

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

---

Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche, Cliniche e Sperimentali

Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità

Corso di Dottorato in "Epidemiologia, Ambiente e Sanità pubblica"

XXXII Ciclo

Settore Scientifico Disciplinare MED/42



## ORIGINE E DISPERSIONE DI WNV-2 IN ITALIA DAL 2011 AL 2018: RICOSTRUZIONE FILOGENETICA E FILOGEOGRAFICA

Dottoranda:

Carla **VEO**

Matricola: R11594

TUTOR:

Prof. Gianguglielmo **ZEHENDER**

COORDINATORE DEL DOTTORATO:

Prof. Carlo **LA VECCHIA**

Anno accademico: 2018-2019

**Ai** miei nonni, esempio di amore autentico  
ai miei genitori, porto sicuro  
a mia sorella, amica per la vita  
ai miei nipoti, che rendono il Mondo più luminoso.

**"It always seems impossible until it's done."**

Nelson Mandela

# Riassunto

La presente tesi di dottorato, sviluppata in collaborazione con il Policlinico San Matteo di Pavia e l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, è incentrata sulla epidemiologia del virus di West Nile (WNV), un patogeno emergente che rappresenta il Flavivirus più diffuso a livello globale, essendo presente in tutti i continenti, con la sola esclusione dell'Antartide.

WNV rappresenta oggi un importante problema di salute pubblica, potendo causare patologie neurologiche potenzialmente letali soprattutto nelle fasce più fragili della popolazione, come gli anziani e i malati cronici.

Ad oggi sono descritti 9 *lineages* virali, di cui l'1 e il 2 rappresentano i principali patogeni per l'uomo.

WNV-1 è diffuso in tutto il Mondo eccetto l'Antartide; WNV-2, isolato inizialmente in Africa Sub-Sahariana e in Madagascar, dal 2011 è comparso in Italia e attualmente sembrerebbe essere l'unico *lineage* circolante nel nostro territorio.

In accordo con i dati epidemiologici riportati dall'ECDC, 1832 casi umani di malattia neuro-invasiva sono stati registrati nel periodo 2011-2017 nei Paesi membri dell'Unione Europea e nelle Nazioni limitrofe. Nel 2018, la trasmissione del virus in Italia e in diversi Paesi europei è iniziata precocemente e ha causato in una sola stagione un numero di casi nell'uomo pari a quelli che si sono verificati nei 7 anni precedenti. Solo nel nostro Paese, da Giugno 2018 sono stati segnalati 577 casi umani confermati di infezione, di cui 230 si sono manifestati nella forma neuro-invasiva e 42 sono deceduti. Inoltre, è stata evidenziata una elevata circolazione nelle zanzare e negli uccelli, che rappresentano rispettivamente il vettore e il serbatoio del virus.

Non essendo disponibile attualmente alcun vaccino per l'uso nell'uomo, di fondamentale importanza risultano le attività di sorveglianza di questa importante arbovirosi, istituita e regolamentata dal "Piano Nazionale integrato di sorveglianza e risposta ai virus West Nile e Usutu - 2019".

E' in questo contesto che si inserisce il presente lavoro, finalizzato alla ricostruzione della storia epidemiologica del virus attraverso l'utilizzo di approcci bioinformatici e filogenetici avanzati.

Nel corso di questi tre anni di attività di ricerca sono stati collezionati i ceppi di West Nile circolanti in Italia nelle stagioni estivo-autunnali 2013-2018; dopo una messa a punto dei protocolli di amplificazione dell'intero genoma virale, questi ceppi sono stati

caratterizzati tramite tecnologie di Next Generation Sequencing (NGS). Le sequenze ottenute sono state analizzate alla ricerca di mutanti importanti da un punto di vista epidemiologico o patogenetico, ed è stato condotto uno studio di evoluzione molecolare del genoma virale e delle forze che ne guidano l'evoluzione, in relazione allo spazio e al tempo.

Attraverso l'applicazione di modelli filogenetici il nostro gruppo di ricerca ha cercato di ricostruire la storia di WNV-2 dal momento del suo primo isolamento ad oggi, utilizzando i genomi *home-made* e quelli depositati in banche dati pubbliche alla data di inizio dello studio, corredati di informazioni relative all'anno e al luogo di isolamento.

L'utilizzo di un approccio filogeografico ci ha consentito, unicamente sulla base della conoscenza del luogo di isolamento delle sequenze incluse nell'analisi, di ricostruire la località più probabile dei nodi interni del nostro albero, e di stimare la diffusione geografica del virus, in scala di tempo reale.

Allo scopo di studiare le dinamiche di propagazione virale sono stati anche utilizzati modelli filo-epidemiologici che permettono di stimare importanti parametri, quali il numero riproduttivo effettivo ( $R_e$ ) e i suoi cambiamenti nel tempo.

Interessanti risultati, pubblicati recentemente dal nostro gruppo, sono stati ottenuti sulla circolazione di WNV-2 nel nostro Paese. La ricostruzione filogenetica ha confermato l'ingresso del virus in Italia nel 2008 e ha evidenziato la contemporanea circolazione di due varianti, una delle quali sembrerebbe essersi estinta nel 2013/2014.

Inoltre, l'osservazione della esistenza di differenti gruppi significativi all'interno della variante ancora circolante nel 2018, ha suggerito la presenza di ceppi endemici e supporta l'ipotesi che il virus endemico sia mantenuto tra una stagione estiva e l'altra attraverso diversi possibili meccanismi di "*overwintering*".

I metodi utilizzati di filodinamica e filogeografia sono risultati particolarmente adatti alla ricostruzione della storia di infezioni emergenti, come l'arbovirosi da West Nile, potendo fornire informazioni utili alla sorveglianza.

Pertanto, ci proponiamo in futuro, al fine di comprendere al meglio l'origine e le modalità di diffusione del virus, di migliorare la qualità dei dati epidemiologici disponibili, attraverso l'implementazione di metodi molecolari, per una più precoce individuazione della circolazione virale, e lo sviluppo di una rete di competenze e di collaborazioni con figure professionali diverse per fare chiarezza sul complesso ciclo epidemiologico del virus.

## Indice

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Il virus di West Nile</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Classificazione.....	2
1.1.2 Struttura del genoma.....	5
1.1.3 Morfologia del virione e composizione .....	6
1.1.4 Ciclo vitale .....	7
<b>1.2 Lineages</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3 Distribuzione geografica</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4 Epidemiologia</b> .....	<b>16</b>
1.4.1 WNV in Europa.....	16
1.4.2 WNV in Italia .....	19
<b>1.5 Modalita' di trasmissione e patogenesi della infezione</b> .....	<b>20</b>
<b>1.6 Clinica della infezione</b> .....	<b>23</b>
<b>1.7 Prevenzione</b> .....	<b>24</b>
1.7.1 Immunoprofilassi.....	24
1.7.1.1 Immunoprofilassi nei cavalli.....	24
1.7.1.2 Immunoprofilassi negli uccelli.....	26
1.7.1.3 Immunoprofilassi nell'uomo.....	28
1.7.2 Profilassi ambientale .....	32
1.7.3 Sorveglianza epidemiologica.....	33
1.7.4 Lotta al vettore.....	35
<b>1.8 Diagnosi di infezione da WNV</b> .....	<b>36</b>
<b>1.9 Trattamento</b> .....	<b>43</b>
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	<b>46</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1 Popolazione in studio</b> .....	<b>50</b>
<b>3.2 Metodi</b> .....	<b>56</b>
3.2.1 Isolamento virale .....	56
3.2.2 Estrazione di RNA virale da materiale biologico .....	56
3.2.3 Real-Time PCR .....	58
3.2.4 Retrotrascrizione.....	59
3.2.5 Amplificazione del genoma completo .....	60
3.2.6 Retrotrascrizione con FR26RV-N .....	62
3.2.7 Amplificazione del genoma completo con FR20RV .....	63
3.2.8 Rilevamento dei prodotti di PCR.....	64

3.2.9 Purificazione dei prodotti di PCR.....	65
3.2.10 Quantificazione del DNA con QBIT .....	66
3.2.11 Quantificazione del DNA con lettore di piastre TECAN .....	66
3.2.12 Sequenziamento del DNA con Next Generation Sequencing (NGS) .....	67
3.2.13 Analisi dei dati di sequenza .....	76
3.2.13.1 Preparazione dei dataset per l'analisi filogenetica.....	76
3.2.13.2 Studio dei ceppi ricombinanti.....	77
3.2.13.3 Stima delle distanze genetiche.....	78
3.2.13.4 Analisi Bayesiana: filogenesi e filogeografia.....	78
3.2.13.5 Analisi Filodinamica e stima del tasso riproduttivo di base, R0.....	82
3.2.13.6 Analisi della pressione selettiva.....	84
<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>86</b>
<b>4.1 Caratterizzazione molecolare con sequenziamento NGS.....</b>	<b>87</b>
<b>4.2 Caratterizzazione molecolare dei principali <i>lineages</i> di WNV-2 tramite un protocollo di RT-PCR .....</b>	<b>90</b>
<b>4.3 Analisi filogenetica degli isolati Italiani.....</b>	<b>92</b>
<b>4.4 Distanze genetiche.....</b>	<b>96</b>
<b>4.5 Analisi della pressione selettiva .....</b>	<b>104</b>
<b>4.6 Analisi filogeografica .....</b>	<b>105</b>
4.6.1 Filogeografia discreta .....	105
4.6.2 Filogeografia continua.....	106
<b>4.7 Filodinamica .....</b>	<b>108</b>
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>110</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>116</b>

# **1. INTRODUZIONE**

## 1.1 Il virus di West Nile

---

### 1.1.1 Classificazione

Gli arbovirus sono un gruppo di virus che vengono trasmessi da artropodi e causano malattia negli esseri umani e negli animali. Pertanto, il verificarsi di malattia si basa sulla presenza del virus, di ospiti suscettibili e di vettori competenti.

Le malattie causate da arbovirus sono state segnalate per secoli, ma negli ultimi anni la notifica di focolai è aumentata in maniera drammatica. La crescita della popolazione umana, la deforestazione, l'urbanizzazione e il movimento di persone, animali e vettori hanno contribuito alla diffusione di questi virus.

Alcuni arbovirus per lungo tempo trascurati, sono emersi negli ultimi decenni come importanti minacce per la salute pubblica. Si pensi al virus Zika (ZIKV) in America meridionale e centrale, al virus della febbre gialla (YFV) in Brasile e al virus del Nilo occidentale (WNV) di *lineage 2* in Europa del Sud e dell'Est.

Al giorno d'oggi gli arbovirus presentano una distribuzione mondiale, essendo diffusi in tutti i continenti ad eccezione dell'Antartide. Tuttavia, ogni arbovirus presenta generalmente una distribuzione focale, possedendo requisiti specifici in relazione agli ospiti vertebrati, ai vettori e ai fattori ecologici necessari per il mantenimento del ciclo di trasmissione.

Gli arbovirus che vengono trasmessi ai vertebrati tramite zanzare ematofaghe competenti (*Diptera: Culicidae*) prendono il nome di Mobovirus. Le zanzare competenti sono quelle in grado di acquisire prima il virus attraverso l'alimentazione su un ospite viremico, quindi replicarlo ed infine trasmetterlo con la saliva a un nuovo ospite attraverso un successivo pasto di sangue.

I Mobovirus che infettano gli esseri umani appartengono a quattro famiglie: *Flaviviridae* (genere *Flavivirus*), *Togaviridae* (genere *Alphavirus*), *Peribunyaviridae* (genere *Orthobunyavirus*) e *Phenuiviridae* (genere *Phlebovirus*).

I membri della famiglia *Flaviviridae* sono virus a RNA a singolo filamento con polarità positiva e un genoma di dimensioni variabili fra 9,5 e 12,5 kb.

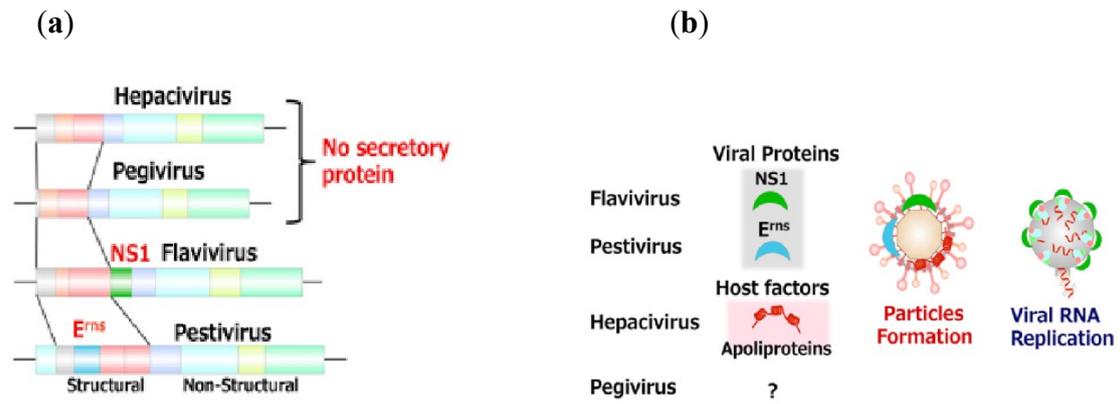
Alla famiglia *Flaviviridae* appartengono 4 generi:

1. *Flavivirus*. Comprende più di 58 membri con una distribuzione globale e un ampio *range* di ospiti, dai rettili ai mammiferi. Questo genere è il più significativo all'interno della famiglia e comprende YFV, il virus della Dengue (DENV) e il virus della encefalite trasmessa da zecche (TBEV). Altre malattie da Flavivirus, tra cui

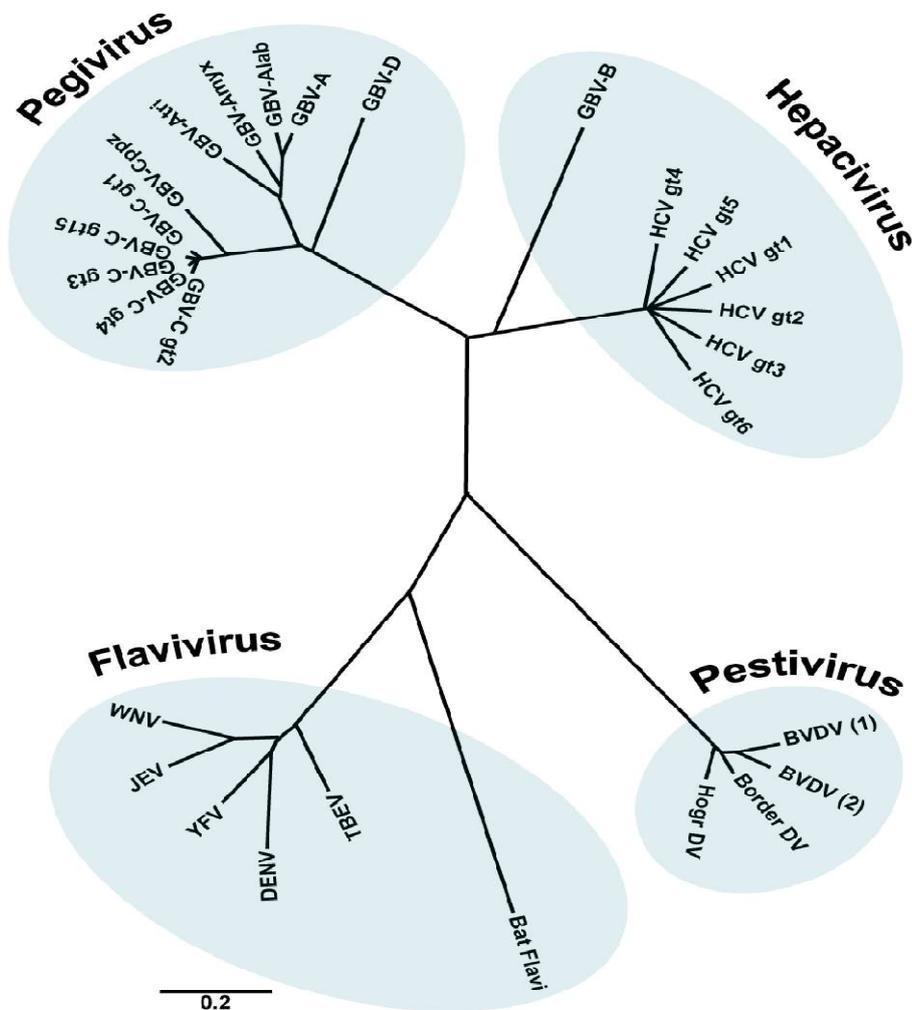
l'encefalite da WNV, l'encefalite Usutu (USUV), la febbre da ZIKV e l'encefalite di Bagaza, sono riconosciute come "malattie emergenti". I membri di questo genere sono trasmessi attraverso la puntura di insetti (zanzare, zecche); il loro genoma codifica la proteina secretoria NS1, che partecipa alla formazione dei complessi di replicazione e delle particelle virali.

2. *Pestivirus*, a cui appartengono i virus della diarrea bovina (BVDV 1/2), il virus della "Border disease" degli ovini (BDV) e il virus della peste suina classica (*Classical swine fever virus*, CSFV). Nei *Pestivirus* la glicoproteina dell'*envelope* E<sup>ms</sup> è essenziale per la produzione di particelle infettive ed è fortemente glicosilata, tranne che a livello della estremità C-terminale. E<sup>ms</sup> induce una ottima risposta anticorpale, una discreta immunità protettiva e possiede attività RNasica, nota nei *Pestivirus* per prender parte alla replicazione del virus e alla virulenza in vivo. L'attività RNasica interferisce con la risposta all'interferone (IFN), contribuendo al mantenimento di infezioni persistenti. E<sup>ms</sup> secreto viene internalizzato nelle cellule e rimane nell'endosoma, per inibire l'induzione di interferone di tipo 1 da parte di dsRNA [1].
3. *Hepacivirus*, che comprende i virus dell'epatite C (HCV) e dell'epatite G (GBV-B o HGV). Nel caso dell'epatite C, la specie-specificità è ristretta a uomini e scimpanzé e le apolipoproteine sono note per partecipare alla formazione di particelle infettive virali [1].
4. *Pegivirus*, genere più recentemente identificato, in cui sono inclusi virus *GB-like*. Recenti studi hanno dimostrato che l'infezione da *Pegivirus* nei linfociti può essere associata con l'insorgenza di linfomi maligni.

WNV, appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, è il principale morbovirus presente nell'Europa dell'Est ed è stato isolato per la prima volta in Uganda, nel distretto di West Nile, nel 1937.



**Figura 1:** (a) Genoma dei virus appartenenti alla famiglia *Flaviviridae*; (b) Ruolo dei fattori virali e dell'ospite nella formazione delle particelle infettive [1].



**Figura 2:** Classificazione della famiglia *Flaviviridae* sulla base della analisi di motivi conservati allineati di RNA polimerasi RNA-dipendente [2].

### 1.1.2 Struttura del genoma

Il genoma di WNV, comunemente ad altri Flavivirus, è costituito da un singolo filamento di RNA a polarità positiva, di circa 11,000 nucleotidi (nt) contenente una singola *open reading frame* (ORF) di circa 10,301 nt.

L'ORF nella maggior parte degli isolati di WNV codifica una poliproteina che viene processata dal complesso di serin-proteasi virali (NS2B-NS3) e da varie proteasi cellulari in 10 proteine virali mature. Le tre proteine strutturali, il capsid (C), la membrana (prM/M) e l'envelope (E), sono codificate nella porzione 5' dell'ORF, mentre le 7 proteine non strutturali (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) sono codificate all'interno della porzione 3'. La poliproteina virale contiene multipli domini transmembrana che determinano la localizzazione delle singole proteine virali mature sul lato citoplasmatico o lumenale del reticolo endoplasmico (ER), dopo il clivaggio dalla poliproteina.

Le proteine C, NS3 ed NS5 sono localizzate sul versante citoplasmatico, mentre le proteine prM, E ed NS1 nello spazio lumenale. NS2A, NS2B, NS4A e NS4B sono localizzate all'interno del doppio strato fosfolipidico della membrana del reticolo endoplasmatico.

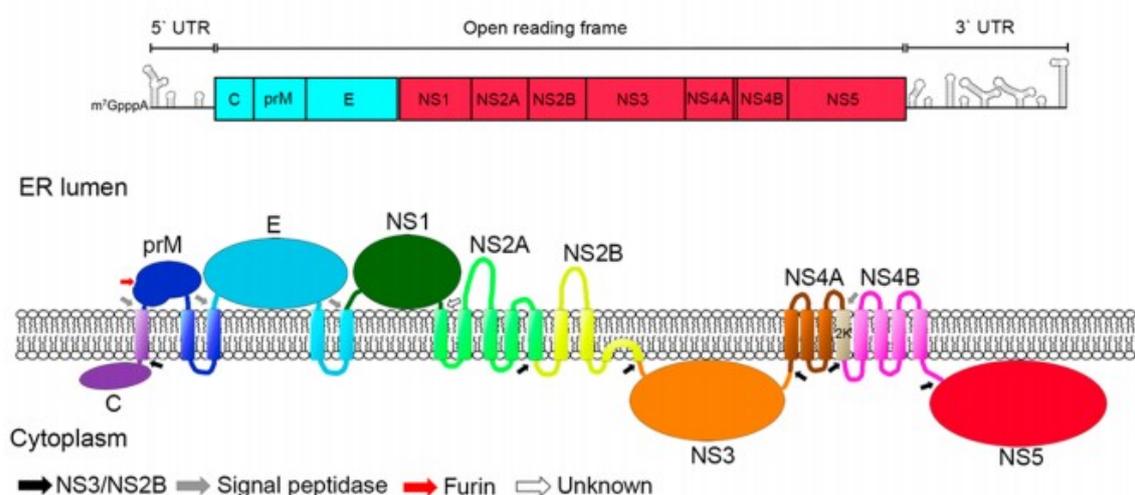


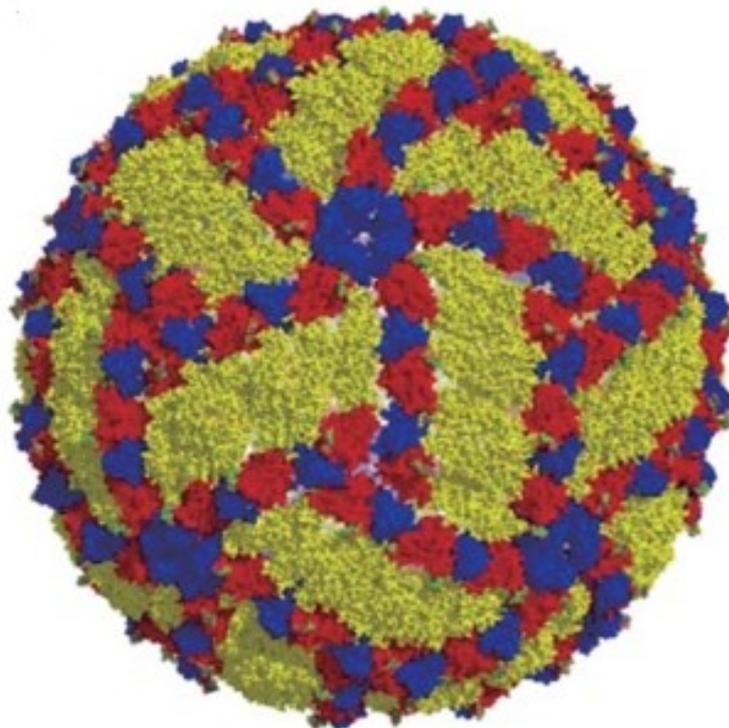
Figura 3: Genoma di WNV e poliproteina [3].

### 1.1.3 Morfologia del virione e composizione

La particella virale consiste in un *envelope* approssimativamente di 50 nm di diametro, circondato da un *bilayer* fosfolipidico.

Il nucleocapside virale è composto da copie multiple della proteina C (~11KD), che è associata al genoma ad RNA e media l'assemblaggio virale [4, 5].

La superficie esterna del virione è costituita da eterodimeri di prM (~26KD) e dalla proteina E (~53KD). La proteina M è un piccolo frammento proteolitico del precursore prM ed è prodotta durante la maturazione del virione all'interno del *pathway* secretorio. M pare che abbia la funzione di proteggere il virione immaturo da una prematura fusione con la cellula ospite. La glicoproteina E, invece, è il maggiore determinante antigenico del virione e media sia il legame del recettore sulla superficie cellulare allo scopo di favorire l'ingresso del virus in cellula, sia la fusione con la membrana della cellula ospite [6, 7].



**Figura 4:** Struttura del virione di WNV [8].

Le 7 proteine non strutturali sono multifunzionali e giocano ruoli critici nella sintesi dell'RNA virale e/o nel suo assemblaggio.

La glicoproteina NS1 (~46KD) svolge un ruolo precoce nella regolazione della replicazione virale [9-11]. Mutazioni in NS1 possono condurre a drammatici difetti nella replicazione dell'RNA e alla produzione di virus contagiosi.

NS3 (~70KD) ha multiple funzioni enzimatiche: funziona come serin-proteasi virale, clivando le altre proteine non strutturali dalla poliproteina in associazione con NS2B, come RNA elicasi in associazione con NS4A e come NTPasi in associazione con NS5 [12-15].

NS5 (~103KD) è una proteina altamente conservata ed è necessaria per la replicazione virale, dal momento che è dotata di attività metiltransferasica nella regione N-terminale e di attività RNA polimerasica RNA dipendente (RdRP) nella regione C-terminale.

NS2A, NS2B, NS4A e NS4B sono piccole proteine idrofobiche con funzione enzimatica non nota, ma si pensa agiscano come cofattori nell'assemblaggio del complesso di replicazione virale e nella sua localizzazione [16-20].

Le proteine non strutturali del virus possono anche modulare il *signaling* cellulare e la risposta immune: in particolare, la proteina NS1 antagonizza le difese antivirali dell'ospite attraverso l'inibizione del segnale di trasduzione TLR3 (*Toll-like Receptor 3*) e la attivazione di STAT1/STAT2 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). NS1, inoltre, inibisce l'attivazione del complemento, contribuendo alla evasione immune dei Flavivirus [21-25].

Alternativamente questa proteina, associata alla superficie cellulare, rappresenta il maggior target per gli anticorpi prodotti dall'ospite, e contribuisce alla *clearance* delle cellule infettate dal virus attraverso una fagocitosi mediata dal recettore Fc-gamma [26].

### 1.1.4 Ciclo vitale

WNV è in grado di replicare in vari tipi di colture cellulari, a partire da una ampia varietà di specie (mammiferi, specie aviarie, anfibi, insetti), suggerendo che per l'ingresso del virus in cellula vengono utilizzati recettori altamente conservati, o alternativamente che WNV può utilizzare differenti proteine cellulari in differenti tipi cellulari e specie ospite. Nel topo e nell'uomo il tropismo di WNV è più limitato, dal momento che il *target* della infezione è rappresentato da monociti, macrofagi, cellule dendritiche, cellule endoteliali e neuroni [27].

Il ciclo replicativo del virus (Figura 5) può essere riassunto in 4 tappe principali:

**1. Attacco ed entrata in cellula:** prima tappa del ciclo replicativo, che prevede una interazione specifica tra la proteina E virale e un recettore cellulare. Sebbene siano noti i meccanismi di fusione del virione con la membrana endosomiale, i recettori cellulari usati non sono stati definitivamente identificati e poco si conosce circa gli stadi precoci del ciclo di replicazione virale. Vari glicosamminoglicani possono funzionare come mediatori dell'ingresso in cellula dei Flavivirus.

In vitro è stato dimostrato che diverse molecole cellulari funzionano come corecettori per l'attacco del virione, come DC-SIGN e DC-SIGN-related nelle cellule dendritiche, nonostante WNV sia in grado di legarsi in maniera efficiente anche a cellule che non esprimono DC-SIGN-related. Inoltre la proteina di legame della laminina e le proteine da shock termico, HSP 90 e 70, sono state riconosciute come fattori di attacco per i Flavivirus.

In seguito all'attacco ai recettori della cellula ospite, WNV fa il suo ingresso nella cellula attraverso un processo di endocitosi mediato da clatrina, che porta alla formazione di un endosoma. L'ambiente endosomico, caratterizzato da un pH acido, favorisce il cambio conformazionale irreversibile della glicoproteina E, consentendo la dissociazione degli omodimeri di E a monomeri e il rilascio del nucleocapside nella cellula ospite. L'efficienza di fusione è influenzata dalla composizione lipidica delle membrane target: colesterolo, acido oleico e lipidi anionici favoriscono il processo di fusione, mentre la lisofosfatidilcolina lo inibisce. La composizione lipidica può anche influenzare il pH.

A seguito della fusione, il genoma virale è immediatamente accessibile alla traduzione.

**2. Traduzione e processamento della poliproteina:** l'RNA virale viene rilasciato dal nucleocapside con un meccanismo sconosciuto, e viene tradotto. La poliproteina prodotta viene processata da proteasi cellulari e virali a livello del lume del reticolo endoplasmico.

**3. Replicazione dell'RNA:** Allo stesso tempo, la RNA polimerasi RNA-dipendente produce, a partire dal template di RNA genomico a polarità positiva, eliche complementari a polarità negativa. Queste eliche negative servono come template per la sintesi di nuovi RNA virali positivi. Studi hanno mostrato che la replicazione dell'RNA può continuare senza la sintesi proteica e che da un filamento a polarità positiva solo un filamento a polarità negativa può essere sintetizzato allo stesso

tempo, mentre da un filamento a polarità negativa possono essere simultaneamente copiati multipli filamenti a polarità positiva (<http://dx.doi.org/10.5772/55198>).

La progenie di molecole di RNA positive può subire tre diverse destinazioni:

- RNA genomico impaccato in particelle infettive rilasciate in circolo;
- mRNA per la produzione di proteine di WNV;
- RNA per iniziare nuovi cicli di replicazione.

**4. Assemblaggio e rilascio del virione:** Il virione immaturo viene trasportato nell'apparato del Golgi, dove avviene la sua maturazione a seguito della trasformazione di prM in proteina M. In questo modo il virione assume la capacità infettiva e viene rilasciato per esocitosi. L'assemblaggio del virione non può avvenire in assenza di sufficiente sintesi proteica. Ogni virione contiene più di 180 copie delle proteine strutturali prM e E e solamente una copia genomica. Il rilascio del virione sembra che avvenga mediante il normale pathway secretorio della cellula.

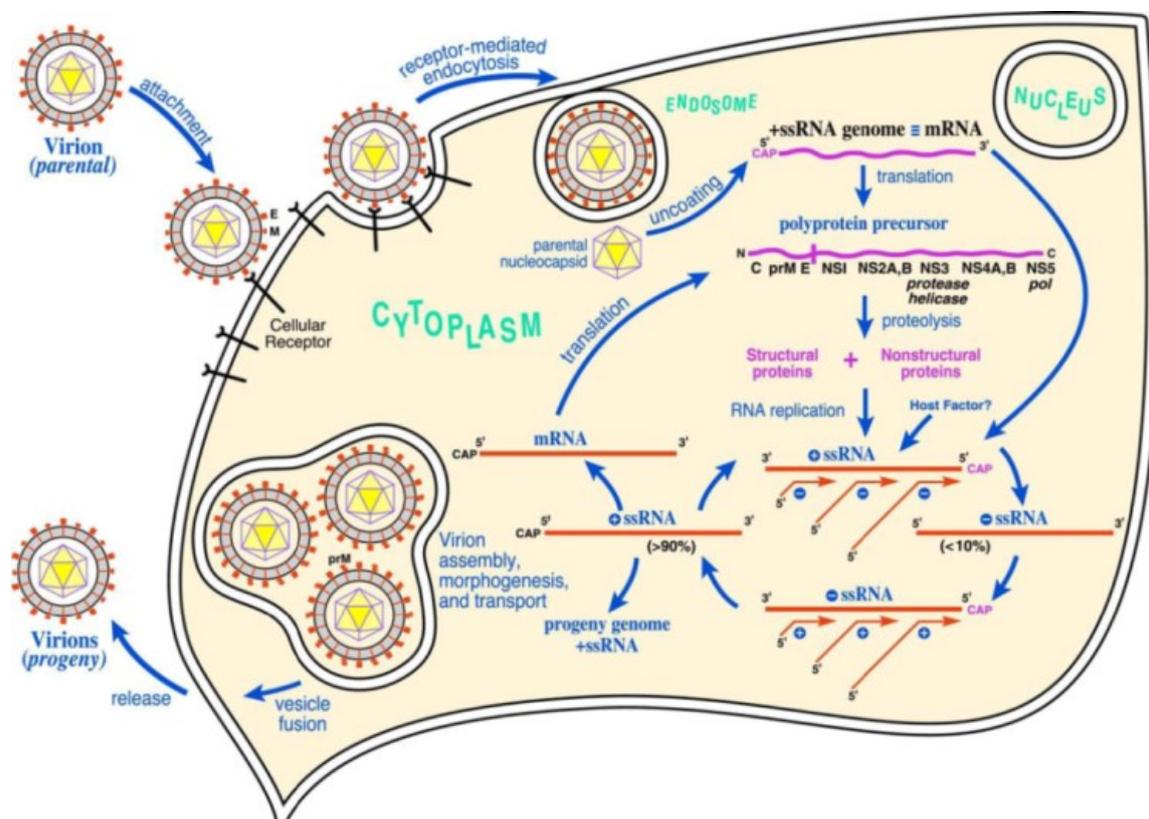


Figura 5: Ciclo replicativo di WNV.

## 1.2 Lineages

---

Il sequenziamento e la analisi filogenetica dei genomi completi di West Nile ha portato ad una divisione dei ceppi virali in 9 *lineages*.

Il *lineage 1* comprende 3 *clades*: 1a, 1b e 1c. Il *clade 1a* raggruppa isolati provenienti da tutto il Mondo: Europa, Medio Oriente, Russia e America. Il *clade 1b* comprende la variante australiana naturalmente attenuata, il virus *Kunjin*, che forma uno stretto *cluster* con il ceppo di WNV americano, con una differenza a livello amminoacidico approssimativamente variabile dal 2 al 3%. Il *clade 1c* comprende isolati provenienti dall'India [28, 29].

Ceppi di *lineage 2*, invece, storicamente sono stati isolati in Africa Sub-Sahariana e in Madagascar, e generalmente hanno mostrato meno abilità a causare malattia negli animali e nell'uomo. Solo recentemente il *lineage 2* è stato responsabile dell'aumento del numero di *outbreaks* sia negli equini che negli umani: è stato identificato in Ungheria nel 2004 [30], in Romania e in Grecia nel 2010 [31-33], in Italia nel 2011 [34] e in Russia negli anni 2004-2011 [35, 36].

Di numero sicuramente inferiore sono i ceppi di WNV sequenziati di *lineage 3* e 4. Tali ceppi sono caratterizzati da scarsa patogenicità, sono stati descritti recentemente e presentano notevoli differenze genetiche con i ceppi di *lineage 1* e 2. Il *lineage 3* (*Rabensburg*) è stato ripetutamente isolato in Repubblica Ceca [37-39], il *lineage 4* in Russia [40].

Il *lineage 5* è stato identificato in India come *clade 1c* del *lineage 1* [29]; un sesto *lineage* putativo è stato rilevato in Spagna.

Altri *lineages* putativi sono il *lineage 7* (*Koutango*), isolato da zecche e roditori in Africa, che ha mostrato una virulenza maggiore rispetto al ceppo NY99 di *lineage 1a* nel topo, il *lineage 8*, isolato da zanzare *Culex perfuscus* in Senegal nel 1992 [41] e il *lineage 9* isolato da zanzare *Uranotaenia unguiculata* in Austria [42].

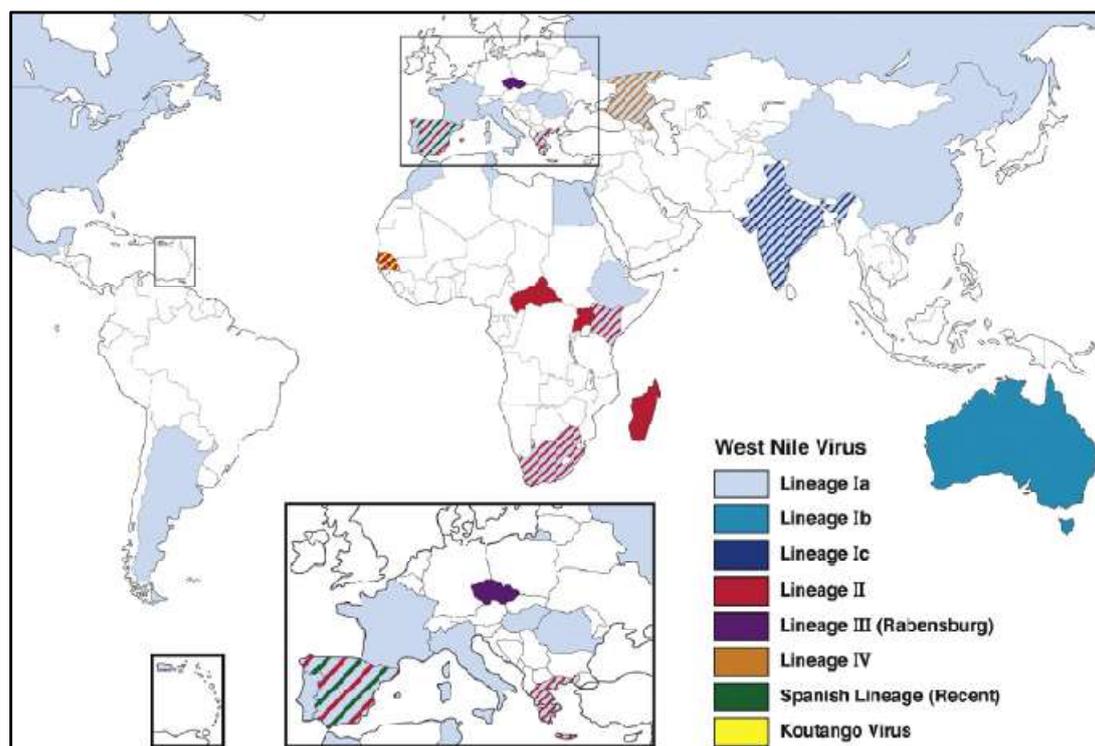


Figura 6: Distribuzione mondiale dei *lineages* di WNV [43].

### 1.3 Distribuzione geografica

WNV è stato isolato per la prima volta nel 1937 in una donna residente nel distretto di West Nile, in Uganda.

Una sieropositività al virus è stata riscontrata in Uganda, Sudan, Repubblica Democratica del Congo e Kenya tra il 1939 e il 1940. Diversi *outbreaks* di infezione sono stati descritti in Kenya, Repubblica Democratica del Congo e Sud Africa, insieme a casi sporadici e/o sieropositività nell'uomo e/o nel cavallo durante il 20esimo e il 21esimo secolo. Tra il 1974 e il 1984 epizootie ed epidemie di ridotta patogenicità nell'uomo sono state descritte in Sud Africa, causate dal *lineage 2* del virus. In regioni dell'Africa Sub-Sahariana come la Guinea, il Ghana, il Gabon e la Nigeria, casi di WNV sono stati riportati tra il 2006 e il 2009.

In Nord Africa il virus è stato isolato per la prima volta nel 1968, in Algeria, da un *pool* di 215 zanzare del genere *Culex* nella regione di Djanet in provincia di Illizi, nel corso di un'indagine su epidemie equine verificatesi nel 1965 [44].

Il virus è stato anche isolato per la prima volta nel 1996 in Marocco dal tessuto cerebrale di un cavallo morto a seguito di una malattia insolita apparsa in cavalli residenti nella zona costiera atlantica a Nord-Ovest del Paese, come riportato dai servizi

veterinari. L'analisi del genoma dei ceppi isolati in Marocco ha mostrato una appartenenza del virus al *lineage 1 clade 1a* [45].

Le analisi filogenetiche hanno anche mostrato alta similarità con i ceppi Senegal/93 e Francia/00 [46]. Un anno dopo in Tunisia, WNV è stato isolato nell'uomo durante un'epidemia di meningo-encefalite e anche questo ceppo apparteneva al *lineage 1*, ma era molto simile ai ceppi virulenti isolati in Israele nel 1998 e a New York nel 1999.

Nel 2003, dopo un apparente silenzio epidemiologico, si è verificata in Marocco un'altra epizoozia, causata da un ceppo di WNV che si è rivelato molto più patogeno di altri virus del Mediterraneo occidentale [47, 48]. Sono stati rilevati 9 casi equini e 5 decessi; tuttavia, non è stata segnalata alcuna meningo-encefalite umana.

Tutti i ceppi di WNV isolati in Algeria, Marocco e Tunisia sono risultati caratterizzati da una patogenicità moderata per cavalli e per gli esseri umani e da nessuna o limitata patogenicità per gli uccelli. Non si può dire lo stesso per i ceppi appartenenti al *cluster* israelo-americano, caratterizzati da un alto tasso di mortalità aviaria e negli Stati Uniti da alti tassi di morbilità e mortalità in esseri umani e cavalli [49].

Nonostante l'isolamento del virus da zanzare in Algeria nel 1968 ed evidenze sierologiche di infezione nell'uomo e negli animali, non sono mai stati segnalati casi clinici nell'uomo nell'Africa nord-occidentale fino al 1994, quando è stato segnalato un focolaio nel sud dell'Algeria con circa 50 casi sospetti tra cui 8 decessi [50]. I pazienti avevano una febbre alta associata a segni neurologici e altri sintomi, a volte presentando anche uno stato comatoso.

In Marocco, 1 caso fatale è stato notificato durante l'epidemia del 1996, e un anno dopo, durante l'autunno 1997, Tunisi ha segnalato epidemie umane di meningo-encefalite con 173 casi riportati e 8 decessi.

Nell'ottobre 2010, la malattia di West Nile (*West Nile Disease, WND*) è stata diagnosticata in 2 bambini al confine tra Tunisia e Algeria, e nell'ottobre 2011 in 3 donne di 61, 70 e 77 anni a sud della Tunisia. Nel 2011, l'infezione umana in Marocco è stata confermata sierologicamente attraverso il rilevamento di anticorpi neutralizzanti in 59 su 499 persone sane residenti a Meknes, Rabat e Kenitra [51].

I dati raccolti sulla malattia di WNV in Africa nord-occidentale, sui casi clinici di meningo-encefalite nell'uomo in Algeria, Marocco e Tunisia e sui focolai negli equidi in Marocco, suggeriscono che WNV sia endemico in Africa nord-occidentale. La presenza del virus può essere il risultato dell'introduzione da parte degli uccelli migratori o di un'endemizzazione risultante da cicli di svernamento negli uccelli e nelle zanzare locali

durante la stagione invernale [52]. Inoltre, l'area oggetto di studio è situata lungo le principali rotte migratorie, e il ruolo degli uccelli migratori in relazione all'introduzione del virus in Europa e nel bacino del Mediterraneo è stato valutato da numerosi studi [49]. Anche se la regione è quasi interamente coperta dal deserto, esiste una pianura costiera delimitata da una grande catena montuosa (Tell in Algeria, Atlante in Marocco); pertanto, l'esistenza di zone umide naturali e artificiali è favorevole alla confluenza di diverse specie intorno ai corsi d'acqua e alla interazione tra vettori e ospiti, con aumento del rischio di acquisire la malattia. In questi Paesi i fattori ambientali e le condizioni climatiche sono favorevoli al mantenimento del ciclo di trasmissione della WND [53]. Tali condizioni sostengono la circolazione del virus, e quando è alta la densità delle zanzare e sono disponibili ospiti sensibili, si osservano focolai epidemici.

Dopo il suo primo isolamento nel 1937, il virus non è stato isolato fino al 1950, quando è stata descritta una epidemia in Egitto. Durante uno studio condotto su 251 individui che vivevano al Cairo, il virus è stato isolato dal siero di tre bambini, ad uno solo dei quali era stata diagnosticata febbre. Lo stesso studio ha rilevato che oltre il 70% dei partecipanti aveva una età pari o superiore a 4 anni e che oltre il 50% dei bambini aveva anticorpi materni contro WNV; ciò indica che l'infezione era diffusa tra la popolazione e che la maggior parte degli individui infetti era di giovane età [54].

Il primo focolaio noto di WNV si è verificato in Israele in un insediamento agricolo vicino ad Haifa nel 1951 [55], seguito da altri focolai nel 1952, 1953, 1957 e 2000 [56-58]. Una sieropositività dimostrata da test di inibizione dell'emagglutinazione (HI) e test di neutralizzazione (NT) è stata segnalata in Turchia e in Iran negli anni '70 e nella metà degli anni 2000, con focolai recenti nel 2010-2011 in Turchia.

Dal 1978 il virus è stato spesso riportato in Madagascar: è stato isolato per la prima volta da una specie endemica di pappagallo, *Coracopsis Vasa*.

Studi successivi hanno descritto un alto livello di sieroprevalenza del virus negli esseri umani in diverse zone dell'isola.

Infezioni causate dal *lineage 2* in Madagascar sono generalmente state considerate lievi; un caso fatale di malattia neuro-invasiva è stato segnalato nel 2011.

Nonostante queste indagini, l'epidemiologia di WNV in Madagascar risulta ancora poco chiara.

Recentemente la trasmissione del virus è stata esplorata in due popolazioni umane rurali dell'isola; sono state studiate le zanzare locali e il pollame, ed è stata determinata la sieroprevalenza di specie sentinella candidate tra il pollame locale.

Le aree oggetto di studio sono state Antsalova e Mitsinjo, località nelle immediate vicinanze di laghi, dove uccelli domestici, uccelli selvatici migratori ed esseri umani coesistono.

Analisi sierologiche hanno rilevato la presenza di anticorpi anti-WNV nei volatili domestici (anatre, polli, oche, tacchini) campionati in entrambi i distretti (29,4% in Antsalova e 16,7% in Mitsinjo). L'acido nucleico del virus è stato rilevato in un pollo e in 8 *pool* di zanzare di cui 2 specie, *Aedeomyia madagascariensis* e *Anopheles Pauliani*, sono state per la prima volta descritte come vettori candidati per WNV.

Il coinvolgimento di zanzare *Anopheles* è abbastanza sorprendente; ad oggi, 23 specie *Anopheles* sono già descritte in Madagascar con un comportamento altamente zoofilo nei riguardi di uccelli e probabilmente di esseri umani.

L'analisi filogenetica ha rivelato che tutti gli isolati identificati in questo studio appartenevano al *lineage 2*, in accordo con la distribuzione spaziale dei diversi *lineages* [59]. In Madagascar, tutti gli isolati ottenuti a partire dal 1978 sono strettamente correlati, suggerendo una circolazione locale del virus, presumibilmente mantenuta da uccelli selvatici, che agiscono come serbatoio virale, e trasmessa da zanzare che agiscono come vettore.

Lo studio, condotto dall'unità di Virologia dell'Istituto "Pasteur" in Madagascar, in collaborazione con altre unità e centri, ha dimostrato che WNV circola nell'isola tra gli uccelli domestici e le zanzare, e mette in evidenza l'utilità del pollame come valido strumento di sorveglianza per rilevare la trasmissione del virus in un ambiente peri-domestico.

Uno studio è in corso nel distretto di Mitsinjo per valutare il ruolo degli uccelli selvatici e delle zanzare nella trasmissione del virus, per individuare una possibile stagionalità del WNV e valutare il rischio per gli esseri umani [60].

In America WNV circola dal 1999. Il ceppo designato *WNV NY99*, che causò l'epidemia iniziale nella città di New York, negli Stati Uniti, provocò 59 casi di meningo-encefalite, con 7 decessi. Si trattava di un ceppo di *lineage 1* analogo a un isolato da un'epidemia in Israele nel 1998. WNV è stato, quindi, introdotto in Nord America per la prima volta, e da allora ha continuato a diffondersi, nel 2000 negli stati vicini del New Jersey e del Connecticut, dal 2001 a 10 stati, dal 2002 a 40 stati e dal 2004 a tutti i 48

stati contigui degli Stati Uniti. In coincidenza con i focolai del 2002-2003, un nuovo genotipo virale conosciuto come *WN02* ha sostituito il genotipo originario *NY99*. Focolai di WNV sono stati registrati anche in Ontario e Quebec in Canada dal 2001 al 2003, nel 2007 e nel 2012. Alla fine del 2001 e del 2003 sono stati segnalati casi di encefalite umana nei Caraibi. Anticorpi anti-WNV sono stati rilevati in uccelli e in cavalli in Giamaica, Repubblica Dominicana, Guadalupa, Porto Rico, Messico, Trinidad e Cuba. Il virus è stato isolato in Porto Rico in tre donatori di sangue nel 2007 e ha mostrato la mutazione V159A nel gene dell'*envelope*, distintiva del genotipo WN02. Due casi umani confermati di WNV sono stati segnalati in Messico: il primo caso è stato segnalato nel 2004 [61] ed è stato seguito da un caso fatale nel 2009 in un uomo di 40 anni che, dopo sintomi lievi per diverse settimane, ha manifestato malattia neurologica, con successivi coma e morte [62].

Diversi Paesi europei come l'Ucraina occidentale (1985), la Romania (1996), la Russia (1999), la Francia (2000-2003), l'Italia (2008-2009) e l'Ungheria (2008) hanno registrato focolai di malattia neuro-invasiva [49, 63-66].

Ulteriori casi di malattia sono stati registrati in esseri umani e animali tra il 2009 e il 2013 in Algeria, Bulgaria, Croazia, Grecia, Ungheria, Italia, Kosovo, Montenegro, l'ex Repubblica jugoslava di Macedonia, Russia, Serbia, Spagna, Portogallo, Croazia e Austria [67-69]. Ad oggi, nel Regno Unito, non è stato descritto alcun caso clinico di WNV, anche se una seropositività è stata segnalata in uccelli.

Il virus *Kunjin* (una sottospecie del *lineage* 1 di WNV) è stato isolato per la prima volta nel 1960 in Australia e ha continuato a causare infezioni umane ed equine nel territorio nord-occidentale del continente [70]. Nel 2011, un focolaio in cavalli nel Sud-Est dell'Australia è stato causato da un ceppo di WNV (*NSW2011*) più neuroinvasivo di quelli precedentemente circolanti [71].

Nel 2013 si è verificato il primo caso umano confermato nella provincia dello Xinjiang, nella Cina nord-occidentale, che ha presentato reattività crociata con il virus della encefalite giapponese, JEV. [72]. L'infezione da WNV è stata confermata in tre pazienti su 108 (2,8%) con encefalite o meningo-encefalite.

In Pakistan, uno studio ha riportato una percentuale di anticorpi neutralizzanti compresa tra il 32,8 e il 38,5% nella popolazione umana campionata. Nello scenario indiano, vari ceppi di WNV sono stati isolati dal complesso *Culex vishnui* e da *Culex fatigans*, in India meridionale tra il 1955 e il 1957. Gli anticorpi contro WNV sono stati segnalati per la prima volta nella costa occidentale dell'India già nel 1952. Questo fu confermato

da Smithburn e collaboratori [73] nel 1954. Sono stati raccolti sieri da un totale di 588 persone residenti in 38 località in India e testati contro 15 virus trasmessi da artropodi. È stata dimostrata una neutralizzazione del virus dal 35% dei sieri testati.

In uno studio condotto in India occidentale sono stati raccolti campioni di siero e liquido cerebrospinale (CSF) di pazienti con sospetta infezione, e sono state dimostrate prove di recente infezione da WNV in 88 casi. Nel 2002, Thakare e collaboratori [74] hanno riferito che il 92% dei casi (81/88) presentava le caratteristiche della febbre virale, mentre sette casi presentavano le caratteristiche dell'encefalite. Durante un'indagine sierologica post-epidemia nel 1991, Risbud e collaboratori [75] hanno rilevato anticorpi neutralizzanti per WNV (40,8%), JEV (49,2%) e DENV (18,14%) nell'India meridionale.

## 1.4 Epidemiologia

---

### 1.4.1 WNV in Europa

Il virus circola in Europa e nel Bacino del Mediterraneo almeno dal 1950. Il primo ingresso nel continente è stato registrato in Albania nel 1958, con il rilevamento di anticorpi neutralizzanti in sieri umani [76].

Il primo focolaio epidemico documentato si è verificato nella Regione del Camargue nel Sud della Francia nel 1962-1963, causando malattia neuro-invasiva sia negli uomini che nei cavalli.

Negli ultimi decenni la situazione epidemiologica in Europa è cambiata radicalmente, con focolai di WNV sintomatici in diversi Paesi Europei. Due estesi *oubreaks* si sono verificati in Romania e in Russia, rispettivamente nel 1996 e nel 1999. Durante l'epidemia a Bucharest sono stati confermati 393 casi di malattia neuro-invasiva e sono state registrate 17 morti [65]. Il tasso di mortalità è stato ancora più elevato in Russia, dove si sono avuti 318 casi e 40 decessi per meningo-encefalite asettica acuta [64].

Tre Regioni della Federazione Russa (Volgograd, Astrakhan, and Rostov) hanno riportato casi di febbre ed encefalite da WNV. Tra il 1999 e il 2010, 928 casi sono stati identificati nell'area di Volgograd, 322 in Astrakhan e 40 a Rostov. Il picco epidemico è stato riportato a Volgograd nel 1999 e nel 2010, rispettivamente con 380 e 413 casi [36].

Casi di sieropositività sono stati documentati in cavalli, uomini e uccelli in Spagna e in Portogallo, con i primi segni clinici di malattia nell'uomo e nel cavallo riportati in

Spagna nel 2010 [77]. Dal 2010 casi umani di infezione sono stati segnalati in Austria, Bosnia-Erzegovina, Croazia, Grecia, Ungheria, Italia, Kosovo, Montenegro, Russia, Serbia, Spagna e Ucraina.

In Ungheria il virus è comparso per la prima volta nel 2004, causando casi sporadici di encefalite in uccelli predatori e mammiferi. Tra il 2004 e il 2007 sono stati osservati solo casi sporadici di infezione, mentre nel 2008 il virus si è improvvisamente diffuso, causando 12 casi nei cavalli e 22 casi neuro-invasivi nell'uomo [63]. Durante il 2018, similmente ad altre aree endemiche in Europa, numerosi casi di infezione sono stati riportati nell'uomo [78].

In Austria WNV è stato isolato per la prima volta in uccelli rapaci nel 2008. I primi casi umani di infezione sono stati documentati in 3 pazienti (due nel 2009 e uno nel 2010) nel corso di uno studio retrospettivo condotto nel 2012 [69].

Due casi di importazione dalla Serbia sono stati documentati nel 2012, mentre nessun caso di febbre è stato registrato nel 2011 e nel 2013.

In Grecia il virus è emerso nel 2010, causando 197 casi di malattia neuro-invasiva con un tasso di fatalità del 17%. Da allora *outbreaks* umani si sono verificati ogni anno, tranne che nel 2015 e nel 2016. Tutte le sequenze virali caratterizzate erano di *lineage 2*. Un precoce inizio della stagione di trasmissione si è avuto nel 2018, con un numero record di 316 casi riportati e 47 decessi. Una nuova variante genetica è stata individuata in Agosto 2018 in un caso umano nel Nord-Est della Grecia, al confine tra Turchia e Bulgaria [79].

In Serbia il virus circola almeno dal 2010 e il primo *outbreak* umano di infezione documentato risale al 2012 [80]. A partire dal 2012 ogni anno sono stati riportati casi umani di infezione nel nord e nel centro della Serbia.

In accordo con i dati epidemiologici riportati dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC), un totale di 1832 casi umani di malattia neuro-invasiva sono stati rilevati nell'Unione Europea e nei Paesi limitrofi tra il 2011 e il 2017.

Nel 2018 in Europa l'attività di sorveglianza ha mostrato un precoce inizio della stagione epidemica rispetto agli anni passati, con un aumento delle infezioni umane acquisite localmente. Sono stati interessati tutti i Paesi membri dell'Unione Europea (Austria, Bulgaria, Croazia, Cipro, Francia, Grecia, Ungheria, Italia, Kosovo, Portogallo, Romania, Spagna, Serbia, Turchia). In particolare sono stati riportati 1503 casi umani nell'Unione Europea e 580 casi nei Paesi limitrofi, con 180 decessi. In tutte le Nazioni i primi casi sono stati osservati in prossimità di aree umide come il delta del

Po in Italia o il fiume Axios in Grecia, che attirano gli uccelli migratori e la popolazione di zanzare *Culex*, potenziando la trasmissione della infezione.

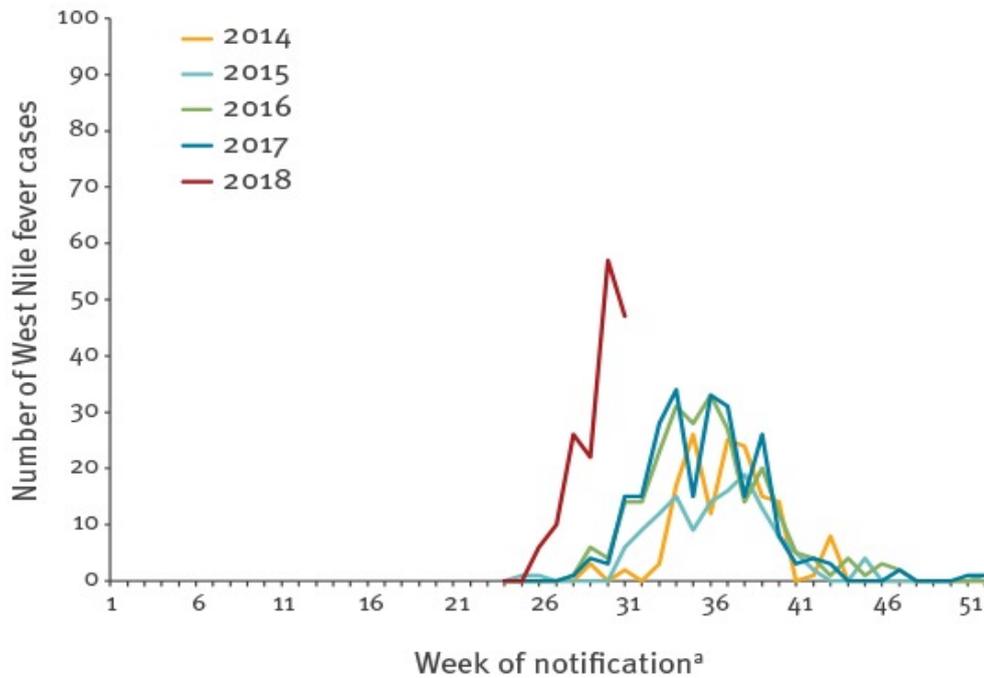


Figura 7: Casi di febbre da WNV per settimana di notifica dal 2014 al 2018 [81].

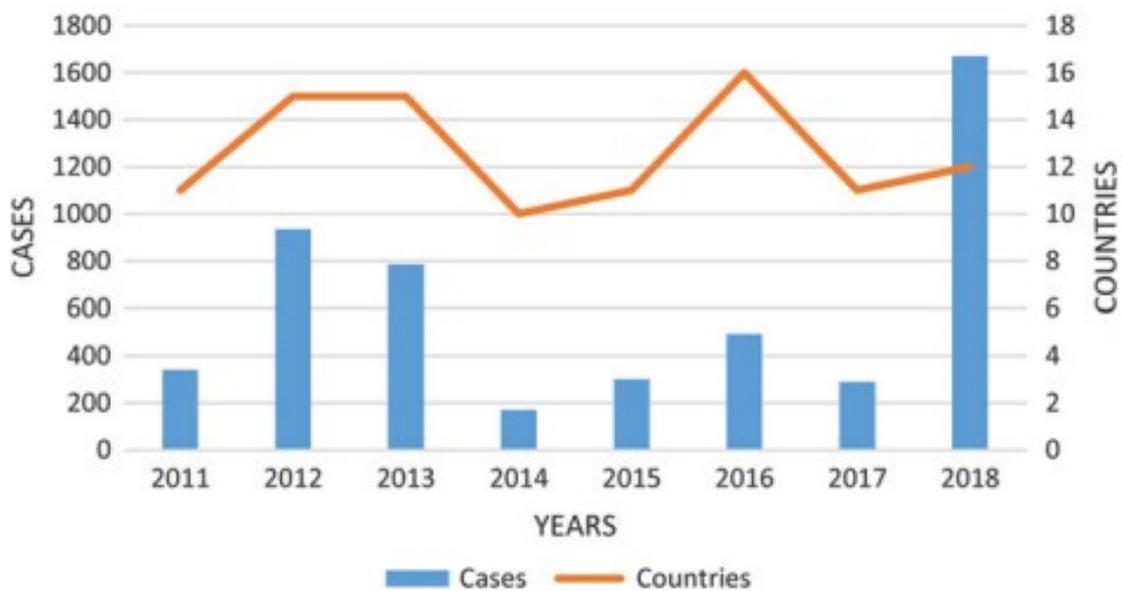


Figura 8: Casi di febbre e di malattia neuro-invasiva in Europa a partire dal 2010. Dati dal Centro Europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie.

### 1.4.2 WNV in Italia

Il primo focolaio italiano di infezione, causato dal WNV-1, è stato segnalato nell'estate del 1998 in Toscana, con casi di malattia neurologica tra cavalli stabulati nell'area circostante il Padule di Fucecchio. Sono stati identificati 14 casi animali, di cui 6 mortali [82] e sono state rilevate positività anticorpali in persone che condividevano con i cavalli il rischio delle punture di zanzara.

Dal 1998 al 2008 i sistemi di sorveglianza veterinaria e umana non hanno riportato una rilevante circolazione virale. Nell'agosto 2008, a distanza di dieci anni dalla prima notifica, una grande epidemia ha colpito otto province in Emilia Romagna, Veneto e Lombardia [49] con casi in uccelli, cavalli e uomini.

Il primo caso umano confermato in laboratorio di infezione neuroinvasiva si è verificato in una zona rurale vicino al fiume Po nel Nord-Est dell'Italia [83] e l'analisi filogenetica degli isolati ha mostrato una similarità nucleotidica pari al 98,8% con il ceppo isolato in Toscana nel 1998.

Nel luglio del 2009 una nuova epidemia ha colpito non solo l'area interessata nel 2008, ma anche l'Italia centrale [84].

Dal 2008, quando è stato implementato il sistema italiano di sorveglianza integrata per WNV, l'incidenza di WNND è rimasta relativamente bassa fino al 2011 (0,4 per milione di abitanti), mentre è aumentata di tre volte tra il 2012 e il 2015 (1,20) raggiungendo il picco nel 2013 (1,66).

WNV-2 è stato documentato per la prima volta in Italia nel 2011, in una co-circolazione con WNV-1, come riportato da Magurano e collaboratori [85].

Dal 2011 ad oggi, il *lineage 2* è il *lineage* più frequentemente identificato in Italia, con il maggior numero di casi riportati.

Nel 2018 un grande focolaio epidemico è stato registrato nel nord Italia e in particolare, da giugno, inizio della sorveglianza, a novembre, sono stati segnalati 577 casi confermati di infezione, 230 dei quali ha manifestato sintomi neuro-invasivi, e di questi 42 sono deceduti.

Sono state riportate 279 febbri e 68 infezioni in donatori di sangue (<https://www.epicentro.iss.it>).

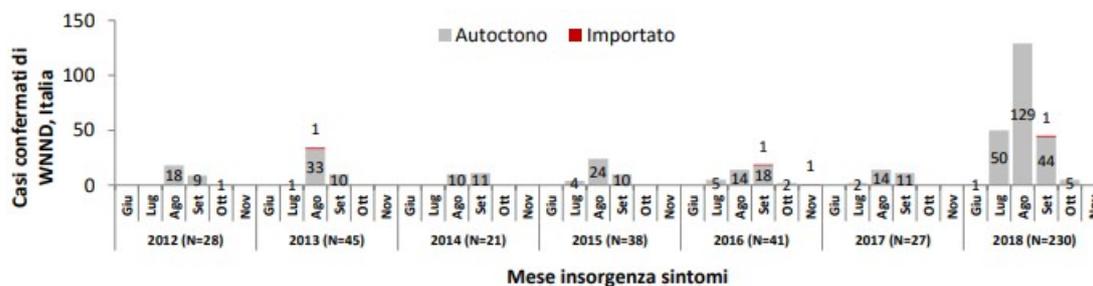


Figura 9: Andamento dei casi confermati di WNND per mese di insorgenza dei sintomi, 2012-2018

Inoltre, la stagione di trasmissione è iniziata prima rispetto agli anni passati, con il primo rilevamento del virus nella provincia di Rovigo da un *pool* di zanzare *Culex* e il primo caso umano confermato nella stessa provincia [86].

### 1.5 Modalità di trasmissione e patogenesi della infezione

WNV è mantenuto in natura in un ciclo primario di trasmissione enzootico (ciclo endemico) che coinvolge come vettori le zanzare ornitofile adulte e come serbatoi uccelli viremici che fungono da ospiti amplificatori.

Dati sperimentali hanno confermato la capacità sia delle zanzare *Aedes* che di quelle *Culex* di trasmettere l'infezione. Tuttavia, il vettore principale del virus a livello mondiale è rappresentato da zanzare dell'ordine *Culex* e della specie *pipiens*.

In realtà questo complesso include due bioforme: *pipiens pipiens*, che vive all'aperto ed è considerata principalmente ornitofila, e *Culex molestus*, che punge solo l'uomo e si ritrova in America e in Europa. La presenza dei due biotipi favorisce la trasmissione del virus fra persone e animali, e la formazione di ibridi che pungono indistintamente uomini e animali aumenta ovviamente il rischio per l'uomo.

Inoltre, sebbene esista una significativa variabilità nei livelli di viremia e di malattia, più di 300 specie di uccelli sono state identificate come ospiti competenti del virus, in grado di sviluppare una viremia con un titolo tale da essere infettanti per il vettore.

Il ciclo secondario di trasmissione (ciclo epidemico) si manifesta quando, a causa di particolari condizioni ecologiche, ospiti accidentali, come il cavallo e l'uomo, entrano nel ciclo e vengono definiti "*dead-end*", ovvero a fondo cieco, in quanto in questi animali la viremia è di breve durata e con un titolo non sufficientemente elevato da consentire l'infezione del vettore.

Altre fonti di trasmissione documentate nell'uomo, seppur rare, sono rappresentate dai trapianti d'organo, dalle trasfusioni di sangue, dall'allattamento al seno e da inoculazioni percutanee.

Gli uccelli che svolgono il ruolo di ospiti amplificatori sono i Passeriformi; i Galliformi e i Columbiformi, invece, mostrano viremie di breve durata e titoli virali non elevati, pertanto sono in grado di mantenere il virus nell'ambiente, ma non sembrano svolgere alcun ruolo di amplificatori.

Anche i rettili (alligatori, serpenti e tartarughe) e le rane possono essere infettati dal virus. Si pensa che queste specie, a causa della lunga viremia e del fatto che si ibernano, siano anche in grado di svolgere un ruolo nel mantenimento di WNV nell'ambiente. I meccanismi per questo "overwintering", però, non sono del tutto chiari.

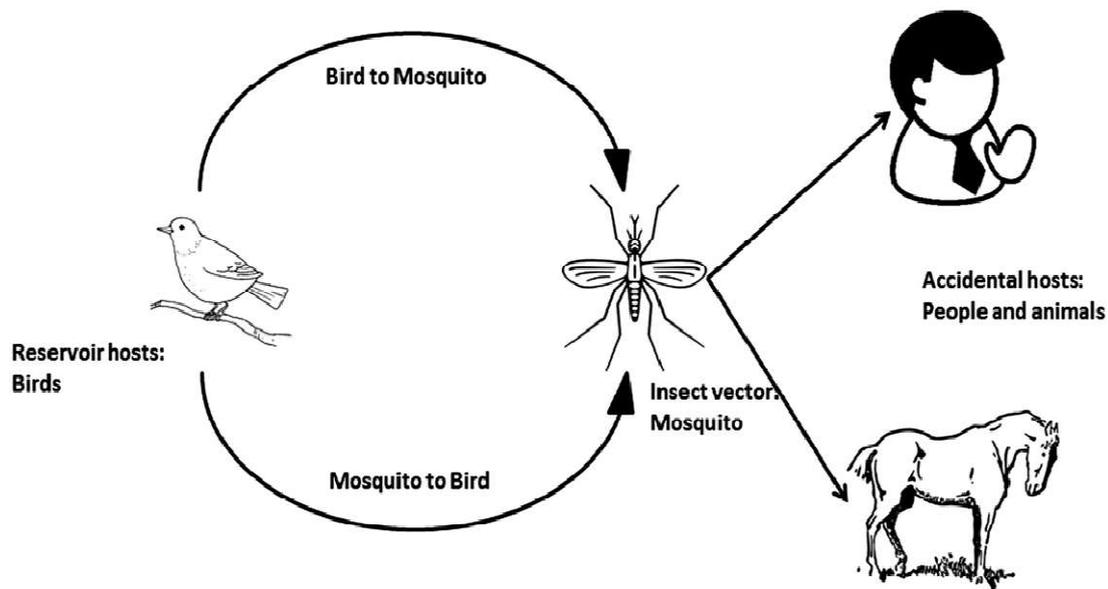


Figura 10: Ciclo di trasmissione del virus di West-Nile [87].

L'infezione dal virus di West Nile avviene tramite il morso di una zanzara infettata.

Il virus, una volta ingerito, è in grado di diffondere nell'organismo della zanzara, dove si moltiplica localizzandosi a livello delle ghiandole salivari, per poi essere trasmesso all'ospite vertebrato.

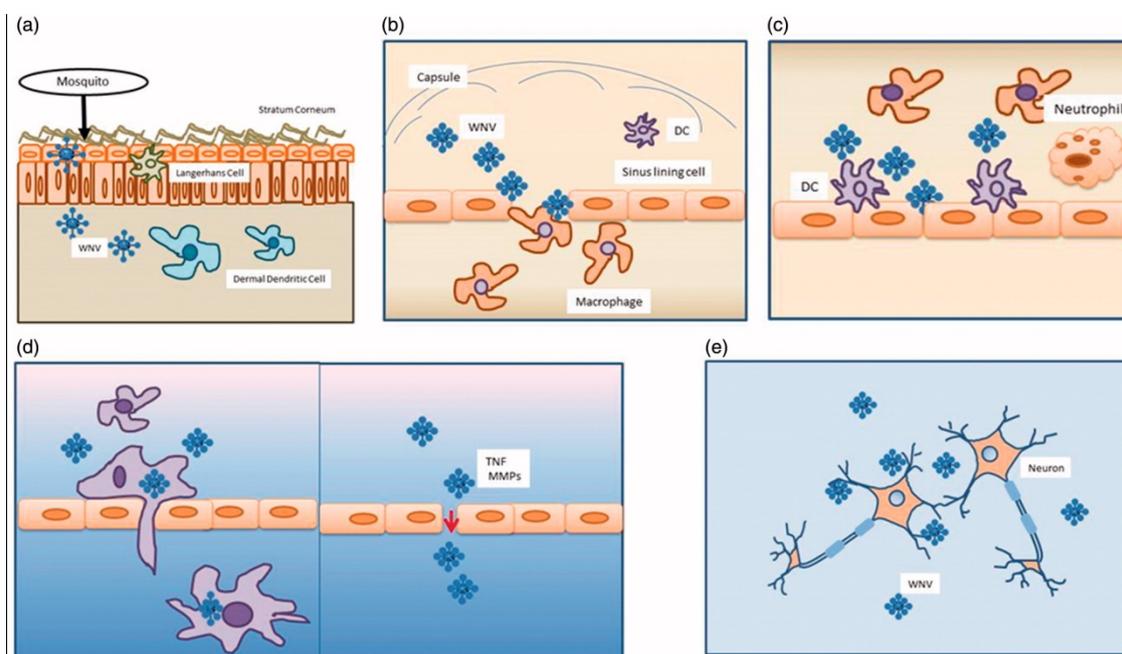
Componenti salivari della zanzara, introdotti nel sito di infezione nei vertebrati, modulano l'infezione iniziale delle cellule bersaglio, come cheratinociti, cellule di Langerhans e cellule dendritiche residenti sulla pelle attraverso diversi meccanismi, tra cui la soppressione di cellule effettrici immunitarie trafficanti al sito di inoculo. Le cellule dendritiche infettate o i cheratinociti migrano al linfonodo drenante, da cui si

genera una viremia sierica che poi trasmette l'infezione agli organi viscerali e potenzialmente al sistema nervoso centrale (Figura 11).

Il virus è in grado di replicare e di causare malattia a livello cerebrale; tuttavia, un prerequisito fondamentale per la malattia neuroinvasiva nell'uomo è la capacità del virus di accedere al sistema nervoso centrale. I meccanismi di invasione del sistema nervoso sono indicati nella Figura 11 e includono:

1. l'attraversamento virale diretto della barriera emato-encefalica, dovuto all'aumento della permeabilità vascolare mediato da citochine;
2. il passaggio attraverso l'endotelio della barriera emato-encefalica;
3. un meccanismo di cavallo di Troia nei macrofagi tissutali;
4. un trasporto assonale retrogrado del virus al sistema nervoso centrale attraverso l'infezione di neuroni olfattori.

Indipendentemente da come il virus entra nel sistema nervoso centrale, modelli murini di infezione hanno dimostrato una persistente replicazione virale in vari tessuti, incluso il sistema nervoso centrale, suggerendo una potenziale eziologia per sequele neurologiche a lungo termine osservate nei pazienti con malattia neuroinvasiva.



**Figura 11** : Patogenesi della infezione da WNV. (a) Fase precoce, (b) Migrazione verso i linfonodi, (c) Migrazione verso la milza, (d) Attraversamento della barriera ematoencefalica, (e) Infezione dei neuroni [87].

## ***1.6 Clinica della infezione***

---

Nell'uomo il periodo di incubazione varia fra 2 e 14 giorni.

Studi sieroepidemiologici suggeriscono che il 20-25% degli individui affetti da WNV sviluppano malattia lieve, mentre 1 persona su 150 sviluppa malattia neuroinvasiva. Tra i pazienti con malattia neuroinvasiva, il 50-71% sviluppa encefalite, il 15-35% meningite, il 3-19% paralisi flaccida acuta [55, 88, 89].

Le infezioni hanno un decorso generalmente asintomatico (~80%). La sintomatologia ha caratteristiche largamente dipendenti dall'età del paziente: può variare da un malessere simil-influenzale a serie malattie neuro-invasive. Nei bambini si manifesta con una forma febbrile aspecifica di modesta entità; negli adolescenti e nei giovani adulti assume un andamento simile alla Dengue e si manifesta con febbre, cefalea frontale, dolore retro-orbitale, linfadenopatia, leucopenia, mialgie, esantema maculo-papuloso non pruriginoso che interessa soprattutto il tronco e si accompagna in genere ad arrossamento del volto. L'infezione, in meno dell'1% dei casi, può evolvere in una malattia neurologica severa sulla base sia della risposta immune dell'ospite [90] che del ceppo virale [91, 92] e della sua patogenicità.

Il rischio di malattia neurologica e morte è aumentato nei soggetti anziani e nei pazienti immunocompromessi; le percentuali di letalità variano dal 15 al 60% a seconda delle epidemie.

Le lesioni anatomico-patologiche nell'uomo si limitano alla presenza di foci necrotici con infiltrazione di leucociti polimorfonucleati e macrofagi a carico del sistema nervoso centrale, del fegato e del cuore.

Negli equidi il periodo di incubazione è di 3-15 giorni.

La maggior parte delle infezioni ha decorso asintomatico. In poco meno del 10% dei casi, però, i cavalli mostrano sintomatologia nervosa. I sintomi più comunemente descritti sono paresi, atassia, cadute improvvise, difficoltà nell'andatura, fascicolazione dei muscoli, cecità, ptosi delle labbra, ipereccitabilità e letargia.

La sintomatologia nervosa varia da soggetto a soggetto e dipende dall'area del sistema nervoso in cui insorgono le lesioni infiammatorie legate alla presenza del virus.

Negli equidi non sono presenti lesioni macroscopiche a carico degli organi; le lesioni sono visibili solo a livello microscopico e sono esclusivamente a carico del sistema nervoso centrale.

I segni clinici possono risolversi con guarigione in 5-15 giorni, oppure progredire rapidamente con la morte dei soggetti. In alcuni casi si preferisce sottoporli ad eutanasia.

Negli uccelli il periodo di incubazione è di 3-4 giorni, e la malattia si presenta solitamente in forma asintomatica o subclinica. Infatti, ad eccezione del Nord America, dove sono state registrate mortalità elevate, e di un episodio registrato in Israele nel 1998, nel quale mostrarono sintomatologia nervosa e morirono cicogne e oche domestiche, in Europa l'infezione da WNV negli uccelli decorre normalmente in modo asintomatico.

Qualora compaiano sintomi clinici, essi sono tipici della forma neurologica, caratterizzata da atassia, paralisi, torcicollo, opistotono, incoordinazione motoria, depressione, letargia, penne arruffate e perdita di peso.

Negli uccelli le lesioni più importanti sono caratterizzate da meningoencefalite con uno spiccato coinvolgimento delle cellule del Purkinje del cervelletto, emorragie a carico dell'encefalo, splenomegalia, miocardite, coinvolgimento epatico e renale.

La morte in genere sopraggiunge a distanza di 24 ore dalla comparsa dei sintomi nervosi.

---

### ***1.7 Prevenzione***

#### **1.7.1 Immunoprofilassi**

##### **1.7.1.1 Immunoprofilassi nei cavalli**

Nelle aree in cui la malattia è endemica, l'uso della vaccinazione permette di proteggere dalla malattia i soggetti a rischio.

Tre vaccini per l'uso nel cavallo hanno ottenuto l'autorizzazione in Stati membri dell'Unione Europea:

1. vaccino inattivato con formalina, *Duvaxyn WNV Fort Dodge*, contenente il ceppo di WNV *VM-2* che è un isolato nordamericano appartenente al *lineage 1*;
2. vaccino vivo ricombinante, *Recombitek*, che consiste di un virus vivo ricombinante del vaiolo del canarino (*Canaripox*) che coesprime la proteina di pre-membrana prM e l'envelope E dell'isolato *NY99* del *lineage 1* di WNV;

3. vaccino chimerico che utilizza un vettore vivo (*Yellow fever 17D*) in cui i geni delle proteine strutturali virali prM ed E vengono sostituiti dai corrispondenti geni del WNV.

Questi vaccini conferiscono protezione nel cavallo, prevenendo lo sviluppo di importanti manifestazioni cliniche della infezione, come le gravi sequele neurologiche. In particolare, il vaccino *Duvaxyn WNV Fort Dodge*, noto negli Stati Uniti come *West Nile-Innovator*, ha mostrato benefici superiori ai rischi nel trattamento di malattie causate dal virus West Nile nei cavalli. Numerosi studi di laboratorio, condotti per valutare la sicurezza del vaccino somministrato a puledri (dell'età di sei mesi) e a cavalle gravide, hanno dimostrato la sicurezza dell'uso del vaccino nei cavalli in generale e in animali giovani e cavalle gravide in particolare. Inoltre, numerosi esperimenti sul campo hanno confermato la sicurezza di *Duvaxyn* dimostrandone l'efficacia nel ridurre il numero di cavalli con viremia e nell'assicurare, pertanto, una protezione dalla malattia.

In uno studio di Monaco e collaboratori, pubblicato sulla *Rivista Veterinaria Italiana* nel 2019, è stata valutata la risposta immunitaria in cavalli vaccinati per la febbre del Nilo occidentale con vaccino inattivato e ricombinante.

Per valutare la risposta immunitaria alla vaccinazione sono stati scelti quaranta cavalli sierologicamente negativi al virus e divisi in due gruppi da venti unità ciascuno. Un gruppo è stato vaccinato con il vaccino inattivato *Duvaxyn WNV*, l'altro con il vaccino vivo ricombinante *Recombitek*. Entrambi i gruppi hanno ricevuto una dose di richiamo dopo 28 giorni. Per 360 giorni sono stati monitorati IgM, IgG e anticorpi neutralizzanti con ELISA specifiche per classe e test di sieroneutralizzazione. In entrambi i gruppi, gli anticorpi IgM sono stati rilevati per la prima volta 7 giorni dopo la vaccinazione (gdv), e sono risultati dosabili fino a 42 gdv nel gruppo vaccinato con il prodotto inattivato e fino a 52 gdv in quello vaccinato con prodotto ricombinante. Inoltre, entrambi i vaccini hanno indotto una risposta anticorpale IgG rilevabile a partire dal 7° gdv fino alla fine dello studio e hanno stimolato la produzione di anticorpi neutralizzanti. Tuttavia, i titoli anticorpali rilevati nel gruppo vaccinato con il vaccino ricombinante (titoli medi 1: 298) sono stati più elevati e duraturi rispetto a quelli rilevati nel gruppo vaccinato con vaccino inattivato.

Un anno dopo la vaccinazione, anticorpi neutralizzanti erano ancora rilevabili nei cavalli vaccinati con il vaccino ricombinante; nessuna rilevazione è stata registrata nei vaccinati con il vaccino inattivato [93].

L'uso di vaccini rappresenta una importante strategia preventiva contro la malattia neuro-invasiva nei cavalli [94-96].

L'anno 2018 è stato un anno importante in termini di circolazione virale nei Paesi membri dell'Unione Europea [86], con l'infezione di un numero elevato di cavalli anche nelle aree endemiche.

Pertanto, la disponibilità di diversi vaccini per l'uso nei cavalli fornisce uno strumento prezioso per ridurre l'impatto della grave sintomatologia clinica in questi animali.

### 1.7.1.2 Immunoprofilassi negli uccelli

Ad oggi, i vaccini con licenza sono disponibili per l'uso solo negli equidi.

Pertanto, la valutazione della capacità protettiva dei vaccini candidati negli uccelli, che rappresentano gli ospiti naturali e gli amplificatori del virus, può essere molto utile per controllare le epidemie da WNV.

Nello studio di De Oya, pubblicato sulla rivista *Frontiers in Microbiology* nel 2019, è stata testata l'efficacia di un vaccino basato sulla particella subvirale ricombinante del WNV (RSP) nella gazza (*Pica pica*), un membro della famiglia *Corvidae*, i cui habitat includono la terra coltivata e le aree suburbane, che è altamente suscettibile di infezione e rappresenta una specie competente di trasmissione [97]. Queste particelle ricombinanti, anch'esse riferite come particelle simil virali (VLP), risultato della co-espressione delle glicoproteine prM ed E di WNV, mimano le proprietà immunogene di tutto il virione e hanno già mostrato nel modello murino il loro potenziale come vaccino candidato per WNV [98], per il virus dell'encefalite virale trasmessa da zecche [99], per il virus dell'encefalite giapponese [100] e per il virus dell'encefalite di Murray Valley [101].

In particolare in questo studio, è stata valutata la capacità del vaccino di conferire protezione a gazze vaccinate contro una dose letale del ceppo di WNV NY99, altamente virulento in corvi americani, e la cui virulenza e patogenicità in modelli animali quali topi e gazze, sono simili a quelli dei ceppi di WNV-2 attualmente circolanti in Europa.

Gli RSP sono potenti induttori della risposta cellulare da cellule B [102, 103], essenziali per il controllo della infezione [104], e da cellule T [102, 105], importanti nella clearance virale [106]; pertanto rappresentano una scelta eccellente per lo sviluppo del vaccino. Una singola dose di vaccino è in grado non solo di proteggere parzialmente le gazze da una infezione letale, ma anche di ridurre in maniera significativa la viremia.

Il vaccino ha dimostrato un ottimo profilo di sicurezza; inoltre, la sua produzione non richiede laboratori di biosicurezza di livello 3 (BSL-3) poiché gli RSP non sono contagiosi, il che si traduce in una riduzione del costo di produzione e in una più facile manipolazione. Questo tipo di vaccino potrebbe essere usato senza interferire con i correnti programmi di sorveglianza contro WNV dal momento che potrebbe consentire la differenziazione tra animali naturalmente infetti e animali vaccinati (vaccino *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*, DIVA).

In conclusione, una singola dose del vaccino RSP protegge le gazze da WNV, provocando una risposta immunitaria neutralizzante e in grado di interferire con il ciclo del virus, riducendo i livelli di viremia e il rischio di trasmissione orizzontale.

Altri vaccini a subunità, vaccini inattivati e vaccini a DNA sono stati usati con variabile successo in diverse specie di uccelli, in particolar modo i falchi.

Uno studio di Angenvoort e collaboratori [107] del 2014 ha valutato l'efficacia e la sicurezza di 2 vaccini disponibili in commercio approvati per l'uso in cavalli: *Duvaxyn WNV Fort Dodge* e *Recombitek Equine Rwnv* in grandi falchi che, per lo scopo, sono stati trattati con 2 o 3 dosi di vaccino.

Così come per i cavalli, dallo studio è emerso che il vaccino ricombinante conferisce una protezione leggermente più alta rispetto al vaccino inattivato, ma moderati effetti collaterali per il vaccino ricombinante e deboli effetti per il vaccino inattivato sono stati osservati in corrispondenza del sito di iniezione. Entrambi i vaccini, con la somministrazione di una doppia dose, hanno stimolato una risposta anticorpale sub-ottimale e hanno conferito solo una parziale protezione nei confronti del virus. Risultati migliori, in termini di riduzione di viremia e di segni clinici, sono stati ottenuti per entrambi i vaccini con una terza dose.

Ad ogni modo, nonostante i livelli di viremia dopo la vaccinazione con entrambi i vaccini si dimostrano sotto ai limiti di trasmissibilità del virus agli artropodi (che può essere considerato un approccio indiretto addizionale di protezione), sono necessari ulteriori studi per determinare la longevità dell'effetto protettivo della vaccinazione e una possibile cross-protezione dei falchi nei confronti del *lineage 2* di WNV.

Nel 2004 è stato autorizzato in Israele un vaccino inattivato per le oche. Nel Novembre 2008 la Commissione europea ha rilasciato un'autorizzazione, valida in tutta l'Unione europea, per l'immissione in commercio del vaccino inattivato da utilizzare nei cavalli di oltre 6 mesi di età. In Italia il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche

Sociali con l'ordinanza del 5 novembre 2008 ha approvato l'impiego della vaccinazione facoltativa degli equidi a carico dei proprietari/detentori.

### 1.7.1.3 Immunoprofilassi nell'uomo

Dalla (ri)emergenza del virus di West Nile nel 1990, la ricerca è stata investita nello sviluppo di vaccini ad uso umano e veterinario. Mentre per i cavalli diversi vaccini sono stati licenziati, per l'uomo ancora non ne è disponibile alcuno.

Un vaccino per l'uomo dovrebbe indurre alti titoli di anticorpi neutralizzanti, i quali rivestono un ruolo cruciale nel contrastare la viremia e ridurre la disseminazione virale [104].

Anche le cellule T hanno dimostrato un importante ruolo nella *clearance* della infezione e nel prevenire la disseminazione del virus [108, 109]; tuttavia, il loro ruolo protettivo è stato messo in discussione in diversi studi.

Diverse piattaforme tecnologiche sono state impiegate per lo sviluppo di vaccini contro WNV, in aggiunta a tecnologie nuove e altamente sofisticate, che includono proteine ricombinanti, particelle simil virali, Flavivirus chimerici, vettori virali che esprimono i geni di WNV, vaccini a DNA e a RNA.

La principale componente della risposta immune protettiva di tutti i vaccini candidati fino ad ora descritti è rappresentata dagli anticorpi contro la proteina E, che conferiscono protezione nei confronti dei due principali *lineages* virali.

Tra i vaccini candidati per WNV, due sono costituiti da virus intero e inattivato.

Il vaccino inattivato *HydroVax-001*, sviluppato da un *team* di ricerca dell'Università dell'Oregon ed entrato in uno studio clinico di fase I nel 2015, è basato su un approccio di inattivazione con perossido di idrogeno, risultato molto efficace se confrontato con approcci convenzionali, come la formaldeide o il beta-propiolattone.

Topi vaccinati con virus inattivato con  $H_2O_2$  hanno mostrato titoli anticorpali neutralizzanti specifici per il virus, conferendo una protezione totale nei riguardi della infezione. Questo studio ha dimostrato che i vaccini a base di  $H_2O_2$  sono altamente immunogenici, forniscono protezione contro una serie di agenti patogeni virali nei topi e rappresentano un promettente nuovo approccio al futuro sviluppo del vaccino.

Altro vaccino inattivato con formaldeide, che ha portato dopo tre dosi alla comparsa di anticorpi neutralizzanti, è in uno studio clinico di fase I/II.

Il vaccino *ChimeriVax-WN02*, un vaccino chimerico umano vivo attenuato, sviluppato da Sanofi Pasteur e prodotto attraverso l'inserimento delle proteine prM e E del WNV

(ceppo *NY99*) nel virus della febbre gialla, ha mostrato una buona tollerabilità e un'alta immunogenicità in uno studio di fase I in volontari in salute di età compresa fra 18 e 40 anni [110]. La maggior parte dei soggetti ha sviluppato un basso livello di viremia transiente; livelli di viremia più alti sono stati osservati in soggetti che hanno ricevuto una dose più bassa di vaccino.

Due *trial* clinici di fase II sono stati, inoltre, completati con risultati promettenti in giovani adulti e in due gruppi di età avanzata [111].

Un altro vaccino vivo e attenuato, *rWN/DEN4Δ30*, è stato sviluppato dall'Istituto Nazionale di Allergie e Malattie Infettive degli Stati Uniti (NIAID) attraverso l'inserimento dei geni prM ed E di WNV in un ceppo vaccinale di Dengue attenuato (*DENV4Δ30*). La chimerizzazione di West Nile con un Flavivirus non neuro-invasivo ha portato alla attenuazione del virus e alla induzione di una forte risposta immunitaria in topi, oche e macachi. Questo vaccino candidato è stato testato in due *trials* clinici di fase I, inducendo un tasso di sieroconversione contro WNV superiore all'80% in soggetti volontari partecipanti allo studio [112].

Il Centro di Ricerca Vaccinale (VRC) ha sviluppato un vaccino costituito da DNA plasmidico (*VRC-302*) modificato in modo da esprimere le proteine prM ed E di WNV. Nel 2005 uno studio clinico di fase I ha dimostrato sicurezza e immunogenicità vaccinale nell'uomo. Inoltre, tutti i soggetti hanno sviluppato anticorpi neutralizzanti a livelli comparabili a quelli protettivi per i cavalli. Per incrementare l'immunogenicità del vaccino, il promotore è stato modificato e testato durante un secondo *trial* di fase I (*VRC-303*), che ha indotto una risposta cellulare ben più forte rispetto a *VRC-302*.

L'azienda *Hawaii Biotech*, invece, si è concentrata sullo sviluppo di un vaccino a subunità (*HBV-002*) contenente la proteina prM e l'E troncato di WNV (*WN-80E*). Uno studio clinico di fase I intrapreso con volontari *naive* a 25 Flavivirus noti, ha mostrato una buona tollerabilità del vaccino e alti titoli di anticorpi neutralizzanti. Ulteriori studi stanno valutando la sicurezza del vaccino in soggetti giovani e adulti.

La malattia indotta da WNV è più severa nei soggetti anziani, perciò la principale popolazione *target* per il vaccino ha un sistema immune non più giovane. Questo rappresenta un *challenge* per gli sviluppatori di vaccini riguardo a immunogenicità e sicurezza. Gli antigeni altamente immunogeni in un sistema immunitario pienamente funzionale potrebbero richiedere dosi più alte o più dosi durante la immunosenescenza. Inoltre, un sistema immune con ridotta funzionalità delle cellule T potrebbe non essere abile a limitare la replicazione di un vettore o di un virus che è normalmente attenuato. I

vaccini candidati costituiti da virus vivo hanno dimostrato alta immunogenicità in individui con più di 50 anni di età, e simili risultati sono stati riportati da un *trial* di fase I per l'impiego di un vaccino a DNA.

Date le complesse interazioni immunitarie tra i diversi Flavivirus e la loro complessità biologica, approcci vaccinali basati sull'utilizzo del vettore potrebbero offrire una soluzione al controllo delle arbovirosi, sfruttando una variabile comune rappresentata dalla saliva. Poiché la risposta naturale dell'ospite umano alla saliva del vettore potrebbe promuovere l'infettività dei patogeni in essa presenti, portando ad un'infezione sistemica, la vaccinazione con la saliva di artropodi potrebbe creare un ambiente immune, con conseguente blocco della trasmissione o la distruzione del patogeno. La saliva della zanzara, oltre ad una miscela di vasodilatatori, anticoagulanti e altri componenti antiemostatici, contiene proteine che modulano sia la risposta immune innata che quella adattativa dell'ospite; pertanto, l'identificazione di proteine salivari responsabili dell'immunomodulazione, rappresenta una potenziale strategia per proteggere dalle arbovirosi, creando nell'ospite vertebrato un ambiente favorevole all'infezione.

In particolare, la saliva è in grado di smorzare la risposta immune antivirale Th1, associata alla protezione da virus e parassiti, e di indurre un incremento dei livelli delle citochine Th2, che mediano le risposte allergiche; i suoi effetti immunomodulatori operano a livello locale.

In generale, ad oggi pochi sono i lavori in cui è stata valutata l'efficacia di vaccini basati su proteine salivari della zanzara (mosquito salivary proteins, MSP), sebbene diversi trial clinici di fase I siano in corso su volontari sani che vivono in aree non endemiche.

Uno studio condotto da Machain Williams e collaboratori e pubblicato nel 2013 sulla rivista *Viral Immunology*, ha mostrato in topi vaccinati con estratti di ghiandola salivare di *Culex tarsalis* e successivamente punti da zanzara infetta con WNV, una diminuzione dei titoli virali nel cervello nelle prime fasi dell'infezione [113]. Questi risultati hanno suggerito che l'immunizzazione con un vaccino basato su MSP potrebbe potenzialmente neutralizzare l'immunomodulazione indotta dalla saliva e proteggere l'ospite dall'infezione.

In un altro studio, condotto dagli stessi autori e pubblicato sulla rivista *Plos Neglected Tropical Diseases*, è stato selezionato come candidato vaccino contro West Nile un membro della famiglia di proteine D7, che rappresentano le proteine più abbondanti (tra il 5 e il 20% di tutte le proteine salivari) e immunogene nella saliva delle zanzare, e

sono espresse in maniera specifica nelle ghiandole salivari di femmine adulte di Ditteri ematofagi. Dopo essere state identificate le proteine D7 di *Culex tarsalis*, un vettore di WNV nel Nord America, è stata selezionata una proteina della famiglia, del peso molecolare di 36 KD, che presenta una identità di sequenza amminoacidica dell'85% con proteine salivari di *Culex pipiens*; a questo punto, è stata prodotta la proteina D7 ricombinante (rD7) da utilizzare come vaccino, attraverso il clonaggio del gene per la proteina in un vettore di espressione contenente i segnali per l'inizio della trascrizione e della traduzione. Topi vaccinati hanno mostrato una incrementata espressione dell'interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) e una riduzione dell'espressione dell'interleuchina-10 (IL-10) a seguito della puntura di una zanzara non infetta; tuttavia, inaspettatamente, la vaccinazione con rD7 ha portato ad una più severa patogenesi dell'infezione da WNV, con conseguente incrementata mortalità dell'ospite. La patogenesi più severa potrebbe essere spiegata dagli alti livelli circolanti di anticorpi contro le proteine salivari, che andrebbero ad impedire il pasto di sangue attraverso la neutralizzazione delle funzioni vasodilatatorie e di inibizione piastrinica. Conseguentemente, aumenterebbe il tempo di esposizione al vettore, con un maggior accumulo di saliva contenente il virus e un aumento della dose iniziale del virus infettivo [114].

Pertanto, la selezione delle proteine salivari come candidato vaccino, sulla base della loro abbondanza e immunogenicità, non è in grado di predirne l'efficacia, e studi futuri dovrebbero concentrarsi su altre proteine.

Questi risultati illustrano la complessa natura della risposta immunitaria alle proteine salivari e gli effetti sulla trasmissione e l'infezione da arbovirus, fornendo importanti informazioni per studi futuri nel campo degli effetti immunomodulatori della saliva delle zanzare.

Un vaccino umano per WNV dovrebbe essere già sul mercato o almeno nelle fasi finali di sviluppo clinico. Tuttavia, nessuno degli studi clinici intrapresi ha superato lo stadio II e al momento non c'è ancora nessun candidato prossimo alla licenza.

Le odierne strategie di prevenzione si basano su programmi di controllo delle zanzare. Sebbene siano strategie molto più economiche rispetto ai vaccini, i quali richiedono un lungo e dispendioso sviluppo clinico, la loro efficacia è transiente. L'immunizzazione rappresenterebbe, invece, un metodo sostenibile e di lunga durata per proteggere i soggetti maggiormente esposti dalla malattia causata dal virus.

WNV rimane una minaccia significativa per gli esseri umani in molte parti del Mondo. Il suo potenziale di causare epidemie in nuove aree è allarmante, come dimostrato dal

recente *outbreak* italiano del 2018, che ha causato più di 500 casi di infezione. La capacità del virus di acquisire mutazioni che portano ad una maggiore virulenza, accoppiata alla sua flessibilità nell'usare varie specie di zanzare come vettori e diverse specie di uccelli come ospiti amplificatori, rende le epidemie estremamente imprevedibili. Il riscaldamento globale e l'aumento del traffico di animali e merci sono fattori aggiuntivi che favoriscono l'ulteriore diffusione virale. Di conseguenza, un vaccino umano sarebbe essenziale per affrontare questa minaccia globale. Come precedentemente descritto, sono state sviluppate numerose tecnologie per la vaccinazione contro questo virus, che conferiscono protezione e sicurezza; tuttavia, alcuni problemi hanno impedito la trasformazione di questi candidati in prodotti commerciabili fino ad ora. Per aumentare l'efficacia in termini di costi, i vaccini candidati devono essere ottimizzati per i bassi costi di produzione e l'efficacia a lungo termine su un regime di vaccino monodose. Per evitare potenziali interferenze delle risposte immunitarie a diversi tipi di malattie, i candidati vaccini dovrebbero essere privi di epitopi che portano al legame degli anticorpi cross-reattivi, come quelli anti febbre gialla nei vaccinati. Infine, per le difficoltà nella pianificazione di *trials* efficaci, le procedure di autorizzazione devono essere adattate, in modo simile ai vaccini contro altre infezioni (ri) emergenti.

### 1.7.2 Profilassi ambientale

Nelle aree in cui la malattia è endemica devono essere messe in atto strategie volte alla riduzione della circolazione del virus, attraverso misure che agiscano sulla densità dei vettori (riduzione delle raccolte di acqua stagnante, esecuzione di trattamenti adulticidi e larvicidi) e che riducano le possibilità di contatto tra vettori ed ospiti recettivi (applicazione di repellenti, zanzariere).

Per le caratteristiche epidemiologiche della malattia (dispersione legata agli uccelli migratori, stretto legame con le condizioni ambientali e climatiche) e per la distribuzione mondiale, la WND è da considerarsi a costante rischio di introduzione nell'Europa centro-meridionale. In tali aree i sistemi di allerta rapida rappresentano gli strumenti fondamentali da utilizzare al fine di riconoscere precocemente la circolazione virale e quindi di mettere in atto tutte le misure preventive che siano in grado di limitare la diffusione dell'infezione, in particolare attraverso la trasfusione di sangue o

emoderivati. Un tale sistema è stato istituito nel nostro Paese con il Piano di Sorveglianza previsto nell'ordinanza ministeriale del 4 aprile 2002 ed aggiornato con il decreto ministeriale del 29 novembre 2007. Tale Piano prevede le seguenti attività:

1. individuazione delle aree a rischio;
2. istituzione di una rete di animali sentinella (polli) che vengono testati ogni 15 giorni al fine di evidenziare precocemente la circolazione virale;
3. sorveglianza sull'avifauna selvatica al fine di evidenziare eventuali anomalie nelle cause di mortalità;
4. sorveglianza entomologica al fine di conoscere la presenza/assenza delle specie di vettori e delle densità di popolazione;
5. esecuzione del test sierologico su un numero di cavalli statisticamente significativo due volte l'anno, al fine di evidenziare l'eventuale pregressa circolazione virale e valutare a posteriori l'efficacia del sistema di allerta rapido;
6. notifica di sintomatologia clinica neurologica negli equidi;
7. istituzione di un sistema informativo telematico.

### **1.7.3 Sorveglianza epidemiologica**

Considerata la complessità del ciclo biologico di WNV, la sorveglianza della sua circolazione richiede l'interazione tra diverse professionalità e competenze e l'integrazione dei sistemi di sorveglianza in ambito veterinario (sorveglianza entomologica e animale) ed umano.

L'obiettivo generale della sorveglianza integrata consiste nell'individuare precocemente la circolazione virale sul territorio nazionale negli uccelli selvatici o negli insetti vettori, al fine di mettere in atto in maniera tempestiva tutte le misure disponibili per prevenire la trasmissione all'uomo.

Le attività di sorveglianza previste per il WNV sono integrate con quelle per USUV, un arbovirus con cui West Nile condivide il ciclo biologico. Pertanto, il rilievo di circolazione di USUV fornisce un'indicazione utile anche sul rischio di trasmissione di WNV nelle medesime aree geografiche.

Le attività di sorveglianza entomologica sono svolte dalla rete degli Istituti Zooprofilattici (IZS) presenti su tutto il territorio nazionale. Nelle aree oggetto di sorveglianza deve essere posizionata almeno una trappola e le catture devono essere effettuate con cadenza quindicinale nel periodo da aprile a novembre.

I campioni raccolti devono essere inviati all'IZS competente per territorio che provvede ad effettuare l'identificazione degli esemplari catturati e la preparazione di appositi *pool* composti da un massimo di 200 esemplari della stessa specie. Su questi campioni devono essere eseguiti i test RT-PCR specifici per WNV e USUV. In caso di positività ad uno dei due test RT-PCR, i campioni (omogenato del *pool* di insetti e relativo RNA) devono essere inviati al centro studi malattie esotiche (CESME) per gli esami di conferma che devono essere effettuati entro 7 giorni lavorativi dal ricevimento del campione. In caso di positività, le informazioni ottenute vengono trasmesse al Ministero della Salute.

La sorveglianza animale viene condotta su allevamenti avicoli, su uccelli ritrovati morti e su cavalli. Tutti i casi sospetti devono essere confermati dal CESME.

La sorveglianza epidemiologica dei casi umani di malattia da virus West Nile è regolata dalla circolare ministeriale “Piano nazionale integrato di prevenzione, sorveglianza e risposta ai virus West Nile e Usutu – 2019” pubblicata dal ministero della Salute il 5 aprile 2019.

Il periodo di sorveglianza epidemiologica dei casi umani importati e autoctoni si estende per tutto l'anno su tutto il territorio nazionale e dai primi di maggio a tutto novembre in tutte le Regioni nelle quali sia stata identificata un'area endemica.

Il sistema di sorveglianza deve essere particolarmente tempestivo per permettere l'adozione immediata delle necessarie misure di controllo.

Anche il Centro Nazionale Sangue emana le indicazioni per la sorveglianza e la prevenzione della trasmissione dell'infezione mediante la trasfusione di emocomponenti labili. Le indicazioni sono mirate a prevenire e ridurre il rischio di trasmissione trasfusionale dell'infezione.

La sorveglianza umana è coordinata a livello nazionale dall'Istituto superiore di sanità (ISS) e dal ministero della Salute che trasmette i dati alla Commissione europea e all'ECDC. Le Regioni, in piena autonomia, definiscono i documenti normativo-programmatici per la sorveglianza epidemiologica e di laboratorio sul loro territorio e trasmettono i dati all'ISS e al Ministero. Il Dipartimento di Malattie Infettive dell'ISS, con il coordinamento del Ministero della Salute e in collaborazione con il CESME dell'IZS dell'Abruzzo e del Molise “Giuseppe Caporale”, pubblica i dati del sistema di sorveglianza in un bollettino periodico.

### 1.7.4 Lotta al vettore

Una efficace prevenzione della infezione causata dal virus di West Nile dipende dallo sviluppo di programmi integrati di controllo e di sorveglianza del vettore che dovrebbero essere mirati alla identificazione delle specie di zanzare locali che giocano un ruolo nella trasmissione del virus.

Le misure di controllo attualmente in uso per la lotta al vettore sono i trattamenti con prodotti chimici (larvicidi e pesticidi) e i metodi di controllo biologico.

Gli interventi con larvicidi consistono nella distribuzione periodica nei focolai larvali di prodotti ad azione larvicida, che sono disponibili in diverse formulazioni e possono essere di natura chimica o microbiologica.

I larvicidi di sintesi chimica sono a base di principi attivi appartenenti alla categoria dei regolatori di crescita degli insetti (IGR) e possono avere effetti tossici anche nei confronti della fauna acquatica non bersaglio, pertanto il loro impiego è limitato a quei particolari focolai caratterizzati da una scarsa biodiversità in conseguenza della qualità scadente dell'acqua in essi presente.

I larvicidi microbiologici disponibili sono a base di *Bacillus thuringiensis israelensis* e di *Bacillus thuringiensis israelensis* in combinazione con il *Bacillus sphaericus* [115].

Di recente è disponibile sul mercato un prodotto a base di silicone (polidimetilsilossano - PDMS), che forma un film molto sottile sulla superficie dell'acqua e, agendo per azione fisico-meccanica, impedisce lo sviluppo delle larve e delle pupe.

Il trattamento adulticida, regolato dal Piano Regionale di Sorveglianza e Controllo delle Arbovirosi, deve essere attivato solo in presenza di rischio sanitario accertato, quindi nelle situazioni in cui è in corso una epidemia e non come forma preventiva: l'adulticida risulta efficace nei confronti delle popolazioni di zanzara presenti in un determinato ambiente nel momento dell'intervento stesso, senza garantire una protezione persistente. Pertanto, il suo impiego in assenza del bersaglio è assolutamente da evitare.

I trattamenti adulticidi possono essere effettuati all'interno degli edifici, in caso di infestazioni moleste da parte del vettore, e all'esterno. Il rimedio *indoor* più opportuno ed efficace è rappresentato dalla presenza di barriere fisiche (zanzariere collocate alle finestre e alle porte) o insetticidi aerosol in bombolette spray, per piccoli ambienti.

Il trattamento adulticida *outdoor* è un'opzione a cui ricorrere solo nel caso di comprovato elevato rischio sanitario (linee guida per la lotta integrata alle zanzare vettrici del virus West Nile).

Tuttavia, gli allarmanti tassi di resistenza agli insetticidi nelle popolazioni di insetti hanno indotto allo sviluppo di una nuova generazione di strategie specifiche in grado di ridurre la trasmissione mediata da vettori.

Studi recenti in vitro hanno dimostrato che la trasmissione del virus al vettore può essere impedita attraverso la coinfezione con il batterio *Wolbachia pipientis*, un endosimbionte che si trova comunemente negli insetti. In *Drosophila*, ad esempio, *Wolbachia* media la protezione antivirale contro un'ampia gamma di virus a RNA [116]. Sperimentalmente si è visto che la zanzara infettata con questo parassita ha una aspettativa di vita più bassa, produce prole e uova meno vitali, impedendo lo sviluppo al suo interno del virus e quindi la trasmissione.

In alcuni studi, però, si è anche visto che il germe, anziché rallentare la capacità della zanzara di trasmettere l'agente infettivo, l'aumenta o è in grado di stimolare la diffusione di un altro. Inoltre, la capacità del *Wolbachia* di trasmettersi per via orizzontale dalla zanzara ad altri insetti potrebbe avere effetti non prevedibili su organismi diversi dalla zanzara.

Pertanto, occorrerà valutare attraverso studi futuri l'efficacia di questa strategia.

Attualmente sono state proposte anche strategie di controllo genetico (tecnologia CRISP-CAS9) volte a ridurre la competenza vettoriale per il patogeno e a sopprimere le popolazioni di insetti diffondendo la sterilità [117].

---

### ***1.8 Diagnosi di infezione da WNV***

Con lo sviluppo delle metodiche di biologia molecolare nel 1980, la diagnosi di laboratorio delle infezioni virali è passata dal tradizionale isolamento virale in coltura cellulare, che può richiedere da qualche giorno a diverse settimane, alla rilevazione molecolare dei genomi virali, che può essere effettuata in poche ore.

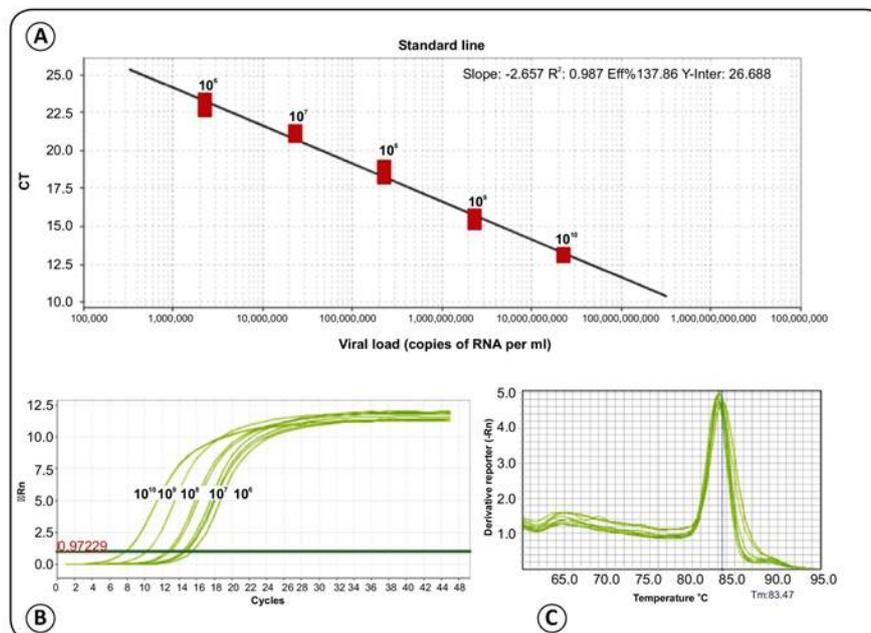
L'infezione acuta da West Nile nell'uomo può essere diagnosticata attraverso la ricerca dell'RNA virale in campioni ottenuti da pazienti sintomatici. Inoltre, dal momento che un mezzo di infezione documentato, anche se molto raro, è rappresentato da trapianti di organo e trasfusioni di sangue [118], lo screening dei donatori che vivono in aree endemiche è importante per l'identificazione dei campioni infetti.

La trasmissione del virus durante le donazioni di sangue e di organi è stata documentata negli Stati Uniti, in Canada, in diverse Nazioni nell'Unione Europea e in Israele,

pertanto lo screening dei donatori viene effettuato annualmente in tutte quelle Nazioni dove la circolazione virale è endemica, per valutare e ridurre il rischio di trasmissione della infezione. Test commerciali di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) sono disponibili sul mercato e permettono di testare un centinaio di campioni di plasma al giorno. Tuttavia, questi test, per via della bassa carica virale che può essere presente in donatori di sangue asintomatici e in salute, necessitano di rilevare il virus con una maggiore sensibilità e specificità.

In anni recenti, il rilevamento del genoma virale in fluidi corporei attraverso *Real-Time PCR* è diventato il metodo diagnostico di routine per molte infezioni virali, per gli alti livelli di ripetibilità e riproducibilità, l'alta sensibilità e specificità, i tempi rapidi e la semplicità di esecuzione.

La *Real-Time PCR* misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale.

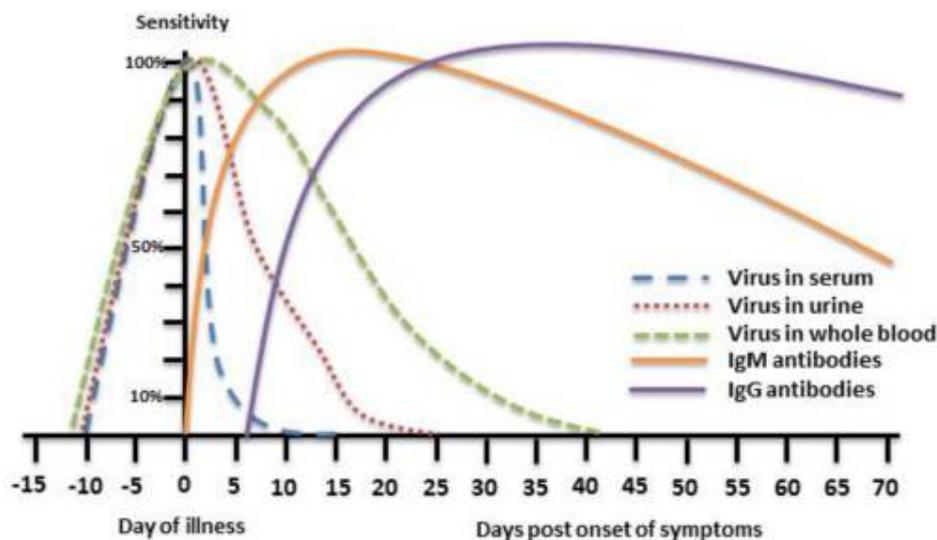


**Figura 12:** Real-time RT-PCR **A)** Linea standard con diluizioni decimali seriali di RNA di Flavivirus; **B)** Curva di amplificazione; **C)** Analisi delle curve di *melting* [119].

Sfortunatamente, però, per la maggior parte delle malattie causate da Flavivirus, incluso WNV, la diagnosi molecolare attraverso Real-Time PCR di campioni di siero, plasma, liquido cerebrospinale è di limitato valore per la diagnostica di routine, per via del basso

livello e della breve durata della viremia generata da questi virus [120]. Recentemente, diversi studi hanno dimostrato che WNV è trattenuto nei reni e può essere rilevato in campioni di urine per un periodo di tempo più lungo rispetto che in campioni di plasma, siero o liquido cerebrospinale [121, 122]. Inoltre, dal momento che il virus aderisce ai globuli rossi [123], può persistere per mesi nel sangue intero dei donatori [124].

Attualmente, la diagnosi di infezione da WNV viene effettuata principalmente attraverso analisi sierologiche. La ricerca delle immunoglobuline M (IgM) e G (IgG) può essere condotta rispettivamente a partire dal 4° e dall'8° giorno dall'esordio della sintomatologia clinica e il riscontro di soli anticorpi IgM o di una seroconversione IgG può essere indice di infezione acuta. Numerosi *kit* commerciali per la ricerca degli anticorpi contro WNV sono disponibili, e sono basati primariamente sulla rilevazione di specifici anticorpi contro la proteina *envelope* del virus, usando saggi di immunoenzimatica (ELISA) o di immunofluorescenza (IFA). I vantaggi di questi saggi qualitativi sono la semplicità d'uso, la riproducibilità e l'automazione.



**Figura 13:** Fasi di rilevamento del virus in siero, urine, sangue intero e risposta anticorpale (IgM e IgG) all'infezione rispetto ai giorni di malattia [125].

Ad ogni modo, dal momento che le IgM di WNV possono persistere nel siero per mesi o anche anni dopo l'infezione, ed esiste una significativa cross-reattività tra tutti i Flavivirus, spesso è difficile fare diagnosi di infezione acuta da WNV con il solo utilizzo di questi *kit* commerciali. Per validare i risultati iniziali, occorre effettuare saggi di neutralizzazione, che determinano l'abilità degli anticorpi presenti nel campione del

paziente di neutralizzare il virus, consentendo di valutare l'efficienza di neutralizzazione anticorpo-virus e di discriminare eventuali cross-reazioni dovute ad anticorpi diretti contro altri Flavivirus. Ad oggi, i saggi di neutralizzazione rappresentano il gold standard per la diagnosi di infezione da WNV. Diversi protocolli di neutralizzazione sono disponibili sul mercato; essi presentano simile *performance* e differiscono per sensibilità e per metodo di rilevamento dell'effetto citopatico (diretto, colorimetrico, immunofluorescente).

Il test di neutralizzazione è il metodo maggiormente specifico, anche se molto più complesso ed indaginoso (e quindi di solito riservato ai laboratori di riferimento), e viene condotto previa titolazione virale.

La titolazione viene eseguita per stabilire la quantità di virus presente in una determinata preparazione al fine di stabilire la diluizione che servirà per l'esecuzione del test di neutralizzazione.

La titolazione e la neutralizzazione possono essere eseguite in crescita o per placche.

A partire da una diluizione 1:10 dalla sospensione virale vengono fatte varie diluizioni logaritmiche in micropiastre da 96 pozzetti per colture cellulari.

Se la titolazione viene fatta in crescita, alle varie diluizioni del virus verranno successivamente aggiunte le cellule VERO E6 risospese in terreno di crescita. La miscela virus/cellule viene incubata a 37°C per 3 giorni. La lettura viene fatta al microscopio andando a valutare l'effetto citopatico del virus sulle cellule.

Il titolo virale è calcolato in base alla più alta diluizione alla quale si ottiene un CPE 4+, ovvero il titolo lo si sceglie in base all'ultima diluizione che da ancora un effetto citopatico di 4+. 4+ vuol dire che la maggior parte delle cellule sono infettate, ma non tutte.

Se si utilizza il test delle placche, le stesse diluizioni del virus vengono inoculate su micropiastre con monostrato di cellule VERO E6 precedentemente preparato. Dopo l'incubazione a 37°C, viene tolto l'inoculo e aggiunto un terreno semisolido a base di agar che blocca la liberazione del virus nel terreno e fa sì che l'infezione passi solo da cellula a cellula formando la placca. In questo caso il titolo viene calcolato scegliendo un numero contabile di placche da utilizzare nel test di NT.

Le placche possono essere contate al microscopio senza colorazione oppure possono essere colorate con cristal violetto.

Il titolo virale si ottiene facendo la media delle placche di lisi ottenute con le varie diluizioni. Infine, dato che generalmente si infetta con 50 µl di sospensione virale, il

titolo virale ottenuto sarà moltiplicato per 20 (dato che la concentrazione è in ml), e poi per l'inverso dell'ultima diluizione che forma placche. L'unità di misura è il PFU (unità formante placca)/ml.

Alla titolazione virale fa seguito il test di neutralizzazione, che serve a determinare nel siero del paziente il titolo di anticorpi neutralizzanti, i più importanti in grado di neutralizzare il virus. Una volta sviluppati dopo la prima infezione, sono in grado di bloccare il virus quando lo si incontra nuovamente. Nelle infezioni primarie dei pazienti immunodepressi per trapianto d'organo, a volte si sviluppano anche dopo alcuni mesi assieme all'immunità cellulo-mediata, e questi pazienti non riescono a controllare l'infezione.

Il test di neutralizzazione consiste nel mettere a contatto 50 µl di siero/plasma alle varie diluizioni con 50µl di virus alla diluizione stabilita con la titolazione, e 50 µl di cellule VERO E6 se fatta in crescita. Se si utilizza il test delle placche, la miscela virus/anticorpi verrà inoculata in micropiastre con cellule confluenti precedentemente preparate. Si valuterà la riduzione dell'effetto citopatico virale (CPE) o la riduzione delle placche di lisi che si formano a seguito della infezione.

Il conteggio è più facile nel test con le placche, per cui, dato un certo numero di placche nel controllo virus, per stabilire il titolo del siero del paziente, si conta dove c'è una riduzione del 50% delle placche. Se invece la lettura si fa per CPE si deve valutare quando il CPE nel siero del paziente è circa la metà di quello presente nel controllo virus. In sintesi il titolo, nel caso della neutralizzazione valutata come CPE, è la massima diluizione del siero in grado di neutralizzare il 50% del virus presente nel controllo. Nel caso della neutralizzazione per placche, invece, si conta quante placche sono presenti nel controllo virus, e il titolo è dato dalla massima diluizione del siero che riduce del 50% queste placche.

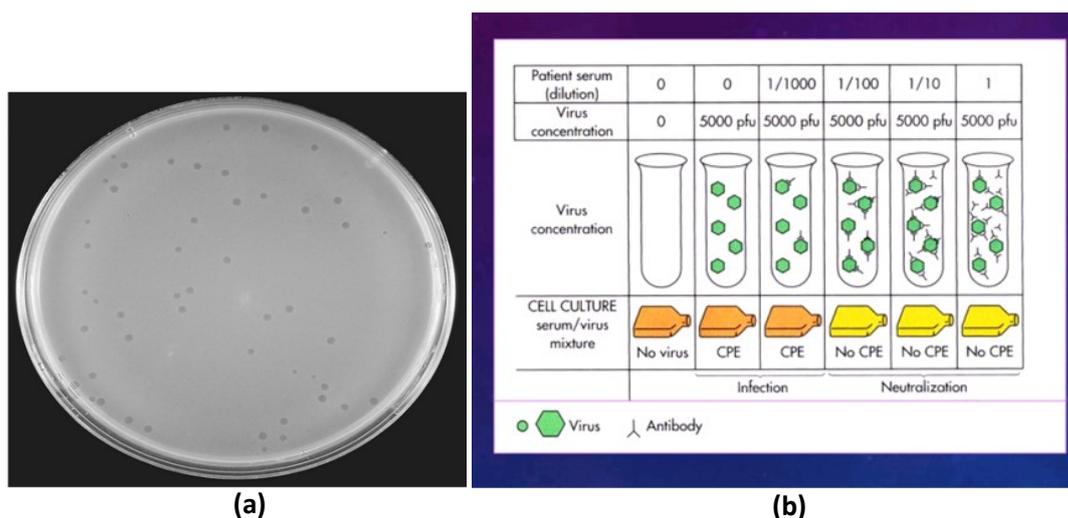


Figura 14: (a) Placche di lisi; (b) Rappresentazione schematica del test di neutralizzazione per il virus WNV.

I metodi molecolari, che hanno come obiettivo la ricerca dell'RNA virale attraverso *Real-Time PCR*, continuano ad essere i metodi diagnostici più utilizzati per la diagnosi di infezione. Tuttavia, l'avvento negli ultimi anni di metodiche di *Next Generation Sequencing* (NGS), ha portato ad un incrementato uso dell'NGS nella diagnosi e nel monitoraggio di malattie infettive causate sia da batteri che da virus. La più importante applicazione diagnostica dell'NGS è probabilmente rappresentata dalla identificazione di patogeni in campioni clinici. Riguardo a WNV, uno studio ha riportato l'identificazione del virus attraverso NGS in un campione di liquido cerebrospinale di un paziente di 14 anni di età con meningoencefalite [126]. In un altro studio recente, campioni di plasma da 12 casi di malattia febbrile inspiegabile in Tanzania, sono stati investigati attraverso l'utilizzo di metodiche NGS e il virus è stato identificato in due di questi campioni [127]. Questi esempi dimostrano il valore aggiunto dell'NGS nella diagnosi di virus con viremia di breve durata, come West Nile. NGS può, inoltre, essere usato in altri ambiti, come investigazioni epidemiologiche e ricerche, come nel caso della presente tesi di dottorato.

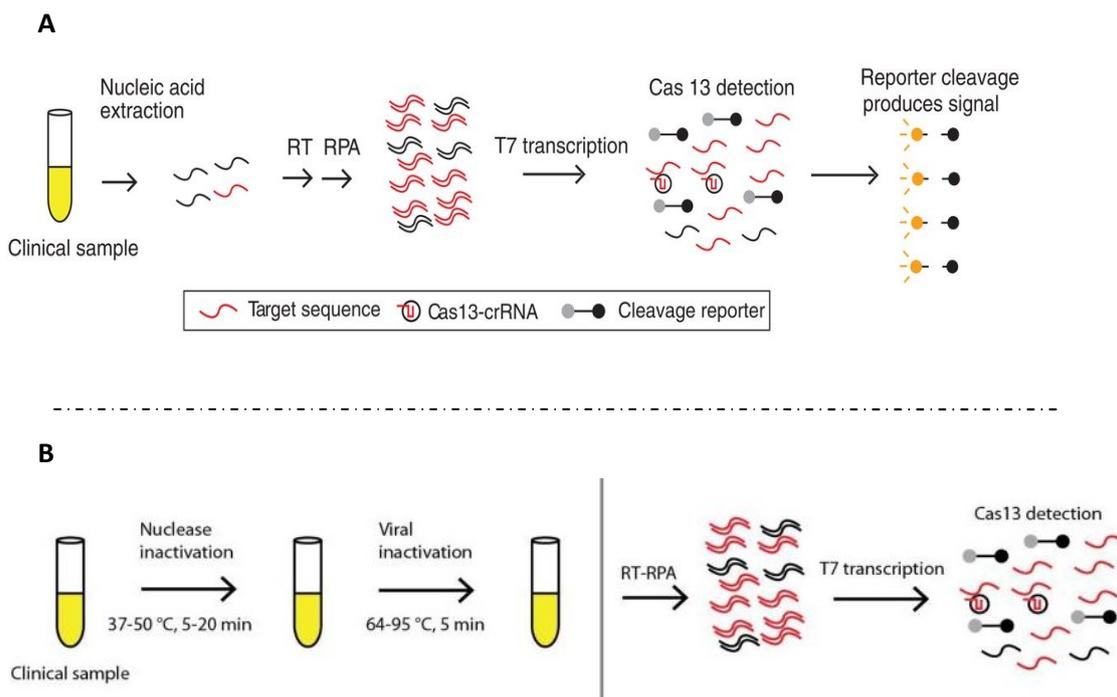
Recentemente è stata sviluppata una nuova piattaforma diagnostica per la individuazione dell'RNA di Flavivirus a partire da fluidi corporei.

Questa piattaforma, definita *Sherlock* (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing), ha il potenziale per affrontare le principali sfide associate alla diagnostica virale. Essa è capace di identificare le infezioni in modo sensibile e specifico e in particolare è in grado di rilevare ZIKV e DENV in campioni di pazienti a concentrazioni fino a 1 copia/μl [128].

*Sherlock* si basa sulla tecnologia CRISP-CAS13, che origina da CRISP, il sistema di *editing* dei genomi oggi usato per identificare gli acidi nucleici di virus e batteri patogeni. CRISP-CAS13 prevede l'utilizzo di una variante di CAS9 detta CAS13a (o C2c2), una ribonucleasi che prende di mira l'RNA tramite una molecola guida CRISPR RNA (crRNA) che fornisce specificità alla reazione, indirizzando verso i bersagli prescelti, tra cui i Flavivirus, alcuni batteri patogeni resistenti e cellule tumorali con particolari mutazioni. L'utilizzo di molecole che rilasciano un segnale fluorescente consente di evidenziare la reazione e amplificare l'RNA per potenziare la sensibilità del metodo. Il nuovo approccio è stato messo alla prova con successo con campioni di siero, saliva e urina. I vantaggi rispetto ai test classici sembrano convincenti. Secondo gli autori dello studio, infatti, bastano pochi giorni per adattare la piattaforma *Sherlock* a uno specifico bersaglio. Inoltre i reagenti possono essere liofilizzati, consentendo una conservazione indipendente dalla catena del freddo, per poi essere ricostituiti rapidamente per le applicazioni sul campo.

Sebbene *SHERLOCK* sia in grado di rilevare gli acidi nucleici estratti, un test diagnostico rapido non dovrebbe richiedere una fase di estrazione. Pertanto, per rilevare l'acido nucleico direttamente dai fluidi corporei tramite *SHERLOCK*, è stato sviluppato un metodo, definito *HUDSON*, in grado di lisare le particelle virali e inattivare gli alti livelli di RNasi presenti nei fluidi sani attraverso l'utilizzo del calore.

In conclusione la piattaforma diagnostica *Sherlock*, associata a *Hudson*, ha mostrato una alta *performance*, richiedendo un processamento minimo dei campioni e nessuna particolare attrezzatura. Questa piattaforma è comparabile per sensibilità ai saggi di *Real-Time PCR*, dà risultati in tempi rapidi (2 ore) e può essere usata per la diagnosi di diverse infezioni in aree a risorse limitate o competere con le tecniche di diagnosi molecolare attualmente in uso.



**Figura 15:** (A) Principio di funzionamento della piattaforma SHERLOCK. (B) Rilevamento dell'RNA virale combinando HUDSON e SHERLOCK [128].

## 1.9 Trattamento

Attualmente non esiste un trattamento definitivo per l'infezione da WNV. Pertanto la prevenzione, attraverso la protezione dalla puntura delle zanzare, è fondamentale e rappresenta una importante misura di Sanità Pubblica.

Pazienti con malattia febbrile lieve generalmente non richiedono specifici interventi, sebbene il controllo della cefalea e una reidratazione possano, talvolta, risultare necessari. Pazienti con viremia documentata o con febbre in presenza di altri fattori di rischio, come l'età avanzata e l'immunosoppressione, dovrebbero essere tenuti sotto controllo per impedire una eventuale progressione a malattia neuro-invasiva. Pazienti con meningite severa possono richiedere una terapia del dolore, e la perdita di liquidi dovuta a nausea e vomito potrebbe richiedere l'ospedalizzazione per la reidratazione. Nei pazienti con encefalite è importante prestare attenzione alla protezione delle vie aeree; l'aumento della pressione intracranica e le convulsioni, riportate di rado in questi soggetti, richiedono una appropriata gestione. Pazienti con mielite flaccida acuta associata a WNV potrebbero non avere meningite o encefalite concomitante, e quindi l'infezione potrebbe inizialmente non essere sospettata. Ciò potrebbe tradursi nella

attuazione di procedure diagnostiche o modalità di trattamento inappropriate, come una terapia anticoagulante per sospetto ictus o una biopsia muscolare per sospetta miopatia.

L'infezione da WNV dovrebbe essere sospettata nelle persone che sviluppano una paralisi asimmetrica acuta, in particolare se accompagnata da altri segni di infezione.

I pazienti che precocemente sviluppano disartria e disfagia sono a più alto rischio di successiva insufficienza respiratoria acuta; per questo motivo, l'ospedalizzazione e l'osservazione dei pazienti con mielite flaccida è consigliata, e lo sviluppo di disartria e disfagia dovrebbero essere considerati con una certa preoccupazione.

La viremia di breve durata nell'uomo e la sua scomparsa dal momento dell'esordio della sintomatologia clinica, rappresentano un ostacolo allo sviluppo di specifiche terapie antivirali. Qualunque agente terapeutico, per essere efficace, dovrebbe ridurre il carico di virus intracellulare e/o prevenire la diffusione virale nel sistema nervoso centrale e possibilmente ridurre la risposta infiammatoria all'infezione.

Diversi approcci, che coinvolgono colture cellulari e modelli animali, sono stati studiati per il trattamento della infezione da WNV. In particolare, la ribavirina, un analogo nucleosidico della guanosina impiegato per bloccare la sintesi dell'RNA virale e la sua trasformazione in RNA maturo con un meccanismo non del tutto chiaro, ha dimostrato una azione inibitoria contro WNV in coltura cellulare ad alte dosi [129]. Un'alta mortalità, tuttavia, è stata osservata in pazienti trattati in un *outbreak* di West Nile in Israele nel 2000 [130]. Anche l'acido micofenolico ha mostrato in vitro una azione inibitoria virale, ma una azione immunosoppressiva in vivo. Pertanto, la ribavirina e l'acido micofenolico non possono essere definiti i candidati terapeutici ideali contro l'infezione da WNV.

L'IFN- $\alpha$ , un farmaco impiegato per il trattamento di alcune forme tumorali, è stato anche usato per trattare casi di encefalite da WNV. Sono stati riportati casi trattati sperimentalmente con IFN- $\alpha$  che hanno mostrato un sostanziale miglioramento delle condizioni di salute e del linguaggio già a partire dal secondo giorno di terapia, raggiungendo un completo recupero o la completa risoluzione delle sequele [131].

L'*RNA interference* (RNAi) è un altro meccanismo candidato per il trattamento della infezione. Si tratta di un processo di degradazione sequenza-specifico dell'RNA all'interno del citoplasma delle cellule eucariotiche, indotto da RNA a doppio filamento. Questo fenomeno è stato descritto per la prima volta in un Nematode, *Caenorhabditis elegans*, ed è conservato nelle cellule di mammifero. Si ritiene che l'RNAi funga da

difesa naturale contro l'ingresso dei virus nell'organismo e l'espressione di elementi trasponibili e possa essere usato per trattare una ampia varietà di malattie.

In particolare, diversi studi hanno mostrato come l'RNAi in vitro sia in grado di inibire la replicazione virale e in vivo di ridurre la carica virale, conferendo una parziale protezione da infezioni letali. Questi studi sottolineano l'efficacia dell'uso profilattico del siRNA contro una infezione virale in vivo, suggerendo nuove strategie per combattere questo virus.

## **2. SCOPO DELLO STUDIO**

Il virus di West Nile è un patogeno emergente ben conosciuto ed è considerato il Flavivirus più diffuso a livello globale. La malattia associata a WNV inizialmente era trascurabile, presentandosi solitamente in forma asintomatica o subclinica; tuttavia, verso la fine degli anni '90, questo virus è diventato un importante problema di salute pubblica, potendo causare patologie neurologiche potenzialmente letali soprattutto nelle fasce più fragili della popolazione come gli anziani e i malati cronici.

Il carico di malattia da WNV in Europa è rilevante: in accordo con i dati epidemiologici riportati dall'ECDC, 1832 casi umani di malattia neuro-invasiva sono stati registrati nel periodo 2011-2017 nei Paesi membri dell'Unione Europea e nelle Nazioni limitrofe.

In Italia le epidemie da West Nile sono state causate inizialmente dal *lineage 1* (2008-2011); ceppi appartenenti al *lineage 2*, invece, si sono diffusi per la prima volta dal 2011 e hanno completamente sostituito il precedente *lineage* già dal 2013, fino a causare una vasta epidemia in Europa nell'estate del 2018, con più di 2000 casi riportati in tutto il continente e oltre 500 solo in Italia, dove i numeri hanno superato la somma di tutti i casi che si erano verificati nei 7 anni precedenti.

Il considerevole aumento di casi di malattia provocati da WNV e rilevati in tutto il Mondo sia nell'uomo che negli equidi, testimonia la grande capacità di diffusione del virus, resa possibile da condizioni climatiche favorevoli, vettori competenti e ospiti aviari suscettibili.

Alla luce della importanza di tale arbovirosi e del suo impatto sulla salute pubblica, scopi del presente lavoro di tesi sono stati:

1. la caratterizzazione molecolare dei ceppi di WNV-2 circolanti in Italia nelle stagioni 2013-2018, tramite l'utilizzo di tecnologie di *Next Generation Sequencing* (NGS) e la ricerca di mutanti importanti da un punto di vista epidemiologico o patogenetico;
2. studio della evoluzione molecolare del genoma virale e delle forze che ne guidano l'evoluzione, in relazione allo spazio e al tempo;
3. studi di filodinamica e filogeografia discreta e continua, al fine di ricostruire l'epidemiologia del virus in Italia dal momento del suo isolamento ad oggi.

Per questi studi sono stati utilizzati gli isolati caratterizzati dal nostro gruppo e i genomi depositati in banche dati pubbliche alla data di inizio dello studio, corredati di informazioni relative all'anno e al luogo di isolamento;

4. studio delle dinamiche di propagazione virale attraverso la stima del tasso riproduttivo effettivo  $R_e$ .

Attualmente per l'uomo non sono disponibili vaccini o trattamenti antivirali specifici per la malattia associata a WNV. I programmi comunitari di controllo delle zanzare per ridurre la densità e l'uso di repellenti rappresentano, ad oggi, le misure precauzionali più efficaci.

Pertanto, alla luce di queste considerazioni, risulta necessario incrementare le attività di sorveglianza, anche con mezzi innovativi come la filogenesi, per migliorare la qualità dei dati epidemiologici disponibili e adottare adeguate e tempestive misure per la salvaguardia della salute pubblica.

## **3.MATERIALI E METODI**

### ***3.1 Popolazione in studio***

---

Questo studio è stato condotto su campioni di pazienti raccolti presso il Policlinico San Matteo di Pavia e su campioni ambientali ottenuti dall'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) nel periodo 2013-2018. Nello specifico, sono stati caratterizzati 17 campioni umani (16 genomi completi e 1 gene *envelope* intero) e 95 campioni ambientali provenienti da *pool* di zanzare, uccelli e cavalli (43 genomi completi e 52 *envelope* interi).

Le regioni di campionamento sono state la Lombardia e l'Emilia Romagna.

Tutti i campioni umani sono stati testati nei centri competenti per la sierologia (identificazione di immunoglobuline IgM e IgG con test Elisa e identificazione e titolazione di anticorpi neutralizzanti con test di neutralizzazione) e per la biologia molecolare (*Real-time PCR WNV* e *PanFlavi RT-PCR*).

Sulla base dei risultati di questi test e della sintomatologia clinica, i pazienti sono stati suddivisi in “casi probabili” (se il paziente presenta uno dei seguenti aspetti clinici tra encefalite, meningite e febbre superiore a 38°C, in presenza nel siero di IgM specifiche per WNV o IgG, o un incremento del titolo delle IgG di 4 *fold* in due campioni consecutivi) e “casi confermati” (se oltre ai precedenti criteri clinici presenta uno o più dei seguenti criteri addizionali: isolamento di WNV da sangue o fluido cerebrospinale, rilevazione dell'RNA virale nel sangue e/o liquido cerebrospinale, IgM specifiche per West Nile nel liquido cerebrospinale, rilevazione di IgM anti-WNV ad alto titolo e IgG, confermate da uno specifico test di neutralizzazione) facendo riferimento ai criteri clinici e diagnostici stabiliti dall'Unione Europea nel 2008 per la definizione di casi probabili e confermati di infezione da WNV.

Nel nostro laboratorio, sui casi confermati dai centri competenti, è stata condotta la caratterizzazione molecolare del virus a partire da diverso materiale biologico (siero, urine, liquor).

I campioni di zanzare sono stati raccolti in stazioni georeferenziate all'interno del sistema di sorveglianza nazionale per il virus West Nile. Gli insetti intrappolati sono stati tenuti nel sacchetto di campionamento originale e refrigerati per preservare il virus dalla degradazione. Le zanzare sono state identificate a livello di specie per mezzo di specifici criteri morfologici, e raggruppate in *pool* di 100 unità sulla base della data di raccolta, della località e della specie. Sono stati analizzati solo *pool* di *Culex pipiens*, uno dei principali vettori virali.

I campioni di uccelli sono stati raccolti tra i mesi di maggio e novembre nell'ambito del Piano nazionale integrato di prevenzione, sorveglianza e risposta ai virus West Nile e Usutu, emanato dalla Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria del Ministero della Salute. Le carcasse degli uccelli, principalmente gazze (*Pica pica*), corvi (*Corvus corone cornix*) e ghiandaie eurasiatiche (*Garrulus glandarius*), sono state raccolte e consegnate a laboratori specialistici per le analisi.

La casistica oggetto di studio è riportata nella tabella sottostante:

CODIFICA	OSPITE	LUOGO DI ISOLAMENTO	GENE/GENOMA COMPLETO
41iCR@13	<i>Culex pipiens</i>	Soresina (CR)	genoma completo
42iCR@13	Corvo ( <i>Corvus cornix</i> )	Rivolta d'Adda (CR)	genoma completo
43iBS@13	<i>Culex pipiens</i>	Leno (BS)	genoma completo
171iMO@13	Gazza ( <i>Pica pica</i> )	Castel Franco E. (MO)	genoma completo
172iFE@13	Upupa ( <i>Upupa epops</i> )	Vigarano Mainarda (FE)	genoma completo
173iFE@13	Ghiandaia ( <i>Garrulus glandarius</i> )	Portomaggiore (FE)	genoma completo
174iFE@13	Merlo ( <i>Turdus merula</i> )	Ferrara (FE)	genoma completo
175iFE@13	Gazza ( <i>Pica pica</i> )	Poggio Renatico (FE)	genoma completo
176iFE@13	Assiolo ( <i>Otus scops</i> )	Argenta (FE)	genoma completo
177iMN@13	<i>Culex pipiens</i>	San Giovanni del Dosso (MN)	genoma completo
178iRE@13	Gazza ( <i>Pica pica</i> )	Novellara, località Bernolda (RE)	genoma completo
179iLO@14	<i>Culex pipiens</i>	Borgetto Lodigiano, località Bassanina (LO)	genoma completo
180iLO@14	<i>Culex pipiens</i>	Borgetto Lodigiano, località Bassanina (LO)	genoma completo
181iMI@14	Corvo ( <i>Corvus cornix</i> )	Via Gianbologna 30 (MI)	genoma completo
182iMO@14	Gazza ( <i>Pica pica</i> )	San Cesario sul Panaro, località Sant'Anna (MO)	genoma completo
183iPR@14	Astore ( <i>Accipiter gentilis</i> )	Località Borghetto (PR)	genoma completo
184iFE@15	Corvo ( <i>Corvus corone cornix</i> )	Pilastri Fondo Cric, Gabbia 8 (FE)	genoma completo
185iFE@15	<i>Culex pipiens</i>	Ferrara (FE)	genoma completo

186iBS@15	Astore ( <i>Accipiter gentilis</i> )	Via Gramsci, 16 (BS)	genoma completo
187iPV@15	<i>Culex pipiens</i>	Cella 9 Sito AL006798 Parona (PV)	genoma completo
188iMO@15	Gazza ( <i>Pica pica</i> )	Modena (MO)	genoma completo
189iMO@15	Gazza ( <i>Pica pica</i> )	Valle Riolo (MO)	genoma completo
190iPV@15	Uomo	Pavia (PV)	genoma completo
191iLO@15	Uomo	Lodi (LO)	genoma completo
192iLO@15	Uomo	Lodi (LO)	genoma completo
193iPV@15	Uomo	Pavia (PV)	genoma completo
194iPV@15	Uomo	Pavia (PV)	genoma completo
199iMO@15	Gazza ( <i>Pica pica</i> )	San Cesario sul Panaro (MO)	genoma completo
200iMO@15	Gazza ( <i>Pica pica</i> )	Castelfranco Emilia (MO)	genoma completo
201iMO@15	Corvo ( <i>Corvus corone cornix</i> )	Ravarino (MO)	genoma completo
202iMO@15	Corvo ( <i>Corvus corone cornix</i> )	Ravarino (MO)	genoma completo
203iMO@15	Corvo ( <i>Corvus corone cornix</i> )	Cavezzo (MO)	genoma completo
204iMO@15	Gazza ( <i>Pica pica</i> )	Mirandola (MO)	genoma completo
206iPC@16	Poiana	Ponte dell'Olio (PC)	genoma completo
207iBO@16	Cornacchia grigia	Calderara di Reno (BO)	genoma completo
208iBO@16	Insetto	Bologna (BO)	genoma completo
209iRE@17	Gazza	Novellara (RE)	genoma completo
210iRE@16	Gazza	Correggio (RE)	genoma completo
211iRE@16	Cornacchia grigia	Correggio (RE)	genoma completo
212iRE@17	Cornacchia grigia	Guastalla (RE)	genoma completo
213iBO@17	Gazza	Minerbio (BO)	genoma completo
214iBO@16	Cornacchia grigia	San Giorgio di Piano (BO)	genoma completo
215iRE@16	Cornacchia grigia	Novellara (RE)	genoma completo

216iLO@17	Cornacchia grigia	Mulazzano (LO)	genoma completo
217iRA@16	Gazza	Ravenna (RA)	genoma completo
218iPC@16	Insetto	Piacenza (PC)	genoma completo
219iBO@16	Cavallo	Budrio (BO)	genoma completo
220iLO@16	Uomo	Lodi (LO)	genoma completo
221iMN@15	Gazza	Viadana (MN)	envelope completo
222iMN@15	Gazza	Carbonara di Po (MN)	envelope completo
223iMN@16	Gazza	Quistello (MN)	envelope completo
224iMI@17	Cornacchia grigia	Albairate (MI)	envelope completo
225iMN@16	Uomo	Mantova (MN)	genoma completo
226iMN@16	Uomo	Mantova (MN)	envelope completo
227iMN@15	Gazza	Moglia (MN)	envelope completo
228iPV@17	Cornacchia grigia	Sant'Angelo Lomellina (PV)	envelope completo
229iBS@15	Astore	Bagnolo Mella (BS)	envelope completo
230iMI@15	Cornacchia grigia	Inveruno (MI)	genoma completo
231iMN@16	Ghiandaia	Gonzaga (MN)	envelope completo
232iMB@15	Gazza	Misinto (MB)	envelope completo
233iRE@16	Gazza	Novellara (RE)	envelope completo
234iRA@17	Gazza	Russi (RA)	envelope completo
235iFE@17	Verdone	Mezzogoro (FE)	envelope completo
236iFE@17	Picchio verde	Mesola (FE)	envelope completo
237iFE@17	Assiolo	Cona Ferrara (FE)	envelope completo
238iFE@17	Passera	Baura Ferrara (FE)	envelope completo
239iRE@17	Gazza	Cadelbosco di sopra (RE)	envelope completo
240iFE@17	Tortora dal collare orientale	Ferrara (FE)	envelope completo

241iPC@17	Cornacchia grigia	Piacenza (PC)	envelope completo
242iBO@16	Gazza	Castel San Pietro Terme IM (BO)	envelope completo
243iBO@17	Gazza	Castel San Pietro Terme IM (BO)	envelope completo
244iRA@17	Gazza	Russi (RA)	envelope completo
248iMN@18	<i>Cx. pipiens</i>	San Benedetto Po (MN)	envelope completo
249iMN@18	<i>Cx. pipiens</i>	San Benedetto Po (MN)	envelope completo
250iMN@18	<i>Cx. pipiens</i>	San Benedetto Po (MN)	envelope completo
251iMN@18	<i>Cx. pipiens</i>	San Benedetto Po (MN)	envelope completo
252iMN@18	<i>Cx. pipiens</i>	San Benedetto Po (MN)	envelope completo
253iMN@18	<i>Cx. pipiens</i>	Bigarello (MN)	envelope completo
254iMN@18	<i>Cx. pipiens</i>	Bigarello (MN)	envelope completo
255iMN@18	Cornacchia grigia	Caposotto - Basso Mantovano SERMIDE (MN)	envelope completo
256iBS@18	<i>Cx. pipiens</i>	Remedello (BS)	envelope completo
257iPV@18	<i>Cx. pipiens</i>	Parona (PV)	envelope completo
258iMN@18	<i>Cx. pipiens</i>	Bigarello (MN)	envelope completo
259iMN@18	<i>Cx. pipiens</i>	Bigarello (MN)	envelope completo
260iPV@18	<i>Cx. pipiens</i>	Tromello (PV)	envelope completo
261iPV@18	<i>Cx. pipiens</i>	Tromello (PV)	envelope completo
264iPV@18	<i>Cx. pipiens</i>	Vigevano (PV)	envelope completo
265iPV@18	<i>Cx. pipiens</i>	Vigevano (PV)	envelope completo
266iPV@18	<i>Cx. pipiens</i>	Vigevano (PV)	envelope completo
267iPV@18	<i>Cx. pipiens</i>	Vigevano (PV)	envelope completo
268iMI@18	Cornacchia grigia	Milano (MI)	envelope completo
269iMI@18	<i>Cx. pipiens</i>	Busto Garolfo (MI)	envelope completo
271iPV@18	<i>Cx. pipiens</i>	Carbonara al Ticino (PV)	envelope completo

272iPV@18	<i>Cx. pipiens</i>	Parona (PV)	envelope completo
273iBS@18	<i>Cx. pipiens</i>	Leno (BS)	envelope completo
276iMI@18	Cornacchia grigia	Magnago (MI)	envelope completo
277iBG@18	Cavallo	Bergamo (BG)	envelope completo
278iBG@18	Cavallo	Bergamo (BG)	envelope completo
279iMI@18	Cornacchia grigia	Lipu la Fagiana (MI)	envelope completo
280iMI@18	Astore	Lipu la Fagiana (MI)	envelope completo
281iLO@18	Uomo	Lodi (LO)	genoma completo
282iPV@18	Uomo	Mortara (PV)	genoma completo
283iBS@18	Uomo	Brescia (BS)	genoma completo
284iMN@18	Uomo	Mantova (MN)	genoma completo
285iBS@18	Uomo	Chiari (BS)	genoma completo
286iMN@18	Uomo	Mantova (MN)	genoma completo
287iMN@18	Uomo	Mantova (MN)	genoma completo
288iPV@18	Uomo	Pavia (PV)	genoma completo
289iMI@18	Uomo	Rozzano (MI)	genoma completo
290iMI@17	Cornacchia grigia	Albairate (MI)	envelope completo
292iRE@17	Gazza	Cadelbosco di sopra (RE)	envelope completo
293iRA@17	Gazza	Russi (RA)	envelope completo

Tabella 1: Descrizione della popolazione in studio.

## 3.2 Metodi

---

### 3.2.1 Isolamento virale

Per l'isolamento virale sono state utilizzate diverse matrici, quali urine per i campioni umani, pool di cuore, milza, rene e cervello per i campioni aviari e pool di zanzare *Culex pipiens* per i campioni da insetto. La crescita virale è stata monitorata sulle colture cellulari tramite RT-PCR o *Mab-based sandwich ELISA* con anticorpi monoclonali (Mabs) specifici per WNV.

Le cellule sono state messe in coltura in terreno base DMEM (*Dulbecco's modified MEM*) con il 10% di siero fetale bovino, FBS. Una volta raggiunta una confluenza cellulare del 70-90%, i campioni sono stati inoculati nel monostrato cellulare. Dopo una incubazione per 90 minuti a 37°C in presenza del 5% di CO<sub>2</sub>, le cellule sono state lasciate in coltura per almeno 7 giorni. L'effetto citopatico è stato monitorato giornalmente. Le colture cellulari positive sono state raccolte e centrifugate a 700 g per 10 minuti, per eliminare i detriti cellulari. I surnatanti virali sono stati trasportati in ghiaccio secco presso il Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche dell'ospedale "L. Sacco", Sezione di Malattie Infettive dell'Università degli Studi di Milano, e conservati a -80° C fino al momento della estrazione dell'RNA virale.

### 3.2.2 Estrazione di RNA virale da materiale biologico

L'estrazione dell'RNA virale è stata condotta mediante il kit *QIAMP viral RNA* e l'estrattore automatico *QIACUBE* (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany).

Il protocollo utilizzato prevede la purificazione dell'RNA virale a partire da 140 µL di plasma, siero, urine, surnatante, seguendo la procedura indicata dal produttore.

Il campione di partenza viene inizialmente lisato con 560 µL di *buffer* AVL, a cui vengono aggiunti 5.6 µL di RNA *carrier*. L'RNA *carrier* svolge due importanti funzioni. In primo luogo, migliora il legame degli acidi nucleici virali alla membrana della colonna usata per l'estrazione, specialmente se nel campione di partenza sono presenti poche molecole bersaglio. Inoltre, l'aggiunta di grandi quantità di *carrier* riduce la possibilità di degradazione dell'RNA virale nel raro caso in cui le molecole di RNAsi sfuggano alla denaturazione da parte dei sali caotropici presenti nel *buffer* di lisi.

Pertanto, se l'RNA *carrier* non viene aggiunto al *buffer* di lisi, una conseguenza può essere il ridotto recupero dell'RNA virale.

Se il volume del campione di partenza è superiore a 140 µL, occorre aumentare proporzionalmente la quantità di RNA *carrier* - *buffer* AVL e utilizzare un tubo più grande.

Alla mix *buffer* - *carrier* si aggiungono i 140 µL di campione, si *vortexa* per 15 secondi e si incuba a temperatura ambiente (15-25°C) per 10 minuti. La lisi è completa dopo incubazione per 10 minuti; tempi di incubazione più lunghi non hanno alcun effetto sulla resa o sulla qualità dell'RNA purificato.

A questo punto, si centrifuga brevemente il tubo per rimuovere le gocce dall'interno del coperchio, e si arresta l'azione del *buffer* di lisi aggiungendo 560 µL di etanolo al 95%, *vortexando* per 15 secondi e nuovamente centrifugando brevemente per la rimozione delle gocce.

Il campione viene trasferito nelle apposite colonne fornite dal *kit* e centrifugato a 8000 rpm per 1 minuto. Si effettua, quindi, un primo lavaggio con 500 µL di *buffer* AW1 e si centrifuga a 8000 rpm per 1 minuto; si prosegue, poi, con un secondo lavaggio con 500 µL di *buffer* AW2 e si centrifuga alla massima velocità (14000 rpm) per 3 minuti. Infine, si centrifuga a vuoto alla massima velocità per 1 minuto e si risospende il campione in una quantità variabile di *buffer* AVE o acqua *Rnase-free*, in base alla carica virale del campione di partenza. Poiché per i campioni analizzati non era nota la carica, si è scelto di utilizzare un volume di diluente pari a 50 µL.

L'RNA purificato è privo di proteine, nucleasi e altri contaminanti o inibitori.

Per escludere la possibilità di contaminazioni tra i diversi campioni, ogni estrazione di RNA è avvenuta in parallelo con controlli negativi di estrazione. Inoltre, per escludere l'eventuale presenza di inibitori o un errore durante il procedimento di estrazione, è stato sempre utilizzato anche un controllo positivo noto.

Il protocollo appena descritto può essere completamente automatizzato sul QIAcube, che può processare fino ad un massimo di 12 campioni per volta. La procedura di preparazione del campione con questo strumento segue gli stessi *step* previsti per la preparazione manuale (lisi, *binding*, lavaggi ed eluizione). I campioni sono sottoposti a lisi in uno *shaker* che può essere riscaldato, e ogni lisato viene poi trasferito in una colonna posizionata in un alloggiamento all'interno del rotore dello strumento. Gli acidi nucleici si legano alla membrana in silice della colonna e vengono sottoposti a lavaggio

per la rimozione dei contaminanti. La colonna viene trasferita in un tubo da microcentrifuga per la eluizione degli acidi nucleici purificati.

### **3.2.3 Real-Time PCR**

La *multiplex real-time* RT-PCR per la simultanea rilevazione dei *lineages* 1 e 2 di WNV, che sono i *lineages* attualmente più diffusi del virus, combina una coppia di *primers* comuni a WNVL1 e WNVL2, ovvero WN-LCV-F1 e WN-LCV-R1, e due sonde TAQMAN-MGB specifiche per *lineage* [132].

Ciascuna *probe* è stata marcata con un differente colorante fluorescente, rispettivamente FAM per il *lineage* 1, che emette nel verde, e VIC per il *lineage* 2, che emette nel giallo. Oltre agli estratti, si utilizzano 2 controlli positivi, uno per ciascun *lineage*, e un bianco di PCR.

La mix per RT-PCR è la seguente:

<b>REAGENTI</b>	<b>VOLUME PER CAMPIONE (µL)</b>
H <sub>2</sub> O Dnasi/Rnasi free	5,25
PRIMER WN-LCV-F1	0,5
PRIMER WN-LCV-R1	0,5
Probe FAM-LCV-S1 ( <i>Lineage</i> 1)	0,5
Probe VIC-LCV-S2 ( <i>Lineage</i> 2)	0,5
QuantiTect RT mix	0,25
Quantitect RT-PCR master mix	12,5
Totale mix	20.0
Campione e controlli	5.0

Le condizioni di amplificazione consistono in un primo *step* di trascrizione inversa a 50°C per 30', seguito da 15' a 95°C ("hot start"), 45 cicli di 30'' a 95°C e 1' a 60°C. La fluorescenza emessa da FAM e VIC viene misurata simultaneamente e indipendentemente alla fine di ogni ciclo.

La RT-PCR è stata condotta all'interno dello strumento *Rotor-Gene Q*, dotato di un efficace sistema di raffreddamento e riscaldamento per raggiungere ottimali condizioni di reazione.

### **3.2.4 Retrotrascrizione**

Utilizzando i reagenti contenuti nel modulo per la retrotrascrizione (*SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR, Invitrogen Life Technologies*) è stata preparata la *mix* per la RT-PCR:

<b>REAGENTI</b>	<b>VOLUME PER CAMPIONE (µL)</b>
RT Mix 2X	8.0
RT Enzyme Mix	2.0
RNA	10.0
Totale	20.0

Il funzionamento del *kit* è basato sull'enzima trascrittasi inversa del virus della leucemia murina di *Moloney* (*Moloney Murine Leukemia Virus*, MMLV), che estende un *primer* specifico per l'RNA virale contenuto nel *buffer* di reazione, sintetizzando una molecola di cDNA a doppio filamento.

Il *kit* contiene dei *random primers* che permettono di retrotrascrivere tutto il genoma di WNV.

Una volta preparata la *mix* di reazione, i campioni sono stati inseriti in un termociclatore, impostato con il seguente programma:

<b>T (°C)</b>	<b>t</b>	<b>PROCESSO</b>
25	10'	Innesco reazione
50	30'	Retrotrascrizione
85	5'	Inattivazione MMLV RT
4	∞	Conservazione

Al termine della reazione è stato aggiunto 1 µl di ribonucleasi H (RNasi H) purificato dal batterio *Escherichia Coli* ed è stata fatta una incubazione a 37°C per 20' per eliminare l'RNA in eccesso. Il cDNA così ottenuto è stato poi sottoposto a amplificazione.

### 3.2.5 Amplificazione del genoma completo

In seguito alla retrotrascrizione è stata effettuata l'amplificazione del genoma completo del virus, aggiungendo ai campioni estratti e al controllo negativo anche un controllo positivo, precedentemente estratto.

Il genoma virale è stato interamente amplificato con metodica PCR con 22 coppie di *primers* parzialmente sovrapposti, utilizzando il kit *GoTaq® Hot Start Polymerase* (*Promega*, Madison, WI, USA).

I *primer* usati sono stati modificati a partire da quelli precedentemente descritti in letteratura [30] e sono indicati nella tabella sottostante:

PRIMERS	SEQUENZA
1F	AGTAGTTCGCCTGTGTGAGC
1R	AGCATAGCCCTCTTCAGTCC
2F	TAGCACGAAGATCTCGATGT
2R	TGCCACCAGGAGCAATAGGA
3F	CCTCGTTGCAGCGGTCATTG
3R	TCCATGGCAGGTTTCAGATCC
4F	CTTCCTGGTTCACCGAGAAT
4R	CTTGCCTGCCAATRTCAATG
5F	CTCTTTGGRGGRATGTCHTG
5R	GTGCADGATTKACYTCTCC
6F	CAACATGGCTGTGCATAGTG
6R	GCCGACGAGAATGACATATC
7F	GACGGCCAAGATCAGCATTG
7R	TGAGAATCATCCACGCGACG
8F	GGCTTACTATGACGCCAAGA
8R	CCATCATCATCCAGCCTAAC
9F	ATGTTYGCCATYGTWGGDGG
9R	TGGCACATSACATCMACKAT
10F	TYGCTGCTGAGATGTCTGAG
10R	TGTCCGAGATAGGAGCATTG
11F	ATGGATGAAGCYCATTTAC
11R	GGTAYTCYGTMTCATAGGAC
12F	GCCTGGAACACTGGATATGA
12R	TAAGCGAGCCAGACTGGTAA
13F	TATCAGCCTGAGCGCGAGAA
13R	ACGGCTGTCGYTACGGCATA
14F	ATGACATTRGCAGCCTGTTG
14R	ATCCTCCTCGCATGATGTGA

15F	GAGAGGCTGGAATTCTGACT
15R	GTTCTTCTACCTCGGCACTT
16F	CATCAGAAGCGAGCGACACA
16R	ACAGCCAGTTCGTGGTCTCA
17F	TCGGTCAACAACGAGTGTTT
17R	GAGATGACATCCATCACAGT
18F	TAGCGCGGTCCATCATTGAG
18R	ATCCAGCCCCTGGAGAGATT
19F	CTGTTCCGCTGTGCCTGTCA
19R	CGTGGATCACCTCGCAGCTT
20F	TACAACATGATGGGVAARAGAGAGA
20R	AGCATGTCTTCYGTBGTCCATCCAYT
21F	GCCACCGGAAGTTGAGTAGA
21R	GCTGGTTGTGCAGAGCAGAA
22F	TGCGAGGTGATCCACGTAAG
22R	CACCTATATCGGCGCACTGT

**Tabella 2:** Lista delle 22 coppie di *primers* usati per l'amplificazione del genoma completo del virus di West Nile.

La *mix*, comune alle 22 coppie di primers, è stata così preparata:

<b>REAGENTI</b>	<b>VOLUME PER CAMPIONE (µL)</b>
5X	10.0
dNTPs	4.0
MgCl <sub>2</sub>	3.0
Primer F (50 pmol/µL)	0.5
Primer R (50pmol/µL)	0.5
Go Taq Hot Start	0.5
H2O	21.5
Volume finale	40.0

A questa *mix* sono stati aggiunti 10 µL di cDNA virale estratto ed il tutto è stato sottoposto ad amplificazione in un termociclatore così impostato:

<b>T (°C)</b>	<b>t</b>	<b>n° cicli</b>	<b>PROCESSO</b>
94	2'	1	Attivazione TAQ
94	1' } 1' } 1' }	45	Denaturazione DNA
50	1' }		Annealing primers
72	1' }		Estensione
72	10'	1	Estensione finale
4	∞		Conservazione

Per campioni con carica virale molto bassa, i cicli di PCR sono stati aumentati.

### **3.2.6 Retrotrascrizione con FR26RV-N**

Utilizzando i reagenti contenuti nel modulo per la retrotrascrizione, è stata preparata la mix per la RT:

<b>REAGENTI</b>	<b>VOLUME PER CAMPIONE (µL)</b>
RNA	8.0
Primer FR26RV-N (10 µM)	2.0

L'RNA è stato preriscaldato a 95°C e messo in ghiaccio per 1'.

Nel frattempo è stata preparata la mix di reazione nel seguente modo:

<b>REAGENTI</b>	<b>VOLUME PER CAMPIONE (µL)</b>
5X RT <i>Buffer</i>	4.0
H <sub>2</sub> O	3.5
dNTP mix	1.0
Rnase in	0.5
Trascrittasi inversa RT-MMLV	1.0

Sono stati aliquotati 10 µl di mix e aggiunti 10 µl di campione preriscaldato per un volume finale totale di 20 µl.

A questo punto i campioni sono stati inseriti in un termociclatore, impostato con il seguente programma:

<b>T (°C)</b>	<b>t</b>	<b>n°cicli</b>
94	60'	1
70	15'	1
4	∞	1

Il cDNA così ottenuto è stato sottoposto ad amplificazione.

### **3.2.7 Amplificazione del genoma completo con FR20RV**

Alla retrotrascrizione è seguita l'amplificazione del genoma completo di WNV con il *primer* FR20RV.

Anche in questo caso, oltre ai campioni estratti e al controllo negativo, è stato aggiunto un controllo positivo.

<b>REAGENTI</b>	<b>VOLUME PER CAMPIONE (µL)</b>
<i>10x accu prime PCR buffer I</i>	4.0
FR20RV (10 µM)	4.0
<i>AccuPrime Taq DNA Polymerase, high fidelity</i>	0.2
H <sub>2</sub> O	35.8
Totale	45.0

Ai 45 µL di mix sono stati aggiunti 5 µL di cDNA, e i campioni sono stati inseriti in un termociclatore impostato nel seguente modo:

T (°C)	t	n° cicli
94	2'	1
94	30''	40
55	1'	
68	3'	

### 3.2.8 Rilevamento dei prodotti di PCR

Il rilevamento dei prodotti di amplificazione è stato ottenuto mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1,5% in tampone TAE 1X.

La migrazione del DNA su gel di agarosio dipende dalla lunghezza del frammento di DNA analizzato rispetto alla concentrazione dell'agarosio stesso.

Le bande prodotte in seguito alla migrazione del DNA sono state esaminate esponendo il gel a luce ultravioletta; per questo motivo nel gel stesso viene incorporato un colorante fluorescente, l'etidio bromuro (0,01 µg/µl), che si intercala tra le basi dell'acido nucleico ed emette fluorescenza quando irradiato da luce ultravioletta. E' stato possibile riconoscere gli amplificati di nostro interesse tramite il confronto con un opportuno standard di riferimento o *marker* a concentrazione nota (*Gene ruler 1 kb-DNA ladder*), che è stato caricato in ogni corsa elettroforetica contemporaneamente ai campioni in esame.

Per la preparazione del gel, 0.9 gr di agarosio (1,5%) sono stati sciolti ad alta temperatura in tampone TRIS-acetato EDTA (TAE) 1X (60 ml), ed è stato incorporato l'etidio bromuro (10 µg/ml).

Una volta raggiunta la temperatura di circa 50°C, il gel è stato versato nell'apposita vaschetta approntata per la corsa elettroforetica, sulla quale è stato inserito un pettine per la formazione dei pozzetti necessari per il caricamento dei campioni.

Il gel è stato lasciato polimerizzare a temperatura ambiente per 15-20 minuti ed è stato posto nella vaschetta elettroforetica contenente TAE 1X.

Di ogni campione sono stati caricati 10 µl di DNA e la corsa elettroforetica è stata condotta a 90 mV/cm in TAE 1X.

### 3.2.9 Purificazione dei prodotti di PCR

La purificazione dei prodotti di PCR è stata eseguita impiegando il kit di purificazione *QIAquick* (Qiagen, Hilden, Germany), che permette di rimuovere efficacemente tamponi di reazione, enzimi, *primer* e dNTPs (marcati o non). Un limite di questo *kit* è rappresentato dalle dimensioni del frammento, che devono essere comprese tra 100 bp e 10 Kb.

Prima di iniziare è necessario porre attenzione ai seguenti punti:

- il *buffer* PB (*binding buffer*), che permette il legame del DNA alla resina della colonnina *QIAquick*, deve avere un pH  $\leq 7.5$ ;
- il *buffer* PE, con il quale viene eluito il DNA dopo la purificazione, deve essere addizionato di etanolo al 96-100%;
- tutte le centrifugazioni previste dal protocollo devono essere impostate ad una velocità di 14.000 rpm in una microcentrifuga da tavolo convenzionale a temperatura ambiente.

La purificazione avviene tramite la seguente procedura:

- si posiziona una colonnina *QIAquick* in una provetta di raccolta da 2 mL;
- si aggiunge PB *buffer* in rapporto 5:1 con il campione;
- si inserisce il campione nella colonnina *QIAquick*, si miscela attentamente con la pipetta fino ad ottenere una soluzione omogenea e si centrifuga per 1 minuto;
- si scarta l'eluito e si riposiziona la colonna nella medesima provetta;
- per il lavaggio, si aggiungono 700  $\mu$ l di *buffer* PE nella colonnina e si centrifuga per 1 minuto;
- si elimina l'eluito e si riposiziona la colonnina nella medesima provetta;
- si centrifuga ulteriormente per 1 minuto e mezzo;
- si posiziona la colonnina in una nuova provetta da 1.5 mL;
- per eluire il DNA, si aggiungono 50  $\mu$ L di *buffer* EB o di acqua distillata direttamente sopra la membrana della colonnina e si centrifuga per 1 minuto;
- si eliminano le colonnine. Il DNA purificato deve essere conservato a + 4°C.

### 3.2.10 Quantificazione del DNA con QBIT

Il fluorometro Qbit 2.0 è un piccolo strumento usato per la quantificazione di DNA, RNA e proteine.

La sua calibrazione viene effettuata per mezzo degli standard 1 e 2 che servono per la costruzione della retta di taratura.

La quantificazione richiede una *working solution*, che può essere di 2 tipi: BR (*broad range*) e HR (*hight range*). La *working solution* di tipo BR consente di quantificare campioni con una concentrazione compresa fra 2 e 1000 ngr/ $\mu$ l, mentre la *working solution* di tipo HR permette la lettura di campioni concentrati fra 0.2 e 100 ngr/ $\mu$ l.

Il procedimento per la quantificazione è il seguente:

- Preparare un tubino per ogni standard (1 e 2) e un tubino per ogni campione.
- Preparare 200  $\mu$ l di *Working solution* per ogni standard e campione, diluendo il *Qubit Reagent* 1:200 nel *Qubit Buffer*.
- Per preparare gli standard aggiungere nel tubino 190  $\mu$ l di *Working Solution* e 10  $\mu$ l di standard. Per i campioni aggiungere 198  $\mu$ l di *Working Solution* e 2  $\mu$ l di campione.
- *Vortexare* per 3 secondi.
- Incubare per 2 minuti a temperatura ambiente ed effettuare la lettura.

### 3.2.11 Quantificazione del DNA con lettore di piastre TECAN

La quantificazione del DNA virale è stata effettuata anche con lo strumento *Infinite M200 Pro* e la piastra *NanoQuant* della Tecan, uno strumento di laboratorio per la quantificazione di piccoli volumi (2  $\mu$ L) di acidi nucleici, che consente di misurare parallelamente 16 campioni diversi in un unico *step*. Dopo la misurazione, che è controllata dal *software i-control*, il calcolo del contenuto di acido nucleico e il controllo di purezza utilizzando il rapporto 260/280 viene eseguito automaticamente e i risultati vengono visualizzati in un foglio Excel, che si apre automaticamente in modalità *background*, al termine del calcolo. Il rapporto fra l'assorbanza a 260 nm e quella a 280 rappresenta un indice della contaminazione da proteine. Per il DNA tale rapporto deve essere pari a 1.8; se più basso può indicare la presenza di proteine o di altri contaminanti, e in questo caso si raccomanda un ulteriore *step* di purificazione.

Una misurazione del bianco funziona come controllo di qualità per l'intera piastra e indica eventuali errori di pipettaggio o pulizia.

Una scheda chiamata *Applications* è implementata nel *software i-control*, in modo che tutte le misurazioni possano essere eseguite in modo rapido e semplice.

### **3.2.12 Sequenziamento del DNA con Next Generation Sequencing (NGS)**

Il sequenziamento di singoli geni e del genoma completo del virus è stato effettuato con la piattaforma Illumina, una delle piattaforme disponibili sul mercato per il sequenziamento di nuova generazione.

Tutte le piattaforme NGS prevedono il sequenziamento parallelo massivo di molecole di DNA amplificate in modo clonale o di singole molecole di DNA separate spazialmente in una cella a flusso ("*flow cell*").

Questa strategia rappresenta un radicale cambiamento rispetto al metodo di sequenziamento descritto da *Sanger*, che si basa sulla separazione elettroforetica di frammenti di lunghezza diversa ottenuti mediante singole reazioni di sequenziamento.

Nelle tecnologie NGS, invece, il sequenziamento viene effettuato mediante cicli ripetuti di estensioni nucleotidiche ad opera di una DNA-polimerasi o, in alternativa, mediante cicli iterativi di ligazione di oligonucleotidi.

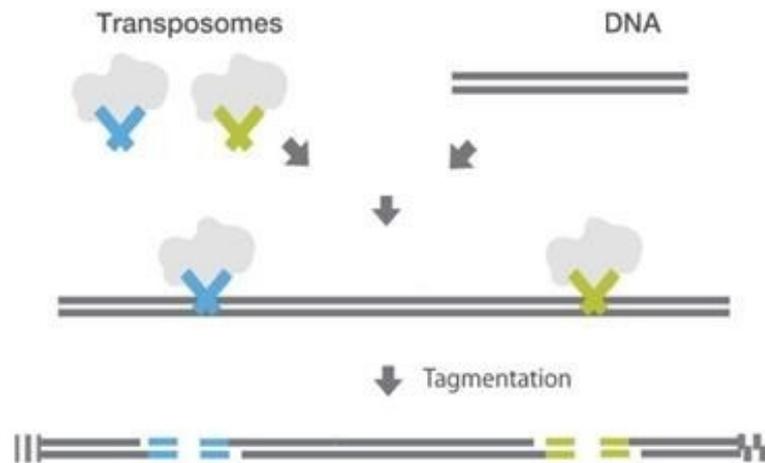
Poiché la procedura è parallela e massiva, tali piattaforme consentono di sequenziare da milioni a miliardi di paia di basi di DNA in un'unica seduta analitica, a seconda del tipo di tecnologia utilizzata.

Il maggior vantaggio della tecnologia NGS è il sequenziamento *paired-end* (PE), ossia il sequenziamento di entrambe le estremità dei frammenti di DNA in una *library* di sequenziamento (*sequency library*) e l'allineamento delle *reads*, *forward* e *reverse*, come coppie di *read* per conferire maggior accuratezza all'allineamento.

Le fasi previste per il sequenziamento con la piattaforma Illumina sono le seguenti:

#### **1. costruzione della "*library*"**

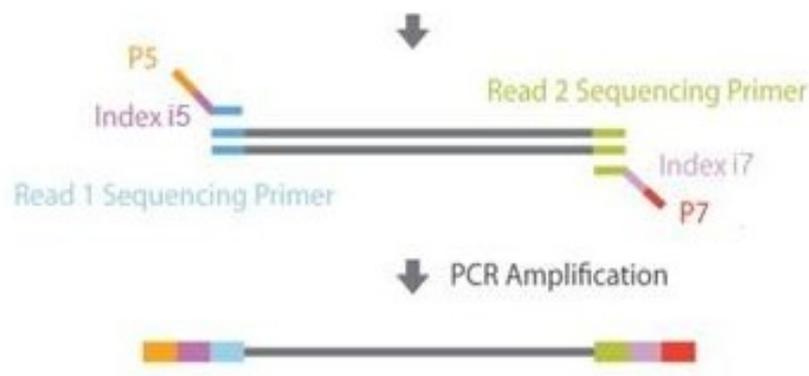
La *library* viene costruita attraverso la frammentazione del DNA genomico con dei trasposoni, che sono enzimi ingegnerizzati con degli adattatori univoci al loro interno. Tali enzimi si legano al DNA e simultaneamente lo frammentano e lo "tagmentano", producendo frammenti della lunghezza di ~ 300 bp.



**Figura 16:** Un trasposone ingegnerizzato con adattatori univoci simultaneamente frammenta e tagmenta il DNA.

I tag inseriti dai trasposoni vengono, poi, utilizzati come innesco in una prima reazione di PCR che consente l’aggiunta al DNA degli “*index*”, che sono sequenze nucleotidiche di circa 8 bp che servono per identificare univocamente il campione, e degli “*adapters*” P5 e P7, che hanno sequenze complementari agli oligonucleotidi ancorati sulla cella a flusso utilizzata per il sequenziamento.

I prodotti della preparazione del campione sono, quindi, frammenti di DNA con legate alle estremità sequenze di *adapters*:



**Figura 17:** Una PCR a ciclo limitato aggiunge sequenze di *index* e *adapters* complementari agli oligonucleotidi ancorati alla cella a flusso.

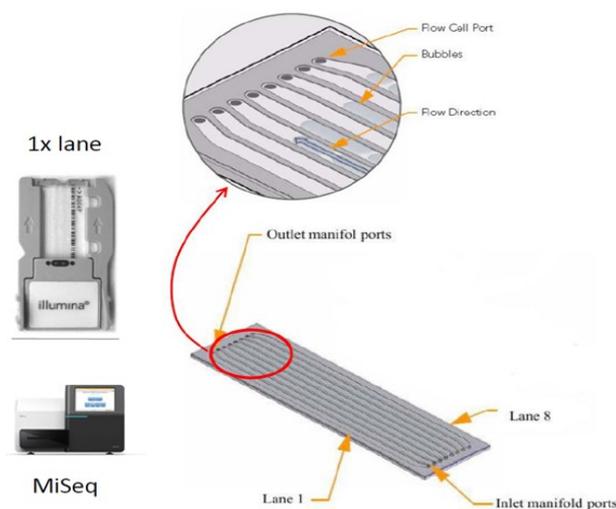
La concentrazione del DNA di partenza consigliata per la costruzione della *library* deve essere pari a 0.2 ng/μL, quindi il prodotto di PCR, dopo essere stato quantificato, deve essere diluito e portato alla concentrazione richiesta per il sequenziamento.

Le librerie sono state costruite utilizzando il kit *Nextera XT DNA Library Preparation* (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) e la robotica *Hamilton* (Microlab STAR Line).

## 2. “cluster generation”

Lo *step* successivo alla preparazione della *library* è la generazione dei *cluster*. Questo *step* porta alla produzione di singoli *cluster* sulla *flow cell* tramite ibridazione oligo-specifica tra la libreria di DNA e gli oligonucleotidi presenti sulla *flow cell* stessa.

Il sequenziatore *MiSeq* di Illumina utilizza una cella a flusso consistente in una “*slide*” otticamente trasparente costituita sulla superficie da 8 comparti (*lanes*) a cui sono legati degli oligonucleotidi di ancoraggio:



**Figura 18:** Struttura di una cella a flusso.

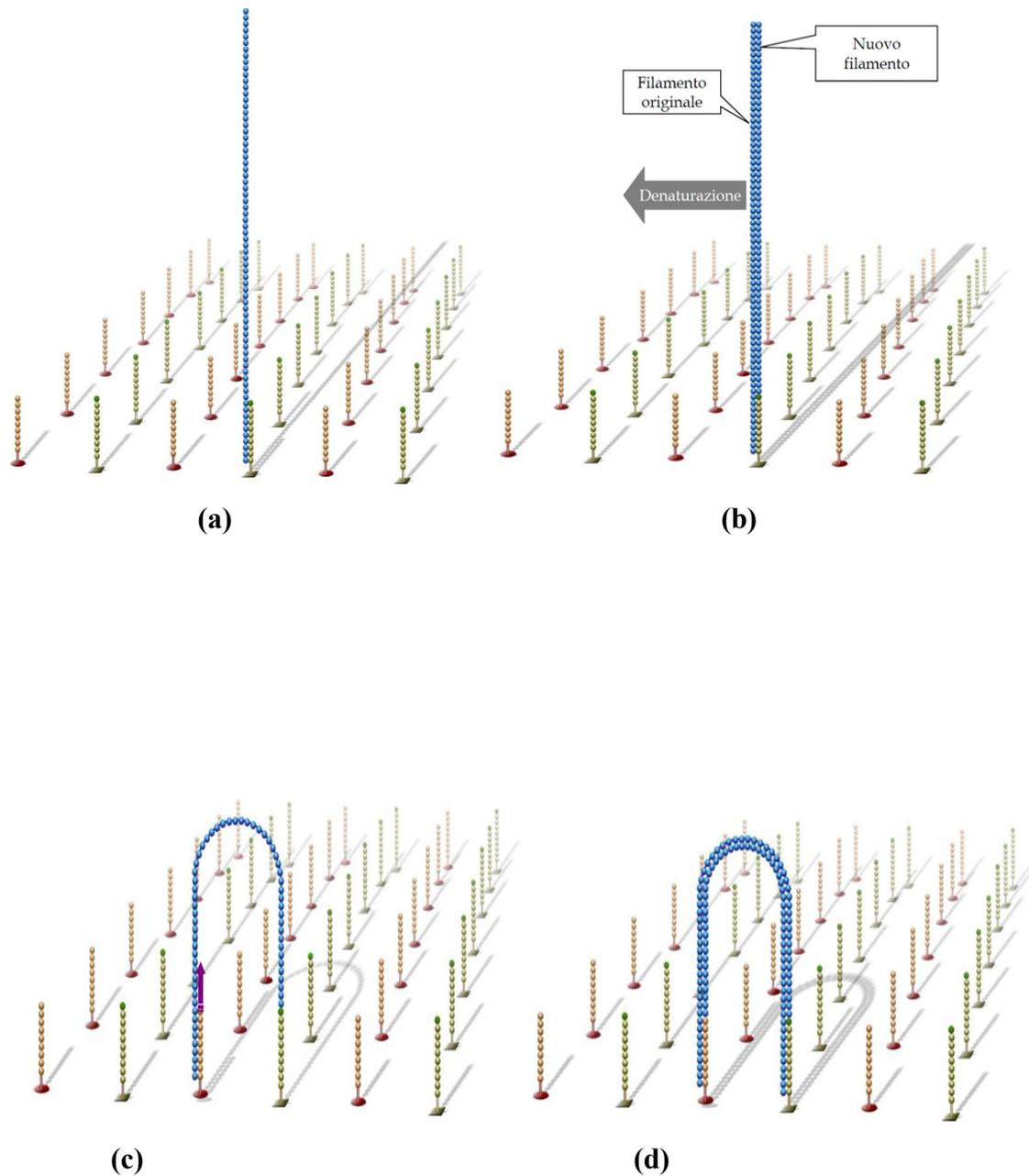
Ogni *lane* della *flow cell* è rivestita da una matrice ricoperta di oligonucleotidi con sequenza complementare a quella degli *adapters* posizionati alle estremità dei frammenti formanti la *library*.

Il DNA a singolo filamento viene fatto fluire sulla *flow cell*, e così si ha il legame dell’adattatore all’oligonucleotide (Figura 19a).

Viene fatta una estensione a partire dall’adattatore tramite una DNA Polimerasi, e in questo modo il filamento prodotto sarà legato covalentemente alla *flow cell* (Figura 19b). Il filamento originale, che si era legato per complementarità di sequenza, verrà scartato, ovvero denaturato, e lavato dalla *flow cell*.

I frammenti di DNA legati alla *flow cell* sono amplificati mediante una amplificazione “a ponte” (“*bridge amplification*”), che si basa sulla cattura dei filamenti di DNA ripiegati ad arco che si ibridano ad un oligonucleotide di ancoraggio adiacente.

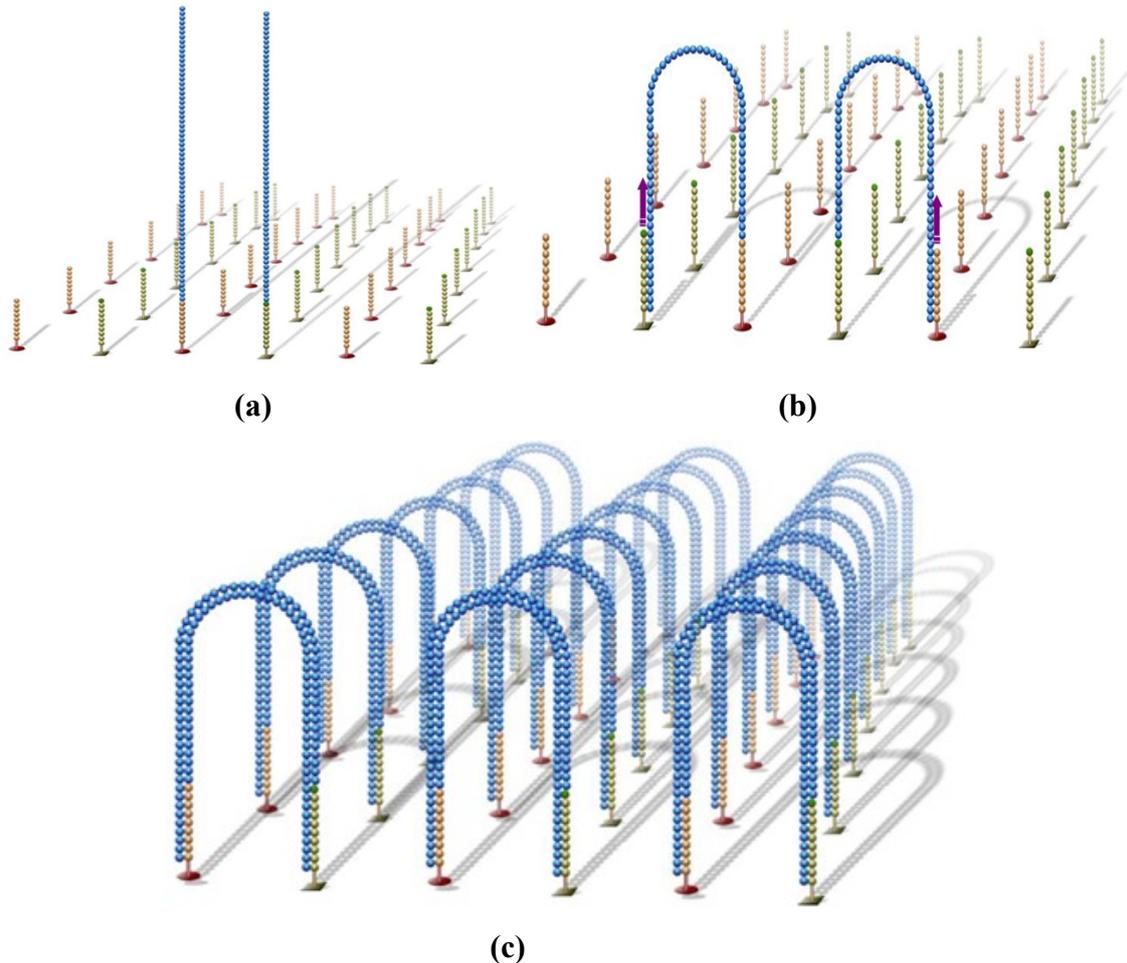
Il singolo filamento si ibrida all'*adapter* più vicino, formando un *bridge* (Figura 19c); lo stesso *adapter* legato alla *flow cell* funziona da *primer* per replicare il filamento formante il *bridge* (Figura 19d).



**Figura 19:** Rappresentazione schematica della “bridge amplification” in una cella a flusso. (a) Legame dell’adattatore all’oligonucleotide; (b) Estensione tramite DNA Polimerasi e generazione di un nuovo filamento covalentemente legato alla *flow cell*; (c) Formazione del *bridge* a singolo filamento; (d) Formazione del *bridge* a doppio filamento.

Il dsDNA *bridge* viene, poi, denaturato, e in questo modo due filamenti sono legati covalentemente al supporto, sono a singolo *strand* e sono uguali al filamento originario che si era legato alla *flow cell* (Figura 20a).

Cicli multipli di amplificazione convertono la singola molecola di DNA stampo in un *cluster* di frammenti ripiegati, amplificati clonalmente, ciascuno composto approssimativamente da 1000 ampliconi clonali, ovvero 1000 molecole uguali alla molecola iniziale che si era legata (Figura 20c).

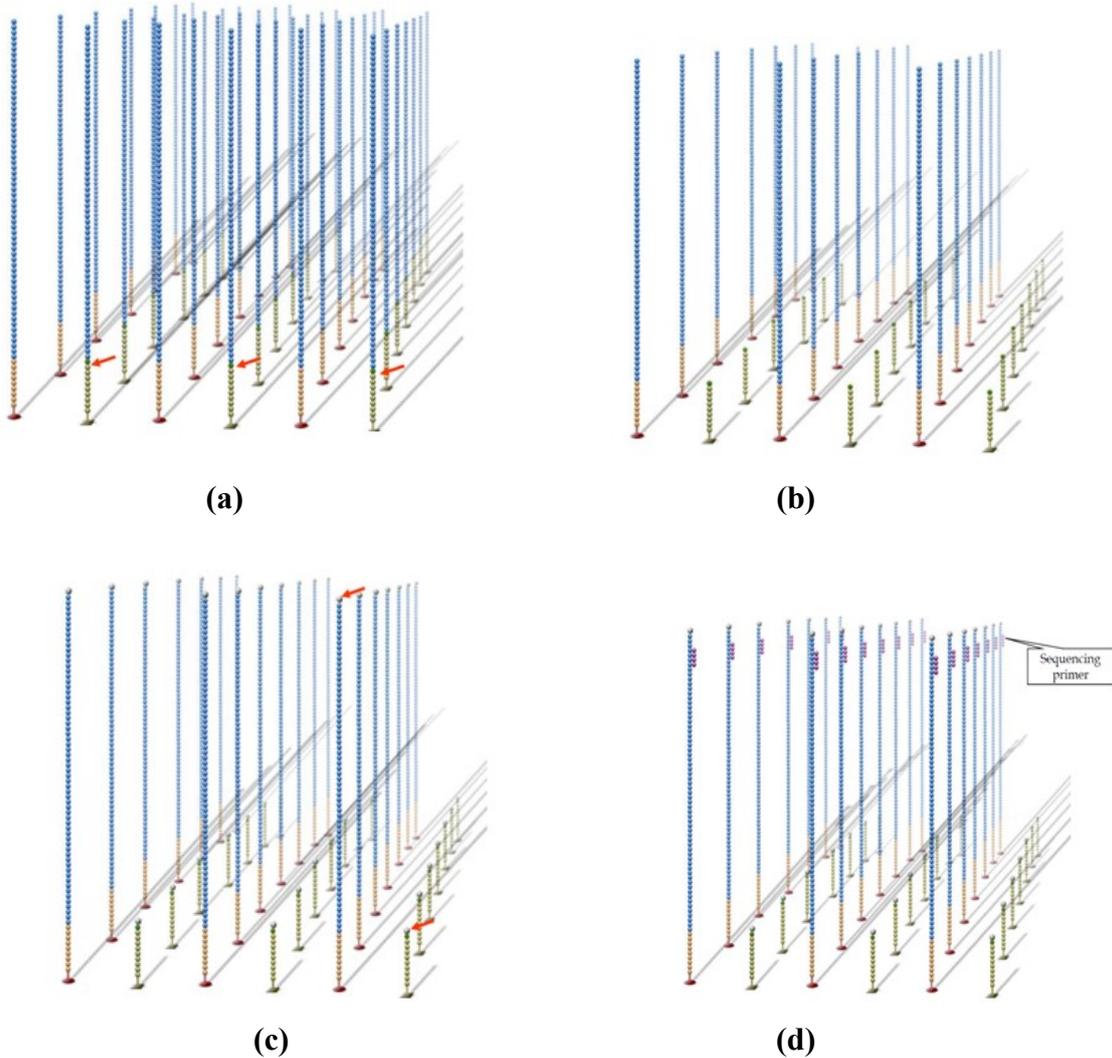


**Figura 20:** Rappresentazione schematica della generazione dei *cluster*. (a) Denaturazione del dsDNA *bridge*; (b) formazione di altri *bridges*; (c) amplificazione clonale dei *cluster*.

In una singola cella a flusso possono essere generati circa  $50 \times 10^6$  *cluster* separati.

In seguito alla generazione dei *cluster*, avviene una denaturazione di tutti i *bridges* che si sono formati, ottenendo DNA a singolo filamento legati alla *flow cell*, e viene effettuato un taglio chimico su un singolo adattatore per avere in un *cluster* tutti i filamenti nella stessa direzione (vengono eliminati i filamenti *reverse*, e quindi il *cluster* alla fine risulta formato solo dal filamento *forward*).

In questo modo è possibile sequenziare base per base il singolo *cluster*. Viene, poi, effettuato un blocco alla estremità 3' del filamento *forward* per evitare che quest'ultimo, per complementarità, si appai all'adattatore più vicino.



**Figura 21:** (a) denaturazione di tutti i *bridges* a doppio filamento; (b) Taglio chimico per avere in un *cluster* tutti i filamenti nella stessa direzione; (c) Blocco alla estremità 3' del filamento *forward*; (d) Appaiamento del *sequencing primer* per il sequenziamento.

A questo punto può avere inizio il sequenziamento.

### 3. Sequenziamento del DNA

Il sequenziamento dei filamenti senso avviene mediante ibridazione di un *primer* complementare alla sequenza dell'oligonucleotide adattatore; successivamente si ha l'aggiunta di una DNA polimerasi e di una miscela di 4 nucleotidi terminatori "reversibili" marcati con fluorofori differenti.

I nucleotidi terminatori sono incorporati in base alla complementarità della sequenza di ciascun filamento, all'interno di ogni *cluster* clonale. Dopo l'incorporazione, i reagenti in eccesso vengono rimossi con un lavaggio e la fluorescenza relativa ad ogni *cluster* viene rilevata e registrata.

Mediante successivi passaggi, il gruppo di blocco dei nucleotidi terminatori reversibili viene rimosso e la marcatura fluorescente viene allontanata tramite un lavaggio, consentendo di effettuare il ciclo successivo di sequenziamento.

Al termine del sequenziamento avviene l'acquisizione delle immagini. Viene prodotta una immagine specifica per ciascuno dei 4 nucleotidi e, man mano che si procede con il ciclo di sequenziamento, viene ricostruita, ciclo per ciclo, la mappa di quel *cluster*, sovrapponendo le immagini dei 4 nucleotidi e analizzandole con un algoritmo (Figura 22).

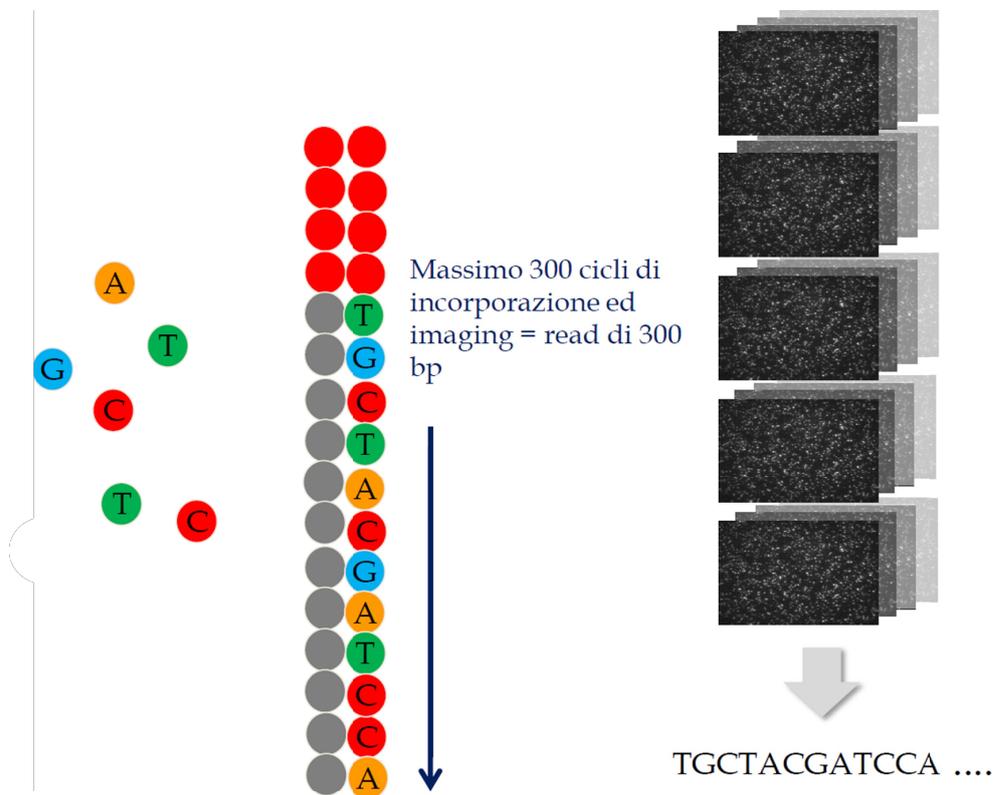


Figura 22: Rappresentazione schematica del sequenziamento NGS.

#### 4. Analisi dei risultati ottenuti con sequenziamento NGS

I *cluster* vengono identificati e localizzati attraverso una serie di immagini dei segnali di luminescenza o di fluorescenza acquisiti dalla superficie della cella a flusso, registrate dopo ogni passaggio di sequenziamento iterativo.

Il punto di partenza è la sovrapposizione di queste immagini al fine di creare una mappa con all'interno la posizione di ciascun *cluster*. Ad ogni ciclo si vede quale lunghezza d'onda sta emettendo ciascun *cluster* e ad ognuno di essi si assegna un nucleotide specifico. Questo viene fatto contemporaneamente per tutti i *cluster* generati.

Mediante l'impiego di algoritmi specifici vengono valutati una serie di parametri di immagine e a ciascuna base vengono assegnati punteggi di qualità, meglio definiti come “*quality scores*” correlati alla probabilità di errore.

L'indicatore di qualità complessiva prende il nome di Q-SCORE, e permette di assegnare una qualità ad ogni singola base.

Le qualità sono classificate in:

Q10: probabilità di incorporazione di una base scorretta pari a 1/10 (**90%** di accuratezza);

Q20: probabilità di incorporazione di una base scorretta pari a 1/100 (**99%** di accuratezza);

Q30: probabilità di incorporazione di una base scorretta pari a 1/1000 (**99,9%** di accuratezza);

Q40: probabilità di incorporazione di una base scorretta pari a 1/10000 (**99,99%** di accuratezza).

Il metodo *Sanger* ha una qualità pari a Q20 e quindi presenta una accuratezza pari al 99%; con NGS, invece, si arriva ad un Q30 e spesso anche ad un Q40.

L'operazione di elaborazione principale consiste nella conversione delle immagini acquisite in *reads*; le piattaforme NGS richiedono un adeguato numero di *reads* tra loro sovrapposte, definito “*coverage*” per le fasi di assemblaggio, allineamento e analisi dei dati.

Il primo *step* dell'analisi dei dati NGS è un controllo di qualità delle *reads* ottenute durante il sequenziamento, che è stata effettuata mediante il programma *FastQC* v0.11.8 [<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>].

*FastQC* analizza i file in formato fastq come input e restituisce un *report* HTML contenente informazioni ben strutturate e illustrate graficamente su diversi aspetti qualitativi delle *reads*. Nella prima sezione del *report* si trovano informazioni generali riguardanti il numero e la lunghezza delle *reads*, chiamate "Statistiche di base". La sezione "sequenze sovra-rappresentate", invece, mostra l'elenco degli adattatori potenzialmente non eliminati. In questa pagina sono disponibili spiegazioni dettagliate relative al significato e ai potenziali problemi di ciascuna sezione del *report*.

Per eliminare le *reads* di bassa qualità e rimuovere l'eventuale presenza di adattatori, è stato utilizzato il *software* *TRIMMOMATIC* v0.39 [133]. I parametri settati per l'analisi sono stati: ILLUMINACLIP (2:30:10), HEADCROP (12), LEADING (3), TRAILING (3), SLIDINGWINDOW (4:15), MINLEN (36). Dopo il processo di *trimming* le

sequenze sono state rianalizzate con il programma *FastQC* per controllarne nuovamente la qualità.

A questo punto, le *reads* sono state allineate e mappate contro un genoma di riferimento (JN858070) scaricato dalla banca dati NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), usando i *softwares* *Geneious* v10.1.3 e *Bowtie* v2.3.4.3.

Le sequenze allineate vengono memorizzate in formato SAM (*Sequence Alignment/Map*), convertito con il programma *samtools* in formato binario (BAM), che occupa meno memoria e risulta più maneggevole per le analisi successive.

Le *reads* sono state visualizzate sia con il *software* *Geneious* che con il *tool* *IGV* v2.6 (*Integrative Genomics Viewer*).

Dopo l'allineamento delle *reads*, le sequenze nucleotidiche oggetto di studio sono state confrontate con il genoma di riferimento, per individuare le eventuali variazioni presenti. Per l'analisi delle varianti (*variant calling*) è stato utilizzato il *software* *Freebayes* (v1.3.1) che produce un file VCF (*variant call format*), un formato di file testuale usato per la raccolta di varianti genomiche (SNPs, inserzioni, delezioni). La predizione dell'effetto patogenetico e la annotazione delle varianti è stata effettuata con *SNPeff* v4.3T (<http://snpeff.sourceforge.net/>), che fornisce un *output* in cui è riportata la variante rispetto al riferimento, il tipo di variazione, etc. Con *SnpSift*, insieme di *tools* utili per la manipolazione di files VCF, è possibile filtrare per qualità del dato, per tipo di variante ed effetto patogenetico, etc.

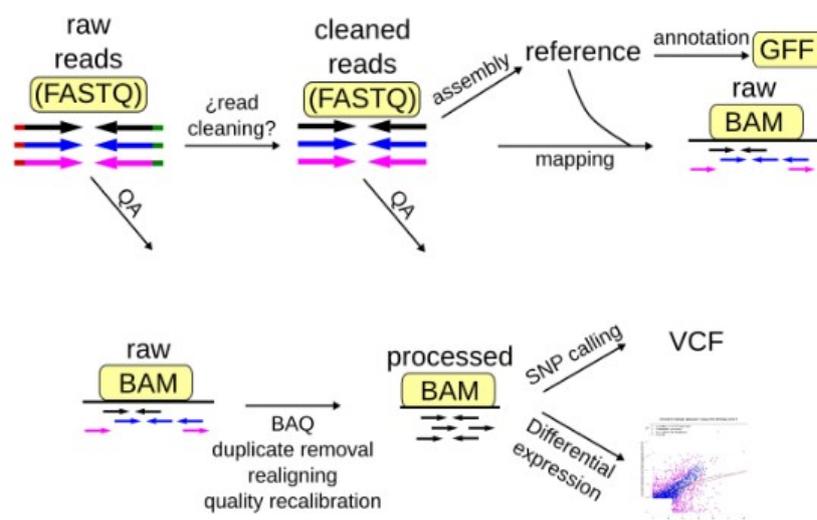


Figura 23 : Principali formati dei file prodotti dall'analisi NGS.

### 3.2.13 Analisi dei dati di sequenza

L'analisi dei dati di sequenza è stata eseguita utilizzando il programma BioEdit v.7.2.5 (BioEdit Home Page <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>). Le sequenze virali di interesse sono state allineate tra loro insieme ad un numero variabile di sequenze di riferimento, ottenute dalle principali banche dati biologiche, quali *GenBank*, presso il *National Center for Biotechnology Information* (USA). Le estremità sono state eliminate, al fine di ottenere frammenti della medesima lunghezza e l'allineamento è stato effettuato utilizzando l'algoritmo *ClustalX* contenuto nel programma, intervenendo con un *editing* manuale quando necessario. In questo modo sono stati costruiti i *dataset* di sequenze utilizzati per le successive analisi di tipizzazione [134].

#### 3.2.13.1 Preparazione dei dataset per l'analisi filogenetica

L'analisi filogenetica è volta a studiare le relazioni evolutive esistenti tra le sequenze. Tali relazioni sono rappresentate attraverso alberi filogenetici, che costituiscono dei grafici bidimensionali composti da nodi connessi tra loro tramite rami.

I nodi terminali rappresentano i *taxa* attuali, mentre i nodi interni rappresentano quelli ancestrali.

Le relazioni filogenetiche vengono definite attraverso la topologia dell'albero: la distribuzione dei nodi e la lunghezza dei rami forniscono indicazioni sulla divergenza evolutiva esistente tra i diversi *taxa*, permettendo di individuare gruppi monofiletici e linee evolutive.

L'analisi filogenetica rappresenta oggi l'unico metodo affidabile per la tipizzazione delle sequenze, siano esse sottotipi puri o ricombinanti; permette, inoltre, di esaminare le relazioni genetiche all'interno di un gruppo di sequenze o tra virus provenienti da diverse aree geografiche, fornendo indicazioni epidemiologiche sull'origine e la propagazione dei virus in una popolazione.

La filogenesi è stata eseguita su due *dataset* e un *subset*, utilizzando opportune sequenze di riferimento.

In particolare, il primo *dataset* includeva 127 genomi completi virali isolati in diverse nazioni Europee tra il 2004 e il 2018: Austria (AT, n = 20), Repubblica Ceca (CZ, n = 4), Grecia (GR, n = 14), Ungheria (HU, n = 3), Slovacchia (SK, n = 4), Serbia (SR, n =

2), Germania (DE, n =3) e Italia (IT, n 77, di cui 59 caratterizzati da noi in laboratorio). A partire da questo *dataset* è stato generato un *subset* di sole sequenze Italiane, usato per ricostruire dal punto di vista filogeografico l'importante epidemia registrata nel 2018.

Il second *dataset* consisteva di 130 sequenze italiane del gene *envelope* isolate tra il 2011 e il 2018 nelle regioni della Lombardia e dell'Emilia Romagna, e includeva tutti gli isolati caratterizzati in questo studio e descritti nella Tabella 1, e 18 riferimenti.

Le sequenze sono state selezionate sulla base dei seguenti criteri: 1) pubblicazione su riviste *peer-reviewed*; 2) assegnazione certa a sottotipi non ricombinanti; 3) località e anno di campionamento noti.

### 3.2.13.2 Studio dei ceppi ricombinanti

Le sequenze non tipizzabili all'analisi filogenetica sono state esaminate per cercare eventuali ricombinazioni tra ceppi noti. Questo processo è stato studiato con RDP4 v4 (*Recombination Detection Program*), un programma per l'analisi della ricombinazione e/o dei segnali di riassortimento genomico in un *set* di sequenze di DNA allineate. Questo *tool* simultaneamente fa uso di metodi differenti per rilevare e caratterizzare ipotetici eventi di ricombinazione all'interno di un allineamento di sequenze.

In particolare, RDP4 include il metodo originale RDP [135], BOOTSCANning [136, 137], GENECONV [138], MAXCHI [19, 139], CHIMAERA [139], SISCAN [140] e 3SEQ [141], che rappresentano i principali metodi di investigazione degli eventi primari di ricombinazione. In aggiunta, altri 5 metodi possono essere usati per testare l'accuratezza dei *breakpoint* rilevati attraverso i metodi primari di esplorazione.

Molti dei metodi sopracitati permettono non solo di individuare i ceppi ricombinanti, ma anche i parenti *major* e *minor* coinvolti nel processo e i punti di ricombinazione. A tal proposito, un programma molto usato e disponibile gratuitamente in rete è Simplot che permette di analizzare sequenze di ~10Kb di lunghezza.

Simplot calcola e mostra la percentuale di identità della sequenza da analizzare o *query* rispetto ad un pannello ottimale di sequenze di riferimento allineate rispetto alla regione di interesse.

Il programma utilizza una finestra di specifiche dimensioni che scorre lungo l'allineamento in piccoli *step* che si overlappano, generando due distinti *output* grafici.

Nell'opzione Simplot la sequenza *query* viene comparata secondo il metodo di similarità e dissimilarità con le altre dell'allineamento. Il calcolo statistico è mostrato in un grafico x/y dove x indica la posizione dei residui e y la % di similarità/dissimilarità calcolata sulla base della finestra utilizzata.

Il secondo *output* è generato mediante la cosiddetta analisi di *bootscan*, che permette di calcolare e mettere in grafico la percentuale di alberi permutati, sempre utilizzando una finestra scorrevole lungo l'intera sequenza.

### **3.2.13.3 Stima delle distanze genetiche**

Le distanze genetiche, fondamentali per lo studio dell'evoluzione molecolare e utili per le ricostruzioni filogenetiche e la stima dei tempi di divergenza, sono state stimate con il *software MEGA v7* (<https://www.megasoftware.net/>). Usualmente la distanza evolutiva tra una coppia di sequenze è misurata dal numero di sostituzioni nucleotidiche (o amminoacidiche) che si verificano fra di esse.

La maggior parte dei metodi ampiamente utilizzati per la stima della distanza fra sequenze nucleotidiche e amminoacidiche sono inclusi in *MEGA*, che è in grado di calcolare anche gli errori standard delle stime, utilizzando formule analitiche e il metodo *bootstrap*, una tecnica in grado di valutare l'attendibilità di una analisi filogenetica.

A livello nucleotidico e amminoacidico sono stati calcolati il numero di differenze e la *p-distance*. Il numero di differenze rappresenta il numero dei siti in cui due sequenze nucleotidiche a confronto sono diverse; la *p-distance* rappresenta la proporzione (p) dei siti in cui due sequenze nucleotidiche confrontate sono diverse e si ottiene dividendo il numero di differenze nucleotidiche per il numero totale di nucleotidi confrontati.

Data la distanza genetica molto bassa, abbiamo preferito evitare l'uso di modelli più complessi (come Kimura 2 parametri), in quanto i risultati ottenuti sarebbero stati identici, ma con una maggiore complessità di calcolo e imprecisione.

### **3.2.13.4 Analisi Bayesiana: filogenesi e filogeografia**

Per la scelta del modello di calcolo delle distanze genetiche è stata effettuata preventivamente la stima del rapporto fra le transizioni (mutazioni quali purina-purina o pirimidina-pirimidina) e le trasversioni (mutazioni del tipo pirimidina-purina o purina-pirimidina) con il programma *jModeltest v2.1.7* [142], utilizzato per calcolare le

distanze genetiche tra le sequenze mediante opportuni modelli evolutivisti di differente complessità. Quelli da noi utilizzati sono stati il criterio di informazione *Akaike* (AIC), il criterio di informazione Bayesiano (BIC) e l'approccio *decision-theoretical performance-based* (DT).

AIC è un metodo per la valutazione e il confronto tra modelli statistici sviluppato dal matematico giapponese Akaike nel 1971. Fornisce una misura della qualità della stima di un modello e si basa sul concetto di entropia dell'informazione, offrendo una misura relativa di informazioni perse quando un dato modello è usato per descrivere la realtà. La regola è quella di preferire i modelli con l'AIC più basso.

BIC, strettamente correlato ad AIC, è un criterio per la selezione di un modello tra una classe di modelli parametrici con un diverso numero di parametri, e introduce un termine di penalizzazione per il numero di parametri, che è più forte della penalizzazione introdotta da AIC [143].

Il criterio DT rappresenta un nuovo approccio alla selezione del modello che si basa sul criterio di informazione Bayesiano. Include una penalità per l'*overfitting* e simultaneamente confronta tutti i modelli presi in considerazione senza basarsi sul confronto a coppie [144].

Il modello selezionato per il primo *dataset* è stato TN93 (Tamura-Nei, 93) + I; quello selezionato per il secondo HKY (Hasegawa-Kishino-Yano).

Gli alberi filogenetici, i parametri dei modelli, i valori di *evolutionary rate* (ER) e i modelli di crescita di popolazione sono stati stimati mediante un metodo Bayesiano, basato sull'algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), incluso nel *software Beast* v1.8.4 [145].

La statistica Bayesiana calcola la probabilità a posteriori dell'albero (ovvero la probabilità di ottenere un certo albero in base ai dati forniti), diversamente da quanto avviene nel *Maximum Likelihood*, che ricerca la più alta verosimiglianza dell'albero (ovvero la probabilità di ottenere i dati/sequenze in base all'albero ottenuto). La probabilità a posteriori è così calcolata, secondo le teorie Bayesiane, a partire dalla probabilità a priori e dalla *likelihood* dell'albero.

Le probabilità a posteriori stimate vengono approssimate mediante l'algoritmo MCMC. Inizialmente viene generato uno *starting tree* casuale, che viene poi confrontato con un nuovo albero ottenuto modificando in modo sistematico il precedente e i relativi parametri; il secondo albero viene, quindi, accettato o rifiutato sulla base della probabilità a posteriori in uno specifico processo di campionamento. Questo sistema di

confronto viene ripetuto a catena fino a ottenere l'albero con il più alto prodotto di probabilità a posteriori nodale tra tutti quelli generati (definito *consensus tree* o *maximum clade credibility tree*).

Le catene di Markov sono state fatte correre per 100 milioni di generazioni e campionate ogni 10000 *step*.

L'analisi filogenetica può essere condotta sulla base di un modello temporale definito orologio molecolare (*Molecular Clock*) [146, 147]. Tale modello si basa sull'assunto che le mutazioni si accumulino nel tempo in modo pressoché costante e permette di delineare le relazioni intercorrenti tra le distanze genetiche e il tempo, permettendo al tempo stesso di datare gli eventi di divergenza evolutiva.

I modelli più semplici prevedono un orologio molecolare più rigido (*strict clock model*), nel quale si assume che tutti i *lineage* evolvano alla stessa velocità; diversamente, nei modelli più complessi (*relaxed clock model*) le velocità evolutive variano nel tempo e tra i vari *lineage*, fornendo degli intervalli di variabilità intorno ad un valore medio di velocità evolutiva. In questo studio sono stati testati sia il modello *strict* che il modello *relaxed*, con una distribuzione log-normale non correlata.

Quattro modelli demografici parametrici (*constant population size*, *exponential expansion* e *logistic growth*) e i modelli non parametrici *Bayesian skyline plot* (BSP), *GMRf bayesian skyride* e *skygrid* sono stati confrontati con un test denominato Bayes Factor (BF) e attraverso il calcolo del *marginal likelihood*. Entrambi gli stimatori hanno confermato un orologio molecolare di tipo *rilassato*, in cui ogni *lineage* ha un *rate* evolutivo caratteristico e non correlato con quello dei *lineage* contigui. In accordo con Kass e Raftery, la forza dell'evidenza contro  $H_0$  viene valutata come segue:  $2\ln BF < 2$  nessuna evidenza; tra 2 e 6 debole evidenza; tra 6 e 10 forte evidenza e  $> 10$  evidenza molto forte. Un valore di  $2\ln BF$  negativo è indice di evidenza in favore di  $H_0$ . Solo valori  $\geq 6$  sono considerati significativi.

L'albero datato è stato ottenuto selezionando l'albero con il più alto prodotto di probabilità a posteriori (*maximum clade credibility*), mediante il programma *Tree Annotator* v1.8.0.

Le sequenze virali sono state datate in base al momento del prelievo e i rami dell'albero filogenetico hanno una lunghezza proporzionale al tempo. Questo tipo di approccio stima la distanza temporale dei rami ed il tempo dell'ancestore comune più recente (tMRCA, *time of the most recent common ancestor*).

Il *software Figtree* v1.4.2, disponibile gratuitamente sul web (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), è stato usato per la riproduzione grafica degli alberi.

La significatività degli alberi è stata stimata mediante il metodo *Bootstrap*, che consiste in un ricampionamento del multiallineamento estraendone a caso i siti. Sono stati considerati significativi i nodi interni supportati da un *bootstrap* maggiore del 70%.

L'analisi ottenuta tramite *Beast* è stata poi validata dal *software TRACER* v1.5 (TRACER Home Page: <http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>) il quale verifica la stima dell'effettiva dimensione del campione (ESS, *effective sample size*).

L'incertezza delle stime ottenute è stata indicata con intervalli di *Highest Posterior Density* del 95% (HPD).

L'approccio filogeografico si basa sull'esistenza di una relazione tra l'evoluzione molecolare di un organismo e la sua distribuzione spaziale. Questa relazione richiede normalmente milioni di anni di evoluzione perché possa essere verificata, ma nel caso di virus ad RNA, caratterizzati da una elevatissima velocità evolutiva e dalla produzione di milioni di generazioni virali in un tempo brevissimo, è possibile osservare tale relazione anche nell'intervallo di pochi anni che possono intercorrere tra due campionamenti. Sono attualmente disponibili diversi approcci filogenetici per inferire la distribuzione spaziale di un organismo sulla base della filogenesi dei suoi geni; in questo lavoro è stato utilizzato un approccio Bayesiano, implementato nel programma *Beast* 1.8.0. Tale approccio consente di ricostruire la località più probabile dei nodi interni esclusivamente sulla base della conoscenza del luogo di isolamento delle sequenze incluse nell'analisi. Il modello utilizzato è detto CTMC (*Continuous-Time Markov Chain*), e consente di raggruppare le sequenze sulla base della località di campionamento. La filogenesi di un virus, ricostruita in scala spazio-temporale, permette quindi di stimare la sua diffusione geografica, in relazione al tempo reale, e di ricostruire quindi la sua storia epidemiologica. Gli alberi ottenuti vengono rappresentati con il *Maximum Clade Credibility (MCC) tree*, cioè l'albero con la più alta probabilità posteriore dopo un *burn-in* del 10%.

La località più probabile per ogni nodo viene evidenziata contrassegnando le ramificazioni dell'albero con diversi colori.

La metodica descritta si basa su un approccio cosiddetto discreto, in quanto raggruppa le sequenze in gruppi corrispondenti alle località di campionamento.

Una metodica più raffinata di analisi filogeografica è quella cosiddetta “continua”, che permette lo studio della diffusione del virus in uno spazio bidimensionale continuo, definito dalle coordinate geografiche del luogo di campionamento di ogni sequenza.

Nel nostro studio, in particolare, le coordinate delle località di campionamento erano disponibili per gli uccelli e per le zanzare (trappole), e sono state dedotte sulla base della residenza per i pazienti [148, 149].

Per la ricostruzione filogeografica le sequenze sono state sottoposte ad analisi mediante il programma *Spread v.1.0.7*, che riproduce visivamente la migrazione virale nelle regioni studiate.

### **3.2.13.5 Analisi Filodinamica e stima del tasso riproduttivo di base, R0**

Al fine di delineare la storia epidemiologica/evolutiva di WNV-2 è stata condotta una analisi filodinamica sul *clade* europeo e in particolare su quello italiano.

Per ricostruire la dinamica evolutiva del virus abbiamo utilizzato due modelli, quello della coalescenza e il *birth-death*.

La teoria della coalescenza si basa sulla correlazione tra il tempo in cui due *taxa* o due *lineage* hanno condiviso uno stesso ancestore e le dimensioni della popolazione in esame, rappresentando così un ottimo strumento per stimare nel tempo i cambiamenti nella dimensione effettiva della popolazione ( $N_e$ ).

Per tracciare l'evoluzione dei *lineage* virali, da cui estrapolare gli eventi di coalescenza, è necessario disegnare uno *skyline plot*, che mostra le dimensioni della popolazione virale (numero delle infezioni effettive  $N$  sulle ordinate) e il suo andamento su scala temporale (tempo  $t$  sulle ascisse).

Questo tipo di approccio è alla base dei metodi Bayesiani e del programma *Beast*, il quale consente di stimare contemporaneamente la topologia dell'albero filogenetico, la velocità evolutiva, la popolazione effettiva e i tMRCA dei nodi interni, a partire da un allineamento multiplo.

L'analisi Bayesiana è stata eseguita assumendo lo stesso modello di sostituzione e orologio molecolare impiegato per il *dataset* completo.

Sono stati testati due modelli demografici parametrici (*constant population size*, *exponential growth*) e il modello non parametrico *Bayesian skyline plot* (BSP) ed è stato scelto, sulla base del *Bayes Factor* (BF) ottenuto, il modello *relaxed skyline* (RelSky).

Nell'analisi della coalescenza la dimensione dei gruppi è stata fissata a quattro.

Un metodo alternativo per studiare la filodinamica di una infezione è quello di stimare come varia nel tempo e nello spazio la distribuzione e trasmissione delle malattie infettive.

Un parametro molto importante in questo contesto è il tasso di riproduzione di base o  $R_0$ , che rappresenta il numero di casi secondari attesi da un singolo soggetto infettato al tempo 0 in cui tutta la popolazione è completamente suscettibile.

Ogni soggetto infetto deve poter trasmettere l'infezione almeno ad un altro soggetto suscettibile. Se ciò non avviene, l'epidemia si arresta; viceversa, se il soggetto infetto può infettare più soggetti suscettibili, l'epidemia cresce in modo esponenziale.

$R_0$  aumenta con la durata della infezione (D) e con il numero di soggetti suscettibili all'interno della popolazione con cui il caso primario entra in contatto (S), e dipende anche dalla trasmissibilità del patogeno ( $\beta$ ). Pertanto  $R_0 = \beta * S * D$ .

Per fermare un'epidemia si può agire riducendo il numero di suscettibili nella popolazione (per esempio tramite una vaccinazione), la durata dell'infezione tramite cure adatte (antimicrobici o riposo a letto) o la trasmissibilità.

In una popolazione reale non tutti i soggetti sono suscettibili di infezione (vaccinati, infezioni pregresse), pertanto è più corretto parlare di  $R$  effettivo o  $R_e$ .

Nello studio delle dinamiche di propagazione delle malattie infettive una complicazione viene dai vettori. E' questo il caso della malattia di West Nile, che si trasmette principalmente tramite puntura di zanzara *Culex*. La diffusione di un patogeno mediante vettore dipende dalla densità del vettore, dal numero di punture giornaliere, dalla sopravvivenza giornaliera, dalla competenza del vettore e dal periodo d'incubazione del patogeno nel vettore.

Il modello *birth-death* deduce direttamente i cambiamenti in  $R_e$  e altri importanti parametri epidemiologici, come la durata del periodo di infettività (tasso di rimozione).

Per la costruzione dell'albero *birth-death* è necessario stimare i *priors* di importanti parametri epidemiologici, quali  $R_e$ , il tasso di rimozione (*become uninfected*), la probabilità di campionamento e l'origine dell'epidemia. Per stimare tali parametri sono stati utilizzati *priors* caratterizzati da diverse distribuzioni di probabilità, in particolare:

- per  $R_e$  un *prior lognormal* ( $M= 0.0$  che permette di limitare il valore di  $R_e$  tra 0 e 8);
- per il tasso di rimozione un *prior normal* ( $M= 27$  e  $\text{Sigma}=5$ ) che corrisponde ad un periodo di infettività tra i 10 e i 20 giorni;

- la probabilità di campionamento è stata valutata molto bassa e quindi è stato utilizzato un *prior*  $\beta$  con valori  $\alpha = 1.0$  e  $\beta = 9999$ ;
- per l'origine della epidemia è stato utilizzato un *prior normal* ( $M = 6$  e  $S = 2$ ), che delimita un periodo di 6-8 anni.

Sia la analisi filodinamica che quella di *birth-death* sono state effettuate utilizzando il *software Beast v2.48* e il modello di sostituzione GTR (*General Time Reversible*).

Le analisi MCMC sono state eseguite a 30 milioni di generazioni, campionando ogni 3000. La convergenza è stata valutata sulla base dei valori ESS (ESS >200).

L'incertezza delle stime ottenute è stata indicata con intervalli di *Highest Posterior Density* del 95% (HPD). Gli alberi finali sono stati visualizzati utilizzando *FigTree*, v1.4.2.

### 3.2.13.6 Analisi della pressione selettiva

La comprensione della pressione selettiva, che è alla base della variabilità genetica, rappresenta un obiettivo centrale nello studio della biologia evolutiva. Diversi tipi di pressione possono agire in natura, principalmente la selezione negativa o “purificante” e quella positiva o “diversificante”.

Una mutazione in un gene può portare ad un cambiamento fenotipico, influenzando la *fitness*. Se tale mutazione è deleteria, sarà rimossa dalla popolazione, con una diminuzione della *fitness*, e si parlerà di selezione negativa; viceversa, se la mutazione è vantaggiosa, sarà spinta ad affermarsi, con un aumento della *fitness*, e si parlerà di selezione positiva. Se la mutazione è neutra, non è soggetta a forze selettive.

Una mutazione nucleotidica che non provoca cambiamenti a livello amminoacidico è detta sinonima (o silente); viceversa, mutazioni che provocano un cambiamento nella sequenza amminoacidica vengono dette non sinonime.

La probabilità di mutazioni sinonime e nonsinonime varia sulla base della posizione (relativamente al codone) in cui la mutazione si verifica.

Nell'analisi delle sequenze codificanti, fondamentale è il rapporto tra il tasso di sostituzioni non sinonime e quello di sostituzioni sinonime (dN/dS) indicato con la lettera  $w$  [150]. Se questo rapporto è pari a 1, dN risulta pari a dS e la selezione risulta neutrale;  $w > 1$  vuol dire  $dN > dS$  pertanto la pressione selettiva sarà positiva;  $w < 1$  vuol dire  $dS > dN$  pertanto la pressione selettiva sarà negativa.

La pressione selettiva è stata valutata sul server Datamonkey, che è in grado di stimare dN, dS, a livello di singolo sito amminoacidico, identificando codoni e *lineages* sotto pressione, anche in presenza di sequenze ricombinanti. A tal proposito, sono stati utilizzati diversi approcci: *single likelihood ancestor counting (SLAC)*, *fixed-effects likelihood* e *internal fixed-effects likelihood (FEL/IFEL)*, *Mixed Effects Model of Episodic Diversifying Selection (MEME)* e *Fast, Unconstrained Bayesian AppRoximation (FUBAR)* [151].

In particolare, il metodo SLAC utilizza l'allineamento per costruire un albero filogenetico di *Maximum Likelihood* da cui è in grado di ricostruire sito per sito la sequenza ancestrale, ottenuta valutando il numero minore possibile di mutazioni. Da questa sequenza vengono calcolati i valori dN e dS e confrontati fra loro. Il test calcola il rapporto dN/dS ad ogni codone nell'allineamento; se la frequenza di sostituzioni sinonime osservate ad un determinato sito si discosta significativamente dal valore calcolato significa che in tale sito agisce una pressione selettiva.

Il metodo FEL, invece, dopo aver costruito l'albero calcola, per ogni sito, il tasso di sostituzione sinonima e il tasso di sostituzione non-sinonima, ed effettua un LRT (*Likelihood ratio test*) per valutare se i due tassi sono uguali, ricavando un valore di significatività p. Se la differenza risulta statisticamente significativa, allora il sito è soggetto a pressione selettiva.

IFEL è sempre un metodo di *Maximum Likelihood* basato sui codoni che va ad investigare se le sequenze campionate sono soggette a pressione selettiva a livello di popolazione, cioè lungo i rami interni.

Il metodo MEME è stato recentemente sviluppato per identificare la pressione selettiva positiva sia pervasiva che episodica. Questo metodo combina gli effetti fissi che avvengono a livello di un sito e gli effetti *random* che avvengono a livello dei rami. Questo modello è un'estensione di FEL, dove è permesso che alcuni rami siano sotto pressione selettiva positiva, mentre altri sotto pressione negativa.

Per concludere, FUBAR usa un approccio Bayesiano per stimare il rapporto dN/dS e assume che la pressione selettiva a ciascun sito sia costante lungo l'intera filogenesi.

## 4. RISULTATI

## 4.1 Caratterizzazione molecolare con sequenziamento NGS

---

Dal 2016 ad 2018 sono stati caratterizzati e analizzati nel nostro laboratorio 59 genomi completi virali e 53 *envelope* a partire da campioni umani e ambientali (*pool* di zanzare, uccelli, cavalli) prelevati in Nord Italia nelle regioni della Lombardia e della Emilia Romagna e raccolti rispettivamente presso l'ospedale "San Matteo" di Pavia e l'istituto Zooprofilattico della Lombardia e della Emilia Romagna.

Tutti i campioni oggetto di studio sono stati testati per la sierologia e per la biologia molecolare nei centri competenti; nel nostro laboratorio il virus è stato caratterizzato mediante sequenziamento NGS con lo strumento *MiSeq* di Illumina.

Il sequenziamento è stato preceduto dalla preparazione delle librerie di DNA genomico con la robotica *Hamilton* ed è avvenuto in corse *paired-end*.

Gli esperimenti sono stati condotti a partire da surnatanti virali o direttamente da materiale biologico (urine, plasma, liquor, *pool* di zanzare, *pool* di organi).

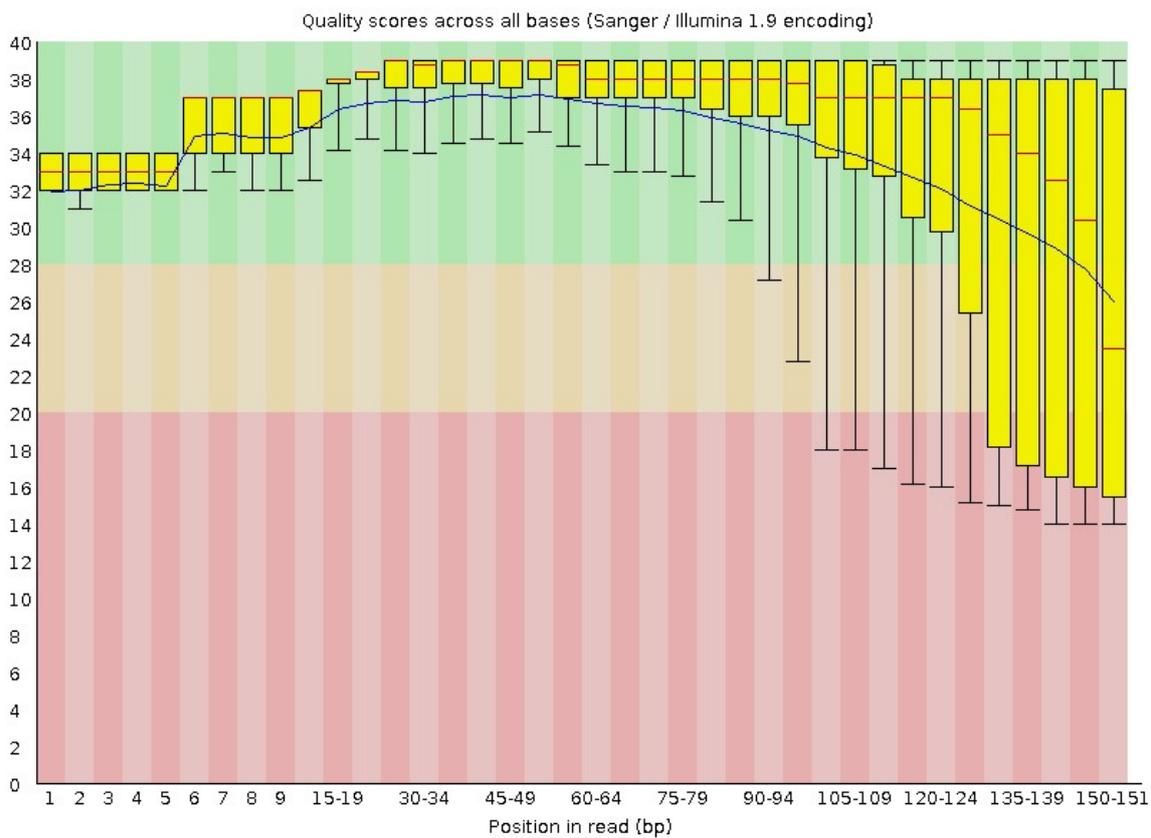
Alla estrazione dell'RNA virale, come precedentemente descritto nella sezione dei metodi, è seguita, nel caso degli isolati, la retrotrascrizione con il *random primer* FR26RV-N e l'amplificazione del genoma completo con il *primer* FR20RV.

Nel caso di mancato isolamento virale, si è proceduto con una retrotrascrizione classica con *SuperScript III Reverse Transcriptase* (*Thermo Fisher Scientific*) e una amplificazione dei diversi geni virali con le coppie di *primers* parzialmente sovrapposti descritti nella metodologia. Successivamente, i vari frammenti sono stati *poolati* per ottenere il genoma completo.

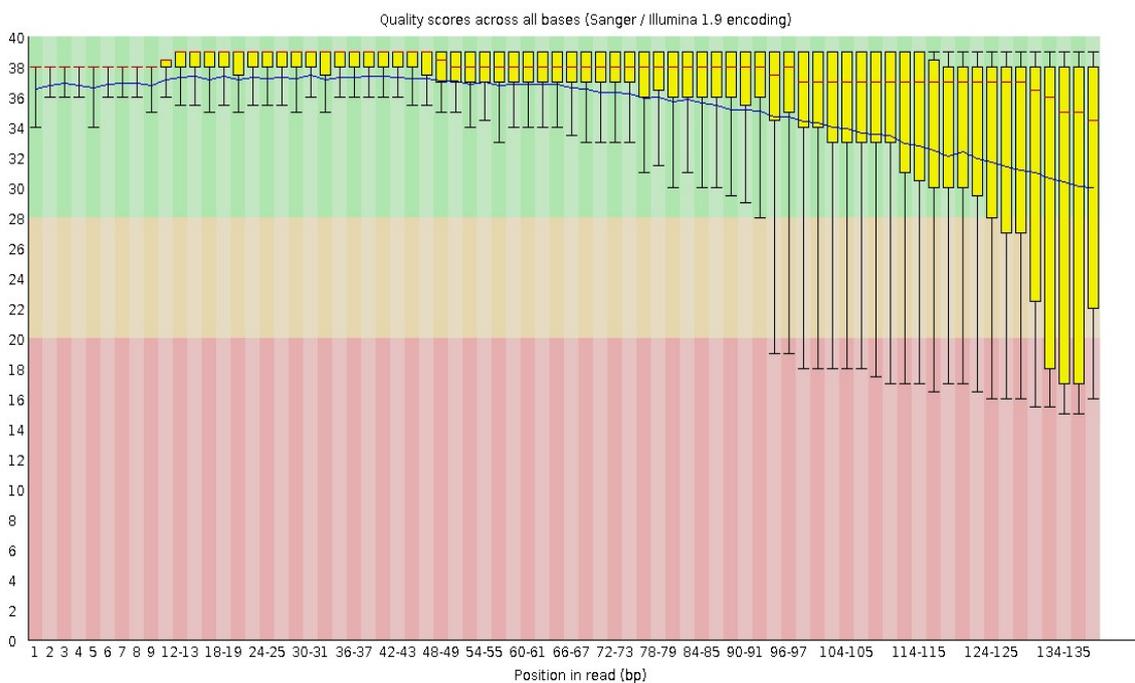
La preparazione delle librerie, che sono state costruite seguendo il protocollo *Nextera XT Sample Preparation kit*, è stata preceduta dal dosaggio con il fluoroforo *Qbit* o con il lettore di piastre *TECAN* dei purificati di PCR. Questi ultimi sono stati caricati sul robot e diluiti fino ad una concentrazione di 0.2 ngr/uL, ossia la concentrazione ottimale richiesta per la preparazione delle librerie.

I files FASTQ prodotti dal *MiSeq* sono stati analizzati con il software *FastQC* e hanno mostrato per alcuni campioni una qualità delle *reads* non completamente soddisfacente (<30X). Con il *trimming* sono state scartate tutte le basi a bassa qualità (< 20) e le *reads* troppo corte, ed è stata ripetuta l'analisi con *FastQC* (Figura 24).

**A**



**B**



**Figura 24 :** Qualità delle reads prima (A) e dopo il trimming (B), mostrata nel report del programma *FastQC*.

I dati grezzi delle sequenze sono stati allineati con un genoma di riferimento scaricato dalla banca dati *Genbank* (*accession number* JN858070) e rappresentativo della epidemia da virus West Nile verificatasi ad Ancona nel 2011.

In Tabella 3 sono mostrati i ceppi virali isolati da campioni umani e ambientali nel 2018 e la percentuale di mappaggio globale con il riferimento calcolato con il *software* *Bowtie2*:

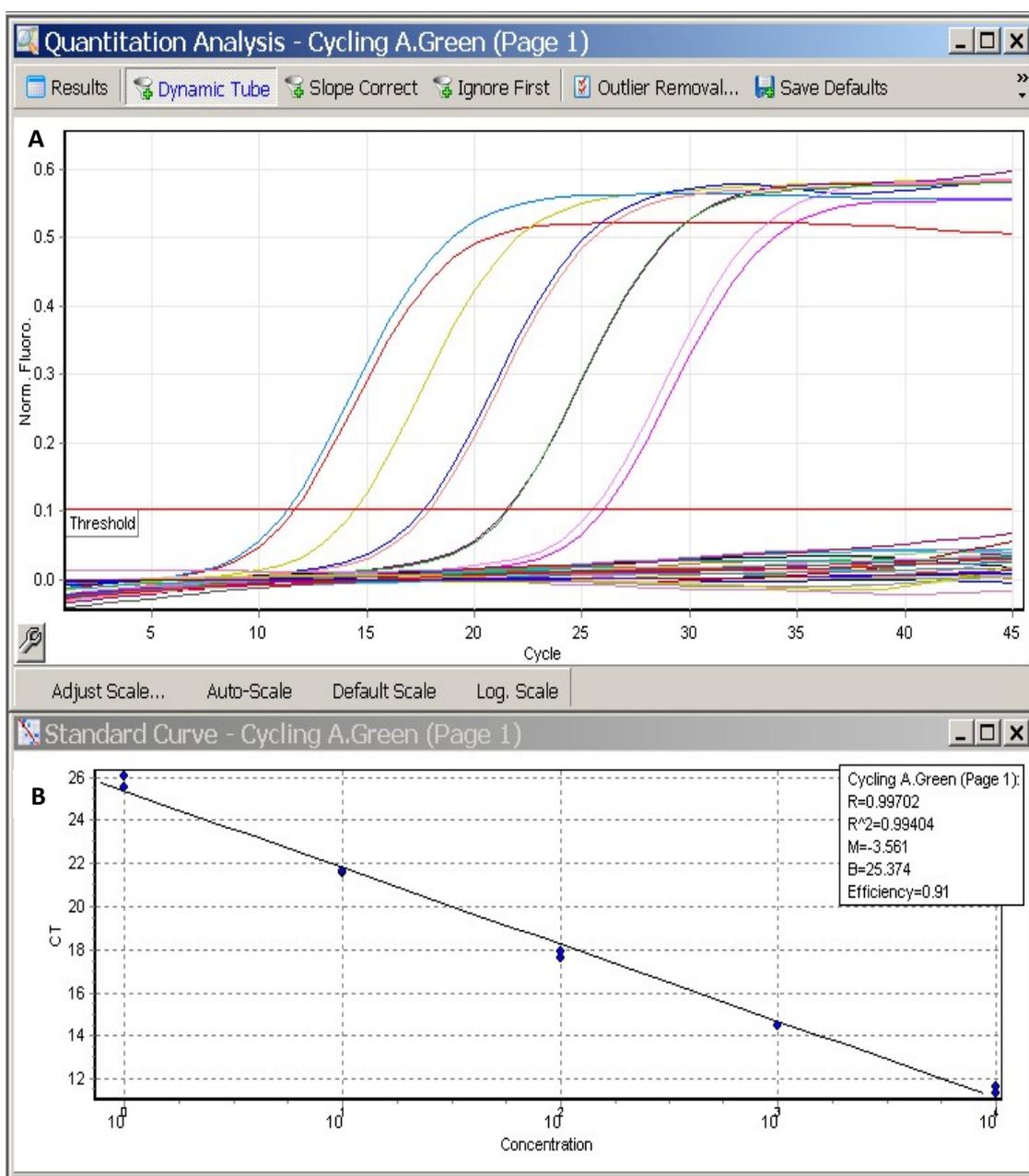
CAMPIONE	CODIFICA	GENE/GENOMA	% DI ALLINEAMENTO
198542_1	248iMN@18	envelope completo	90.68
198542_2	249iMN@18	envelope completo	97.77
198542_4	250iMN@18	envelope completo	93.13
198542_5	251iMN@18	envelope completo	93.38
198542_9	252iMN@18	envelope completo	95.02
198536_6	253iMN@18	envelope completo	96.49
198536_9	254iMN@18	envelope completo	96.49
200926_1	255iMN@18	envelope completo	54.56
207679_1	256iBS@18	envelope completo	96.42
211498_3	257iPV@18	envelope completo	85.61
212576_3	258iMN@18	envelope completo	97.17
212576_4	259iMN@18	envelope completo	96.51
219042_1	260iPV@18	envelope completo	70.25
219042_3	261iPV@18	envelope completo	95.61
219046_3	264iPV@18	envelope completo	97.05
219046_4	265iPV@18	envelope completo	93.17
219046_5	266iPV@18	envelope completo	95.84
219046_6	267iPV@18	envelope completo	95.51
221351_2	268iMI@18	envelope completo	69.23
225634	269iMI@18	envelope completo	95.75
232271	271iPV@18	envelope completo	94.02
232263_2	272iPV@18	envelope completo	97.78
236822_1	273iBS@18	envelope completo	97.62
254421_8	276iMI@18	envelope completo	57.82
256867_3	277iBG@18	envelope completo	56.06
256867_4	278iBG@18	envelope completo	88.16
243114_2	279iMI@18	envelope completo	75.15
243114_3	280iMI@18	envelope completo	90.22
17374_P	281iLO@18	complete genome	87.4
18132_P	282iPV@18	complete genome	87.87
17188_P	283iBS@18	complete genome	91.35
17989_P	284iMN@18	complete genome	87.69
18940_P	285iBS@18	complete genome	94.7
17992_P	286iMN@18	complete genome	87.71
17986_P	287iMN@18	complete genome	87.81
18893_P	288iPV@18	complete genome	88.34
19158_P	289iMI@18	complete genome	88.86

**Tabella 3:** Ceppi di WNV-2 isolati nel 2018 e percentuale di mappaggio con il riferimento JN858070.

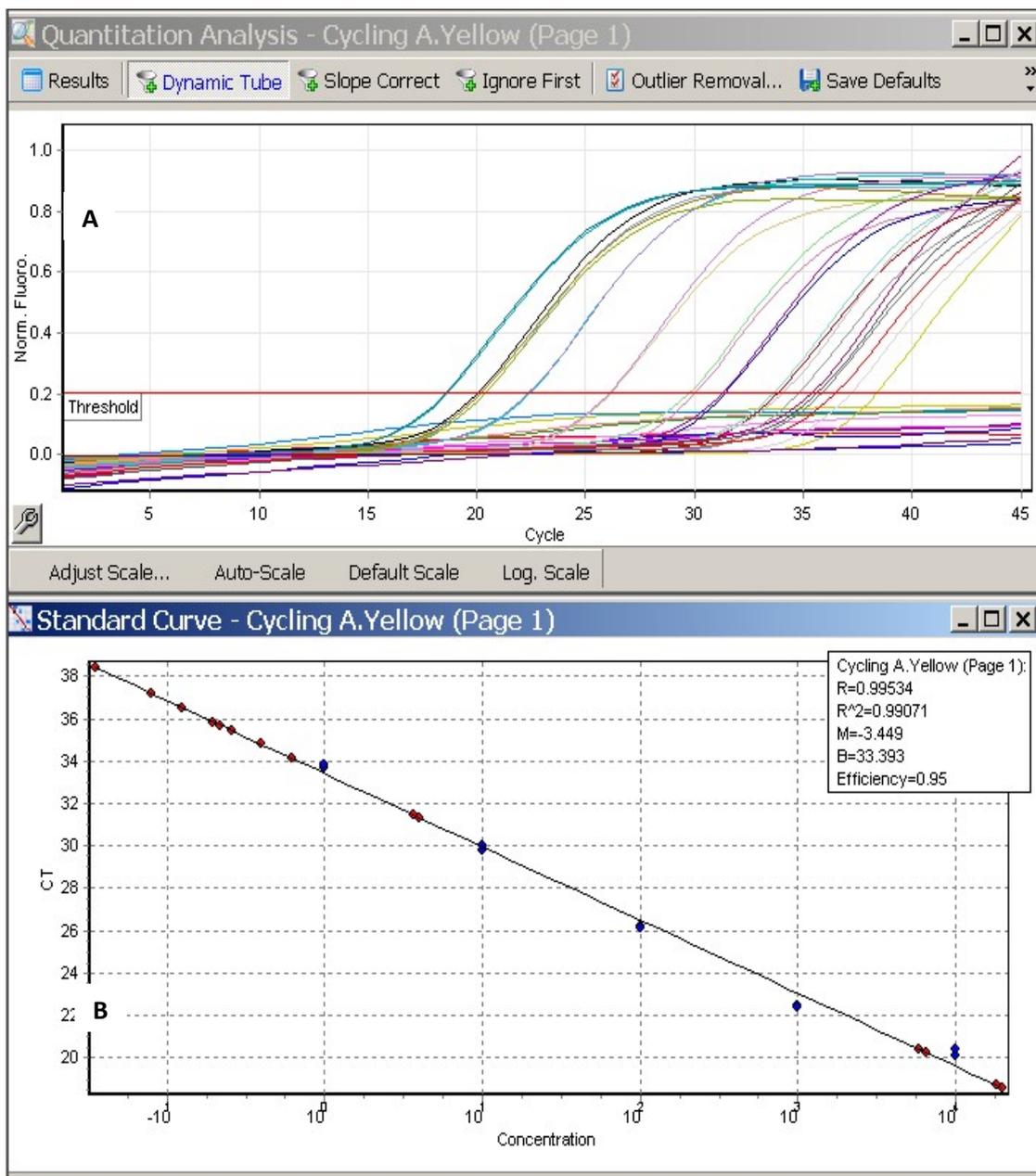
## 4.2 Caratterizzazione molecolare dei principali *lineages* di WNV-2 tramite un protocollo di RT-PCR

Sempre sui ceppi isolati nel 2018 è stata condotta, sugli estratti con volume maggiore, una *realtime RT-PCR* per la simultanea rilevazione dei due principali *lineages* del virus, per avere conferma della appartenenza dei ceppi in esame al *lineage 2*, che è quello attualmente circolante nel nostro Paese.

Gli esperimenti condotti sui campioni umani disponibili hanno prodotto con i fluorofori FAM e VIC i risultati presentati nelle Figure 25 e 26.



**Figura 25:** (A) Visualizzazione del plot di fluorescenza per FAM-LCV-S1; (B) curva standard.



**Figura 26:** (A) Visualizzazione del plot di fluorescenza per VIC-LCV-S2; (B) curva standard.

Nelle figure sovrastanti sono riportati i plot di amplificazione dei campioni esaminati e le relative curve standard, generati durante l'esperimento di *Real-Time* RT-PCR.

L'andamento delle reazioni viene visualizzato in forma di un grafico che è il plot di amplificazione, come si evince nella parte superiore dei report mostrati. In questo plot, per ogni DNA, sull'asse delle ordinate viene rappresentata la fluorescenza emessa e sull'asse delle ascisse i cicli di PCR. La fluorescenza viene, pertanto, misurata in ogni ciclo di reazione di PCR.

Nei primi cicli, che definiscono la linea di base della curva, si nota come non sia misurabile alcuna variazione nel segnale della fluorescenza; con l'aumentare dei cicli,

invece, aumenta la fluorescenza, indicando il rilevamento dei prodotti di PCR in fase di accumulo.

Nel plot di amplificazione è riportato un altro parametro importante, definito linea-soglia o *threshold*, che è parallela alla linea di base e taglia le curve dei campioni nella loro fase di crescita esponenziale.

I plot di amplificazione di ogni campione tagliano la linea-soglia in un punto, chiamato ciclo-soglia ( $C_t$ ), che è un indicatore fedele della quantità iniziale di DNA.

Al di sotto dei plot di amplificazione, nelle figure sono mostrate le curve standard che, invece, mettono in relazione le iniziali quantità di DNA con il ciclo soglia.

Come si evince dall'esperimento, il plot di amplificazione relativo all'acquisizione della fluorescenza emessa dalla sonda FAM mostra solo lo standard usato come controllo del *lineage 1* tal quale e diluito 1:10, 1:100, 1:1000 e 1: 10000.

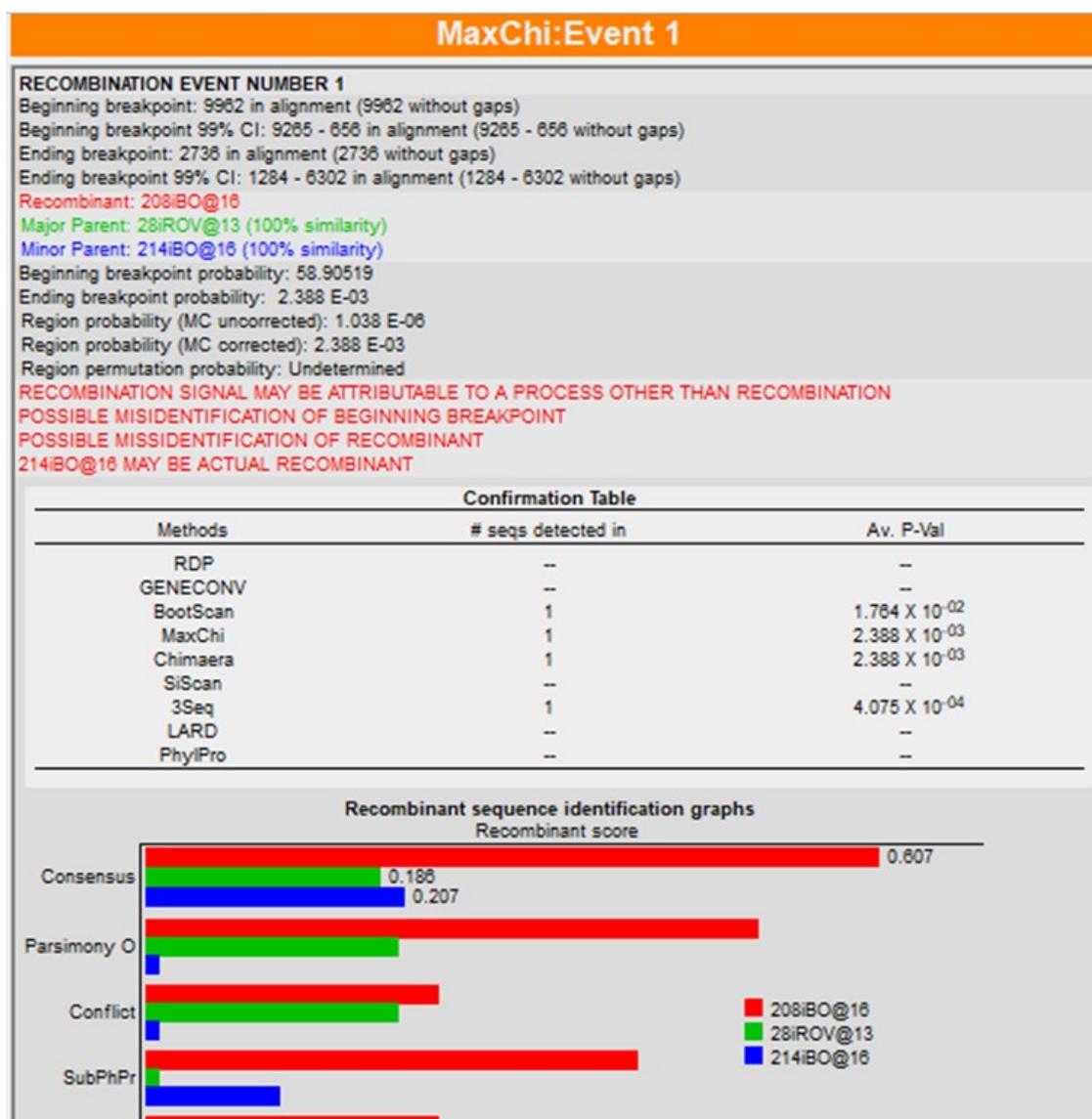
Viceversa, il plot di amplificazione relativo all'acquisizione della fluorescenza emessa dalla sonda VIC mostra lo standard usato come controllo del *lineage 2* alle diverse diluizioni e tutti i campioni analizzati.

I ceppi in esame, pertanto, si sono confermati di *lineage 2*, che attualmente sembra essere l'unico *lineage* circolante in Italia.

### **4.3 Analisi filogenetica degli isolati Italiani**

---

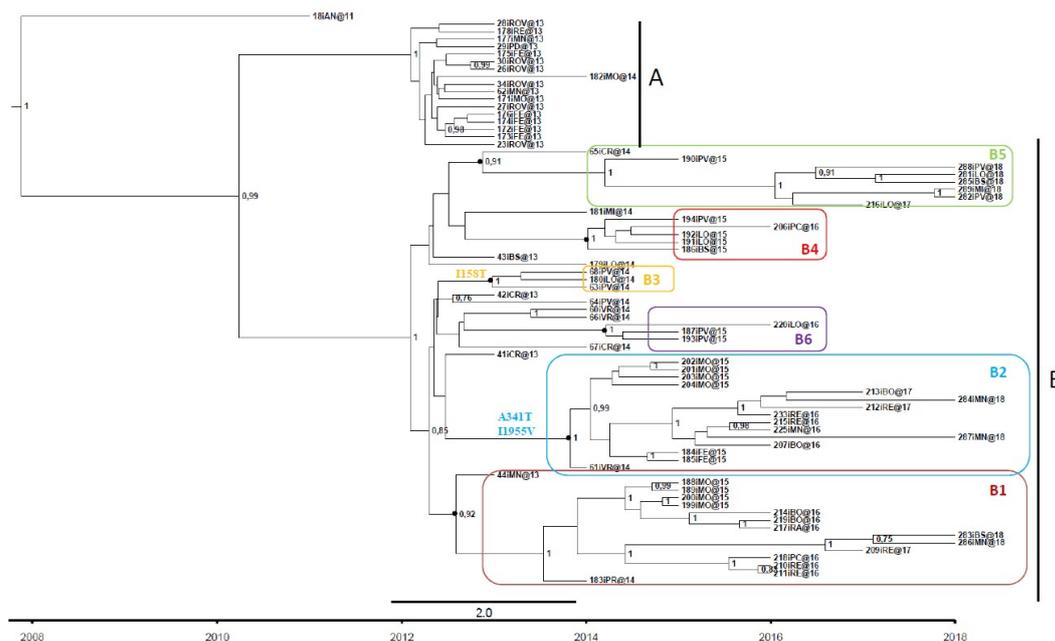
Tutti i genomi completi ottenuti a partire dai campioni umani e ambientali dal 2016 al 2018 sono stati allineati con 18 riferimenti scaricati dalle principali banche dati biologiche e il *dataset* creato è stato analizzato con il *software RDP4*, al fine di valutare ipotetici eventi di ricombinazione. Da questa analisi l'isolato 208iBO@16 è risultato un potenziale ceppo ricombinante, con *hot spots* di ricombinazione in posizione 2736 e 9962, corrispondenti ai geni NS1-NS5 (Figura 27); pertanto, questo ceppo è stato rimosso dal *dataset* ed escluso dalle successive analisi.



**Figura 27:** Analisi dei ceppi ricombinanti con il *software* RDP4.

L'analisi filogenetica condotta sui ceppi Italiani (Figura 28) ha suggerito un ingresso del virus in Italia nel 2008 e ha mostrato la presenza di due *clades* statisticamente significativi ( $pp = 1$ ): un *clade*, definito A, comprendente gli isolati tra il 2013 e il 2014, che sembrerebbe essersi estinto in quegli stessi anni, e un *clade* definito B, con isolati tra il 2013 e il 2018. All'interno del *clade* B sono stati rilevati 6 *subclades* statisticamente significativi: due di questi (B1 e B2) risultavano costituiti da 15 isolati ciascuno, campionati in tempi e località differenti, principalmente nell'Italia nord-orientale (Veneto ed Emilia Romagna); il *subclade* B5 comprendeva 8 isolati campionati tra il 2014 e il 2018 in Lombardia e i *subclades* B3, B4 e B6 erano costituiti da 3-5 isolati campionati principalmente in Italia nord-occidentale.

I ceppi di WNV circolanti nel 2018 appartenevano ai *subclades* B1, B2 e B5.



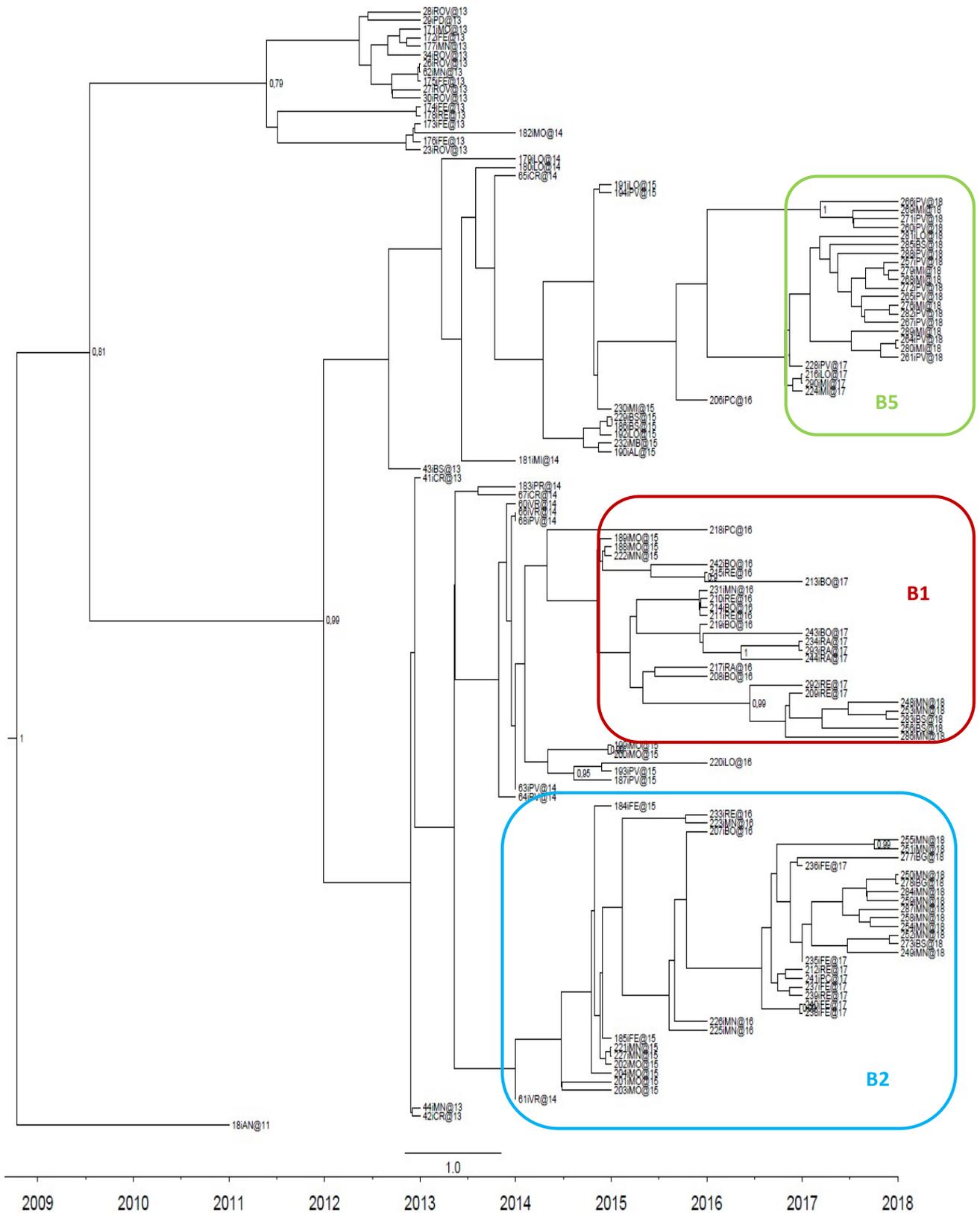
**Figura 28:** Analisi filogenetica degli isolati italiani. *Clades* e *subclades* sono identificati rispettivamente con linee nere verticali e rettangoli colorati.

Successivamente, le 53 sequenze del gene *envelope*, caratterizzate dalla data di inizio di questo studio, sono state allineate con la stessa porzione dei 77 genomi completi precedentemente descritti.

E' stato, quindi, creato un *dataset* di 130 sequenze totali (da cui è stato escluso il ceppo ricombinante) che sono state utilizzate per l'analisi filogenetica.

La filogenesi relativa al gene *envelope* ha confermato l'appartenenza dei ceppi del 2018 ai *subclades* B1, B2 e B5; nel *subclade* B5, peraltro, sono stati rilevati due significativi gruppi di isolati del 2018 non individuati nella analisi dei genomi completi descritta in precedenza.

La figura sottostante mostra in dettaglio l'analisi filogenetica condotta sul gene *envelope*.



**Figura 29:** Albero filogenetico relativo al gene *envelope*. La scala ai piedi dell'albero rappresenta il tempo (in anni) prima dell'ultimo anno di campionamento (2018).

#### 4.4 Distanze genetiche

Le sequenze oggetto di studio sono state raggruppate nei *clades* di appartenenza (A/B) che sono stati confrontati in termini di mutazioni tra loro e rispetto al progenitore.

Dal confronto fra loro, i due *clades* sono risultati differenti per la presenza di 6 varianti missenso (T143A, H826Y, A937V, Y2731H, N2868S, V3414A), delle quali la prima cadeva in prM, le due successive in NS1 e le ultime tre in NS5. Dal confronto rispetto al progenitore di Ancona, il *clade* A (corrispondente al ceppo orientale descritto nell'analisi filogenetica) presentava 12 mutazioni amminoacidiche (nelle posizioni 139, 143, 937, 978, 1335, 2210, 2731, 2756, 2868, 2975, 3179 e 3414) e 42 nucleotidi diversi, mentre il *clade* B (il ceppo occidentale) mostrava 8 sostituzioni amminoacidiche (nelle posizioni 139, 826, 978, 1335, 2210, 2756, 2975 e 3179) e 35 sostituzioni nucleotidiche.

In Tabella 4 sono riportate tutte le varianti missenso riscontrate:

CEPPO	prM 139	prM 143	NS1 826	NS1 937	NS1 978	NS2A 1335	NS4A 2210	NS5 2731	NS5 2756	NS5 2868	NS5 2975	NS5 3179	NS5 3414
18iAN@11	V	T	Y	A	V	S	T	Y	S	N	H	A	V
23iROV@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
26iROV@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
27iROV@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
28iROV@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
30iROV@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
34iROV@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
172iFE@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
173iFE@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
174iFE@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
175iFE@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
176iFE@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
62iMN@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
177iMN@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
171iMO@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
182iMO@14	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
29iPD@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
178iRE@13	A	A	Y	V	A	C	I	H	G	S	R	T	A
208iBO@16	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	S	R	T	A
179iLO@14	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
180iLO@14	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
191iLO@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
216iLO@17	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
220iLO@16	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
281iLO@18	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V

CLADE  
ACLADE  
B

63iPV@14	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
64iPV@14	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
68iPV@14	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
187iPV@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
190iPV@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
193iPV@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
192iPV@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
194iPV@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
282iPV@18	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
288iPV@18	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
43iBS@13	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
186iBS@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
283iBS@18	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
285iBS@18	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
41iCR@13	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
42iCR@13	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
65iCR@14	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
67iCR@14	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
44iMN@13	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
225iMN@16	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
284iMN@18	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
286iMN@18	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
287iMN@18	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
60iVR@14	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
61iVR@14	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
66iVR@14	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
181iMI@14	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
289iMI@18	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
184iFE@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
185iFE@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
188iMO@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
189iMO@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
199iMO@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
200iMO@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
201iMO@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
202iMO@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
203iMO@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
204iMO@15	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
206iPC@16	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
218iPC@16	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
207iBO@16	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
213iBO@17	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
214iBO@16	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
219iBO@16	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
209iRE@17	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
210iRE@16	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
211iRE@16	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
212iRE@17	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V
215iRE@16	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V

CLADE  
B

233iRE@16	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V	} CLADE B
217iRA@16	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V	
183iPR@14	A	T	H	A	A	C	I	Y	G	N	R	T	V	

Tabella 4: Varianti missenso nei *clades* A e B.

I *subclades* descritti nella Figura 28 sono stati confrontati rispetto al progenitore comune del 2011; dal confronto sono risultate, oltre alle mutazioni non sinonime comuni a tutto il *clade* occidentale e riportate nella Tabella 4, altre due varianti missenso all'interno del *subclade* B2 (A341T e I1955V) rispettivamente in *envelope* ed *NS3*, una sola variante missenso all'interno del *subclade* B3 (I158S) in *prM* e un'altra all'interno del *subclade* B6 (E900G) in *NS1* (Tabella 5). Le differenze negli altri *subclades*, invece, erano dovute o alla presenza di sostituzioni sinonime o a varianti missenso non comuni a tutti i ceppi.

A	ENVELOPE 341	NS3 1955
18iAN@11	A	I
61iVR@14	T	V
184iFE@15	T	V
185iFE@15	T	V
201iMO@15	T	V
202iMO@15	T	V
203iMO@15	T	V
204iMO@15	T	V
207iBO@16	T	V
212iRE@17	T	V
213iBO@17	T	V
215iRE@16	T	V
225iMN@16	T	V
233iRE@16	T	V
284iMN@18	T	V
287iMN@18	T	V

B	prM 158
18iAN@11	I
68iPV@14	S
180iLO@14	S
63iPV@14	S

<b>C</b>	<b>NS1 900</b>
	<b>18iAN@11</b>
	<b>E</b>
	<b>G</b>
	<b>G</b>
<b>220iLO@16</b>	<b>G</b>
<b>187iPV@15</b>	<b>G</b>
<b>193iPV@15</b>	<b>G</b>

**Tabella 5:** Varianti missenso specifiche dei *clades* B2 (A), B3 (B) e B6 (C) rispetto al progenitore.

Sui ceppi del 2018 è stata condotta una analisi delle varianti rispetto al riferimento di Ancona con il *software SnpEff*.

Dall'analisi degli *envelope* sono risultate 6 mutazioni sinonime e 4 mutazioni non sinonime (Tabella 6).

REF	POS	REF	ALT	TYPE	EFFECT	CODON	AA	IMPACT	GENE
JN858070.1	1076	T	C	snp	missense_variant	c.1013T>C	p.Met338Thr	MODERATE	ENV
JN858070.1	1084	G	A	snp	missense_variant	c.1021G>A	p.Ala341Thr	MODERATE	ENV
JN858070.1	1085	C	T	snp	missense_variant	c.1022C>T	p.Ala341Val	MODERATE	ENV
JN858070.1	1479	G	A	snp	synonymous_variant	c.1416G>A	p.Glu472Glu	LOW	ENV
JN858070.1	1696	T	C	snp	synonymous_variant	c.1633T>C	p.Leu545Leu	LOW	ENV
JN858070.1	1869	T	C	snp	synonymous_variant	c.1806T>C	p.Ala602Ala	LOW	ENV
JN858070.1	1963	G	A	snp	missense_variant	c.1900G>A	p.Ala634Thr	MODERATE	ENV
JN858070.1	1983	G	A	snp	synonymous_variant	c.1920G>A	p.Thr640Thr	LOW	ENV
JN858070.1	2292	T	C	snp	synonymous_variant	c.2229T>C	p.Leu743Leu	LOW	ENV
JN858070.1	2370	A	G	snp	synonymous_variant	c.2307A>G	p.Arg769Arg	LOW	ENV

**Tabella 6:** Analisi delle varianti nel gene *envelope* degli isolati di WNV-2 nel 2018.

Dall'analisi degli genomi completi, invece, sono risultate 25 mutazioni sinonime e 28 non sinonime (Tabella 7). Delle mutazioni sinonime 5 cadevano in *ENV*, 4 in *NS1*, 3 in *NS2A*, 1 in *NS2B*, 2 in *NS3*, 2 in *NS4A*, 2 in *NS4B* e 6 nel gene *NS5*. Delle mutazioni non sinonime, invece, 1 cadeva in *NC*, 1 in *prM*, 2 in *ENV*, 6 in *NS1*, 4 in *NS2A*, 1 in *NS2B*, 4 in *NS3*, 2 in *NS4A*, 1 in *NS4B* e 6 in *NS5* (Tabella 7).

I risultati di annotazione mostrati nelle tabelle 6 e 7 sono stati filtrati con il programma *SnpSift* per qualità superiore a 30, per effetto (variante sinonima/missenso) e per impatto sulla proteina (lieve/moderato).

REF	POS	REF	ALT	TYPE	EFFECT	CODON	AA	IMPACT	GENE
JN858070.1	374	A	G	snp	missense_variant	c.311A>G	p.Lys104Arg	MODERATE	NC
JN858070.1	479	T	C	snp	missense_variant	c.416T>C	p.Val139Ala	MODERATE	prM
JN858070.1	1076	T	C	snp	missense_variant	c.1013T>C	p.Met338Thr	MODERATE	ENV
JN858070.1	1085	C	T	snp	missense_variant	c.1022C>T	p.Ala341Val	MODERATE	ENV
JN858070.1	1479	G	A	snp	synonymous_variant	c.1416G>A	p.Glu472Glu	LOW	ENV
JN858070.1	1696	T	C	snp	synonymous_variant	c.1633T>C	p.Leu545Leu	LOW	ENV
JN858070.1	1869	T	C	snp	synonymous_variant	c.1806T>C	p.Ala602Ala	LOW	ENV
JN858070.1	1983	G	A	snp	synonymous_variant	c.1920G>A	p.Thr640Thr	LOW	ENV
JN858070.1	2370	A	G	snp	synonymous_variant	c.2307A>G	p.Arg769Arg	LOW	ENV
JN858070.1	2529	A	T	snp	synonymous_variant	c.2466A>T	p.Arg822Arg	LOW	NS1
JN858070.1	2539	T	C	snp	missense_variant	c.2476T>C	p.Tyr826His	MODERATE	NS1
JN858070.1	2572	A	G	snp	missense_variant	c.2509A>G	p.Ile837Val	MODERATE	NS1
JN858070.1	2607	A	G	snp	synonymous_variant	c.2544A>G	p.Leu848Leu	LOW	NS1
JN858070.1	2749	G	C	snp	missense_variant	c.2686G>C	p.Ala896Pro	MODERATE	NS1
JN858070.1	2803	A	T	snp	missense_variant	c.2740A>T	p.Ile914Phe	MODERATE	NS1
JN858070.1	2996	T	C	snp	missense_variant	c.2933T>C	p.Val978Ala	MODERATE	NS1
JN858070.1	3096	C	T	snp	synonymous_variant	c.3033C>T	p.Val1011Val	LOW	NS1
JN858070.1	3145	C	T	snp	synonymous_variant	c.3082C>T	p.Leu1028Leu	LOW	NS1
JN858070.1	3262	G	A	snp	missense_variant	c.3199G>A	p.Asp1067Asn	MODERATE	NS1
JN858070.1	3620	T	C	snp	missense_variant	c.3557T>C	p.Val1186Ala	MODERATE	NS2A
JN858070.1	3628	T	C	snp	missense_variant	c.3565T>C	p.Phe1189Leu	MODERATE	NS2A
JN858070.1	4038	G	A	snp	synonymous_variant	c.3975G>A	p.Gly1325Gly	LOW	NS2A
JN858070.1	4066	A	T	snp	missense_variant	c.4003A>T	p.Ser1335Cys	MODERATE	NS2A
JN858070.1	4071	T	C	snp	synonymous_variant	c.4008T>C	p.Ser1336Ser	LOW	NS2A
JN858070.1	4140	G	A	snp	missense_variant	c.4077G>A	p.Met1359Ile	MODERATE	NS2A
JN858070.1	4146	C	T	snp	synonymous_variant	c.4083C>T	p.Leu1361Leu	LOW	NS2A
JN858070.1	4418	G	A	snp	missense_variant	c.4355G>A	p.Arg1452Lys	MODERATE	NS2B
JN858070.1	4551	C	T	snp	synonymous_variant	c.4488C>T	p.Phe1496Phe	LOW	NS2B
JN858070.1	4737	T	C	snp	synonymous_variant	c.4674T>C	p.Thr1558Thr	LOW	NS3
JN858070.1	4887	A	G	snp	synonymous_variant	c.4824A>G	p.Gly1608Gly	LOW	NS3
JN858070.1	5159	T	A	snp	missense_variant	c.5096T>A	p.Leu1699Gln	MODERATE	NS3
JN858070.1	5324	A	C	snp	missense_variant	c.5261A>C	p.His1754Pro	MODERATE	NS3
JN858070.1	5861	A	G	snp	missense_variant	c.5798A>G	p.Lys1933Arg	MODERATE	NS3
JN858070.1	5926	A	G	snp	missense_variant	c.5863A>G	p.Ile1955Val	MODERATE	NS3
JN858070.1	6442	A	G	snp	missense_variant	c.6379A>G	p.Ile2127Val	MODERATE	NS4A
JN858070.1	6633	T	C	snp	synonymous_variant	c.6570T>C	p.Gly2190Gly	LOW	NS4A
JN858070.1	6643	T	C	snp	synonymous_variant	c.6580T>C	p.Leu2194Leu	LOW	NS4A
JN858070.1	6692	CCTTG	TCTTA	complex	missense_variant	c.6629_6633delCCTTGinsTCTTA	p.Thr2210Ile	MODERATE	NS4A
JN858070.1	7497	G	A	snp	synonymous_variant	c.7434G>A	p.Ala2478Ala	LOW	NS4B
JN858070.1	7532	C	T	snp	missense_variant	c.7469C>T	p.Ser2490Leu	MODERATE	NS4B
JN858070.1	7593	G	A	snp	synonymous_variant	c.7530G>A	p.Ser2510Ser	LOW	NS4B
JN858070.1	7830	G	A	snp	synonymous_variant	c.7767G>A	p.Ala2589Ala	LOW	NS5
JN858070.1	7882	G	A	snp	missense_variant	c.7819G>A	p.Val2607Met	MODERATE	NS5
JN858070.1	8226	A	T	snp	synonymous_variant	c.8163A>T	p.Ile2721Ile	LOW	NS5
JN858070.1	8329	A	G	snp	missense_variant	c.8266A>G	p.Ser2756Gly	MODERATE	NS5
JN858070.1	8613	C	T	snp	synonymous_variant	c.8550C>T	p.Ser2850Ser	LOW	NS5
JN858070.1	8661	T	C	snp	synonymous_variant	c.8598T>C	p.Ile2866Ile	LOW	NS5
JN858070.1	8748	A	G	snp	synonymous_variant	c.8685A>G	p.Pro2895Pro	LOW	NS5
JN858070.1	8987	A	G	snp	missense_variant	c.8924A>G	p.His2975Arg	MODERATE	NS5
JN858070.1	9598	G	A	snp	missense_variant	c.9535G>A	p.Ala3179Thr	MODERATE	NS5
JN858070.1	9868	A	G	snp	missense_variant	c.9805A>G	p.Ile3269Val	MODERATE	NS5
JN858070.1	10301	A	G	snp	missense_variant	c.10238A>G	p.Tyr3413Cys	MODERATE	NS5
JN858070.1	10363	C	T	snp	synonymous_variant	c.10300C>T	p.Leu3434Leu	LOW	NS5

**Tabella 7:** Analisi delle varianti nei genomi completi degli isolati di WNV-2 nel 2018.

Delle mutazioni osservate, alcune sono state precedentemente descritte in letteratura. In particolare, la variante H1754P (NS3-H249P), individuata in due ceppi isolati in Lombardia durante l'epidemia del 2018 (282iPV@18 e 289iMI@18), risulta associata ad un aumento della virulenza e della termotolleranza. A tal proposito, uno studio condotto da Barzon e collaboratori e pubblicato sulla rivista *Clinical Microbiology and Infection* nel 2015, ha permesso, a seguito di una ingegnerizzazione con alanina,

treonina e prolina, di valutare l'effetto del residuo NS3-249 sulla attività della proteina a differenti temperature. La sola variante NS3-249P consente al virus di conservare la sua attività a temperature di 42°C (temperatura corporea degli uccelli), conferendogli una carica e una letalità più elevata.

Sempre nello stesso lavoro sono stati descritti gli *outbreak* da WNV-2 in Italia e in Grecia durante la stagione 2013-2014; l'analisi filogenetica di tutti i genomi completi isolati da pazienti con febbre e malattia neuro-invasiva, e da donatori di sangue, ha mostrato una appartenenza di tutti i ceppi a un *clade* monofiletico, probabilmente derivato da una singola introduzione del virus in Europa (Ungheria/04). I genomi italiani e greci risultavano raggruppati in *cluster* distinti e con una differente distribuzione spaziale (*cluster* Veneto e Lombardia per l'Italia, *cluster* Macedonia Centrale e Macedonia dell'Est per la Grecia). Allo scopo di caratterizzare la diversità virale, è stato condotto uno studio sulle varianti rispetto al ceppo Ungherese del 2004, da cui sono emerse diverse sostituzioni amminoacidiche, delle quali alcune sono state da noi individuate nel presente studio (T143A in prM, A937V in NS1, Y2731H/N2868S/V3414A in NS5, distintive del *cluster* Veneto, e Y826H in NS1, distintiva del *cluster* Lombardia).

Su tutti i ceppi sono state stimate le distanze genetiche. La *p-distance* tra tutti gli isolati è risultata di 1.73 su 1000 sostituzioni, con un errore standard di 0.18, e un numero di nucleotidi mutati per genoma pari a 15.67 con un errore standard di 1.62. Le sostituzioni sinonime sono risultate 10 volte più frequenti rispetto a quelle non sinonime.

Successivamente e' stata calcolata la distanza *within* all'interno di ciascun gruppo (*clade* A e B) e quella *between*, tra i due gruppi. Dal calcolo della distanza *within* è risultato come gli isolati del *clade* A siano più omogenei rispetto a quelli del *clade* B: la *within* per il *clade* A è risultata pari a 1.08 (SE 0.16), per il *clade* B pari a 1.84 (SE 0.22), con un numero di nucleotidi mutati di 9.67 (SE 1.31) per il *clade* A e 16.49 (SE 1.62) per il *clade* B.

La distanza *between* è risultata di 1.71 (SE 0.18) con nucleotidi mutati pari a 15.32 (SE 1.89) e mutazioni sinonime predominanti su quelle non sinonime. In Tabella 8 sono riassunti i risultati del calcolo delle distanze con il *software* MEGA.

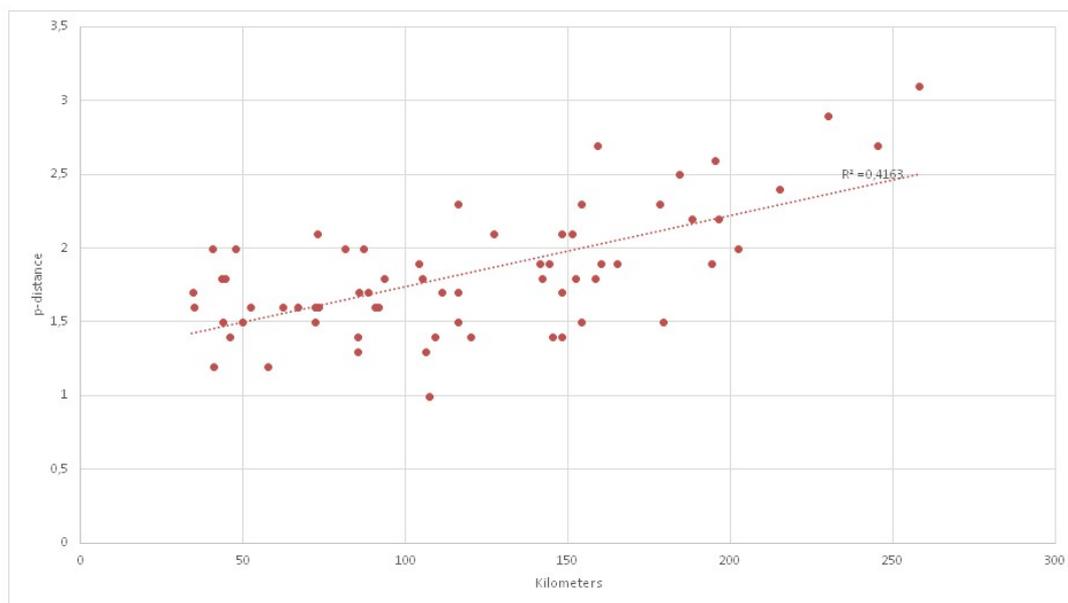
	Eastern	Western	
Within	A	B	Total
Mean p distance (SE)	1.08 (0.16)	1.84 (0.22)	1.73 (0.18)
n° of differences (SE)	9.67 (1.31)	16.49 (1.62)	15.47 (1.62)
Synonymous (SE)	3.16 (0.65)	5.93 (0.76)	5.44 (0.71)
Non synonymous (SE)	0.42 (0.10)	0.48 (0.12)	0.51 (0.1)
Between			
Mean p distance (SE)	-	1.71 (0.18)	-
n° of differences (SE)	-	15,32 (1.89)	-
Synonymous (SE)	-	5.36 (0.83)	-
Non synonymous (SE)	-	0.52 (0.12)	-

**Tabella 8:** Analisi della divergenza tra i *clades* A e B in termini di *p-distance*, nucleotidi mutati e sostituzioni sinonime e non sinonime.

Il *clade* B, comprendente i ceppi del 2018, è stato ulteriormente analizzato, raggruppando le sequenze al suo interno per località di isolamento. Sono state prese in considerazione le seguenti province: Brescia, Lodi, Pavia, Piacenza, Milano, Cremona, Bologna, Ravenna, Modena, Parma, Reggio Emilia, Mantova, Verona e Ferrara ed è stata calcolata la distanza chilometrica di ogni provincia con tutte le altre. Quindi è stata riportata la distanza chilometrica minima e massima e sono state calcolate mediana e quartili.

Con il *software* MEGA 7 è stata calcolata la distanza genetica tra le varie località in studio, e questa distanza è stata messa in relazione con quella chilometrica. Da questa analisi è risultato un aumento della distanza genetica in proporzione con la distanza tra le varie località.

La Figura 30 mostra per ciascun isolato la correlazione fra distanza genetica e chilometrica (coefficiente di determinazione,  $R^2 = 0.41$ ). Tale correlazione è risultata significativa (indice di correlazione,  $r$  di Pearson = 0.645;  $p < 0.05$ ).



**Figura 30:** Analisi della correlazione tra distanza spaziale e genetica per ciascun isolato appartenente al *clade B*.

Le sequenze del *clade B* sono state raggruppate anche in base all'anno di isolamento ed è stata poi calcolata la distanza genetica media per ciascun anno (*within* e *between*).

Anche in questo caso è risultata una crescita della distanza media all'interno dei singoli gruppi col tempo (Tabella 9A).

A		B	
Within		Between	
Years	Mean p-distance (SE)	$\Delta$ Years	Mean p-distance (SE)
2013	0.55 (0.18)	1	1.64 (0.56)
2014	1.1 (0.12)	2	1.77 (0.5)
2015	1.49 (0.19)	3	1.83 (0.48)
2016	1.61 (0.22)	4	1.94 (0.27)
2017	2.38 (0.33)	5	1.94 (0.27)
2018	2.54 (0.25)		
Total	1.67 (0.18)		

**Tabella 9:** Calcolo della *p-distance within* (A) e *between* (B) in funzione dell'anno di isolamento negli isolati appartenenti al *clade B*.

Inoltre è risultato un aumento della distanza genetica media tra sequenze ottenute in anni diversi in proporzione alla distanza di tempo tra un campionamento e l'altro (Tabella 9B e Figura 31).



**Figura 31:** Calcolo della *p-distance* in proporzione alla distanza di tempo tra un campionamento e l'altro negli isolati appartenenti al *clade B*.

Sempre sul *clade B* è stata calcolata la distanza genetica in relazione all'ospite, pertanto le sequenze sono state raggruppate sulla base dell'ospite in 3 gruppi (uomini, uccelli, zanzare). Il cavallo non è stato incluso nella analisi, per via della scarsa rappresentatività di ceppi disponibili isolati da questo.

Da questa analisi è risultato un maggior numero di sostituzioni nel gruppo degli uomini piuttosto che in quello degli uccelli o delle zanzare; le distanze *between* erano simili a quelle *within* senza differenze significative, come si evince dalla Tabella 10.

Host	Within p-distance		Host	Between p-distance
	d	SE		d
Human	1.9	0.2	Human-Bird	1.8
Bird	1.5	0.2	Human-Mosquito	1.6
Mosquito	1.2	0.2	Bird-Mosquito	1.4

**Tabella 10:** Distanze genetiche medie in relazione all'ospite.

## 4.5 Analisi della pressione selettiva

L'analisi della pressione selettiva con il server Datamonkey è stata condotta su 10 dataset, corrispondenti a ciascuna delle 10 proteine virali, e ha rilevato 10 siti sottoposti a pressione selettiva positiva. In particolare, sei di questi siti sono stati confermati

unicamente dal metodo IFEL, uno dal metodo MEME, due dal metodo FUBAR e uno sia da MEME che da FUBAR.

I risultati ottenuti sono descritti in dettaglio nella Tabella 11.

Codone	Proteina	Sostituzione amminoacidica	Metodo					PP
			FEL	IFEL	MEME	SLAC	FUBAR	
			P-VALUE					
<b>143</b>	prM	<b>T -&gt; A</b>	-	0.047	-	-	-	
<b>158</b>	prM	<b>I -&gt; S</b>	-	0.035	-	-	-	
<b>341</b>	ENV	<b>A -&gt; T</b>	-	-	-	-	0.925	
498	ENV	A -> S	-	-	0.0063	-	-	
863	NS1	K -> E	-	-	-	-	0.933	
2571	NS5	H -> R	-	0.079	-	-	-	
<b>2731</b>	NS5	<b>Y -&gt; H</b>	-	0.083	-	-	-	
<b>2868</b>	NS5	<b>N -&gt; S</b>	-	0.063	-	-	-	
3269	NS5	I -> V	-	0.093	-	-	-	
3416	NS5	Y -> I	-	-	0.0011	-	0.924	

**Tabella 11:** Analisi di pressione selettiva sui singoli geni virali. In grassetto sono evidenziate le sostituzioni amminoacidiche caratteristiche dei *clades/subclades* descritti.

## 4.6 Analisi filogeografica

### 4.6.1 Filogeografia discreta

La ricostruzione filogeografica relativa al *clade* europeo, evidenziata in Figura 32, mostra un ingresso di WNV-2 in Europa nel 2002; la località più probabile della radice dell'albero è risultata l'Ungheria ( $sp=0.82$ ).

L'albero ha mostrato la presenza di due *clades* statisticamente significativi entrambi con probabilità posteriori  $pp=1$ : un *clade* orientale, con i ceppi isolati in Grecia fra il 2010 e il 2013, e un *clade* occidentale, costituito da ceppi isolati in Austria, Repubblica Ceca, Slovacchia, Germania, Serbia e Italia.

Dalla ricostruzione emerge una netta segregazione degli isolati italiani rispetto agli altri ceppi europei, con un'unica eccezione rappresentata dall'isolato di Ancona, che funge da *outgroup* del *clade* italiano.

L'analisi filogeografica mostra come una probabile origine della epidemia italiana possa essere Mantova (*location probability*, 0.27).



comprendente inizialmente la maggior parte delle sequenze ottenute nella parte orientale della valle del Po e l'altro comprendente la maggior parte degli isolati ottenuti inizialmente nella parte occidentale; i ceppi isolati nella regione centrale sono risultati distribuiti in entrambi i *subclade*. Un singolo isolato di Ancona era all'esterno dell'albero (*outgroup*).

Le coordinate della radice dell'albero stimate per mezzo della filogeografia continua erano 44.35 12.08, cadendo a metà strada tra Ancona (luogo del primo isolamento italiano) e il fiume Po. La stima del tMRCA è risultata di 10.38 anni fa (95% HPD = 8.1-12.9), il che suggerisce che WNV-2 sia entrato in Italia tra la fine del 2007 e l'inizio del 2008 (Figura 33A), raggiungendo tra la fine del 2010 e gli inizi del 2011 un'area comune alla Lombardia, al Veneto e alla Emilia Romagna (Figura 33B). L'epidemia si è poi diffusa simultaneamente verso Est e verso Ovest (Figura 33C). Il ceppo orientale si è propagato verso Nord-Est raggiungendo Ferrara, Rovigo e Padova nella prima metà del 2013. Simultaneamente questo ceppo si sarebbe espanso verso Sud tra Modena e Bologna nella seconda metà dello stesso anno e attualmente sembrerebbe essersi estinto.

Il ceppo occidentale, invece, si è rapidamente diffuso in una zona fra Cremona Piacenza e Lodi nella seconda metà del 2013, raggiungendo Milano nel 2014 e successivamente Pavia. La diffusione dello stesso ceppo ha mostrato una deviazione verso Mantova e Verona tra il 2013 e il 2014. Dal 2014 ad oggi il ceppo occidentale si è simultaneamente espanso in Lombardia (Mantova, Lodi, Pavia, Brescia, Milano) e in Emilia Romagna (Parma, Reggio Emilia, Modena, Bologna, Ravenna) (Figura 33D).

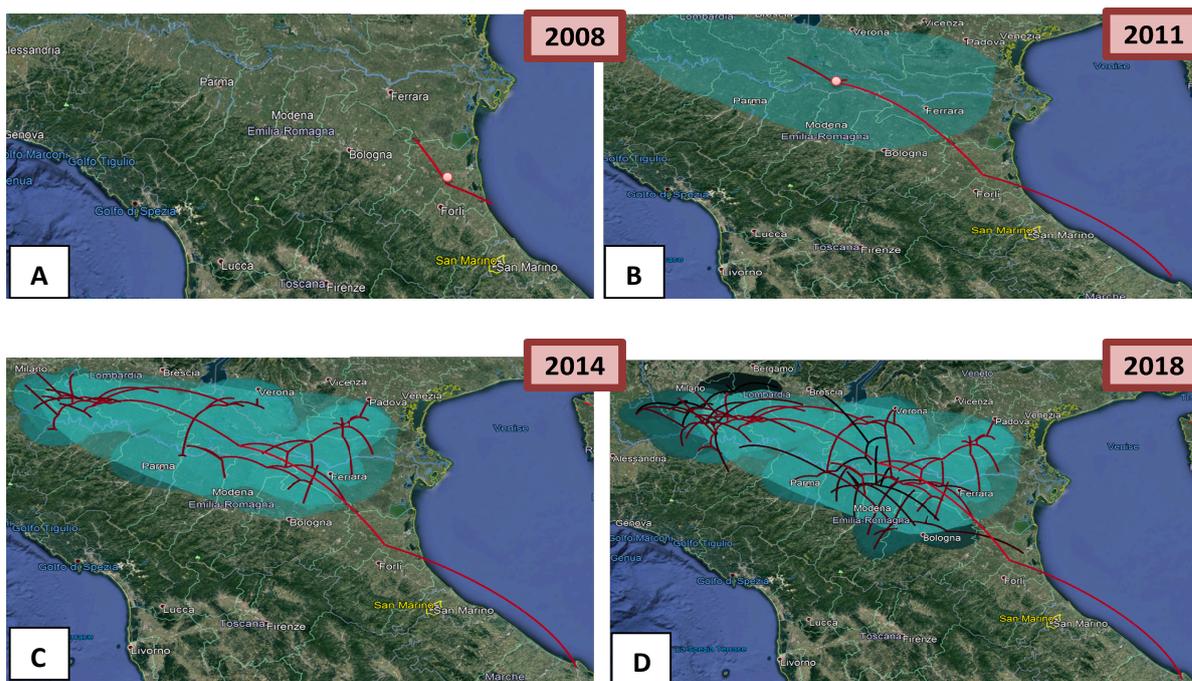


Figura 33: Dinamiche spazio-temporali della epidemia da WNV-2 in Italia.

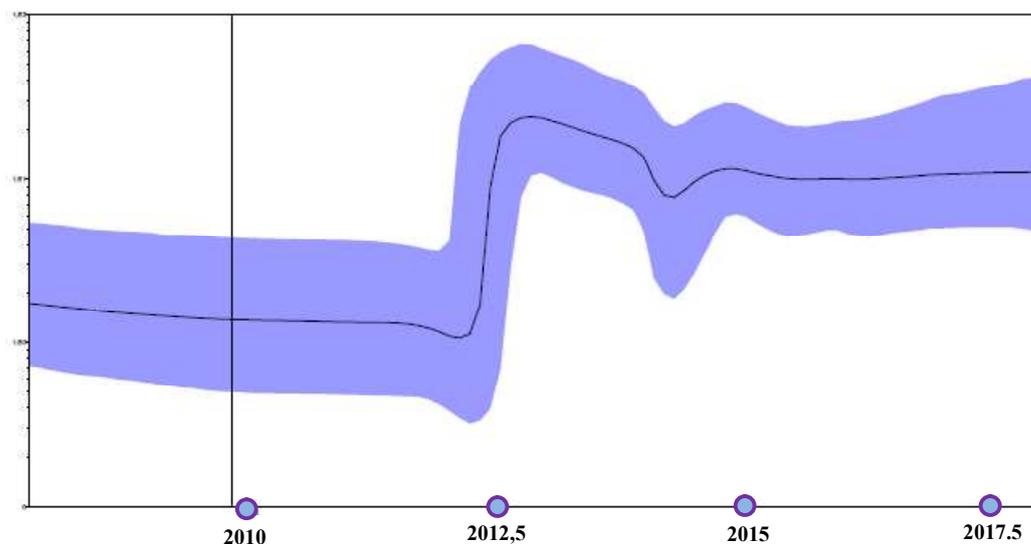
## 4.7 Filodinamica

L'analisi filodinamica è stata condotta facendo uso di due modelli, quello della coalescenza e il *birth-death*.

Come detto nei metodi, il primo modello si basa sulla teoria della coalescenza e consente di valutare la dimensione effettiva della popolazione virale nel tempo.

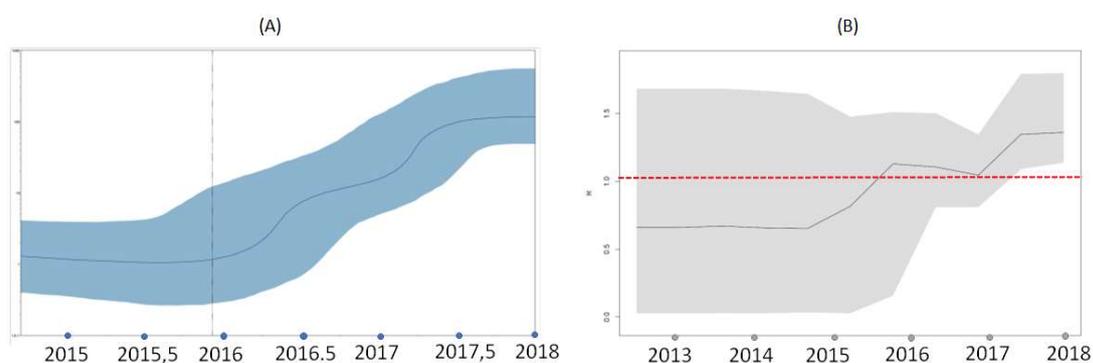
Il *birth-death*, invece, consente di stimare il tasso di riproduzione effettivo  $R_e$ , che tiene conto del fatto che non tutta la popolazione sia suscettibile al virus.

Dall'analisi dello *skyline plot* condotta sul *clade* italiano è stato stimato un ingresso di WNV-2 in Italia intorno al 2008. Dalla figura si evince un livello relativamente costante di endemia dal 2008 al 2012; nel 2012 si è avuta una rapida crescita del numero effettivo di infezioni, ovvero degli eventi di trasmissione. Dopo aver assistito ad un leggero decremento della popolazione virale dal 2013 alla prima metà del 2014, è stata registrata una ulteriore crescita dalla seconda metà del 2014 (Figura 34)



**Figura 34:** Skyline realizzato sul *clade* italiano di WNV-2.

Analizzando più in dettaglio il solo *clade* B, che è quello ancora circolante nel 2018, la ricostruzione Bayesiana (Figura 35A) ha mostrato un incremento del numero delle infezioni, che è iniziato nel 2016 e ha poi raggiunto un log 10 nel 2017 e un log 100 nel 2018. Il *birth-death* plot (Figura 35B), invece, ha mostrato un incremento del numero riproduttivo effettivo  $R_e$  a partire dal 2015, con un valore di 1.1 nel 2016 e 1.41 nel 2018 (95% HPD 12.7-33.7).



**Figura 35:** Skyline plot (A) e birth-death plot (B).

## **5. DISCUSSIONE**

WNV è stato rilevato per la prima volta in Italia nel 1998, durante una epizoozia tra cavalli in Toscana [82] ed è poi riapparso nel 2008, circolando tra animali e uomini residenti nell'area della Valle Padana [49]. A partire da quella data, il sistema di sorveglianza nazionale del WNV ha registrato ogni anno una circolazione costante e progressivamente crescente del virus, fino alla vasta epidemia del 2018, che ha visto ben 577 casi confermati di infezione, 230 dei quali hanno manifestato sintomi neuro-invasivi, e 68 infezioni in donatori di sangue (<https://www.epicentro.iss.it>).

Le prime infezioni umane e animali in Italia sono state causate dal *lineage* 1 (genotipo 1a) [152]; WNV-2 è stato isolato per la prima volta nel nostro Paese nel 2011 in un paziente con febbre, residente ad Ancona e successivamente è stato rilevato sempre più frequentemente in infezioni umane ed animali [85, 153, 154]. A partire dal 2013 il *lineage* 2 è stato trovato in quasi tutti i campioni umani e ambientali positivi al virus [152] e ad oggi rappresenta il *lineage* più frequentemente identificato in Italia.

Allo scopo di studiare l'evoluzione molecolare di West Nile nel nostro Paese, abbiamo caratterizzato l'intero genoma di 59 isolati italiani ottenuti tra il 2016 e il 2018 da campioni umani e animali (zanzare, cavalli e uccelli) nel Nord Italia usando, per l'amplificazione, *primers* specifici o *random*, come descritto da Djikeng e collaboratori [155]. Le sequenze ottenute sono state allineate con 18 ceppi di riferimento scaricati da banche dati biologiche pubbliche (*Pubmed*) e confrontate con il progenitore comune rappresentato dall'isolato di Ancona del 2011[34]. Questo confronto ha confermato l'esistenza iniziale di almeno due ceppi virali: un *clade*, che abbiamo definito A, comprendente gli isolati tra il 2013 e il 2014, che apparentemente si è estinto in quegli stessi anni, e un *clade* definito B, con ceppi virali circolanti tra il 2013 e il 2018.

L'analisi filogenetica relativa al gene *envelope* ha confermato l'appartenenza dei ceppi isolati nel 2018 al *clade* occidentale, che sembrerebbe essere l'unico *clade* presente attualmente in Italia.

Rispetto al genoma del progenitore di Ancona, il *clade* A (corrispondente al ceppo orientale descritto nei risultati) presentava 12 mutazioni amminoacidiche (nelle posizioni 139, 143, 937, 978, 1335, 2210, 2731, 2756, 2868, 2975, 3179 e 3414) e 42 nucleotidi diversi, mentre il *clade* B (il ceppo occidentale) mostrava 8 sostituzioni amminoacidiche (nelle posizioni 139, 826, 978, 1335, 2210, 2756, 2975 e 3179) e 35 sostituzioni nucleotidiche. Pertanto, dai risultati ottenuti sembrerebbe che il *clade* B attualmente circolante sia quello più vicino dal punto di vista filogenetico al progenitore; tuttavia, è possibile ad oggi solo formulare ipotesi circa l'origine di questi

due ceppi dal virus isolato nel 2011; si potrebbe ipotizzare un ciclo selvatico sufficientemente lungo da consentire l'accumulo di un numero di differenze tali da giustificare la divergenza tra i due *clades*, o si potrebbe giustificare la divergenza del *clade* A rispetto al B con la introduzione in Italia di due ceppi nello stesso periodo di tempo.

L'estinzione del ceppo A nel 2013-2014 è supportata dal fatto che questo non sia stato più rilevato nei campioni disponibili per l'analisi, inclusi quelli del 2018 da noi caratterizzati. Un'ulteriore caratterizzazione genomica dei ceppi rilevati nell'Italia nord-orientale potrebbe confermare questa osservazione.

Al contrario, il *clade* B si è originato nel 2011-2012 divergendo progressivamente fino al 2018; questa divergenza è sostenuta dai numerosi *subclades* originatisi, che sono risultati altamente significativi, con una diversa distribuzione spaziale e una persistenza nel tempo variabile. I *subclades* B1 e B2 (prevalenti nel Nord-Est) e B5 (prevalente nel Nord-Ovest), comprendenti tutti i ceppi del 2018, attualmente persistono; i *subclades* B3, B4 e B6 presentano dimensioni e distribuzione più limitate, e il loro raggruppamento temporale suggerisce una persistenza più limitata come quella che caratterizza il *clade* A.

L'analisi effettuata con il *software* RDP, al fine di valutare ipotetici eventi di ricombinazione, ha mostrato la presenza di un ceppo ricombinante tra il *clade* A e il *clade* B.

La ricombinazione nel virus di West Nile è un evento relativamente raro [156], come riportato dallo studio di Armstrong e collaboratori su WNV-1 negli Stati Uniti [157] e non contribuisce in modo significativo alla sua variabilità genetica; pertanto, questo ceppo è stato rimosso dal *dataset* usato per l'analisi filodinamica ed escluso anche dalle successive analisi.

Sui ceppi italiani sono state stimate le distanze genetiche; le sequenze oggetto di studio sono state, poi, raggruppate nei *clades* di appartenenza (A/B) ed è stata calcolata la distanza *within* all'interno di ciascun gruppo e quella *between*, tra i due gruppi. Dal calcolo della distanza *within* è risultato che gli isolati del *clade* A sono più omogenei rispetto a quelli del *clade* B; l'analisi ha mostrato, in generale, una predominanza delle mutazioni sinonime su quelle non sinonime.

Analizzando più in dettaglio i genomi completi del solo *clade* B, abbiamo notato una correlazione positiva significativa delle distanze genetiche (all'interno di ciascun gruppo e tra i gruppi) con lo spazio e con il tempo.

In particolare, ceppi isolati in località più distanti fra loro hanno mostrato distanze genetiche maggiori, risultando con il passar del tempo sempre più diversi da un punto di vista nucleotidico. Questi dati indicano una crescente complessità di questo *clade* dal punto di vista filogenetico, con la continua comparsa di nuovi ceppi localmente circolanti con il passar del tempo. Ciò suggerisce che l'evoluzione del WNV-2 in Italia è stata guidata più da elementi stocastici, come la deriva genetica, che dalla selezione [158]. Inoltre, il fatto che la maggior parte delle mutazioni che distinguono gli isolati virali fra loro siano sinonime, quindi non portino ad alcun cambiamento a livello amminoacidico, suggerisce la presenza di una selezione negativa prevalente. Le sostituzioni non sinonime sono state osservate maggiormente tra il *clade* A e il progenitore di Ancona del 2011, e alcune di queste sono risultate sotto significativa pressione selettiva positiva.

Dalla analisi filogeografica condotta sui genomi completi isolati in Italia abbiamo ipotizzato che WNV-2 abbia raggiunto il nostro Paese intorno al 2008, tre anni prima del suo primo isolamento in ospiti umani. Il luogo di ingresso è stato stimato in un'area compresa tra l'Adriatico e la valle centrale del Po.

Da qui, nel 2010 il virus si sarebbe simultaneamente diffuso verso Est e verso Ovest, seguendo il tragitto del Po e dei suoi affluenti, dando vita ai due *clades* precedentemente descritti.

La filogeografia continua, condotta sempre sui genomi completi italiani, ci ha permesso di ricostruire in maniera più dettagliata le rotte migratorie del virus, confermando il flusso virale lungo il corso dei principali affluenti del Po in aree densamente popolate di uccelli migratori e avifauna locale.

Dalle nostre analisi, si conferma come il virus abbia bisogno di un periodo di circolazione enzootica tra gli animali serbatoio (gli uccelli) e le zanzare che lo trasmettono, prima di causare epidemie nell'uomo. Dunque, anche quando ancora non si osservano casi, è importante effettuare una sorveglianza attiva ambientale, in particolare nelle aree in cui è prevedibile che il virus possa circolare.

Varie ipotesi sono state proposte per spiegare la ricomparsa dell'infezione nella stagione estiva ogni anno nelle zone temperate. Tra tutte le ipotesi, la migrazione annuale degli uccelli e l'*overwintering*, ovvero la capacità del virus di sopravvivere all'inverno in assenza del vettore, sono quelle più accreditate.

L'analisi filogeografica del *clade* europeo ha mostrato una netta segregazione dei ceppi identificati in Italia rispetto a quelli osservati in altri Paesi europei, anche durante

l'epidemia del 2018. Questo, insieme alla continua persistenza di alcuni *subclades*, suggerisce la presenza di ceppi endemici e supporta l'ipotesi dell'*overwintering* più che la reintroduzione annuale dell'infezione. Tuttavia, resta da chiarire se l'*overwintering* sia dovuto ad una trasmissione verticale dell'infezione tra le zanzare [159] o ad una persistenza dell'infezione nel serbatoio durante la stagione invernale [160].

Per studiare la filodinamica dell'epidemia italiana da WNV-2, abbiamo analizzato le sequenze del *clade* B utilizzando due modelli, quello della coalescenza e il modello *birth-death* [161], che consentono rispettivamente di valutare la dimensione effettiva della popolazione virale e di stimare il tasso di riproduzione effettivo  $R_e$  e i suoi cambiamenti nel tempo.

Lo *skyline plot* del *clade* B ha mostrato un netto aumento di 2 log della dimensione della popolazione virale tra il 2016-2017 e il 2017-2018, mentre il valore stimato di  $R_e$  è risultato superiore a 1 tra il 2015 e il 2016 e ha raggiunto il picco tra il 2017 e il 2018, suggerendo una espansione della infezione nel tempo.

Questi dati molto interessanti richiedono una interpretazione. È noto come nel ciclo eco/epidemiologico di WNV, esseri umani e cavalli rappresentino ospiti *dead-end*, ovvero con una viremia di breve durata e con un titolo non sufficientemente elevato da consentire l'infezione del vettore.

Pertanto uomo e cavallo non svolgono alcun ruolo nella catena di infezione: si può, quindi, assumere che  $R_0$  nell'uomo sia uguale a 0. In questa condizione, la dimensione dell'epidemia dipende dal salto di specie (*spillover*) del patogeno dal *reservoir* all'ospite *dead-end* e l'aumento dell' $R_e$ , e conseguentemente del numero effettivo di infezioni, dipende dal vettore o dal serbatoio, e quindi indica un'espansione dell'infezione a seguito dell'aumento di uno o dell'altro nella catena di trasmissione.

È interessante notare che il sistema integrato di sorveglianza italiano per WNV ha riferito un aumento del numero di uccelli residenti e selvatici infetti negli ultimi tre anni, tra cui gazze, corvi, merli, civette e colombacci (bollettino n. 18 del 15/11/2018). Tuttavia, rimane ancora da chiarire se la crescita dell'epidemia sia dovuta all'aumento del *reservoir* o all'introduzione di nuovi individui o specie sensibili o all'aumento della disponibilità di vettori; in ogni caso, l' $R_e$  stimato  $> 1$  suggerisce che l'infezione sia ben affermata nel serbatoio. Un'espansione nel serbatoio infetto potrebbe causare un aumento delle infezioni negli ospiti *dead-end*, e quindi indurre maggiori focolai soprattutto quando le condizioni climatiche sono particolarmente favorevoli all'abbondanza di vettori [162], come probabilmente è accaduto nell'epidemia del 2018.

I nostri risultati dimostrano ancora una volta l'utilità dei metodi filogenetici e bioinformatici nel monitoraggio più dettagliato di fenomeni difficili da rilevare ma con un significativo impatto sulla salute umana. Il modello *birth-death* ha permesso di stimare l' $R_e$  e i suoi cambiamenti nel tempo in una condizione in cui è difficile effettuare una stima diretta [163].

## **6. BIBLIOGRAFIA**

1. Fukuhara T, Matsuura Y. Roles of secretory glycoproteins in particle formation of Flaviviridae viruses. *Microbiol Immunol.* 2019;24(10):1348-0421. Epub 2019/07/26 06:00. PubMed PMID: 31342548.
2. Romero-Brey I, Bartenschlager R. Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. *Viruses.* 2014;6(7):2826-57. Epub 2014/07/24 06:00. PubMed PMID: 25054883.
3. Barrows NJ, Campos RK, Liao KC, Prasanth KR, Soto-Acosta R, Yeh SC, et al. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem Rev.* 2018;118(8):4448-82. Epub 2018/04/14 06:00. PubMed PMID: 29652486.
4. Khromykh AA, Westaway EG. RNA binding properties of core protein of the flavivirus Kunjin. *Arch Virol.* 1996;141(3-4):685-99. Epub 1996/01/01 00:00. PubMed PMID: 8645104.
5. Markoff L, Falgout B, Chang A. A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. *Virology.* 1997;233(1):105-17. Epub 1997/06/23 00:00. PubMed PMID: 9201220.
6. Kaufmann B, Rossmann MG. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect.* 2011;13(1):1-9. Epub 2010/09/28 06:00. PubMed PMID: 20869460.
7. Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 10):2755-66. Epub 2006/09/12. doi: 10.1099/vir.0.82210-0. PubMed PMID: 16963734.
8. Martin-Acebes MA, Saiz JC. West Nile virus: A re-emerging pathogen revisited. *World J Virol.* 2012;1(2):51-70. Epub 2012/04/12 00:00. PubMed PMID: 24175211.
9. Khromykh AA, Sedlak PL, Westaway EG. trans-Complementation analysis of the flavivirus Kunjin ns5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication. *J Virol.* 1999;73(11):9247-55. Epub 1999/10/09 00:00. PubMed PMID: 10516033.
10. Lindenbach BD, Rice CM. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J Virol.* 1997;71(12):9608-17. Epub 1997/11/26 00:00. PubMed PMID: 9371625.
11. Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology.* 1996;220(1):232-40. Epub 1996/06/01 00:00. PubMed PMID: 8659120.
12. Falgout B, Miller RH, Lai CJ. Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. *J Virol.* 1993;67(4):2034-42. Epub 1993/04/01 00:00. PubMed PMID: 8383225.
13. Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(12):4713-30. Epub 1989/06/26 00:00. PubMed PMID: 2546125.
14. Shiryaev SA, Chernov AV, Aleshin AE, Shiryaeva TN, Strongin AY. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from

- West Nile virus. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 9):2081-5. Epub 2009/05/29 09:00. PubMed PMID: 19474250.
15. Wengler G, Czaya G, Farber PM, Hegemann JH. In vitro synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids. *J Gen Virol.* 1991;72 ( Pt 4)(Pt 4):851-8. Epub 1991/04/01 00:00. PubMed PMID: 1826736.
16. Brinton MA. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:371-402. Epub 2002/07/27 10:00. PubMed PMID: 12142476.
17. Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol.* 2008;82(10):4731-41. Epub 2008/03/14 09:00. PubMed PMID: 18337583.
18. Liu WJ, Chen HB, Khromykh AA. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J Virol.* 2003;77(14):7804-13. Epub 2003/06/28 05:00. PubMed PMID: 12829820.
19. Smith JM. Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol.* 1992;34(2):126-9. Epub 1992/02/01 00:00. PubMed PMID: 1556748.
20. Youn S, Ambrose RL, Mackenzie JM, Diamond MS. Non-structural protein-1 is required for West Nile virus replication complex formation and viral RNA synthesis. *Virol J.* 2013;10(339):339. Epub 2013/11/20 06:00. PubMed PMID: 24245822.
21. Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med.* 2010;207(4):793-806. Epub 2010/03/24 06:00. PubMed PMID: 20308361.
22. Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol.* 2011;187(1):424-33. Epub 2011/06/07 06:00. PubMed PMID: 21642539.
23. Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G, Davis AE, Townsend RR, Fremont DH, et al. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(50):19111-6. Epub 2006/11/30 09:00. PubMed PMID: 17132743.
24. Liu WJ, Wang XJ, Mokhonov VV, Shi PY, Randall R, Khromykh AA. Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. *J Virol.* 2005;79(3):1934-42. Epub 2005/01/15 09:00. PubMed PMID: 15650219.
25. Wilson JR, de Sessions PF, Leon MA, Scholle F. West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J Virol.* 2008;82(17):8262-71. Epub 2008/06/20 09:00. PubMed PMID: 18562533.

26. Chung KM, Thompson BS, Fremont DH, Diamond MS. Antibody recognition of cell surface-associated NS1 triggers Fc-gamma receptor-mediated phagocytosis and clearance of West Nile Virus-infected cells. *J Virol.* 2007;81(17):9551-5. Epub 2007/06/22 09:00. PubMed PMID: 17582005.
27. Pierson TC, Kielian M. Flaviviruses: braking the entering. *Curr Opin Virol.* 2013;3(1):3-12. Epub 2013/01/29 06:00. PubMed PMID: 23352692.
28. Kramer LD, Styer LM, Ebel GD. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu Rev Entomol.* 2008;53:61-81. Epub 2007/07/25 09:00. PubMed PMID: 17645411.
29. Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R, et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology.* 2002;298(1):96-105. Epub 2002/07/03 10:00. PubMed PMID: 12093177.
30. Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenbock H, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(4):618-23. Epub 2006/05/18 09:00. PubMed PMID: 16704810.
31. Chaskopoulou A, Dovas C, Chaintoutis S, Bouzalas I, Ara G, Papanastassopoulou M. Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011. *Euro Surveill.* 2011;16(31):31. Epub 2011/08/30 06:00. PubMed PMID: 21871217.
32. Sirbu A, Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI, Vazquez A, Tenorio A, Rebreanu R, et al. Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill.* 2011;16(2):2. Epub 2011/01/22 06:00. PubMed PMID: 21251489.
33. Valiakos G, Touloudi A, Iacovakis C, Athanasiou L, Birtsas P, Spyrou V, et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 2 in sedentary wild birds (Eurasian magpie), Greece, 2010. *Euro Surveill.* 2011;16(18):18. Epub 2011/05/19 06:00. PubMed PMID: 21586266.
34. Bagnarelli P, Marinelli K, Trotta D, Monachetti A, Tavio M, Del Gobbo R, et al. Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011. *Euro Surveill.* 2011;16(43):43. Epub 2011/11/17 06:00. PubMed PMID: 22085600.
35. Platonov AE, Fedorova MV, Karan LS, Shopenskaya TA, Platonova OV, Zhuravlev VI. Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitol Res.* 2008;103 Suppl 1(1):S45-53. Epub 2008/12/17 09:00. PubMed PMID: 19030885.
36. Platonov AE, Karan LS, Shopenskaia TA, Fedorova MV, Koliashnikova NM, Rusakova NM, et al. [Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2011;2(2):29-37. Epub 2011/05/24 06:00. PubMed PMID: 21598612.
37. Bakonyi T, Hubalek Z, Rudolf I, Nowotny N. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(2):225-31. Epub 2005/03/09 09:00. PubMed PMID: 15752439.

38. Hubalek Z, Halouzka J, Juricova Z, Sebesta O. First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic. *Acta Virol.* 1998;42(2):119-20. Epub 1998/10/14 00:00. PubMed PMID: 9770080.
39. Hubalek Z, Rudolf I, Bakonyi T, Kazdova K, Halouzka J, Sebesta O, et al. Mosquito (Diptera: Culicidae) surveillance for arboviruses in an area endemic for West Nile (Lineage Rabensburg) and Tahyna viruses in Central Europe. *J Med Entomol.* 2010;47(3):466-72. Epub 2010/05/26 06:00. PubMed PMID: 20496595.
40. Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, Kovtunov AI, Prilipov AG, Kinney R, et al. West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Arch Virol Suppl.* 2004;18(18):85-96. Epub 2004/05/04 05:00. PubMed PMID: 15119764.
41. Fall G, Diallo M, Loucoubar C, Faye O, Sall AA. Vector competence of *Culex neavei* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Senegal for lineages 1, 2, Koutango and a putative new lineage of West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(4):747-54. Epub 2014/02/26 06:00. PubMed PMID: 24567319.
42. Pachler K, Lebl K, Berer D, Rudolf I, Hubalek Z, Nowotny N. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(12):2119-22. Epub 2014/11/25 06:00. PubMed PMID: 25418009.
43. Pesko KN, Ebel GD. West Nile virus population genetics and evolution. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):181-90. Epub 2012/01/10 06:00. PubMed PMID: 22226703.
44. Pilo-Moron E, Vincent J, Le Corroller Y. [Isolation of a West-Nile virus in the extreme south of the Algerian Sahara (Djanet)]. *Arch Inst Pasteur Alger.* 1970;48:181-4. Epub 1970/01/01 00:00. PubMed PMID: 4148584.
45. Benjelloun A, El Harrak M, Belkadi B. West Nile Disease Epidemiology in North-West Africa: Bibliographical Review. *Transbound Emerg Dis.* 2016;63(6):e153-e9. Epub 2016/10/23 06:00. PubMed PMID: 25753775.
46. Schuffenecker I, Peyrefitte CN, el Harrak M, Murri S, Leblond A, Zeller HG. West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(2):306-9. Epub 2005/03/09 09:00. PubMed PMID: 15752452.
47. Sotelo E, Fernandez-Pinero J, Llorente F, Agüero M, Hoefle U, Blanco JM, et al. Characterization of West Nile virus isolates from Spain: new insights into the distinct West Nile virus eco-epidemiology in the Western Mediterranean. *Virology.* 2009;395(2):289-97. Epub 2009/10/17 06:00. PubMed PMID: 19833373.
48. Sotelo E, Gutierrez-Guzman AV, del Amo J, Llorente F, El-Harrak M, Perez-Ramirez E, et al. Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: the red-legged partridge. *Vet Res.* 2011;42(11):11. Epub 2011/02/15 06:00. PubMed PMID: 21314967.
49. Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z, Ionescu A, Monaco F, Savini G, et al. Epidemiology of west nile in europe and in the mediterranean basin. *Open Virol J.* 2010;4:29-37. Epub 2010/06/03 06:00. PubMed PMID: 20517490.

50. Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:117-26. Epub 2002/01/19 10:00. PubMed PMID: 11797769.
51. El Rhaffouli H, El Harrak M, Lotfi C, El Boukhrissi F, Bajjou T, Laraoui A, et al. Serologic evidence of West Nile virus infection among humans, Morocco. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(5):880-1. Epub 2012/04/21 06:00. PubMed PMID: 22516366.
52. Monaco F, Savini G, Calistri P, Polci A, Pinoni C, Bruno R, et al. 2009 West Nile disease epidemic in Italy: first evidence of overwintering in Western Europe? *Res Vet Sci.* 2011;91(2):321-6. Epub 2011/02/22 06:00. PubMed PMID: 21334703.
53. Rogers DJ, Randolph SE. Climate change and vector-borne diseases. *Adv Parasitol.* 2006;62:345-81. Epub 2006/05/02 09:00. PubMed PMID: 16647975.
54. Melnick JL, Paul JR, Riordan JT, Barnett VH, Goldblum N, Zabin E. Isolation from human sera in Egypt of a virus apparently identical to West Nile virus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1951;77(4):661-5. Epub 1951/08/01 00:00. PubMed PMID: 14891830.
55. Klein C, Kimiagar I, Pollak L, Gandelman-Marton R, Itzhaki A, Milo R, et al. Neurological features of West Nile virus infection during the 2000 outbreak in a regional hospital in Israel. *J Neurol Sci.* 2002;200(1-2):63-6. Epub 2002/07/20 10:00. PubMed PMID: 12127678.
56. Kokernot RH, Smithburn KC, Weinbren MP. Neutralizing antibodies to arthropod-borne viruses in human beings and animals in the Union of South Africa. *J Immunol.* 1956;77(5):313-23. Epub 1956/11/01 00:00. PubMed PMID: 13385500.
57. Macnamara FN, Horn DW, Porterfield JS. Yellow fever and other arthropod-borne viruses; a consideration of two serological surveys made in South Western Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1959;53(2):202-12. Epub 1959/03/01 00:00. PubMed PMID: 13647627.
58. Taylor RM, Hurlbut HS, Dressler HR, Spangler EW, Thrasher D. Isolation of West Nile virus from *Culex* mosquitoes. *J Egypt Med Assoc.* 1953;36(3):199-208. Epub 1953/01/01 00:00. PubMed PMID: 13084817.
59. 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;88(Pt 3):875-84. Epub 2007/02/28 09:00. PubMed PMID: 17325360.
60. Maquart M, Boyer S, Rakotoharinome VM, Ravaomanana J, Tantely ML, Heraud JM, et al. High Prevalence of West Nile Virus in Domestic Birds and Detection in 2 New Mosquito Species in Madagascar. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147589. Epub 2016/01/26 06:00. PubMed PMID: 26807720.
61. Estrada-Franco JG, Navarro-Lopez R, Beasley DW, Coffey L, Carrara AS, Travassos da Rosa A, et al. West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(12):1604-7. Epub 2004/01/15 05:00. PubMed PMID: 14720402.
62. Rios-Ibarra C, Blitvich BJ, Farfan-Ale J, Ramos-Jimenez J, Muro-Escobedo S, Martinez-Rodriguez HR, et al. Fatal human case of West Nile disease, Mexico, 2009. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(4):741-3. Epub 2010/03/31 06:00. PubMed PMID: 20350413.

63. Bakonyi T, Ferenczi E, Erdelyi K, Kutasi O, Csorgo T, Seidel B, et al. Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Vet Microbiol.* 2013;165(1-2):61-70. Epub 2013/04/11 06:00. PubMed PMID: 23570864.
64. Platonov AE, Shipulin GA, Shipulina OY, Tyutyunnik EN, Frolochkina TI, Lanciotti RS, et al. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(1):128-32. Epub 2001/03/27 10:00. PubMed PMID: 11266303.
65. Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet.* 1998;352(9130):767-71. Epub 1998/09/16 00:00. PubMed PMID: 9737281.
66. 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;23(3):147-56. Epub 2004/02/27 05:00. PubMed PMID: 14986160.
67. Di Sabatino D, Bruno R, Sauro F, Danzetta ML, Cito F, Iannetti S, et al. Epidemiology of West Nile disease in Europe and in the Mediterranean Basin from 2009 to 2013. *Biomed Res Int.* 2014;2014(10):907852. Epub 2014/10/11 06:00. PubMed PMID: 25302311.
68. Merdic E, Peric L, Pandak N, Kurolt IC, Turic N, Vignjevic G, et al. West Nile virus outbreak in humans in Croatia, 2012. *Coll Antropol.* 2013;37(3):943-7. Epub 2013/12/07 06:00. PubMed PMID: 24308241.
69. Stiasny K, Aberle SW, Heinz FX. Retrospective identification of human cases of West Nile virus infection in Austria (2009 to 2010) by serological differentiation from Usutu and other flavivirus infections. *Euro Surveill.* 2013;18(43):1560-7917. Epub 2013/11/02 06:00. PubMed PMID: 24176619.
70. Russell RC, Dwyer DE. Arboviruses associated with human disease in Australia. *Microbes Infect.* 2000;2(14):1693-704. Epub 2001/01/04 11:00. PubMed PMID: 11137043.
71. Frost MJ, Zhang J, Edmonds JH, Prow NA, Gu X, Davis R, et al. Characterization of virulent West Nile virus Kunjin strain, Australia, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(5):792-800. Epub 2012/04/21 06:00. PubMed PMID: 22516173.
72. Li XL, Fu SH, Liu WB, Wang HY, Lu Z, Tong SX, et al. West Nile virus infection in Xinjiang, China. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13(2):131-3. Epub 2013/01/08 06:00. PubMed PMID: 23289395.
73. Smithburn KC, Kerr JA, Gatne PB. Neutralizing antibodies against certain viruses in the sera of residents of India. *J Immunol.* 1954;72(4):248-57. Epub 1954/04/01 00:00. PubMed PMID: 13163397.
74. Thakare JP, Rao TL, Padbidri VS. Prevalence of West Nile virus infection in India. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2002;33(4):801-5. Epub 2003/05/22 05:00. PubMed PMID: 12757229.
75. Risbud AR, Sharma V, Rao CV, Rodrigues FM, Shaikh BH, Pinto BD, et al. Post-epidemic serological survey for JE virus antibodies in south Arcot district (Tamil Nadu). *Indian J Med Res.* 1991;93:1-5. Epub 1991/01/01 00:00. PubMed PMID: 1850713.

76. Bardos V, Adamcova J, Dedei S, Gjini N, Rosicky B, Simkova A. Neutralizing antibodies against some neurotropic viruses determined in human sera in Albania. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1959;3:277-82. Epub 1959/01/01 00:00. PubMed PMID: 13796704.
77. Garcia-Bocanegra I, Jaen-Tellez JA, Napp S, Arenas-Montes A, Fernandez-Morente M, Fernandez-Molera V, et al. West Nile fever outbreak in horses and humans, Spain, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(12):2397-9. Epub 2011/12/17 06:00. PubMed PMID: 22172565.
78. Nagy A, Mezei E, Nagy O, Bakonyi T, Csonka N, Kaposi M, et al. Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. *Euro Surveill.* 2019;24(28):1560-7917. Epub 2019/07/18 06:00. PubMed PMID: 31311619.
79. Papa A, Papadopoulou E, Chatzixanthouliou C, Glouftsiou P, Pappa S, Pervanidou D, et al. Emergence of West Nile virus lineage 2 belonging to the Eastern European subclade, Greece. *Arch Virol.* 2019;164(6):1673-5. Epub 2019/04/07 06:00. PubMed PMID: 30953205.
80. Popovic N, Milosevic B, Urosevic A, Poluga J, Lavadinovic L, Nedeljkovic J, et al. Outbreak of West Nile virus infection among humans in Serbia, August to October 2012. *Euro Surveill.* 2013;18(43):1560-7917. Epub 2013/11/02 06:00. PubMed PMID: 24176618.
81. Haussig JM, Young JJ, Gossner CM, Mezei E, Bella A, Sirbu A, et al. Early start of the West Nile fever transmission season 2018 in Europe. *Euro Surveill.* 2018;23(32):1560-7917. Epub 2018/08/16 06:00. PubMed PMID: 30107869.
82. Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, et al. West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(12):1372-8. Epub 2002/12/25 04:00. PubMed PMID: 12498650.
83. Rossini G, Cavrini F, Pierro A, Macini P, Finarelli A, Po C, et al. First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy, September 2008 - case report. *Euro Surveill.* 2008;13(41):19002-en. Epub 2008/10/18 09:00. PubMed PMID: 18926106.
84. Rizzo C, Vescio F, Declich S, Finarelli AC, Macini P, Mattivi A, et al. West Nile virus transmission with human cases in Italy, August - September 2009. *Euro Surveill.* 2009;14(40):40. Epub 2009/10/14 06:00. PubMed PMID: 19822123.
85. Magurano F, Remoli ME, Baggieri M, Fortuna C, Marchi A, Fiorentini C, et al. Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(12):E545-7. Epub 2012/10/02 06:00. PubMed PMID: 23020657.
86. Riccardo F, Monaco F, Bella A, Savini G, Russo F, Cagarelli R, et al. An early start of West Nile virus seasonal transmission: the added value of One Health surveillance in detecting early circulation and triggering timely response in Italy, June to July 2018. *Euro Surveill.* 2018;23(32):1560-7917. Epub 2018/08/16 06:00. PubMed PMID: 30107870.
87. David S, Abraham AM. Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. *Infect Dis (Lond).* 2016;48(8):571-86. Epub 2016/05/22 06:00. PubMed PMID: 27207312.

88. Asnis DS, Conetta R, Waldman G, Teixeira AA. The West Nile virus encephalitis outbreak in the United States (1999-2000): from Flushing, New York, to beyond its borders. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:161-71. Epub 2002/01/19 10:00. PubMed PMID: 11797774.
89. Kopel E, Amitai Z, Bin H, Shulman LM, Mendelson E, Sheffer R. Surveillance of West Nile virus disease, Tel Aviv district, Israel, 2005 to 2010. *Euro Surveill.* 2011;16(25):25. Epub 2011/07/05 06:00. PubMed PMID: 21722612.
90. Samuel MA, Diamond MS. Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol.* 2006;80(19):9349-60. Epub 2006/09/16 09:00. PubMed PMID: 16973541.
91. Beasley DW, Li L, Suderman MT, Barrett AD. Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype. *Virology.* 2002;296(1):17-23. Epub 2002/05/31 10:00. PubMed PMID: 12036314.
92. Venter M, Myers TG, Wilson MA, Kindt TJ, Paweska JT, Burt FJ, et al. Gene expression in mice infected with West Nile virus strains of different neurovirulence. *Virology.* 2005;342(1):119-40. Epub 2005/08/30 09:00. PubMed PMID: 16125213.
93. Monaco F, Purpari G, Di Gennaro A, Mira F, Di Marco P, Guercio A, et al. Immunological response in horses following West Nile virus vaccination with inactivated or recombinant vaccine. *Vet Ital.* 2019;55(1):73-9. Epub 2019/04/06 06:00. PubMed PMID: 30951184.
94. Grosenbaugh DA, Backus CS, Karaca K, Minke JM, Nordgren RM. The anamnestic serologic response to vaccination with a canarypox virus-vectored recombinant West Nile virus (WNV) vaccine in horses previously vaccinated with an inactivated WNV vaccine. *Vet Ther.* 2004;5(4):251-7. Epub 2005/02/19 09:00. PubMed PMID: 15719324.
95. Joo K, Bakonyi T, Szenci O, Sardi S, Ferenczi E, Barna M, et al. Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in equine serum after natural infection or vaccination. *Vet Immunol Immunopathol.* 2017;183:1-6. Epub 2017/01/09 06:00. PubMed PMID: 28063471.
96. Siger L, Bowen RA, Karaca K, Murray MJ, Gordy PW, Loosmore SM, et al. Assessment of the efficacy of a single dose of a recombinant vaccine against West Nile virus in response to natural challenge with West Nile virus-infected mosquitoes in horses. *Am J Vet Res.* 2004;65(11):1459-62. Epub 2004/11/30 09:00. PubMed PMID: 15566080.
97. Jimenez de Oya N, Escribano-Romero E, Camacho MC, Blazquez AB, Martin-Acebes MA, Hofle U, et al. A Recombinant Subviral Particle-Based Vaccine Protects Magpie (*Pica pica*) Against West Nile Virus Infection. *Front Microbiol.* 2019;10(1133):1133. Epub 2019/06/25 06:00. PubMed PMID: 31231320.
98. Merino-Ramos T, Blazquez AB, Escribano-Romero E, Canas-Arranz R, Sobrino F, Saiz JC, et al. Protection of a single dose west nile virus recombinant subviral particle vaccine against lineage 1 or 2 strains and analysis of the cross-reactivity with Usutu virus. *PLoS One.* 2014;9(9):e108056. Epub 2014/09/18 06:00. PubMed PMID: 25229345.
99. Heinz FX, Allison SL, Stiasny K, Schlich J, Holzmann H, Mandl CW, et al. Recombinant and virion-derived soluble and particulate immunogens for vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine.* 1995;13(17):1636-42. Epub 1995/12/01 00:00. PubMed PMID: 8719513.

100. Hunt AR, Cropp CB, Chang GJ. A recombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced in stably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunit immunogen. *J Virol Methods*. 2001;97(1-2):133-49. Epub 2001/08/03 10:00. PubMed PMID: 11483224.
101. Kroeger MA, McMinn PC. Murray Valley encephalitis virus recombinant subviral particles protect mice from lethal challenge with virulent wild-type virus. *Arch Virol*. 2002;147(6):1155-72. Epub 2002/07/12 10:00. PubMed PMID: 12111426.
102. Tan M, Jiang X. Subviral particle as vaccine and vaccine platform. *Curr Opin Virol*. 2014;6:24-33. Epub 2014/03/26 06:00. PubMed PMID: 24662314.
103. Zhang S, Cubas R, Li M, Chen C, Yao Q. Virus-like particle vaccine activates conventional B2 cells and promotes B cell differentiation to IgG2a producing plasma cells. *Mol Immunol*. 2009;46(10):1988-2001. Epub 2009/04/21 09:00. PubMed PMID: 19376580.
104. Diamond MS, Shrestha B, Mehlhop E, Sitati E, Engle M. Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Viral Immunol*. 2003;16(3):259-78. Epub 2003/10/30 05:00. PubMed PMID: 14583143.
105. Pitoiset F, Vazquez T, Bellier B. Enveloped virus-like particle platforms: vaccines of the future? *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(7):913-5. Epub 2015/05/15 06:00. PubMed PMID: 25968245.
106. McMurtrey CP, Lelic A, Piazza P, Chakrabarti AK, Yablonsky EJ, Wahl A, et al. Epitope discovery in West Nile virus infection: Identification and immune recognition of viral epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(8):2981-6. Epub 2008/02/27 09:00. PubMed PMID: 18299564.
107. Angenvoort J, Fischer D, Fast C, Ziegler U, Eiden M, de la Fuente JG, et al. Limited efficacy of West Nile virus vaccines in large falcons (*Falco* spp.). *Vet Res*. 2014;45(41):41. Epub 2014/04/09 06:00. PubMed PMID: 24708385.
108. Shrestha B, Diamond MS. Role of CD8+ T cells in control of West Nile virus infection. *J Virol*. 2004;78(15):8312-21. Epub 2004/07/16 05:00. PubMed PMID: 15254203.
109. Shrestha B, Zhang B, Purtha WE, Klein RS, Diamond MS. Tumor necrosis factor alpha protects against lethal West Nile virus infection by promoting trafficking of mononuclear leukocytes into the central nervous system. *J Virol*. 2008;82(18):8956-64. Epub 2008/07/18 09:00. PubMed PMID: 18632856.
110. Monath TP, Liu J, Kanesa-Thanan N, Myers GA, Nichols R, Deary A, et al. A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(17):6694-9. Epub 2006/04/18 09:00. PubMed PMID: 16617103.
111. Dayan GH, Bevilacqua J, Coleman D, Buldo A, Risi G. Phase II, dose ranging study of the safety and immunogenicity of single dose West Nile vaccine in healthy adults  $\geq$  50 years of age. *Vaccine*. 2012;30(47):6656-64. Epub 2012/09/11 06:00. PubMed PMID: 22959989.
112. Durbin AP, Wright PF, Cox A, Kagucia W, Elwood D, Henderson S, et al. The live attenuated chimeric vaccine rWN/DEN4Delta30 is well-tolerated and immunogenic in healthy

- flavivirus-naive adult volunteers. *Vaccine*. 2013;31(48):5772-7. Epub 2013/08/24 06:00. PubMed PMID: 23968769.
113. Machain-Williams C, Reagan K, Wang T, Zeidner NS, Blair CD. Immunization with *Culex tarsalis* mosquito salivary gland extract modulates West Nile virus infection and disease in mice. *Viral Immunol*. 2013;26(1):84-92. Epub 2013/02/01 06:00. PubMed PMID: 23362833.
114. Reagan KL, Machain-Williams C, Wang T, Blair CD. Immunization of mice with recombinant mosquito salivary protein D7 enhances mortality from subsequent West Nile virus infection via mosquito bite. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12):e1935. Epub 2012/12/14 06:00. PubMed PMID: 23236530.
115. Boyce R, Lenhart A, Kroeger A, Velayudhan R, Roberts B, Horstick O. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Trop Med Int Health*. 2013;18(5):564-77. Epub 2013/03/27 06:00. PubMed PMID: 23527785.
116. Johnson KN. The Impact of *Wolbachia* on Virus Infection in Mosquitoes. *Viruses*. 2015;7(11):5705-17. Epub 2015/11/12 06:00. PubMed PMID: 26556361.
117. Shaw WR, Catteruccia F. Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. *Nat Microbiol*. 2019;4(1):20-34. Epub 2018/08/29 06:00. PubMed PMID: 30150735.
118. Montgomery SP, Brown JA, Kuehnert M, Smith TL, Crall N, Lanciotti RS, et al. Transfusion-associated transmission of West Nile virus, United States 2003 through 2005. *Transfusion*. 2006;46(12):2038-46. Epub 2006/12/21 09:00. PubMed PMID: 17176314.
119. Romeiro MF, Souza WM, Tolardo AL, Vieira LC, Colombo TE, Aquino VH, et al. Evaluation and optimization of SYBR Green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool for diagnosis of the *Flavivirus* genus in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(3):279-85. Epub 2016/07/08 06:00. PubMed PMID: 27384823.
120. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Cattai M, et al. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *J Infect Dis*. 2013;208(7):1086-92. Epub 2013/07/04 06:00. PubMed PMID: 23821721.
121. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Squarzon L, Sinigaglia A, Ulbert S, et al. Isolation of West Nile virus from urine samples of patients with acute infection. *J Clin Microbiol*. 2014;52(9):3411-3. Epub 2014/06/22 06:00. PubMed PMID: 24951801.
122. Barzon L, Pacenti M, Ulbert S, Palu G. Latest developments and challenges in the diagnosis of human West Nile virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(3):327-42. Epub 2015/02/03 06:00. PubMed PMID: 25641365.
123. Rios M, Daniel S, Chancey C, Hewlett IK, Stramer SL. West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood. *Clin Infect Dis*. 2007;45(2):181-6. Epub 2007/06/21 09:00. PubMed PMID: 17578776.
124. Lanteri MC, Lee TH, Wen L, Kaidarova Z, Bravo MD, Kiely NE, et al. West Nile virus nucleic acid persistence in whole blood months after clearance in plasma: implication for

transfusion and transplantation safety. *Transfusion*. 2014;54(12):3232-41. Epub 2014/06/27 06:00. PubMed PMID: 24965017.

125. Lustig Y, Sofer D, Bucris ED, Mendelson E. Surveillance and Diagnosis of West Nile Virus in the Face of Flavivirus Cross-Reactivity. *Front Microbiol*. 2018;9(2421):2421. Epub 2018/10/30 06:00. PubMed PMID: 30369916.

126. Wilson MR, Zimmermann LL, Crawford ED, Sample HA, Soni PR, Baker AN, et al. Acute West Nile Virus Meningoencephalitis Diagnosed Via Metagenomic Deep Sequencing of Cerebrospinal Fluid in a Renal Transplant Patient. *Am J Transplant*. 2017;17(3):803-8. Epub 2016/10/22 06:00. PubMed PMID: 27647685.

127. Williams SH, Cordey S, Bhuvu N, Laubscher F, Hartley MA, Boillat-Blanco N, et al. Investigation of the Plasma Virome from Cases of Unexplained Febrile Illness in Tanzania from 2013 to 2014: a Comparative Analysis between Unbiased and VirCapSeq-VERT High-Throughput Sequencing Approaches. *mSphere*. 2018;3(4):00311-18. Epub 2018/08/24 06:00. PubMed PMID: 30135221.

128. Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*. 2018;360(6387):444-8. Epub 2018/04/28 06:00. PubMed PMID: 29700266.

129. Jordan I, Briese T, Lipkin WI. Discovery and molecular characterization of West Nile virus NY 1999. *Viral Immunol*. 2000;13(4):435-46. Epub 2001/02/24 12:00. PubMed PMID: 11192290.

130. Chowers MY, Lang R, Nassar F, Ben-David D, Giladi M, Rubinshtein E, et al. Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(4):675-8. Epub 2001/10/05 10:00. PubMed PMID: 11585531.

131. Kalil AC, Devetten MP, Singh S, Lesiak B, Poage DP, Bargenquast K, et al. Use of interferon-alpha in patients with West Nile encephalitis: report of 2 cases. *Clin Infect Dis*. 2005;40(5):764-6. Epub 2005/02/17 09:00. PubMed PMID: 15714427.

132. Del Amo J, Sotelo E, Fernandez-Pinero J, Gallardo C, Llorente F, Agüero M, et al. A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. *J Virol Methods*. 2013;189(2):321-7. Epub 2013/03/19 06:00. PubMed PMID: 23499258.

133. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-20. Epub 2014/04/04 06:00. PubMed PMID: 24695404.

134. Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci*. 1998;23(10):403-5. Epub 1998/11/12 00:00. PubMed PMID: 9810230.

135. Martin D, Rybicki E. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*. 2000;16(6):562-3. Epub 2000/09/12 11:00. PubMed PMID: 10980155.

136. Martin DP, Williamson C, Posada D. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics*. 2005;21(2):260-2. Epub 2004/09/21 05:00. PubMed PMID: 15377507.

137. Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1995;11(11):1423-5. Epub 1995/11/01 00:00. PubMed PMID: 8573403.
138. Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*. 1999;265(2):218-25. Epub 1999/12/22 00:00. PubMed PMID: 10600594.
139. Posada D, Crandall KA. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):13757-62. Epub 2001/11/22 10:00. PubMed PMID: 11717435.
140. Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics*. 2000;16(7):573-82. Epub 2000/10/20 11:00. PubMed PMID: 11038328.
141. Boni MF, Posada D, Feldman MW. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics*. 2007;176(2):1035-47. Epub 2007/04/06 09:00. PubMed PMID: 17409078.
142. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*. 2008;25(7):1253-6. Epub 2008/04/10 09:00. PubMed PMID: 18397919.
143. Posada D. Selection of models of DNA evolution with jModelTest. *Methods Mol Biol*. 2009;537:93-112. Epub 2009/04/21 09:00. PubMed PMID: 19378141.
144. Minin V, Abdo Z, Joyce P, Sullivan J. Performance-based selection of likelihood models for phylogeny estimation. *Syst Biol*. 2003;52(5):674-83. Epub 2003/10/08 05:00. PubMed PMID: 14530134.
145. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*. 2007;7(214):214. Epub 2007/11/13 09:00. PubMed PMID: 17996036.
146. Bromham L, Penny D. The modern molecular clock. *Nat Rev Genet*. 2003;4(3):216-24. Epub 2003/03/01 04:00. PubMed PMID: 12610526.
147. Lam TT, Hon CC, Tang JW. Use of phylogenetics in the molecular epidemiology and evolutionary studies of viral infections. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2010;47(1):5-49. Epub 2010/04/07 06:00. PubMed PMID: 20367503.
148. Baele G, Lemey P, Bedford T, Rambaut A, Suchard MA, Alekseyenko AV. Improving the accuracy of demographic and molecular clock model comparison while accommodating phylogenetic uncertainty. *Mol Biol Evol*. 2012;29(9):2157-67. Epub 2012/03/10 06:00. PubMed PMID: 22403239.
149. Lemey P, Rambaut A, Welch JJ, Suchard MA. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Mol Biol Evol*. 2010;27(8):1877-85. Epub 2010/03/06 06:00. PubMed PMID: 20203288.
150. Yang Z, Nielsen R. Synonymous and nonsynonymous rate variation in nuclear genes of mammals. *J Mol Evol*. 1998;46(4):409-18. Epub 1998/04/29 00:00. PubMed PMID: 9541535.

151. Pond SL, Frost SD. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics*. 2005;21(10):2531-3. Epub 2005/02/17 09:00. PubMed PMID: 15713735.
152. Rizzo C, Napoli C, Venturi G, Pupella S, Lombardini L, Calistri P, et al. West Nile virus transmission: results from the integrated surveillance system in Italy, 2008 to 2015. *Euro Surveill*. 2016;21(37):1560-7917. Epub 2016/09/30 06:00. PubMed PMID: 27684046.
153. Calzolari M, Pautasso A, Montarsi F, Albieri A, Bellini R, Bonilauri P, et al. West Nile Virus Surveillance in 2013 via Mosquito Screening in Northern Italy and the Influence of Weather on Virus Circulation. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140915. Epub 2015/10/22 06:00. PubMed PMID: 26488475.
154. Savini G, Capelli G, Monaco F, Polci A, Russo F, Di Gennaro A, et al. Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Vet Microbiol*. 2012;158(3-4):267-73. Epub 2012/03/13 06:00. PubMed PMID: 22406344.
155. Djikeng A, Halpin R, Kuzmickas R, Depasse J, Feldblyum J, Sengamalay N, et al. Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics*. 2008;9(5):5. Epub 2008/01/09 09:00. PubMed PMID: 18179705.
156. Pickett BE, Lefkowitz EJ. Recombination in West Nile Virus: minimal contribution to genomic diversity. *Virol J*. 2009;6(165):165. Epub 2009/10/14 06:00. PubMed PMID: 19821990.
157. Armstrong PM, Vossbrinck CR, Andreadis TG, Anderson JF, Pesko KN, Newman RM, et al. Molecular evolution of West Nile virus in a northern temperate region: Connecticut, USA 1999-2008. *Virology*. 2011;417(1):203-10. Epub 2011/07/05 06:00. PubMed PMID: 21723580.
158. Grubaugh ND, Weger-Lucarelli J, Murrieta RA, Fauver JR, Garcia-Luna SM, Prasad AN, et al. Genetic Drift during Systemic Arbovirus Infection of Mosquito Vectors Leads to Decreased Relative Fitness during Host Switching. *Cell Host Microbe*. 2016;19(4):481-92. Epub 2016/04/07 06:00. PubMed PMID: 27049584.
159. Rudolf I, Betasova L, Blazejova H, Venclikova K, Strakova P, Sebesta O, et al. West Nile virus in overwintering mosquitoes, central Europe. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):452. Epub 2017/10/04 06:00. PubMed PMID: 28969685.
160. Montecino-Latorre D, Barker CM. Overwintering of West Nile virus in a bird community with a communal crow roost. *Sci Rep*. 2018;8(1):6088. Epub 2018/04/19 06:00. PubMed PMID: 29666401.
161. Stadler T, Kuhnert D, Bonhoeffer S, Drummond AJ. Birth-death skyline plot reveals temporal changes of epidemic spread in HIV and hepatitis C virus (HCV). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(1):228-33. Epub 2012/12/19 06:00. PubMed PMID: 23248286.
162. Kilpatrick AM, Randolph SE. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet*. 2012;380(9857):1946-55. Epub 2012/12/04 06:00. PubMed PMID: 23200503.
163. Woolhouse ME, Gowtage-Sequeria S. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(12):1842-7. Epub 2006/02/21 09:00. PubMed PMID: 16485468.