



UNIVERSITA' DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA

**“INDAGINI EPIDEMIOLOGICHE SU FLAVIVIROSI
TRASMESSE DA ZANZARE IN TOSCANA”**

I RELATORE:

Professor Francesco Tolari

II RELATORE:

Dottor Maurizio Mazzei

CANDIDATO:

Silvia Tognarelli

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

INDICE

RIASSUNTO	pag.5
INTRODUZIONE	pag.6
1. GENERALITA' SULLA FAMIGLIA FLAVIVIRIDAE.....	pag.6
2. GENERALITA' SUL GENERE FLAVIVIRUS.....	pag.8
3. FLAVIVIROSI TRASMESSE DA ZANZARE.....	pag.10
3.1. ENCEFALITE WEST NILE.....	pag.12
3.1.1. DEFINIZIONE.....	pag.12
3.1.2. STORIA E DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA....	pag.12
3.1.3. EZIOLOGIA.....	pag.17
3.1.4. EPIDEMIOLOGIA.....	pag.19
3.1.5. PATOGENESI.....	pag.22
3.1.5.1. CAVALLO.....	pag.23
3.1.5.2. VOLATILI.....	pag.24
3.1.6. RISPOSTA IMMUNITARIA.....	pag.25
3.1.7. ASPETTI ANATOMO-CLINICI.....	pag.27
3.1.7.1. CAVALLO	pag.27
3.1.7.2. VOLATILI.....	pag.30
3.1.7.3. UOMO.....	pag.33
3.1.9. DIAGNOSI DI LABORATORIO.....	pag.34
3.1.9.1. DIAGNOSI VIROLOGICA.....	pag.34

3.1.9.2. DIAGNOSI SIEROLOGICA.....	pag.35
3.1.9.3. DIAGNOSI DI LABORATORIO NEL CAVALLO	pag.36
3.1.9.4. DIAGNOSI DI LABORATORIO NELL’UOMO.....	pag.36
3.1.10. PROFILASSI E CONTROLLO.....	pag.38
3.1.10.1. PROFILASSI SANITARIA.....	pag.38
3.1.10.2. PROFILASSI IMMUNIZZANTE.....	pag.39
3.2. INFEZIONE DA VIRUS USUTU.....	pag.41
3.2.1. DEFINIZIONE.....	pag.41
3.2.2. STORIA E DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA...	pag.41
3.2.3. EPIDEMIOLOGIA.....	pag.43
3.2.4. PATOLOGIA.....	pag.44
3.2.5. SEGNI CLINICI.....	pag.44
3.2.6. DIAGNOSI.....	pag.45
3.2.7. PROFILASSI, TERAPIA E CONTROLLO.....	pag.46
RICERCHE PERSONALI.....	pag.48
1. MATERIALI E METODI.....	pag.48
1.1. CATTURA E RACCOLTA DI ZANZARE.....	pag.48
1.2. ESTRAZIONE DI RNA E SINTESI DEL cDNA.....	pag.52
1.3. SELEZIONE DEI PRIMERS.....	pag.52

1.4. PCR ESEGUITA CON I PRIMERS DESCRITTI DA SCARAMOZZINO ET AL, 2001.....	pag.55
1.5. PCR ESEGUITA CON I PRIMERS DA NOI DISEGNATI.....	pag.56
1.6. PCR-NESTED.....	pag.57
1.7. ESTARZIONE E PURIFICAZIONE DI DNA DA GEL DI AGAROSIO.....	pag.58
1.8. SEQUENZIAMENTO.....	pag.58
1.9. INDAGINE EPIDEMIOLOGICA SU PICCIONI.....	pag.58
2. RISULTATI.....	pag.60
2.1. RISULTATI TEST ESEGUITI SU POOLS DI ZANZARE.....	pag.60
2.2. RISULTATI TEST ESEGUITI SU PICCIONI.....	pag.66
3. DISCUSSIONE.....	pag.67
BIBLIOGRAFIA.....	pag.69
SITOGRAFIA.....	pag.95
RINGRAZIAMENTI.....	pag.97

RIASSUNTO

Dal 1998 nella regione Toscana sono stati segnalati focolai infettivi causati da *Flavivirus* trasmessi da zanzare, West Nile Virus (WNV) e Usutu Virus (USUV).

Questi *Flavivirus* presentano un ciclo di trasmissione che coinvolge principalmente zanzare e uccelli; tuttavia, anche uomo e altri mammiferi (oltre che rettili e anfibi) possono essere accidentalmente infettati.

Nella tesi si riportano i risultati di una indagine sulla ricerca di *Flavivirus* trasmessi da zanzare in piccioni di una località nel comune di Capannori e in zanzare catturate nel comune di Fucecchio.

I piccioni, abbattuti in seguito a una ordinanza comunale, sono stati sottoposti a prelievi di reni, milza e cervello. Gli organi sono stati inviati all'IZS di Teramo, dove è stata eseguita la PCR per WNV.

Le zanzare, dopo essere state identificate, sono state suddivise in pools di 50 femmine. I pools sono stati sottoposti a estrazione di RNA, sintesi di cDNA, PCR e PCR-nested, seguite da sequenziamento degli amplificati ottenuti.

In nessuno dei campioni esaminati sono stati identificati WNV e USUV.

INTRODUZIONE

1. GENERALITA' SULLA FAMIGLIA FLAVIVIRIDAE

Della famiglia *Flaviviridae* fanno parte virus a RNA responsabili di numerose malattie rilevanti per uomo e animali.

Il nome *Flaviviridae* deriva dal latino *flavus*, cioè giallo, poiché la specie virale tipo è quella del virus della febbre gialla.

I *Flaviviridae* sono inclusi tra gli “*Arbovirus*”, un macrogruppo eterogeneo (non tassonomico) di virus veicolati a uomo e animali da vettori artropodi ematofagi (*arthropod borne viruses*) (Hernandez et al, 2014).

Dal punto di vista morfologico, i virioni appaiono come particelle sferiche di 40-60 nm, provviste di envelope formato da proteine, lipidi e carboidrati che derivano dalla membrana citoplasmatica della cellula ospite, dal quale si dirama una frangia di piccole proiezioni superficiali. L'envelope avvolge un nucleocapside a simmetria icosaedrica, contenente il genoma.

L'unità di massa atomica dei virioni è di 60×10^6 e la loro *buoyant density* varia in base al gradiente impiegato.

Figura N.1: Morfologia di un virus della famiglia *Flaviviridae*.

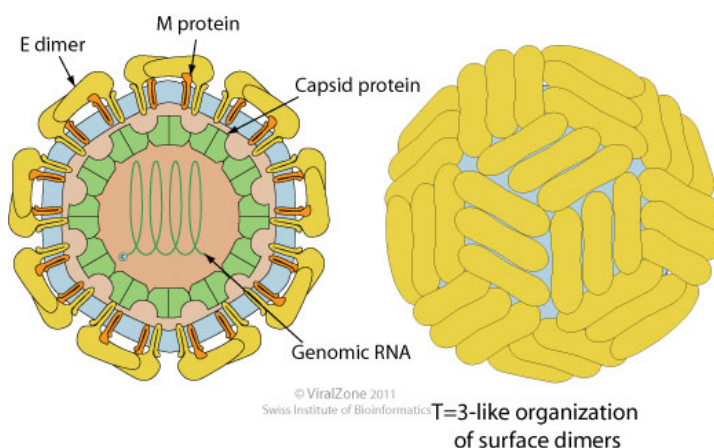


Immagine tratta dal sito Internet: [http://viralzone.expasy.org/all by species/43.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/43.html)

I virus che fanno parte di questa famiglia, sono rapidamente inattivati dall'esposizione al calore e già a 50°C in dieci minuti perdono il 50% della loro infettività, tuttavia la loro resistenza termica aumenta in presenza di materiale proteico.

Sono inoltre sensibili a disinfettanti, solventi dei lipidi e detergenti mentre risultano stabili a pH 8, in condizioni di laboratorio.

Il genoma è costituito da 9500-12500 nucleotidi e contiene un unico filamento di RNA a polarità positiva direttamente infettante.

Nel genoma si distinguono 3 segmenti:

- UTR: *untranslated region*, regione non codificante all'estremo 5' dotata di funzioni di innesco della traduzione;
- ORF: un lungo segmento codificante per una sola poliproteina che, per un successivo clivaggio, porta alla formazione di tutte le proteine virali;
- UTR: un'altra regione non codificante situata all'estremo 3'.

Nel segmento ORF le sequenze più vicine all'estremità 5' codificano per quattro proteine strutturali, mentre le proteine non strutturali sono codificate dalle sequenze poste in prossimità dell'estremità 3' (Farina e Scatozza, 1998).

La replicazione avviene all'interno del citoplasma delle cellule.

Alla famiglia *Flaviviridae* appartengono tre generi di virus ampiamente diffusi in natura: *Flavivirus* e *Pestivirus* contenenti virus responsabili di malattie degli animali e dell'uomo e *Hepacivirus* contenente il virus responsabile dell'epatite C dell'uomo.

2. GENERALITA' SUL GENERE FLAVIVIRUS

Il genere *Flavivirus* è costituito da più di 70 virus trasmessi da zecche o da zanzare, in grado di causare malattia nell'uomo e negli animali.

I *Flavivirus*, rispetto ad altri membri della famiglia *Flaviviridae*, sono maggiormente sensibili al calore e possono essere inattivati già a 40°C, sono labili a pH 3 e stabili a pH compresi tra 7 e 9.

Tre proteine strutturali costituiscono i loro virioni:

- Glicoproteina dell'envelope E: che permette l'adesione del virus alle cellule e contiene i determinanti antigenici tipo-specifici e sierogruppo-specifici che inducono la formazione di anticorpi neutralizzanti;
- Proteina di membrana M: non glicosilata, associata all'envelope, responsabile dei legami fra nucleocapside ed envelope (Castrucci, 1992) e stimolante anch'essa la produzione di anticorpi neutralizzanti (Farina e Scatozza, 1998);
- Proteina capsidica C: che rappresenta l'antigene comune del genere.

Nel virione, come si evince dalla figura N.2, sono poi presenti sette proteine non strutturali (NS), che intervengono, in vario modo, nella replicazione virale (espressione delle proteine, assemblaggio e rilascio delle particelle virali) e nell'elusione del sistema immunitario dell'ospite.

Figura N.2: Genoma *Flavivirus*.

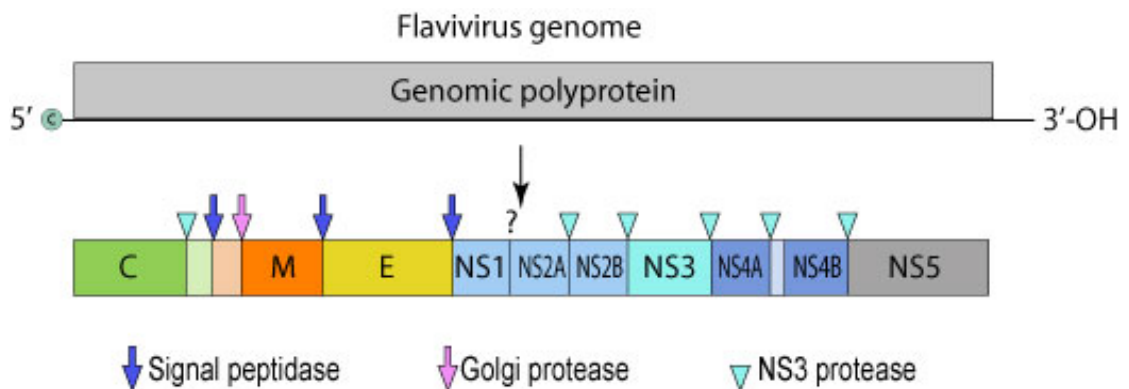


Immagine tratta dal sito Internet: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/43.html

In particolare la proteina NS1 è implicata nella replicazione virale, nella regolazione della risposta immunitaria innata ed è in grado di impedire l'attivazione del TLR3 (Wilson et al, 2008); la NS2A sembra coinvolta nell'assemblaggio del capsid e inibisce la trascrizione e l'espressione di INF-beta (Liu et al, 2004); la NS2B è un cofattore richiesto per la funzione di serina proteinasi della NS3; la NS3 presenta tre attività enzimatiche: serina proteinasi, NTPasi e RNA elicasi (lega l'RNA e snoda il dsRNA in direzione 3'-5'); la NS4 svolge un ruolo nella replicazione inducendo riarrangiamenti della membrana reticolo endoplasmatica dell'ospite volti alla formazione di vescicole di membrana virus indotte, contenenti dsRNA e polimerasi; la NS4A sembra regolare l'attività ATPasi della NS3 elicasi; la NS4B previene l'azione antivirale cellulare, mediante il blocco della produzione di interferone (INF) alfa e beta (Fonte Internet: <http://www.uniprot.org/uniprot/P06935>); la NS5 (Laurent-Rolle et al, 2010; Munoz-Jordan et al, 2005), oltre ad avere un ruolo importante nella replicazione virale, contribuisce a prevenire l'azione antivirale cellulare da parte dell'INF.

Almeno 30 specie di Flavivirus sono in grado di causare nell'uomo malattie, classificabili in tre gruppi principali: sindromi febbrili ed

encefaliti; epatite ed esantemi fugaci di natura congestizia; febbri emorragiche.

In base al tipo di vettore biologico coinvolto nella trasmissione, si distinguono flavivirusi trasmesse da zanzare, trasmesse da zecche e trasmesse da vettore sconosciuto.

3. FLAVIVIROSI TRASMESSE DA ZANZARE:

Tra i *Flavivirus* trasmessi da zanzare troviamo (Thiel et al, 2005):

- Calbertado virus;
- Virus del gruppo Aroa:
 - Aroa virus (AROAV);
- Virus del gruppo Dengue:
 - Dengue virus (DENV);
- Kedougou virus (KEDV);
- Virus del gruppo encefalite giapponese:
 - Cacipacore virus (CPCV);
 - Koutango virus (KOUV);
 - Japanese encefalite virus (JEV);
 - Murray Valley encefalite virus (MVEV);
 - Virus dell'encefalite di Saint Louis (SLEV);
 - Usutu virus (USUV);
 - West Nile virus (WNV);
 - Yaounde virus (YAOV);

- Virus del gruppo Kokobera:
 - Kokobera virus (KOKV);

- Virus del gruppo Ntaya:
 - Bagaza virus (BAGV);
 - Ilheus virus (ILHV);
 - Israel turkey meningoencephalomyelitis virus (ITV);
 - Ntaya virus (NTAV);
 - Tembusus virus (TMUV);

- Virus del gruppo Spondweni:
 - Zika virus (ZIKV);

- Virus del gruppo Yellow fever:
 - Banzi virus (BANV);
 - Bouboni virus (BOUV);
 - Edge Hill virus (EHV);
 - Jugra virus (JUGV);
 - Saboya virus (SABV);
 - Sepik virus (SEPV);
 - Uganda S virus (UGSV);
 - Wesselsbron virus (WESSV);
 - Yellow fever virus (YFV).

In relazione alle finalità di questa tesi si forniscono di seguito informazioni sulle due flavivirus trasmessi da zanzare più importanti nel contesto epidemiologico italiano: Encefalite West Nile e Infezione da Virus Usutu.

3.1. ENCEFALITE WEST NILE

3.1.1. DEFINIZIONE

L'encefalite West Nile o *West Nile Disease* (WND), nota anche come Febbre o Malattia del Nilo Occidentale, è una malattia infettiva a trasmissione vettoriale causata da West Nile Virus (WNV) (Fonte Internet: <http://www.cesmet.com/it/malattia-febbre-da-west-nile-virus>).

Questa malattia è inserita nella lista della *World Organisation for Animal Health* (OIE) fra le malattie che interessano più specie animali.

La malattia si perpetua in natura mediante cicli di trasmissione che coinvolgono principalmente zanzare e volatili.

Uomo e altri mammiferi domestici e selvatici possono fungere da ospiti accidentali del virus.

3.1.2. STORIA E DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

WNV fu isolato per la prima volta nel 1937 in Uganda nel distretto West Nile, dal sangue di una donna e successivamente, negli anni '50, durante casi sporadici di infezione nell'uomo e nel cavallo in Africa e in Medio Oriente (Zeheder et al, 2011).

In particolare nel 1950 fu isolato in Egitto da uomini, zanzare, uccelli e nel 1957 provocò casi di meningoencefalite nell'uomo in Israele.

WNV è l'arbovirus più diffuso al mondo essendo stato identificato in Africa, Europa, Asia, Australia e America, a seguito di una grande epidemia scoppiata a New York nel 1999 (Lanciotti et al, 1999), che coinvolse uomini, cavalli e uccelli, in particolare corvidi.

Non si è mai chiarito come il virus sia giunto in America, ma sembra che l'infezione sia arrivata dal Medio Oriente, in quanto il ceppo virale NY99 risultò molto simile a quelli isolati in Israele (Giladi et al, 2001).

Il virus si è stabilito in Europa a partire dal 1996 (Tsai et al, 1998), in Romania, anche se va precisato che già nel 1962 fu segnalata la sua presenza nel cavallo in Camargue (Francia) (Murgue et al, 2001), dove si contarono più di 500 casi di infezione, con mortalità del 10%, per lo più in soggetti anziani. Dal 1996 l'infezione è stata segnalata in cavalli e uomini in tutti i paesi, dell'est e dell'ovest, dell'Europa.

In Italia WNV è stato segnalato per la prima volta in Toscana nel 1998 durante il periodo agosto-ottobre, in un'area vicina al padule di Fucecchio. L'infezione coinvolse 14 cavalli, 6 dei quali morirono.

I cavalli colpiti mostravano segni clinici di varia gravità caratterizzati da atassia, paralisi degli arti posteriori, tetraplegia e decubito permanente.

Durante quel focolaio non furono osservati casi di infezione nell'uomo (Cantile et al, 2000).

Nel 2000 il virus è ricomparso in Camargue e si sono poi susseguiti, in questa zona, tre focolai di infezione nel 2003, 2004 e 2006.

In America, nel 2002, si diffuse un nuovo genotipo virale che sostituì il NY99 e che, nel 2003, provocò l'epidemia mondiale più grande di WNV osservata nell'uomo (9858 casi accertati, dei quali ben 262 mortali).

WNV si è diffuso in tutti gli USA e successivamente è stato segnalato in Canada, Messico, Centro America, Caraibi e Argentina.

La Russia è stata colpita dall'infezione a partire dal 1999, anno in cui furono segnalati circa 1000 casi nell'uomo, nelle regioni di Astrakham, Krasnodar e Volgograd (Platonov et al, 2008; Fonte Internet: <http://www.episouthnetwork.org/sites/default/files/outputs/notewestnilepisouth201020112012june2013.pdf>).

Uomini e cavalli sono stati colpiti dal virus periodicamente in Algeria nel 1994, in Tunisia nel 1997, in Marocco nel 1996 e 2003 e in Israele dal 1997 al 2000.

Dal 2003 WNV si è diffuso anche in Ungheria (Bakonyi et al, 2013;).

Nel 2007 il virus è stato isolato in Spagna da aquile (Zehender et al, 2011) e nello stesso anno è arrivato anche in Grecia (Engler et al, 2013).

Il virus è riapparso in Italia nell'estate del 2008 in cavalli e volatili a Ferrara e in seguito si manifestarono pure quattro casi di encefalite nell'uomo (Rizzo et al, 2014).

Alla fine del 2008, i focolai italiani furono 184 localizzati nelle province di Ferrara, Ravenna, Bologna, Modena, Rovigo, Mantova, Padova e Venezia.

Nel 2010, focolai di infezione sono stati segnalati nelle province di Trapani, Campobasso, Bologna e Venezia in cavalli, di Modena in una ghiandaia, di Rovigo, Modena e Venezia in zanzare e in Veneto nell'uomo.

In Turchia il virus fu isolato nel 2010 e nel 2011, confermando che l'infezione era presente allo stato endemico nel paese (Kalaycioglu et al, 2012).

Nell'ottobre del 2010, WNV ha poi fatto la sua prima comparsa in Bulgaria, in cinque asini e tre cavalli, e si è poi manifestato nell'uomo nel 2012 (Fonte Internet: http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/west-nile-fevermaps/pages/historical-data.aspx).

Negli anni 2010, 2011 e 2012 WNV fu isolato in Albania (Berxholi et al, 2013).

In Ucraina, venti casi clinici umani di WNV si sono manifestati tra il 2011 e il 2012 (Fonte Internet:

<http://www.episouthnetwork.org/sites/default/files/outputs/notewestnileepisouth201020112012june2013.pdf>); nel 2013 si è rilevato un ulteriore caso presso

Zhytomyrs'ka oblast (Fonte Internet:

http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-

fevermaps/Pages/historical-data.aspx).

Nel 2012 e 2013 l'infezione è stata segnalata in diversi paesi balcanici (Croazia, Serbia, Montenegro, Kosovo, Macedonia e Bosnia-Herzegovina) (Lupulovic et al, 2011, Fonte Internet:

<http://www.episouthnetwork.org/sites/default/files/outputs/notewestnileepisouth201020112012june2013.pdf>; Petrovic et al., 2013).

Negli stessi anni (2010-2014) il virus è stato rilevato anche in Israele (Anis et al, 2014).

WNV è stato nuovamente individuato in Italia: nel 2011 in Veneto e Sicilia, nel 2012 in Friuli-Venezia Giulia, Basilicata, Lazio (Di Sabatino et al, 2014), Sardegna e Veneto (Engler et al, 2013) e nel 2013 in Emilia Romagna, Lombardia, Veneto, Calabria, Sardegna e Sicilia (Di Sabatino et al, 2014).

Il 24 novembre 2014 è stato pubblicato dall'ECDC l'aggiornamento sulla situazione epidemiologica in Europa dal quale risulta che, a partire dal 13 giugno 2014, si sono manifestati un totale di 74 casi umani così ripartiti:

- 24 Italia;
- 23 Romania
- 15 Grecia;
- 11 Ungheria;
- 1 Austria

Nel 2014 l'infezione ha circolato anche nei seguenti paesi: Palestina, Israele (17 casi), Bosnia-Herzegovina (13 casi), Serbia (76 casi) e Federazione Russa (29 casi).

Nell'elenco che segue sono state ordinate cronologicamente le segnalazioni nei diversi paesi:

- Uganda: 1937;
- Egitto: 1950, 1951;

- Israele: 1957, 1997-2000, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014;
- Francia: 1962, 2004, 2012;
- Portogallo: 1971, 2004, 2010;
- Etiopia: 1976;
- Marocco: 1996, 2003;
- Romaniaa: 1996, 2007, 2008, 2009, 2010, 2012, 2013, 2014;
- Tunisia: 1997, 2010, 2012, 2013;
- Kenya: 1998;
- Italia: 1998, 2008, 2009, 2010, 2014;
- USA: 1999, 2000, 2002, 2003;
- Russia: 1999, 2000, 2007, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014;
- Cina: 2001;
- Ungheria: 2003, 2004, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014;
- Messico: 2004;
- Spagna: 2007, 2010, 2013;
- Grecia: 2007, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014;
- Austria: 2008, 2009, 2014;
- Serbia: 2009, 2010, 2012, 2013, 2014;
- Albania: 2010, 2011, 2012;
- Bosnia-Herzegovina: 2012, 2013, 2014.

In altri paesi Europei come Regno Unito, Germania e Svizzera (dove, per la vicinanza con l'Italia, è stato messo in atto un programma di sorveglianza epidemiologica sulle zanzare) non è mai stato isolato WNV (Engler et al, 2013).

Dal 31 ottobre 2014 non sono stati più segnalati casi (http://ecdc.europa.eu/en/press/news/_layouts/forms/News_DispForm.aspx?List=8db7286c-fe2d-476c-9133-18ff4cb1b568&ID=1123).

Figura N.3: Casi di WNV nel Bacino Mediterraneo e in Europa.

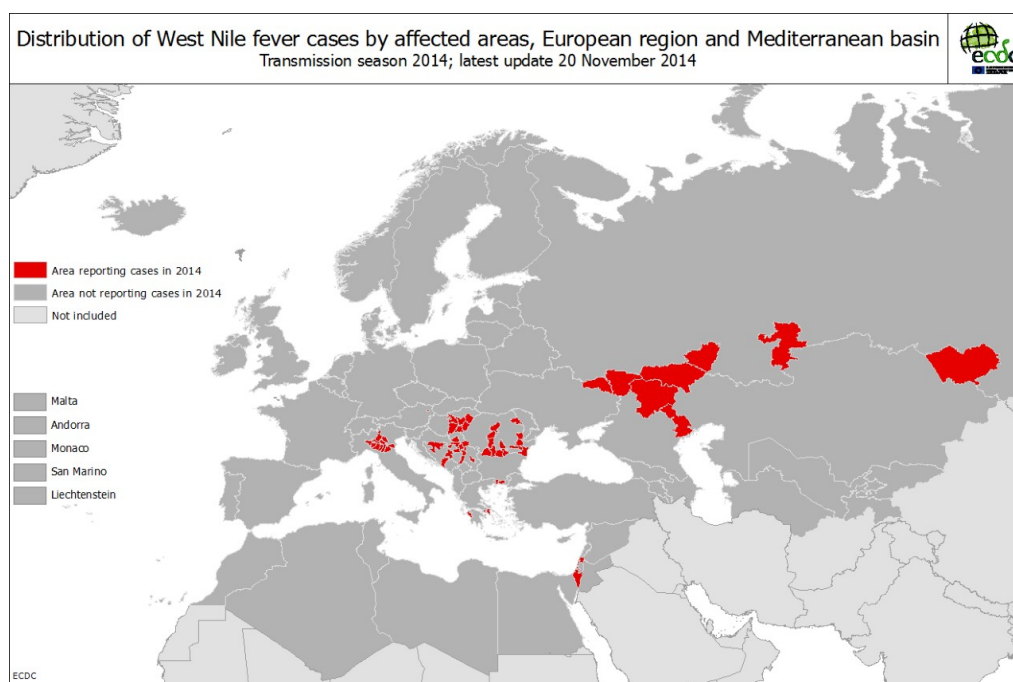


Immagine tratta dal sito dell'ECDC, 2014:

http://ecdc.europa.eu/en/press/news/_layouts/forms/News_DispForm.aspx?List=8db7286c-fe2d-476c-9133-18ff4cb1b568&ID=1123

3.1.3. EZIOLOGIA

WNV è il *Flavivirus* più diffuso del gruppo dell'Encefalite Giapponese (Bakonyi et al, 2006).

Il virus presenta le caratteristiche generali del genere *Flavivirus*.

Dal punto di vista genetico il virus è piuttosto variabile e sono stati individuati otto genotipi dei quali i più importanti sono i genotipi 1 e 2 responsabili di infezione nell'uomo e nel cavallo.

Nel genotipo 1 ritroviamo gli stipiti responsabili dei primi focolai scoppiati in Europa, Africa, Medio Oriente, Asia, Oceania e Nord America; nel genotipo 2 ritroviamo gli stipiti di origine africana (Donadieu et al, 2013).

Tutti gli stipiti appartenenti al genotipo 1 presentano le proteine

dell'envelope glicosilate.

Tale caratteristica contribuisce a rendere questi stipiti molto virulenti come confermato sperimentalmente in studi condotti su modelli murini.

Basse cariche virali del ceppo NY99, inoculate nel circolo periferico di topini, ne determinano la morte per encefalite nell'arco delle 12 ore post-infezione (Borisevich et al, 2006).

I virus appartenenti al genotipo 1 si possono suddividere in ulteriori tre cluster (Berthet et al, 1997; Scherret et al, 2002):

- al primo appartengono i ceppi di WNV isolati in Africa, Medio Oriente, Europa e Nord America;
- nel secondo sono raggruppati i ceppi di Kunjin virus (sottotipo di WNV) isolati in Australia;
- del terzo fanno parte i ceppi di WNV isolati in India.

Il genotipo 2 viene considerato meno patogeno per l'uomo rispetto al genotipo 1, tuttavia il suo isolamento da volatili morti in Ungheria nel 2004 ha messo in luce la capacità dei ceppi di questo genotipo di diffondersi al di fuori dell'Africa e di accrescere la loro virulenza per i vertebrati. Più recentemente è emerso che il genotipo 2 è stato il responsabile di numerosi focolai di infezione che hanno coinvolto uomini e cavalli sia in Sud Africa che nell'Europa dell'Est e meridionale (Donadieu et al, 2013).

Lo spettro d'ospite in vivo è molto ampio: WNV è capace di infettare diversi tipi di vertebrati, tra cui mammiferi, volatili (migratori e non), e rettili (Fonte Internet:

http://www.izsler.it/izs_home_page/archivio_news/00000020_Informativa_West_Nile.html), ragion per cui si è diffuso in tutto il mondo.

Si considera che il virus sia in grado di infettare circa 180 specie di volatili, 30 specie di mammiferi, almeno 2 specie di rettili e una grande varietà di specie di zanzare.

WNV si replica su cellule di mammiferi e insetti e sulla linea cellulare Vero provocando effetto citopatico.

Figura N.4: Cellula infettata da WNV.

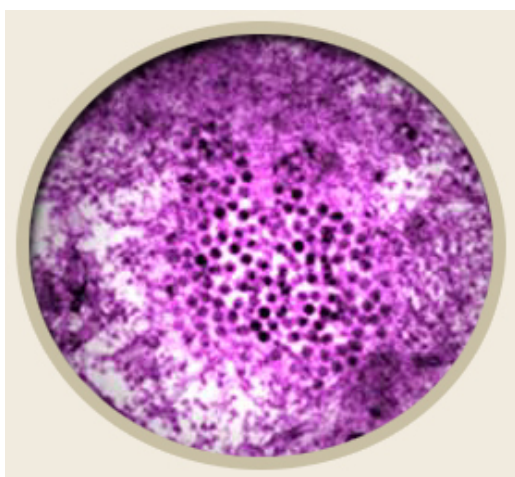


Immagine tratta dal sito: All Natural Pet Care

3.1.4. EPIDEMIOLOGIA

Il ciclo di trasmissione di WNV coinvolge artropodi e vertebrati (figura 5). Negli artropodi, che rappresentano i vettori biologici, la trasmissione può avvenire sia per via transovarica che transtadiale.

L'uomo è coinvolto dall'infezione solo accidentalmente (Castrucci et al, 1992).

In Europa, il ciclo di trasmissione di WNV interessa due principali ecosistemi: rurale/selvatico che coinvolge uccelli selvatici e zanzare ornitofile nelle zone umido-paludose; sinantropico/urbano, che coinvolge uccelli sinantropici o domestici e zanzare che effettuano il pasto di sangue

sia sugli uccelli che sull'uomo e che per questo vengono definite "vettori ponte".

Figura N.5: Ciclo di trasmissione di WNV.

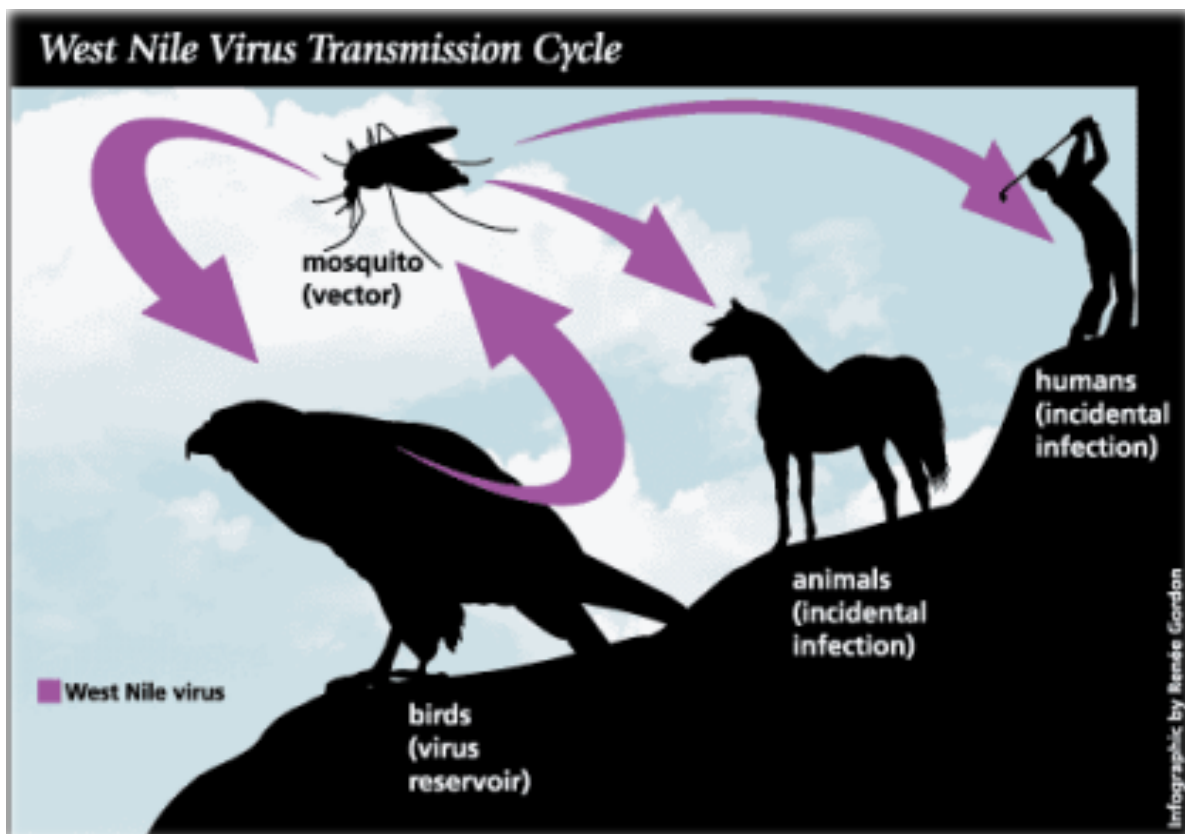


Immagine tratta dal sito Internet : www.izsler.it

Le specie di zanzare coinvolte nel ciclo di trasmissione del virus sono diverse: *Culex* e *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Coquilletidia*, *Mansonia* e *Mimomyia*.

In Europa e in Africa sono principalmente coinvolte *Culex pipiens*, *Culex univittatus*, *Culex antennatus* e *Culex modestus*.

Le femmine di zanzara si infettano durante il pasto di sangue su un ospite vertebrato infetto. Intercorso un periodo di circa 10-14 giorni, WNV si localizza nelle ghiandole salivari della zanzara, la quale, effettuando un nuovo pasto di sangue, trasmette il virus con la saliva.

Nelle zanzare il virus persiste per tutta la durata della loro vita e può localizzarsi anche in ovaie, intestino, sistema nervoso (Girard et al, 2004), tubuli malpighiani e ommatidi (Jiang et al, 2014).

Fra gli ospiti vertebrati i volatili giocano un ruolo importante nella trasmissione di WNV, essendo ospiti amplificatori (Hamer et al, 2008).

Il virus è in grado di colpire numerose specie di uccelli, sia domestici che selvatici; passeriformi come gazze, corvi, ghiandaie, passeri, fringuelli e merli sono tra le specie maggiormente coinvolte nel mantenimento dell'infezione.

Vari uccelli selvatici, pur rimanendo asintomatici, sviluppano una viremia elevata e protratta.

Alcuni volatili predatori possono infettarsi ingerendo prede infette e per questo WNV può essere isolato (da questi uccelli) anche in periodi dell'anno in cui le zanzare non sono attive.

Uomini, cavalli e altri mammiferi si infettano, ma fungono da ospiti accidentali del virus, poiché sviluppano una viremia di breve durata e pertanto hanno poche probabilità di trasmettere il virus alle zanzare. Per questo vengono anche definiti ospiti a fondo cieco (Bowen et al, 2007).

Persino i rettili, come alligatori (Klenk et al, 2004) e coccodrilli (Steinman et al, 2003), e gli anfibi possono essere infettati (Klenk et al, 2003).

La trasmissione da uomo a uomo può avvenire soltanto nel caso in cui siano eseguite trasfusioni con sangue infetto (Pealer et al, 2003) o per trapianto d'organo (Iwamoto et al, 2003). Nel 2008, a seguito dell'epidemia di WNV in Emilia Romagna, il Centro Nazionale Trapianti impose che tutti i potenziali donatori di organi, tessuti e cellule, provenienti dalle province di Bologna e Ferrara, venissero sottoposti ad analisi per escludere la presenza dell'infezione (Fonte Internet:

<http://www.epicentro.iss.it/problemi/westNile/notiziario-22-10-08.asp>).

L'infezione di mammiferi in una determinata area geografica può avvenire solamente se sono presenti specie aviarie amplificatrici e zanzare;

l'introduzione del virus in una nuova area dipende dall'arrivo di uccelli migratori, provenienti da una zona endemica. Tuttavia, il trasporto del virus a lunga distanza potrebbe anche avvenire mediante l'importazione di uccelli viremici o l'introduzione di zanzare infette, tramite container, pneumatici, velivoli, navi, camion, etc.

Le condizioni climatiche influenzano notevolmente la diffusione di WNV: nelle zone a clima tropicale l'infezione rimane presente per tutto l'arco dell'anno; nelle zone a clima temperato, l'infezione si manifesta invece nei periodi in cui le condizioni meteorologiche consentono la diffusione delle zanzare (periodo tarda estate inizio autunno).

3.1.5. PATOGENESI

Una volta inoculato in un ospite vertebrato, il virus penetra nel circolo ematico e si replica in fibroblasti, cellule endoteliali, cellule del sistema reticolare, neuroni e cellule microgliali.

Studi sperimentali suggeriscono che il meccanismo con cui si produce il danno neuronale sia rappresentato dalla morte cellulare per apoptosi virus indotta (McGavin e Zachary, 2010).

WNV è in grado di oltrepassare la barriera ematoencefalica dell'ospite e attaccare i nuclei profondi dell'encefalo, la materia grigia del cervello, il tronco e le corna ventrali del midollo spinale determinando l'insorgenza di poliiencefalomieliti non suppurative.

La capacità di WNV di penetrare nel SNC varia a seconda dello stipite in causa e si distinguono pertanto stipiti (Beasley et al, 2002): altamente, mediamente e lievemente neuroinvasivi.

Il virus arriva al SNC attraverso 3 possibili vie:

- attraversamento della barriera ematoencefalica, mediante leucociti infetti;
- Attraversamento diretto della barriera ematoencefalica, a seguito di compromissione della sua integrità e infezione delle cellule endoteliali dell'encefalo;
- Ingresso attraverso il trasporto assonale retrogrado a seguito dell'infezione del sistema nervoso periferico (Cho e Diamond, 2012; Wang et al, 2008; Samuel et al, 2007; Verma et al, 2009; Samuel et al, 2006; McCandless et al, 2008).

Di queste tre ipotesi, le prime due sono quelle scientificamente più supportate.

3.1.5.1. CAVALLO

A seguito dell'inoculazione cutanea del virus, attraverso la puntura di una zanzara infetta, la replicazione virale si avvia a partire dai tessuti locali e dai linfonodi regionali, raggiungendo in seguito la circolazione sistemica, tramite i vasi linfatici del sistema reticolo-endoteliale (Deubel et al, 2001; Petersen et al, 2003; Castillo-Olivares e Wood, 2004; Zeller e Schuffenecker, 2004).

L'infezione è seguita da una viremia di breve durata che consente al WNV di diffondere verso i tessuti extraneurali e che, probabilmente, precede l'invasione del sistema nervoso e la comparsa di segni clinici specifici (Castillo-Olivares e Wood, 2004).

La viremia non supera le 10^3 pfu/mL di siero e questo titolo è inferiore a quello minimo necessario a trasmettere il virus alle zanzare, stimato intorno a 10^4 - 10^5 pfu/mL (Komar et al, 2003; Bunning et al, 2002).

La viremia di breve durata e l'insufficiente concentrazione virale nel sangue sono fattori che rendono il cavallo un ospite incapace di diffondere l'infezione.

Nel cavallo, il meccanismo di invasione del tessuto nervoso da parte del virus non è del tutto conosciuto e l'ipotesi più probabile sulle modalità di penetrazione del virus nel SNC è quella della replicazione virale nelle cellule endoteliali e successivamente nel parenchima del SNC (Cantile et al, 2001; Bunning et al, 2002; Castillo-Olivares e Wood 2004; Xiao et al, 2001).

3.1.5.2. VOLATILI

Nonostante l'esatto meccanismo e i siti di replicazione negli uccelli non siano ancora del tutto noti, si suppone che, come nei mammiferi, il virus replichi localmente nel sito di inoculo (cute) e che sia rapidamente trasportato dalle cellule dendritiche di Langherans ai linfonodi drenanti. Qui il virus replica e si osservano la prima viremia e la diffusione agli organi periferici (Samuel e Diamond, 2006; Nemeth et al, 2011).

Generalmente, WNV può essere isolato dal sangue di uccelli infetti circa un giorno dopo l'infezione (Peterson et al, 2003; Weingartl et al, 2004; Senne et al, 2000).

Il picco della viremia si può osservare 2-3 giorni post-infezione in alcuni passeriformi, come corvi e ghiandaie, o 4-5 giorni dopo l'infezione in polli, rapaci e gufi (Swayne et al, 2001; Weingartl et al, 2004; Ziegler et al, 2013); WNV può essere rilevato a partire dai 6-7 giorni post-infezione nel sangue di oche e passeri e dopo 10 giorni in quello dei tacchini (Banet-

Noach et al, 2003; Nemeth (A) et al, 2006; Swayne et al, 2000). Il picco della viremia, inoltre, è più alto nei capi che vanno incontro a morte per la malattia (Langevin et al, 2005).

Il virus è capace di infettare tutti i principali organi periferici e un'ampia varietà di tipologie cellulari. Le cellule target del sistema dei fagociti mononucleari sembrano giocare un ruolo importante nella patogenesi di WNV negli uccelli, poiché il virus replica dentro queste cellule e si diffonde ai vari tessuti (Weingartl et al, 2004; Steele et al, 2000).

Dopo un giorno post-infezione il virus può essere isolato dalla milza dei corvi e il giorno successivo anche dagli altri organi. In questa specie il titolo virale più alto si osserva 4 giorni post-infezione, e decresce dal quinto giorno in poi (Weingartl et al, 2004).

Nei falchi e nelle ghiandaie il titolo virale più alto si ha a 7-8 giorni post-infezione e inizia a decrescere dal giorno 9 (Nemeth (A) et al, 2006; Nemeth (B) et al, 2006; Busquets et al, 2012).

Anche negli uccelli, come nei mammiferi, WNV è in grado di penetrare nel SNC (Wang et al, 2004; McMinn, 1997; Garcia-Tapia et al, 2006, Monath et al, 1983; Samuel et al, 2007). Negli uccelli, il rilevamento del virus tramite l'immunoistochimica nelle cellule endoteliali e la presenza di infiltrati infiammatori perivascolari (Lopes et al, 2007; Wunschmann (A) et al, 2004) potrebbero indicare che WNV raggiunga il SNC attraverso il flusso ematico e infetti le cellule endoteliali (Weingartl et al, 2004).

3.1.6. RISPOSTA IMMUNITARIA

Dopo essere stato inoculato WNV replica inizialmente in cheratinociti, neutrofili e cellule dendritiche, soprattutto cellule di Langherhans (Bai et al, 2010; Welte et al, 2009), che diventano rapidamente cellule capaci di presentare gli antigeni virali (APC) (Byrne et al, 2001).

Le cellule di Langherhans infette e i neutrofili migrano ai linfonodi regionali e passano attraverso i vasi linfatici efferenti per raggiungere il flusso sanguigno. A livello dei linfonodi drenanti, sono poi indotte l'espressione di citochine antivirali e chemochine, l'attivazione del complemento e la presentazione dell'antigene ai linfociti T (Johnston et al, 2000).

Nei tessuti periferici l'infezione e la disseminazione del virus sono limitate dalla risposta immune innata, soprattutto dalla risposta dell'INF di tipo I (Cho e Diamond, 2012; Diamonds e Gale, 2012).

Roditori possono essere protetti da infezioni letali di WNV se pretrattati con INF di tipo I e soggetti naturalmente in deficit di INF tipo I sono più sensibili all'infezione da WNV (Samuel e Diamond, 2005; Morrey et al, 2004).

La disseminazione di WNV è inoltre contrastata da cellule dell'immunità innata e acquisita quali cellule T, gamma e delta, cellule NK, neutrofili, macrofagi e cellule B secernenti IgM (Cho e Diamond, 2012; Bai et al, 2010; Diamond et al, 2003; Shrestha (A e B) et al, 2006).

Le NK non sembrano svolgere un ruolo importante, mentre le cellule T, gamma e delta, aumentano significativamente a seguito dell'infezione da WNV e producono elevati livelli di INF-gamma, risultando indispensabili per controllare la replicazione e la disseminazione del virus (Wang et al, 2003; Arjona et al, 2011; Shrestha (A e B) et al, 2006). Inoltre le cellule T, gamma e delta favoriscono la maturazione di APC (Fang et al, 2010).

I macrofagi sono a tutti gli effetti APC e promuovono la proliferazione di cellule T specifiche per il WNV (Kulkarni et al, 1991) e la produzione di ROI (Reactive Oxygen Intermediates), come ossido nitrico, che sono in grado di inibire la replicazione del virus (Lin et al, 1997; Saxena et al, 2000).

3.1.7. ASPETTI ANATOMO- CLINICI

L'infezione nei vertebrati è caratterizzata da un periodo di incubazione variabile, di pochi giorni, e dalla comparsa di uno stato viremico di breve durata; organi bersaglio e patogenesi dell'infezione risultano variabili e l'infezione può rimanere silente nell'ospite o evolvere in diverse forme cliniche (Castrucci et al,1992).

Le infezioni inapparenti sono le più frequenti; quando la malattia si manifesta, la sintomatologia prevalente è quella di tipo neurologico.

3.1.7.1. CAVALLO

Nel cavallo, l'infezione decorre solitamente in forma asintomatica, eccetto che in una bassa percentuale di casi (circa il 10%), nei quali si osserva, dopo un periodo d'incubazione molto variabile (dai 3 ai 15 giorni circa), l'insorgenza di una sintomatologia febbrile che può risolversi spontaneamente o evolvere in un quadro clinico più grave, caratterizzato da deficit neurologici di varia entità a carico dell'encefalo e/o del midollo spinale (Santi et al, 2012).

La sintomatologia neurologica è riferibile a una sindrome midollare acuta o subacuta, coinvolgente per lo più il tratto toraco-lombare, e nelle sue manifestazioni riflette la distribuzione delle lesioni a livello del SNC (Cantile et al, 2000; Cantile et al, 2001; Castillo- Olivares e Wood, 2004).

Talvolta la sintomatologia neurologica può progredire fino a determinare una paresi progressiva, con decubito permanente dell'animale.

La gravità dei segni clinici dipende da carica infettante, area del SNC colpita e risposta immunitaria del soggetto. In alcuni casi la sintomatologia è modesta e transitoria, con completa remissione dei sintomi in 5-7 giorni, e recupero totale o parziale delle capacità motorie.

Una significativa percentuale di cavalli colpiti guarisce spontaneamente. Il tasso di letalità è mediamente compreso tra il 30% e il 40%, come osservato nelle epidemie che colpiscono gli Stati Uniti e la Francia (Long, 2007; Castillo-Olivares e Wood, 2004).

Nelle prime fasi della malattia si osservano febbre, abbattimento, disoressia e sintomatologia colica.

Questi segni clinici possono esaurirsi o evolvere verso una sindrome clinica neurologica.

A differenza di quanto accade per altre encefaliti virali del cavallo, la WND produce sintomi che riflettono maggiormente il coinvolgimento del midollo spinale.

I segni neurologici di più frequente riscontro sono le alterazioni dell'andatura, caratterizzata da movimenti esagerati, iper o ipometrici, incespicamento, dorsoflessione spontanea del piede, evidenti soprattutto durante i cambi di direzione. L'ataxia può essere accompagnata da diversi gradi di paresi e interessare solo gli arti posteriori o tutti e quattro gli arti. Non è infrequente osservare casi caratterizzati da una lateralizzazione anche marcata dei deficit locomotori (Santi et al, 2012).

Altri segni neurologici sono fascicolazioni, tremori muscolari e alterazioni del comportamento, consistenti in irrequietezza, digrignamento dei denti e iperreattività ai rumori e agli stimoli tattili, fino all'assunzione di comportamenti manifestamente aggressivi (Cantile et al, 2000; Long 2007).

Nelle epidemie che hanno colpito il Nord America, circa un terzo dei soggetti sintomatici ha sviluppato una sintomatologia molto grave e mortale, caratterizzata da incapacità a mantenere la stazione, paralisi, segni di disfunzione vestibolare e deficit dei nervi cranici (paresi/paralisi del facciale, disfagia, paralisi della lingua) (Ostlund et al, 2001).

Il decubito permanente del soggetto nella quasi totalità dei casi porta a morte l'animale (Long et al, 2002; Weese et al, 2003; Ward et al, 2006).

La malattia deve essere differenziata dalle altre malattie a decorso

progressivo e con una localizzazione al SNC, con particolare interessamento del midollo spinale, del romboencefalo e del mesencefalo (Cantile et al, 2000; Castillo-Olivares e Wood, 2004).

La presenza di un cavallo con sintomatologia neurologica in associazione a fattori epidemiologici quali l'infestazione di zanzare, la stagione tardo-estiva, il verificarsi di casi clinici simili in aree limitrofe e un eventuale riscontro di mortalità anomale negli uccelli selvatici, inducono a ipotizzare la responsabilità del WNV.

Tra le malattie di natura infettiva devono essere, di norma, considerate in diagnosi differenziale:

- mielopatia da Herpesvirus (EHV-1),
- encefaliti equine sostenute da Alfa-Virus (Encefalite equina dell'est, Encefalite equina dell'ovest, Encefalite equine venezuelana),
- mieloencefalite protozoaria equina (EPM),
- rabbia,
- botulismo,
- mieliti batteriche o micotiche,
- meningoencefalomielite verminosa (Long et al., 2002).

Tra le forme non infettive si devono considerare:

- ipocalcemia,
- neoplasie,
- intossicazione con sostanze tremorigeniche,
- encefalopatia epatica,
- leucoencefalomalacia.

Nella situazione epidemiologica italiana, appare evidente che la rilevazione di alcune malattie presenti in questo elenco è piuttosto improbabile: infatti,

patologie come le encefaliti da alfa virus e l'EPM sono malattie esotiche non presenti in Italia. Inoltre queste malattie (a eccezione dell'EPM) producono segni clinici di origine marcatamente intracranica, gravi e rapidamente progressivi abbastanza diversi da quelli osservati in corso di WND.

Tra le patologie a localizzazione spinale, si devono considerare anche malattie degenerative strutturali, come la Mielopatia Stenotica Cervicale, meglio conosciuta come sindrome Wobbler e, in misura meno rilevante, malattie degenerative del midollo spinale, come la Mieloencefalopatia Degenerativa Equina (Salvadori et al, 2007).

Nel singolo soggetto anche lesioni traumatiche e vascolari a carico del SNC, in presenza di manifestazioni cliniche a esordio acuto e non progressivo, caratterizzate da uno spontaneo miglioramento della sintomatologia, devono essere incluse nella diagnosi differenziale (Santi et al, 2012).

Per quanto riguarda gli aspetti anatomo-patologici, nel cavallo le lesioni macroscopiche riguardano la sostanza grigia con iperemia, petecchie ed emorragie, soprattutto nel tronco encefalico più caudale e nelle corna ventrali del midollo spinale toraco-lombare.

Le lesioni istologiche nei cavalli deceduti a seguito della malattia sono caratterizzate da encefalomyelitis non suppurativa (linfocitaria/istiocitaria) con manicotti perivascolari di linfociti e macrofagi e da emorragie nel SNC di variabile gravità (McGavin e Zachary, 2010).

3.1.7.2. VOLATILI

Nonostante l'infezione, raramente il virus è capace di provocare la morte di questi ospiti; tuttavia nel corso dell'epidemia statunitense WNV fu causa di una grave malattia a carattere neurologico che portò a morte numerosi

soggetti appartenenti a diverse specie aviarie.

In particolare, nei corvidi fu osservata una forma di malattia caratterizzata da lesioni viscerali in assenza di encefalite

La sintomatologia negli uccelli comprende: abbattimento generale, decubito sternale, atassia, tremori, opistotono, movimenti di circolo, convulsioni, anoressia, penne arruffate, disidratazione.

In più del 60% delle infezioni sono presenti convulsioni, nel 30% dei casi si osservano atassia, postura scorretta della testa e movimenti del capo, mentre nel 20 % dei soggetti colpiti compaiono tremori, incordinazione delle ali, paresi e disorientamento (Steele et al, 2000; Fitzgerald et al, 2003; D'Agostino e Isaza, 2004; Wunschmann (A) et al, 2004).

Non è infrequente che rapaci e ghiandaie manifestino difetti della vista e cecità (Wunschmann (B) et al, 2004; Wunschmann et al, 2005).

Negli uccelli più longevi, come i rapaci, si possono ripresentare, anche a distanza di alcuni anni, sintomatologia nervosa e anormalità del piumaggio e della muta, (Nemeth (A) et al, 2006; Nemeth et al, 2009).

Per quanto riguarda gli aspetti anatomo-patologici, negli uccelli non si osservano lesioni macroscopiche patognominiche. Volatili poco suscettibili all'infezione, come i polli, possono non presentare alterazioni macroscopiche (Senne et al, 2000). In specie molto suscettibili, come corvi e ghiandaie si possono osservare (Wunschmann et al (A), 2004; Bertelsen et al, 2004; Lopes et al, 2007): emaciazione, disidratazione, emorragie multiorganiche, splenomegalia, epatomegalia, pallore miocardico e chiazze chiare su fegato, milza e reni. Nei rapaci si possono osservare atrofia cerebrale e encefalomalacia (Nemeth(A) et al, 2006; Steele et al, 2000; Wunschmann et al, 2005).

Le lesioni microscopiche più frequentemente osservate in SNC, cuore, fegato, milza e reni sono caratterizzate da infiltrati linfoplasmacellulari e istiocitari, degenerazione e necrosi cellulare ed emorragie. Le alterazioni patologiche possono essere conseguenza diretta del danno indotto dal virus

o secondarie alla risposta infiammatoria dell'ospite (Chambers e Diamond, 2003; Lim et al, 2011; Pauli et al, 2007).

In falchi infetti sono stati osservati fenomeni di mineralizzazione e necrosi delle cellule della retina e alterazioni nello strato di cellule epiteliali pigmentate della retina, a causa della presenza di infiltrati infiammatori (Pauli et al, 2007).

In volatili dell'ordine di Psittaciformi e Strigiformi possono essere rilevati infiltrati infiammatori su congiuntiva, iride, retina e coroide (Gancz et al, 2006; Stockman et al, 2010).

Le lesioni a carico del SNP sono state rilevate e studiate in rapaci e gufi (Ellis et al, 2007). Fenomeni infiammatori si rilevano solitamente a carico del nervo sciatico e nei gangli mienterico, proventricolare e ventricolare.

Le lesioni più frequentemente riscontrate a livello cardiaco sono: miocarditi linfoplasmacellulari e istiocitarie con necrosi miocardica, degenerazione, mineralizzazione, fibrosi ed emorragie.

In ghiandaie azzurre e gheppi americani sono state rilevate vasculiti (Nemeth (A) et al, 2006; Gibbs et al, 2005).

La milza e gli altri organi linfatici presentano spesso lesioni importanti quali necrosi linfoide o apoptosi con deposito di fibrina ed emosiderina.

Fenomeni necrotici possono essere rilevati anche nelle cellule linfatiche timiche e bursali (Ellis et al, 2007; Himsworth et al, 2009).

A livello epatico le lesioni maggiormente osservate sono: epatite linfoplasmacellulare e istiocitaria, necrosi epatica coagulativa, fenomeni emorragici e iperplasia dei dotti biliari (Erdelyi et al, 2007; Gibbs et al, 2005; Steele et al, 2000).

A livello dei reni si rilevano nefriti interstiziali, linfoplasmacellulari e istiocitarie, e degenerazione e necrosi delle cellule dell'epitelio tubulare. Fenomeni di degenerazione e necrosi delle cellule glomerulari si osservano per lo più in specie appartenenti all'ordine degli Psittaciformi e Strigiformi

(Palmieri et al, 2011; Gancz et al, 2006); inoltre sono state rilevate lesioni emorragiche nelle papere (Himsworth et al, 2009).

Oltre a queste lesioni, i volatili possono manifestare alterazioni virus indotte anche a livello di: tratto gastroenterico, sistema endocrino, cute, gonadi, muscoli scheletrici e midollo osseo (Gamino e Hofle, 2013).

3.1.7.3. UOMO

Nell'uomo per lo più l'infezione decorre in forma subclinica o asintomatica, con una sintomatologia simil-influenzale, o in forma grave.

Il periodo di incubazione varia dai 2 ai 14 giorni, ma può arrivare anche ai 21 giorni.

Fra i casi sintomatici circa il 20% presenta : febbre, cefalea, nausea, vomito, linfonodi ingrossati.

Questi sintomi durano generalmente pochi giorni, anche se in rari casi possono protrarsi per qualche settimana (Fonte Internet: <http://www.epicentro.iss.it/problemi/westNile/notiziario-22-10-08.asp>).

La sintomatologia varia fortemente a seconda dell'età della persona: nei bambini è più frequente una febbre leggera; nei giovani la sintomatologia è caratterizzata da febbre mediamente alta, arrossamento degli occhi, cefalea e dolori muscolari; negli anziani e nelle persone debilitate, che sono le più sensibili all'infezione, la sintomatologia può essere più grave.

I sintomi più gravi si presentano in media in meno dell'1% delle persone infette (1 persona su 150) e comprendono: ipertermia, cefalea, debolezza muscolare, disorientamento, tremori, disturbi della vista, torpore, convulsioni, fino alla paralisi e al coma.

Alcune lesioni neurologiche possono essere talmente gravi da provocare danni permanenti.

Raramente, nei casi più gravi (circa 1 su mille), il virus può causare

un'encefalite letale (Fonte Internet:

<http://www.epicentro.iss.it/problemi/westNile/notiziario-22-10-08.asp>).

3.1.9. DIAGNOSI DI LABORATORIO

La diagnosi di WND è basata principalmente su: isolamento e identificazione del virus, indagini anatomopatologiche e immunoistochimiche, indagini sierologiche.

3.1.9.1. DIAGNOSI VIROLOGICA

Le tecniche diagnostiche di isolamento e identificazione sono essenziali per poter valutare e confermare la circolazione del virus in una determinata area.

Per lo più l'isolamento virale è ottenuto dalla semina di materiale patologico su cellule della linea Vero.

Nel cavallo è possibile isolare il virus a partire da liquido cefalo-rachidiano, midollo spinale e cervello.

L'isolamento del virus dal sangue è difficile ma possibile durante la breve fase viremica.

Negli uccelli il virus è stato isolato da: SNC; cuore; fegato; milza; reni; intestino; sangue.

La conferma diagnostica si ottiene generalmente mediante neutralizzazione virale o immunofluorescenza, utilizzando anticorpi monoclonali capaci di differenziare WNV dagli altri *Flavivirus*.

L'immunoistochimica, con l'uso di anticorpi monoclonali, è piuttosto efficace per eseguire la diagnosi post-mortem: infatti, permette di rilevare

la presenza di antigeni virali nel SNC, sia negli animali che nell'uomo, persino in tessuti fissati in formalina.

La presenza di antigeni virali può essere svelata anche dall'impiego di un test ELISA nei tessuti di volatili e in pool di zanzare.

RT-PCR o Real Time sono tecniche molto efficienti, impiegate per la ricerca del genoma virale su tessuti animali e pool di zanzare.

3.1.9.2. DIAGNOSI SIEROLOGICA

Le tecniche principalmente impiegate sono: la sieroneutralizzazione, l'inibizione dell'emoagglutinazione, la fissazione del complemento e il test ELISA per la ricerca di IgM ed IgG.

In particolare l'ELISA-IgM permette di individuare casi di infezione recente con una buona attendibilità, in quanto le IgM compaiono recentemente dopo l'infezione e possono persistere fino a tre mesi post-infezione (nel cavallo).

L'ELISA-IgG è utile per indagini di prevalenza poichè le IgG compaiono più tardivamente, ma persistono più a lungo.

I test ELISA presentano un'elevata sensibilità, ma una specificità ridotta, poichè è possibile ottenere positività per WNV anche qualora il soggetto sia stato a contatto con un altro *flavivirus* appartenente al gruppo dell'encefalite giapponese.

Pertanto il test ELISA è utile per l'esecuzione di screening sierologici, ma per avere una conferma diagnostica è opportuno eseguire il test di sieroneutralizzazione.

In particolare l'OIE ha definito come test ufficiale per la diagnosi di WNV il test di neutralizzazione con riduzione delle placche.

3.1.9.3. DIAGNOSI DI LABORATORIO NEL CAVALLO

Per quanto riguarda la diagnosi diretta, il test più utilizzato è la PCR effettuata su campioni di cervello, midollo spinale, cuore e milza prelevati da soggetti deceduti. In caso di sospetto clinico, è sconsigliata l'esecuzione di PCR da siero o sangue poiché la viremia è di breve durata e già al momento dell'insorgenza della sintomatologia il virus nel sangue non è più rilevabile.

L'isolamento virale può essere effettuato su tessuti d'elezione quali cervello, midollo spinale e liquido cefalorachidiano.

La diagnosi indiretta è ottenuta mediante l'esecuzione del test ELISA, seguito, in caso di positività, dai test di Sieroneutralizzazione (SN) e PRNT, impiegati come test di conferma (Fonte Internet: <http://www.oie.int>).

La conferma diagnostica è effettuata mediante il test di immunofluorescenza o tramite tecniche di biologia molecolare (RT-PCR), metodiche che possono essere applicate anche direttamente su campioni di organi e tessuti (Fonte Internet: <http://www.oie.int>).

3.1.9.4. DIAGNOSI DI LABORATORIO NELL'UOMO

Nell'uomo la diagnosi di infezione da WNV si basa sull'evidenza clinica (Fonte Internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:159:0046:0090:EN:PDF>) e sui risultati delle analisi di laboratorio.

Anche per l'uomo la diagnosi di laboratorio può essere virologica o sierologica.

Per la diagnosi virologica si possono utilizzare le seguenti tecniche:

- Isolamento virale su linee Vero, E6, RK-13, AP61 (Dauphin e Zientara, 2007);
- RT-PCR, in grado di differenziare WNV dagli altri flavivirus (Shi et al, 2001; Scaramozzino et al, 2001; Sanchez-seco et al, 2005; Bush et al, 2008);
- Real-Time PCR: tecnica rapida usata per l'identificazione di WNV (Lanciotti et al, 2000), attuata mediante l'esecuzione di diverse metodiche (Jimenez-Clavero et al, 2006; Papin et al, 2010; Papin et al, 2004; Rodini et al, 2008);

La PCR e l'isolamento virale possono essere attuati su campioni di siero e liquido cerebrospinale, entro 7 giorni dall'inizio della sintomatologia acuta, poiché che la viremia è di durata relativamente breve e di basso titolo (Fonte Internet: <http://www.epicentro.iss.it/problemi/westNile/notiziario-22-10-08.asp>).

Per quanto riguarda la diagnosi sierologica, il rilevamento di anticorpi specifici rimane l'approccio diagnostico più impiegato per la malattia da WNV nell'uomo.

Le tecniche maggiormente impiegate sono le seguenti:

- Test di riduzione del numero delle placche (Plaque reduction neutralization test: PRNT) (Lindsey et al, 1976);
- Tecniche ELISA: metodi rapidi e riproducibili, (Kapoor et al, 2004; Prince et al, 2007; Long et al, 2006; Papa et al, 2010; Gaibani et al, 2012; Charrel et al, 2001; Blitvich et al, 2003);

- IF: metodo che sembra avere una specificità di circa il 94% (Niedrig et al, 2007; Malan et al, 2003; Koraka et al, 2002).

I test Elisa e IF possono essere eseguiti su siero e liquido cerebrospinale per la ricerca di anticorpi IgM.

Questi anticorpi possono persistere per periodi molto lunghi nei soggetti malati (fino a un anno), pertanto la positività a questi test potrebbe indicare anche un'infezione pregressa.

Inoltre, prima dell'esecuzione di trapianti è utile eseguire test di screening su sangue e organi (Gyure, 2009; Morelli et al, 2010; Rabel et al, 2011; Stramer, 2007; Grazzini et al, 2008);

3.1.10. PROFILASSI E CONTROLLO

3.1.10.1. PROFILASSI SANITARIA

Nelle zone endemiche, la profilassi si basa principalmente su una serie di misure per ridurre la presenza di vettori nell'ambiente:

- eliminare e limitare le raccolte di acqua piovana in sottovasi, contenitori e depressioni del terreno;
- ottimizzare la funzionalità degli impianti fognari e dei canali di scolo;
- effettuare trattamenti chimici larvicidi e adulticidi, circoscritti a zone limitate onde evitare rischi di contaminazione ambientale;
- mettere in atto nei confronti delle zanzare una lotta biologica, la

quale, avendo un impatto ambientale molto limitato rispetto a quella chimica, ha maggiori possibilità di essere impiegata.

Il metodo più impiegato per la lotta biologica è basato sull'utilizzo di pesci larvivori, come ad esempio la *Gambusia*, anche se si stanno sperimentando nuove tecniche di lotta che vedono l'uso di zanzare predatrici della specie *Toxorhynchites*, il nematode *Romanomermis* e il micete *Lagenidium giganteum*.

Inoltre si cerca di contrastare la densità delle zanzare con il ripopolamento di chirotteri insettivori, mediante l'uso di *bat cages*.

Per quanto riguarda il cavallo, la prevenzione nei confronti dell'infezione si basa sulla riduzione dell'esposizione al vettore attraverso semplici interventi come il ricovero notturno all'interno di scuderie chiuse e provviste di zanzariere alle finestre. Altri provvedimenti utili possono essere: spegnere le luci nei locali di stabulazione dei cavalli, accendere luci in siti lontani dai ricoveri (per attirare qui le zanzare), tenere gli uccelli fuori dalle scuderie e impedire la nidificazione dei volatili nelle vicinanze dei box.

Inoltre, è sempre conveniente, in vicinanza delle scuderie, eseguire una lotta diretta al vettore mediante trattamenti periodici nei box e pulizia e sfalcio della vegetazione circostante, nel tentativo di limitare la proliferazione delle zanzare.

Infine, nonostante il cavallo presenti una viremia di breve durata e non sia una riserva del virus, è opportuno evitare la movimentazione di capi potenzialmente viremici.

3.1.10.2. PROFILASSI IMMUNIZZANTE

Un vaccino anti WNV inattivato da usare nel cavallo è stato utilizzato per

la prima volta nel 2001 negli Stati Uniti durante i focolai scoppiati in Florida.

Il vaccino si dimostra efficace a prevenire l'infezione dopo la seconda inoculazione, è sicuro e provoca reazioni nel sito di inoculo molto limitate.

A seguito della sua immissione in commercio, il vaccino è stato impiegato in tutto il mondo, anche in specie diverse dal cavallo; infatti, in Israele è stato utilizzato per immunizzare anatre domestiche.

Il vaccino è stato raccomandato per proteggere dall'infezione anche specie esotiche di volatili tenuti in cattività nelle aree endemiche.

Nel 2006 è stato sviluppato un altro vaccino per il cavallo utilizzando uno stipite del virus *Canaripox* come virus vettore di geni di WNV.

Nel cavallo la vaccinazione fornisce una buona copertura nei confronti del WNV e, in caso di infezione, si osserva nei soggetti vaccinati una riduzione dell'insorgenza di sintomi clinici gravi e del rischio di decesso (Salazar et al, 2004).

I vaccini inattivati sono ampiamente impiegati sia in America che in Europa e dal giugno del 2009 possono essere utilizzati anche in Italia. Questi vaccini forniscono una buona copertura per circa 12 mesi, a seguito della somministrazione di 2 dosi vaccinali, a distanza di 3-5 settimane (Dauphin e Zientara 2007).

Solitamente, la prima vaccinazione è effettuata dopo i 6 mesi di età, per evitare l'interferenza del vaccino con gli anticorpi di origine materna; in seguito vengono effettuati richiami annuali.

Trascorse tre settimane dalla seconda vaccinazione l'animale risulta completamente protetto e l'immunità persiste per circa 1 anno.

La vaccinazione è facoltativa, a carico del proprietario e deve essere effettuata da un veterinario, il quale ha l'obbligo di provvedere alla registrazione della vaccinazione sul passaporto e alla sua comunicazione alla Azienda USL, mediante l'apposito modello 12, secondo quanto previsto dall'articolo 65 del Regolamento di polizia veterinaria.

La registrazione dell'avvenuta vaccinazione sul passaporto del cavallo è importante poiché la sieropositività indotta dal vaccino è indistinguibile da quella dovuta all'infezione naturale ed è necessario, in caso di indagini sierologiche in seguito a focolai, scartare dal controllo i cavalli vaccinati.

3.2. INFEZIONE DA VIRUS USUTU

3.2.1. DEFINIZIONE

Il virus Usutu (USUV), il secondo *Flavivirus* più diffuso nel nostro paese, è un arbovirus emergente, trasmesso da zanzare, patogeno per gli uccelli e per l'uomo (Nikolay et al, 2011). Dal punto di vista tassonomico USUV è molto simile a WNV, appartenendo allo stesso sierogrupo del virus dell'encefalite giapponese (Pauli et al, 2014).

3.2.2. STORIA E DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

USUV fu isolato per la prima volta nello Swaziland, nel 1959 (Bruce, 1985), e trae il suo nome dal fiume più importante che attraversa questo paese.

In seguito è stato isolato da zanzare, uccelli e mammiferi anche se, fino a qualche anno fa, non sembrava un virus importante per uomo e animali nelle aree non tropicali.

Nel corso degli anni, USUV è stato identificato in (Nikolay et al, 2011):

- Senegal;
- Repubblica Centrale Africana;

- Nigeria;
- Uganda;
- Burkia Faso;
- Costa d'Avorio;
- Morocco.

Al di fuori dell'Africa, il virus è stato isolato per la prima volta a Vienna, nel 2001 (Weissenbock et al, 2002), dove provocò la morte di diversi tordi e di cinque gufi grigi (*Strix nebulosa*).

Nel 2001 e negli anni immediatamente seguenti, USUV si diffuse in Ungheria, Svizzera, Spagna, Italia (Bakonyi et al, 2007; Ashraf et al, 2015) e Regno Unito.

Successivamente, USUV fu isolato da rondini comuni (*Hirundo rustica*), attraverso le quali si suppone che sia giunto in Austria dall'Africa.

In seguito alle segnalazioni in Svizzera e Ungheria, USUV fu identificato, nel 2006, in Spagna (Catalogna) da zanzare e in Italia (Milano) da un allocco, da civette e da un merlo. Nel 2007, sempre in Italia, sono state rinvenute positività sierologiche in polli sentinella (Fonte Internet: <http://www.vetjournal.it/approfondimento.php?codnotizia=3941>). Anche nel 2008 si sono manifestate positività sierologiche in polli sentinella e cavalli, principalmente in Emilia Romagna.

Il primo caso nell'uomo, fuori dall'Africa, si manifestò in Italia nel 2009, in un uomo immunodepresso che sviluppò una forma di encefalite (Pecorari et al, 2009). Nel 2010, a Roma e nel Nord-est italiano, fu trovato USUV nei merli (*Turdus merula*).

Negli stessi anni, USUV fu isolato anche in Germania (Jost et al, 2011), in Repubblica Ceca, Spagna, Gran Bretagna e Polonia (Vazquez et al, 2011).

USUV fu isolato da zanzare catturate in ambiente urbano e rurale nel 2012, in Veneto e Trentino (Grisenti et al, 2013).

Nel 2012/2013 quattro sieropositività per USUV sono state segnalate durante una indagine sierologica eseguita su volatili del nord Italia.

Negli ultimi dieci anni, USUV è stato identificato in una gran varietà di uccelli dell'Europa centrale affetti da encefalite, degenerazione miocardica e necrosi epatica e splenica. (Fonte Internet:

<http://www.vetjournal.it/approfondimento.php?codnotizia=3941>).

3.2.3. EPIDEMIOLOGIA

Per molti aspetti l'epidemiologia delle infezioni da USUV è sovrapponibile a quella del WNV (Pauli et al, 2012) in quanto anche per questo virus le zanzare fungono da vettori biologici.

Gli uccelli selvatici rappresentano i principali ospiti vertebrati del virus, nonché i serbatoi dell'infezione (Becker et al, 2012). Tra questi, gli uccelli migratori giocano un ruolo importante nella diffusione dell'infezione in nuove aree (Jöst et al, 2011). Gli uccelli da cui è stato identificato il virus in Africa appartengono a tre specie: Tordo del Kurrichane, Bucero fischiatore e Little greenbul.

Alcune specie di mammiferi tra cui cavalli, cani e uomo possono essere ospiti accidentali del virus; il primo isolamento da mammiferi avvenne in un ratto africano del genere *Praomys spp.*

Recentemente, USUV è stato isolato anche in pipistrelli comuni (*Pipistrellus pipistrellus*), trovati morti all'interno di aree endemiche della Germania (Becker et al, 2012).

Studi sierologico-epidemiologici hanno mostrato come una gran moltitudine di uccelli si infetti e vada incontro a sieroconversione senza mostrare alcun segno di malattia. Zanzare ornitofile appartenenti alle specie *Coquillettidia aurites*, *Culex spp.*, *Culex perfuscus*, *Aedes minutus*, *Mansonia africana* e *Aedes albopictus*, rappresentano i vettori più importanti per la trasmissione di USUV alle popolazioni di uccelli e mammiferi.

3.2.4. PATOLOGIA

Le lesioni più significative sono state osservate in volatili deceduti o abbattuti (Chvala et al, 2004):

- epatomegalia,
- splenomegalia,
- congestione epatica e splenica con vari gradi di necrosi multifocale acuta ed enterite sieromucoide.

Le uniche lesioni rilevate a livello nervoso sono encefaliti caratterizzate da aree multifocali di neuronofagia e microgliosi.

All'esame istologico si possono osservare quadri di: encefalite, miocardiopatia, necrosi epatica e necrosi splenica (Fonte Internet: http://www.veterinariaalimenti.marche.it/viewdoc.asp?CO_ID=4898).

3.2.5. SEGNI CLINICI

Negli uccelli la malattia non è frequente e si osserva solo in alcune specie di uccelli selvatici e in particolare nei merli (*Turdus merula*). I segni clinici più frequentemente osservati sono:

- abbattimento,
- arruffamento delle piume,
- incoordinazione dei movimenti,
- convulsioni,
- morte.

Lo stato nutrizionale risulta, generalmente, da discreto a scadente nei soggetti selvatici e variabile in quelli in cattività (Fonte Internet: <http://www.vetjournal.it/approfondimento.php?codnotizia=4473>).

Inoltre, quando sono presenti apatia, piumaggio arruffato, incoordinazione dei movimenti e incapacità al volo, la morte avviene entro 2-24 ore.

I polli domestici non sviluppano la malattia clinica, ma vanno incontro a sierconversione e per questo sono utilizzati come sentinelle nei programmi di sorveglianza epidemiologica. Il virus si replica anche nelle oche, ma non dà né viremia né malattia.

Per quanto riguarda l'uomo, USUV, pur essendo in grado di infettarlo, difficilmente provoca l'insorgenza di malattia, anche se talvolta sono stati individuati rash cutanei indotti dall'infezione.

Nel 2009 USUV fu isolato da due pazienti: una donna sessantenne di una zona dell' Emilia Romagna, dove contemporaneamente era in corso una epidemia di WNV, e una donna quarantenne di ritorno da un viaggio in Egitto. Le due donne furono colpite rispettivamente da meningoencefalite ed encefalite, ma entrambe avevano il sistema immunitario compromesso da patologie concomitanti e questo potrebbe aver aggravato il decorso dell'infezione.

In particolare in uno dei due casi la sintomatologia nervosa si è evidenziata dopo un trapianto di fegato (Pecorari et al, 2009).

3.2.6. DIAGNOSI

Diverse tecniche diagnostiche possono essere impiegate per la ricerca di USUV:

- Semina su colture cellulari (VERO PK-15, fibroblasti di oca);

- Inoculazione nel sacco allantoideo di uova embrionate di oca;
- Inoculazione intracerebrale di topi lattanti;
- Immunoistochimica;
- Ibridazione in situ;
- RT-PCR.

Per quanto riguarda le indagini sierologiche, possono essere eseguiti diversi test: ELISA, immunofluorescenza indiretta, immunoperossidasi indiretta (tutti e tre poco utilizzati per la scarsa disponibilità di anticorpi coniugati specifici per le diverse specie di uccelli selvatici), PRNT (che rappresenta il gold standard), inibizione dell'emoagglutinazione (HI).

3.2.7. PROFILASSI, TERAPIA E CONTROLLO

Fino ad ora sono stati osservati solo pochi casi di infezione umana da USUV perciò sono ancora scarse le informazioni sul trattamento di questa malattia. Come per le altre infezioni da *Flavivirus*, vengono effettuati solamente trattamenti sintomatici.

Non è ancora a disposizione alcun trattamento antivirale USUV specifico. Lo studio degli enzimi virali (elicasi) implicati nella replicazione potrebbe fornire indicazioni per cercare nuovi approcci terapeutici (Vlachakis, 2009).

Non sono disponibili informazioni relative allo sviluppo di vaccini per la profilassi nell'uomo e negli animali.

L'unica profilassi efficace consiste nell'effettuare la lotta ai vettori nelle aree endemiche (Pauli et al, 2014).

RICERCHE PERSONALI

1. MATERIALI E METODI

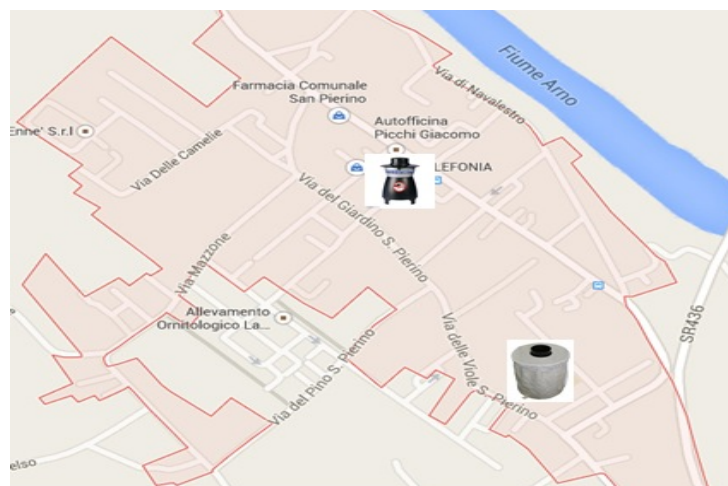
1.1. CATTURA E RACCOLTA DELLE ZANZARE

Le procedure di cattura, raccolta e identificazione delle zanzare in base a specie e sesso sono state eseguite presso il Dipartimento di Scienze Veterinarie in ambito di una tesi sperimentale per il corso di Laurea Magistrale in Scienze Biologiche, relativa a uno studio sul monitoraggio e il controllo biologico di varie specie di zanzare con particolare riferimento a *Aedes albopictus* e *Culex pipiens*

Le zanzare utilizzate nel nostro studio provengono dalla località di San Pierino, zona residenziale ricca di aree verdi quali parchi, giardini e campi, situata a circa 1,51 Km da Fucecchio, in prossimità del fiume Arno (Fonte Internet:

http://italia.indettaglio.it/ita/toscana/firenze_fucecchio_sanpierino.html#dati_istat).

Immagine N.1: Siti di localizzazione delle trappole in San Pierino.



Per la cattura delle zanzare adulte sono state utilizzate due diverse tipologie di trappole:

- You Get Out;
- BG-sentinel.

Queste trappole hanno un meccanismo di cattura molto simile: attirano con diversi attrattivi le zanzare che sono poi trascinate all'interno della trappola dalla forza di una ventola. Nella trappola le zanzare sono trattenute in una rete che può essere estratta, consentendo di raccogliere le zanzare catturate. Gli attrattivi rilasciati dalle trappole nell'aria circostante contengono sostanze non tossiche, simili a quelle emesse da ospiti a sangue caldo per odore e composizione. Entrambe le trappole, per funzionare, hanno bisogno di corrente elettrica.

- **You Get Out:** è una trappola cilindrica in materiale plastico resistente all'acqua con dimensioni di 30 cm di diametro e 43 cm di altezza. L'attrazione delle zanzare è dovuta a: emanazione di luce UV, rilascio di anidrite carbonica per via foto catalitica, propagazione di calore e umidità, emissione di attrattivo *Activix Pro*. Questa trappola è stata posta a circa 1,50 m da terra, in prossimità di una scuola elementare.

Immagine N.2: Trappola You Get Out.



- **BG-sentinel:** anch'essa cilindrica e in materiale plastico, a differenza della You Get Out non rilascia anidride carbonica.

L'attrazione delle zanzare è legata principalmente al rilascio di attrattivo *BG-Lure*. Questa trappola è stata posizionata a terra, in prossimità di un asilo.

Immagine N.3: Trappola BG-sentinel.



Ogni settimana le zanzare sono state estratte dalle trappole, identificate (secondo specie, sesso, periodo di cattura e tipologia di trappola) e conservate a -20°C.

Le zanzare appartenenti alla specie *Culex pipiens*, catturate nel periodo compreso tra settembre e ottobre 2014, sono state suddivise in 10 pools di 50 femmine ciascuno.

Nelle seguenti tabelle (N.1 e N.2) sono riportati i dati riguardanti i pools di zanzare.

Tabella N.1: Dati zanzare catturate tra settembre e ottobre 2014.

DATA CATTURA	NUMERO SETTIMANA	TIPO TRAPPOLA	<i>CULEX PIPIENS</i> FEMMINE
15/09/2014	23	Y	70
15/09/2014	23	B	80
22/09/2014	24	Y	125
22/09/2014	24	B	125
29/09/2014	25	Y	70
29/09/2014	25	B	80
06/10/2014	26	Y	50
06/10/2014	26	B	30
13/10/2014	27	Y	30
13/10/2014	27	B	20
20/10/2014	28	Y	20
20/10/2014	28	B	20
27/10/2014	29	Y	20
27/10/2014	29	B	20

Tabella N.2: Dati pools creati.

NUMERO POOL	NUMERO SETTIMANA / TRAPPOLA	NUMERO ZANZARE PER SETTIMANA/ TRAPPOLA	NUMERO ZANZARE CAMPIONE
1	26Y	50	50
2	27Y e 28Y	30 e 20	50
3	26B e 27B	30 e 20	50
4	25B	80	50
5	24Y	125	50
6	24B	125	50
7	24B	75	50
8	23B e 24B	80 e 25 (25 e 25)	50
9	23B	55	50
10	25Y	70	50

1.2. ESTRAZIONE DI RNA E SINTESI DEL cDNA

Ad ogni pool sono state aggiunte 10 biglie di vetro (diametro 1mm) e 400 μ L di PBS. I pools sono poi stati sottoposti ad azione meccanica tramite TissueLyser per 2 minuti a 25 MhZ e per 2 minuti a 27 MhZ e successivamente sono stati centrifugati a 8000 rpm per 1 minuto.

140 μ L del surnatante sono stati utilizzati per effettuare l'estrazione di RNA, secondo il protocollo "QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen".

L'RNA estratto è stato utilizzato per la sintesi del cDNA, secondo il protocollo "M-MLV Reverse Transcriptase-invitrogen".

1.3. SELEZIONE DEI PRIMERS

Sequenze in formato FASTA disponibili in GenBank dei genomi di WNV e USUV, isolati in Italia e nel bacino mediterraneo, sono state allineate tramite il software *Bioedit sequence allinement editor* (Hall, 1999).

Nella tabella N.3 sono elencati gli stipiti esaminati.

Tabella N.3: Sequenze WNV e USUV utilizzate per l'identificazione di primers.

GenBank Code	Accession	Virus, paese e anno
AF404757.1		WNV Italia, 1998
AY701412.1		WNV Marocco, 2003
AY701413.1		WNV Marocco, 2003
DQ118127.1		WNV Ungheria, 2003
DQ116961.1		WNV Ungheria, 2004
JF719066.1		WNV Italia, 2008
JF719065.1		WNV Italia, 2008
FJ483549.1		WNV Italia, 2008

FJ483548.1	WNV Italia, 2008
JF719068.1	WNV Italia, 2009
KF234080.1	WNV Italia, 2009
GU011992.2	WNV Italia, 2009
JF719067.1	WNV Italia, 2009
JF719069.1	WNV Spagna, 2010
HQ537483.1	WNV Grecia, 2010
JQ928175.1	WNV Italia, 2011
JQ928174.1	WNV Italia, 2011
JN858070.1	WNV Italia, 2011
KC954092.1	WNV Italia, 2011
JN858069.1	WNV Italia, 2011
JF707789.1	WNV Spagna, 2011
JX556213.1	WNV Italia, 2012
KC954092.1	WNV Italia, 2012
KF179639.1	WNV Grecia, 2012
KF647253.1	WNV Italia, 2013
KF647252.1	WNV Italia, 2013
KF647251.1	WNV Italia, 2013
KF647250.1	WNV Italia, 2013
KF647249.1	WNV Italia, 2013
KF588365.1	WNV Italia, 2013
KF647249.1	WNV Italia, 2013
JF266698.1	USUV Italia, 2009
HM569263.1	USUV Italia, 2009

L'allineamento delle sequenze degli stipiti selezionati ha permesso di individuare le regioni più conservate, sulle quali ricercare i primers. Tramite il programma Primer-BLAST (Ye et al, 2010) sono state quindi identificate tre coppie di primers da utilizzare nei protocolli di PCR e PCR-Nested.

Tabella N.4: Primers da noi disegnati.

Nome Primer	Sequenza
P9399_F_WN	CACAAAGTBGTGAAAGTGATG
P9399_F_U	CACAAAGTBGTGAAAGTTATG
P10112_R	CATGTCHTCTGTYGTCATCCA
P9811_R	CAGAATGGVACYTGCTGCCA
P9632_R_WN	CTCAAACAGCCAGGTYCTGAC
P9632_R_U	CTCAAACAGCCAGGTYCTCAC

Oltre a questi primers, abbiamo utilizzato i primers descritti da Scaramozzino et al, 2001.

Tabella N.5: Primers descritti da Scaramozzino et al, 2001.

Nome Primer	Sequenza
cFD2 (R)	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC
MAMD (F)	AACATGATGGGRAARAGRGARAA
FS778 (F)	AARGGHAGYMCDCGCHATHHTGGT

Nelle seguenti tabelle (N.6 e N.7) sono illustrate le coppie di primers utilizzate nei diversi test di PCR e la lunghezza attesa degli amplificati.

Tabella N.6: Coppie di primers descritte da Scaramozzino et al, 2001.

Tipologia test utilizzato	Coppie di primers	Lunghezza amplificato attesa
PCR	cFD2 MAMD	252 bp
PCR-Nested (I)	cFD2 FS778	214 bp

Tabella N.7: Coppie di primers da noi disegnate.

Tipologia test utilizzato	Coppie di primers	Lunghezza amplificato attesa
PCR	P9399_F_WN e U P10112_R	713 bp
PCR-Nested (I)	P9399_F_WN e U P9811_R	412 bp
PCR-Nested (II) WNV specifica	P9399_F_WN P9632_R_WN	233 bp
PCR-Nested (II) USUV specifica	P9399_F_U P9632_R_U	233 bp

1.4. PCR ESEGUITA CON I PRIMERS DESCRITTI DA SCARAMOZZINO ET AL, 2001

La PCR è stata eseguita seguendo le indicazioni del protocollo “HotStartTaq Plus, Qiagen” utilizzando i primers cFD2 e MAMD (banda attesa 252 bp) e i seguenti parametri:

- 95°C per 5 minuti;
- **35 cicli di:**
 - 94°C per 60 secondi;
 - 53°C per 60 secondi;
 - 72°C per 60 secondi;
- 72°C per 10 minuti.

Gli amplificati ottenuti sono stati identificati con le sigle da 1S a 10S (252 bp).

La PCR-Nested (I) è stata eseguita con gli stessi parametri, utilizzando i primers cFD2 e FS778 (banda attesa 214 bp) e gli amplificati identificati da 1SN a 10SN (214 bp).

1.5. PCR ESEGUITA CON I PRIMERS DA NOI DISEGNATI

Anche in questo caso la PCR è stata effettuata seguendo le indicazioni del protocollo “HotStartTaq Plus, Qiagen” utilizzando i seguenti primers P9399_F_WN, P9399_F_U e P10112_R (banda attesa 713 bp) e i seguenti parametri:

- 95°C per 5 minuti;

35 cicli di:

- 94°C per 30 secondi;
- 53°C per 30 secondi;
- 72°C per 60 secondi;

- 72°C per 10 minuti.

Gli amplificati ottenuti sono stati identificati con le sigle da 1P a 10P (713 bp). La PCR-Nested (I) è stata eseguita con gli stessi parametri, utilizzando i primers P9399_F_WN, P9399_F_U e P9811_R (banda attesa 412 bp) e gli amplificati sono stati identificati con le sigle da 1PN a 10PN (412 bp).

Sugli amplificati 1PN-10PN (412 bp) sono state eseguite due ulteriori PCR-Nested (II), una specifica per WNV (con i primers P9339_F_WN e P9632_R_WN, banda attesa 233 bp) dalla quale sono stati ottenuti gli amplificati 1PW-10PW (233 bp), e una specifica per USUV (con i primers P9399_F_U e P9632_R_U, banda attesa 233 bp) dalla quale sono stati ottenuti gli amplificati 1PU-10PU (233 bp).

Gli amplificati ottenuti dalle precedenti procedure di PCR e PCR-Nested sono stati sottoposti a elettroforesi (I) in gel agarosio al 2,5%, insieme ai markers Gene Rulers 100.

In seguito, gli amplificati 7SN e 1PU-10PU sono stati sottoposti a una seconda elettroforesi (II) in gel di agarosio al 3%, insieme a marker Gene Rulers 100.

1.6. PCR-NESTED

Sull'amplificato 7SN (214 bp) è stata eseguita una seconda PCR-Nested (II), utilizzando i primers cFD2 e FS778 (banda attesa 214 bp) e i seguenti parametri:

- 95°C per 5 minuti;
- **35 cicli di:**
 - 94°C per 60 secondi;
 - 53°C per 60 secondi;
 - 72°C per 60 secondi;
- 72°C per 10 minuti.

L'amplificato ottenuto è stato identificato con la sigla 7SN1 (214 bp).

Sugli amplificati 3PU e 8PU (233 bp) è stata effettuata una PCR-Nested (III) con i primers P9399_F_U e P9632_R_U (banda attesa 233 bp) e i seguenti parametri:

- 95°C per 5 minuti;
- **35 cicli di:**
 - 94°C per 30 secondi;
 - 56°C per 30 secondi;
 - 72°C per 60 secondi;
- 72°C per 10 minuti.

Gli amplificati sono stati identificati con le sigle 3PU1 e 8PU1 (233 bp).

Gli amplificati 7SN1 (214 bp), 3PU1 e 8PU1 (233 bp) sono stati sottoposti a elettroforesi (III) in gel di agarosio al 3%, insieme a marker Gene Rulers 100.

1.7. ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI DNA DA GEL DI AGAROSIO

Il gel corrispondente alle bande 7SN1 (214 bp) e 3PU1 (233 bp) è stato sezionato e sottoposto a estrazione e purificazione di DNA secondo il protocollo “QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen”.

Il DNA è stato poi sottoposto a elettroforesi (IV) in gel di agarosio al 2,5%, insieme a marker Gene Rulers 100.

1.8. SEQUENZIAMENTO

Gli eluati 7SN1 (214 bp) e 3PU1 (233 bp) sono stati trattati seguendo le indicazioni della “*BMR Genomics-servizio di sequenziamento e analisi DNA- Padova*”, alla quale sono stati inviati per il sequenziamento.

1.9. INDAGINE EPIDEMIOLOGICA SU PICCIONI

Parallelamente al lavoro svolto sulle zanzare, è stata eseguita una indagine virologica su piccioni, in collaborazione con l’Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Teramo (centro di referenza per WNV).

I piccioni esaminati provenivano dall'area di San Ginese, nel Comune di Capannori in provincia di Lucca.

Gli animali erano stati abbattuti dalle guardie forestali a seguito di un'ordinanza comunale emanata per cercare di ridurre i danni che arrecavano alle coltivazioni di quella zona.

Nel periodo compreso tra il settembre 2013 e l'ottobre 2014, sono stati recapitati al Dipartimento di Scienze Veterinarie un totale di 75 piccioni.

Ogni capo è stato sottoposto a necropsia, durante la quale sono state prelevate porzioni di reni, milza e cervello.

I campioni sono stati congelati a -80°C e successivamente inviati all'IZS di Teramo, dove sono stati sottoposti a PCR per WNV, secondo il protocollo in uso presso il centro di referenza.

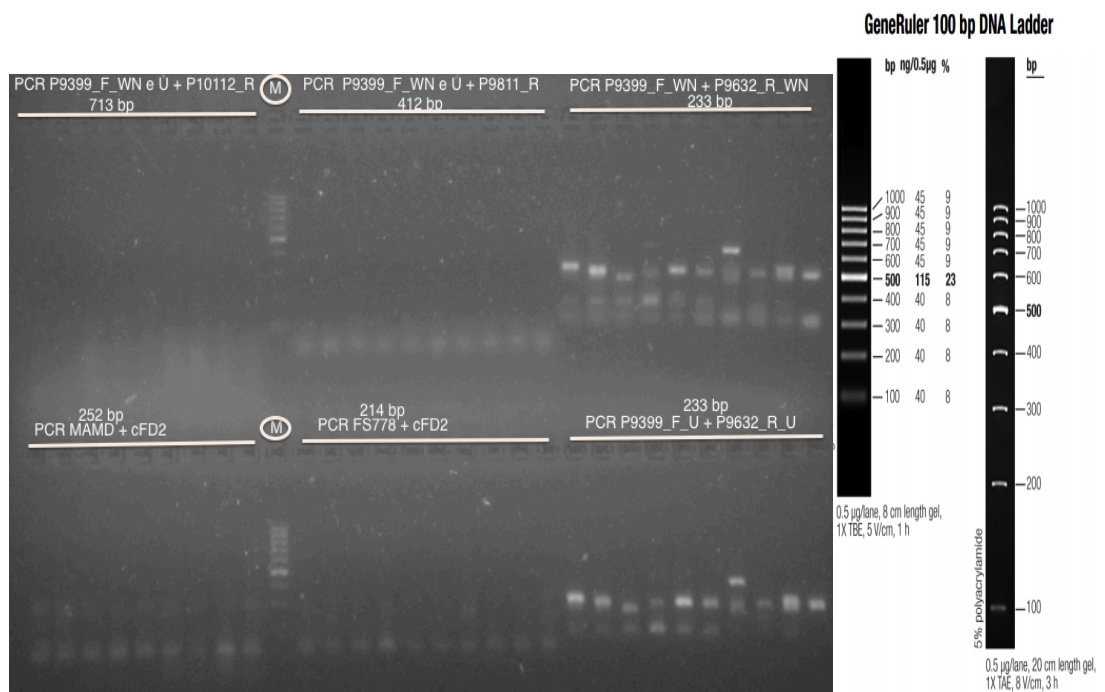
2. RISULTATI

2.1. RISULTATI TEST ESEGUITI SU POOLS DI ZANZARE

Nell'immagine N.4 sono evidenziati i risultati relativi all'elettroforesi (I) degli amplificati ottenuti con le seguenti tecniche: PCR (banda attesa 252 bp) e PCR-Nested (I) (banda attesa 214 bp) con i primers secondo Scaramozzino et al, 2001; PCR (banda attesa 713 bp) e PCR-Nested (I) (banda attesa 412 bp) con i primers da noi disegnati; PCR-Nested (II) (banda attesa 233 bp) con primers da noi disegnati specifici per WNV e specifici per USUV.

La disposizione di caricamento dei campioni nel gel è riportata nella tabella che segue l'immagine.

Immagine N.4: Elettroforesi I.



Gel di agarosio al 2,5%; sono stati caricati 10 µl di prodotto di PCR in ogni lane. Il marker utilizzato è il low range GeneRuler 100 bp (5 µl).

Partendo dall'alto verso il basso abbiamo il pettine I e il pettine II suddivisi da sinistra verso destra in tre parti, come di seguito mostrato nella tabella N.8.

Tabella N.8: Schema di caricamento dei campioni nel gel.

I Pettine

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1P	2P	3P	4P	5P	6P	7P	8P	9P	MARKER 100bp

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1PN	2PN	3PN	4PN	5PN	6PN	7PN	8PN	9PN	10PN

21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1PW	2PW	3PW	4PW	5PW	6PW	7PW	8PW	9PW	10PW

II Pettine

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1S	2S	3S	4S	5S	6S	7S	8S	9S	MARKER

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1SN	2SN	3SN	4SN	5SN	6SN	7SN *	8SN	9SN	10SN

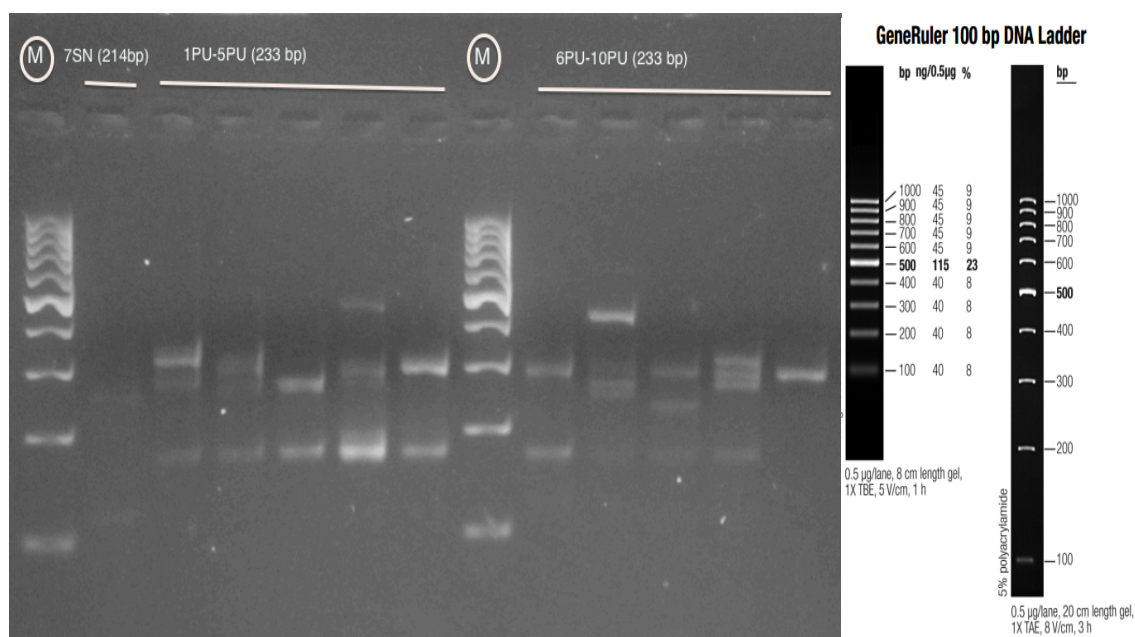
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1PU *	2PU *	3PU *	4PU *	5PU *	6PU *	7PU *	8PU *	9PU *	10PU *

Si può osservare che le bande relative ai campioni 7SN (214 bp), 1PU-10PU (233 bp), contrassegnati dall'asterisco nella tabella, si posizionano tra le bande 200 e 300 del marker e pertanto gli amplificati sono della lunghezza attesa.

Nell'immagine N.5 si illustrano i risultati dell'elettroforesi (II) eseguita sugli amplificati 7SN (214 bp), ottenuto dalla PCR-Nested (I) con i primers secondo Scaramozzino et al, 2001, e 1PU-10PU (233 bp), ottenuti dalla PCR-Nested (II) con primers da noi disegnati specifici per USUV.

La disposizione di caricamento dei campioni nel gel è riportata nella tabella che segue l'immagine.

Immagine N.5: Elettroforesi II.



Gel di agarosio al 3%; sono stati caricati 10 µl di prodotto di PCR in ogni lane e 5µl di marker.

Tabella N.9: Schema di caricamento dei campioni nel gel.

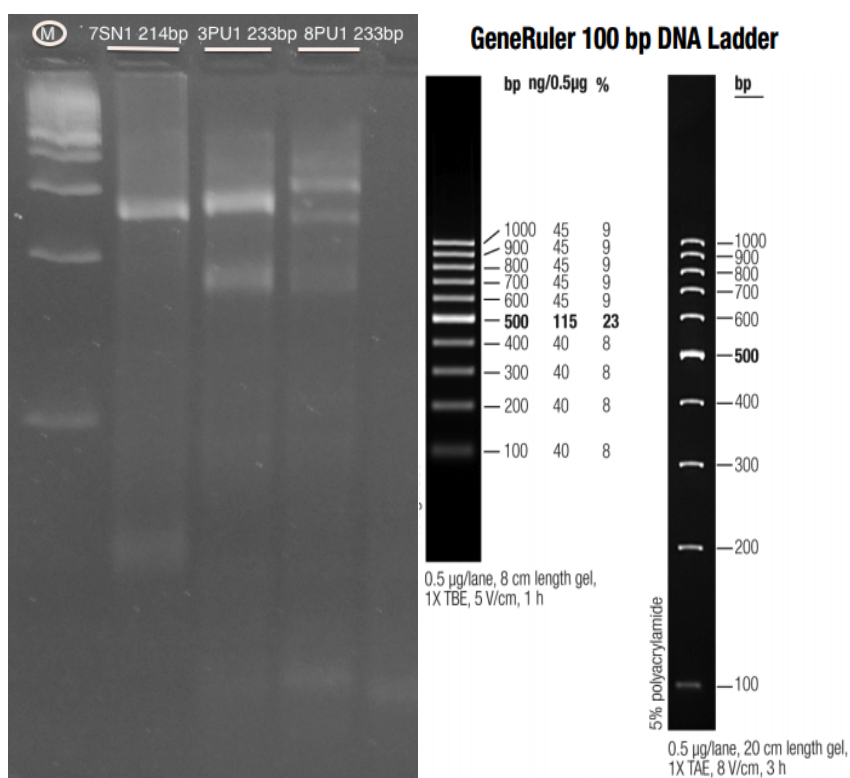
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
MARKER 100 bp	7SN *	1PU	2PU	3PU *	4PU	5PU	MARKER	6PU	7PU	8PU *	9PU	10PU

Le bande che si riferiscono ai campioni 7SN (lunghezza attesa di 214 bp), 3PU e 8PU (lunghezza attesa di 233 bp), contrassegnati dall'asterisco nella tabella, sono della lunghezza attesa (comprese tra le bande 200 e 300 del marker).

Nell'immagine N.6 sono evidenziati i risultati dell'elettroforesi (III) degli amplificati 7SN1 (214 bp), ottenuto dalla PCR-Nested (II) (banda attesa 214 bp) con i primers secondo Scaramozzino et al, 2001, e 3PU e 8PU (233 bp), ottenuti dalla PCR-Nested (III) (banda attesa 233 bp) con primers da noi disegnati specifici per USUV.

La disposizione di caricamento dei campioni nel gel è riportata nella tabella che segue l'immagine.

Immagine N.6: Elettroforesi III.



Gel di agarosio al 3%; sono stati caricati 10 µl di prodotto di PCR in ogni lane e 5µl di marker.

Tabella N.10: Schema di caricamento dei campioni nel gel.

1	2	3	4
MARKER	7SN1 *	3PU1 *	8PU1

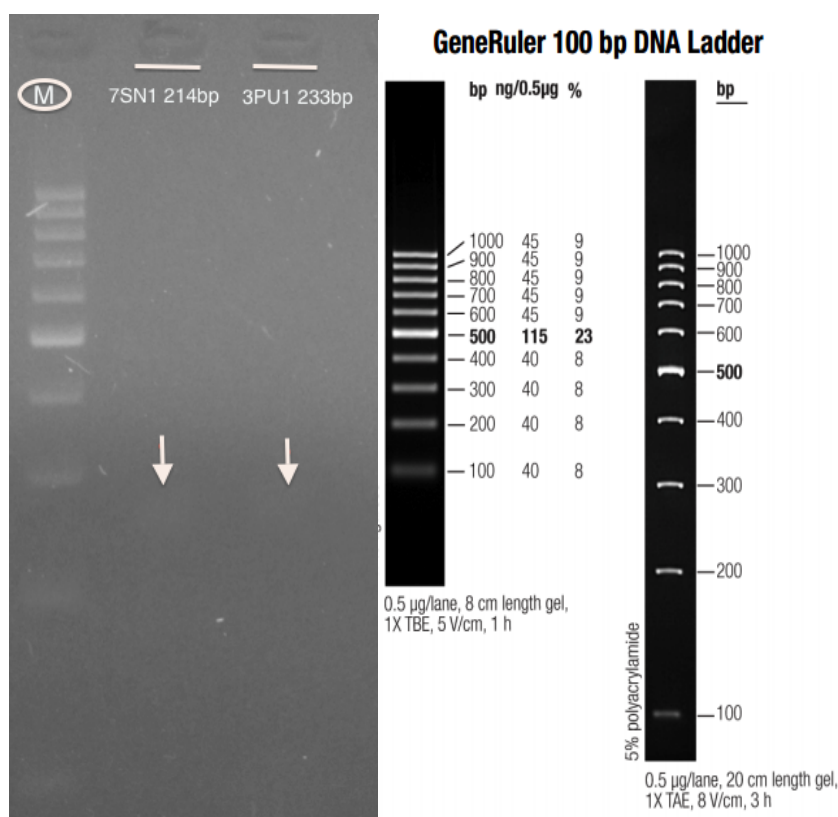
L'immagine ci permette di osservare la presenza di due bande nette riferibili ai campioni 7SN1 (lunghezza attesa 214 bp) e 3PU1 (lunghezza attesa 233 bp) poste tra le bande 200 e 300 del marker. Pertanto gli

amplificati 7SN1 (214 bp) e 3PU1 (233 bp), contrassegnati dall'asterisco in tabella, sono della lunghezza attesa.

Nell'immagine N.7 si illustrano i risultati dell'elettroforesi (IV) eseguita sugli eluati 7SN1 (214 bp) e 3PU1 (233 bp) ottenuti dall'estrazione e purificazione di DNA da gel di agarosio.

La disposizione di caricamento degli eluati nel gel è riportata nella tabella che segue l'immagine.

Immagine N.7: Elettroforesi IV.



Gel di agarosio al 2,5%; sono stati caricati 1 µl di eluato in ogni lane e 5 µl di marker.

Tabella N.11: Schema di caricamento dei campioni nel gel.

1	2	3
Marker	7SN1	3PU1

Nell'immagine le bande relative agli eluati 7SN1 (214 bp) e 3PU1 (233 bp) si trovano in corrispondenza dell'area compresa tra le bande 200 e 300 del

marker (lunghezze attese); pertanto questi eluati sono stati inviati al sequenziamento.

L'analisi di sequenza non ha riscontrato alcuna omologia tra i nostri campioni e le sequenze di *Flavivirus*.

L'amplificato 7SN1 ottenuto dai test eseguiti con i primers descritti da Scaramozzino et al, 2001 è risultato aspecifico, in quanto corrispondente alla sequenza genomica di *Culex pipiens quinquefasciatus*.

Di seguito vengono riportate la sequenza dell'amplificato e l'immagine del risultato della ricerca su BLAST.

Immagine N.8: Sequenza del campione 7SN1.

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
7sn1_Cons      5      15      25      35      45      55
GTGTTTTTTTA GCCGGTGGTG TCATCAGCAC CTTCATAACG TCCATCCGGT CGGTATCCGT

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
7sn1_Cons      65      75      85      95      105     115
GCGCACAAAC ACCGAACTGC TGAAGGACAG CGGCAAGCTT GTAGACAGCG TAACCGTTTC

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
7sn1_Cons     125     135     145     155     165     175
TTGAGCCAGT CGCTTCACCT GCGGGGAGT AGCACGAGTT CCAGAGTACC TAGCCTTCGT

      .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
7sn1_Cons     185     195     205     215     225     235
ACCGTAGTGA TGCGAGATGA CGAACGTCCC GTCTTCACCG ATCATGTCGT TCGAACCAAA

      .....| .....| .....|
7sn1_Cons     245     255
TGGCCGTACT TCCCNNA
```

Immagine N.9: Esito della ricerca della sequenza consenso 7SN1 in BLAST.

Download ▾ GenBank Graphics

Culex quinquefasciatus survivin, mRNA
Sequence ID: [reflXM_001843151.1](#) Length: 3468 Number of Matches: 1

Range 1: 2437 to 2657 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
354 bits(392)	3e-94	211/221(95%)	0/221(0%)	Plus/Minus
Query 20	GTCATCAGCACCTTCATAACGTC	CCATCCGGTCCGGTATCCGTGCGC	CACAAACACCGAACTG	79
Sbjct 2657	GTAATCAGCACCTTCATAACGTC	CCAACCGGTCCGGTATCCGTGCGC	CACAAACACCGAACTG	2598
Query 80	CTGAAGCACAGCGGCAAGCTTGT	TACACAGCGTAACCGTTTCTT	GAGCCAGTCGCTTCACC	139
Sbjct 2597	CTGAAGCACAGCGGCAAGCTTGT	TACACAGCGTAACCGTTTCTT	GAGCCAGTCGCTTCACC	2538
Query 140	TGGCGGGGAGTAGCACGAGTTC	CACAGTACCTAGCCTTCGTACC	GTAAGTGTGCGGAGATG	199
Sbjct 2537	TGGCGGGGAGTAGCACGAGTTC	CACAGTACCTAGCCTTCGTACC	GTAAGTGTGCGGAGATG	2478
Query 200	ACGAACGTCCTTCACCGATCAT	GTGCGTTCGAACCAA	240	
Sbjct 2477	ACAAAGCCCATCTTCACCGATCAT	GTGCGTTCGAACCAA	2437	

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download ▾ GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Culex quinquefasciatus survivin, mRNA	354	354	85%	3e-94	95%	XM_001843151.1
<input type="checkbox"/> Culex quinquefasciatus survivin, mRNA	109	109	44%	2e-20	81%	XM_001844220.1

L'analisi delle sequenze ottenute con i primers da noi disegnati ha dimostrato che queste non appartenevano a *Flavivirus*.

2.2. RISULTATI TEST ESEGUITI SU PICCIONI

Tutti i campioni di reni, cervello e milza, prelevati dai 75 piccioni esaminati, sono risultati negativi ai test di PCR per la ricerca di WNV eseguiti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Teramo.

3. DISCUSSIONE

Una prima parte del lavoro sperimentale è stato svolto in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Teramo, nell'ambito di una ricerca di monitoraggio sulla situazione epidemiologica di WNV in Toscana.

Lo studio è stato svolto ricercando tramite PCR la presenza di *Flavivirus* su organi di 75 piccioni abbattuti a seguito di una ordinanza del Comune di Capannori per il controllo della densità di questi animali in ambiente rurale. Si trattava pertanto di campioni di opportunità ed eravamo consapevoli che l'indagine, se avesse dato risultati negativi, come nel nostro caso, non si sarebbe prestata a inferenze statistiche. Abbiamo comunque sfruttato questa opportunità poiché i piccioni presenti in zone agricole ai margini dei centri urbani possono essere volatili interessanti dal punto di vista epidemiologico, in quanto, se portatori di *Flavivirus*, possono svolgere un ruolo di "ponte" fra cicli di trasmissione silvestre e urbana.

Nella seconda parte del lavoro abbiamo utilizzato pools di zanzare, catturate e identificate nell'ambito di una indagine (argomento di altra tesi di laurea) sull'efficacia del controllo biologico, svolta nel Comune di Fucecchio.

I pools sono stati sottoposti a test di PCR per la ricerca di WNV e USUV. Dato che il numero di campioni che abbiamo potuto analizzare era limitato (500 zanzare della specie *Culex pipiens*) e che le aree di raccolta di questi campioni erano urbane, l'indagine non è nata con uno scopo di sorveglianza e controllo dell'infezione; tuttavia il rilevamento di positività in queste aree sarebbe stato molto interessante poiché avrebbe significato un elevato rischio di infezione per l'uomo.

Il risultato di alcune PCR su pools hanno mostrato la presenza di bande prossime alle dimensioni attese che potevano indirizzare verso un risultato di positività.

Al fine di individuare con un unico protocollo di PCR la presenza di più di un *Flavivirus*, siamo dovuti ricorrere all'utilizzo di primers degenerati che permettessero l'amplificazione del genoma sia di WNV che di USUV.

La presenza di bande aspecifiche è un fatto abbastanza comune, specialmente quando, come in questo caso, si è costretti a utilizzare primers degenerati a causa dell'elevata variabilità degli stipiti.

Abbiamo inoltre scelto di affiancare il protocollo da noi sviluppato a un protocollo descritto in letteratura (Scaramozzino et al, 2001), per poter eseguire un confronto e un riscontro dei nostri risultati.

Altro fatto da considerare è che l'utilizzo di pools ci ha permesso di analizzare un elevato numero di zanzare ma nello stesso tempo ha reso molto eterogeneo l'RNA estratto.

Avendo analizzato pools di *Culex pipiens* femmina, che nella maggioranza dei casi avevano effettuato il pasto di sangue su vertebrati, nei campioni di RNA estratto erano sicuramente presenti anche frammenti genomici di tali animali. Pertanto il test di PCR è stato ulteriormente complicato dalla notevole eterogeneità del template.

Per questi motivi la presenza di bande prossime alle dimensioni attese non è stata considerata sufficiente ad attestare la presenza del genoma virale e siamo ricorsi alla conferma tramite sequenziamento.

In conclusione i risultati ottenuti non hanno identificato la presenza di *Flavivirus* nei campioni da noi esaminati, ma questo non ci consente di escludere totalmente una eventuale circolazione virale.

BIBLIOGRAFIA

- Anis E., I. Grotto, E.Mendelson et al.; West Nile fever in Israel: the reemergence of an endemic disease. *Journal of Infection*, vol. 68, no. 2, pp. 170–175, **2014**.
- Arjona, A.; Wang, P.; Montgomery, R.R.; Fikrig, E. Innate immune control of West Nile virus infection. *Cell Microbiol.* 13, 1648–1658. **2011**.
- Ashraf Usama, Jing Ye, Xindi Ruan, Shengfeng Wan, Bibo Zhu and Shengbo Cao. Usutu Virus: An Emerging Flavivirus in Europe. *Viruses* 7, 219-238; doi:10.3390/v7010219. Academic Editor: Karyn Johnson. Received: 11 November 2014; Accepted: 13 January 2015; Published: 19 January **2015**.
- Bai, F.; Kong, K.F.; Dai, J.; Qian, F.; Zhang, L.; Brown, C.R.; Fikrig, E.; Montgomery, R.R. A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. *J. Infect. Dis.* 202, 1804–1812. **2010**.
- Bakonyi Tamás, E'va Ivanics, Károly Erdélyi, Krisztina Ursu, Eموke Ferenczi, Herbert Weissenböck, Norbert Nowotny. “Lineage 1 and 2 Strains of Encephalitic West Nile Virus, Central Europe”; *Emerg Infect Dis.* 12 (4): 618-623. Apr **2006**.
- Bakonyi T, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Csörögo T, Lussy H, Chvala S, Bukovsky C, Meister T, Weissenböck H, Nowotny N. J Emergence of Usutu virus in Hungary. *Clin Microbiol.* 45(12):3870-4. Epub Oct 3 **2007**.

- Bakonyi T., E. Ferenczi, K. Erd'elyi et al.; Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Veterinary Microbiology*, vol. 165, no. 1-2, pp. 61–70, **2013**.
- Banet-Noach C, Simanov L, Malkinson M: Direct (non-vector) transmission of West Nile virus in geese. *Avian Pathol*, 32:489–494. **2003**.
- Beasley, D.W.; Li, L.; Suderman, M.T.; Barrett, A.D. Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype. *Virology*, 296, 17–23. **2002**.
- Becker N, Jöst H, Ziegler U, Eiden M, Höper D, Emmerich P, Fichet-Calvet E, Ehichioya DU, Czajka C, Gabriel M, Hoffmann B, Beer M, Tenner-Racz K, Racz P, Günther S, Wink M, Bosch S, Konrad A, Pfeffer M, Groschup MH, Schmidt-Chanasit J. Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PLoS One*. 7(2):e32604. **2012**.
- Bertelsen MF, Olberg RA, Crawshaw GJ, Dibernardo A, Lindsay LR, Drebot M, Barker IK: West Nile virus infection in the eastern loggerhead shrike (*Lanius ludovicianus migrans*): Pathology, epidemiology, and immunization. *J Wildl Dis*, 40:538–542. **2004**.
- Berthet F. X., Zeller H. G., Drouset M. T., Rauzier J., Digoutte J. P. and Deubel V. Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro- African West Nile viruses. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 9): 2293-2297. **1997**.

- Berxholi K., U. Ziegler, A. Rexhepi et al.; Indigenous west nile virus infections in horses in Albania. *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 60, no. 2, pp. 45–50, **2013**.
- Blitvich, B.J.; Bowen, R.A.; Marlenee, N.L.; Hall, R.A.; Bunning, M.L.; Beaty, B.J. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for detection of west nile virus antibodies in domestic mammals. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2676–2679. **2003**.
- Borisevich, V., Seregin, A., Nistler, R., Mutabazi, D., Yamshchikov, V. Biological properties of chimeric West Nile viruses. *Virology* 349:371-381; **2006**.
- Bowen RA, Nemeth NM; Experimental infections with West Nile Virus. *Curr Opin Infect Dis.* ;20(3):293-7. Review. **2007**.
- Bruce M. Usutu (SA Ar 1776), nouvel arbovirus du groupe B. *International Catalogue of Arboviruses* 3: 1059–1060. **1985**.
- Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, Sullivan KG, Davis BS, Komar N, Godsey MS, Baker D, Hettler DL, Holmes DA, Biggerstaff BJ, Mitchell CJ Experimental infection of horses with West Nile virus *Emerg. Infect. Dis.* 8:380-386. **2002**.
- Busch, M.P.; Kleinman, S.H.; Tobler, L.H.; Kamel, H.T.; Norris, P.J.; Walsh, I.; Matud, J.L.; Prince, H.E.; Lanciotti, R.S.; Wright, D.J.; et al. Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection. *J. Infect. Dis.* 198, 984–993. **2008**.

- Busquets N, Bertran K, Costa TP, Rivas R, de la Fuente JG, Villalba R, Solanes D, Bensaid A, Majo N, Pages N: Experimental West Nile virus infection in Gyr-Saker hybrid falcons. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12:482–489. **2012**.
- Byrne, S.N.; Halliday, G.M.; Johnston, L.J.; King, N.J. Interleukin-1beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice. *J. Invest. Dermatol.* 117, 702–709. **2001**.
- Cantile, C, Di Guardo, G, Eleni, C, Arispici, M Clinical and neurological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet. J.* 32:31-35. **2000**.
- Cantile C, Del Piero F, Di Guardo G, Arispici M Pathologic and immunohistochemical findings in naturally occurring West Nile virus infection in horses *Vet Pathol.* 38:414-421. **2001**.
- Castillo-Olivares J, Wood J: West Nile virus infection of horses. *Vet. Res.* 35:467-483. **2004**.
- Castrucci G.; 3: *Togaviridae, Flaviviridae, Toroviridae* / Bologna, Esculapio, di Castrucci Giovanni; parte di “Infezioni da virus degli animali domestici/ Castrucci Giovanni **1992**.
- Chambers TJ, Diamond MS: Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Adv Virus Res* 60:273–342. **2003**.
- Charrel, R.N.; de Lamballerie, X.; Durand, J.P.; Gallian, P.; Attoui, H.; Biagini, P.; De Micco, P. Prevalence of antibody against West

Nile virus in volunteer blood donors living in southeastern France. *Transfusion* 41, 1320–1321. **2001**.

- Cho, H.; Diamond, M.S. Immune responses to West Nile virus infection in the central nervous system. *Viruses* 4, 3812–3830. **2012**.
- Chvala S, Kolodziejek J, Nowotny N, Weissenböck H Pathology and viral distribution in fatal Usutu virus infections of birds from the 2001 and 2002 outbreaks in Austria. *J Comp Pathol.* 131(2-3):176-85. **2004**.
- Dauphin, G.; Zientara, S. West Nile virus: Recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine* 25, 5563–5576. **2007**.
- D'Agostino JJ, Isaza R: Clinical signs and results of specific diagnostic testing among captive birds housed at zoological institutions and infected with West Nile virus. *J Am Vet Med Assoc* 224:1640–1643. **2004**.
- Deubel V, Fiette L, Gounon P, Drouet MT, Khun H, Huerre M, Banet C, Malkinson M, Depres P; Variations in biological features of West Nile virus. *Ann. NY Accad. Sci.* 951:195-206. **2001**.
- Di Sabatino Daria, Rossana Bruno, Francesca Sauro, Maria Luisa Danzetta, Francesca Cito, Simona Iannetti, Valeria Narcisi, Fabrizio De Massis, and Paolo Calistri; Epidemiology of West Nile Disease in Europe and in the Mediterranean Basin from 2009 to 2013. Received 1 August 2014; Accepted 2 September 2014; Published 11 September 2014. Academic Editor: Penghua Wang. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, Volume,

- Diamond, M.S.; Shrestha, B.; Marri, A.; Mahan, D.; Engle, M. B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *J. Virol.* 77, 2578–2586. **2003**.
- Diamond, M.S.; Gale, M., Jr. Cell-intrinsic innate immune control of West Nile virus infection. *Trends. Immunol.* 33, 522–530. **2012**.
- Donadieu Emilie, Céline Bahuon, Steeve Lowenski, Stéphan Zientara, Muriel Coulpier and Sylvie Lecollinet; Differential Virulence and pathogenesis of West Nile Viruses. *Viruses*, 5, 2856-2880; doi:10.3390/v5112856. Received: 29 August 2013; in revised form: 13 November 2013 / Accepted: 14 November 2013 / Published: 22 November **2013**.
- Ellis AE, Mead DG, Allison AB, Stallknecht DE, Howerth EW: Pathology and epidemiology of natural West Nile viral infection of raptors in Georgia. *J Wildl Dis* 43:214–223. **2007**.
- Engler Olivier, Giovanni Savini, Anna Papa, Jordi Figuerola, Martin H. Groschup, Helge Kampen, Jolyon Medlock, Alexander Vaux, Anthony J. Wilson, Doreen Werner, Hanna Jöst, Maria Goffredo, Gioia Capelli, Valentina Federici, Mauro Tonolla, Nicola Patocchi, Eleonora Flacio, Jasmine Portmann, Anya Rossi-Pedruzzi, Spiros Mourelatos, Santiago Ruiz, Ana Vázquez, Mattia Calzolari, Paolo Bonilauri, Michele Dottori, Francis Schaffner, Alexander Mathis, Nicholas Johnson. European Surveillance for West Nile Virus in Mosquito Populations. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 4869-

4895. **2013.**

- Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Szeredi L, Ratz F, Skare J, Bakonyi T: Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonot Dis* 7:181–188. **2007.**
- Fang, H.; Welte, T.; Zheng, X.; Chang, G.J.; Holbrook, M.R.; Soong, L.; Wang, T. Gammadelta T cells promote the maturation of dendritic cells during West Nile virus infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 71–80. **2010.**
- Farina R., Scatozza F.; *Trattato di malattie infettive degli animali domestici.* Editore: Utet Medica, seconda edizione. **1998.**
- Fitzgerald SD, Patterson JS, Kiupel M, Simmons HA, Grimes SD, Sarver CE, Fulton RM, Steficek BA, Cooley TM, Massey JP, Sikarskie JG: Clinical and pathologic features of West Nile virus infection in native North American owls (Family strigidae). *Avian Dis* 47:602–610. **2003.**
- Gaibani, P.; Pierro, A.; Alicino, R.; Rossini, G.; Cavrini, F.; Landini, M.P.; Sambri, V. Detection of Usutu-virus-specific IgG in blood donors from northern Italy. *Vector Borne Zoonotic. Dis.* 12, 431–433. **2012.**
- Gamino Virginia and Ursula Höfle; Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review; Gamino and Höfle *Veterinary Research*, 44:39. **2013.**

- Gancz AY, Smith DA, Barker IK, Lindsay R, Hunter B: Pathology and tissue distribution of West Nile virus in North American owls (family : Strigidae). *Avian Pathol* 35:17–29. **2006**.
- Garcia-Tapia D, Loiacono CM, Klelboeker SB: Replication of West Nile virus in equine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 110:229–244. **2006**.
- Gibbs SE, Ellis AE, Mead DG, Allison AB, Moulton JK, Howerth EW, Stallknecht DE: West Nile virus detection in the organs of naturally infected blue jays (*Cyanocitta cristata*). *J Wildl Dis* 41:354–362. **2005**.
- Giladi Michael, Einat Metzkor-Cotter, Denise A. Martin, Yardena Siegman-Igra, Amos D. Korczyn, Raffaele Rosso, Stephen A. Berger, Grant L. Campbell, and Robert S. Lanciotti. “West Nile Encephalitis in Israel, 1999: The New York Connection”; *Emerg Infect Dis*. 7(4):659-61. **2001**.
- Girard YA, Klingler KA, Higgs S. Vector Borne; West Nile virus dissemination and tissue tropisms in orally infected *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Zoonotic Dis*. 4(2):109-22. **2004**.
- Grazzini, G.; Liembruno, G.M.; Pupella, S.; Silvestri, A.R.; Randi, V.; Pascarelli, N.; Zucchelli, P.; Di Caro, A.; Spataro, N.; D'Angelo, E.; et al. West Nile virus in Italy: a further threat to blood safety, a further challenge to the blood system. *Blood Transfus*. 6, 235–237. **2008**.
- Grisenti M, Arnoldi D, Rizzolli F, Giacobini M, Bertolotti L, Rizzoli

- A. Lack of identification of Flaviviruses in oral and cloacal swabs from long- and short-distance migratory birds in Trentino-Alto Adige (North-eastern Italy). *Virology* 10:306. doi: 10.1186/1743-422X-10-306. **2013**.
- Gyure, K.A. West Nile virus infections. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 1053–1060. **2009**.
 - Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98. **1999**.
 - Hamer GL, Walker ED, Brawn JD, Perdita SR, Ruiz MO, Goldberg TL, Schotthofer AM, Brown WM, Wheeler E, Kitron UD; “Rapid amplification of West Nile Virus: the role of hatch-year birds”; *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8 (1): 57-67. **2008**.
 - Hernandez Raquel, Dennis T. Brown, and Angel Paredes
Structural Differences Observed in Arboviruses of the Alphavirus and Flavivirus Genera. Academic Editor: Trudy Morrison.
Received 20 May 2014; Revised 28 July 2014; Accepted 18 August 2014; Published 16 September **2014**.
 - Himsworth CG, Gurney KEB, Neimanis AS, Wobeser GA, Leighton FA: An outbreak of West Nile virus infection in captive lesser scaup (*Aythya affinis*) ducklings. *Avian Dis* 53:129–134. **2009**.
 - Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, Trepka MJ, Blackmore CG, Hellinger WC, Pham SM, Zaki S, Lanciotti RS, Lance-Parker SE, DiazGranados CA, Winquist AG, Perlino CA, Wiersma

S, Hillyer KL, Goodman JL, Marfin AA, Chamberland ME, Petersen LR, “Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients”; West Nile virus in Transplant Recipients investigation Team. *N Engl J Med*; 348 (22): 2196-20329 maggio **2003**.

- Jiang S, Wang Z, Guo X, Zhang Y, Li C, Dong Y, Xing D, Zhao T. J “Infection and dissemination of West Nile virus in China by the potential vector, *Culex pipiens pallens*.” *Vector Ecol*. 39(1):78-82. doi: 10.1111/j.1948-7134.2014.12073.x. **2014**.
- Jimenez-Clavero, M.A.; Agüero, M.; Rojo, G.; Gomez-Tejedor, C. A new fluorogenic real-time RT-PCR assay for detection of lineage 1 and lineage 2 West Nile viruses. *J. Vet. Diagn. Invest*. 18, 459–462. **2006**.
- Johnston, L.J.; Halliday, G.M.; King, N.J. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J. Invest. Dermatol*. 114, 560–568. **2000**.
- Jöst H, Bialonski A, Maus D, Sambri V, Eiden M, Groschup MH, Günther S, Becker N, Schmidt-Chanasit J . Isolation of usutu virus in Germany. *Am J Trop Med Hyg*. 85(3):551-3. **2011**.
- Kalaycioglu H., G. Korukluoglu, A. Ozkul et al., “Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011,” *Eurosurveillance*, vol. 17, no. 21, **2012**.
- Kapoor, H.; Signs, K.; Somsel, P.; Downes, F.P.; Clark, P.A.; Massey, J.P. Persistence of West Nile Virus (WNV) IgM antibodies

in cerebrospinal fluid from patients with CNS disease. *J. Clin. Virol.* 31, 289–291. **2004**.

- Klenk K, Komar N. “Poor replication of West Nile virus (New York 1999 strain) in three reptilian and one amphibian species” in *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 69, n° 3, pp. 260–2, PMID 14628941. (URL consultato l'8 dicembre 2014) Settembre **2003**.
- Klenk K, Snow J, Morgan K, Bowen R, Stephens M, Foster F, Gordy P, Beckett S, Komar N, Gubler D, Bunning M. “Alligators as West Nile virus amplifiers” in *Emerging Infectious Diseases*; Vol. 10, n° 12, pp. 2150–5, DOI:10.3201/eid1012.040264, PMC 3323409, PMID 15663852. Dicembre **2004**.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M “Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus”. *Emerg Infect Dis.* 9(3):311-22. **2003**.
- Koraka, P.; Zeller, H.; Niedrig, M.; Osterhaus, A.D.; Groen, J. Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes Infect* 4, 1209–1215. **2002**.
- Kulkarni, A.B.; Mullbacher, A.; Blanden, R.V. Functional analysis of macrophages, B cells and splenic dendritic cells as antigen-presenting cells in West Nile virus-specific murine T lymphocyte proliferation. *Immunol. Cell Biol.* 69, 71–80. **1991**.

- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ. “Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States”; *Science*.;286(5448):2333-7. Dic 17 **1999**.
- Lanciotti, R.S.; Kerst, A.J.; Nasci, R.S.; Godsey, M.S.; Mitchell, C.J.; Savage, H.M.; Komar, N.; Panella, N.A.; Allen, B.C.; Volpe, K.E.; et al. Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4066–4071. **2000**.
- Langevin SA, Brault AC, Panella NA, Bowen RA, Komar N: Variation in virulence of West Nile virus strains for house sparrows (*Passer domesticus*). *Am J Trop Med Hyg* 72:99–102. **2005**.
- Laurent-Rolle, M.; Boer, E.F.; Lubick, K.J.; Wolfinbarger, J.B.; Carmody, A.B.; Rockx, B.; Liu, W.; Ashour, J.; Shupert, W.L.; Holbrook, M.R.; et al. The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. *J. Virol.* 84, 3503–3515. **2010**.
- Lim SM, Koraka P, Osterhaus AD, Martina BE: West Nile virus: immunity and pathogenesis. *Viruses* 3:811–828. **2011**.
- Lin, Y.L.; Huang, Y.L.; Ma, S.H.; Yeh, C.T.; Chiou, S.Y.; Chen, L.K.; Liao, C.L. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection

by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *J. Virol.* 71, 5227–5235. **1997.**

- Lindsey, H.S.; Calisher, C.H.; Mathews, J.H. Serum dilution neutralization test for California group virus identification and serology. *J. Clin. Microbiol.* 4, 503–510. **1976.**
- Liu, W.J.; Chen, H.B.; Wang, X.J.; Huang, H.; Khromykh, A.A. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J. Virol.* 78, 12225–12235. **2004.**
- Long MT, Ostlund EN, Porter MB, Crom RL Equine West Nile Encephalitis: Epidemiological and Clinical Review for Practitioners. *AAEP Proceedings Vol. 48.* **2002.**
- Long, MT.; Jeter, W.; Hernandez, J.; Sellon, D.C.; Gosche, D.; Gillis, K.; Bille, E.; Gibbs, E.P. Diagnostic performance of the equine IgM capture ELISA for serodiagnosis of West Nile virus infection. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 608–613. **2006.**
- Long MT; Flavivirus infections, *Equine Infectious diseases.* Ed. Saunders, 198-206. **2007.**
- Lopes H, Redig P, Glaser A, Armien A, Wunschmann A: Clinical findings, lesions, and viral antigen distribution in great gray owls (*Strix nebulosa*) and barred owls (*Strix varia*) with spontaneous West Nile virus infection. *Avian Dis* 51:140–145. **2007.**

- Lupulovic D., M. A. Mart'in-Acebes, S. Lazic et al.; First serological evidence of West Nile virus activity in horses in Serbia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 11, no. 9, pp. 1303–1305, **2011**.
- Malan, A.K.; Stipanovich, P.J.; Martins, T.B.; Hill, H.R.; Litwin, C.M. Detection of IgG and IgM to West Nile virus. Development of an immunofluorescence assay. *Am. J. Clin. Pathol.* 119, 508–515. **2003**.
- McCandless, E.E.; Zhang, B.; Diamond, M.S.; Klein, R.S. CXCR4 antagonism increases T cell trafficking in the central nervous system and improves survival from West Nile virus encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 11270–11275. **2008**.
- McGavin M D, Zachary J F; “Patologia veterinaria sistematica” quarta edizione; Elsevier Srl, pp:560. **2010**.
- McMinn PC: The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *J Gen Virol* 78:2711–2722. **1997**.
- Monath TP, Cropp CB, Harrison AK: Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. Reinvestigation of an old controversy. *Lab Investig* 48:399–410. **1983**.
- Morelli, M.C.; Sambri, V.; Grazi, G.L.; Gaibani, P.; Pierro, A.; Cescon, M.; Ercolani, G.; Cavrini, F.; Rossini, G.; Capobianchi, M.R.; et al. Absence of neuroinvasive disease in a liver transplant recipient who acquired West Nile virus (WNV) infection from the organ donor and who received WNV antibodies prophylactically. *Clin. Infect. Dis.* 51, e34–e37. **2010**.

- Morrey, J.D.; Day, C.W.; Julander, J.G.; Blatt, L.M.; Smee, D.F.; Sidwell, R.W. Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models. *Antiviral Chem. Chemother.* 15, 101–109. **2004**.
- Munoz-Jordan, J.L.; Laurent-Rolle, M.; Ashour, J.; Martinez-Sobrido, L.; Ashok, M.; Lipkin, W.I.; Garcia-Sastre, A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J. Virol.* 79, 8004–8013. **2005**.
- Murgue B1, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis.* 7(4):692-6. **2001**.
- Nemeth N(A), Gould D, Bowen R, Komar N: Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species. *J Wildl Dis* 42:1–13. **2006**.
- Nemeth NM(B), Hahn DC, Gould DH, Bowen RA: Experimental West Nile virus infection in Eastern Screech Owls (*Megascops asio*). *Avian Dis* 50:252–258. **2006**.
- Nemeth NM, Kratz GE, Bates R, Scherpelz JA, Bowen RA, Komar N: Clinical evaluation and outcomes of naturally acquired West Nile virus infection in raptors. *J Zoo Wildl Med* 40:51–63. **2009**.
- Nemeth NM, Thomsen BV, Spraker TR, Benson JM, Bosco-Lauth AM, Oesterle PT, Bright JM, Muth JP, Campbell TW, Gidlewski TL, Bowen RA: Clinical and pathologic responses of American

crows (*Corvus brachyrhynchos*) and fish crows (*C. ossifragus*) to experimental west nile virus Infection. *Vet Pathol* 48:1061–1074. **2011.**

- Niedrig, M.; Sonnenberg, K.; Steinhagen, K.; Paweska, J.T. Comparison of ELISA and immunoassays for measurement of IgG and IgM antibody to West Nile virus in human sera against virus neutralisation. *J. Virol. Methods* 139, 103–105. **2007.**
- Nikolay, Birgit; Diallo, Mawlouth; Boye, Cheikh Saad Bouh; Sall, Amadou Alpha. Usutu Virus in Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11 (11): 1417–1423. November **2011.**
- Ostlund EN, Crom RL, Pedersen DD, Johnson DJ, Williams WO, Schmitt BJ Equine West Nile encephalitis, United States *Emerg. Infect. Dis.* 7: 665-9. **2001.**
- Palmieri C, Franca M, Uzal F, Anderson M, Barr B, Woods L, Moore J, Woolcock P, Shivaprasad HL: Pathology and immunohistochemical findings of West Nile virus infection in psittaciformes. *Vet Pathol* 48:975–984. **2011.**
- Papa, A.; Perperidou, P.; Tzouli, A.; Castilletti, C. West Nile virus--neutralizing antibodies in humans in Greece. *Vector Borne Zoonotic. Dis.* 10, 655–658. **2010.**
- Papin, J.F.; Vahrson, W.; Dittmer, D.P. SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile Virus circumvents false-negative results due to strain variability. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1511–1518. **2004.**

- Papin, J.F.; Vahrson, W.; Larson, L.; Dittmer, D.P. Genome-wide real-time PCR for West Nile virus reduces the false-negative rate and facilitates new strain discovery. *J. Virol. Methods* 169, 103–111. 2010 Oct;169(1):103-11. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.07.005. Epub Jul 14 **2010**.
- Pauli AM, Cruz-Martinez LA, Ponder JB, Redig PT, Glaser AL, Klauss G, Schoster JV, Wunschmann A: Ophthalmologic and oculopathologic findings in red-tailed hawks and Cooper's hawks with naturally acquired West Nile virus infection. *J Am Vet Med Assoc* 231:1240–1248. **2007**.
- Pauli G, Bauerfeind U, Blümel J, et al. West-Nil-Virus. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*. 55:1024–1043. **2012**.
- Pauli George, Dr Ursula Bauerfeind, Dr Johannes Blümel, Prof Dr Reinhard Burger, Prof Dr Christian Drosten, Dr Albrecht Gröner, Prof Dr Lutz Gürtler, Dr Margarethe Heiden, Prof Dr Martin Hildebrandt, Prof Dr Dr Bernd Jansen, Dr Ruth Offergeld, Dr Rainer Seitz,* Dr Uwe Schlenkrich, Dr Volkmar Schottstedt, Dr Johanna Strobel, and Dr Hannelore Willkommen; *Transfus Med Hemother*. Feb 2014; 41(1): 73–82. doi: 10.1159/000357106. Published online Dec 23, **2013**.
- Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Pagina PL, Stramer SL, Stoibierski MG, Segni K, Newman B, Kapoor H, Goodman JL, Chamberland ME; La trasmissione del virus del Nilo occidentale attraverso la trasfusione di sangue negli Stati Uniti nel

2002. West Nile Virus Trasmissione Investigation Team; N Engl J Med 2003 25 Settembre; 349 (13): 1236-1245. Epub 18 set **2003**.

- Pecorari, M.; Longo, G.; Gennari, W.; Grottola, A.; Sabbatini, A.; Tagliazucchi, S.; Savini, G.; Monaco, F.; Simone, M. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August September 2009. Eurosurveillance 14 (50). PMID 20070936. 17 December **2009**.
- Petersen LR, Marfin AA, Gubler DJ West Nile virus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 290: 524-528. **2003**.
- Peterson AT, Vieglais DA, Andreasen JK: Migratory birds modeled as critical transport agents for West Nile Virus in North America. Vector Borne Zoonot Dis, 3:27–37, **2003**.
- Petrovic T., A. B. Bl'azquez, D. Lupulovi'c et al.; Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: first isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. Eurosurveillance, vol. 18, no. 44, **2013**.
- Platonov E., M. V. Fedorova, L. S. Karan, T. A. Shopenskaya, O. V. Platonova, and V. I. Zhuravlev; Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. Parasitology Research, vol. 103, supplement 1, pp. S45–S53, **2008**.
- Prince, H.E.; Tobler, L.H.; Yeh, C.; Geftter, N.; Custer, B.; Busch, M.P. Persistence of West Nile virus-specific antibodies in viremic blood donors. Clin. Vaccine Immunol. 14, 1228–1230. **2007**.

- Rabel, P.O.; Planitzer, C.B.; Farcet, M.R.; Orlinger, K.K.; Ilk, R.; Barrett, P.N.; Kreil, T.R. Increasing West Nile virus antibody titres in central European plasma donors from 2006 to 2010. *Euro Surveill.* 16, pii: 19812. **2011.**
- Rizzo F, Cerutti F, Ballardini M, Mosca A, Vitale N, Radaelli MC, Desiato R, Prearo M, Pautasso A, Casalone C, Acutis P, Peletto S1, Mandola ML. Molecular characterization of flaviviruses from field-collected mosquitoes in northwestern Italy, 2011-2012. *Parasit Vectors.* 7:395. **2014.**
- Rondini, S.; Pingle, M.R.; Das, S.; Tesh, R.; Rundell, M.S.; Hom, J.; Stramer, S.; Turner, K.; Rossmann, S.N.; Lanciotti, R.; et al. Development of multiplex PCR-ligase detection reaction assay for detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2269–2279. **2008.**
- Salazar P, Traub-Dargatz JL, Morley PS, Wilmot DD, Steffen DJ, Cunningham WE, Salman MD Outcome of equids with clinical signs of West Nile virus infection and factors associated with death. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 225:267-274. **2004.**
- Salvadori C, Arispici M, Gandini G, Cantile C, Aspetti clinicopatologici differenziali delle malattie neurologiche centrali del cavallo. *Ippologia*, Anno 18, n 4. **2007.**
- Samuel, M.A.; Diamond, M.S. Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J. Virol.* 79, 13350–13361. **2005.**

- Samuel, M.A.; Diamond, M.S. Pathogenesis of West Nile Virus infection: A balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J. Virol.* 80, 9349–9360. **2006**.
- Samuel, M.A.; Wang, H.; Siddharthan, V.; Morrey, J.D.; Diamond, M.S. Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 104, 17140–17145. **2007**.
- Sanchez-Seco, M.P.; Rosario, D.; Domingo, C.; Hernandez, L.; Valdes, K.; Guzman, M.G.; Tenorio, A. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J. Virol. Methods* 126, 101–109; **2005**.
- Santi Annalisa, Gualtiero Gandini, Antonella Gallucci, Silvia Dell’Anna, Marco Tamba. Considerazioni sulla sorveglianza passiva della West Nile Disease negli equidi. L’esperienza dell’Emilia-Romagna nel triennio 2008-2010; Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 01/08/2011 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 16/02/2012.
- Saxena, S.K.; Singh, A.; Mathur, A. Antiviral effect of nitric oxide during Japanese encephalitis virus infection. *Int. J. Exp. Pathol.* 81, 165–172. **2000**.
- Scaramozzino, N.; Crance, J.M.; Jouan, A.; DeBriel, D.A.; Stoll, F.; Garin, D. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse

transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1922–1927. **2001**.

- Scherret J. H., Mackenzie J. S., Hall R. A., Deubel V. And Gould E. A.. Phylogeny and molecular epidemiology of West Nile and Kunjin viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 267:373-390. **2002**.
- Senne DA, Pedersen JC, Hutto DL, Taylor WD, Schmitt BJ, Panigrahy B: Pathogenicity of West Nile virus in chickens. *Avian Dis* 44:642–649. **2000**.
- Shi, P.Y.; Kauffman, E.B.; Ren, P.; Felton, A.; Tai, J.H.; Dupuis, A.P., 2nd; Jones, S.A.; Ngo, K.A.; Nicholas, D.C.; Maffei, J.; et al. High-throughput detection of West Nile virus RNA. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1264–1271. **2001**.
- Shrestha (A), B.; Wang, T.; Samuel, M.A.; Whitby, K.; Craft, J.; Fikrig, E.; Diamond, M.S. Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection. *J. Virol.* 80, 5338–5348. **2006**.
- Shrestha (B), B.; Samuel, M.A.; Diamond, M.S. CD8⁺ T cells require perforin to clear West Nile virus from infected neurons. *J. Virol.* 80, 119–129. **2006**.
- Steele KE, Linn MJ, Schoepp RJ, Komar N, Geisbert TW, Manduca RM, Calle PP, Raphael BL, Clippinger TL, Larsen T, Smith J, Lanciotti RS, Panella NA, McNamara TS: Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999

outbreak in New York City, New York. *Vet Pathol*, 37:208–224. **2000**.

- Steinman A, Banet-Noach C, Tal S, Levi O, Simanov L, Perk S, Malkinson M, Shpigel N. West Nile virus infection in crocodiles in *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 9, n° 7, pp. 887–9, DOI:10.3201/eid0907.020816, PMC 3023443, PMID 12899140. Luglio **2003**.
- Stockman J, Hawkins MG, Burns RE, Fang Y, Brault AC, Lowenstine LJ: West Nile virus infection in a green-winged macaw (*Ara chloropterus*). *Avian Dis* 54:164–169. **2010**.
- Stramer, S.L. Reacting to an emerging safety threat: West Nile virus in North America. *Dev. Biol.* 127, 43–58. **2007**.
- Swayne DE, Beck JR, Zaki S: Pathogenicity of West Nile virus for turkeys. *Avian Dis*, 44:932–937. **2000**.
- Swayne DE, Beck JR, Smith CS, Shieh WJ, Zaki SR: Fatal encephalitis and myocarditis in young domestic geese (*Anser anser domesticus*) caused by West Nile virus. *Emerg Infect Dis*, 7:751–753. **2001**.
- Tolari F, Bandecchi P; Malattie di interesse veterinario da Flavivirus e Pestivirus. ARACNE editrice S.r.l. pp: 9-12; 75-76; 87-101. I edizione, marzo **2011**.
- Thiel H.-J., Collett M. S. et al., «Genus Flavivirus». In: C. M. Fauquet, M. A. Mayo et al., Eighth Report of the International

Committee on Taxonomy of Viruses. London; San Diego: Elsevier, **2005**.

- Tsai TF1, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet*. 352(9130):767-71. **1998**.
- Vazquez A., Jimenez-Clavero M., Franco L., Donosomantke O., Sambri V., Niedrig M., Zeller H., Tenorio A. Usutu Virus: potential risk of Human disease in Europe. *Euro Surveill*. 16 (31), pii: 19935. **2011**.
- Verma, S.; Lo, Y.; Chapagain, M.; Lum, S.; Kumar, M.; Gurjav, U.; Luo, H.; Nakatsuka, A.; Nerurkar, V.R. West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology*, 385, 425–433. **2009**.
- Vlachakis D: Theoretical study of the Usutu virus helicase 3D structure, by means of computer-aided homology modelling. *Theor Biol Med Model* 6:9. **2009**.
- Wang, T.; Scully, E.; Yin, Z.; Kim, J.H.; Wang, S.; Yan, J.; Mamula, M.; Anderson, J.F.; Craft, J.; Fikrig, E. IFN-gamma-producing gamma delta T cells help control murine West Nile virus infection. *J. Immunol*. 171, 2524–2531. **2003**.
- Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA: Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10:1366–1373. **2004**.

- Wang, S.; Welte, T.; McGargill, M.; Town, T.; Thompson, J.; Anderson, J.F.; Flavell, R.A.; Fikrig, E.; Hedrick, S.M.; Wang, T. Drak2 contributes to West Nile virus entry into the brain and lethal encephalitis. *J. Immunol.* 181, 2084–2091. **2008**.
- Ward MP, Schuermann JA, Highfield LD, Murray KO (2006) Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. *Vet. Microbiol.* Dec 20; 118(3-4): 255-9 Epub **2006**.
- Weese Scott J, Baird JD, DeLay J, Kenney DG, Staempfli HR, Viel L, Parent J, Smith-Maxie L, Poma R West Nile virus encephalomyelitis in horses in Ontario: 28 cases. *Can. Vet. J.* 44:469-473. **2003**.
- Weingartl HM, Neufeld JL, Cops J, Marszal P: Experimental west nile virus infection in blue jays (*Cyanocitta cristata*) and crows (*Corvus brachyrhynchos*). *Vet Pathol* 41:362–370. **2004**.
- Weissenböck, H.; Kolodziejek, J.; Url, A.; Lussy, H.; Rebel-Bauder, B.; Nowotny, N. Emergence of Usutu virus, an African Mosquito-Borne Flavivirus of the Japanese Encephalitis Virus Group, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases* 8 (7): 652–656. July **2002**.
- Welte, T.; Reagan, K.; Fang, H.; Machain-Williams, C.; Zheng, X.; Mendell, N.; Chang, G.J.; Wu, P.; Blair, C.D.; Wang, T. Toll-like receptor 7-induced immune response to cutaneous West Nile virus infection. *J. Gen. Virol.* 90, 2660–2668. **2009**.

- Wilson, J.R.; de Sessions, P.F.; Leon, M.A.; Scholle, F. West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J. Virol.* 82, 8262–8271. **2008**.
- Wunschmann A (A), Shivers J, Carroll L, Bender J: Pathological and immunohistochemical findings in American crows (*Corvus brachyrhynchos*) naturally infected with West Nile virus. *J Vet Diag Invest* 16:329–333. **2004**.
- Wunschmann A (B), Shivers J, Bender J, Carroll L, Fuller S, Saggese M, van Wettere A, Redig P: Pathologic findings in red-tailed hawks (*Buteo jamaicensis*) and Cooper's hawks (*Accipiter cooperi*) naturally infected with West Nile virus. *Avian Dis* 48:570–580. **2004**.
- Wunschmann A, Shivers J, Bender J, Carroll L, Fuller S, Saggese M, van Wettere A, Redig P: Pathologic and immunohistochemical findings in goshawks (*Accipiter gentilis*) and great horned owls (*Bubo virginianus*) naturally infected with West Nile virus. *Avian Dis* 49:252–259. **2005**.
- Xiao SY, Guzman H, Zhang H, Travassos da Rosa APA, Tesh RB, West Nile Virus Infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*): A Model for West Nile Encephalitis, *Emerging Infectious Diseases*, Vol 7, No 4. **2001**.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 13: 134. **2012**.

- 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.* 23:147-156. **2004.**
- Ziegler U, Angenvoort J, Fischer D, Fast C, Eiden M, Rodriguez AV, Revilla-Fernandez S, Nowotny N, de la Fuente JG, Lierz M, Groschup MH: Pathogenesis of West Nile virus lineage 1 and 2 in experimentally infected large falcons. *Vet Microbiol* 161:263–273. **2013.**
- Zehender Gianguglielmo, Erika Ebranati, Flavia Bernini, Alessandra Lo Presti, Giovanni Rezza, Mauro Delogu, Massimo Galli, Massimo Ciccozzi; Phylogeography and epidemiological history of West Nile virus genotype 1a in Europe and the Mediterranean basin. *Infection, Genetics and Evolution* 11 646–653; Article history: Received 3 December 2010, Received in revised form 3 February 2011, Accepted 4 February 2011, Available online 12 February 2011. **2011.**

SITOGRAFIA

- Allnaturalpetcare:
<http://allnaturalpetcare.com/blog/2014/06/24/west-nile-virus-info-natural-prevention-pets/>
- Cesmet: <http://www.cesmet.com/it/malattia-febbre-da-west-nile-virus>
- Ecdc-A: http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fevermaps/Pages/historical-data.aspx
- Ecdc-B:
http://www.ecdc.europa.eu/en/press/news/_layouts/forms/News_DispatchForm.aspx?List=8db7286c-fe2d-476c-9133-18ff4cb1b568&ID=1123
- Eur-lex.europa: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:159:0046:0090:EN:PDF>
- Epicentro: <http://www.epicentro.iss.it/problemi/westNile/notiziario-22-10-08.asp>
- Episouthnetwork:
<http://www.episouthnetwork.org/sites/default/files/outputs/notewestnileepisouth201020112012june2013.pdf>

- Italia.indettaglio:
http://italia.indettaglio.it/ita/toscana/firenze_fucecchio_sanpiero.html#dati_istat
- Izler-A:
http://www.izsler.it/izs_home_page/archivio_news/00000020_Informativa_West_Nile.html
- Izler-B: www.izsler.it.
- OIE: <http://www.oie.int>
- Uniprot: <http://www.uniprot.org/uniprot/P06935>
- VeterinariaAlimenti:
http://www.veterinariaalimenti.marche.it/viewdoc.asp?CO_ID=4898
- Vetjournal-A:
<http://www.vetjournal.it/approfondimento.php?codnotizia=3941>
- Vetjournal-B:
<http://www.vetjournal.it/approfondimento.php?codnotizia=4473>
- Viralzone: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/43.html

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare di cuore il Professor Francesco Tolari per la sua disponibilità e professionalità.

Un ringraziamento speciale al Dottor Maurizio Mazzei, prezioso nei suoi consigli e sempre pronto a prestarmi aiuto.

Ringrazio inoltre il Dottor Mario Forzan, la Dottoressa Maria Luisa Carrozza, la Professoressa Patrizia Bandecchi e la carissima Giorgia Tozzini.

Un ringraziamento particolare ai miei genitori e a mio fratello per l'incoraggiamento, il supporto e l'amore di cui mi hanno circondato ogni giorno.

Ringrazio infine Yari, Martina, il mio adorato gruppetto universitario (Daniela, Isabella, Manuele e Sara) e tutti i miei preziosi amici.