

Il ruolo del laboratorio di riferimento regionale nella diagnosi della Dengue



LAZZAROTTO TIZIANA



Centro di Riferimento Regionale per le Emergenze Microbiologiche - CRREM
Unità Operativa Complessa di Microbiologia
IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna
Policlinico di Sant'Orsola, Bologna

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche - DIMEC
Alma Mater Studiorum - Università di Bologna IT



Centro di Riferimento Regionale per le Emergenze Microbiologiche - CRREM Unità Operativa Complessa di Microbiologia



Bologna

IRCCS Az.Ospedaliero
Universitaria di Bologna
Policlinico di Sant'Orsola

Attività di ricerca e diagnostica sulle infezioni che causano o possono causare problemi di sanità pubblica, con particolare attenzione alle infezioni emergenti e riemergenti.



~ 300 mq
BSL-3 facility
NGS facility



Arbovirus clinicamente importanti - attività di diagnosi sierovirologica

Virus family	Virus genus	Species examples
<i>Flaviviridae</i>	Flavivirus	<u>Dengue 1-4 (DENV)</u> <u>West Nile virus (WNV)</u> <u>Yellow fever virus (YFV)</u> <u>Zika virus (ZIKV)</u> <u>Tick-borne encephalitis virus (TBEV)</u>
<i>Togaviridae</i>	Alphavirus	<u>Chikungunya virus (CHIKV)</u> O'nyong Nyong virus (ONNV) Mayaro virus (MAYV) Sindbis virus (SINV) Ross River virus (RRV)
<i>Bunyaviridae</i>	Nairovirus, Phlebovirus, Orthobunyavirus	Crimean Congo hemorrhagic virus (CCHFV) Sandfly fever virus (SFV, <u>TOSCANA VIRUS</u>) <u>Rift Valley fever virus (RVFV)</u> Oropouche virus (OROV)

- Test sierologici classici e innovativi (Ab & Ag);
- Test virologici (molecolari e non molecolari);
- Identificazione dei lignaggi dei diversi virus;
- Isolamento in colture cellulari dei ceppi di WNV, Toscana virus, Chikungunya, Zika e Dengue;
- Caratterizzazione molecolare, con Next Generation Sequencing (NGS), dei genomi dei ceppi virali isolati al fine di rispondere all'esigenza del monitoraggio genomico delle infezioni emergenti e riemergenti con potenziale epidemico.

Partecipa al circuito inter-laboratori per l'attività diagnostica sulle Arbovirosi

Nazionali:

- Gruppo di Lavoro sulle Infezioni Virali Emergenti – GLIVE per AMCLI (Associazione Microbiologi Clinici Italiani);
- Gruppo di Lavoro Antropozoonosi - GLAZOO per AMCLI (Associazione Microbiologi Clinici Italiani);
- RER-Comitato strategico Sistema Regionale Prevenzione Salute dai rischi ambientali e climatici (SRPS).

Internazionali:

Network Europeo "EVD-LabNet (Emerging Viral Diseases-Expert Laboratory Network).

PNRR “One Health Basic and Translational Research Actions addressing Unmet Needs on Emerging Infectious Diseases (INF-ACT)” 2022-2025

- PE13 - INF-ACT - CUP: J33C22002870005
- SPOKE 1: VIRUS EMERGENTI E RIEMERGENTI

Il Piano nazionale per gli investimenti complementari (PNC), è finalizzato a integrare con risorse nazionali gli interventi del Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza (PNRR). Sistema Regionale Prevenzione Salute dai rischi ambientali e climatici (SRPS):

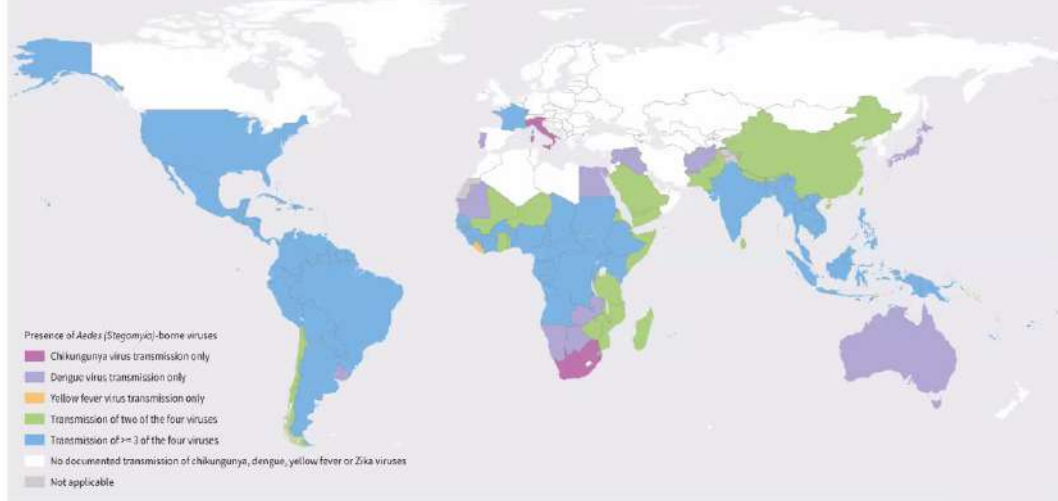
- Rafforzare la capacità, l'efficacia, la resilienza e l'equità nell'affrontare gli impatti sulla salute attuali e futuri, associati ai rischi ambientali e climatici, in una visione One-Health.



Le malattie trasmesse da vettori sono un importante problema di sanità pubblica.

WHO estimates that they cause 1 billion/year of cases - about 17% of total cases of infectious diseases
Among vector-borne diseases, **Arboviruses** constitute an important group

one or more of the leading arboviruses are now present in most countries of the world



The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of WHO concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: World Health Organization
Map Production: WHO Health Emergencies Programme
Request ID: 201900095



Launch of the
WHO Global Arbovirus
Initiative
Meeting report
31 March 2022

Piano strategico integrato per combattere gli arbovirus emergenti e riemergenti con potenziale epidemico e pandemico



Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA) 2020-2025

Chikungunya, **Dengue**, Zika,
West Nile, Toscana virus, Usutu

“Queste malattie sono le malattie del nostro tempo”.

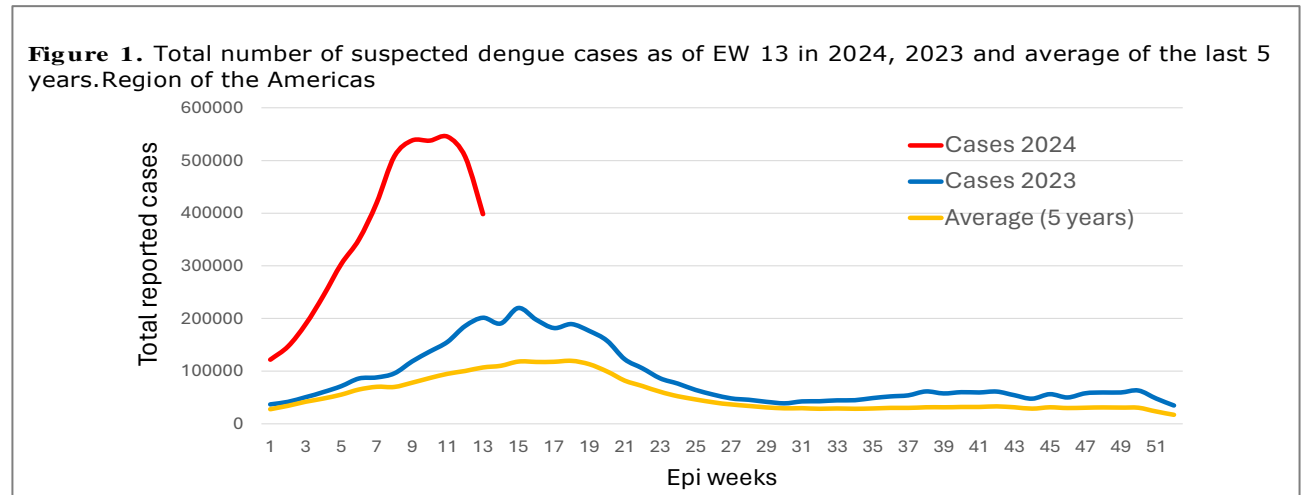
“Sono malattie del XXI secolo, perché i fattori scatenanti di queste malattie sono fattori che ci accompagneranno nel XXI secolo”.

“E quei fattori che tutti conosciamo sono: il cambiamento climatico, il cambiamento dell'uso del suolo, il cambiamento dell'ecologia, l'urbanizzazione... l'aumento del commercio e dei viaggi... porteranno a cambiamenti nelle dinamiche delle infezioni...” - Jeremy Farrar, director of Wellcome Trust -



Il picco di Dengue alimenta le preoccupazioni per la minaccia alla salute pubblica

- L'incidenza globale della dengue è aumentata notevolmente negli ultimi due decenni.
- Dal 2000 al 2019: un aumento di 10 volte dei casi segnalati in tutto il mondo (da 500.000 a 5,2 milioni).
- Il 2019 ha segnato un picco senza precedenti.
- Dall'inizio del 2023, i casi di dengue sono saliti a 6 milioni e sono stati segnalati più di 5.000 decessi legati alla dengue in oltre 80 Paesi/territori. Quasi l'80% dei casi è stato segnalato nella regione delle Americhe.



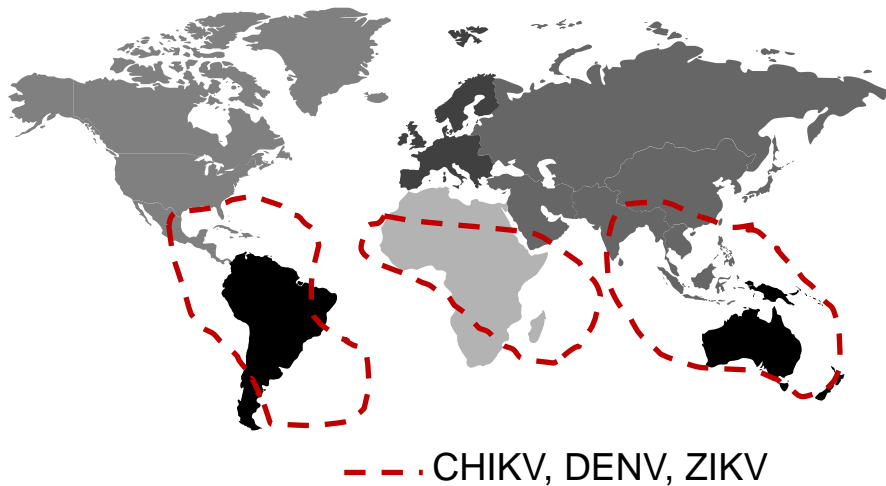
Increase of 260% compared to the same period in 2023;
Increase of 448% compared to the average of the last 5 years.

L'OMS ha valutato il rischio elevato a livello globale.



Molti arbovirus presentano sintomi e distribuzione geografica sovrapponibili.

Geographical distribution



I criteri clinici ed epidemiologici non differenziano in modo affidabile le infezioni da Arbovirus

È necessaria una diagnostica accurata per individuare i singoli casi e avviare risposte tempestive per il controllo di nuovi focolai.

Clinical manifestations

- Febrile illness
- Rash
- Arthralgia and/or myalgia

Multiplex diagnostic algorithms - syndromic approach -

Returning from endemic region
(or suspected autochthonous case)
+
Clinical symptoms

Dengue

Zika

Chikungunya



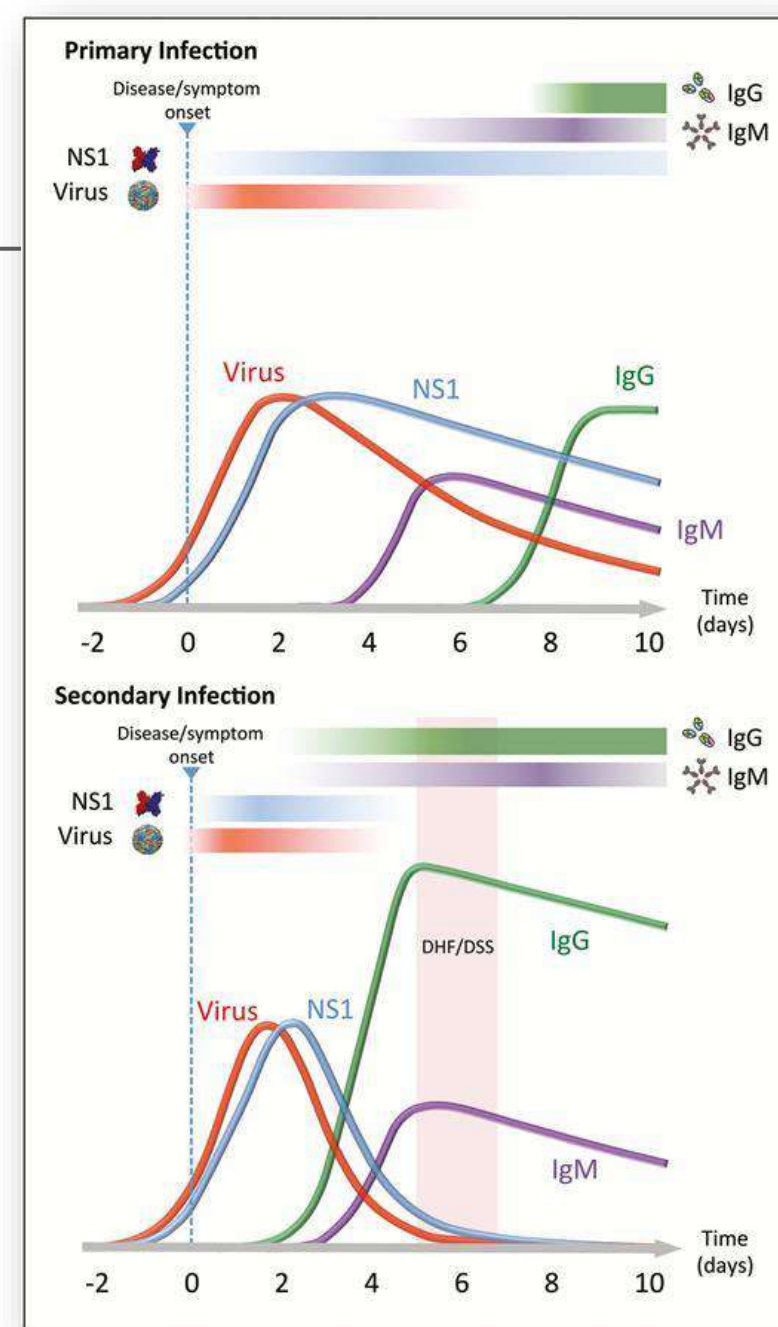
Cronologia della comparsa dei biomarcatori diagnostici della Dengue nei pazienti con infezione primaria e non-primaria

Primary infections

- both nonstructural protein 1 (NS1) and viral RNA can be detected from the onset of disease
- IgM appearing around day 3 of illness
- IgG appearing toward the end of the acute period

Secondary infections

- presence of IgG early in the acute phase of disease
- shorter duration of NS1 and viral RNA detection



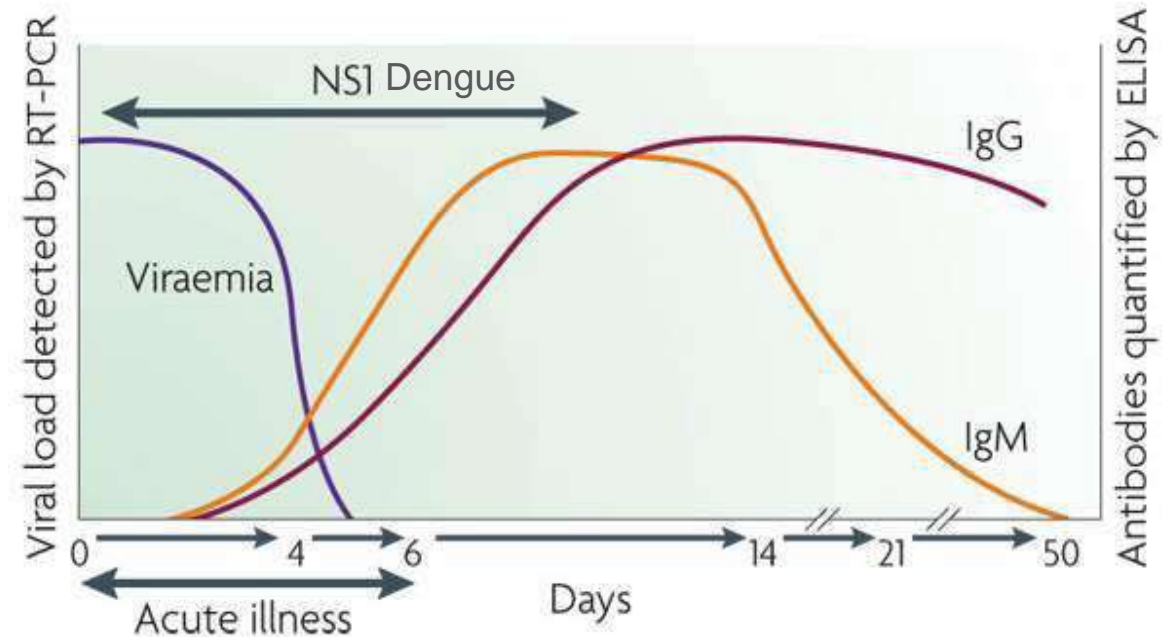


Diagnosi dell'infezione da virus Dengue

- **Exposure:** travel to or living in endemic areas; mosquito bite; epidemiological link;
- **Clinical symptoms**
- **Time since symptom onset**
- **Vaccination status**

Laboratory tests

- Detection of virus nucleic acids/antigens in body fluids
- Virus isolation (BSL-3)
- Detection of specific antibodies in serum and confirmation with neutralization tests



Le infezioni acute da virus Dengue sono più comunemente rilevate con una combinazione di **metodi molecolari e sierologici**.

Opportunità, limiti e insidie nella diagnostica degli Arbovirus (Dengue)

- Test sierologici -

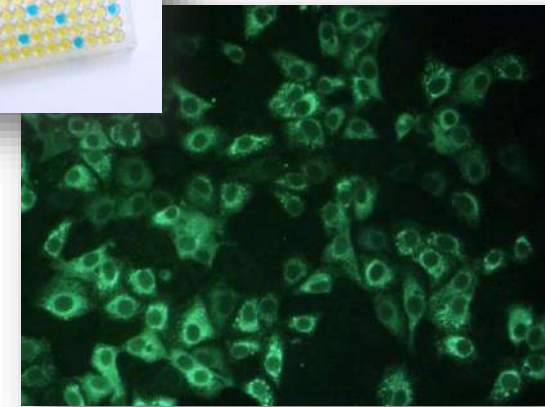
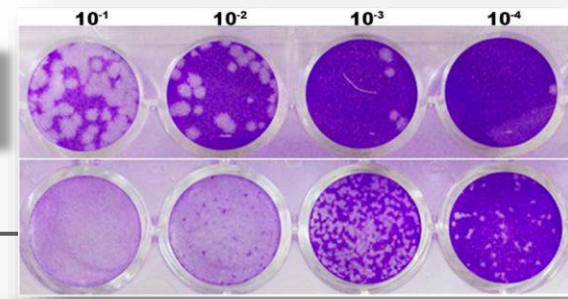
IgM Abs appear within 3-6 days after the onset of illness and can be detected up to 3-6 months after infection

IgG Abs are typically found as early as 6–7 days after illness onset, a few days after IgM appearance and can persist for many years

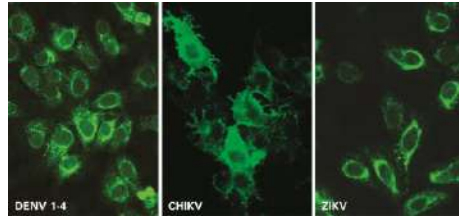
Serology methods have limitations:

- IgM may remain undetectable (immunosuppressed individuals, secondary infections)
- IgM may persist for a long time. Antibody responses to a given arbovirus show significant cross-reaction with antigenically related viruses.
- These tests require confirmation by virus-specific neutralization assays (labour-intensive; BSL-3 facility)

I risultati dei test sierologici devono essere interpretati in base allo stato di vaccinazione contro i Flavivirus.



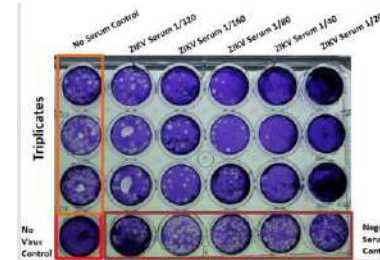
Sierologia dei Flavivirus: un dilemma diagnostico - il problema della cross-reattività -



IFA



ELISA



PRNT

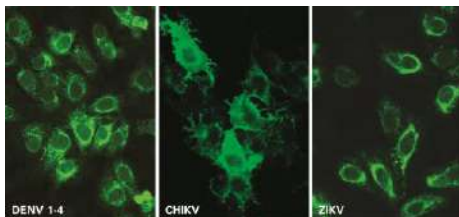
La diagnosi sierologica definitiva non è sempre possibile!

IgM Zika	IgM Dengue	PRNT-90 Zika	PRNT-90 Dengue 1	PRNT-90 Dengue 2
POS	POS	1:160	1:5120	1:320

courtesy from R.Lanciotti, CDC, 2017

High cross-reactivity in patients with previous flavivirus infection and/or vaccination

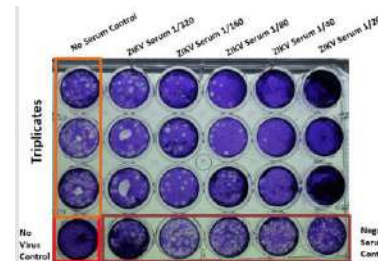
Sierologia dei Flavivirus: un dilemma diagnostico - il problema della cross-reattività -



IFA



ELISA



PRNT

La diagnosi sierologica definitiva non è sempre possibile!

Confirmed acute Zika infection in a patient with previous Dengue infection

RT-PCR Zika	IgM Zika	IgM Dengue	PRNT-90 Zika	PRNT-90 Dengue 1	PRNT-90 Dengue 2
POS	POS	POS	1:160	1:5120	1:320

courtesy from R.Lanciotti, CDC, 2017

High cross-reactivity in patients with previous flavivirus infection and/or vaccination

Opportunità, limiti e insidie nella diagnostica degli Arbovirus (Dengue)

Dengue NS1 Antigen Test

- Viral detection

- The viral protein NS1 is secreted from infected cells
NS1 is involved in the viral RNA replication complex as well as in viral defense through the inhibition of complement activation.
- NS1 is found at high levels circulating in the blood of infected individuals
- NS1 can be detected from the onset of symptoms through to 9 days or longer after disease onset (in primary infections)
- *Primary infections:* NS1 can be detected at the same time as viral RNA and before the antibody response is mounted in primary infections.
- *Secondary infections:* the kinetics of NS1 detection is shorter than that for primary infections

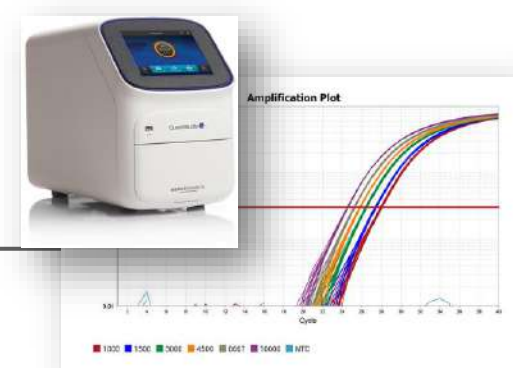
Fluorescence immuno assay (FIA) for qualitative analysis on NS1 antigen in serum/plasma



- 100 ul serum/plasma
- High sensitivity and specificity
- **Results in 15-20 min**

Opportunità, limiti e insidie nella diagnostica degli Arbovirus (Dengue)

- Viral detection



• I test molecolari sono fondamentali per la conferma di un'infezione acuta da ARBOvirus (Dengue)

- per la maggior parte degli arbovirus la viremia è breve
- Il carico virale può essere basso
- Picco viremico prima dei sintomi

L'analisi parallela di più campioni migliora notevolmente la sensibilità clinica complessiva dei metodi molecolari nella fase acuta di molte infezioni da Flavivirus.

“Persistenza” dell'RNA virale nel sangue intero e nelle urine → diagnosi diretta anche in tempi tardivi rispetto all'esordio dei sintomi



Testing multiple specimens can increase sensitivity		
Specimen	Viral RNA detection	Arbovirus
Serum/plasma	✓	All
Whole blood	✓	Flavivirus
CSF	✓	WNV, USUV, TOSV
Urine	✓	WNV, USUV, DENV , ZIKV, TOSV
Semen	✓	ZIKV
Saliva	✓	ZIKV
Amniotic fluid, tissues	✓	ZIKV

Infezione da virus Dengue - Definizione di caso -

Gli esami di laboratorio sono fondamentali per la conferma di caso

Tests results within 24h

	Dengue (DENV)
Criterio clinico	<p>- <u>Dengue classica</u>. Qualunque persona che presenti: febbre e almeno 2 dei seguenti sintomi: nausea, vomito, dolore oculare o retro-orbitale, cefalea, esantema cutaneo maculo-papulare, mialgia, artralgie. Sono segni predittivi di dengue grave: dolore addominale o dolorabilità, vomito persistente, accumulo di fluidi, sanguinamento dalle mucose, letargia, ingrossamento del fegato, irrequietezza.</p> <p>- <u>Dengue grave</u>. Dengue con uno qualsiasi dei seguenti sintomi: grave fuoriuscita plasmatica che porta a shock o accumulo di liquidi con difficoltà respiratoria; grave sanguinamento, o grave insufficienza d'organo come transaminasi elevate ≥ 1000 UI / L, alterazione della coscienza o insufficienza cardiaca.</p>
Criteri di laboratorio¹	<p><u>Test di laboratorio per caso probabile:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - presenza di anticorpi di tipo IgM anti-DENV in un unico campione di siero. <p><u>Test di laboratorio per caso confermato (almeno uno dei seguenti):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - isolamento virale effettuato su campioni biologici prelevati entro 7 giorni dalla comparsa dei sintomi; - identificazione di acido nucleico di DENV in campioni biologici; - identificazione dell'antigene virale di DENV in campioni biologici; - identificazione di anticorpi di tipo IgM anti-DENV in un unico campione di siero e conferma con test di neutralizzazione; - sierconversione da un titolo negativo a positivo o incremento di 4 volte del titolo anticorpale per anticorpi specifici anti-DENV in campioni consecutivi (ad almeno 14 giorni l'uno dall'altro) e conferma mediante neutralizzazione.
Criterio epidemiologico	Storia di viaggio o residenza nelle 2 settimane precedenti in un'area con trasmissione documentata e sostenuta di Dengue.
Classificazione	
Classificazione – Possibile	Persona che soddisfa il criterio clinico ed epidemiologico.
Classificazione – Probabile	Qualsiasi persona che soddisfi sia i criteri di caso possibile che i criteri di laboratorio per caso probabile.
Classificazione – Confermato	Persona che soddisfa almeno uno dei criteri di laboratorio per caso confermato.

¹ I risultati dei test sierologici devono essere interpretati considerando eventuali precedenti esposizioni ad altri alphavirus e flavivirus.

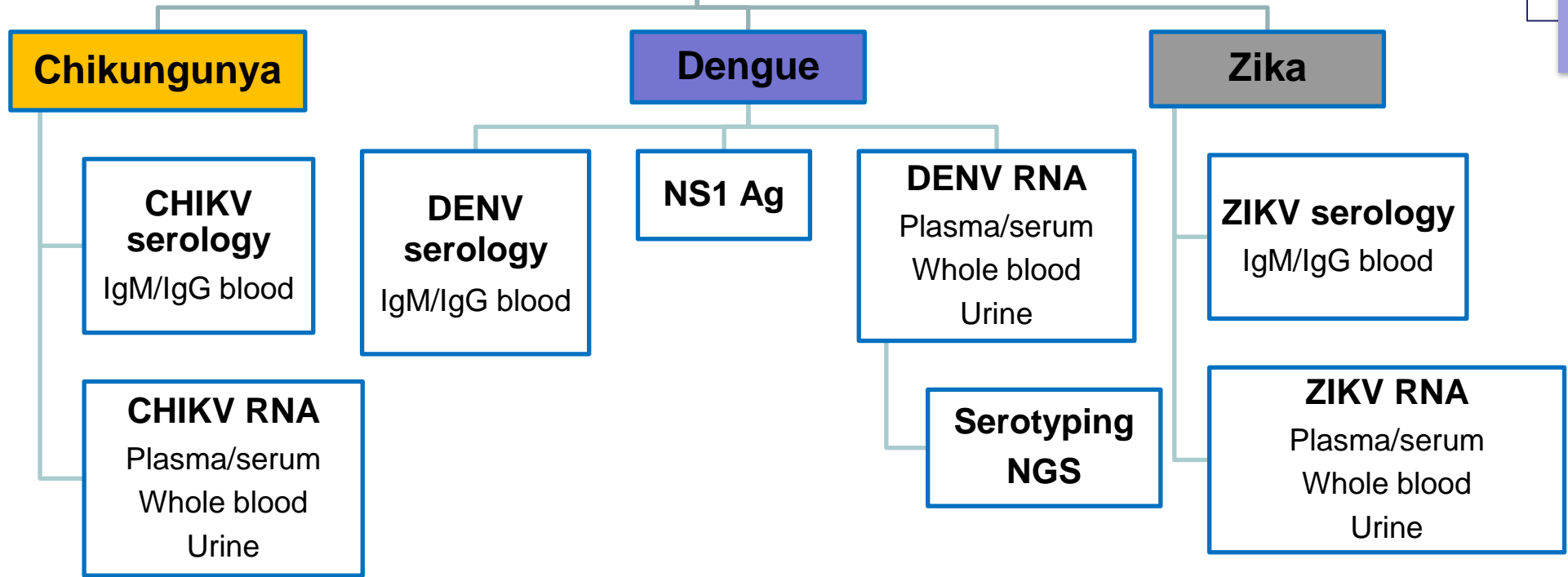


Diagnostic algorithm for Chikungunya, Dengue and Zika surveillance

Returning from endemic region
(or suspected autochthonous case)
+ Clinical symptoms

within 24h

- Unità Clinica richiedente
- Dipartimento di Sanità Pubblica territorialmente competente
- Settore Prevenzione collettiva e Sanità pubblica Regionale





Casi Dengue 2023/24 – Emilia Romagna

Casi di infezione da virus Dengue/Chikungunya/Zika RER, 2023	Confermati/ Sospetti
Dengue	43/246
Chikungunya	-/246
Zika	2/256

Casi Dengue - 2024		
01/01 – 30/04	2023	2024
Casi sospetti	33	110
Casi confermati	8	21

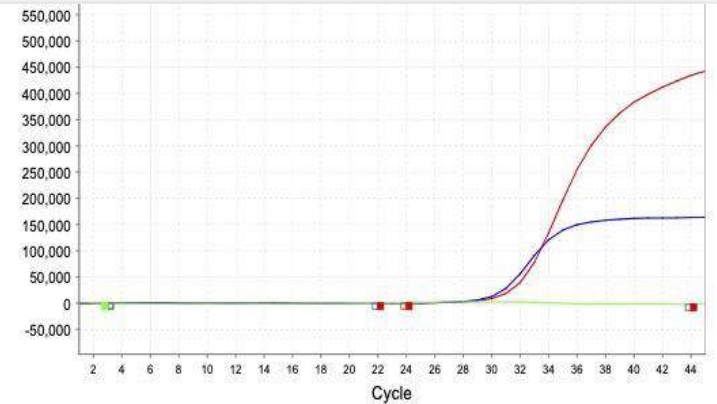
Provenienza geografica	2023	2024 (al 30/04)
Sud-Est Asia	23,4%	28,5%
Sud America/Caraibi	41,8%	47,6%
Maldive	14%	4,7%
Africa	14%	4,7%
Italia (Lombardia)	2,3%	-
Non noto	4,7%	14,2%

Sierotipi Dengue	2023	2024 (al 30/04)
Dengue - 1	32,5%	42,8%
Dengue - 2	27,5%	38%
Dengue - 3	37,5%	-
Dengue - 4	2,5%	-
Non noto	-	19,2%

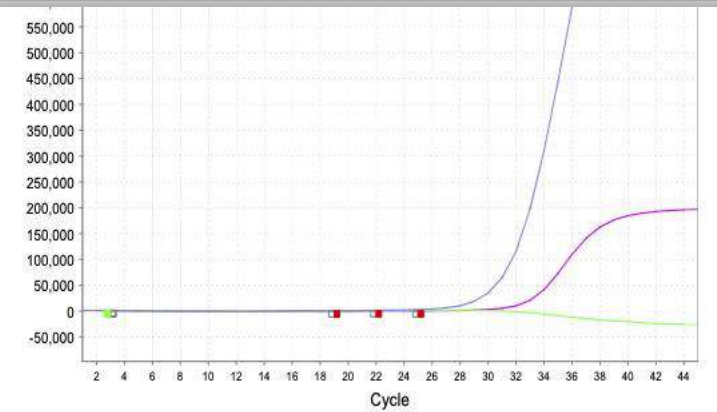


Oltre la diagnostica - approfondimenti di epidemiologia molecolare

Dengue serotype definition

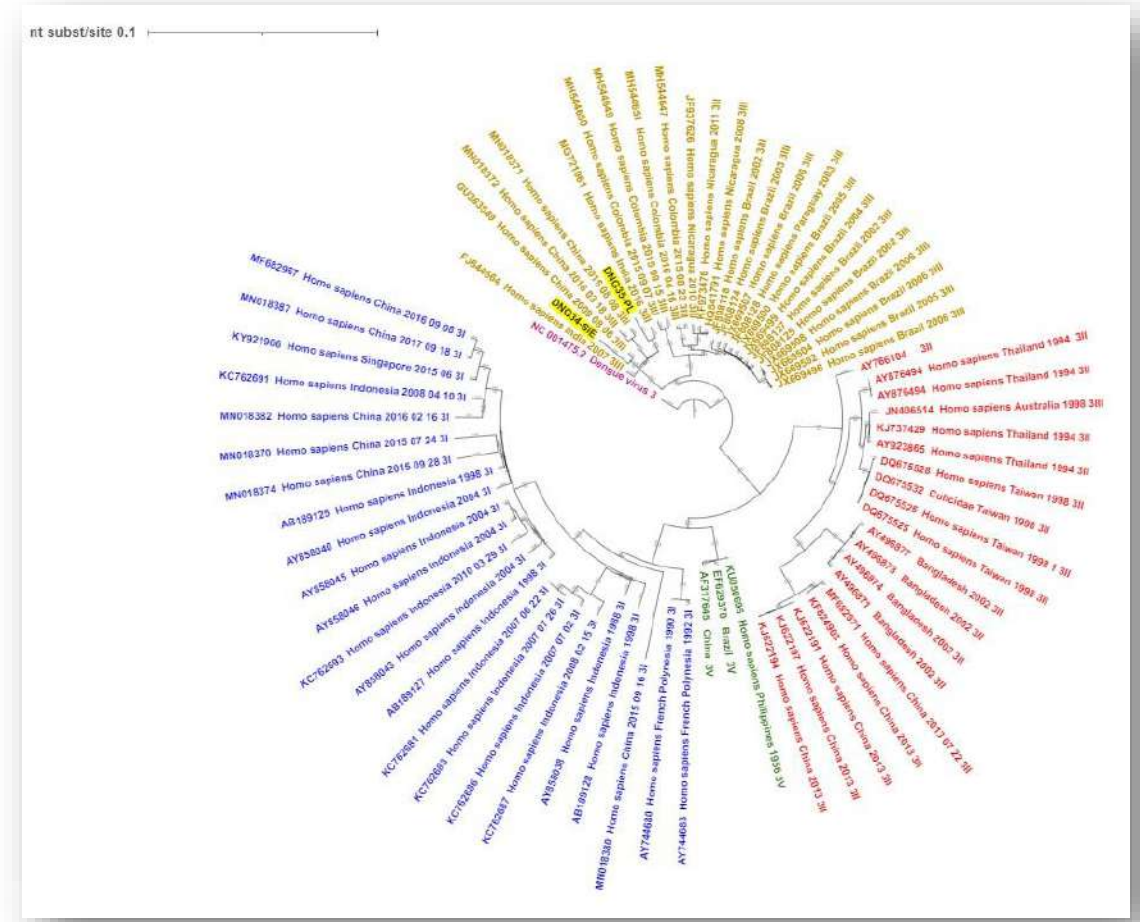


■ IC ■ DENV 1 ■ DENV 4



■ IC ■ DENV 2 ■ DENV 3

Full genome sequencing (WGS) and Phylogeny





Arbovirus/Dengue: sfide diagnostiche

- I test di laboratorio sono fondamentali per la conferma dei casi e per avviare risposte tempestive in materia di sanità pubblica, circolazione geografica e manifestazioni cliniche sovrapposte → “approccio sindromico”;
- L'interpretazione dei test sierologici è complessa, la viremia è di breve durata e spesso non è ancora rilevabile al momento della diagnosi → test su diversi materiali biologici;
- Il test dell'antigene NS1 della dengue è un test diagnostico valido, affidabile e veloce;
- Gli studi epidemiologici molecolari sono fondamentali per comprendere meglio la diffusione della Dengue



Grazie per l'attenzione!



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Ospedaliero - Universitaria di Bologna
IRCCS Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico

POLICLINICO DI SANT'ORSOLA
INTRANET

2022
WORLD'S
BEST
HOSPITALS
Policlinico di Sant'Orsola - IRCCS

Centro di Riferimento Regionale per le Emergenze Microbiologiche - CRREM

Unità Operativa Complessa di Microbiologia

Giada Rossini, Caterina Vocale e tutto il personale dirigente

Erica D'Angelo e tutto il personale tecnico di laboratorio del CRREM

.....specializzandi, borsisti, dottorandi e assegnisti di ricerca

I colleghi delle UOC di Malattie Infettive, Pronto Soccorso Generale

I colleghi di tutte le Strutture Sanitarie della RER