. **2019**;24(21):pii=1900261. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.21.1900261
- Sinigaglia A, Peta E, Riccetti S, et al. New avenues for therapeutic discovery against West Nile virus. Expert Opin Drug Discov. **2020** Mar;15(3):333-348. doi: 10.1080/17460441.2020.1714586.
- Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, et al. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. Am J Trop Med. **1940**;20:471-92. doi: 10.4269/ajtmh.1940.s1-20.471
- Soldateschi D, dal Maso GM, Valassina M, et al. Laboratory diagnosis of Toscana virus infection by enzyme immunoassay with recombinant viral nucleoprotein. J Clin Microbiol. **1999** Mar;37(3):649-52. doi: 10.1128/JCM.37.3.649-652.1999.
- Suthar MS, Diamond MS, Gale M. West Nile virus infection and immunity. Nat Rev Microbiol. **2013** Feb;11(2):115-28. doi: 10.1038/nrmicro2950.

- Taba P, Schmutzhard E, Forsberg P, et al. EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis. Eur J Neurol. **2017** Oct;24(10):1214-e61. doi: 10.1111/ene.13356.
- Thirion L, Pezzi L, Pedrosa-Corral I, et al. Evaluation of a Trio Toscana Virus Real-Time RT-PCR Assay Targeting Three Genomic Regions within Nucleoprotein Gene. Pathogens. **2021** Feb 24;10(3):254. doi: 10.3390/pathogens10030254.
- Trogu T, Canziani S, Salvato S, et al. Survey on the Presence of Viruses of Economic and Zoonotic Importance in Avifauna in Northern Italy. Microorganisms. **2021** Sep 15;9(9):1957.
- 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. doi: 10.1128/JCM.02428-14. Epub 2014 Aug 27.
- Vilibic-Cavlek T, Barbic L, Stevanovic V, et al. IgG Avidity: an Important Serologic Marker for the Diagnosis of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection. Pol J Microbiol. **2016**;65(1):119-21. doi: 10.5604/17331331.1197285.
- Vilibic-Cavlek T, Petrovic T, Savic V, et al. Epidemiology of usutu virus: The European scenario. Pathogens. **2020** Aug 26;9(9):699. doi: 10.3390/pathogens9090699.
- Vogels CBF, Göertz GP, Pijlman GP, et al. Vector competence of European mosquitoes for west Nile virus. Emerg Microbes Infect. **2017** Nov 8;6(11):e96. doi: 10.1038/emi.2017.82.
- Wang H, Abbo SR, Visser TM, et al. Competition between Usutu virus and West Nile virus during simultaneous and sequential infection of Culex pipiens mosquitoes. Emerg Microbes Infect. **2020**;9(1):2642–52 doi: 10.1080/22221751.2020.1854623
- Weissenböck H, Bakonyi T, Rossi G, Mani P, Nowotny N. Usutu virus, Italy, 1996. Emerg Infect Dis. **2013** Feb;19(2):274-7. doi: 10.3201/eid1902.121191.
- Woodall JP. The viruses isolated from arthropods at the East African Virus Research Institute in the 26 years ending December 1963. Proc E Afr Acad. **1964**;2: 141-6.
- Zeller HG, Schuffenecker I. West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **2004** Mar;23(3):147-56. doi: 10.1007/s10096-003-1085-1.

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore