

West Nile Virus (WNV) seroprevalence in a blood donors group of Milan

Giovanna Lunghi², Paolo Gaibani¹, Caterina Matinato², Anna Orlandi², Antonella Zoccoli²,
Patrizia Bono², Anna Pierro¹, Maria Paola Landini¹, Vittorio Sambri¹, Erminio Torresani²

1 Centro di Riferimento Regionale per le emergenze Microbiologiche [CRREM], Unità Operativa di Microbiologia Clinica,
Ospedale S.Orsola-Malpighi, Bologna, Italy

2 UO Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico,
Milano, Italy

Key words: Seroprevalence, West Nile Virus, Blood donors

Sieroprevalenza di West Nile Virus (WNV) in una popolazione di donatori di Milano

SUMMARY

A seroprevalence study for anti West Nile virus was carried out among 864 healthy blood donors living in the metropolitan area of Milan by using a commercially available ELISA method. In addition, the performance of a novel ELISA assay for WNV antibodies was assessed. The sero-prevalence rate of WNV antibodies was 0.57% thus showing that WNV is likely circulating also in this up to now unknown area. The overall sensitivity and specificity of the novel ELISA were 99.9% and 45.4%, respectively, well comparable with that of the chosen reference immunoenzymatic method.

INTRODUZIONE

Il West Nile virus (WNV) è un Arbovirus appartenente alla famiglia delle *Flaviviridae*, con un ciclo naturale che coinvolge uccelli (*corvivoridae*) e zanzare (genere *Culex*). Nella maggior parte dei casi, l'infezione decorre asintomatica con esito di encefalite solo nell'1% degli infetti. Tra le vie di trasmissione si riconoscono trasfusioni, trapianto d'organo e via verticale.

Negli ultimi anni la circolazione di WNV è stata descritta ubiquitariamente, con evidenza di epidemie negli Stati Uniti e in Europa (1, 10, 11).

In Italia la prima epidemia WNV è stata segnalata nel 1998 in Toscana negli equini, il virus è riemerso, poi, nel 2008 -2009 dando origine rispettivamente a 9 e 16 casi di infezione neuro invasiva nell'uomo, in Emilia Romagna e Veneto nella zona del delta del Po (3, 6). Come conseguenza di tali ritrovamenti le regioni interessate hanno impostato una strategia di sorveglianza integrata in uomini, animali e vettori per monitorare la circolazione di WNV nel proprio territorio (8).

Tra il 2010 e il 2011 si sono verificati 6 casi di trasmissione di WNV tramite organi trapiantati nonostante la ricerca attiva del DNA del virus tra i donatori nel periodo giugno-novembre (5).

Nel 2011, la presenza di WNV è stata riscontrata, anche in Friuli, in zone *naives* del sud Italia e Sardegna suggerendo un progressivo allargamento delle zone interessate dal virus (2).

Questo studio è stato intrapreso per valutare la

sieroprevalenza di WNV in un'area, quella metropolitana di Milano, dove l'attività virale non era stata documentata precedentemente.

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati un totale di 864 sieri di donatori afferenti al Centro Trasfusionale della Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano nel periodo 1 maggio-1 agosto 2011 (età media 45 anni, range 18-65, ratio maschi/femmine 1.5).

Per lo *screening* sono stati utilizzati: un nuovo *kit* commerciale EIA IgG/IgM (DIAPRO Milano) e un *kit* con *performances* consolidate, EIA IgG (EuroImmuno, Germany). I campioni reattivi sono stati confermati tramite *test* di microneutralizzazione (MNTA) in accordo con il protocollo *standard*. I campioni MNTA positivi sono stati valutati mediante EIA IgM, IFA ed Avidity (EuroImmuno Germany).

RISULTATI

Allo *screening*, 11 campioni sono risultati positivi con il *test* Diapro e 10 con il *test* Euroimmun. Tali campioni, confermati tramite microneutralizzazione (MNTA), *gold standard* per la verifica di specificità degli anticorpi WNV, hanno indicato che solo 5 presentavano azione neutralizzante contro WNV.

La specificità del *test* Diapro era del 45.5 % mentre quella del *test* Euroimmun del 54.5%, la sensi-

Corresponding author: Giovanna Lunghi

Laboratorio Centrale Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico,
Milano - Via San Barnaba,8 - Padiglione Devoto - Tel. 02 55033457

E-mail: giovanna.lunghi@policlinico.mi.it

bilità era per entrambi i metodi del 99.9%, quando comparati con il *test* MNTA. Il paragone tra i due metodi EIA (Diapro-Euroimmun) indicava un esito concorde nel 91%, infatti 1 solo campione evidenziava un risultato discordante: positivo Diapro/negativo Euroimmun, confermato negativo dall'MNTA. I 5 campioni positivi alla micro-neutralizzazione valutati con il *test* IFA presentavano titoli IgG compresi tra 1/400 e 1/6400, mentre erano tutti negativi per IgM (Tabella 1). Per stabilire il periodo di infezione i campioni sono stati saggiati con un *test* di avidità: i titoli sono risultati superiori al 70%, indicando che il contatto con il virus presumibilmente era da datarsi prima della primavera 2011.

CONCLUSIONI

I risultati del nostro studio confermano la diffusione di WNV nell'area di Milano con una siero prevalenza dello 0.57 tra i donatori di sangue da noi testati. Uno studio simile condotto nel 2009 in

Emilia Romagna, considerata regione endemica per WNV, aveva rivelato una prevalenza dello 0.68%, tra i donatori della provincia di Ferrara (1). In provincia di Rovigo tra i contadini che lavoravano in fattorie con cavalli sieropositivi per WNV la siero prevalenza riportata era dell'1.56%, mentre era dell'1.2%, in oltre mille donatori d'organo provenienti da 18 regioni italiane (3, 4, 6). Il nostro campione di donatori, tuttavia, rappresentando prevalentemente soggetti maschi tra i 18 e i 65 anni potrebbe sottostimare l'effettiva epidemiologia del virus.

Visti i risultati del *test* di *avidity* (>70%), si può suggerire che WNV circoli almeno dal 2010 tra la popolazione di Milano e che l'attività di sorveglianza stagionale del virus dovrebbe essere estesa a zone più vaste per evitare il rischio di trasmissione tramite donazioni di sangue e d'organo (7).

Il nuovo *test* EIA saggiato nello *screening* presenta una sensibilità (99.9%) comparabile con i metodi noti e può essere validamente utilizzato in *routine*.

Tabella 1. Riassunto dei test utilizzate per i campioni reattivi.

Campione	WNV ELISA IgG		AVIDITY (%)	WNV IIF Titolo IgG	MNTA Titolo
	DiaPro	EUROIMMUN	EUROIMMUN	EUROIMMUN	WNV
1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
5	Positivo	Positivo	≥ 70%	1/6400	1/320
6	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
15	Positivo	Positivo	≥ 90%	1/1600	1/80
18	Positivo	Positivo	≥ 90%	1/400	1/20
19	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
22	Positivo	Positivo	≥ 70%	1/6400	1/40
26	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
31	Positivo	Positivo	≥ 90%	1/800	1/80
33	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
35	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
TOT	11	10	5	5	5

BIBLIOGRAFIA

- Angelini P, Tamba M, Finarelli AC, et al. West Nile Virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: the integrated surveillance system 2009. *Euro Surveill* 2010; 15: pii: 19547.
- Bagnarelli P, Marinelli K, Trotta D, et al. Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011. *Euro Surveill* 2011; 16: pii: 20002.
- Barzon L, Pacenti M, Cusinato R, et al. Human cases of West Nile Virus infection in north-eastern Italy, 15 June to 15 November 2010. *Euro Surveill* 2011; 16: pii: 19949.
- Capobianchi MR, Sambri V, Castilletti C, et al. Italian Transplant Network: Retrospective screening of solid organ donors in Italy, 2009, reveals unpredicted circulation of West Nile virus. *Euro Surveill*, Aug 26, 2010; 15 (34) pii: 19648.
- Costa AN, Capobianchi MR, Ippolito G, et al. West Nile virus: the Italian national transplant network reaction to an alert in the north-eastern region, Italy 2011. *Euro Surveill* 2011; 16: pii: 19991.
- Cusi MG, Roggi A, Terrosi C, Gori Savellini G, Toti M. Retrospective diagnosis of West Nile virus infection in a patient with meningoencephalitis in Tuscany, Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11: 1511-2.
- Fox JL, Hazell SL, Tobler LH, Busch MP. Immunoglobulin G avidity in differentiation between early and late antibody responses to West Nile virus. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 33-6.
- Grazzini G, Liumbruno GM, Pupella S, et al. West Nile virus in Italy: a further threat to blood safety, a further challenge to the blood system. *Blood Transfus* 2008; 6: 235-7.
- Pierro A, Gaibani P, Manisera C, et al. Seroprevalence of West Nile virus-specific antibodies in a cohort of blood donors in northeastern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11: 1605-7.
- Rizzo C, Vescio F, Declich S, et al. West Nile virus transmission with human cases in Italy, August - September 2009. *Euro Surveill* 2009; 14: pii: 19357.
- Rossini G, Cavrini F, Pierro A, et al. First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy, September 2008 - case report. *Euro Surveill* 2008; 13: pii: 19002.