

Mod. E

RELAZIONE FINALE DELLE ATTIVITA'

Obiettivi intermedi raggiunti

Descrivere gli obiettivi del progetto raggiunti nello stadio intermedio di avanzamento progettuale.
Compilare la parte sottostante non superando i 500 caratteri per obiettivo

- 1) Elaborazione di protocolli diagnostici con definizioni di caso condivise per il riconoscimento delle Arbovirus emergenti.
In collaborazione con la Clinica di Malattie Infettive di Udine è stato redatto un Protocollo diagnostico per le infezioni da virus Dengue, West Nile, Chikungunya, Zika (inclusa anche TBE) già allegato alla rendicontazione intermedia (All./1)
- 2) Definizione di modalità di campionamento dei materiali biologici semplificate e comuni ai diversi agenti.
Le modalità di campionamento, conservazione e invio dei campioni al Laboratorio di Riferimento sono contenute nel Protocollo diagnostico per le infezioni da virus Dengue, West Nile, Chikungunya, Zika (e TBE) già allegato alla rendicontazione intermedia (vedi punto 1)
- 3) Sensibilizzazione del personale sanitario al problema attraverso l'organizzazione di almeno un corso a livello regionale.
Non è stato possibile effettuare il corso residenziale sugli Arbovirus previsto per la prima metà del 2020 presso ASUITS per sopravvenuta pandemia COVID-19.
- 4) Validazione delle tecniche molecolari "in house" per i virus West Nile, Dengue, Zika e Chikungunya mediante realizzazione di standard interni, partecipazione a programmi nazionali ed internazionali di controllo della qualità.
L'UCO Igiene e Medicina Preventiva ha partecipato nel 2017, 2018, 2019 e 2020 ai controlli di qualità internazionali QCMD per WNV, DENV, CHKV e ZKV dei quali sono stati allegati i certificati di partecipazione e i report individuali sui risultati (All./8-31); il Core Panel Member Score è sempre stato 0 (massimo) per tutti i quattro virus con l'unica eccezione di un falso negativo per Zika virus nel 2019. In collaborazione con ICGEB sono stati preparati gli RNA standard per ZIKV (ceppo africano ed asiatico), Dengue sierotipo 1-4, TBE virus ceppo Neudoerfl, West Nile ceppo NY99. Preparazione di standard molecolari. Selezione dei primers per RT PCR.
- 5) Allestimento delle tecniche diagnostiche di II livello per la conferma delle infezioni, con particolare riferimento alle tecniche di neutralizzazione in formato standard e in PRNT (Plaque Reduction Neutralization Test)
Sono state messe a punto presso il laboratorio i Virologia dell'UCO Igiene e Medicina Preventiva le PRNT per WNV, DENV e per ZKV. In collaborazione con ICGEB è stato realizzato un metodo rapido a fluorescenza di lettura automatica di PRNT (Maistriau et al Virus Res 2017, all.2).
- 6) Raccolta di campioni di sieri di pazienti per l'allestimento di un pannello di controllo per la valutazione dell'accuratezza dei test diagnostici "in house" dei test point of care (Flavipoc)
Sono state raccolti ed analizzati per IgM/G campioni di siero con metodo ELISA con antigene NS1 per WNV, DENV e ZIKV (Mora Cardenas E et al PLOS NTD 2020, all.3; Oderinde et al Viru Res 2020, all.4), lavoro svolto in collaborazione con ICGEB che ha incluso anche il flavivirus emergente USUV (Caracciolo et al. PLOS NTD 2020, all.5). In collaborazione con Udine è stato pubblicato un lavoro su una presentazione atipica di forma neuro invasiva di WNV (Castaldo et al. Trop. Med. Infect. Dis. 2020, all.6). E' stato realizzato un test diagnostico POC innovativo (Tagliabue et al. BBRC 2017, all.7). Le pubblicazioni sono disponibili in allegato.

Risultati già raggiunti nello stadio finale di avanzamento progettuale, indicatori e fonti di verifica

Obiettivo Specifico	Risultato Raggiunto	Indicatore di valutazione	Fonte di Verifica
1. Protocolli diagnostici con definizioni di caso per le infezioni da Arbovirus e definizione di modalità di campionamento dei materiali biologici semplificate e comuni ai diversi agenti	Protocollo diagnostico per le infezioni da virus Dengue, West Nile, Chikungunya, Zika (e TBE)	Protocollo scritto	Allegato alla Relazione finale (all.1)
2. Sensibilizzazione del personale sanitario al problema attraverso l'organizzazione di almeno un corso a livello regionale.	Organizzazione di un corso residenziale sulle Arbovirosi in ASUITS	Organizzazione di un corso residenziale sulle Arbovirosi in ASUITS	Non effettuato per pandemia COVID-19
3. Validazione delle tecniche molecolari "in house" per i virus West Nile, Dengue, Zika e Chikungunya (e TBE) mediante realizzazione di standard interni, partecipazione a programmi nazionali ed internazionali di controllo della qualità.	Standardizzazione delle metodiche "in house" per la ricerca diretta di virus Dengue, Chikungunya e Zika realtime RT-PCR.	Protocollo scritto di real-time RT PCR per DENV, CKV e ZKV.	Protocolli allegati alla rendicontazione finale (All.1). Certificati di partecipazione e reports dei CQ QCMD (all.8-31).
4. Validazione di tecniche sierologiche di secondo livello per la conferma di positività anticorpali per virus Zika, West Nile e Dengue (e TBE)	Standardizzazione del test PRNT di neutralizzazione per Zika virus e messa a punto di test di neutralizzazione rapidi.	Protocolli di PRNT per WNV e per ZKV.	Protocolli allegati alla Relazione e disponibili in laboratorio. Pubblicazione del test automatizzato allegato.
5. Validazione di tecniche sierologiche anche multiparametriche "in house".	Purificazione, caratterizzazione e validazione di antigeni NS1 di ZIKV, DENV1-4 e WNV per la realizzazione di test 'in house'..	Saggi diagnostici sviluppati 'in house', anche in modalità POC, da validare su sieri di controllo.	Pubblicazioni allegate alla Relazione finale (all.2-7).

Quadro delle attività svolte

Descrivere sinteticamente i contenuti delle attività progettuali intermedie svolte, indicando la durata ed i soggetti coinvolti nell'implementazione Compilare per ogni fase progettuale non superando 1000 caratteri per fase					
Fase progettuale	Data prevista di inizio	Data prevista di fine	Attività svolta	Eventuali criticità riscontrate	Soggetti coinvolti nella fase progettuale
I Stesura del protocollo per la diagnosi delle infezioni da virus Dengue, West Nile, Chikungunya e Zika, con le definizioni di caso e le modalità di campionamento dei materiali biologici	0	6° mese	Redazione del protocollo (All./1 relazione intermedia)		Proponente: UNITS Partners: ASUIUD
II Organizzazione di almeno un corso di formazione per MMG e per operatori di Pronto Soccorso	7° mese	9° mese	Organizzazione e presso ASUIUD di un corso realizzazione di un corso residenziale per medici di Pronto Soccorso e per MMG	Il trasferimento dell'UCO Igiene e MP dall'IRCCS "Burlo Garofolo" ad ASUIUD ha ritardato la programmazione dei corsi di formazione: la pandemia COVID-19 ha successivamente impedito la sua realizzazione	Proponente: UNITS Partners: ASUIUD
III Implementazione e standardizzazione	Tempo 0	36° mese	Preparazione di RNA standard per ZIKV (ceppo	La ricerca dell'RNA virale in siero o in	Proponente: UNITS Partners: ICGEB

zione delle metodiche "in house" per la ricerca diretta di arbovirus.			africano ed asiatico), Dengue sierotipo 1-4, TBE virus ceppo Neudoerfl, West Nile ceppo NY99. Preparazione di standard molecolari. Selezione dei primers per RT PCR.	reticolociti presenta criticità nell'amplificazione.	
IV Partecipazione a controlli di qualità nazionali ed internazionali.	Tempo 0	36° mese	L'UCO Igiene e Medicina Preventiva ha partecipato nel 2017/18 ai controlli di qualità internazionali QCMD per WNV, DENV, CHKV e ZKV dei quali sono stati allegati alla relazione finale i certificati di partecipazione e i report individuali sui risultati (All./8-31); il Core Panel Member Score è stato 0 (massimo) per tutti i quattro virus con una sola eccezione dove si è registrato un falso negativo.		Proponente: UNITS Partners: ICGEB
V Standardizzazione del test	Tempo 0	36° mese	Sono stati titolati, suddivisi in	Necessità di preparare diverse linee	Proponente: UNITS Partners: ICGEB

di neutralizzazione PRNT per Zika e messa a punto di test di neutralizzazione rapidi per Dengue e West Nile.			aliquote e stockati a -80°C i virus West Nile e Zika necessari per l'esecuzione del test di neutralizzazione/PRNT. Sono stati eseguiti i primi test per la conferma di positività sierologiche per WNV e per Zika. Realizzazione di un metodo di PRNT con lettura automatica del pozzetto utilizzando una linea cellulare ingegnerizzata con un reporter fluorescente. Risultati pubblicati	cellulari per virus diversi	
VI Validazione di saggi sierologici multiparametrici "in house".	Tempo 0	36° mese	Purificazione, caratterizzazione e validazione di antigeni NS1do ZIKV, DENV1-4 e WNV per la realizzazione di test "in house"		Proponente: UNITS Partners: ICGEB
VII Raccolta di campioni biologici di pazienti con sospette arbovirosi e	Tempo 0	36° mese	Nel corso del progetto sono stati raccolti campioni di sangue (anche seriali) e di urine di casi		Proponente: UNITS Partners: ASUIUD

preparazione di un pannello di sieri/campioni per la validazione delle tecniche e per i controlli di qualità interni.			sospetti di Dengue, di Chikungunya di (di TBE, Zika e di Usutu) confermati con i test in house e con PRNT.		
---	--	--	--	--	--

Eventuale diffusione dei Risultati, trasferimento delle conoscenze già svolti

<p>Descrivere come la ricerca è stata già divulgata e con quali mezzi Compilare la parte sottostante non superando i 1000 caratteri</p>
<p>Pubblicazioni scientifiche dei proponenti (D'Agaro P, Marcello A, Bassetti M) relative al progetto:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tricarico PM, et al. Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 2017; 492: 597-602 2. Fortuna C, et al. Imported arboviral infections in Italy, July 2014-October 2015: a National Reference Laboratory report. <i>BMC Infect Dis.</i> 2017; 17: 216. 3. Mora-Cárdenas E and Marcello A. Switch on the LAMP to spot Zika. <i>Annales of Translational Medicine.</i> 2017, 5: 500. 4. Kaur N, et al. Chikungunya outbreak in Delhi, India, 2016: a report on the co-infection status and co-morbid conditions in patients. <i>New Microbes and New Infections.</i> 2017, 20: 39-42. 5. Maistrau M, et al. A method for the detection of virus infectivity in single cells and real time: towards an automated fluorescence neutralization test. <i>Virus Res.</i> 2017, 237: 1-6. 6. Tagliabue G, et al. A label-free immunoassay for Flavivirus detection by the Reflective Phantom Interface technology. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 2017, 492: 558-564. 7. Oderinde BS, Mora-Cárdenas E, Carletti T, Baba MM, Marcello A. Prevalence of locally undetected acute infections of Flaviviruses in North-Eastern Nigeria. <i>Virus Res.</i> 2020 Sep;286:198060. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198060. 8. Caracciolo I, Mora Cardenas E, Aloise C, Carletti T, Segat L, Burali MS, Chiarvesio A, Totis V, Avšič – Županc T, Mastrangelo E, Manfroni G, D'Agaro P and Marcello A. Comprehensive response to Usutu virus following first isolation in blood donors in the Friuli Venezia Giulia Region of Italy: development of recombinant NS1-based serology and sensitivity to antiviral drugs. <i>PLoS Negl Trop Dis.</i> 2020 Mar 30; 14 (3): e0008156. doi: 10.1371/journal.pntd.0008156. 9. Mora-Cárdenas E, Aloise C, Faoro V, Knap Gašper N, Korva M, Caracciolo I, D'Agaro P, Avšič-Županc T, Marcello A. Comparative specificity and sensitivity of NS1-based serological assays for the detection of flavivirus immune response. <i>PLoS Negl Trop Dis.</i> 2020 Jan 29; 14 (1): e0008039. doi: 10.1371/journal.pntd.0008039. 10. Castaldo N, Graziano E, Peghin M, Gallo T, D'Agaro P, Sartor A, Bove T, Cocconi R, Merlino G, Bassetti M. Neuroinvasive West Nile Infection with an Unusual Clinical Presentation: A Single-Center Case Series. <i>Trop. Med. Infect. Dis.</i> 2020, 5, 138; doi:10.3390/tropicalmed5030138

**Firma e timbro
del Proponente**