

**CORSO REGIONALE DI FORMAZIONE ED ACQUISIZIONE DELLE COMPETENZE
PER LA QUALIFICAZIONE DEL PERSONALE MEDICO E INFERMIERISTICO
ADDETTO ALLA ATTIVITÀ DI RACCOLTA DEL SANGUE E DEGLI
EMOCOMPONENTI**

I patogeni emergenti e riemergenti

Maria Paola Landini

Professore di Microbiologia, Università degli Studi di Bologna

Direttore U.O. Microbiologia

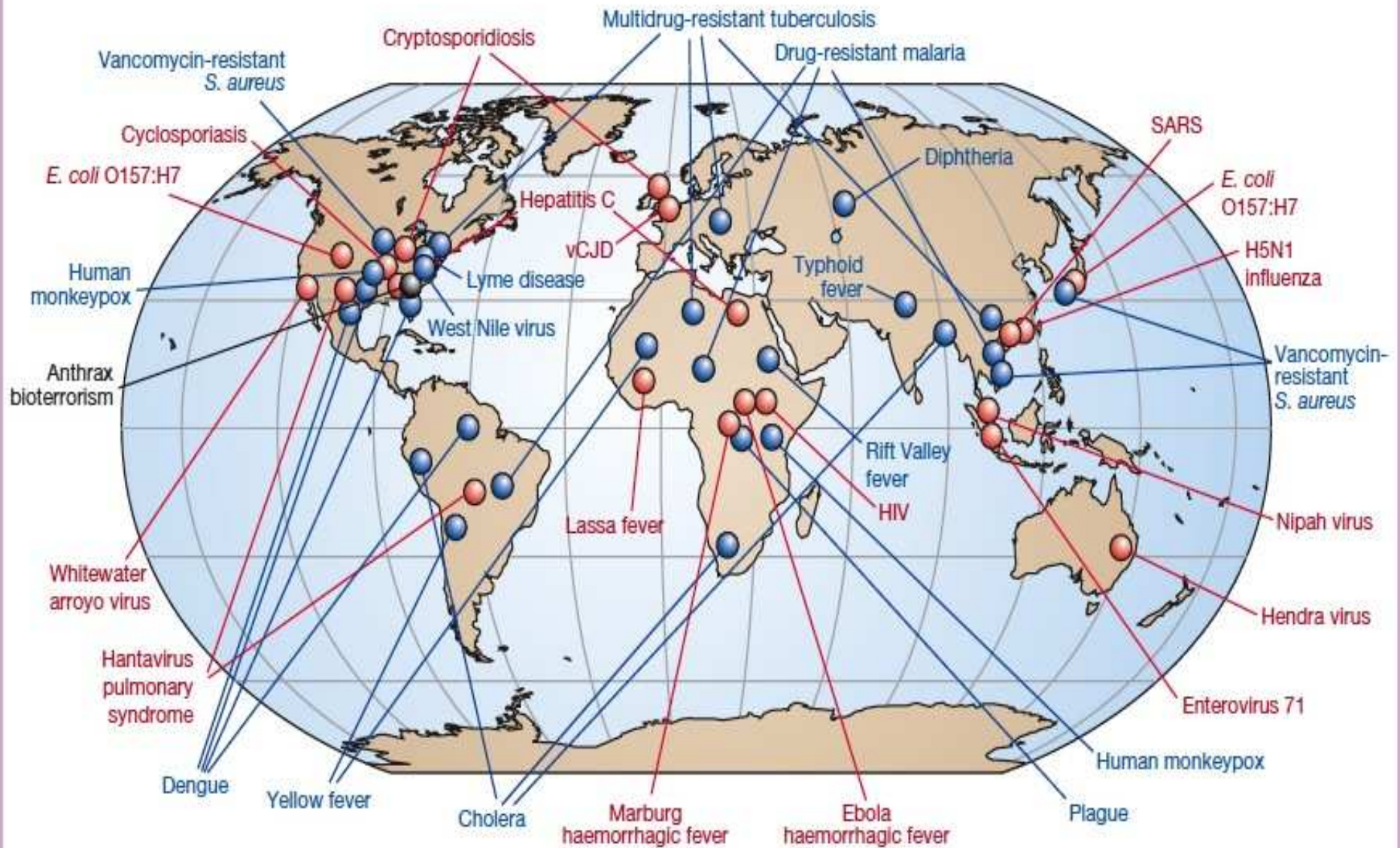


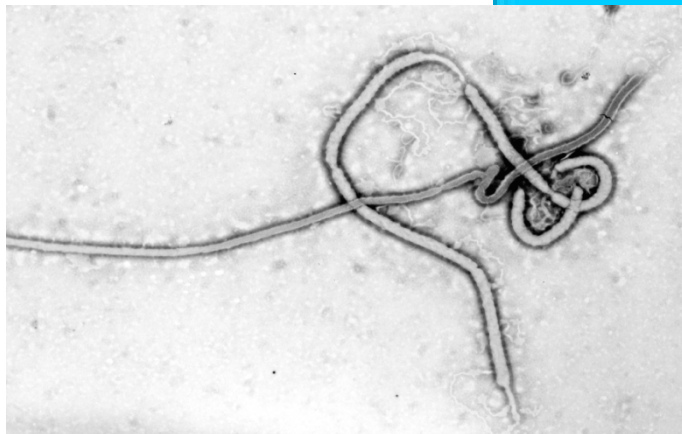
Figure 1 Global examples of emerging and re-emerging infectious diseases, some of which are discussed in the main text. Red represents newly emerging diseases; blue, re-emerging/resurging diseases; black, a 'deliberately emerging' disease. Adapted, with permission, from ref. 23.

EBOLA



La più grande epidemia
da Filovirus della storia
ha inizio nel Dicembre
2013 nella zona sud est
della **Guinea**

ma viene identificata
solo a marzo 2014



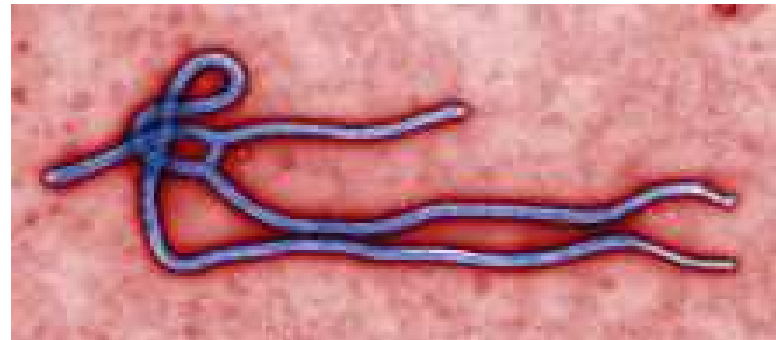
IL VIRUS

Group: Group V (-)ssRNA

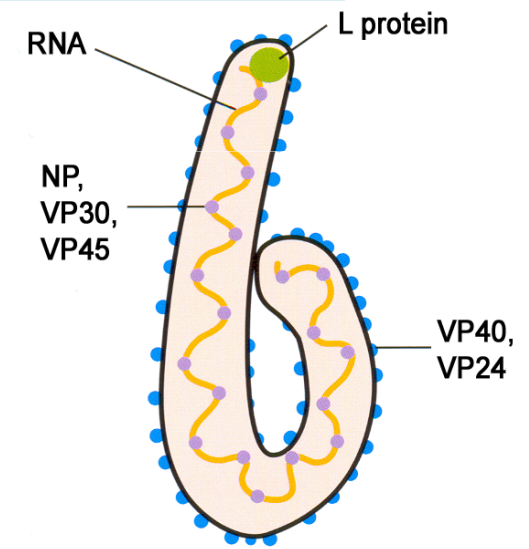
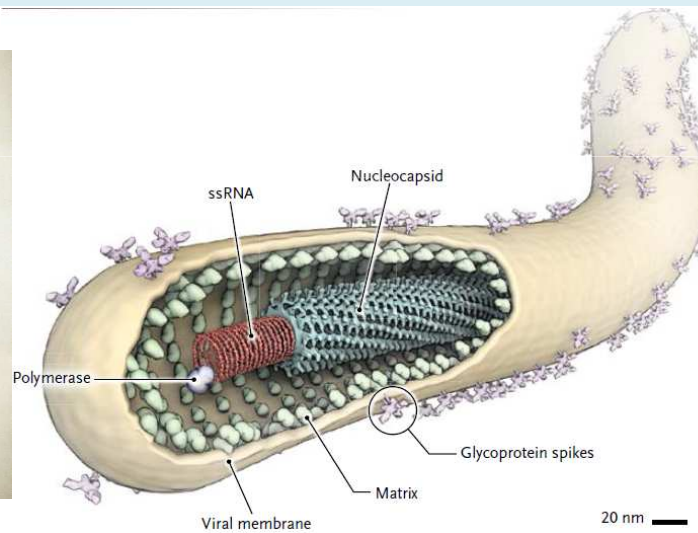
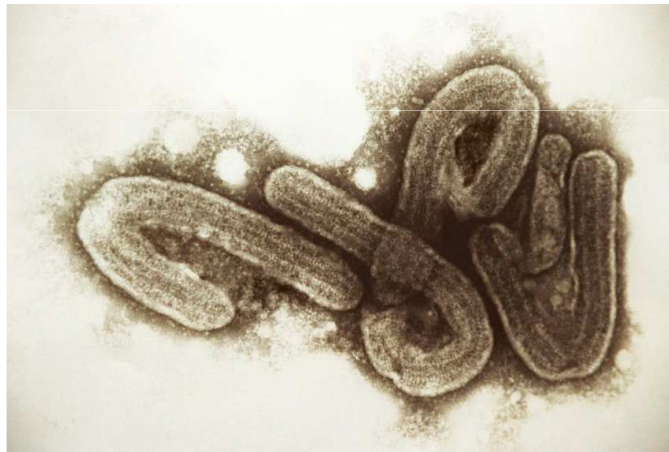
Order: Mononegavirales

Family: Filoviridae

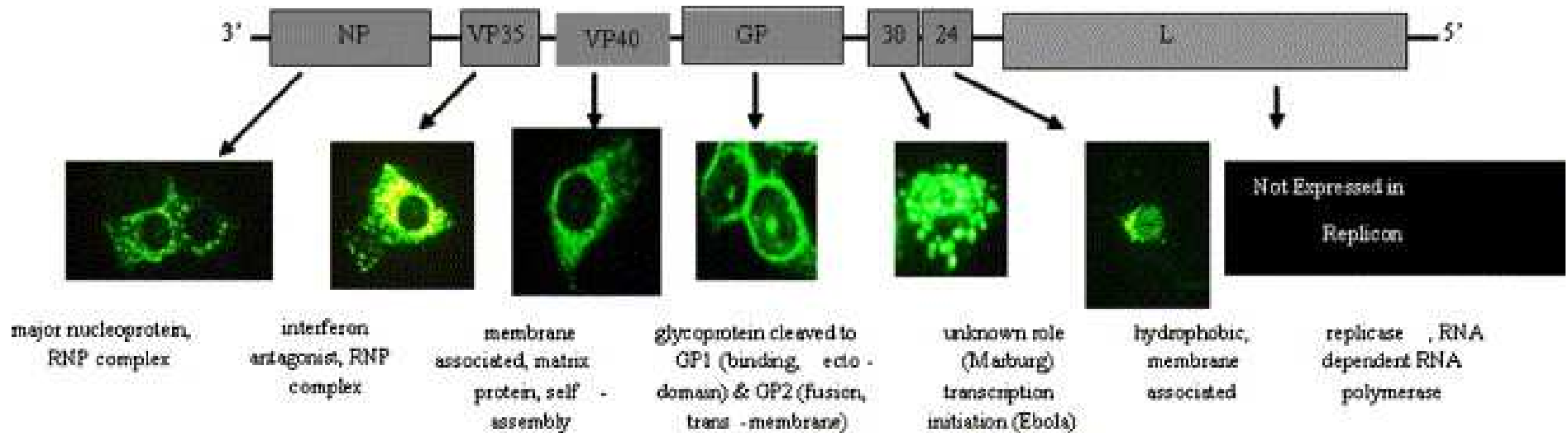
Genus: *Ebolavirus*



- Particella virale pleomorfa, allungata, dotata di involucro,
- Dimensioni: 80nm x 130-14,000nm
- Genoma: RNA a singola elica, polarità negativa
- 7 proteine, alcune con spiccata capacità di contrastare l'attivazione dell'immunità innata (es. IFN)



Replicazione veloce = 8 ore



NP: proteina NP strutturale di 83.3 Kd

L: RNA-polimerasi RNA dipendente

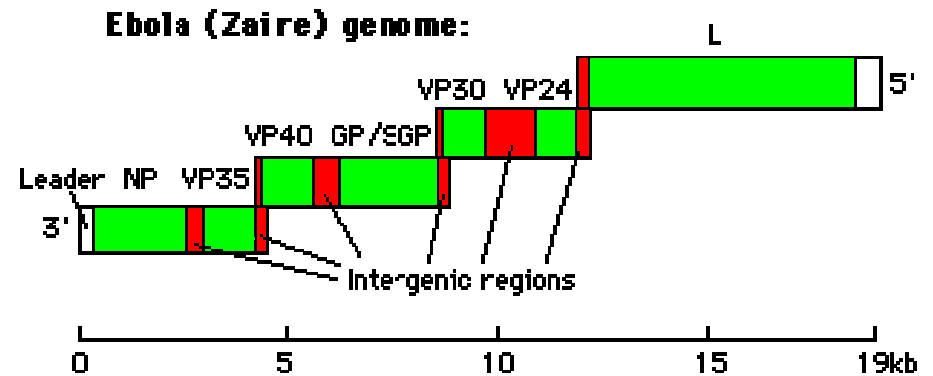
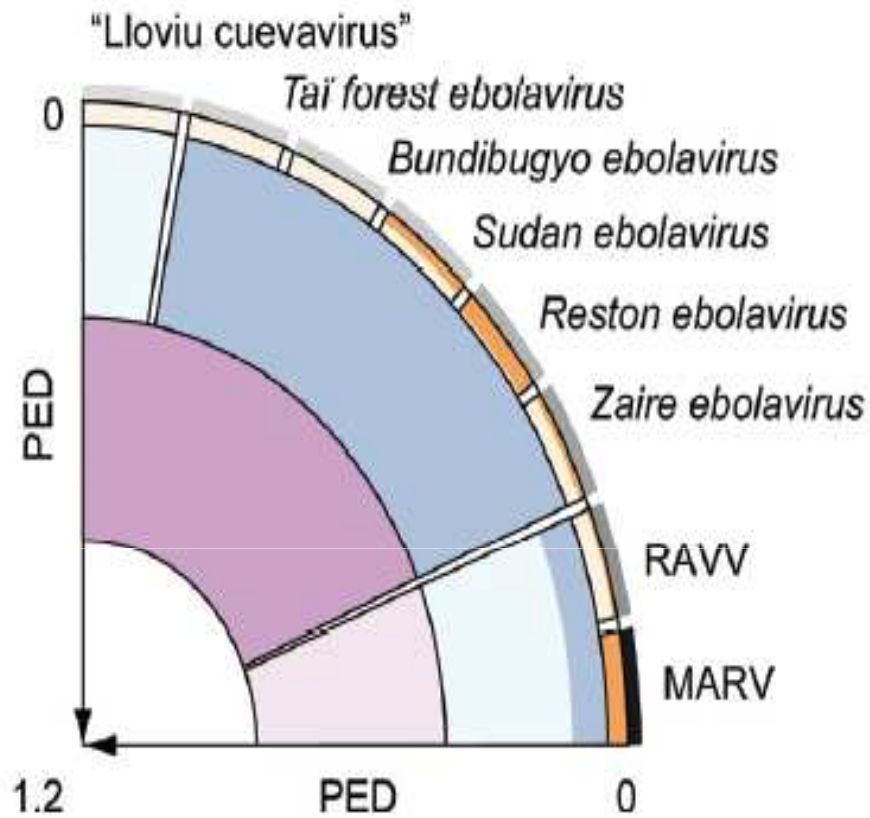
GP: glicoproteina GP (2 forme: trans-membrana e secretoria)

VP40: proteina di matrice per la sua carica positiva facilita la gemmazione

VP30: proteina fosforilata con funzione di attivazione e modulazione della trascrizione (incapsidamento RNA)

VP35: proteina coinvolta in eventi trascrizionali; inibisce l'attivazione del sistema IFN contribuendo alla patogenicità dei filovirus

VP24: proteina associata alla matrice; la funzione rimane ambigua



5 specie di Virus Ebola:

Zaire

Sudan

Bundibuyo

Tai Forest

Reston (non patogeno per l'uomo)

Non è un virus resistente

Viene ucciso facilmente da sapone, candeggina, luce solare o asciugatura.

Il lavaggio in lavatrice di indumenti contaminati è sufficiente a distruggerlo.

Sopravvive solo per breve tempo su superfici esposte alla luce solare o secche

Sopravvive alcune ore in ambienti umidi

L' infezione ha origine zoonotica



Pipistrelli della frutta della famiglia *Pteropodidae* sono considerati l' ospite naturale di Ebola

Altri primati colpiti da Ebola



Gorilla



Scimpanzè

Molto probabilmente si infettano mangiando frutta, bacche, foglie sporcate da deiezioni di pipistrelli infetti

Genoma di Ebola trovato anche in altri animali



Cefalofi, piccole antilopi africane



Topo gigante africano



toporagno

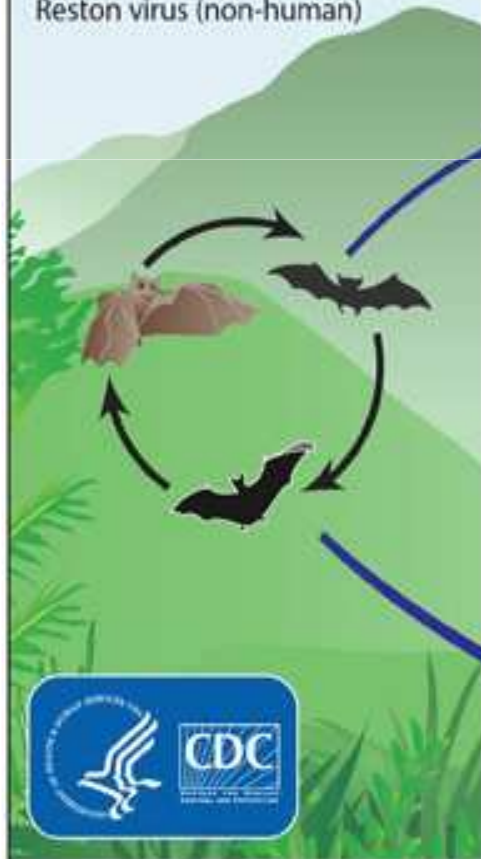
Molto probabilmente si infettano venendo a contatto con deiezioni di pipistrelli infetti

Enzootic Cycle

New evidence strongly implicates bats as the reservoir hosts for ebolaviruses, though the means of local enzootic maintenance and transmission of the virus within bat populations remain unknown.

Ebolaviruses:

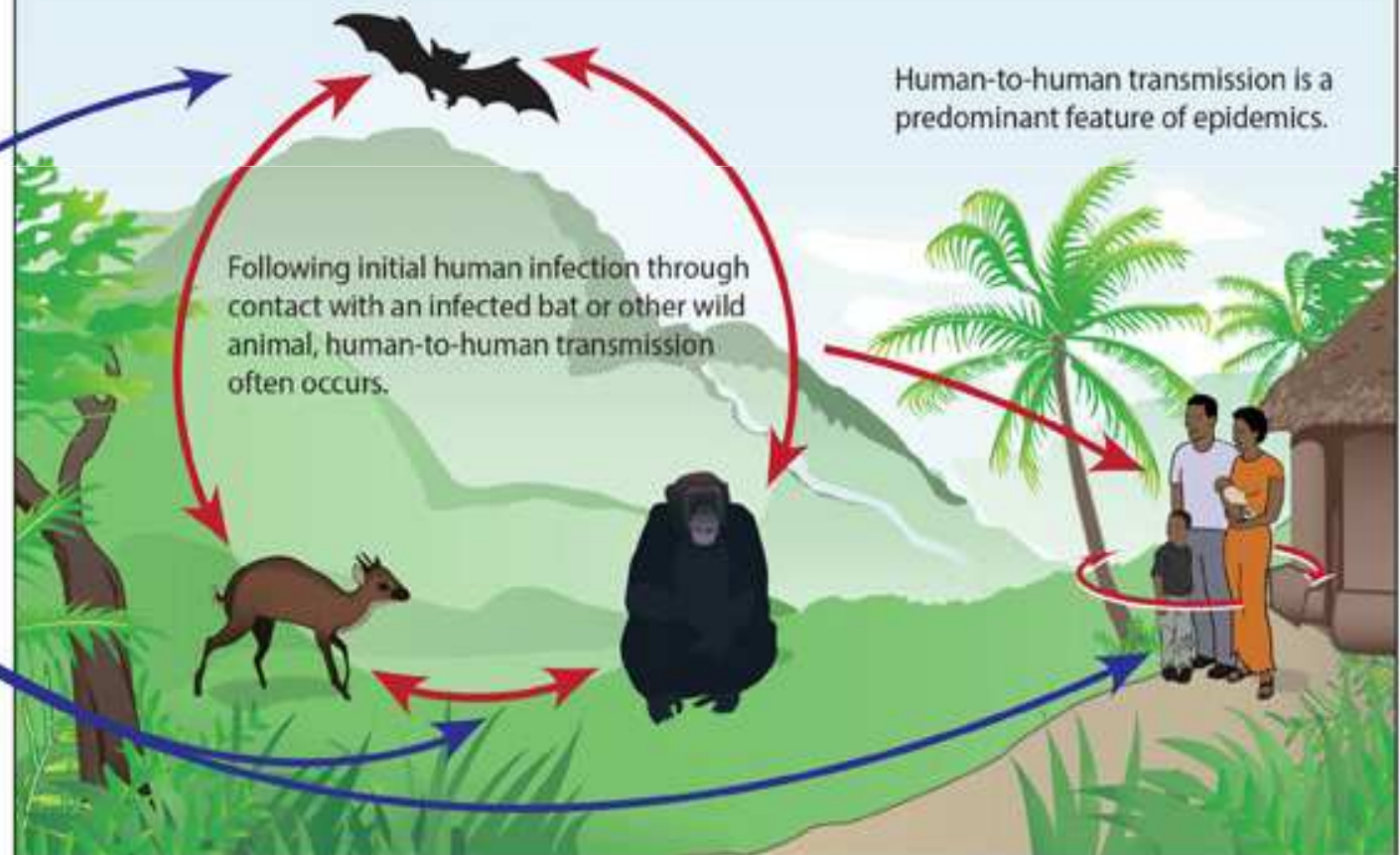
- Ebola virus (formerly Zaire virus)
- Sudan virus
- Tai Forest virus
- Bundibugyo virus
- Reston virus (non-human)



Epizootic Cycle

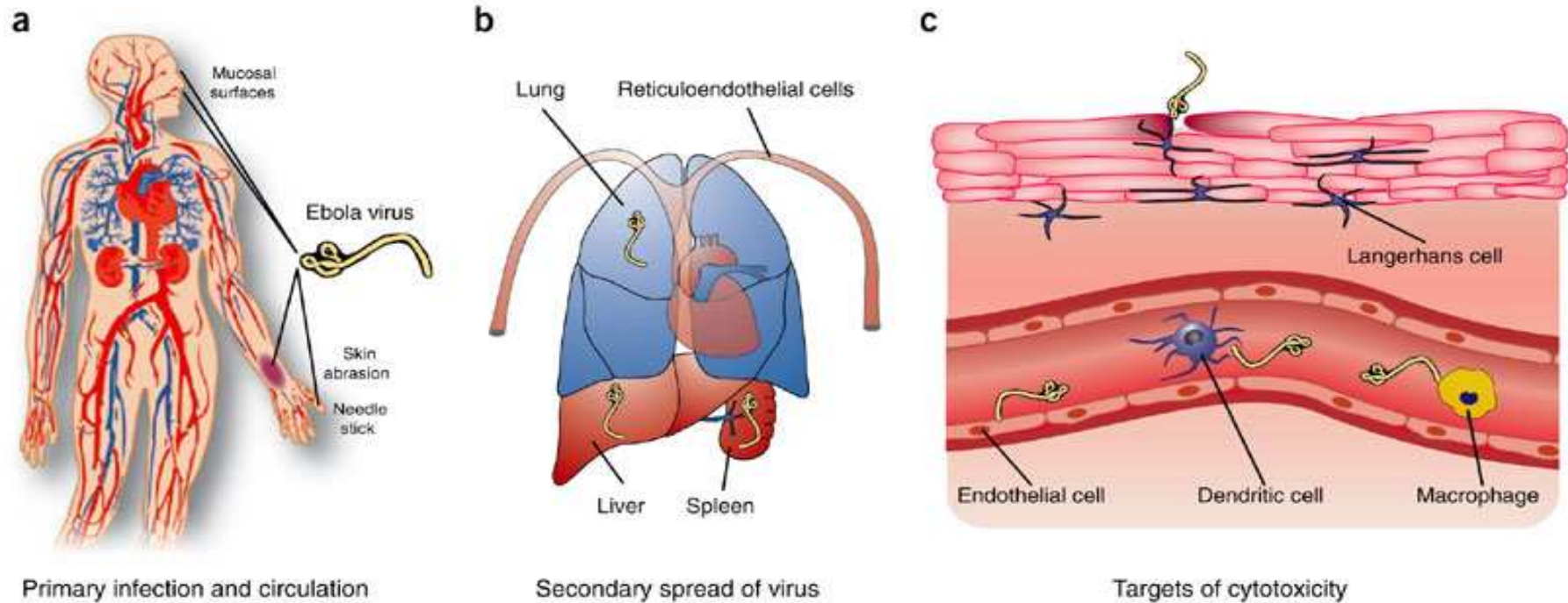
Epizootics caused by ebolaviruses appear sporadically, producing high mortality among non-human primates and duikers and may precede human outbreaks. Epidemics caused by ebolaviruses produce acute disease among

humans, with the exception of Reston virus which does not produce detectable disease in humans. Little is known about how the virus first passes to humans, triggering waves of human-to-human transmission, and an epidemic.



L' uomo si può infettare

- cacciando, preparando e mangiando pipistrelli e “bush meat”
- Raccogliendo e mangiando frutta contaminata da deiezioni di pipistrelli infetti
- Entrando in luoghi (grotte, miniere...etc) che sono il rifugio diurno dei pipistrelli
- Venendo morsicato dai pipistrelli
-



- (a) Il virus entra in circolo e si replica nelle **cellule reticoloendoteliali**
- (b) Particolarmente alta la replicazione in diversi tipi di cellule nel polmone, fegato e milza
- (c) Il virus induce effetto citopatico nelle **Cellule dendritiche, Macrofagi, cellule endoteliali**

[Immunopathology of highly virulent pathogens: insights from Ebola virus](#)

Carisa A Zampieri, Nancy J Sullivan & Gary J Nabel

Nature Immunology 2014

Patogenesi

- 1) DC infection and APC function impairment
- 2) Viral Escape mechanisms to Type I IFN
- 3) Macrophages infection and cytokines/chemokines storm induction
- 4) Dramatic loss and impairment of adaptive immune responses: B and T lymphocytes



Immunosoppressione

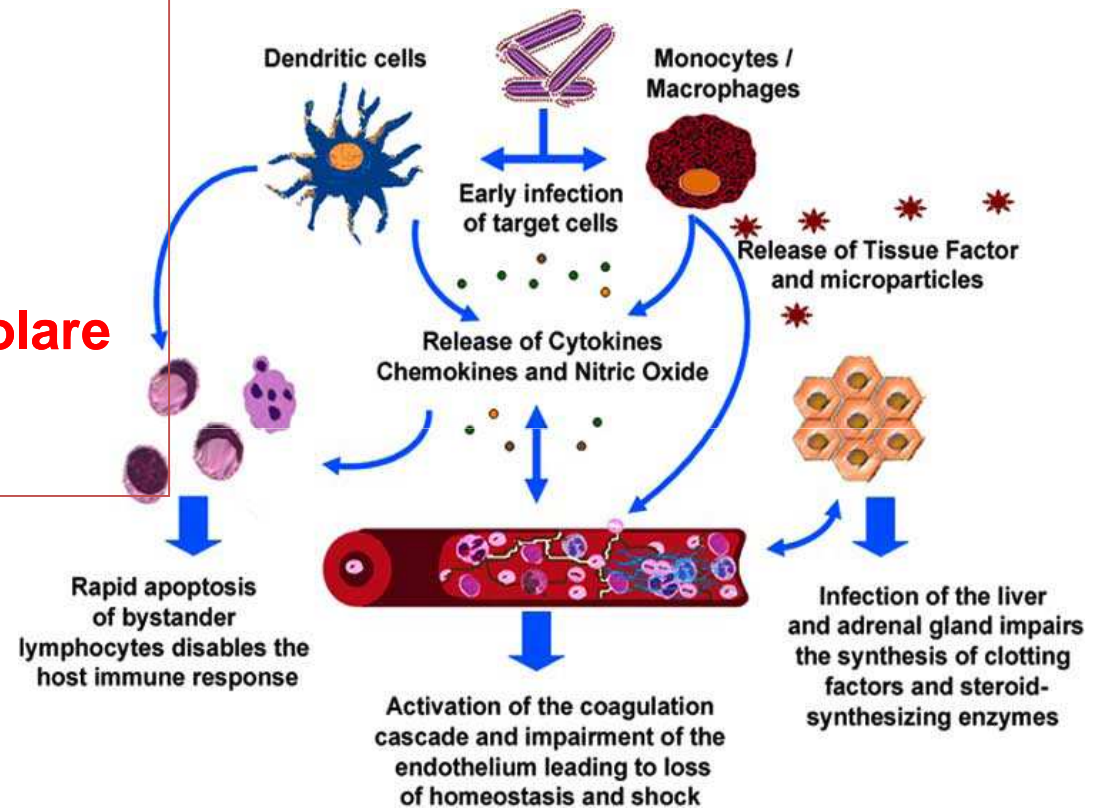
Il virus :

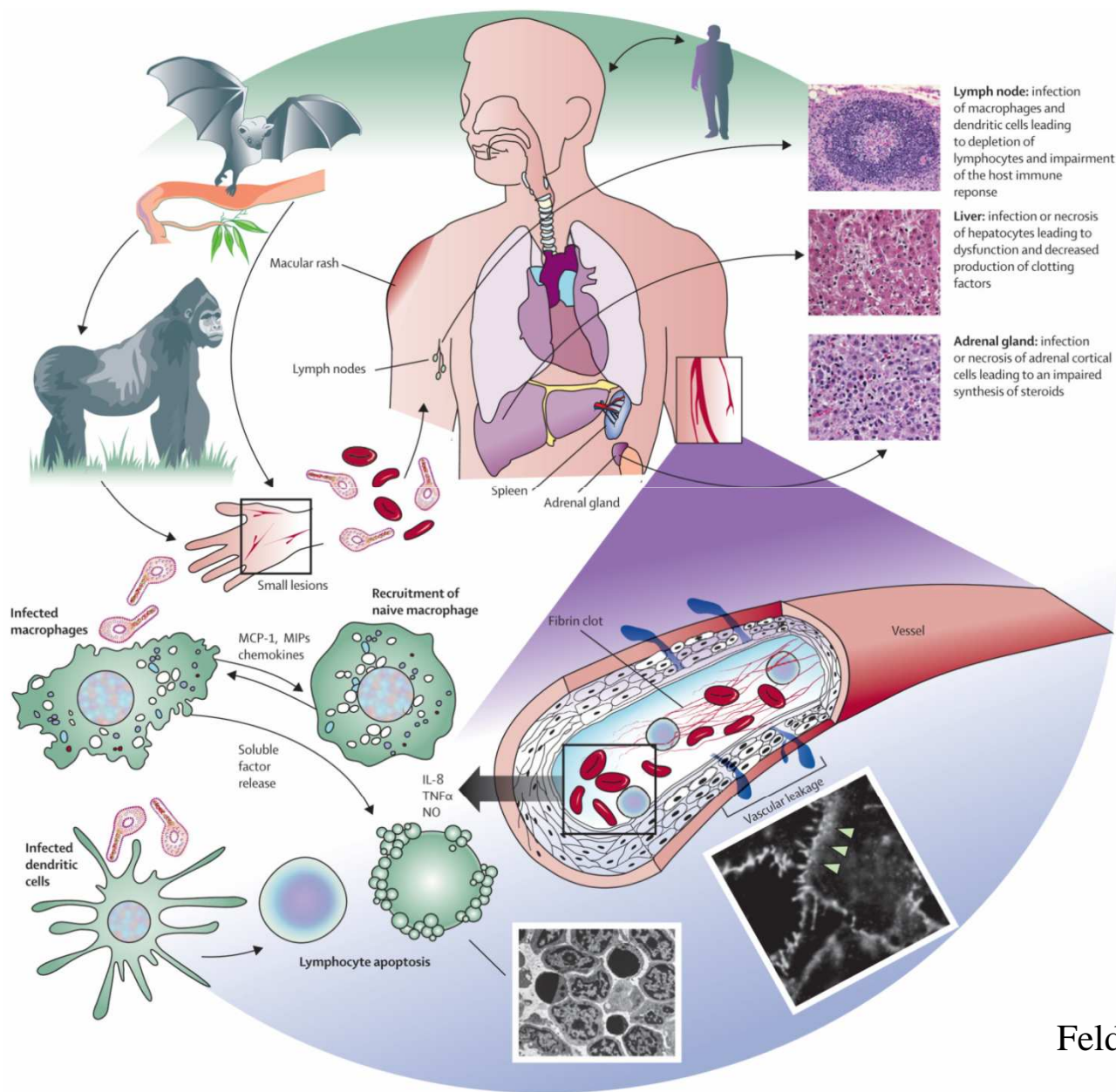
- **Causa immunodepressione**

Scarsa risposta immunitaria

- **Danneggia il sistema vascolare**

Emorragie, ipotensione, shock, morte





Feldmann, Lancet 2011

Da un malato il virus viene eliminato all' esterno

Sangue: Il viral load nel sangue può superare 10^6 - 10^8 pfu/ml nella fase acuta

Feci e urine : Trovato abbondante virus nelle fasi avanzate

Sudore: Trovati antigeni del virus nelle ghiandole sudoripare e nel sudore

Lacrime: Trovato in un caso Ebola RNA

Saliva: Trovato virus infettante nella fase acuta. Significato prognostico negativo

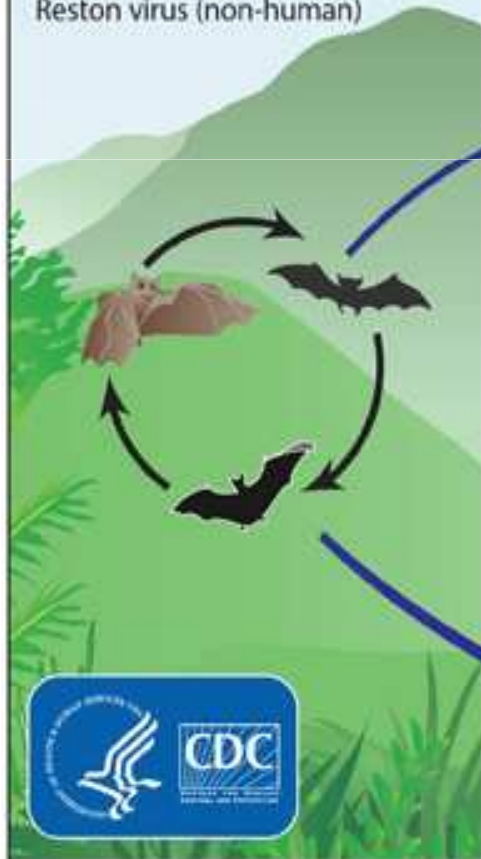
Sperma: Trovato virus fino a tre mesi dopo la guarigione

Enzootic Cycle

New evidence strongly implicates bats as the reservoir hosts for ebolaviruses, though the means of local enzootic maintenance and transmission of the virus within bat populations remain unknown.

Ebolaviruses:

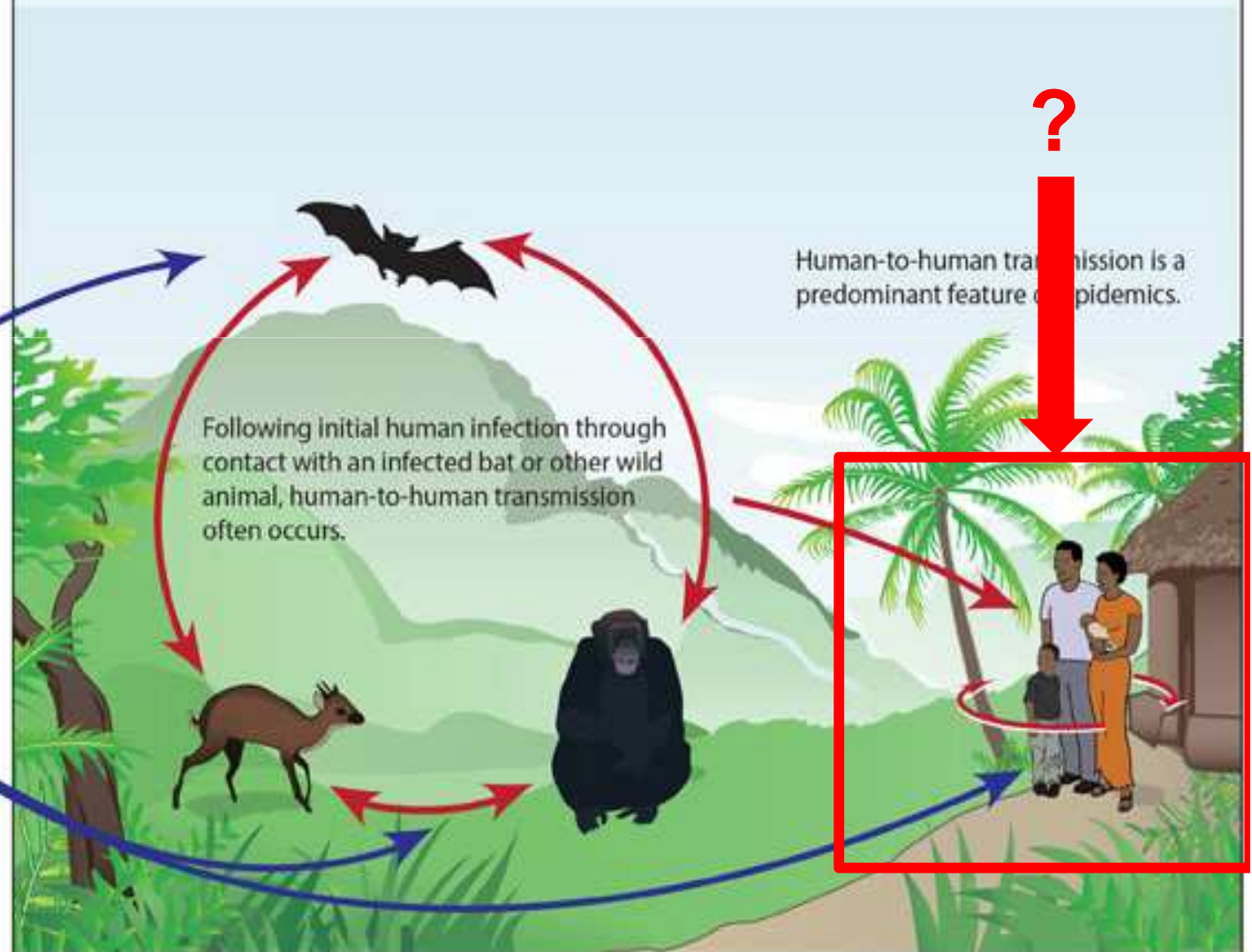
- Ebola virus (formerly Zaire virus)
- Sudan virus
- Tai Forest virus
- Bundibugyo virus
- Reston virus (non-human)



Epizootic Cycle

Epizootics caused by ebolaviruses appear sporadically, producing high mortality among non-human primates and duikers and may precede human outbreaks. Epidemics caused by ebolaviruses produce acute disease among

humans, with the exception of Reston virus which does not produce detectable disease in humans. Little is known about how the virus first passes to humans, triggering waves of human-to-human transmission, and an epidemic.



Trasmissione interumana

Contatto diretto (mucose o lesioni della cute) con sangue o altri materiali organici di persona malata (urine, saliva, feci, vomito, sperma)

Trasmissione sessuale?

Contatto indiretto mediato da oggetti contaminati

Periodo di Incubazione: da 2 a 21 giorni

Sintomi iniziali:

- Febbre
- Occhi arrossati
- Mal di testa
- Debolezza
- Dolori muscolari

Progredisce con:

- Vomito ripetuto
- Dolori addominali
- Diarrea
- Faringite
- Congiuntivite
- Emorragie interne ed esterne
- Febbre molto alta
- Prostrazione

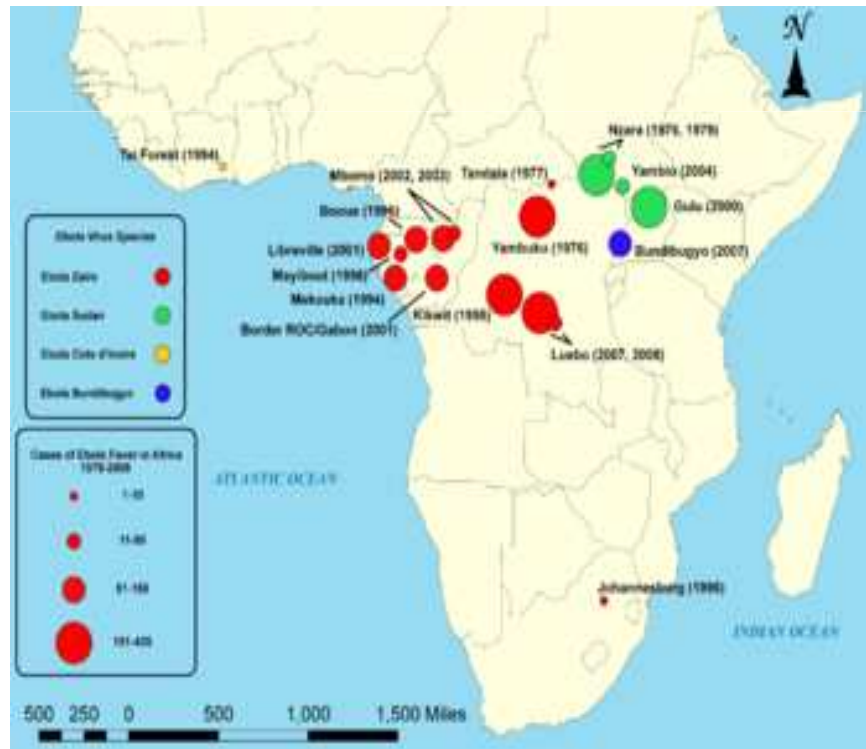
I segni conclamati



Il primo isolamento di *Ebolavirus* avvenne nel 1976 nello ZAIRE (ora Repubblica del Congo) vicino al fiume Ebola con 318 casi, 88% di decessi.

Da allora in poi 27 outbreaks

Il più grave: 1995 in Congo con 315 casi e 81% di letalità.



Casi di Ebola dal 1977 al 2009

Zaire ebolavirus

Sudan ebolavirus

Tai Forest ebolavirus

Bundibugyo ebolavirus

Dal 2010 al 2013

Uganda, Maggio 2011, Sudan Virus

Un paziente deceduto

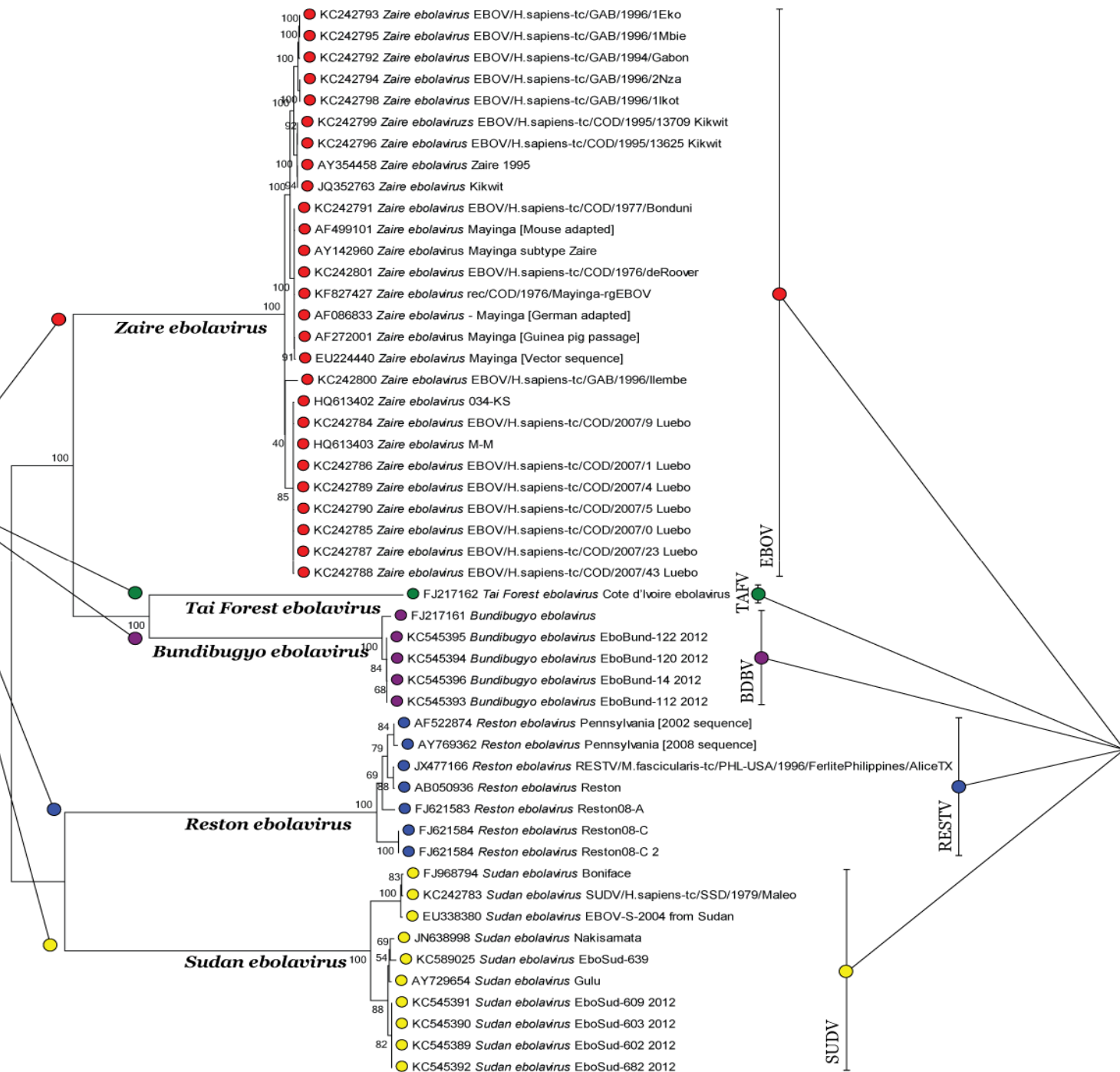
Congo, luglio 2012, Bundibugyo Virus

77 casi, 36 decessi

Uganda, luglio 2012, Sudan Virus

24 casi, 17 decessi

These are the names for the **species** for these ebolaviruses

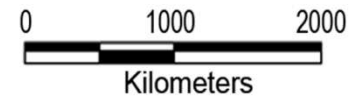
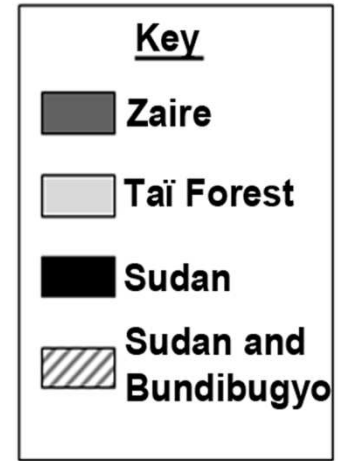
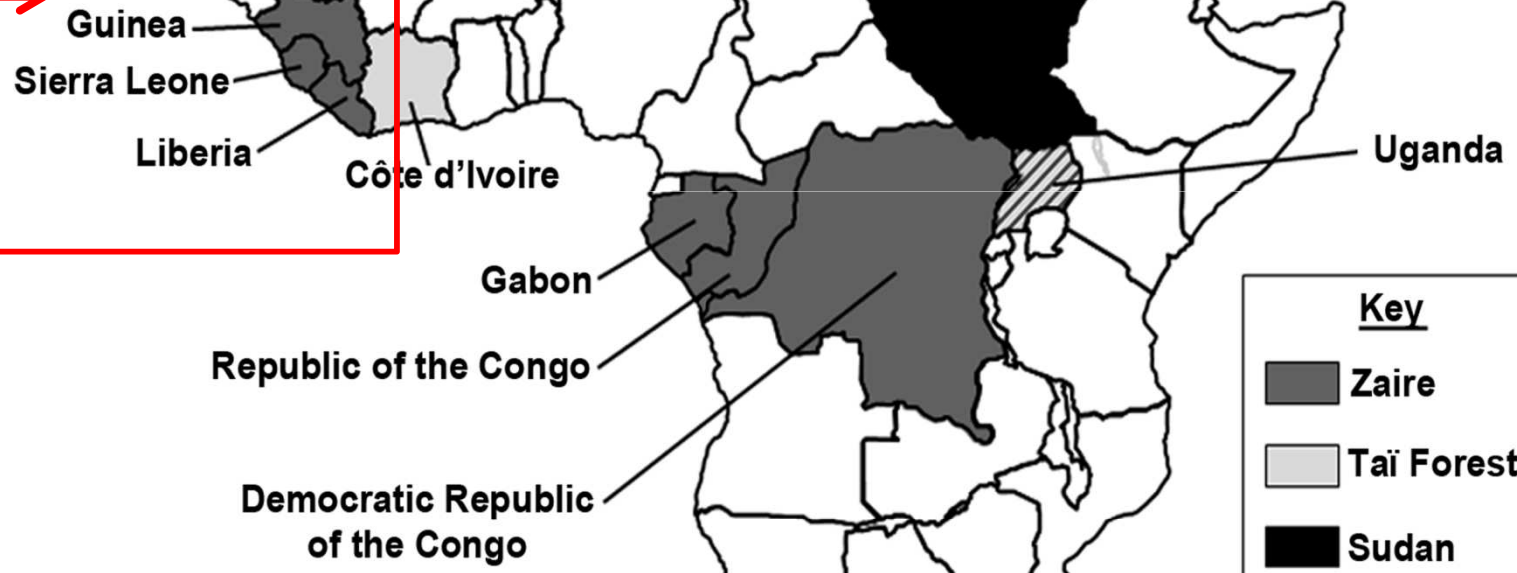
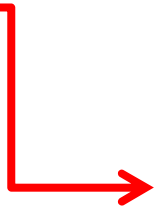


These are the names of the ebolaviruses within each species, and their initialisms

0.1

Da Dicembre 2013

Ebola Zaire





Source: CDC 31 August 2014

L' inizio: un dramma familiare

6 Dicembre 2013: Bambino di due anni muore nel villaggio di Meliandou con sintomatologia tipica della infezione da virus Ebola

13 Dicembre 2013 Muore la mamma con gli stessi sintomi

29 Dicembre 2013 Muore la sorellina di 3 anni

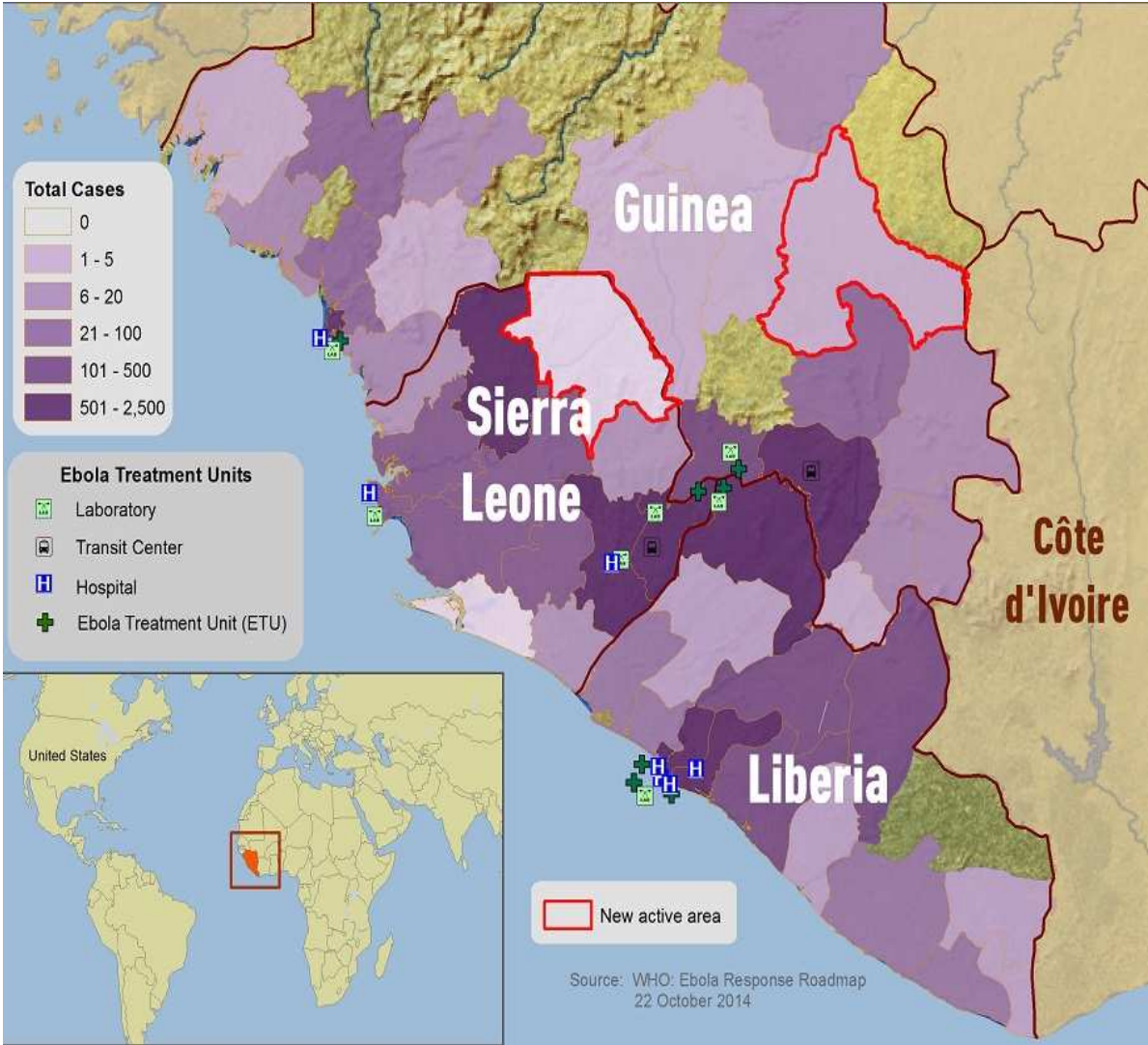
1 gennaio 2014 Muore la nonna

L' infezione si sparge ad altri villaggi attraverso persone che avevano partecipato ai funerali

Agosto 2014

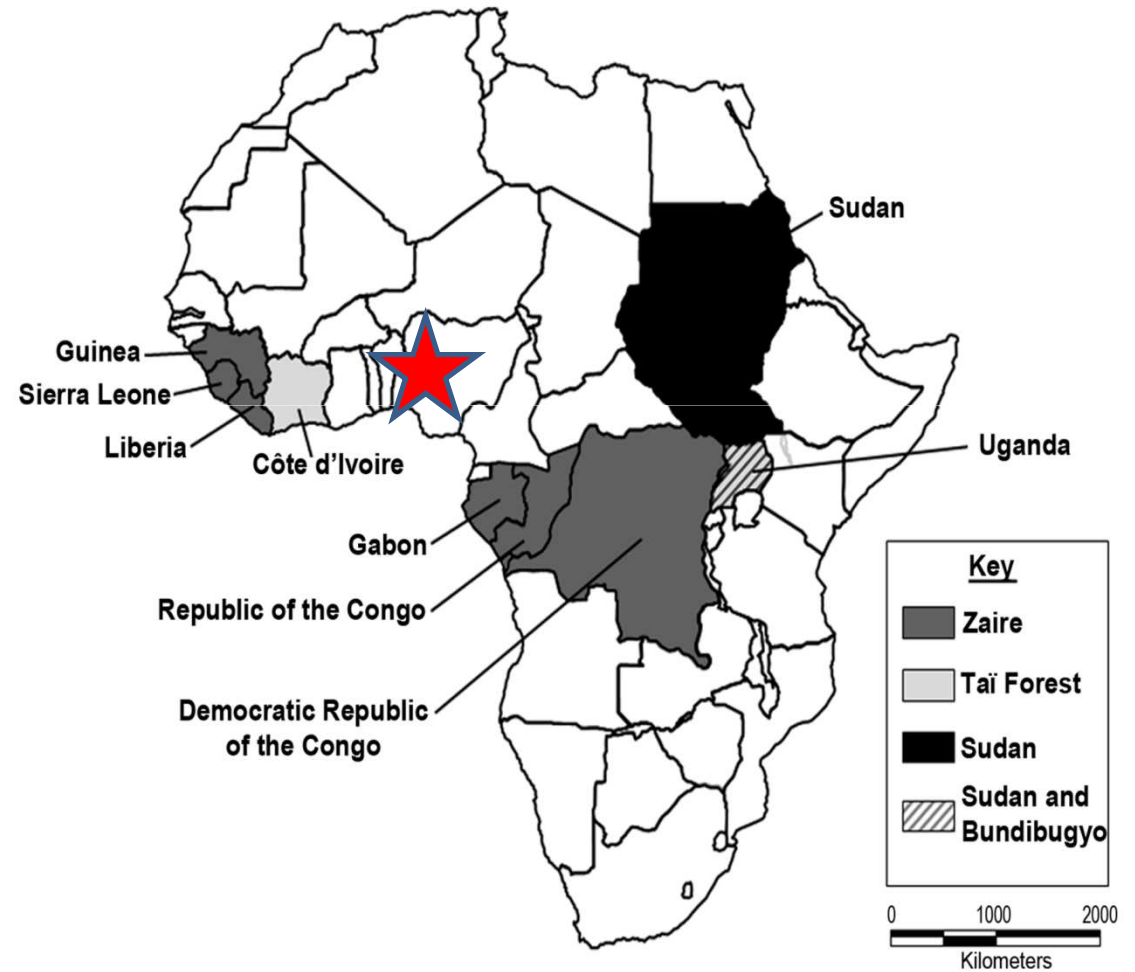


Ottobre 2014



Fine luglio

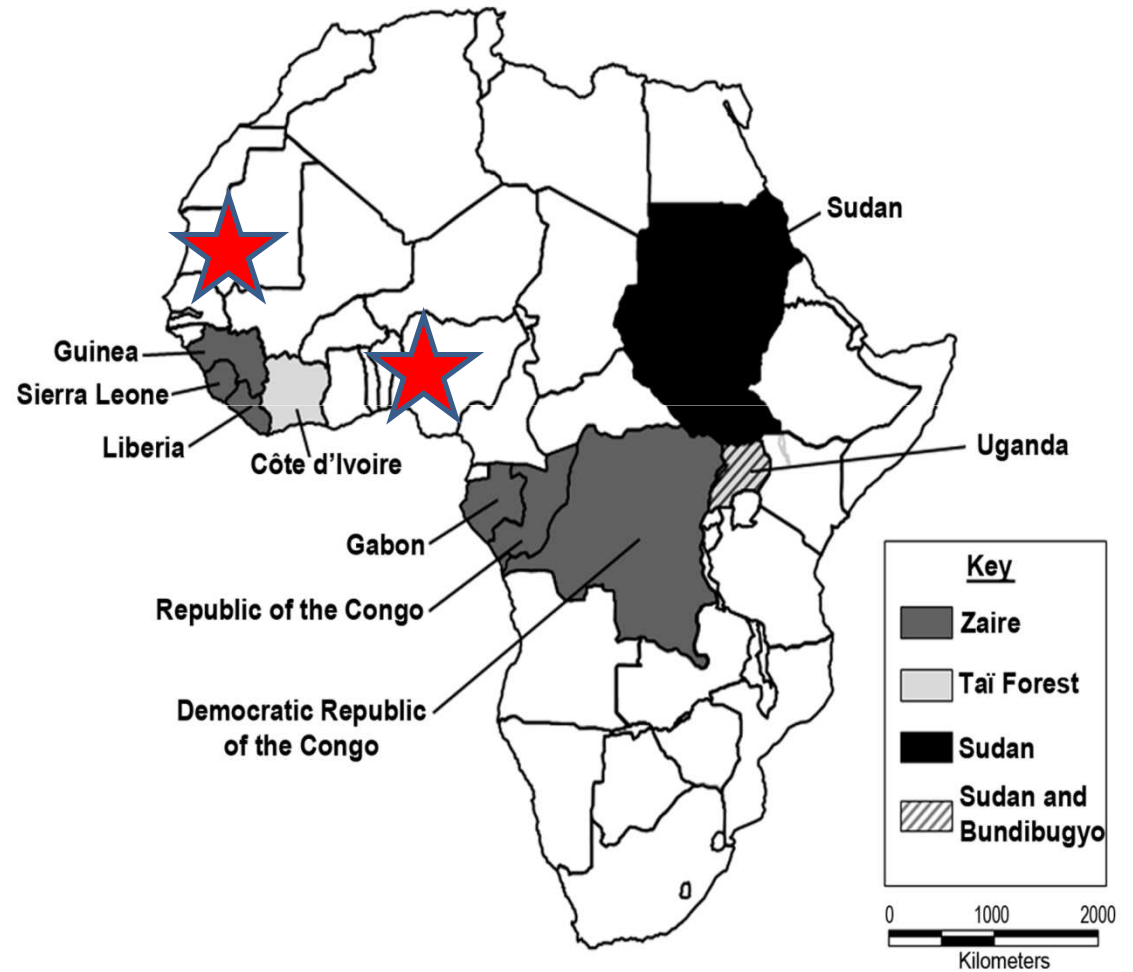
Si aggiungono
alcuni casi in **Nigeria**



1 Settembre

Si aggiunge

Un caso in **Senegal**



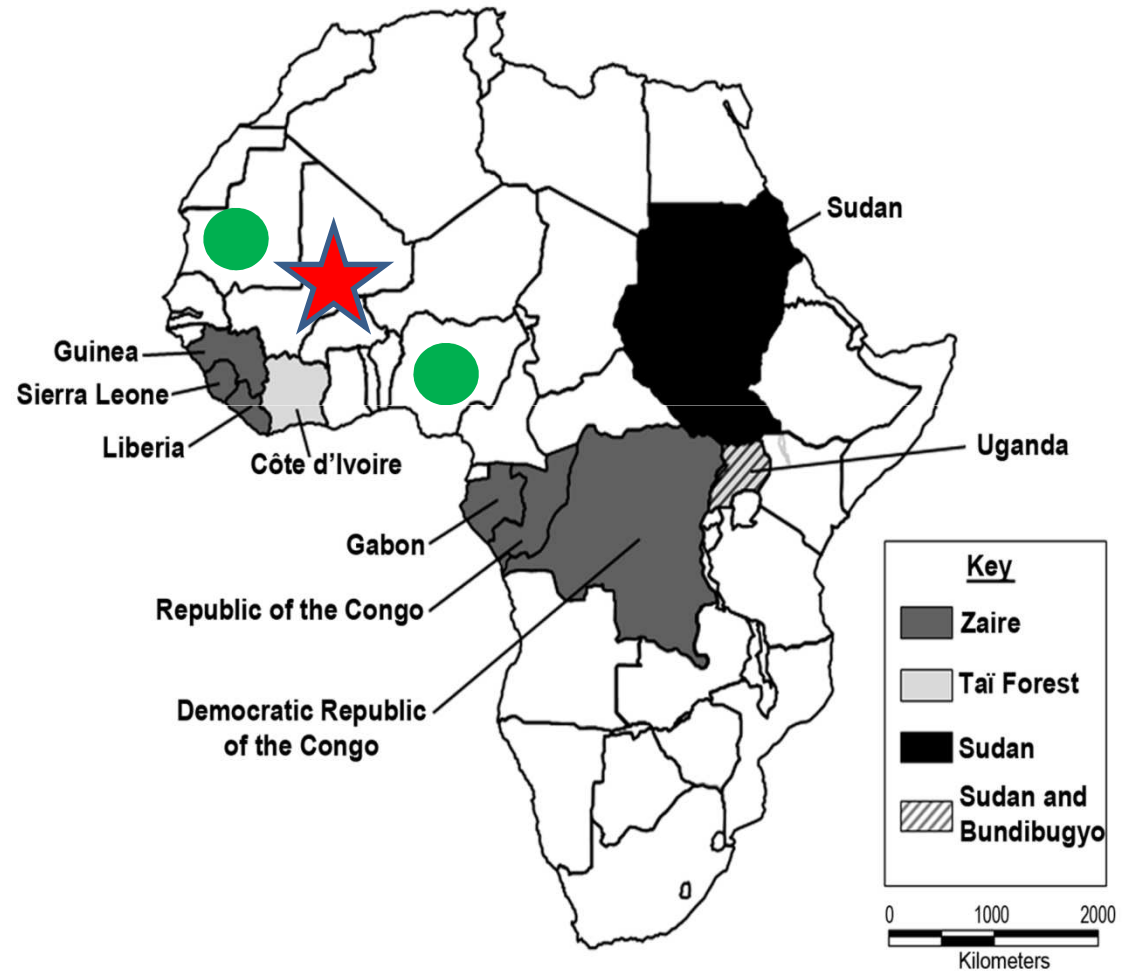
25 Ottobre

Un caso in **Mali**

2 sospetti, 57 contatti (2 nov)

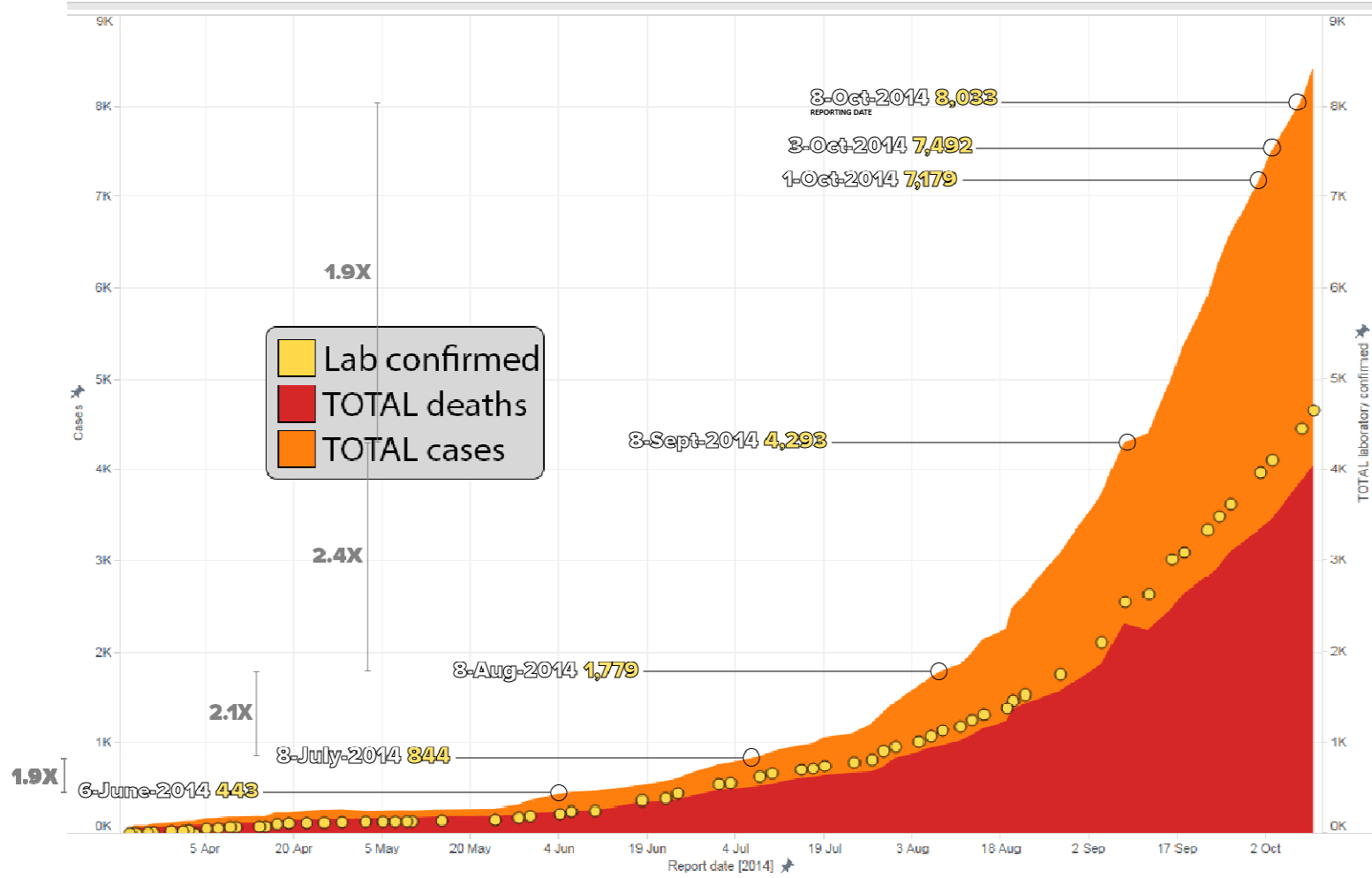
Senegal dichiarato Ebola free
il 17 ottobre

Nigeria dichiarato Ebola-free
il 20 ottobre

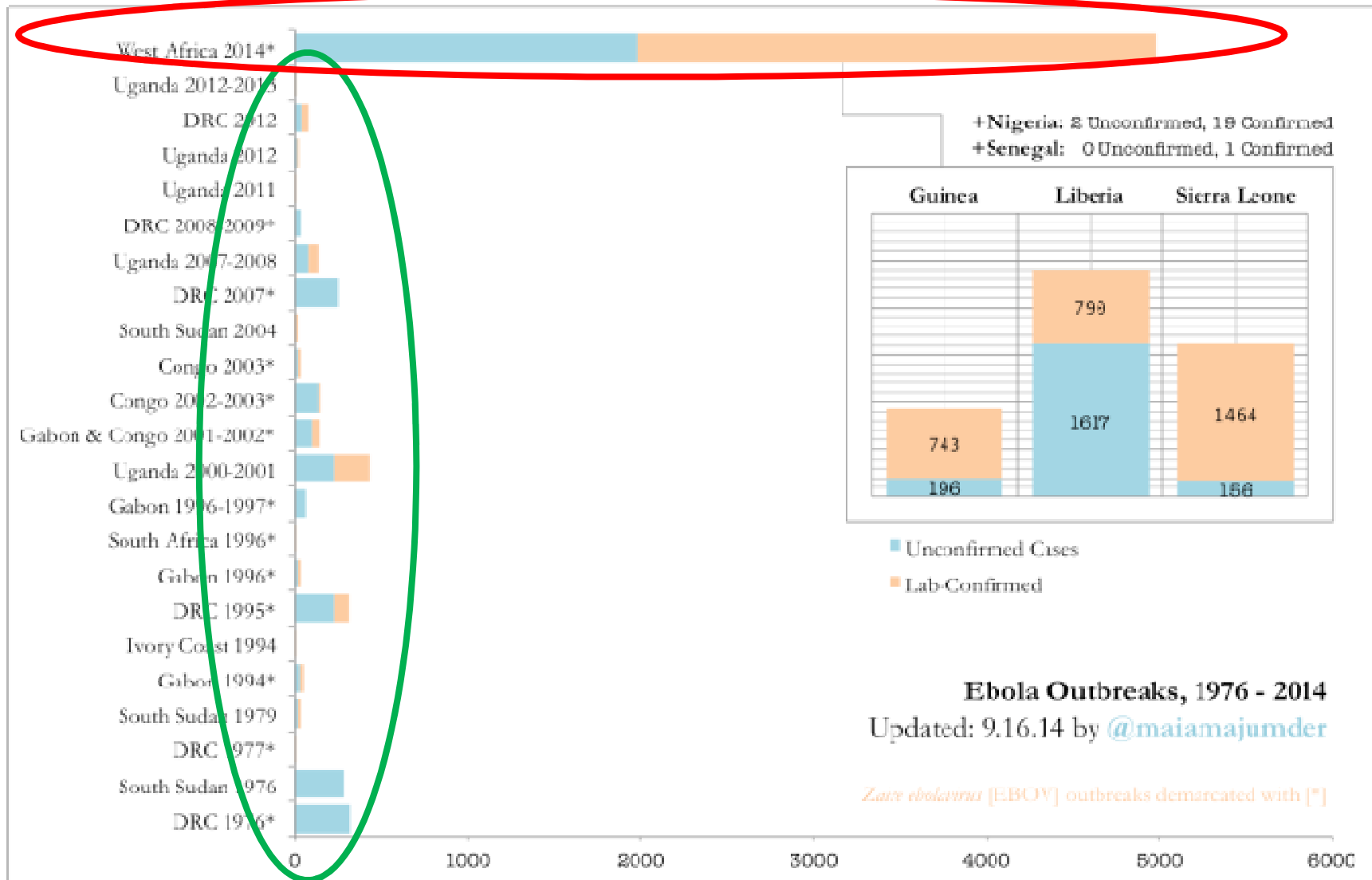


West Africa Ebola virus disease outbreak: ALL CASES

Cumulative curves combining case number from Guinea, Liberia, Sierra Leone, Nigeria, Senegal, USA, Spain



I numeri della epidemia in corso, rispetto alle epidemie precedenti, sono incredibilmente più alti



28 ottobre

Casi totali
13676

Decessi
4910

Fattore di correzione più attendibile= 2.0

Perché?

- ★ La zona interessata comprende tre Paesi tra i più poveri del mondo con lo sfruttamento ancora in corso es: deforestazione
- ★ Decenni di guerra civile
- ★ Servizio sanitario quasi inesistente es: 1 medico ogni 150.000 abitanti
- ★ 80% della popolazione severamente malnutrito
- ★ Endemia per malaria

- ★ L' infezione, iniziata in un piccolo villaggio si è estesa fino ad arrivare alle capitali, prima che venisse riconosciuta (marzo 2014)
- ★ L' OMS ha drammaticamente sottovalutato l' epidemia

2 Novembre

L'OMS lascia il coordinamento delle attività anti Ebola

**Ebola outbreak: Nato will
lead the fight against virus**

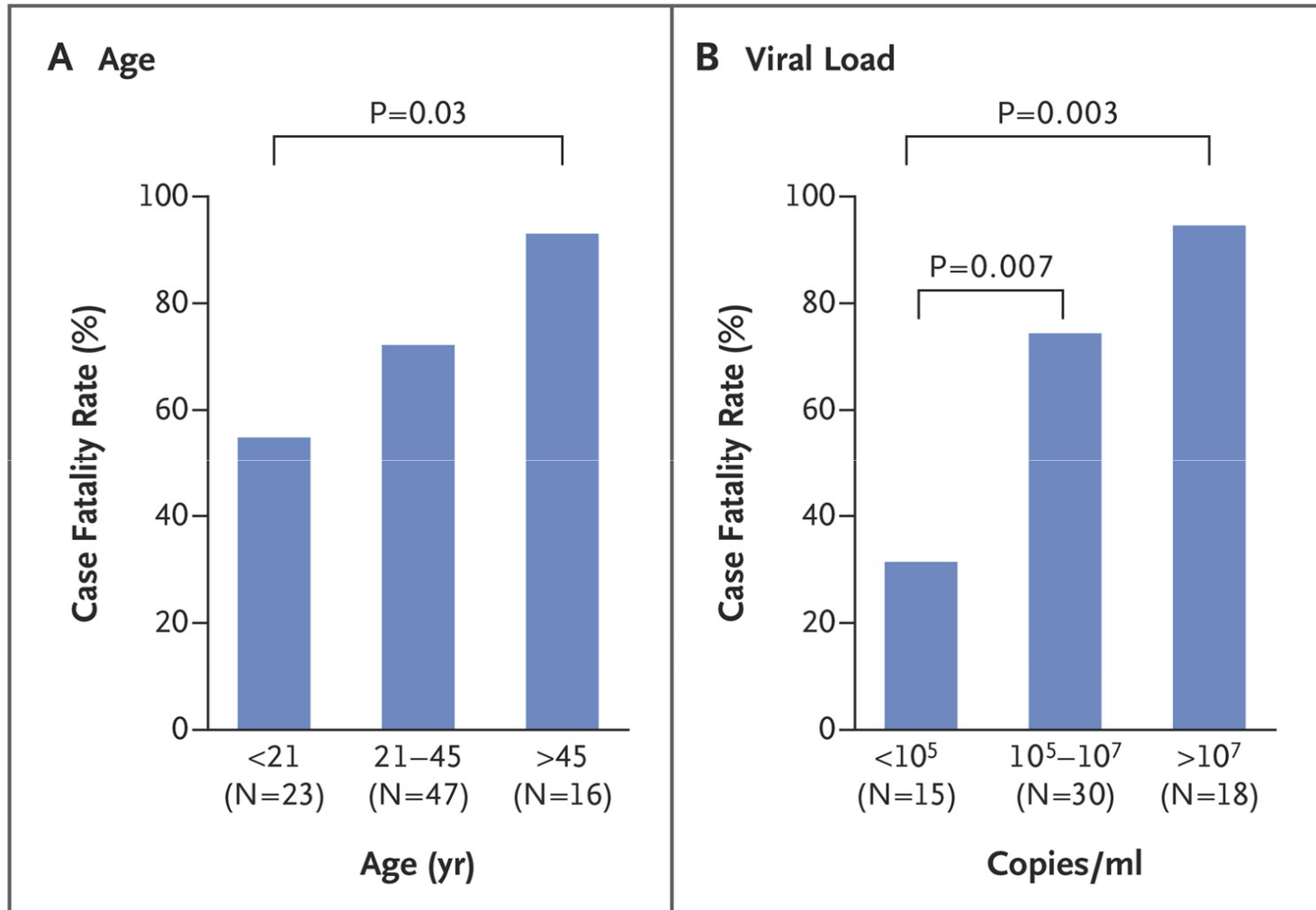


Da crisi sanitaria a crisi umanitaria

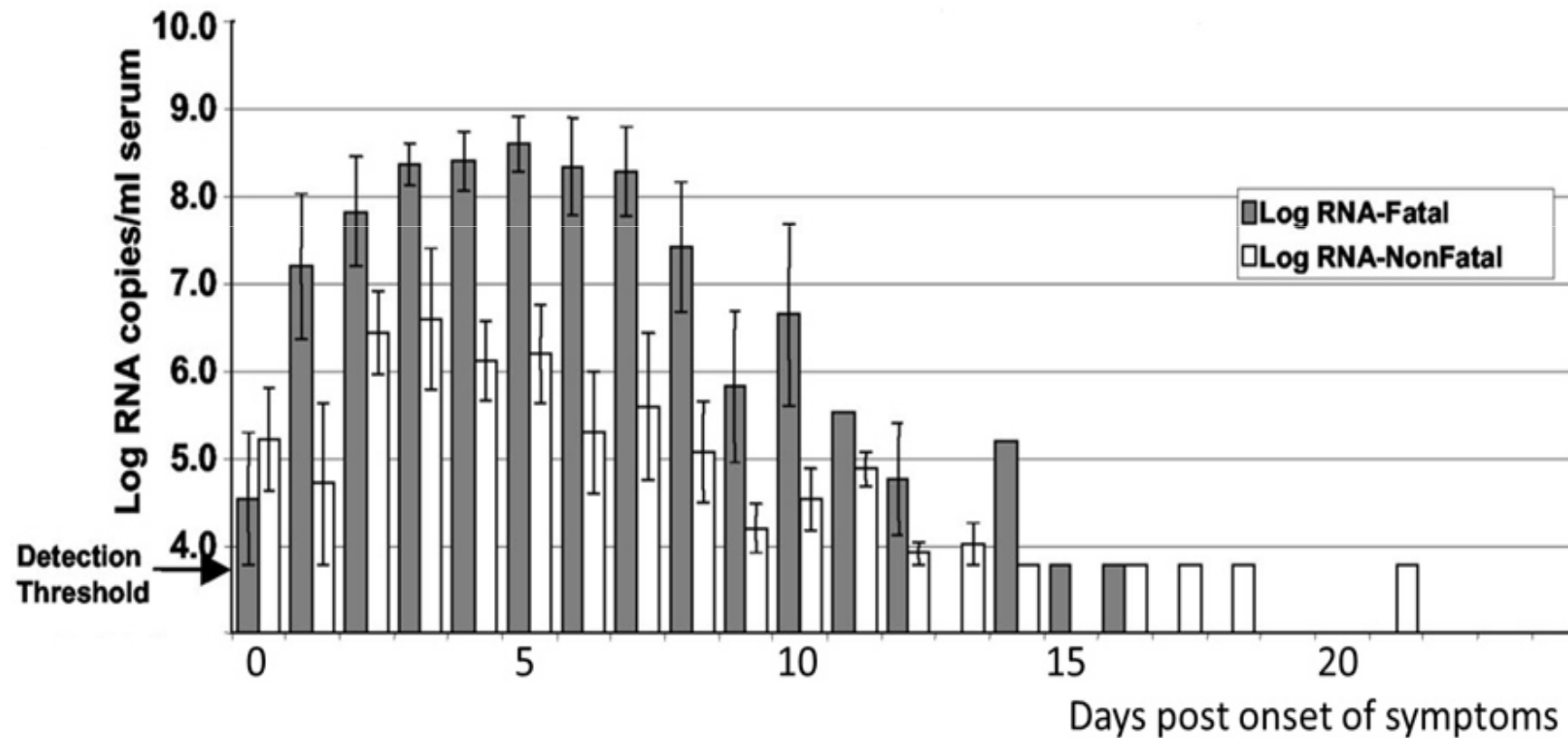
Publicazioni scientifiche Pub Med EBOLA 31 ottobre



La letalità correla con l'età e il viral load



Il viral load ematico è più alto nei casi fatali, ma la persistenza del virus è uguale nei pazienti con esito fatale e nei pazienti che guariscono



Correlative differences in patients who survive versus patients who succumb to Ebola virus infection

Nonlethal infection

Prominent CD8⁺ T cell activation

Above-normal numbers of T cells

10⁷ viral genome copies/ml serum

Detectable antibodies in blood at onset of symptoms

Low NO

Lethal infection

No CD8⁺ T cell activation

Below-normal numbers of T cells

10¹⁰ viral genome copies/ml serum

No detectable antibodies in blood at onset of symptoms

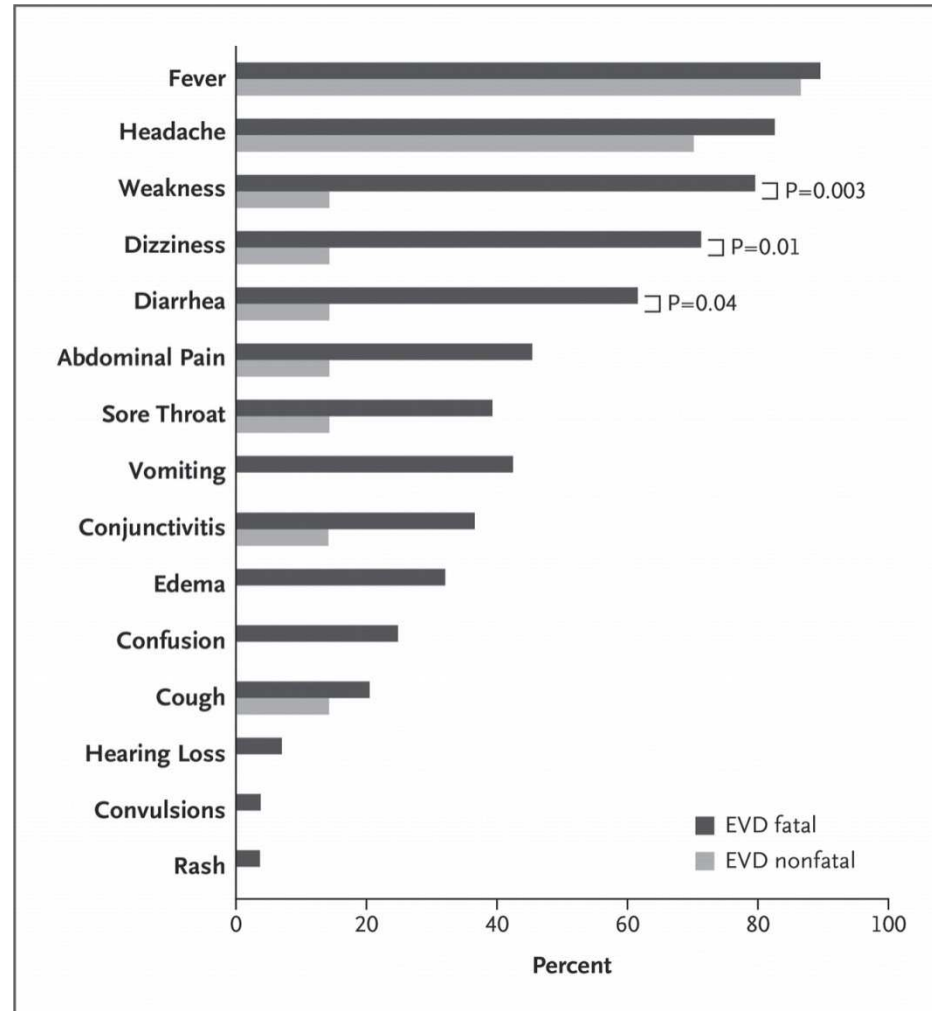
High NO

[Immunopathology of highly virulent pathogens: insights from Ebola virus](#)

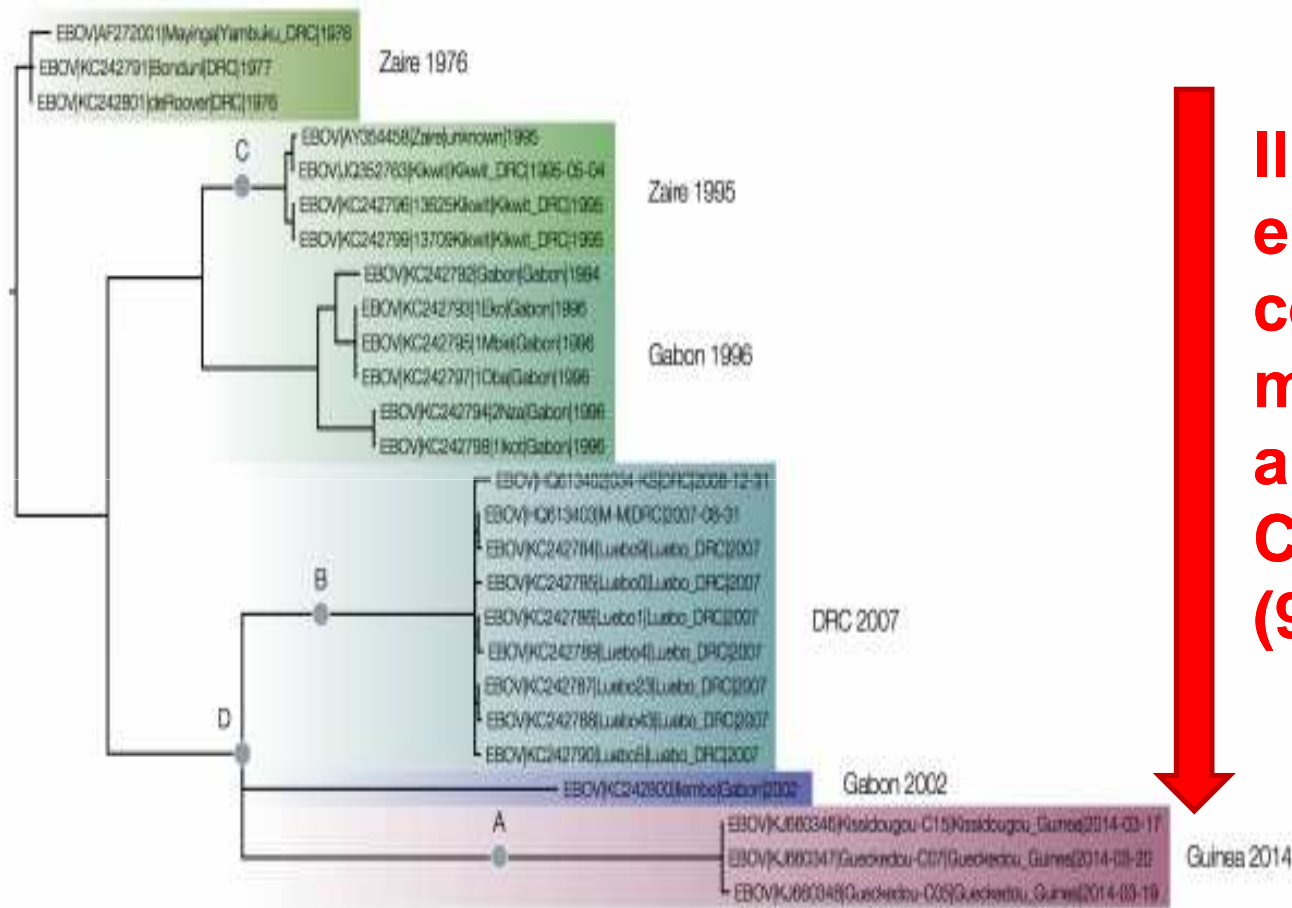
Carisa A Zampieri, Nancy J Sullivan & Gary J Nabel

Nature Immunology 2014

Febbre alta e maggiore sintomatologia gastrointestinale

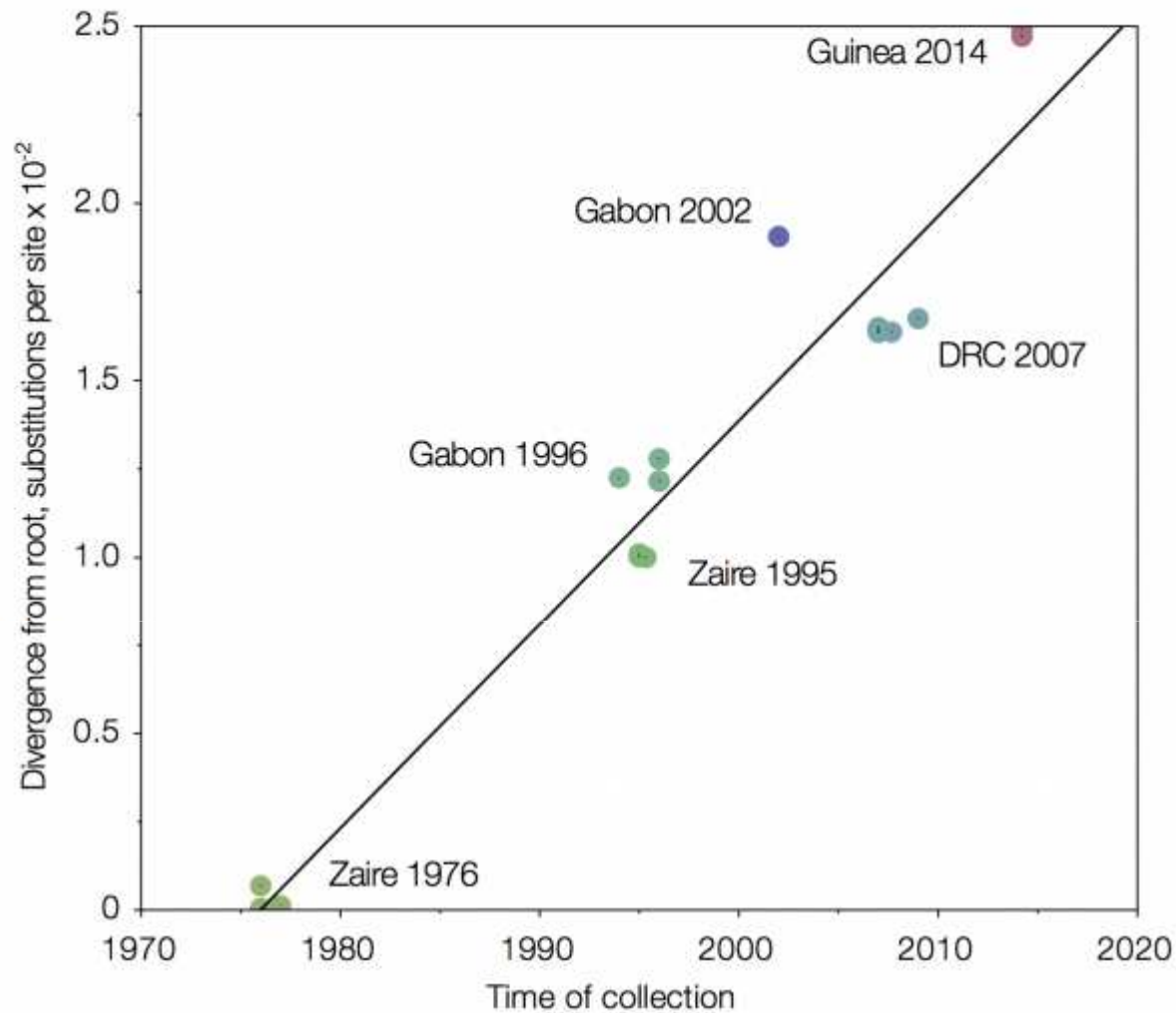


Schieffelin JS et al. N Engl J Med 2014. DOI: 10.1056/NEJMoa1411680



Il responsabile della epidemia è un ceppo di Ebola Zaire molto simile a quelli dell' Africa Centrale (97% omologia)

Gytis Dudas and Andrew Rambaut, Plos one, 2014



**Non rappresenta
l'emergenza
di un virus
divergente**

Gytis Dudas and Andrew Rambaut, Plos one, 2014





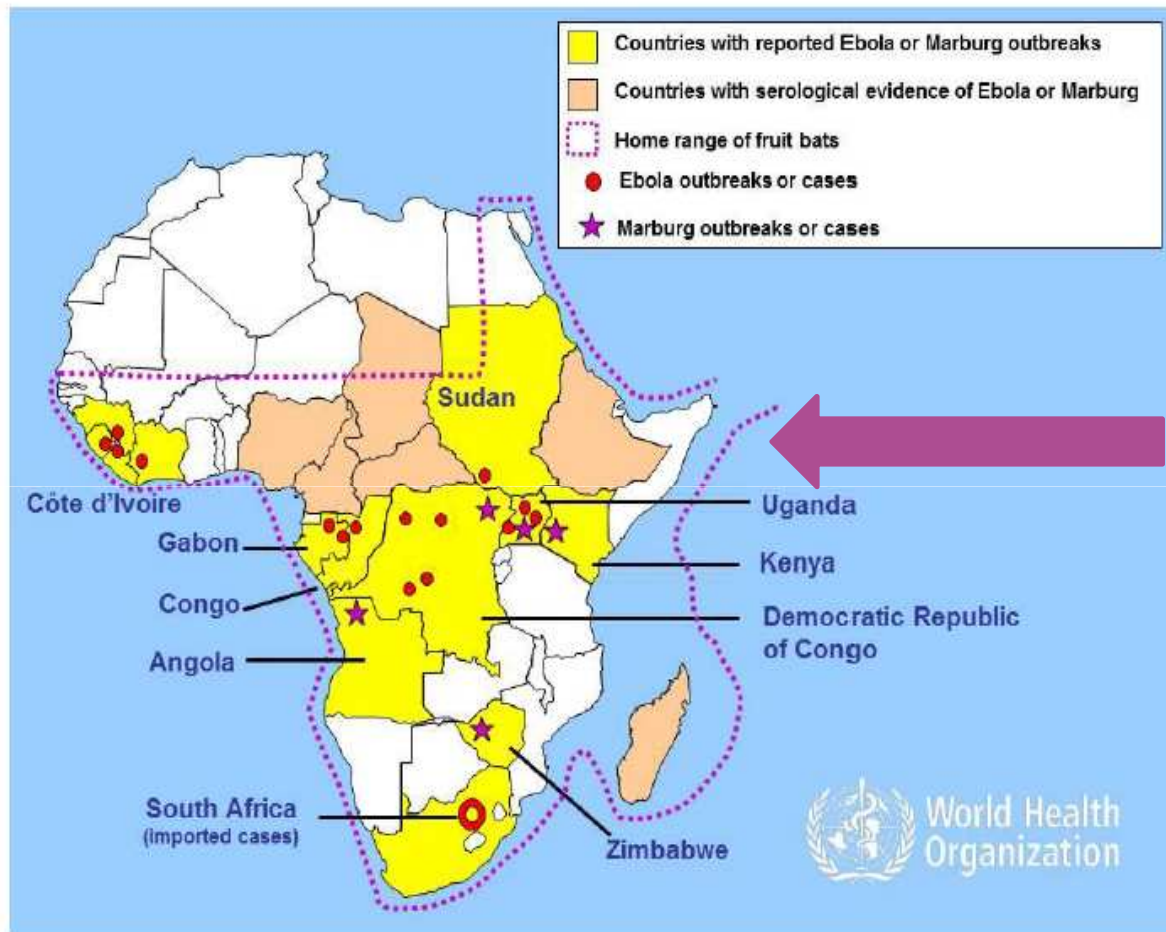
Come si è spostato?



Il veicolo più probabile sono i pipistrelli della frutta

Tre specie comuni in tutta l'Africa centrale e capaci di volare per distanze anche molto lunghe:

Hypsignathus monstrosus, *Epomops franqueti*, *Myonycteris torquata*

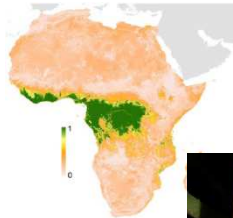


Zona in cui vivono i pipistrelli della frutta

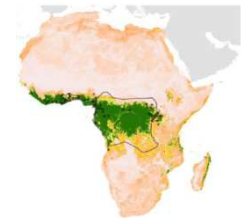
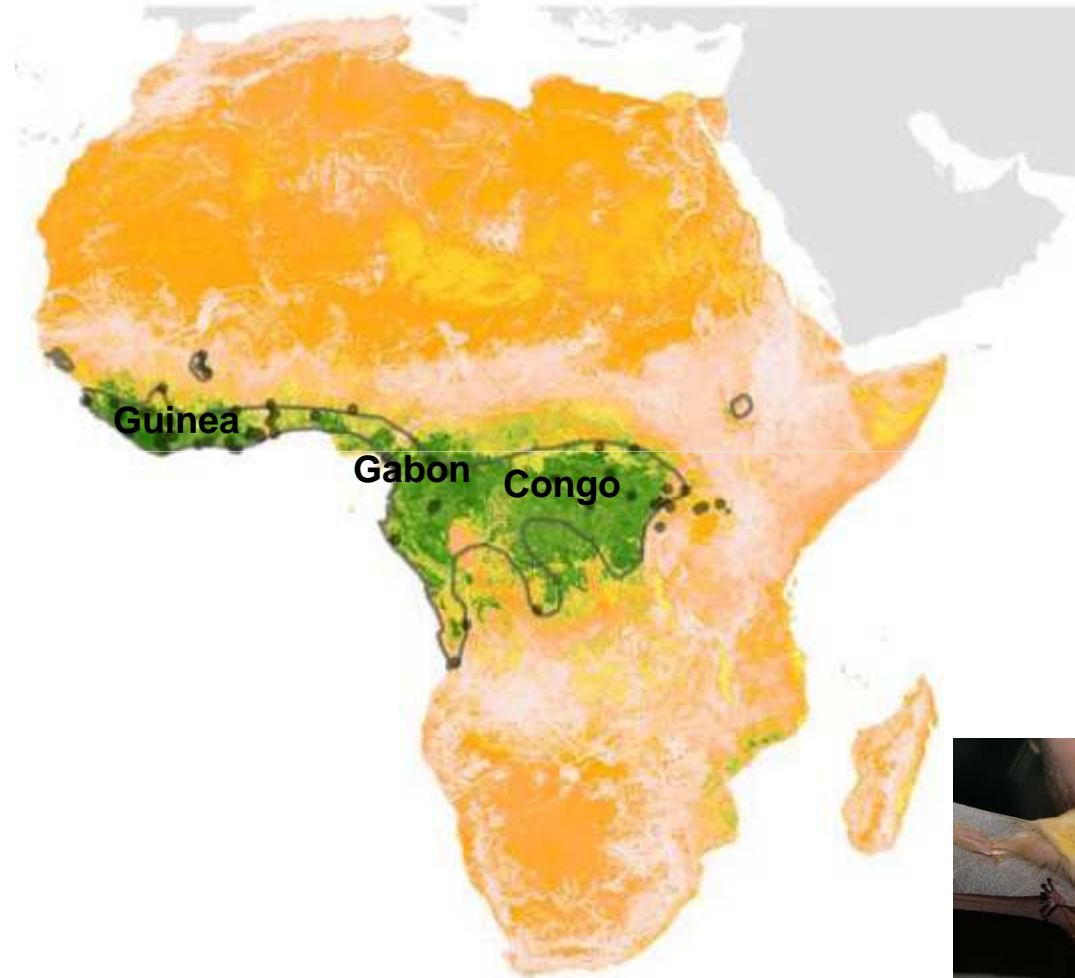
Distribuzione geografica delle 3 specie di pipistrelli sospette di essere l'ospite naturale del virus Ebola



hammer-headed bat
(*Hypsignathus monstrosus*)



Franquet's epauletted fruit bat
(*Epomops franqueti*)



little collared fruit bat
(*Myonycteris torquata*)

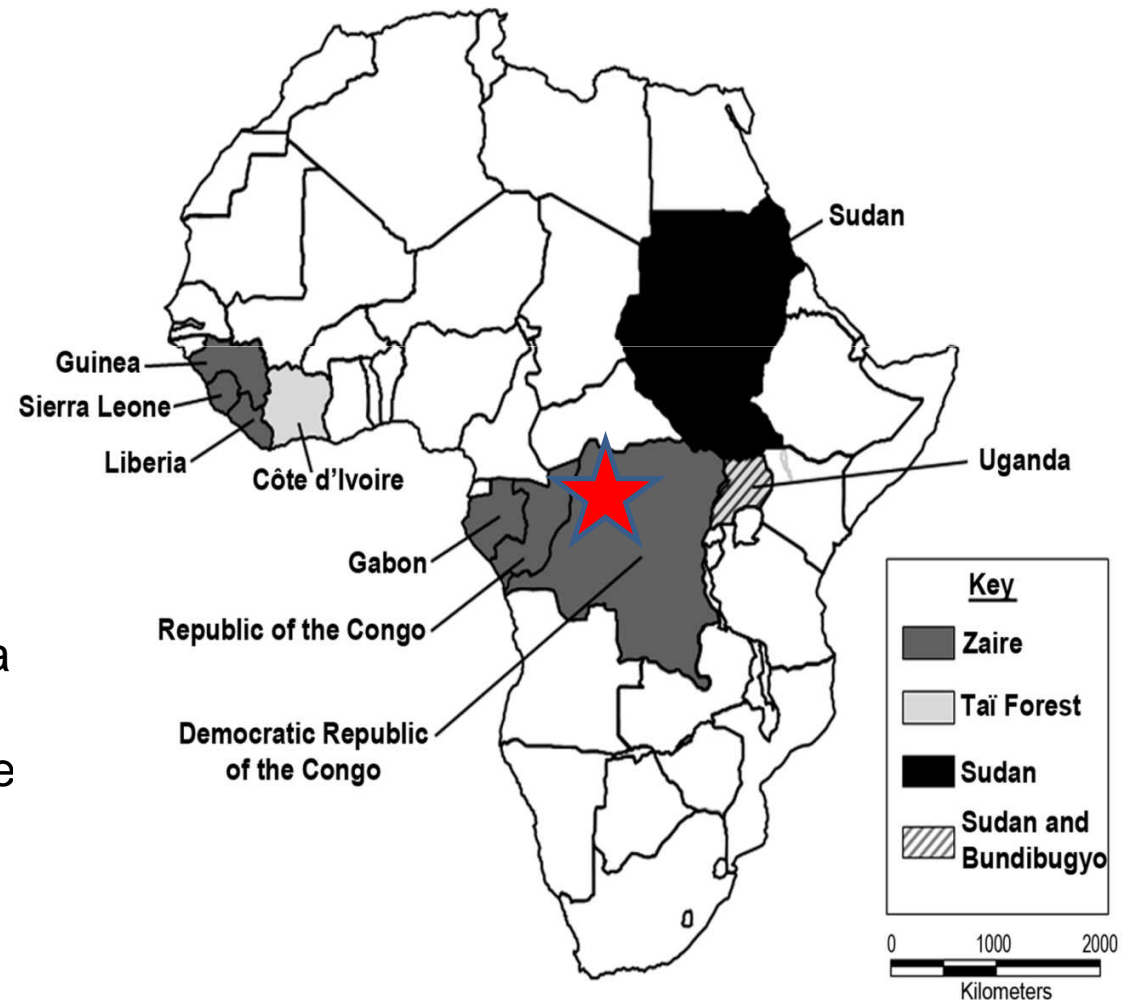
Fine agosto

Viene riportato l' inizio di un outbreak nel nord est del **Congo**

I decessi sono avvenuti in un'area isolata, dove è stata allestita una zona di quarantena.

Il ceppo di virus identificato è diverso da quello che si è diffuso nell'**Africa occidentale**

In un paziente hanno trovato Ebola Sudan , in un altro sia il ceppo Sudan che un ceppo di Ebola Zaire diverso



**DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO -
BOENDE TOWN (EQUATEUR PROVINCE, TSHUAPA DISTRICT)**

MAP DATE: 28 August 2014



**Una zona remota del Congo,
1000 Km da Kinshasa.**

Map Scale (A3): 1:10,000,000
Data source: WHO GIS & VSHOC
Map Production: Health Security (HS2)
Global Preparedness, Surveillance and
Response Operations (PSO)
WHO NCD/HS/DC/2014
© WHO 2014. All rights reserved.



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization 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.

Il virus responsabile appartiene al lineaggio Zaire è strettamente correlato a quello responsabile del focolaio epidemico del 1995 in Congo (Kikwit).

L'attuale focolaio è il settimo in Congo

Non vi è alcun legame con l'epidemia della West Africa

Il caso indice è una donna gravida che ha preparato carne di animali selvatici cacciati dal marito. E' morta lei, il marito, due figli.

WHO: 29 Ottobre 2014: 67 casi clinici di EVD e 49 decessi.

Tutti i casi si sono concentrati nella contea di Jeera.

Oltre 300 persone in quarantena

Tarapie sperimentali

Zmapp

Un cocktail di tre anticorpi monoclonali umanizzati e prodotti nelle piante di tabacco australiane

Il target degli anticorpi sono diversi epitopi della GP

MB-003 + ZMAb =ZMapp

Mapp Biopharmaceuticals (san Diego) esperta in “pianticorpi”

ZMApp in Rhesus Macaques

100 % delle scimmie infettate sopravvivevano se trattate entro le 24h dall' infezione

50% se trattate entro le 48h

Siero Umano Convalescente

Già usato nel 1995 nell'epidemia di Kikwit

- There is only anecdotal evidence of the therapeutic efficacy of human plasma in filovirus infected patients (7 out of 8 patients who received whole blood from convalescent patients survived ebolavirus infection, Mupapa et al., 1999).
- Immunoglobulin preparations from EBOV and MARV convalescent NHPs protected NHPs against lethal challenge (Jahrling et al. Arch Virol Suppl 1996)
- **Unico raccomandato da WHO**

WHO Blood Regulators Network (BRN)

Paper accepted by the BRN, 14 August 2014

Position Paper on Collection and Use of Convalescent Plasma or Serum
as an Element in Filovirus Outbreak Response*

Piccoli RNA interferenti (siRNA)

TkM-Ebola (Tekmira Pharmaceuticals-Canada, con US Department of Defense)

Nanoliposomi contenenti siRNA

EK-1 mod ha come target la RNA polimerasi virale
1160 mod ha come target VP24
855 modA ha come target VP35

100% protezione contro dose letale di Zaire Ebola se somministrate 7 dosi a 30 min e ai giorni 1, 2, 3, 4, 5, e 6 dopo infezione ([Geisbert et al., The Lancet, Vol 375, May 29, 2010](#)).

Nel Gennaio 2014 è iniziato clinical trial Phase I

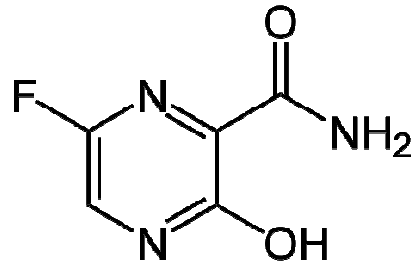
BCX443 (Biocryst Pharmaceuticals e NIAD USA)

Si tratta di un nuovo analogo dell' adenosina
Inibisce l' RNA polimerasi RNA dipendente promuovendo la
terminazione della catena

Attivo contro diversi virus a RNA

Protegge i macachi dalla infezione con Marburg anche se
sommministrato 48 ore post infezione

[Warren TK¹](#), et al [Nature](#). 2014



Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (**favipiravir**) in a small animal model

L. Oestereich et al. Antiviral Research, May 2014

The efficacy of the pyrazinecarboxamide derivative T-705 (favipiravir) against Zaire Ebola virus (EBOV) has been evaluated *in vitro* and *in vivo*. T-705 suppressed replication of Zaire EBOV in cell culture by 4 log units with an IC_{90} of 110 μ M. Mice lacking the type I interferon receptor (IFNAR^{-/-}) were used as *in vivo* model for Zaire EBOV-induced disease. Initiation of T-705 administration at day 6 post infection induced rapid virus clearance, reduced biochemical parameters of disease severity, and prevented a lethal outcome in 100% of the animals. The findings suggest that T-705 is a candidate for treatment of Ebola hemorrhagic fever

Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor.

[Furuta Y¹](#), et al [Antiviral Res.](#) 2013

Favipiravir (T-705; 6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide) inhibits **the RNA-dependent RNA polymerase** of influenza virus.

It is phosphoribosylated by cellular enzymes to its active form, favipiravir-ribofuranosyl-5'-triphosphate (RTP).

RNA polymerase mistakenly recognizes favipiravir-RTP as a purine nucleotide.

In addition to its anti-influenza activity, favipiravir blocks the replication of many other RNA viruses, including

arenaviruses (Junin, Machupo and Pichinde)

phleboviruses (Rift Valley fever, sandfly fever and Punta Toro)

hantaviruses (Maporal, Dobrava, and Prospect Hill)

flaviviruses (yellow fever and West Nile)

enteroviruses (polio- and rhinoviruses)

an **alphavirus** (Western equine encephalitis virus)

a **paramyxovirus** (respiratory syncytial virus)

noroviruses

A Phase III clinical evaluation of favipiravir for influenza therapy has been completed in Japan and two Phase II studies have been completed in the United States.

The clinically approved drugs amiodarone, dronedarone and verapamil inhibit filovirus cell entry

[Gerrit Gehring](#) et al. JAC 2014

amiodarone, a multi-ion channel inhibitor and adrenoceptor antagonist, is a potent inhibitor of filovirus cell entry at concentrations that are routinely reached in human serum during anti-arrhythmic therapy. A similar effect was observed with the amiodarone-related agent dronedarone and the L-type calcium channel blocker verapamil.

Vaccini-1

- ChAd3 monovalente/bivalente NIH/GSK
- 100% di protezione sulle scimmie
- Fase I in USA,UK e mali

Il **monovalente** è contro il ceppo Zaire e il **bivalente** contro i ceppi Zaire e Sudan

Sviluppato in OKAIROS (laboratori di Napoli e Pomezia). Riccardo Cortese e Alfredo Nicosia

Acquistata da GlaksoSmithKline (Gsk) nel 2012

Vaccini-2

- Virus della Stomatite vescicolare (VSV) rVSV Δ G
- 100% di protezione sulle scimmie
- Usato su una virologa
- 30-50% di protezione PEP sulle scimmie
- Fase I 15 ottobre in USA (forse anche in Gabon, Germania e Svizzera)

Vaccini-3

In studio

- –Profectus: piattaforma rVSV (N4CT1)
- –Bavarian Nordic: VacciniaModificato (MVA)
- –Crucell: piattaforma Adenovirus
- –Crucell: Combinazione di MVA con adenovirus
- –USAMRIID Virus Like Particle (VLP)
- Thomas Jefferson U: vettore virus rabbico vivo e inattivato

