



***Riunione della Sezione Triveneto***

# ***Encefalite da West-Nile virus***

## ***Clinica ed esperienza pratica***

**Marco Simonetto**

UOA Neurologia  
Ospedale di Cittadella  
AULSS6 Euganea

**Sala Convegni Torre di Malta  
Cittadella (Padova)  
17 maggio 2019**

# Programma

---

- **Epidemiologia**
  - Storia
  - Diffusione
  - Trasmissione
    - Problematiche di salute pubblica
- **Clinica**
  - WN "fever"
  - WN "forma Neuroinvasiva"
- **Trattamento**
  - Farmaci
  - Vaccini
- ***Esperienza clinica "epidemia WNV estate 2018"***

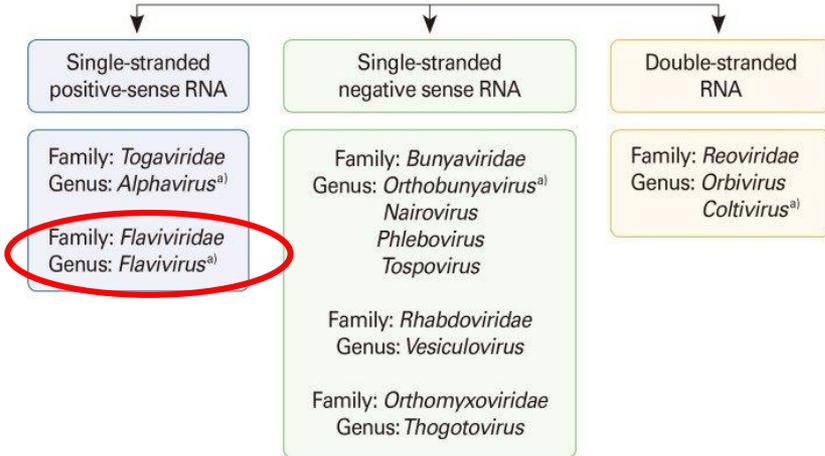
# Programma

---

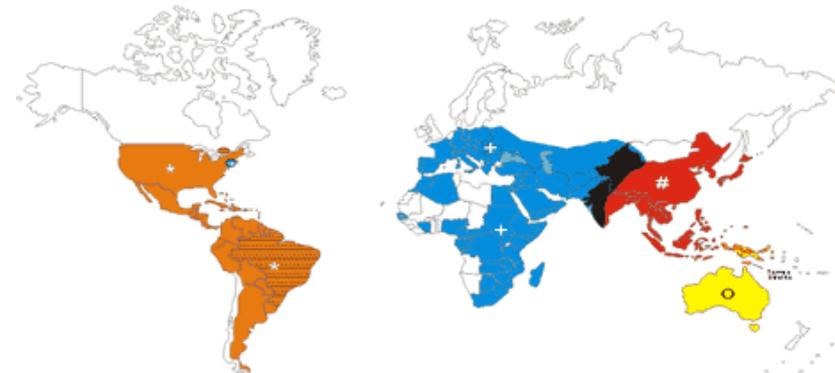
- **Epidemiologia**
  - Storia
  - Diffusione
  - Trasmissione
    - Problematiche di salute pubblica
- Clinica
  - WN "fever"
  - WN "forma Neuroinvasiva"
- Trattamento
  - Farmaci
  - Vaccini
- *Esperienza clinica "epidemia WNV estate 2018"*

# Scoperta WN Virus

## Arboviruses



The Japanese Encephalitis Serocomplex of the Family Flaviviridae



- St. Louis
- Rocio and St. Louis (Brazil)
- West Nile
- Japanese
- Japanese and Murray Valley
- Murray Valley and Kunjin



# Diffusione WNV in USA

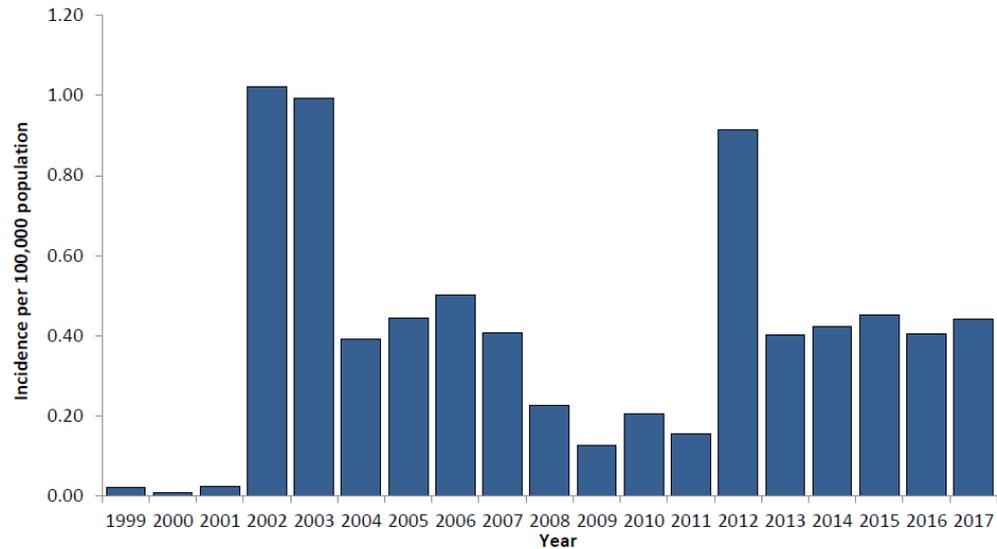
West Nile Virus Activity by State – United States, 2018 (as of January 8, 2019)



\*WNV human disease cases or presumptive viremic blood donors. Presumptive viremic blood donors have a screening test which has not necessarily been confirmed.

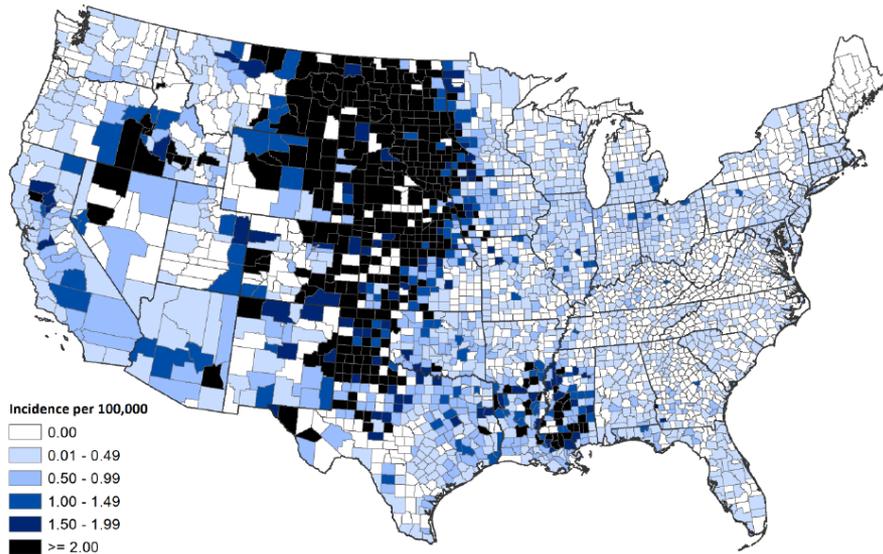
†WNV veterinary disease cases, or infections in mosquitoes, birds, or sentinel animals.

West Nile virus neuroinvasive disease incidence reported to CDC by year, 1999-2017

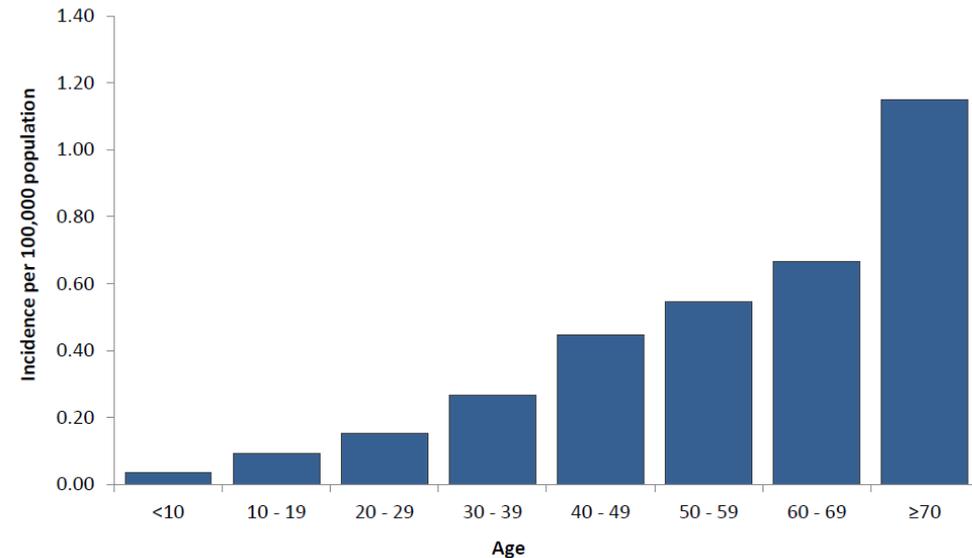


# “Forma Neuroinvasiva” in USA

Average annual incidence of West Nile virus neuroinvasive disease reported to CDC by county, 1999-2017



Average annual incidence of West Nile virus neuroinvasive disease reported to CDC by age group, 1999-2017





# Parametri epidemiologici

- **Tasso ospedalizzazione**

- WNf 8-38% (>65aa: 78%)
- WNme 81-86%

- **Durata degenza**

- WNm 4-5gg (15gg nella prima epidemia in NYC 1999)
- WNe 8-25gg
- AFP 11-68gg

- **“Recovery”**

- WNf 40-69%
- WNm 100%
- WNe 63% (20-33% dimessi a domicilio)
- AFP 7%

- **Mortalità**

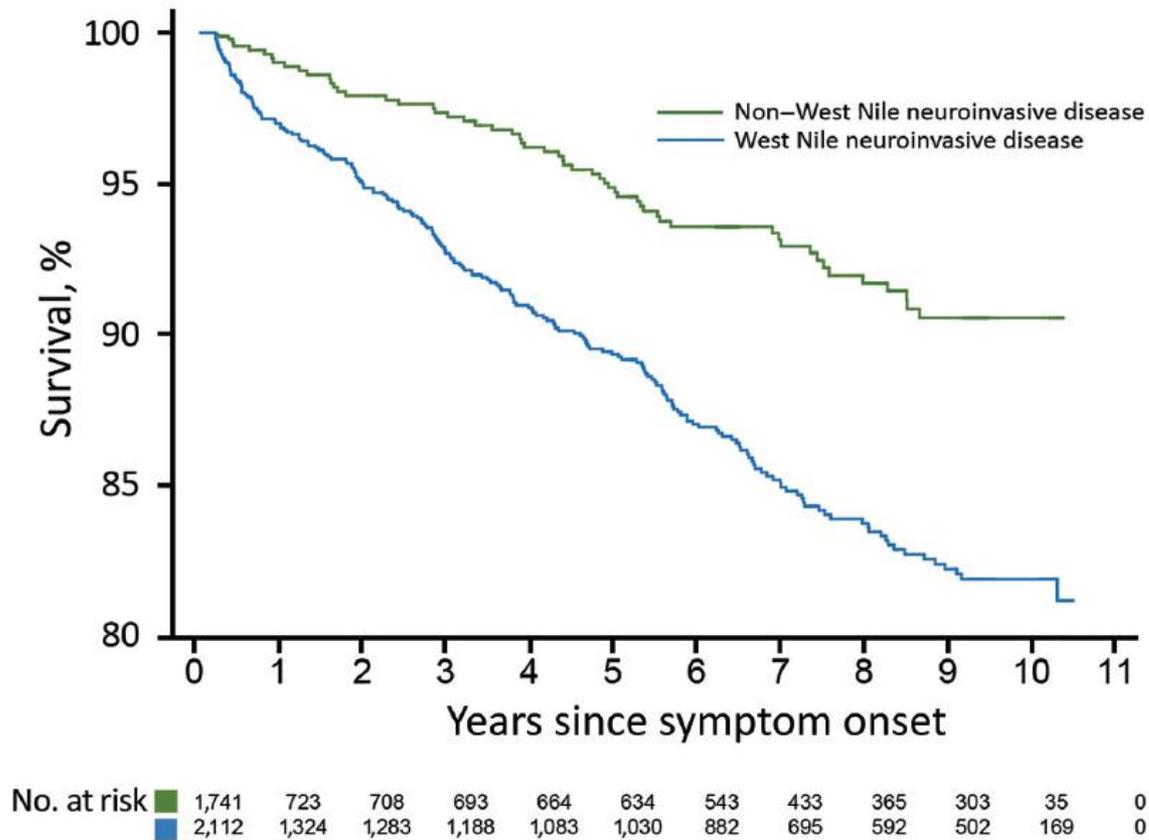
- WNf 0%
- WNm <2%
- WNe 11-18% (>65aa: 46%)
- AFP >50% con insufficienza respiratoria

# Acute and Delayed Deaths after West Nile Virus Infection, Texas, USA, 2002–2012

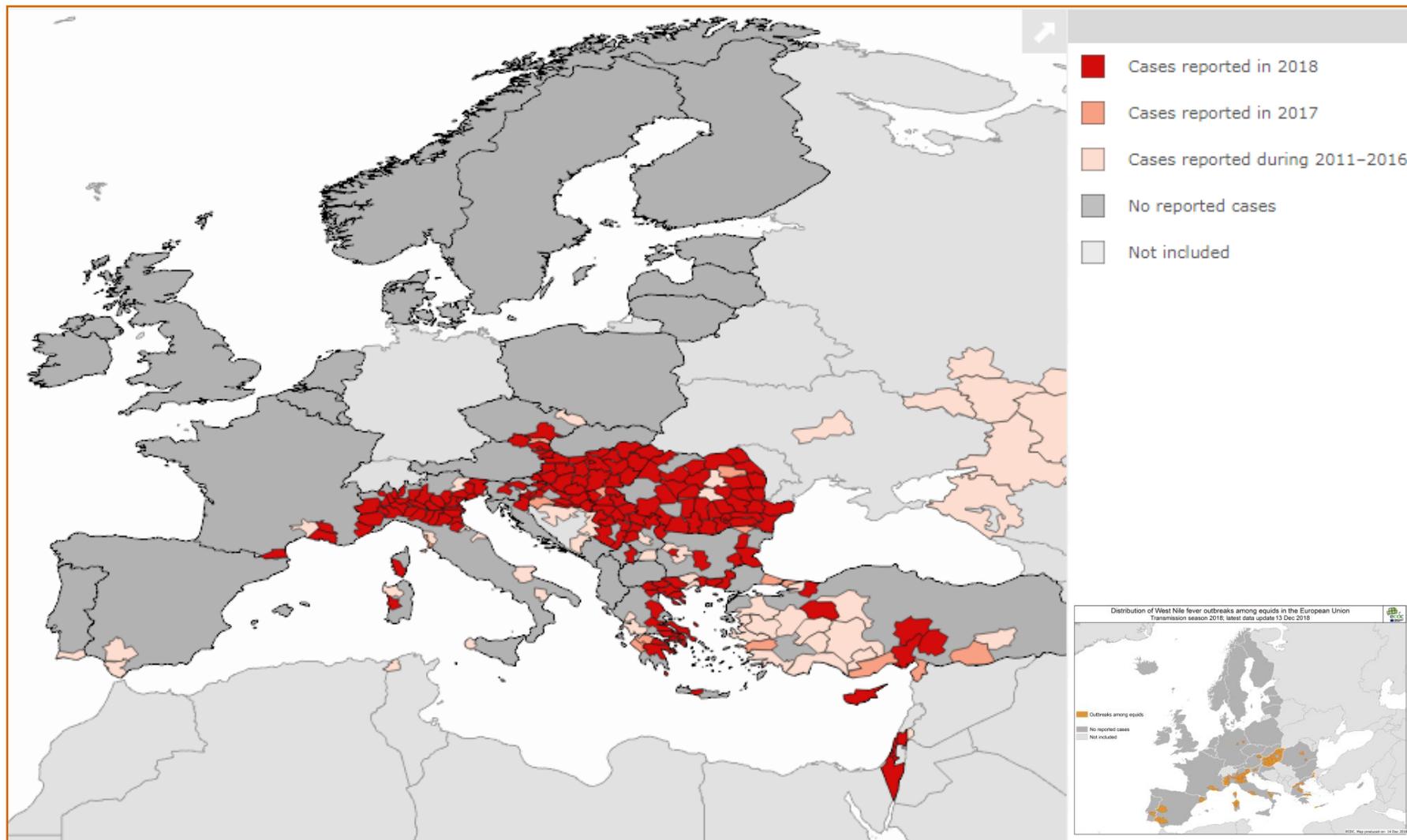
## Kaplan-Meier survival curve

David C.E. Philpott,<sup>1</sup> Melissa S. Nolan, Nicole Evert, Bonny Mayes, Dawn Hesalroad, Eric Fonken, Kristy O. Murray

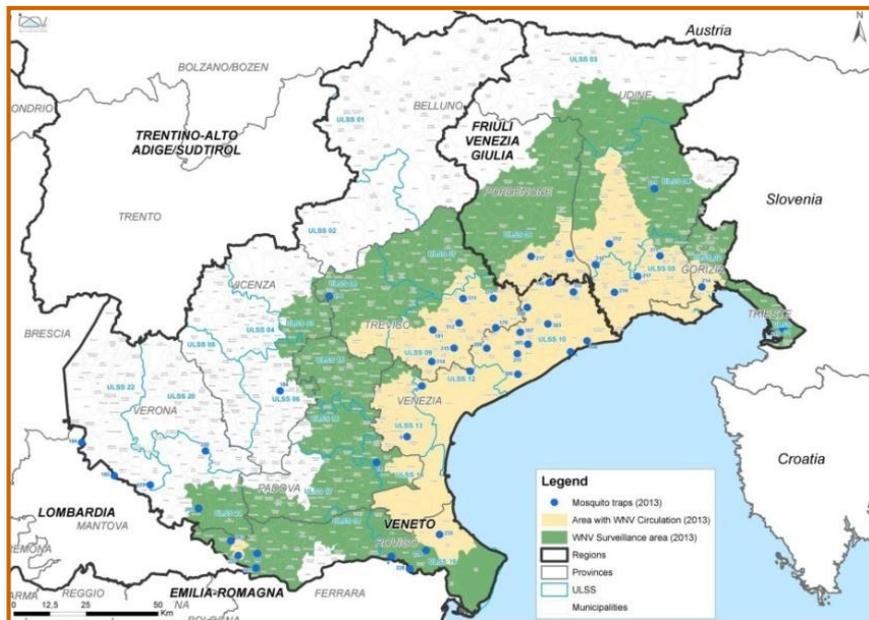
Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 25, No. 2, February 2019



# Presenza di WNV in Europa



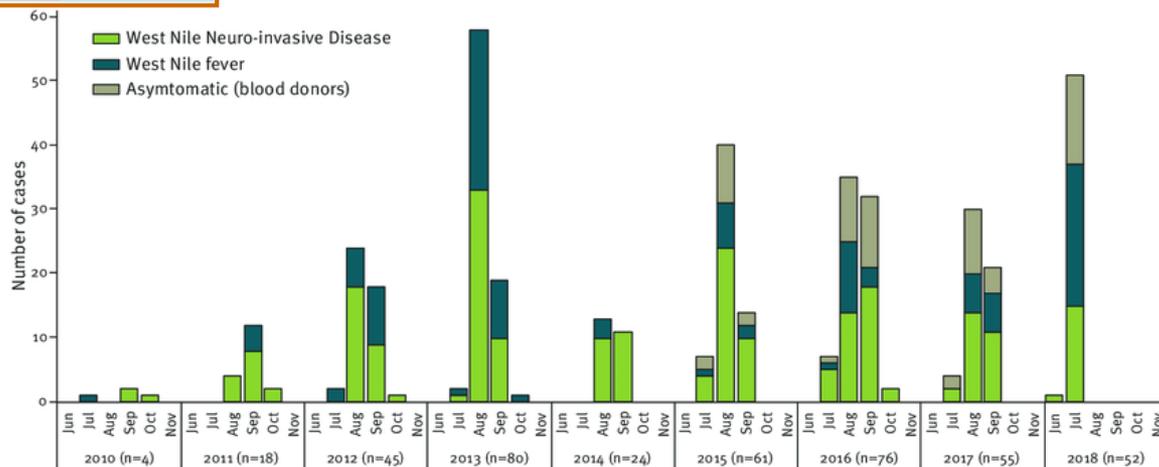
# Diffusione in "TriVeneto"



## RAPID COMMUNICATION

An early start of West Nile virus seasonal transmission: the added value of One Health surveillance in detecting early circulation and triggering timely response in Italy, June to July 2018

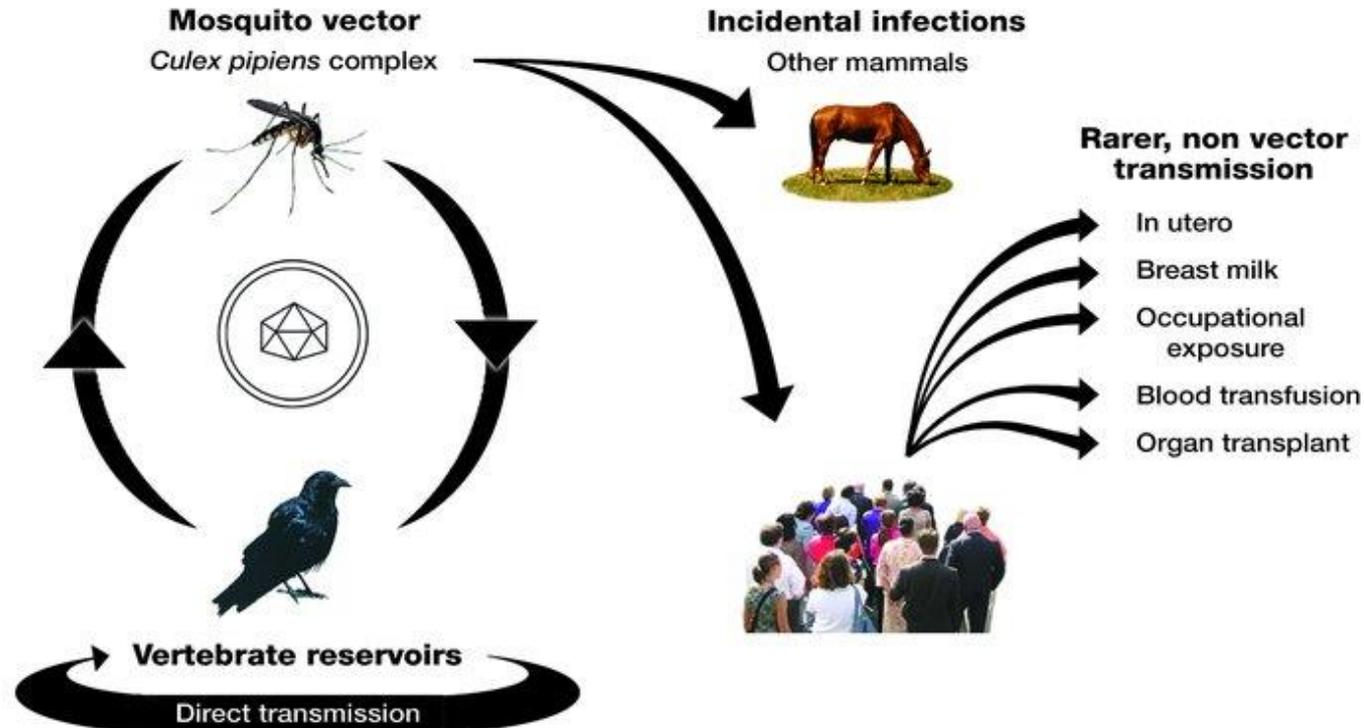
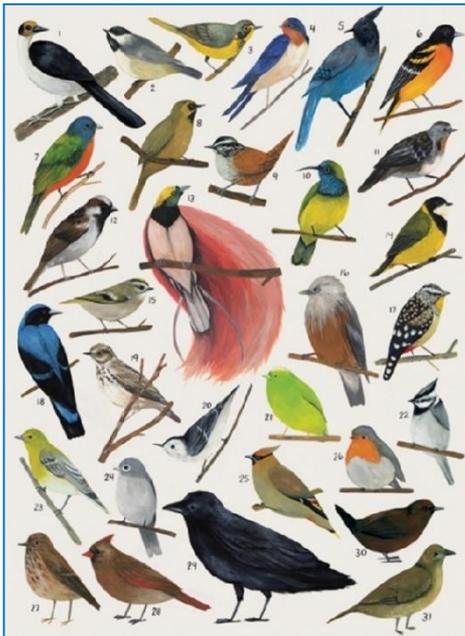
Flavia Riccardo<sup>1</sup>, Federica Monaco<sup>2</sup>, Antonino Bellat<sup>3</sup>, Giovanni Savini<sup>1</sup>, Francesca Russo<sup>3</sup>, Roberto Cagarelli<sup>4</sup>, Michele Dottori<sup>1</sup>, Caterina Rizze<sup>4</sup>, Giulietta Venturi<sup>1</sup>, Marco Di Luca<sup>5</sup>, Simonetta Pupella<sup>6</sup>, Letizia Lombardini<sup>6</sup>, Patrizio Pezzotti<sup>7</sup>, Patrizia Parodi<sup>8</sup>, Francesco Maraglino<sup>9</sup>, Alessandro Nanni Costa<sup>9</sup>, Giancarlo Maria Liumbruno<sup>9</sup>, Giovanni Rezza<sup>9</sup>, the working group<sup>10</sup>



# Trasmissione di WN virus



- La trasmissione all'uomo deriva dalla puntura di **zanzara**, specie **Culex**, che varia geograficamente.
- Gli uccelli, genere **Passeriformes**, sono il "**reservoir**". Sono asintomatici, probabilmente per la lunga durata di co-evoluzione virus/ospite.
- **Uomini**, cavalli e altri vertebrati sono **ospiti incidentali** e non sono importanti per la trasmissione. La viremia è di breve durata e di basso grado.



# Problemi di salute pubblica



Infection

October 2012, Volume 40, Issue 5, pp 557-562 | [Cite as](#)

West Nile virus transmission through organ transplantation in north-eastern Italy: a case report and implications for pre-procurement screening

Authors

Authors and affiliations

W. O. Inojosa , P. G. Scotton, R. Fuser, M. Giobbia, A. Paolin, M. C. Maresca, A. Brunello, E. Nascimben, C. Sorbara, R. Rigoli, R. Berti, G. B. Gajo, B. Giometto

- **Trapianto d'organo:** nel 2002 è stato segnalato il primo caso di trasmissione da organo. Un secondo evento è accaduto a nel 2005. Da allora segnalati altri casi in USA e 1 i Italia.
  - Essendo la ricerca di RNA nel sangue negativa, sembra che la trasmissione derivi dal virus presente nell'organo trapiantato.
- **Transplacentare:** nel 2002 1° caso di infezione congenita dopo il 2° trimestre. I bambini che hanno presentato alla nascita sintomi da WN sono nati da madri che hanno avuto sintomi entro 3 settimane dal parto.
  - E' stata documentata la trasmissione da latte materno
- **Donazioni di sangue:** è stata descritta la trasmissione attraverso il sangue, piastrine e plasma fresco congelato.
  - Lo screening nei laboratori ha eliminato il rischio di trasfusione-trasmissione del WN virus.



# Patogenesi

---

Review

## Immune Responses to West Nile Virus Infection in the Central Nervous System

Hyelim Cho <sup>1</sup> and Michael S. Diamond <sup>1,2,3,\*</sup>

### **Disseminazione** di WN virus dal sottocute si compie in 3 fasi:

- fase iniziale: replicazione nei cheratinociti e cell di Langerhans
  - fase disseminazione viscerale: replicazione virale nei linfonodi e conseguente viremia
  - fase neuroinvasiva
- 
- Nei modelli murini la viremia primaria si compie in 1 settimana e i livelli di virus nel SNC si elevano e iniziano i sintomi.

### **Immunità umorale**, come per altri flavivirus, è critica per la protezione da WN virus.

- Topi knock-out per B-cell hanno elevati livelli di WN nel CNS e l'infezione è letale a basse dosi di virus rispetto ai controlli.
- La presenza di anticorpi neutralizzanti correla con la protezione da flavivirus, la trasmissione passiva di IgG può proteggere contro WN.

# Neuroinvasione

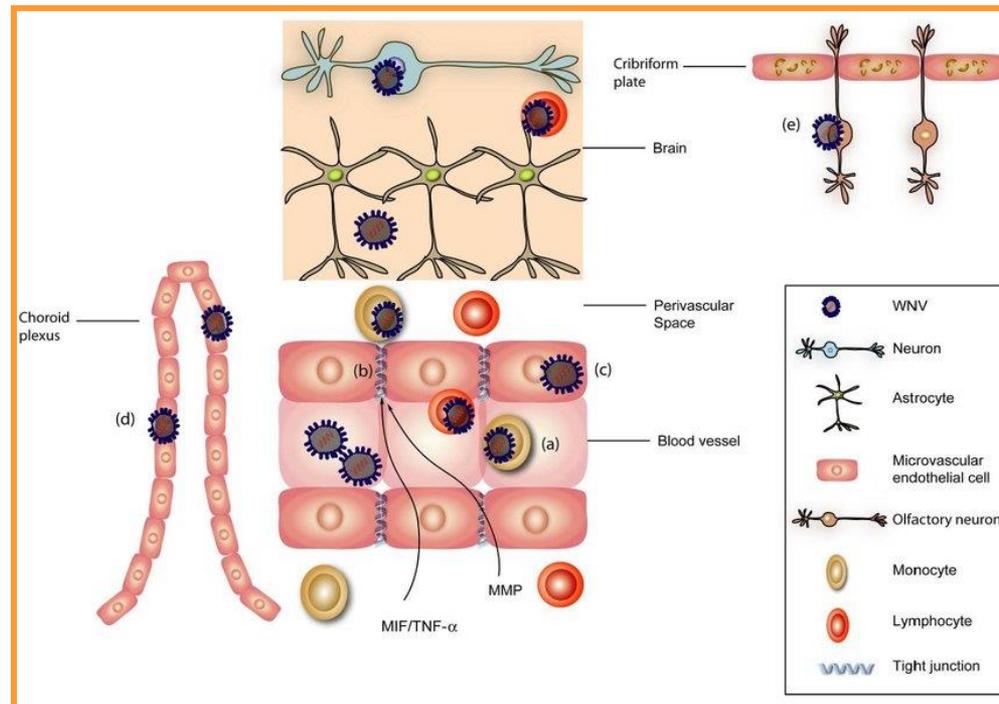
Review

## Immune Responses to West Nile Virus Infection in the Central Nervous System

Hyelim Cho <sup>1</sup> and Michael S. Diamond <sup>1,2,3,\*</sup>

### West-Nile virus penetra nel SNC mediante multipli meccanismi:

- Trasporto assonale retrogrado attraverso neuroni periferici nelle radici spinali
- Trasporto ematogeno attraverso la barriera emato-cerebrale
  - a. Modello "cavallo di Troia": trasporto intracellulare all'interno di macrofagi o neutrofili
  - b. Perdita dell'integrità della BBB mediata da citochine (TNF- $\alpha$ , MIF) o metalloproteasi
  - c. Infezione diretta delle cellule endoteliali dei vasi cerebrali
  - d. o dei plessi corioidei
  - e. Infezione diretta dei neuroni olfattori adiacenti alla lamina cribriforme.



# Programma

---

- Epidemiologia
  - Storia
  - Diffusione
  - Trasmissione
    - Problematiche di salute pubblica
- **Clinica**
  - WN "fever"
  - WN "forma Neuroinvasiva"
- Trattamento
  - Farmaci
  - Vaccini
- *Esperienza clinica "epidemia WNV estate 2018"*



- **La maggior parte dei pazienti infettati è asintomatica.**
- I sintomi sono presenti nel 20-40% dei pz.
- Periodo d'incubazione 2-14gg.
- Convalescenza: astenia, deficit mnesici, cefalea, disequilibrio.
- Una volta guariti, l'immunità si pensa sia a vita.



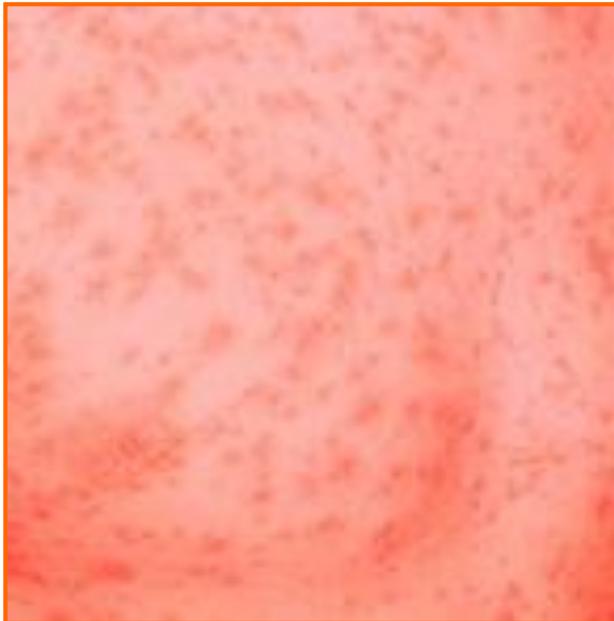
# “WN fever”

Review

West Nile virus

Dr Grant L. Campbell <sup>1</sup>, Anthony A. Marfin <sup>2</sup>, Robert S. Lanciotti <sup>3</sup>, Duane J. Gubler <sup>3</sup>

- **Malattia autolimitantesi, indistinguibile da altre sindromi virali.**
- Clinica: febbre (o febbrecola), cefalea, malessere, lombalgia, mialgie, anoressia. Talora: dolore oculare, faringite, nausea, vomito, diarrea, addominalgie, linfoadenopatia.
- La fase acuta dura 3-10gg.
- Rush (25-50% dei pz) a torace, dorso, arti; di tipo morbilliforme o maculo-papulare; talora con prurito e disestesie. Compare con la caduta della piressia e dura meno di 7gg. Il rush si associa a minor rischio di forma neuroinvasiva e morte.



# Forma Neuroinvasiva (WNND)

---

Le manifestazioni cliniche "MAGGIORI" sono:

- **Meningite:**
  - Sintomi soggettivi: cefalea, mialgie diffuse, fotofobia, vomito
  - Sintomi obiettivi: febbre, disturbi della coscienza, segni meningei (rigor nuchalis, Brudzinski, Lasègue).
  
- **Encefalite:**
  - Sintomi generali: febbre, astenia, mialgie diffuse, malessere, VES elevata, leucocitosi
  - Sintomi neurologici: alterazioni della coscienza (da stato confusionale transitorio a severa encefalopatia con coma e morte); crisi epilettiche, mioclonie, sdr ipertensione endocranica, sdr meningea; deficit focali, disturbi cognitivi/psichici.
  
- **Paralisi flaccida acuta (AFP):** WNV attacca le corna anteriori del midollo spinale (come la poliomielite) provocando un'ipostenia asimmetrica agli arti inferiori, ingravescente (fino alla tetraplegia con deficit ventilatorio) entro 48h dall'inizio dei sintomi, con o senza segni di meningite/encefalite.
  
- **Poliradicolonevrite acuta:** paralisi progressiva degli arti con andamento disto-proximale (simil-sindrome di Guillain-Barré).

Queste forme tutte assieme registrano una **mortalità fino al 10%** e i fattori di rischio sono: l'età avanzata, il genere maschile, l'ipertensione arteriosa, le malattie cardiovascolari, il cancro, il diabete, l'HCV, l'alcolismo, l'immunodepressione.

# Forme neurologiche "MINORI"

- Disordini del SNP:
  - plessopatia brachiale,
  - neuropatia demielinizzante,
  - assonopatia motoria,
  - polineuropatia assonale,
  - forme simil-mistena gravis
  
- Sintomi poco comuni:
  - paralisi nn cranici (diplegia facciale),
  - vertigini,
  - disartria,
  - crisi epilettiche,
  - atassia cerebellare,
  - disfagia.



September 30, 2008; 71 (14) **NEUROIMAGES**

## Multifocal neuropathy associated with West Nile virus infection

Nathan Sumner, Lyell Jones

April 24, 2012; 78 (1 Supplement) **APRIL 24, 2012**

## West Nile Virus Infection Associated with Central Nervous System Vasculitis and Strokes (P03.264)

Sahar Zafar, Debadutta Dash, Michael Chachere, Jennifer Cowart, Joseph Kass

February 12, 2013; 80 (7 Supplement) **MARCH 21, 2013**

## Pontine Demyelination Mimicking Central Pontine Myelinolysis in the Setting of Acute Neuroinvasive West Nile Virus Infection (P06.180)

April 18, 2017; 88 (16 Supplement) **APRIL 23, 2017**

## Severe Dystonia as a Manifestation of West Nile Neuroinvasive Disease (P1.077)

Rachelle Herring, Daniel Savitt, Mered Parnes

# Altre manifestazioni cliniche

---

- **Apparato visivo:** corioretinite, emorragie retiniche, vitreiti; iridocicliti, vasculiti e uveiti.
- Altre forme poco comuni:
  - Rabdomiolisi
  - Febbre emorragica fatale con MOF
  - Epatite/pancreatite acuta
  - Diabete insipido
  - Miocardite
  - Miosite
  - Orchite

# Indagini diagnostiche

---

- **LCS:**
  - Esame chimico-fisico: normale nel 3-5%.
    - Leucocitosi moderata: <500 cellule/microL
    - Iperproteinorrachia: <150 mg/dL
  
- **NEUROIMAGING**
  - TC: negativa
  - RM positiva (a settimane dall'esordio): anomalie in DWI; aumento intensità in FLAIR e T2 (specie nei ggbb)
  
- **Studi neurofisiologici**
  - EEG: attività lenta generalizzata/focale, attività epilettiforme, onde trifasiche e FIRDA
  - ENG: SNAP normali, rallentamento/assenza onda F, CMAP ridotti
  - EMG: segni di denervazione acuta

## EEG in WNV Neuroinvasive Disease

Parsons, Angela M.<sup>\*</sup>; Grill, Marie F.<sup>\*</sup>; Feyissa, Anteneh M.<sup>†</sup>; Britton, Jeffrey<sup>‡</sup>; Hocker, Sara<sup>‡</sup>; Crepeau, Amy<sup>\*</sup>

Journal of Clinical Neurophysiology: March 2019 - Volume 36 - Issue 2 - p 135-140  
 doi: 10.1097/WNP.0000000000000558  
 Original Research

# Esami di laboratorio

---

**Nel sospetto di WNV inviare campione di: sangue, urine e liquor per:**

- **Test dimostrazione diretta: acido nucleico (sangue/urine)**
- **Test dimostrazione indiretta: anticorpi (liquor)**

**Dati anamnestici di supporto al test:**

1. Data esordio sintomi (*quando nota*)
2. Data raccolta campione
3. Stato immunologico del pz se alterato (*ad es. immunosoppressione*)
4. Indirizzo residenza pz
5. Diario di viaggio del pz
6. Storia vaccinale (*ad es. YF, JEV, TBE*)
7. Breve storia clinica

# Laboratorio analisi

## THE IMPORTANCE OF HAEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL FINDINGS IN PATIENTS WITH WEST NILE VIRUS NEUROINVASIVE DISEASE ZNAČAJ HEMATOLOŠKIH I BIOHEMIJSKIH NALAZA KOD BOLESNIKA SA NEUROINVAZIVNIM OBLIKOM GROZNICE ZAPADNOG NILA

Aleksandar Urošević<sup>1,2</sup>, Olga Dulović<sup>1</sup>, Branko Milošević<sup>1,2</sup>, Nebojša Maksić<sup>3</sup>, Nataša Popović<sup>2</sup>, Ivana Milošević<sup>1,2</sup>, Dragan Delić<sup>1,2</sup>, Djordje Jevtović<sup>1,2</sup>, Jasmina Poluga<sup>1,2</sup>, Jelena Jordović<sup>2</sup>, Sanja Peruničić<sup>2</sup>, Goran Stevanović<sup>1,2</sup>

## Interpretazione sierconversione

- Sieroconversione IgM si rileva 4-10gg dopo la viremia.
- Rilievo di IgM a distanza di mesi dall'infezione. (ECDC 2008)
  - IgM anti-WNV su siero rilevate fino a oltre 500 giorni dopo l'infezione acuta in più del 50% dei pz. (Roehrig JT et al. 2003)
  - persistenza di titoli di IgM a 1 e 8 anni dall'infezione rispettivamente del 42% e del 23%. (Murray KO et al. 2013)
- Falsi positivi: se recente vaccino (YV o JEV) o infezione da altri *flavivirus*.

## Eeguire test di conferma su siero a 2 settimane dall'acuzie.

### Test PCR è indicato in pz:

- immunocompromessi
- gravi acuti
- con pregresse infezioni da *flavivirus*
- donatori (pz viremici spesso asintomatici).

Sample/method	Human	Equine	Bird	Mosquito
Specimen	Serum, plasma, CSF and tissue	Serum and tissue	Serum, tissue and oral swabs	Mosquito pools
Indirect detection	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ELISA (IgM, IgG, IgG avidity)</li> <li>• IFA</li> <li>• Seroneutralisation (PRNT)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ELISA (IgM, IgG)</li> <li>• Seroneutralisation (PRNT)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Domestic fowl: ELISA (IgM, IgG);</li> <li>• Wild birds: Competition ELISA, or indirect ELISA with commercial anti-multiple species conjugate;</li> <li>• Seroneutralisation</li> </ul>	
Direct virus detection	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RT-PCR</li> <li>• Isolation in cell culture</li> <li>• Immunohistochemistry</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RT-PCR</li> <li>• Isolation in cell culture</li> <li>• Immunohistochemistry</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapid immunochromatographic tests</li> <li>• RT-PCR</li> <li>• Isolation in cell culture</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapid immunochromatographic tests;</li> <li>• RT-PCR</li> <li>• Isolation in cell culture</li> </ul>

- **Criteri clinici:** qualsiasi pz con **febbre o almeno 1 dei seguenti:**
  - **Encefalite**
  - **Meningite**
- **Criteri di laboratorio**
  - **Caso probabile**
    - **IgM o IgG anti-WNV su siero**
  - **Caso confermato:** almeno 1 dei seguenti:
    - **Isolamento WNV su sangue o LCS**
    - **Rilievo di RNA WNV su sangue o LCS**
    - **Rilievo di IgM anti-WNV su LCS**
    - **Rilievo di IgM anti-WNV ad alto titolo, di IgG anti-WNV e test di neutralizzazione positivo.**
- **Criteri epidemiologici:** almeno 1 dei seguenti:
  - **Trasmissione animale-uomo** (residente in o viaggio o esposizione a zanzare in area WNV endemica per cavalli e uccelli) ○
  - **Trasmissione uomo-uomo** (verticale, trasfusione o trapianto d'organo)

# Classificazione Casi

**A. Caso Possibile: N/A**

**B. Caso Probabile:** qualsiasi persona che presenti criteri clinici e almeno 1 dei seguenti:

- Criterio epidemiologico o
- Criterio di laboratorio per caso probabile

**C. Caso Confermato:** qualsiasi persona che presenti criteri di laboratorio per caso confermato.

# Diagnosi differenziale

---

## Meningiti/Encefaliti

- **Batteriche:**
  - Meningococcica
  - Pneumococcica
  - ...
  
- **Virus:**
  - **VZV:** vescicole a pattern dermatomero, occasionalmente dà encefalite
  - **HSV:** anomalie temporali al neuroimaging
  - **Borrelia:** endemica in Europa-Russia
  - **Enterovirus:** nei mesi estivi è frequente encefalite/meningite
  - **Zika virus:** rash simile a WNV; neuropatia.
  - **Dengue virus:** cefalea associata a dolore a ossa/articolazioni; anamnesi positiva per viaggio in un'area endemica
  - **Encefalite giapponese (JEV)** se recente viaggio in Asia
  - **TBE:** meningoencefalite (vettore zecca)
  - **USUTUv ...**

# Flavivirus "emergente"

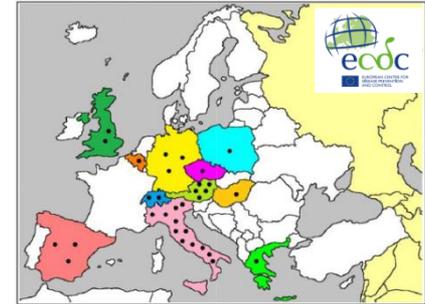
Review

## Usutu Virus: An Emerging Flavivirus in Europe

Usama Ashraf <sup>1,2,3</sup>, Jing Ye <sup>1,2,3</sup>, Xindi Ruan <sup>1,2,3</sup>, Shengfeng Wan <sup>1,2,3</sup>, Bibo Zhu <sup>1,2,3</sup>  
and Shengbo Cao <sup>1,2,3,\*</sup>

### USUTU VIRUS

- **isolato la prima volta nel 1959 in Sud Africa**
- Primi casi registrati
  - 1981 Rep. Centrafricana: adulto con febbre/rash cutaneo
  - 2004 B. Faso: bambino con febbre/ittero.
- 2001 Austria (Vienna): moria di merli
- **2008-2011 Italia** (Modena): studio retrospettivo su siero/LCS ha dimostrato come l'infezione umana non sia così infrequente e persino più diffusa di quella da WNV.
- 2009 Italia (E. Romagna): 2 pz immunocompromessi (entrambi sopravvissuti).
  - pz: febbre e sintomi neurologici al termine CT per linfoma a cellule B
  - pz: PTT, febbre ed epatite dopo viaggio in Egitto, e successivo stato di coma. L'epatite rese necessario il trapianto di fegato. Entrambi i pazienti ricevettero trasfusioni di plasma e non è chiaro se il virus sia stato acquisito naturalmente o con le trasfusioni.
- **2011 ab anti-USUV in donatori sangue asintomatici** in Italia e Germania e in pz con sintomi clinici in Croazia in concomitanza con infezione da WNV.



**Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009** Archived

# USUTU VIRUS

---

**Ciclo vitale simile a quello di altri membri del *serocomplex* JEV.**

- Isolato da numerose specie di zanzare che includono *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia* e *Mansonia*.
- Tra le specie aviarie, i merli eurasiari (*Turdus merula*) hanno mostrato la più elevata mortalità.

**Neuropatologia:** virus USUTU ha uno spiccato **tropismo per neuroni e glia**.

## Clinica

- **Sintomi aspecifici/d'irritazione meningea:** febbre, rash cutaneo, ittero, cefalea, rigidità nucale, tremore e ipereflessia.

# Programma

---

- Epidemiologia
  - Storia
  - Diffusione
  - Trasmissione
    - Problematiche di salute pubblica
- Clinica
  - WN "fever"
  - WN "forma Neuroinvasiva"
- **Trattamento**
  - Farmaci
  - Vaccini
- *Esperienza clinica "epidemia WNV estate 2018"*

# Terapia West-Nile Virus

---

- **La terapia per WNV è di supporto poiché mancano terapie antivirali specifiche WNV (fonte CDC).**
- Il trattamento prevede infusione di liquidi, antipiretici, antibiotici e antivirali.
- Vi sono studi clinici controllati, che hanno fatto seguito a "case reports/series", riguardo l'uso di farmaci (*ad es: IG ev, interferone, ribavirina e corticosteroidi*) per infezione da WNV e altri flavivirus, ma nessuno ha dimostrato chiari benefici.
- Alcuni gruppi hanno utilizzato IG policlonali o interferone-alfa per trattare pz riceventi d'organo o con severa immunodepressione affetti da WNV, ma non c'è provato beneficio.

# Terapie in studio

- Il ciclo vitale dei flavivirus dipende dal **metabolismo lipidico** della cellula ospite. In particolare, l'infezione richiede acidi grassi, biosintesi di colesterolo e sfingolipidi.
- Possibili target terapeutici:
  - inibizione enzimi della sintesi di acidi grassi : "fatty acid synthase" (FASN) o "acetyl-CoA carboxylase" (ACC),
  - inibizione metabolismo sfingolipidi o biosintesi colesterolo.
- **Terapie in studio**
  - Farmaco ipolipemizzante: **acido nordidroguaiaretico (NDGA)** ha dimostrato la proprietà di inibire la replicazione in DENV e HCV. NDGA è in fase di valutazione per svariate patologie: diabete, dolore, infiammazione, infertilità, reumatismi/artriti, calcoli renali. Un derivato sintetico metilato di NDGA: **tetra-O-methyl nordidroguaiaretic acid (M4N, Terameprocol, o EM-1421)** è in fase I/II in pz con cancro avanzato. Merino-Ramos T et al (2017) hanno dimostrato in vitro che NDGA e M4N riducono la moltiplicazione di WNV e ZIKV.
  - Jiménez de Oya N et al (2018) hanno testato in vitro "**PF-06409577**" (attivatore selettivo di AMPK) in cellule infettate da WNV, ZIKV e DENV. La molecola agisce inibendo la fosforilazione di ACC e di conseguenza la produzione di sfingolipidi con conseguente riduzione della replicazione virale.



ANTIVIRAL AGENTS



Antiviral Activity of Nordihydroguaiaretic Acid and Its Derivative Tetra-O-Methyl Nordihydroguaiaretic Acid against West Nile Virus and Zika Virus

Teresa Merino-Ramos, Nereida Jiménez de Oya, Juan-Carlos Saiz, Miguel A. Martín-Acebes

Direct Activation of Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) by PF-06409577 Inhibits Flavivirus Infection through Modification of Host Cell Lipid Metabolism

Nereida Jiménez de Oya,<sup>a</sup> Ana-Belén Blázquez,<sup>a</sup> Josefina Casas,<sup>b</sup> Juan-Carlos Saiz,<sup>a</sup> Miguel A. Martín-Acebes<sup>a</sup>

# Terapie in studio

---

- **Favipiravir: analogo nucleosidico** con potente azione contro virus a RNA.
  - Famarco già disponibile in Giappone contro il virus dell'influenza
  - Molecola in studio contro il virus dell'Ebola.
- **Escribano-Romero E et al (2017)** hanno dimostrato in vitro un'azione mutagenica in cellule infettate da WNV.



## Extinction of West Nile Virus by Favipiravir through Lethal Mutagenesis

© Estela Escribano-Romero,<sup>a</sup> Nereida Jiménez de Oya,<sup>a</sup> Esteban Domingo,<sup>b,c</sup> Juan Carlos Saiz<sup>a</sup>

# Terapie in studio

---

- **Farmaci immunomodulatori:**

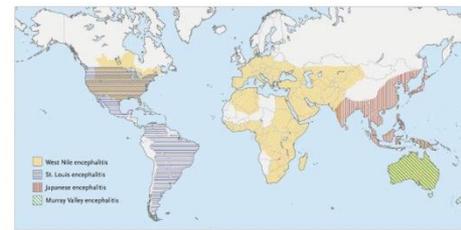
- antagonista Cxcr4 (AMD3100) ha un'azione di richiamo di cell T CD8+ nel SNC,
- anticorpo anti-VLA (integrina) blocca la migrazione di macrofagi produttori di NO

migliorando la sopravvivenza in forme WNND.

- Combinare queste terapie con anticorpi anti-virus potrebbe massimizzare la clearance del virus e minimizzare la neurodegenerazione

McCandless EE, PNAS 2008 – Diamond MS Antivir. Res. 2009 -Getts DR J. Neuroimmunol. 2012

# Vaccini per zoonosi da *Flavivirus*



“L’Organizzazione Mondiale della Sanità stima che la vaccinazione sia solo seconda all’acqua potabile per importanza come misura preventiva di trasmissione delle malattie infettive. I vaccini prevengono circa 6 milioni di morti nel mondo all’anno”.

- **Vaccini disponibili**

- **Japanese encephalitis virus (JEV)**: disponibili numerosi vaccini (inattivati, vivi attenuati e vivi ricombinanti), tutti derivati dal genotipo GIII, che sembra dia protezione crociata contro la maggior parte dei genotipi di JEV. La protezione anticorpale dura 2 anni.
- **Tick-borne encephalitis virus (TBE)**: disponibili 2 vaccini, entrambi contengono virus purificato inattivato.
- **Yellow fever virus (YF)**: vaccino vivo attenuato (YF-17D).

- **Vaccini in corso di sviluppo**

- **West Nile virus (WNV)**: esistono numerosi vaccini vivi/inattivati per equini. Due studi sull’uomo:
  - vaccino inattivato JE-VAX: non ha dato protezione.
  - JE-VAX + YF-17D: ha evidenziato livelli anticorpali neutralizzanti WNV
- **Dengue Virus**: vaccino CYD-TDV vivo attenuato in fase 3 (Messico).
- **Zika Virus**: null



Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Biochemical and Biophysical Research Communications

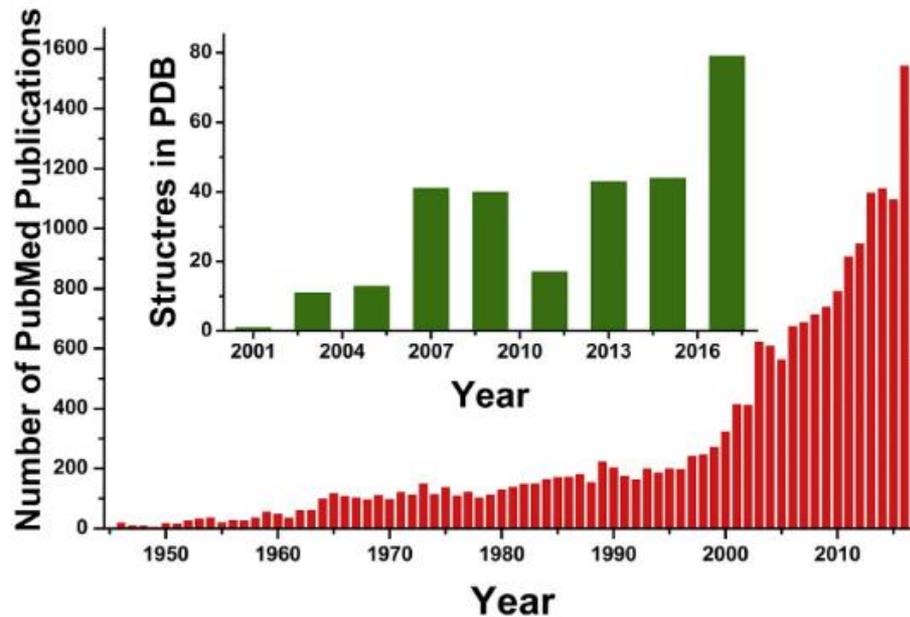
journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)



Interdisciplinary approaches to the study of flavivirus

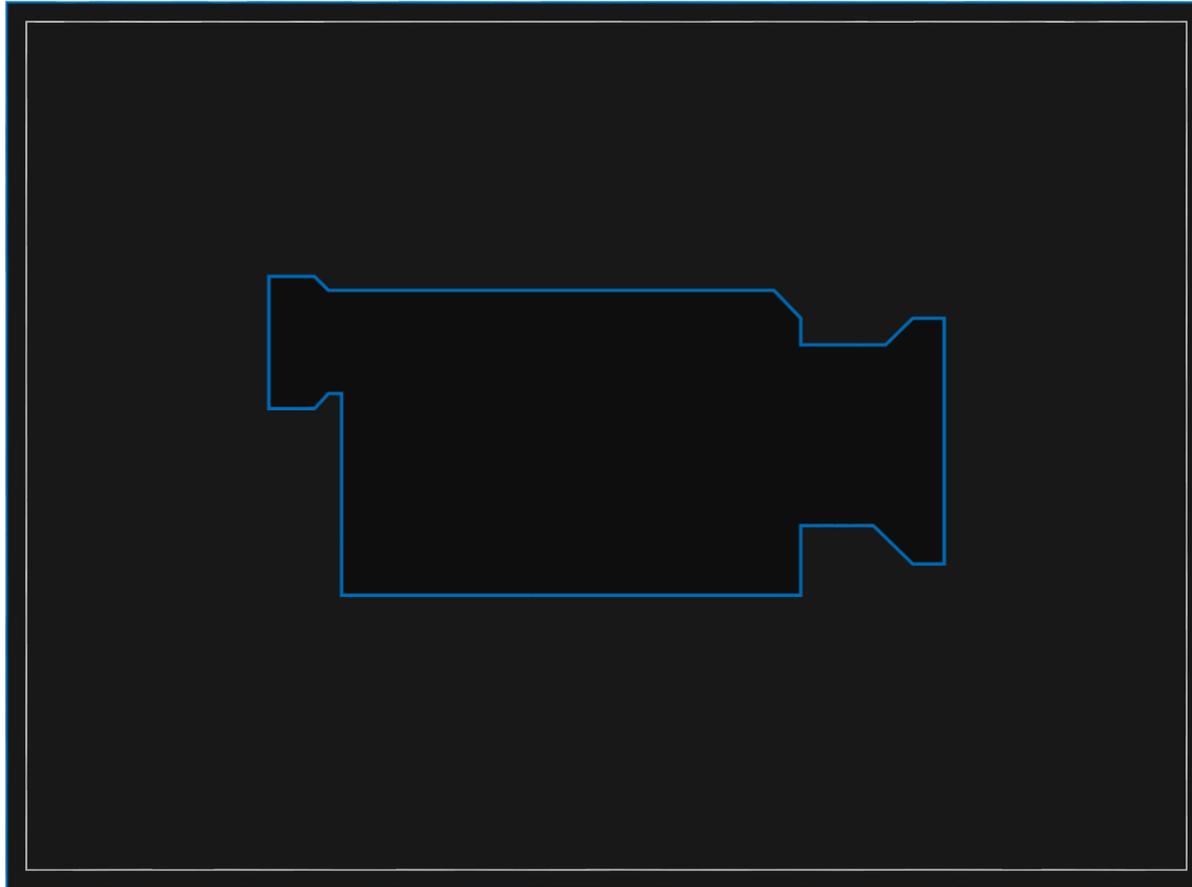


**Esistono metodi e applicazioni di biofisica (simulazioni di dinamica molecolare classica e quantistica) che riflettono la capacità di modelli teorici di far da ponte e superare il gap tra la biologia molecolare e quella computazionale.**



# Molecular Dynamic Simulation of *JEV*

---



## Legenda

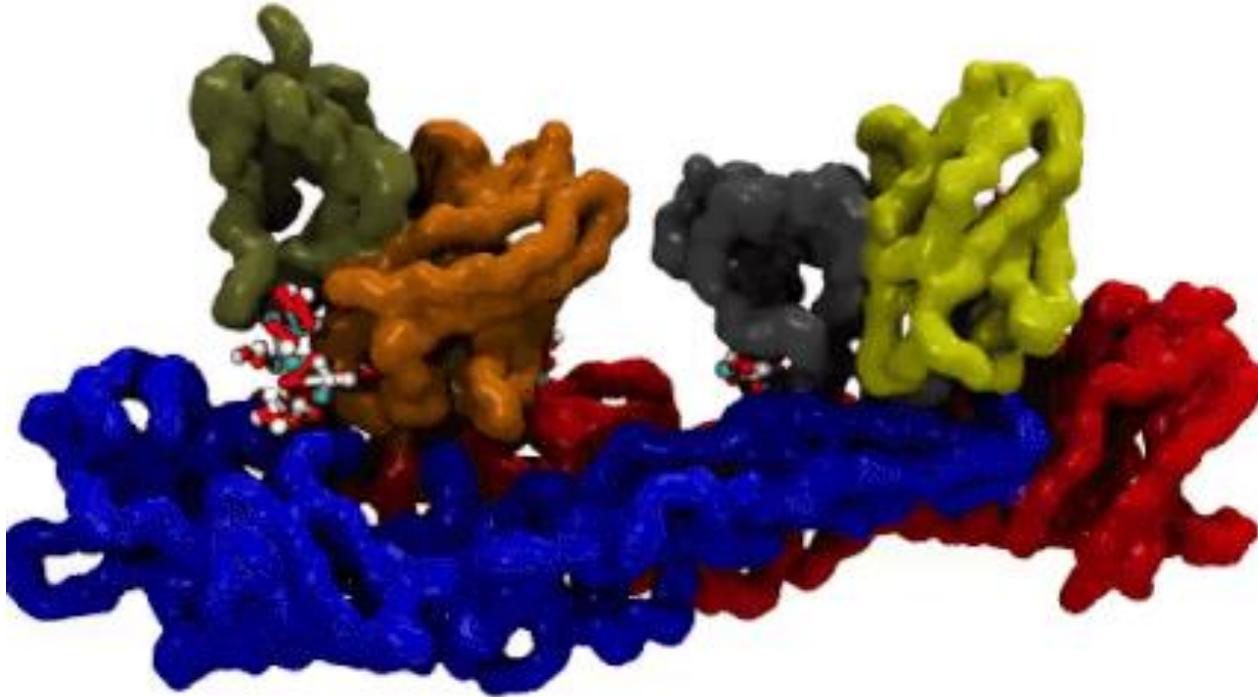
- **A sinistra: Virione completo**
- **In alto a destra: Movimento di apertura del loop di fusione (regione della proteina dell'involucro che si inserisce nella membrana della cellula ospite).**
- **In basso a destra: Poro della membrana virale che si apre simultaneamente col moto delle proteine.**

## Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses

Alexander Rouvinski, Pablo Guardado-Calvo, Giovanna Barba-Spaeth, Stéphane Duquerroy, Marie Christine Vaney, Carlos M. Kikuti, M. Erika Navarro Sanchez, Wanwisa Dejnirattisai, Wiyada Wongwiwat, Ahmed Haouz, Christine Girard-Blanc, Stéphane Petres, William E. Shepard, Philippe Desprès, Fernando Arenzana-Seisdedos, Philippe Dussart, Ju thathip Mongkolsapaya , Gavin R. Screaton  & Félix A. Rey 

Nature 520, 109–113 (02 April 2015) | [Download Citation](#) 

# M.D. Simulation of *Dengue 2*



## Legenda

- **Dimero di proteine di superficie di Dengue 2 (in rosso e blu).**
- **Sopra al dimero ci sono due anticorpi (identici) che riconoscono le proteine virali glicosilate (palline colorate rosso, bianco e ciano).**

**Esperienza clinica**  
**“epidemia WN estate 2018”**

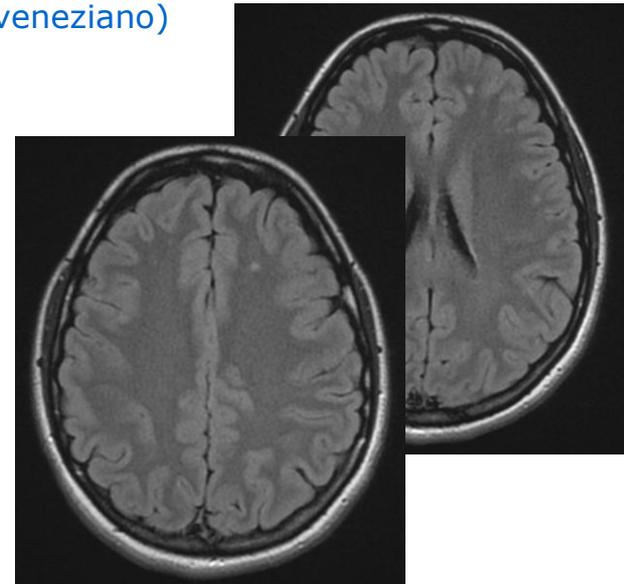
# ***Epidemia WNV nell'Alta Padovana***

---

- **Casi: 6 pz** (2F; età media 62.5aa - degenza media: 21.5gg)
- **Sintomatologia**
  - temperatura febbrile (83%)
  - confusione (66%)
  - rigor, esantema, mialgie, cefalea (33%)
  - diplopia e atassia (17%)
  - ipostenia arti inferiori (17%)
- **Laboratorio analisi - Microbiologia**
  - **LCS:** limpido incolore, in media 98cell (35-200cell)
  - **Siero/urine:** IgM anti-WNV (**3 casi confermati**)
- **Terapia**
  - aciclovir ev (in media 12gg; 7-21gg)
  - antibioticoterapia ev
  - idratazione e antipiretici

# NI f, 24aa - lug2018

- **Criterio clinico** (sintomi esorditi 10gg prima del ricovero):
  - Astenia, cefalea nucale, diplopia, disequilibrio, iposteina AI sn, rash maculo-papulare (prima al volto, poi tronco e aass e infine aaii, a rapida risoluzione)
- **Criterio epidemiologico:**
  - Esposizione in area endemica (1giorno al mare sul litorale veneziano)
- **Criterio di laboratorio:**
  - rilievo di IgM anti-WNV e test di neutralizzazione positivo
- **Esami strumentali:**
  - LCS: limpido incolore, 92cell (80% mononucleati)
  - RM: areole iperlucenti nella sostanza bianca lobi frontali
  - EEG: nella norma
  - EMG: assenza onda F SPE bilateralmente
- **Terapia**
  - aciclovir ev (21gg) e antibioticoterapia ev (3gg)
  - steroidea ev



**DIAGNOSI: WN FORMA NEUROINVASIVA tipo QUADRO MISTO**

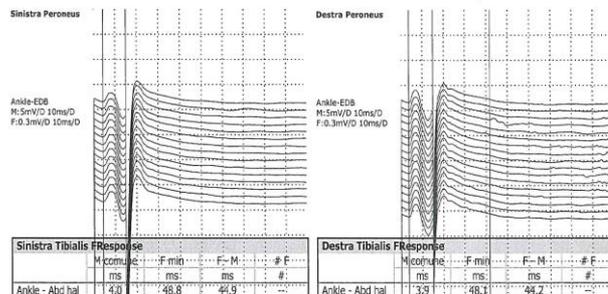
- **Follow-up EMG**

# NI f, 24aa – follow-up EMG

Lug 2018 (ricovero): ROT achillei assenti; assenza onda F SPE bilateralmente  
 Set 2018 (dopo 2 mesi): ricomparsa onda F SPE bilateralmente  
 Gen 2019 (dopo 6 mesi): nella norma

## Onda F

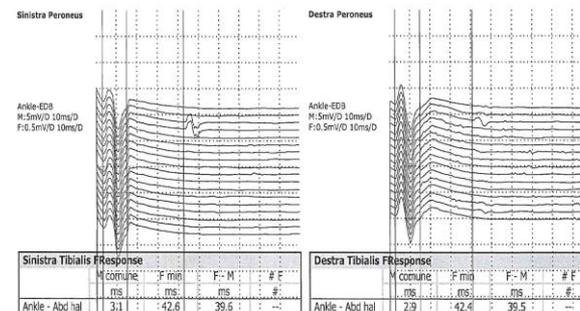
Sinistra Peroneus FResponse					Destra Peroneus FResponse				
M comune	F min	F - M	# F		M comune	F min	F - M	# F	
ms	ms	ms	#		ms	ms	ms	#	
Ankle - EDB	4.4	---	---	---	Ankle - EDB	3.7			



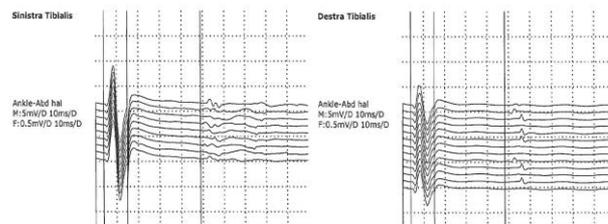
lug2018

## Onda F

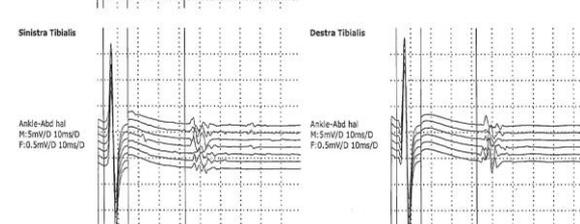
Sinistra Peroneus FResponse					Destra Peroneus FResponse				
M comune	F min	F - M	# F		M comune	F min	F - M	# F	
ms	ms	ms	#		ms	ms	ms	#	
Ankle - EDB	3.2	42.6	39.4	---	Ankle - EDB	2.6	40.7	38.1	---

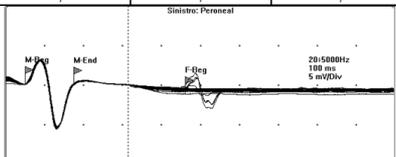


set2018



gen2019



	Onda F				Presenza F (%)
	Latenza F (min) (ms)	Latenza F (media) (ms)	Latenza F (max) (ms)	Latenza F-M (min) (ms)	
Sinistro: Peroneal					
1.Ankle	46,14	46,14	46,14	41,02	20,0
					

# PC m, 68aa - ago2018

---

- **Criterio clinico** (sintomi esorditi 4gg prima del ricovero in MED):
  - Astenia, vomito, diarrea e febbre
- **Criterio epidemiologico:**
  - Risiede in area di sorveglianza per WNV
- **Criterio di laboratorio:**
  - rilievo di IgM anti-WNV e test di neutralizzazione positivo
- **Esami strumentali:**
  - LCS: limpido incolore, 35cell (90% mononucleati)
  - TC: negativa
  - EEG: nella norma
- **Terapia**
  - aciclovir ev (7gg) e antibioticoterapia ev (7gg)

## **DIAGNOSI: WN FORMA NEUROINVASIVA tipo MENINGITE**

- Outcome: restitutio ad integrum

# PA f, 85aa - set2018

---

- **Criterio clinico** (sintomi esorditi 10gg prima del ricovero in GER-CSP):
  - Febbricola, nausea e vomito seguiti da febbre e stato confusionale
- **Criterio epidemiologico:**
  - Risiede in area di sorveglianza per WNV
- **Criterio di laboratorio:**
  - rilievo di IgM anti-WNV e test di neutralizzazione positivo
- **Esami strumentali:**
  - LCS: limpido incolore, 70cell (80% mononucleati)
  - RM: areole iperlucenti nella sostanza bianca lobi f-t-p-occ
  - EEG: anomalie lente diffuse
- **Terapia**
  - aciclovir ev (9gg) e antibioticoterapia ev (urosepsi e colangite acuta)

## **DIAGNOSI: WN FORMA NEUROINVASIVA tipo ENCEFALITE**

- Outcome: trasferita in LD-CSP e poi in Rianimazione per setticemia ove è deceduta.

# Casi probabili di WN neuroinvasiva

---

- **Criterio clinico:** sintomi compatibili con encefalite
- **Criterio epidemiologico:** residenza in area di sorveglianza per WNV
- **Criterio di laboratorio:** rilievo di IgM anti-WNV
  
- **Outcome:**
  - Completo recupero
    - m 77aa, APR: diabete mellito, ipertensione arteriosa, pregresso ca colon
    - m 49aa, APR: ndp
  - Decesso
    - m 72aa, APR: demenza, diabete mellito tipo 2, cardiopatia ipertensiva

# “Take home messages”

---

- **West Nile virus (WNV) è da considerarsi endemico nel nostro territorio.**
- Il **picco** di malattia è nella tarda **estate/inizio autunno (15giu-30nov)**.
- L’infezione nell’uomo deriva principalmente dalla puntura di **zanzara** del tipo **Culex**; solo secondariamente deriva da **trasfusioni o trapianto d’organo**.
- **La maggior parte** dei pz infettati è **asintomatica o** presenta una malattia **autolimitantesi**.
- La **forma neuroinvasiva** di WNV (maggior frequente col crescere dell’età) può presentarsi come: **meningite/encefalite, paralisi flaccida acuta o quadri misti (in particolare simil-GB)**.
- La **diagnosi** di WNV è data dalla **dimostrazione**
  - **Diretta dell’acido nucleico su sangue/urine o**
  - **Indiretta degli anticorpi su liquor**
- **Non vi sono terapie antivirali attualmente approvate o raccomandate.**



### ***Ringraziamenti:***

- ***Dr S Pantano: Direttore Lab Simulazioni Biomolecolari - Istituto Pasteur, Montevideo (Uruguay)***
- ***UO di Laboratorio di Ricerche Cliniche – Ospedale di Cittadella, AULSS6 Euganea***
- ***UO di Microbiologia e Virologia – Azienda Ospedaliera di Padova***