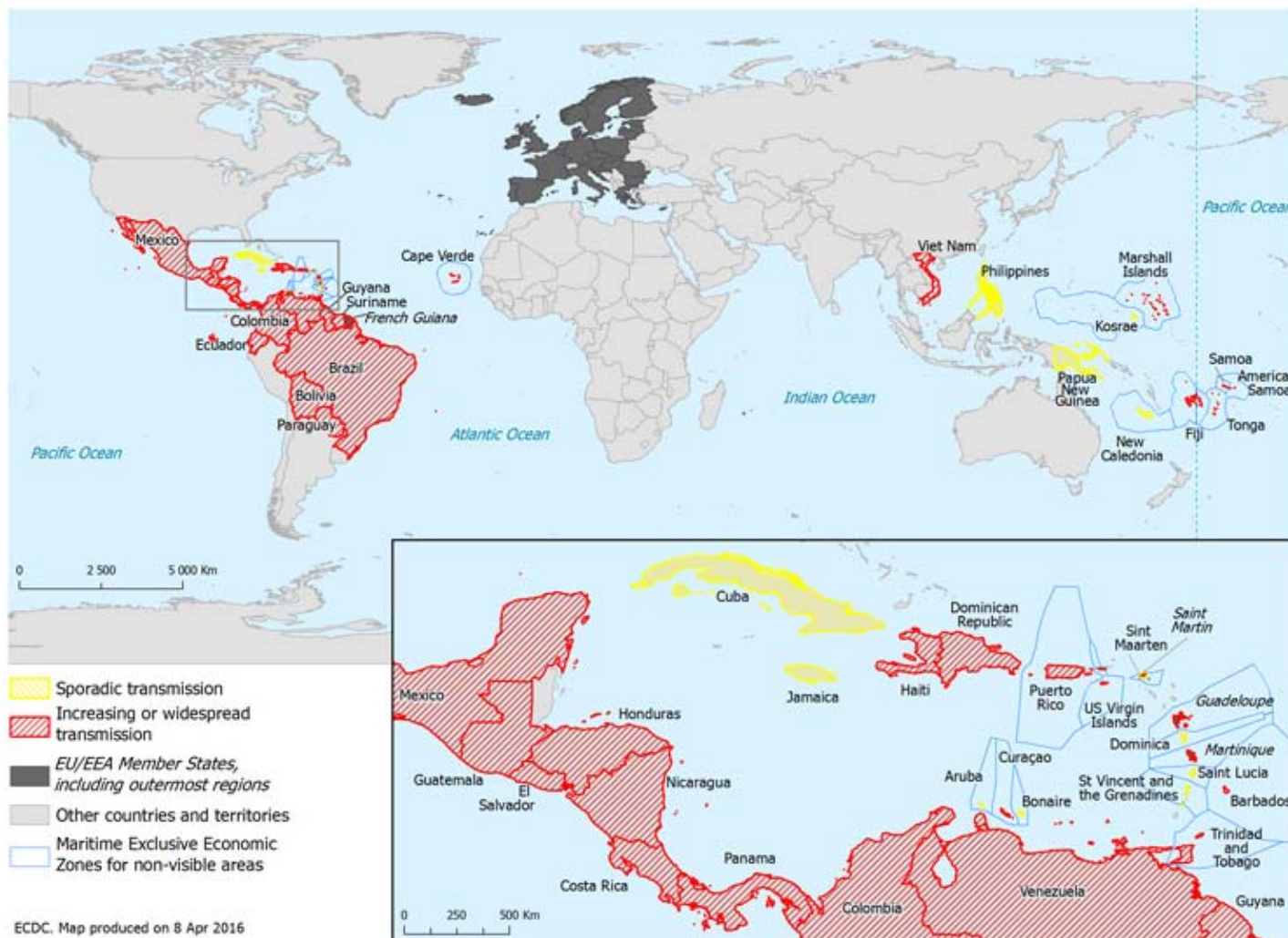



Update su Zika e attività di diagnosi del Laboratorio Nazionale di Riferimento

Dr.ssa Giulietta Venturi
Dipartimento MIPI



ECDC: Paesi e territori con riportati casi autoctoni confermati di infezione da virus Zika negli ultimi due mesi, alla data dell'8 aprile 2016.





Il 1 Febbraio 2016, il WHO ha dichiarato che il recente cluster di casi di microcefalia ed altri disordini neurologici riportati in America, dove è in corso un'epidemia di virus Zika, costituisce una Emergenza di Salute Pubblica di Interesse Internazionale (PHEIC)*.

*(WHO. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations: WHO; 2016).





Infezione da virus Zika: storia naturale dell'infezione e modalità di trasmissione non tramite vettore





Cinetica dell'infezione: viremia e presenza del virus in altri fluidi corporei.

- La viremia sembra essere generalmente bassa e di breve durata: il virus può essere rilevato fino a 3-5 giorni dopo la comparsa dei sintomi; il virus sembra raggiungere il titolo ematico più alto con la comparsa dei sintomi.
- Il virus Zika può essere rilevato nella saliva, ma, dai dati disponibili, la persistenza sembra essere variabile (fino a 29 giorni); la ricerca nella saliva può comunque aumentare la possibilità di rilevamento dell'infezione.
- Urine: dai dati disponibili sembra che il titolo virale sia maggiore nelle urine rispetto al sangue, con un picco dopo 5-7 giorni dai sintomi, e sembra poter persistere per un periodo più lungo (fino a 29 giorni): la ricerca del virus tramite PCR nelle urine dovrebbe essere eseguita in combinazione con la ricerca nel sangue.
- E' stato inoltre documentato il rilevamento del virus Zika in tamponi nasofaringei, nel liquido amniotico e nel liquido seminale.





Risposta immunitaria

I dati disponibili sono ancora limitati, ottenuti su piccoli numeri di pazienti.

- IgM: sembrano comparire precocemente, già dopo 3-5 giorni dalla comparsa dei sintomi; da determinare per quanto tempo possono persistere.
- IgG: il tempo di comparsa può dipendere dalla presenza di immunità verso altri flavivirus; rilevabili dopo circa 8-10 giorni dai sintomi.
- Anticorpi neutralizzanti: rilevabili già dopo 5 giorni dai sintomi.

Resta ancora da indagare la risposta immunitaria nelle donne in gravidanza, che potrebbe presentare delle peculiarità.






Modalità di trasmissione non tramite vettori

- Trasmissione perinatale: avviene probabilmente attraverso trasmissione trans-placentare, o durante il parto, in caso di infezione della madre.
- Trasmissione per via sessuale: ZIKV è stato rilevato/isolato nel liquido seminale di pazienti infetti anche dopo diversi giorni (anche fino a 62) dai sintomi. Inoltre stanno aumentando i casi documentati di probabile infezione per via sessuale.
- Trasmissione in seguito a trasfusioni di sangue: alcune evidenze mostrano un potenziale rischio di trasmissione tramite trasfusioni, e le autorità Brasiliane ne hanno riportato un caso.





**Test attualmente disponibili
per la diagnosi e linee guida
per la diagnosi**

Diagnosi molecolare

- Può essere fatta su diversi tipi di campioni: siero, plasma, saliva, urine.
- Esistono diversi protocolli in-house (sia real time che PCR convenzionale) descritti in letteratura, ma pochi sono stati validati utilizzando i ceppi virali associati alle recenti epidemie, e campioni clinici ben caratterizzati.

PCR	Reference PCR	PCR Target	Amplicon size (bp)	ZIKV lineage analytical	ZIKV lineage field	# human patients	Sample types pos in field	Reference
ZIKV-specific								
Lanciotti 2008 set 1 [835]	(56)	ZIKV-NS5	76	Asian, African	Asian	>200 (combined set)	serum, urine, amniotic fluid	(5, 9, 44, 46, 50, 53, 54, 55, 58, 96, 99, 100)
Lanciotti 2008 set 2 [1086]	(56)	ZIKV-NS5	76	Asian, African	Asian	>200 (combined set)	serum, urine, amniotic fluid	(5, 9, 44, 46, 50, 53, 54, 55, 58, 96, 99, 100)
Faye 2013	(66)	ZIKV-NS5	102	Asian, African	African	0	serum	Rockx, <i>pers. comm.</i>
Tappe 2014	(67)	ZIKV-NS3	94	Asian	Asian	5	serum	(67, 84, 85, 95, 97)
Faye 2008	(68)	ZIKV-E	364	African	Asian	>15	serum	(32, 33)
Pyke 2014	(81)	ZIKV-NS1	65	Asian	Asian	1	serum	(81)
Pyke 2014	(81)	ZIKV-E	71	Asian	Asian	1	serum	(81)
Pan-flavi with sequencing								
Moureaux 2007	(72)	Flavi-NS5	269-272	African	Asian	2	serum, urine	(57, 78)
Kuno 1998	(73)	Flavi-NS5	1079	Asian, African	Asian	51	serum	(79)
Scaramozzino 2001	(74)	Flavi-NS5	220	African	Asian	1	serum, urine	(81), Barzon <i>pers. comm.</i>
Maher-sturgess	(76)	Flavi-NS5	800	African	Asian	1	serum	(80)
Ayers 2006	(75)	Flavi-NS5	863	nt	Asian	1	serum, urine, nasopharyngeal	(59)

- Esistono inoltre test commerciali, al momento per uso di ricerca.





Sierologia: criticità.

- Estesa cross-reattività fra gli anticorpi indotti dall'infezione o vaccinazione verso flavivirus diversi (anche appartenenti a diversi sierogruppi).
- L'infezione acuta da un flavivirus può indurre l'aumento di anticorpi cross-reattivi derivati da precedenti infezioni/vaccinazioni da flavivirus diversi.
- I pazienti nelle aree dell'attuale epidemia da virus Zika avranno livelli elevati di "background" da altri flavivirus (DENV, YFV, WNV); non così i viaggiatori europei di ritorno da aree epidemiche.



Test sierologici disponibili

Test “in-house”:

- Immunoglobulin M antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay (MAC-ELISA) e capture ELISA per IgG, con virus intero inattivato prodotto in cervello di topo neonato o in colture cellulari.
- In-house ZIKV IgM e IgG typing microsphere immunoassay, con la proteina NS1 ricombinante.
- Saggi di immunofluorescenza (IFA) per ZIKV IgM e IgG, con virus intero.
- Test di neutralizzazione del virus.

Test commerciali: IFA, ELISA, sia per IgM che per IgG.



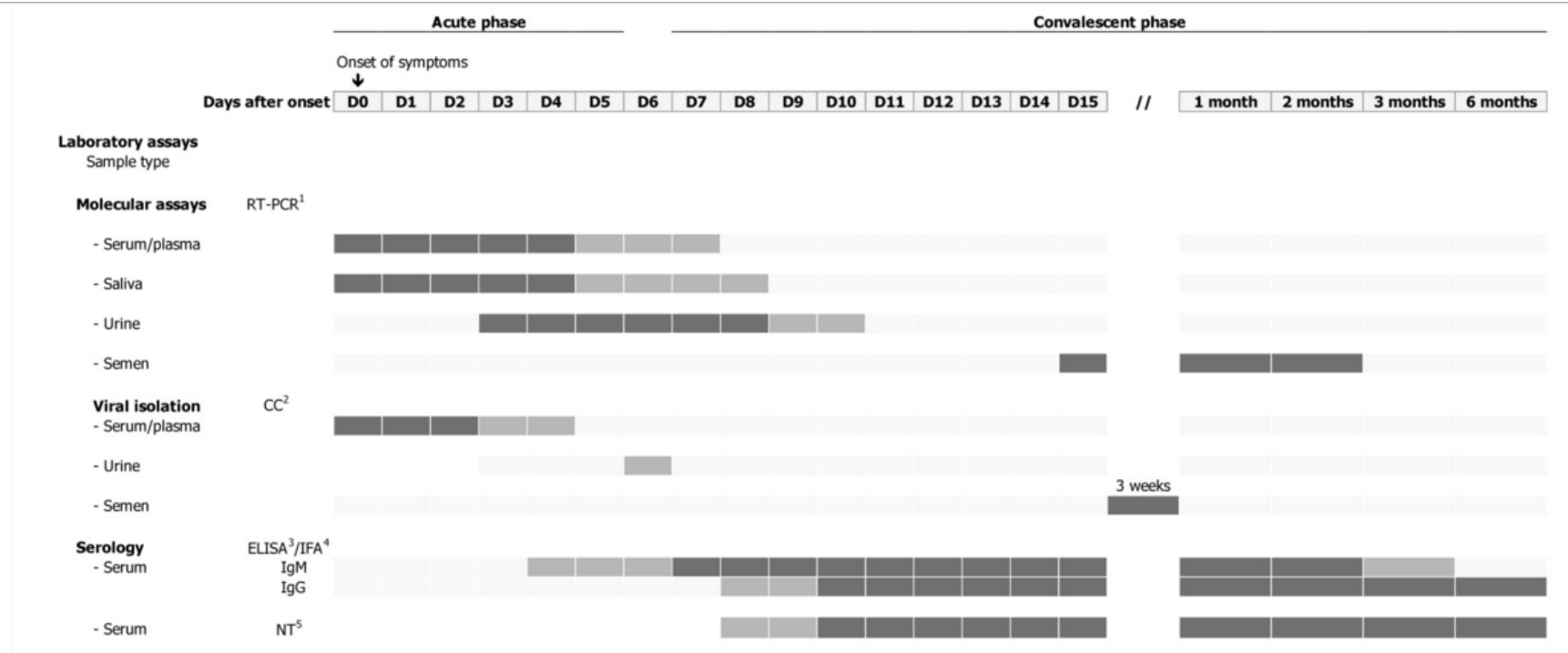


Diagnosi sierologica: raccomandazioni generali

- Non esistono al momento saggi commerciali validati per la diagnosi sierologica da virus Zika: importante l'esecuzione di test di conferma.
- Per la diagnosi sierologica di infezione recente da virus Zika è importante la raccolta di una coppia di sieri a distanza di 2-3 settimane, per poter rilevare la sieroconversione o l'aumento di 4 volte del titolo anticorpale.
- Per l'interpretazione dei risultati è importante prendere in considerazione notizie quali infezioni pregresse o vaccinazioni da altri flavivirus, endemicità per altri flavivirus nella regione di esposizione, e notizie su stati particolari del paziente (gravidanza, neonati, immunodeficienze...)



ECDC: Provisional overview of laboratory tests for Zika virus diagnostic



Notes:

- Optimal period of use per current knowledge.
- Sub-optimal period for detection per current knowledge

(1) RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; (2) CC, Cell culture (mammalian, mosquito cells); (3) ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; (4) IFA, Immunofluorescent assay; (5) NT, neutralisation test.

Detailed investigations on other samples such as cerebrospinal fluid, amniotic fluid, placenta, nasopharyngeal swabs, and other biopsies are not included.

ECDC proposed case definition for surveillance of Zika virus infection

Definition	
Clinical criteria	<p>A person presenting with a rash, with or without fever and at least one of the following signs and symptoms:</p> <ul style="list-style-type: none"> • arthralgia or • myalgia or • non-purulent conjunctivitis/hyperaemia
Laboratory criteria	<p><u>Laboratory criteria for a probable case</u> Detection of Zika-specific IgM antibodies in serum</p> <p><u>Laboratory criteria for a confirmed case</u> At least one of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> • detection of Zika virus nucleic acid in a clinical specimen • detection of Zika virus antigen in a clinical specimen • isolation of Zika virus from a clinical specimen • detection of Zika virus specific IgM antibodies in serum sample(s) and confirmation by neutralisation test; • seroconversion or four-fold increase in the titre of Zika-specific antibodies in paired serum samples
Epidemiological criteria	<p>History of exposure in an area with transmission of Zika within two weeks prior to onset of symptoms or Sexual contact with a male confirmed case of Zika virus infection or Sexual contact with a male who had been in an area with Zika virus transmission in the past four weeks A list of Zika-affected areas is kept updated on the ECDC website (link).</p>
Classification	
Probable case	<p>A person meeting the clinical criteria and the epidemiological criteria. A person meeting the laboratory criteria for a probable case.</p>
Confirmed case	<p>A person meeting the laboratory criteria for a confirmed case.</p>



ECDC: Definizione delle priorità diagnostiche

Se la capacità diagnostica è limitata, la priorità dovrebbe essere considerata nel seguente ordine:

1. donne in gravidanza esposte:

1.1 donne in gravidanza con sospetto di malformazioni congenite del feto

1.2 donne in gravidanza con una storia di infezione da Zika durante la gravidanza

1.3 Altre donne in gravidanza

2. paziente sintomatico esposto in una zona ricettiva

3. paziente esposto che presenta sintomi neurologici

4. paziente sintomatico esposto in una zona non ricettiva





Knowledge gaps che devono essere urgentemente affrontati

- Rapida ed estesa validazione di test molecolari e sierologici disponibili sia in aree affette che non affette ma ospitanti viaggiatori di ritorno, con una particolare attenzione per le donne in gravidanza.
- Monitoraggio della diversità genomica dei ceppi circolanti di virus ZIKA per poter verificare la validità dei test molecolari disponibili.
- Sviluppo di External Quality Assessments (EQA) sia per i test molecolari che sierologici, per più tipi di campioni.
- La conoscenza della cinetica di infezione dovrebbe essere ottenuta attraverso studi prospettici, includendo donne in gravidanza, per determinare il tipo di campionamento ideale o i tempi di campionamento.
- La disponibilità di reagenti per lo sviluppo di saggi diagnostici dovrebbe essere agevolata.

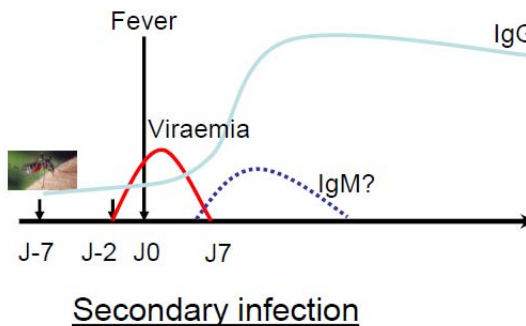
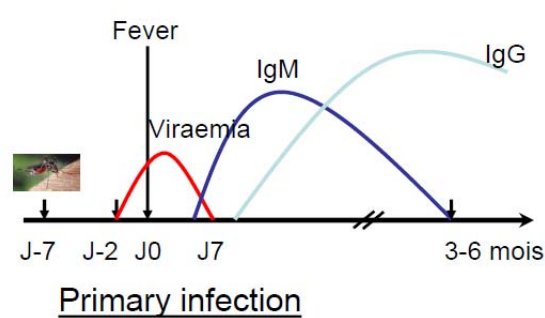




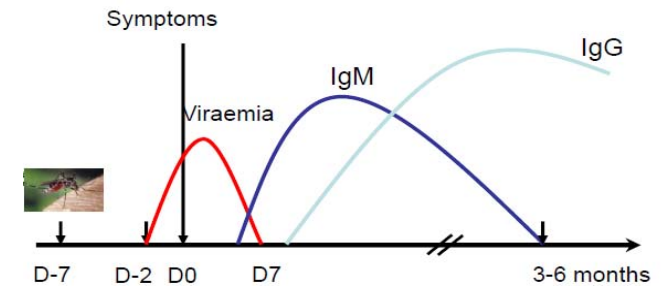
- Infezioni da Arbovirus importate in Italia: attività del Laboratorio Nazionale di Riferimento (luglio 2014-ottobre 2015)**
- Attività di laboratorio nel periodo “allerta virus Zika”**



DENGUE VIRUS



CHIKUNGUNYA VIRUS



Strategia diagnostica:

- Campioni raccolte entro 10 giorni dai sintomi: rilevamento genoma virale mediante Real time PCR e/o RT-PCR, sequenziamento ed analisi filogenetica; tecniche sierologiche: saggio IgM (ELISA) e test di neutralizzazione per placche (PRNT)
- Campioni in fase convalescente: tecniche sierologiche: saggio IgM (ELISA) e test di neutralizzazione per placche (PRNT)

Metodi utilizzati di real time PCR

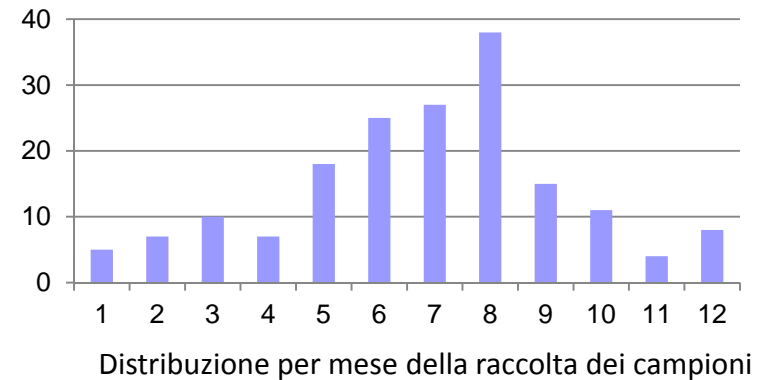
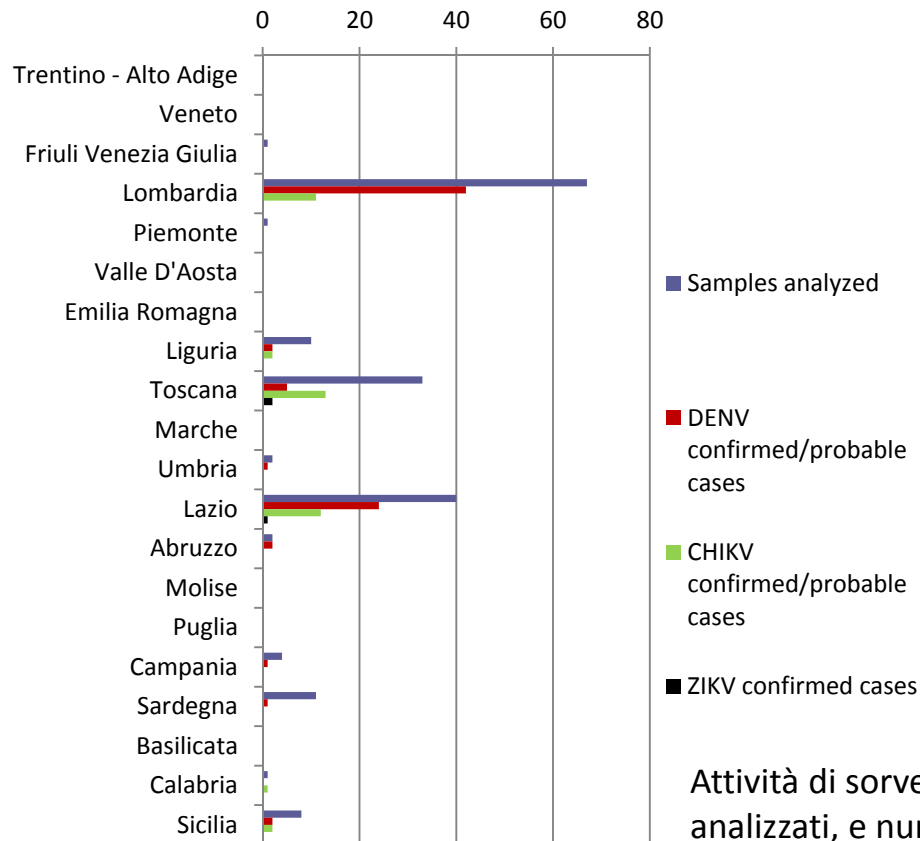
Primers and Probes	Sequence (5'-3')	Reference
DenS DenAs+ DenAs1 DenP	GGATAGACCAGAGATCCTGCTGT CATTCCATTTTCTGGCGTTC + CAATCCATCTTGCGGCGCTC FAM-CAGCATCATTCCAGGCACAG-TAMRA	Drosten C. et al., Journal of Clinical Microbiology 2002
ChikS ChikAs ChikP	TGATCCCGACTCAACCATCCT GGCAAACGCAGTGGTACTTCCT FAM-TCCGACATCATCCTCCTTGCTGGC-BHQ1	Rezza G. et al., Lancet 2007
Zvf1086 Zvr1162c ZvP_1107	CCGCTGCCCAACACAAG CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA- TAMRA	Lanciotti RS et al., Emerging Infectious Diseases 2008

Metodi utilizzati per RT-PCR + nested PCR

Primers	Sequence (5' - 3')	Reference
RT-PCR: DEUL DEUR Nested PCR: DENUL DENUR	TGGCTGGTGCACAGACAATGGTT GCTGTGTCACCCAGAATGGCCAT GATCTCAAGAAGGAGCCATGCA ATGGAACTTCCCTTCTTGAACCA	Yenchitsomanus PT et al., Asian J Trop Med Public Health 1996
RT-PCR: CHIK 10264F CHIK 11300R Nested PCR: CHIK 10564F CHIK 11081R	GGGCCTACTGCTTCTG CGACACGCATAGCACCSC CCCTTTGGCGCAGGAAGAC GACTTGTACGCGGAATTCGG	Edwards CJ et al., J Clin Virol 2007
RT-PCR: MAMD Mf4 Seminested: Mf4 Mf3	AACATGATGGGRAARAGRGARAA GGGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTT GGGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTT GARTGGATGACVACRGAAGACATGCT	Weissenbock H. et al., Emerging Infection Disease 2002

Pazienti e campioni

- Pazienti N=180 (età media 38), 50,6% maschi;
- Per 27 pazienti furono analizzati 2 campioni;
- Giorni intercorsi tra l'inizio dei sintomi ed il prelievo dei (noti per 116 pazienti): media \pm dev st 15,5 \pm 18,2, mediana 8 giorni (range 2-102 giorni).



Attività di sorveglianza nelle Regioni Italiane: numero di campioni analizzati, e numero di casi probabili e confermati di DENV/CHIKV/ZIKV.



Definizione di caso sulla base dei risultati dei nostri test diagnostici

Confermato	PCR positiva <u>e/o</u> IgM positive più PRNT positivo.
Probabile	IgM positive più PRNT border line in campioni in fase acuta*.
Possibile	IgM negative e PRNT positivo/border line, <u>o</u> IgM positive ma PRNT negativo in campioni in fase acuta.
Non confermato	IgM positive e PRNT negativo in campioni tardivi/convalescenti, <u>o</u> PRNT positivo senza un incremento nei titoli in due campioni raccolti a distanza di 15 giorni.

PRNT80 ≥10: positivo; PRNT50≥10: border line (b.l.).

* Questi casi sono stati classificati come possibili se i risultati PRNT b.l. sono stati ottenuti per diversi virus.



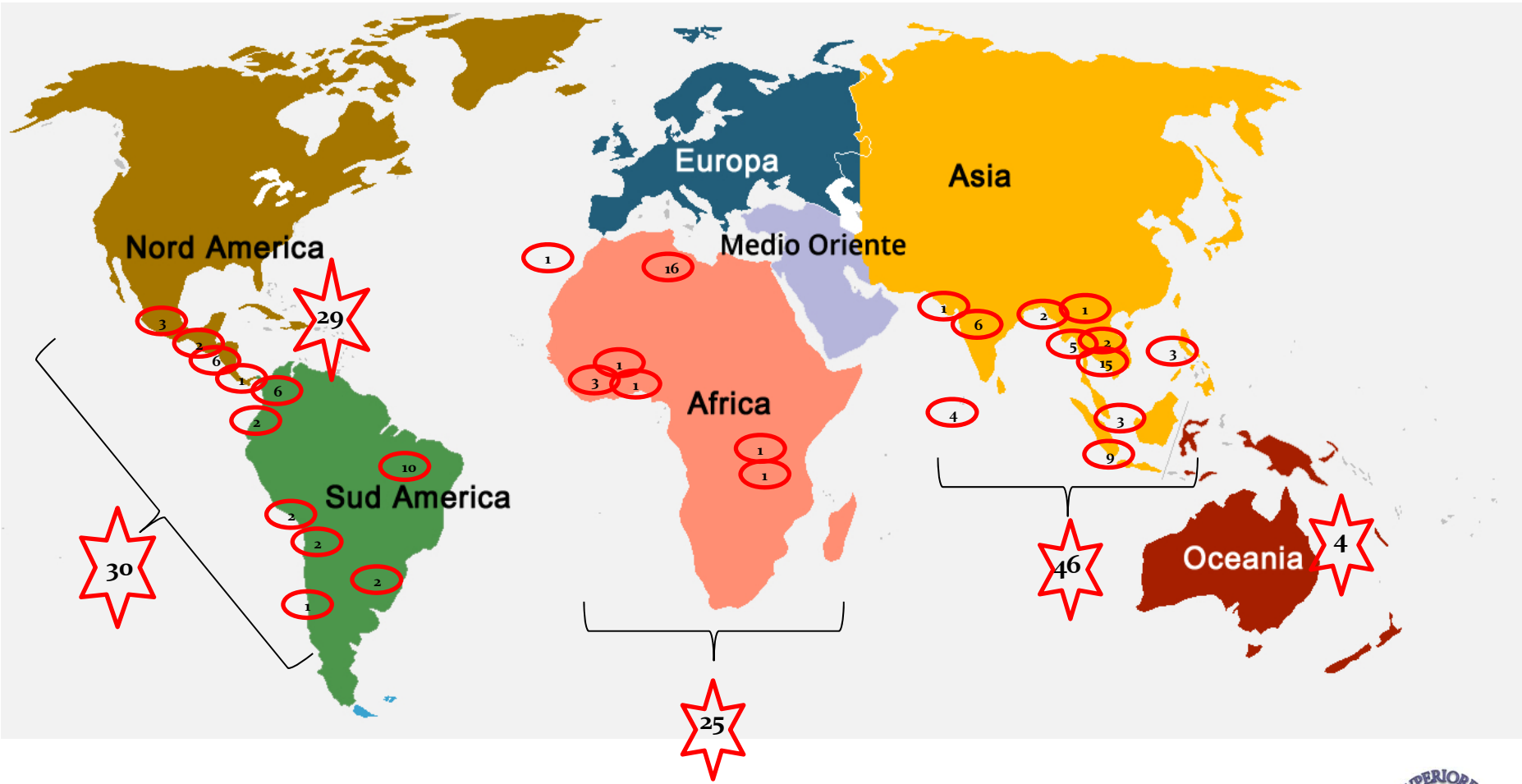
Diagnosi di DENV, CHIKV e ZIKV nel periodo da luglio 2014 a ottobre 2015

	Totale	Confermati	Probabili	Possibili	Non confermati
Diagnosi DENV	157	68	12	33	44
Diagnosi CHIKV	97	35	6	14	42
Diagnosi ZIKV	16	5*	0	2	9
Doppia diagnosi DENV/CHIKV	76: due casi di possibile co-infezione.	DENV: 18/76 (di cui 2 confermati per CHIKV ed 1 possibile per CHIKV)			
		CHIK: 20/76 (di cui 2 confermati per DENV e 6 possibili per DENV)			

* La diagnosi di uno di questi casi è stata eseguita in Germania dopo aver escluso un'infezione da DENV e CHIKV (Zammarchi 2015). Per uno di questi casi si è avuta trasmissione autoctona (probabilmente per via sessuale) (Venturi 2016).



Aree di origine dei casi importati



Casi di DENV e CHIKV da differenti aree geografiche

Asia N=46	Central and South America N=30	Carribbean Islands N=29	Africa N=25	Oceania N=4	Casi sospetti di infezione autoctona (assenza di storie di viaggi). N=6
DENV					
31/46 confermati; 6/46 probabili; 3/46 possibili.	8/21 confermati; 3/21 probabili; 2/21 possibili (di cui 1 caso confermato CHIKV e 1 caso possibile CHIKV).	7/24 confermati; 7/24 possibili (di cui 5 casi confermati/possibili CHIKV).	4/23 confermati; 7/23 possibili.	3/4 confermati.	1/5 possibili.
CHIKV					
1/20 confermati (Indonesia); 1 /20 possibili (caso confermato DENV).	9 /19 confermati (Colombia, Ecuador, El Salvador, Suriname)**; 2/19 probabili (Ecuador, Mexico); 1/19 possibili (caso possibile DENV).	14/21 confermati; 2/21 probabili (di cui 1 caso possibile DENV). 2/21 possibili (di cui 1 caso possibile DENV).	1/10 confermati; 1/10 probabili.	1/1 possibili.	3/3 esclusi.

** Casi da Dicembre 2014.

Diagnosi sierologica di infezione da virus Dengue, Chikungunya e Zika: rilevamento delle IgM

	ELISA IgM: positivi/testati	
DENV (Focus Diagnostics Dengue Virus IgM Capture, DxSelect™)	55/127	8/55 (14.5%) falsi positivi
		8/72 (11.1%) falsi negativi
CHIKV (NovaLisa® Chikungunya IgM μ-capture ELISA, NovaTec Immundiagnostica)	31 + 3b.l./86	1 b.l./86 falso positivo
		5/52 (9,6%) falsi negativi

Confronto con altri laboratori:

DENV: 13/53 (**24,5%**) dei casi sospetti di DENV arrivati al nostro laboratorio con un risultato IgM positivo sono stati classificati come non confermati dopo valutazione complessiva di tutti i risultati di laboratorio.

CHIKV: 3/27 (**11,1%**) dei casi sospetti di CHIKV arrivati al nostro laboratorio con un risultato IgM positivo sono stati classificati come non confermati dopo valutazione complessiva di tutti i risultati di laboratorio.

Complessivamente, per 94 risultati ELISA IgM per DENV e per 40 risultati per CHIKV, è stato possibile un confronto con i risultati IgM ottenuti dai laboratori di provenienza dei campioni: si sono ottenuti risultati concordanti nell' **81.9%** e **87.5%** dei casi rispettivamente per DENV e CHIKV.

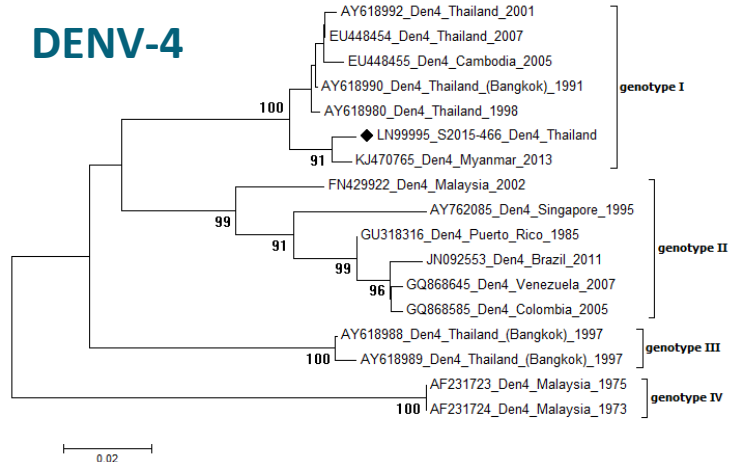
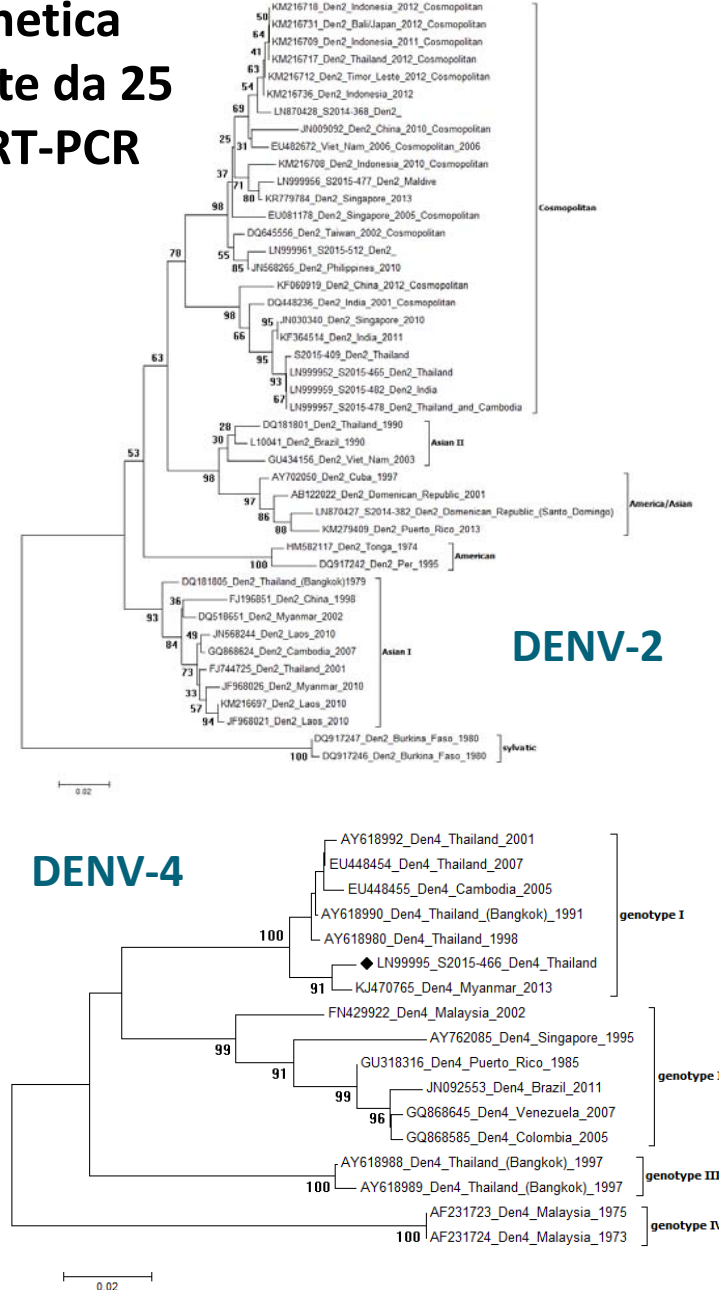
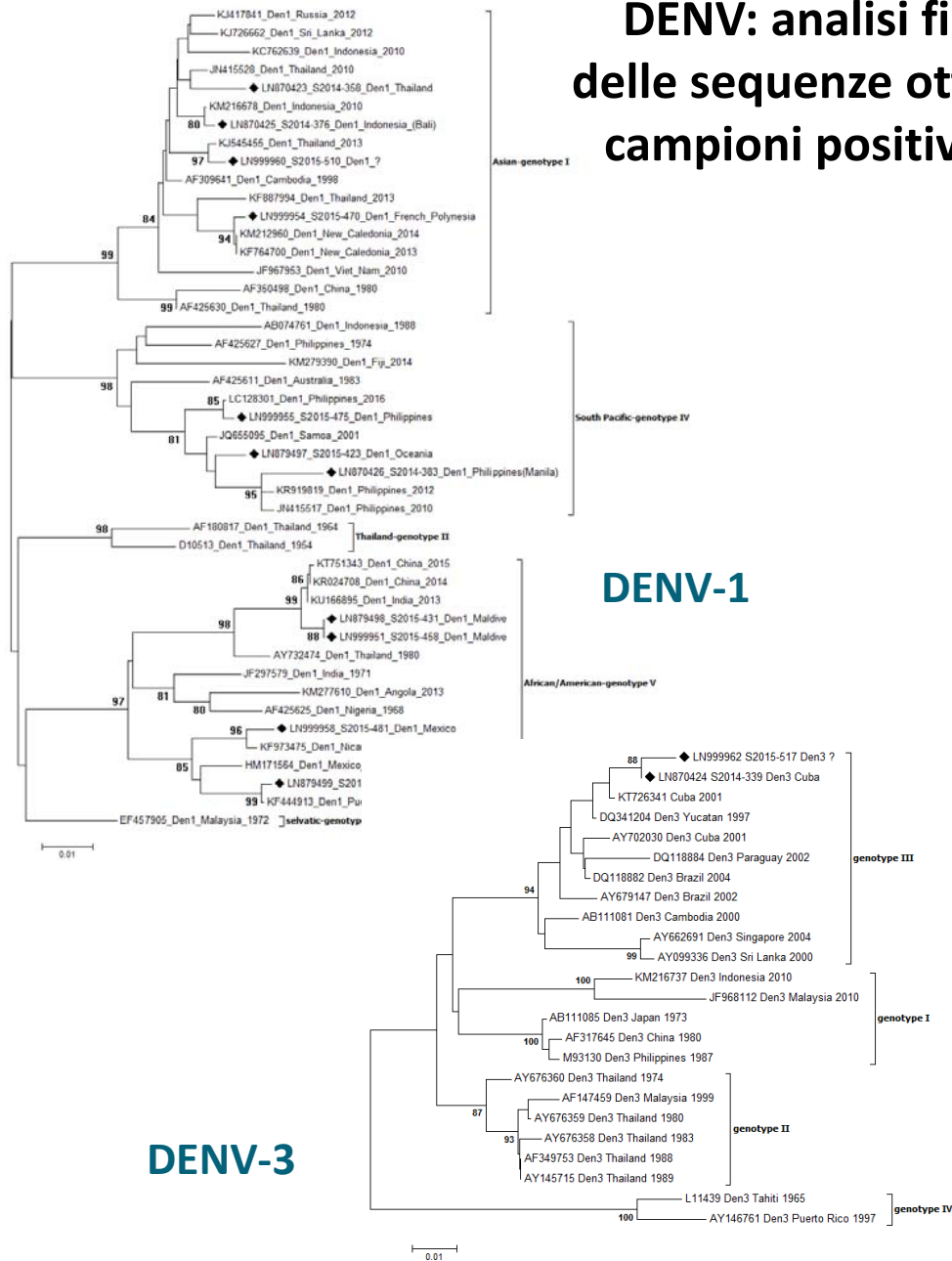


Diagnosi sierologica di infezione da virus Dengue, Chikungunya e Zika: PRNT

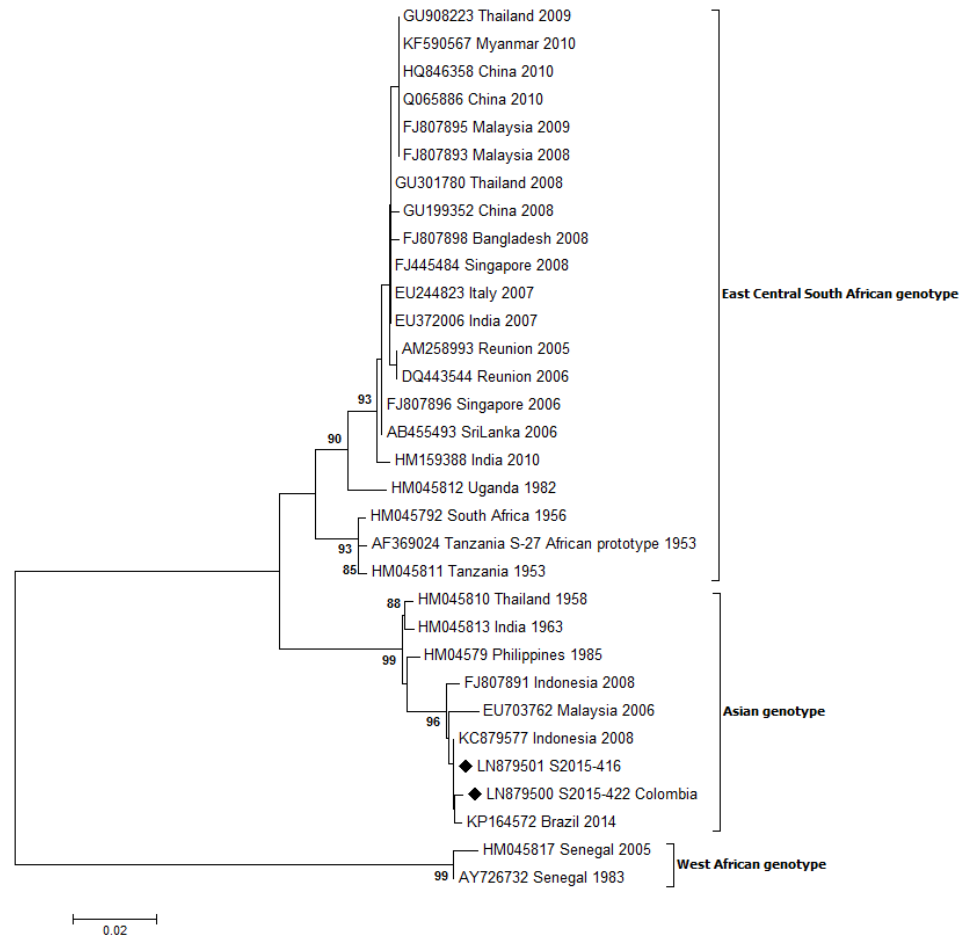
	PRNT pos/testati		PRNT b.l./testati	
DENV	79/157 (50.3%)	26/79 (32,9%): infezioni pregresse	31/157 (19,7%)	10/31 (32.3%): casi confermati
				12/31 (38.7%): casi probabili
				9/31 (29%): casi possibili
CHIKV	47/97 (48.4%)	10/47 (21,2%): infezioni pregresse	11/97 (11,3%)	1/11 (%): caso confermato
				4/11 (%): casi probabili
				6/11 (%):casi possibili
ZIKV	6/16	2/6 (%): infezioni pregresse	1/16	Caso DENV confermato



DENV: analisi filogenetica delle sequenze ottenute da 25 campioni positivi in RT-PCR



CHIKV: analisi filogenetica delle sequenze ottenute da 2 campioni positivi in RT-PCR



Diagnosi di infezione da virus ZIKA (luglio 2014 – aprile 2016): analisi preliminare

	PCR urine, positivi su testati	PCR siero, positivi su testati	PRNT, positivi su testati	PRNT, b.l. su testati	ELISA IgM, positivi su testati
Campioni analizzati: 168 sieri, 74 urine, di 136 pazienti*	2/73	1/101	20/157	15/157	11+1b.l./18
Casi confermati (n=12)	2/3	1/6	11/12	1/12 (DENV PRNT negativo)	9/9
Casi di probabile infezione pregressa (?) (n=4)	0/1	0/3	4/4 (tutti DENV PRNT positivi!)	0/4	0/3
Casi di probabile cross reattività verso DENV (n=10)	0/3	0/4	0/10	10/10 (tutti DENV PRNT positivi)	0/1

* 2014: 2 pazienti; 2015: 39; 2016: 95





Valutazione preliminare kit Euroimmune ELISA IgM per ZIKV

- Tre campioni di casi confermati per DENV (ELISA IgM e PRNT per DENV positivi): negativi
- Quattro campioni ZIKV confermati sulla base di un positività in PCR o di un aumento di titolo in PRNT in due campioni successivi di siero: positivi
- Un campione di un paziente ZIKV confermato in PRNT, con un risultato positivo per IgM in un saggio IF: positivo
- Due campioni con diagnosi di infezione recente da ZIKV sulla base di dati clinici ed epidemiologici, positivi in PRNT per ZIKV: positivi

Preparazione di Riferimento per saggi NAT

ZIKA RNA Lotto ISS0416

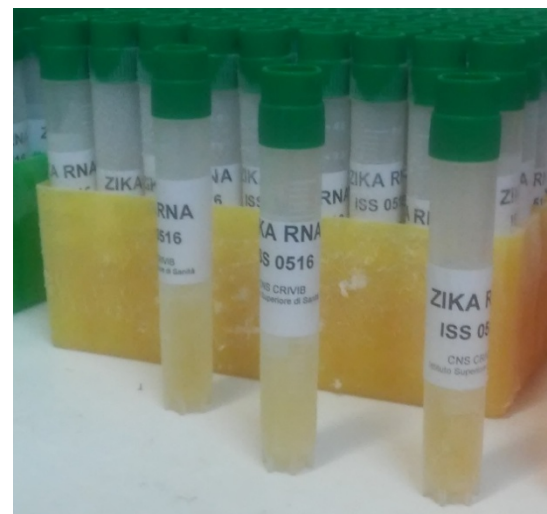
Virus cresciuto su cellule vero (77.000 pfu/mL)
Sopranatante trattato al calore : 2 h + 2h a 56°C
Virus inattivato : assenza di crescita su cellule vero

Diluizione di $1:10^5$ in plasma.

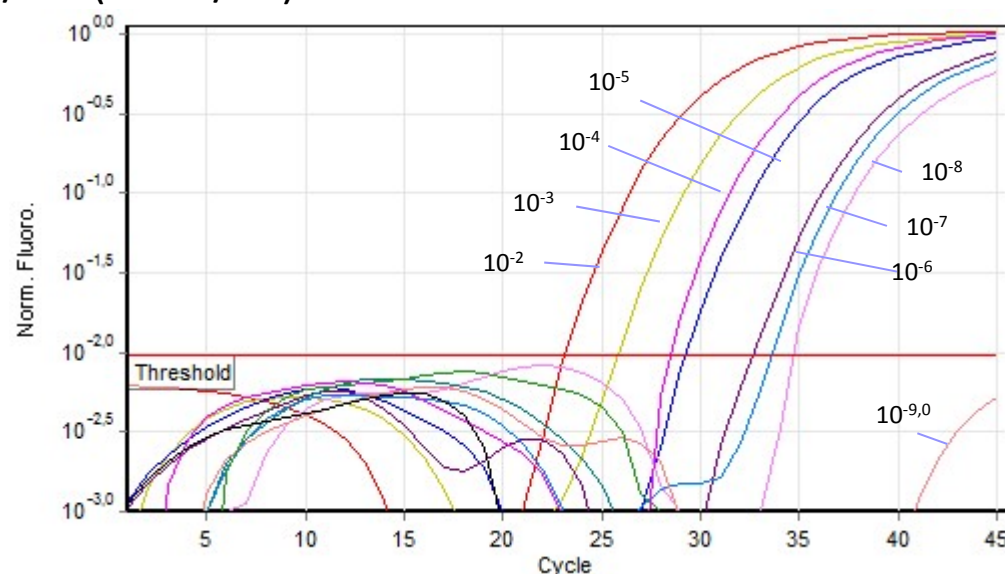
500 aliquote da 1,5 mL ciascuna

Conservazione -70°C

Titolo Provvisorio: circa 10.000 copie/mL (UPCR/ml)



RealStar[®] Zika Virus RT-PCR Kit
Altona Diagnostics





**STUDIO INTERLABORATORIO PER LA VALUTAZIONE DEI SAGGI NAT E PER
ASSEGNARE UN “TITOLO DI CONSENSO” ALLA PREPARAZIONE ISS0516**

Reclutamento Laboratori – entro aprile

I° Fase dello Studio: entro maggio

II° Fase dello Studio: entro giugno

Referente Studio

Dott. Giulio Pisani, CRIVIB, ISS

Dott.ssa Giulietta Venturi, MIPI, ISS



Ringraziamenti

Laboratori Regionali di Riferimento e Reparti di Malattie Infettive.

ISS

Claudia Fortuna

Maria Elena Remoli

Eleonora Benedetti

Cristiano Fiorentini

Claudio Argentini

Alessia Caratelli

Veronica Bizzotti

Daniela Casale

Giulio Pisani

Roberto Romi

Marco Di Luca

Luciano Toma

Francesco Severini

Daniela Boccolini

Caterina Rizzo

Antonino Bella

Patrizio Pezzotti

**Grazie per
l'attenzione!**

