

**Stima della sieroprevalenza di West – Nile Virus (WNV) in donatori della provincia di Rovigo****Introduzione**

La febbre West Nile (West Nile Fever) è una malattia provocata dal virus West Nile (West Nile Virus, WNV), un virus della famiglia dei Flaviviridae isolato per la prima volta nel 1937 in Uganda, appunto nel distretto West Nile (da cui prende il nome). I serbatoi del virus sono gli uccelli selvatici e le zanzare (più frequentemente del tipo Culex), le cui punture sono il principale mezzo di trasmissione all'uomo. Altri mezzi di infezione documentati, anche se molto più rari, sono trapianti di organi, trasfusioni di sangue e la trasmissione madre-feto in gravidanza. Salvo questi casi, la febbre West Nile non si trasmette da persona a persona tramite il contatto con le persone infette. Il virus infetta anche altri mammiferi, soprattutto equini, ma in alcuni casi anche cani, gatti, conigli e altri.

La maggior parte delle persone infette non mostra alcun sintomo. Fra i casi sintomatici, circa il 20% presenta sintomi leggeri: febbre, mal di testa, nausea, vomito, linfonodi ingrossati, sfoghi cutanei. Questi sintomi possono durare pochi giorni, in rari casi qualche settimana, e possono variare molto a seconda dell'età della persona. Nei bambini è più frequente una febbre leggera, nei giovani la sintomatologia è caratterizzata da febbre mediamente alta, arrossamento degli occhi, mal di testa e dolori muscolari. Negli anziani e nelle persone debilitate, invece, la sintomatologia può essere più grave.

I sintomi più gravi si presentano in media in meno dell'1% delle persone infette (1 persona su 150), e comprendono febbre alta, forti mal di testa, debolezza muscolare, disorientamento, tremori, disturbi alla vista, torpore, convulsioni, fino alla paralisi e al coma. Alcuni effetti neurologici possono essere permanenti. Nei casi più gravi (circa 1 su mille) il virus può causare un'encefalite letale.

Nel 1999, WNV ha fatto la sua comparsa negli USA a New York City (North Queens) e nell'area metropolitana circostante (probabilmente attraverso uccelli importati illegalmente da Israele dove è endemico nelle oche e nelle cicogne) e ha causato una epidemia di meningoencefalite in 62 persone, in gran parte anziani, causando 7 decessi. L'epidemia è stata preceduta da un allarmante e apparentemente inspiegabile moria di uccelli selvatici in ambiente urbano in particolare a Central Park in N.Y.C.

La malattia, ha avuto in quasi tutti i soggetti con sindrome clinica manifesta un decorso grave, simile a quello di altre aree (Romania e Russia) dove il livello degli anticorpi nella popolazione è molto basso.

Da quel momento il virus si è rapidamente diffuso sia in Nord-America, dove ha determinato tra il 1999 e il 2007 un totale di oltre 30.000 casi di malattia, comprendenti circa 25.000 casi di malattia da WNV, 11.000 casi di encefalite e oltre 800 decessi sia in Canada, nell'area Caraibica e in diversi Paesi del Sud-America. Sulla base del rapporto fra malattia e infezioni asintomatiche il CDC ha stimato che negli USA oltre un milione di persone sia stato infettato da WNV nello spazio di 4 anni. L'infezione è stata documentata anche attraverso trasfusioni di sangue in almeno 23 casi.

In Italia il primo focolaio di infezioni WNV negli equini è stato segnalato nel 1998 in Toscana, nella provincia di Firenze. Le successive attività di sorveglianza hanno individuato quattro persone sieropositive che non presentavano alcun sintomo.

Dal 2001, un sistema di sorveglianza veterinaria nazionale su uccelli e equini, ha individuato alcuni sporadici casi di sieropositività, mai accompagnati da casi umani di malattia, almeno fino al 2008. Nel mese di agosto 2008, un focolaio di WNV in equini è stato individuato in zone che circondano il delta del fiume Po, che coinvolge le regioni Emilia-Romagna (province di Bologna e Ferrara) e il Veneto (provincia di Rovigo).

In entrambe le regioni è stata subito avviata una sorveglianza umana sia attiva (lavoratori o residenti nei pressi degli allevamenti infetti) che passiva (ricoverati per meningoencefalite ad etiologia sconosciuta).

Nel settembre 2008, il primo caso umano di West Nile neuroinvasiva malattia in Italia è stato segnalato in Emilia-Romagna (provincia di Bologna) : una donna di 83 anni, residente in una zona rurale. Nel mese di ottobre altri due casi di malattia neuro invasiva sono stati segnalati nella stessa regione (provincia di Ferrara).

Nel mese di ottobre 2008, la sorveglianza umana passiva nel Veneto ha individuato e confermato la positività al virus WN in una donna di 81 anni residente della provincia di Rovigo, ricoverata in ospedale con meningoencefalite.

La sorveglianza attiva ha invece rilevato quattro infezioni da WNV asintomatiche.

Nel novembre 2008, una donna di 48 anni residente della provincia di Rovigo si è presentata spontaneamente presso il Centro per malattie tropicali a Negrar (Verona) segnalando un episodio di febbre risalente a tre mesi prima, accompagnata da rash cutaneo, adenopatia e forte mal di testa che ancora non si erano risolti. Anche questo caso è stato confermato come positivo al virus WN

Come da protocollo, dopo il primo caso di malattia neuro invasiva sono iniziati i controlli sulle sacche di sangue di donatori che hanno soggiornato almeno una notte nella zona considerata a rischio. Nel Veneto sono state controllate con il test NAT circa 3.500 sacche di sangue risultate tutte negative.

In Emilia Romagna è stata fatta la rilevazione di IGG e IGM su 7.600 donazioni: 55 sacche sono risultate positive (prevalenza 0,72%) e si è valutata una stima del rischio di trasmissione infetta con valori prossimi a 1 su 100.000.

Obiettivi

1. Valutare la sieroprevalenza di anticorpi (sia IgG che IgM) al WNV in donatori di sangue che effettueranno donazioni nei centri trasfusionali della provincia di Rovigo nel periodo 15/7/2009 – 15/11/2009
2. In tutti i pazienti con IgM positive, valutare l'eventuale presenza del virus da aliquote di plasma, conservate presso il Servizio Immunotrasfusionale, mediante RT-PCR e isolamento in coltura

Disegno dello studio

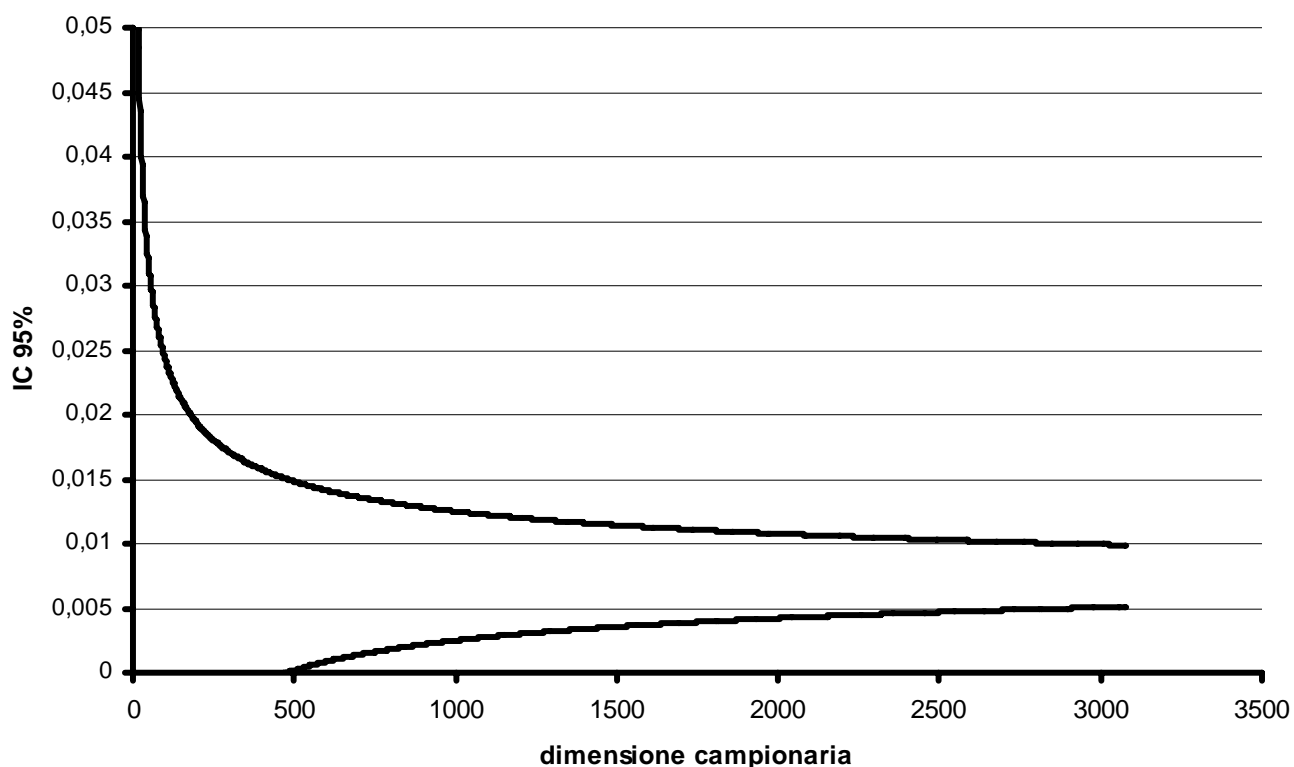
Campione casuale di "sieri" di donatori che effettueranno una donazione di sangue nel periodo luglio – novembre 2009 nella provincia di Rovigo

Dimensione campionaria

Utilizzando lo studio dell'Emilia Romagna, si è assunta una prevalenza attesa di 7,5 per mille donazioni. La figura 1 mostra l'intervallo di confidenza al 95% della prevalenza di anticorpi (IgG e IgM) al variare del numero di sacche analizzate.

Si può osservare che valutando 2.550 sacche nel periodo di studio la stima ha una variazione attesa di circa $\pm 2,5$ per mille.

Fig. 1

**Metodi per l'identificazione degli anticorpi a WNV**

Le analisi sierologiche saranno effettuate presso il laboratorio di riferimento regionale dell'Azienda Ospedaliera di Padova (Centro Unico). Per tutti i sieri campionati sarà effettuato il test in immunoenzimatica per l'identificazione di IgG ed IgM. Su tutti i casi positivi (IgG o IgM) sarà effettuato un secondo test con metodo di I.F. indiretta e test di neutralizzazione per la conferma. Inoltre, nei casi con IgM positive sarà eseguita ricerca diretta del virus mediante RT-PCR ed isolamento in coltura.

L'indagine dovrà essere effettuata senza identificazione dei donatori, se nel periodo sono assenti segnalazioni di casi di neuro encefalite WNV correlata. Diversamente scatta il criterio adottato dal CNS per l'autunno 2008 nell'area di Rovigo.

I donatori daranno nel consenso informato complessivo l'assenso all'esecuzione anche del test sierologico per WNV finalizzato allo studio della sieroprevalenza, secondo quanto previsto dalle normative vigenti (DM 3/03/05 art. 16)

Modalità di campionamento

Il periodo in analisi conta 17 settimane: ogni settimana si dovranno raccogliere 150 sieri suddivisi in due invii di 75 campioni ciascuno in modo da ottenere la numerosità desiderata di 2.550 sieri (pari a circa un terzo delle donazioni attese nel periodo). I campioni da inviare saranno selezionati in modo sistematico come descritto nelle procedure.

Procedure

Il protocollo è stabilito dalla Regione del Veneto; investe la provincia di Rovigo a seguito del riscontro di zoo-reattività per WNV e del riscontro di un caso di contagio umano con quadro neurologico nel corso del 2008.

Lo studio di siero prevalenza è effettuato su un campione di 2.550 donazioni per un periodo di 17 settimane a partire dal mese di luglio.

La provincia di Rovigo è suddivisa nei tre ambiti di popolazione/donatori: Rovigo fornirà 1.530 campioni di donatori che effettuano donazioni di sangue intero; Trecenta, 510; Adria, 510. La numerosità è stata calcolata in modo proporzionale al numero di donazioni.

- 1) **Campionamento:** i donatori di sangue si presentano con accesso casuale; pertanto, ogni giornata dal lunedì al sabato, i primi 15 donatori a Rovigo, i primi 5 a Trecenta e i primi 5 ad Adria saranno arruolati allo studio. La scelta di questo tipo di selezione è dovuta a motivi organizzativi: non abbiamo motivo di pensare che questo possa indurre una distorsione. A fine studio verrà comunque valutata l'omogeneità del campione scelto mediante il confronto con l'intera popolazione di donatori.
- 2) **Consenso:** ai donatori individuati, dopo una sintetica spiegazione, secondo un testo scritto previsto dal Direttore del DIMT di Rovigo, è richiesto e raccolto il consenso "*al prelievo aggiuntivo di un campione di sangue per sierologia immunoenzimatica e di uno per NAT per lo studio regionale per la sieroprevalenza del virus West Nile*"; il modulo di consenso è un foglio aggiuntivo prestampato, identificato con l'etichetta nominativa del donatore e della presentazione; il consenso resta agli atti del Servizio trasfusionale, allegato al corrente modulo di selezione e consenso.
- 3) **Raccolta dei campioni:** i campioni non sono caricati in EmoNet e sono etichettati con etichette prestampate con la seguente dicitura R01ggmm → R15ggmm; A01ggmm → A05ggmm e T01ggmm → T05ggmm, rispettivamente a Rovigo, Adria e Trecenta; una copia dell'etichetta è adesa al modulo di consenso. Il set di etichette è predisposto dal SIT in quattro serie: due presso il punto raccolta (provetta e modulo) e due presso il Servizio trasfusionale per l'etichettatura finale dei campioni (uno da inviare e uno da congelare a -80°C). La stampa delle 5 serie di etichette è eseguita dal Servizio trasfusionale per le 17 settimane. Le provette sono una per sierologia immunoenzimatica (6 mL, senza anticoagulante) e una per NAT (6 mL, K₂EDTA gel).
- 4) **Preparazione campioni:** i 25 campioni giornalieri sono trattati presso il Servizio trasfusionale di Rovigo mediante centrifugazione con trasferimento del plasma in provette rietichettate con le stesse serie numeriche di tracciabilità; il campione per sierologia, pari a 2,5 mL di siero, va conservato a -20°C ordinato in rack fino al momento dell'invio; il campione per NAT (2,5 mL) resta congelato a -80°C ordinato in rack presso il Servizio trasfusionale.
- 5) **Spedizione campioni sierologia:** la spedizione al Laboratorio di riferimento regionale dell'Università di Padova va effettuata due volte alla settimana al lunedì (campioni di giov, ven e sab) e al giovedì (campioni di lun mar e mer), al raggiungimento dei 75 campioni. La

spedizione è attuata secondo gli accordi con il citato Laboratorio e secondo le modalità di conservazione termica concordata; la lista di accompagnamento dei campioni con le relative sequenze è giornaliera, ed essendo anonima, è prestampata, con sola spunta dei campioni ed è datata e siglata dal tecnico che provvede alla separazione/conservazione e dal tecnico che provvede all'invio.

- 6) Conservazione campioni NAT: i campioni per eventuale NAT restano a disposizione presso il Servizio trasfusionale fino alla fine dello studio di siero prevalenza, con regolare tracciabilità di corretta conservazione in ambiente termico controllato a - 80°C. L'utilizzo dei campioni NAT stoccati permette l'eventuale immediata attivazione della procedura del CNS in caso di insorgenza di casi umani con sintomatologia neurologica di WNV.
- 7) Responsabilità del procedimento: il Direttore del DIMT di Rovigo provvede in via diretta a comunicare al personale strettamente addetto (raccolta e trattamento dei campioni) il presente protocollo, dando evidenza dell'applicazione e fornendo comunicazione mensile della sua applicazione al CRAT, e delle eventuali NC rilevate. Il Direttore del DIMT di Rovigo si impegna al richiamo della segnalazione, da parte del citato Laboratorio, dei donatori con eventuale reattività sierologica IgM e IgG WNV per la raccolta di dati anamnestici pertinenti.

Nel caso ci siano positività per la conferma si dovranno attendere altri 20 giorni. Nel sito regionale verranno riportati contestualmente tutti gli aggiornamenti.

Se la prevalenza ottenuta dovesse risultare maggiore del livello superiore dell'intervallo di confidenza riportato in fig.1 si procederà, di concerto con il Centro Nazionale Sangue, ad una attenta valutazione sull'opportunità di seguire nuove procedure compreso eventualmente l'utilizzo del test NAT.

Costi previsti

Costo test = costo unitario € 42 X test n. 2550 = costo totale previsto € 107.100,00

nel 10% dei casi si prevede l'utilizzo del test di immunofluorescenza

test di immunofluorescenza = costo unitario € 20 X test n. 255 =

costo totale € 5.100,00

COSTO TOTALE TEST = € 107.100,00+€ 5.100,00= €112.200,00

Costo esecuzione prelievi e test = due borse di studio € 13.500,00

Collaborazione per attività di prelievo e coordinamento centro
trasfusionale € 5.000,00

Costo per ulteriori collaborazioni = coordinamento del progetto € 5.000,00

disegno dello studio, monitoraggio sviluppo ed elaborazioni € 10.000,00

Missioni e Riunioni = € 1.000,00

Attività di gestione amministrativa = € 2.000,00

COSTO TOTALE COORDINAMENTO E GESTIONE PROGETTO = 36.500,00

TOTALE = € 112.200,00 + € 36.500,00 = € 148.700,00

Istituzione del Gruppo di Lavoro

Il Gruppo di Lavoro ha il compito di coordinare, insieme al Servizio Sanità Pubblica e Screening della Direzione Regionale Prevenzione, il Progetto "Stima della sieroprevalenza di West – Nile Virus (WNV) in donatori della provincia di Rovigo".

Il Gruppo di Lavoro suddetto è così composto:

Giovanna Frison	Dirigente Direzione Regionale Prevenzione
Francesca Russo	Responsabile del Servizio Sanità Pubblica e Screening – Direzione Regionale Prevenzione
Cinzia Piovesan	Funzionario del Servizio Sanità Pubblica e Screening in distacco dall'Azienda Ulss n. 10
Francesco Pietrobon	Dirigente Direzione Regionale Servizi Sanitari
Antonio Breda	Coordinatore responsabile C.R.A.T. (Coordinamento Regionale per le Attività Trasfusionali).
Rocco Potenza	Direttore Dipartimento Trasfusionale – Azienda Ulss n. 18 Rovigo
Giorgio Palù	Responsabile del Centro Unico Regionale di Genotipizzazione e Responsabile dell'U.O.C. di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova.
Riccardo Cusinato	Responsabile Settore Virologico presso l'U.O.C. di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova.
Margherita Cattai	Responsabile Settore Sierologico presso l'U.O.C. di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova.
Luisa Barzon	Responsabile Settore Molecolare presso l'U.O.C. di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova.
Mario Saugo	Responsabile del Servizio Epidemiologico dell'Azienda Ulss n. 4
Giovanni Rezza	Direttore del Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità
Patrizio Pezzotti	Dirigente a staff presso area direzione scientifica – Agenzia di Sanità pubblica della Regione Lazio

Bibliografia

<http://www.health.gov.sk.ca/west-nile-seroprevalence>

http://www.health.gov.on.ca/english/public/pub/ministry_reports/wnv_rep_2003/executive_summary_110703.pdf

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118690624/PDFSTART>