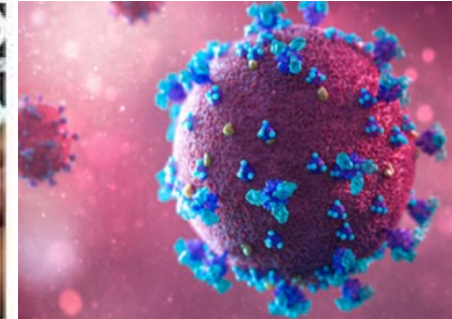
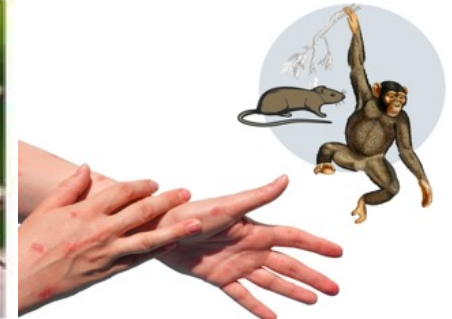
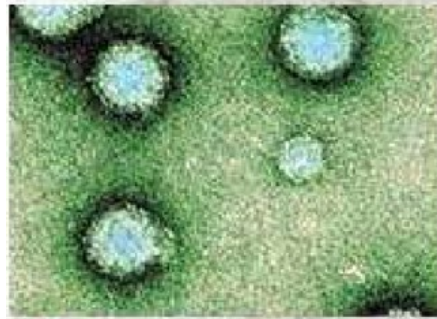


# Infezioni virali emergenti e riemergenti

Licia Bordi

Laboratorio di Virologia  
Istituto Nazionale per le Malattie  
infettive  
“L. Spallanzani”  
Roma, Italia



Roma 8 aprile 2024 Università La sapienza



## **MALATTIE INFETTIVE EMERGENTI:**

patologie infettive la cui incidenza o diffusione geografica è in rapido aumento ed è andata aumentando in aree del mondo circoscritte o a livello globale, nell'ultimo ventennio del XX secolo (*IOM - Microbial Threats to Health, 2003*).

## **MALATTIE INFETTIVE RIEMERGENTI:**

patologie infettive che divengono nuovamente frequenti, dopo aver mostrato una diminuzione significativa di incidenza.



## **MALATTIE INFETTIVE EMERGENTI:**

- ✓ malattie che potremmo definire nuove,
- ✓ malattie causate da un agente patogeno che prima di venire identificato era sconosciuto,
- ✓ diffusione in nuove aree di patogeni già esistenti,
- ✓ malattie nate dall'introduzione nella specie umana di patogeni che prima colpivano altre specie animali (esempi: AIDS, Ebola, SARS)

## **MALATTIE INFETTIVE RIEMERGENTI:**

malattie che per un certo periodo sono sembrate sotto controllo, ma che oggi sono tornate a essere una minaccia in vaste aree del mondo (TBC, HIV)

Le infezioni emergenti hanno modellato il corso della storia umana e hanno causato incalcolabili sofferenze e morte!!

# Le infezioni emergenti sono state minacce familiari fin dai tempi antichi, definite col termine greco **loimos**= piaga, pestilenza, flagello

La Peste di Atene colpì la città-stato di Atene durante il secondo anno della Guerra del Peloponneso, quando una vittoria ateniese sembrava ancora a portata di mano. La prima epidemia urbana devastante registrata.

La peste Antonina è stata un'antica pandemia di vaiolo o morbillo, o meno probabilmente tifo, riportato in patria dalle truppe di ritorno dalle campagne militari contro i Parti. Ha causato fino a 2.000 morti al giorno con un tasso di mortalità del 25%, decimando intere popolazioni in Asia Minore, Egitto, Grecia e Italia.

La peste di Giustiniano è una pandemia che ebbe luogo nei territori dell'Impero bizantino, con particolare forza a Costantinopoli, sotto il regno dell'imperatore Giustiniano. Una delle più grandi piaghe della storia; ha ucciso circa 25-50 milioni di persone in tutto l'impero romano-orientale (bizantino).

Peste nera è il termine con il quale ci si riferisce normalmente all'epidemia di peste che imperversò in tutta Europa tra il 1347 e il 1352 uccidendo almeno un terzo della popolazione del continente.



429-427 BC

165-180

541-542

1347

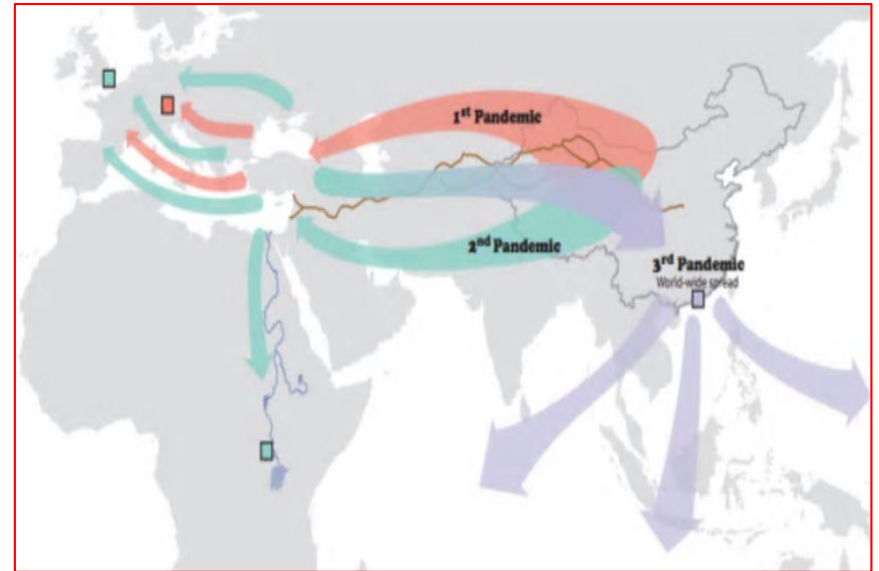
Plague of Athens  
(Typhoid or Typhus)

Antonine Plague

Plague of Justinian

Black Death

- L'ultima grande pandemia di peste iniziò in Cina a fine '800 e da lì si diffuse al resto dei continenti, contagiando oltre 30 milioni di persone e uccidendone 12 milioni.
- Questa nuova diffusione della malattia fu affrontata con uno sforzo multinazionale di ricerca che portò all'identificazione dell'agente della malattia: il batterio *Yersinia pestis*.
- Fu chiaro da subito che i portatori della malattia erano i ratti, visto che l'epidemia umana solitamente scoppiava in seguito a una grande moria di roditori.
- L'osservazione che non fosse necessario il contatto umano per diffondere la malattia, portò alla comprensione del ruolo delle pulci nella sua trasmissione.



## Science & Environment

# 'Gerbils replace rats' as main cause of Black Death

By Rebecca Morelle  
Science Correspondent, BBC News



## Human ectoparasites and the spread of plague in Europe during the Second Pandemic

Katharine R. Dean<sup>a,1</sup>, Fabienne Krauer<sup>a</sup>, Lars Walløe<sup>b</sup>, Ole Christian Lingjærde<sup>c</sup>, Barbara Bramanti<sup>a,d</sup>, Nils Chr. Stenseth<sup>a,1</sup>, and Boris V. Schmid<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Centre for Ecological and Evolutionary Synthesis (CEES), Department of Biosciences, University of Oslo, N-0316 Oslo, Norway; <sup>b</sup>Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Oslo, N-0317 Oslo, Norway; <sup>c</sup>Department of Computer Science, University of Oslo, N-0316 Oslo, Norway; and <sup>d</sup>Department of Biomedical and Specialty Surgical Sciences, Faculty of Medicine, Pharmacy and Prevention, University of Ferrara, 35-441221 Ferrara, Italy

Nel 1969, in occasione del  
“Congressional Testimony of the  
General Surgeons of the United  
States”, il dr. William H. Stewart  
asseriva:

**“It is time to close the  
book on infectious  
diseases and declare  
the war against  
pestilence won”**

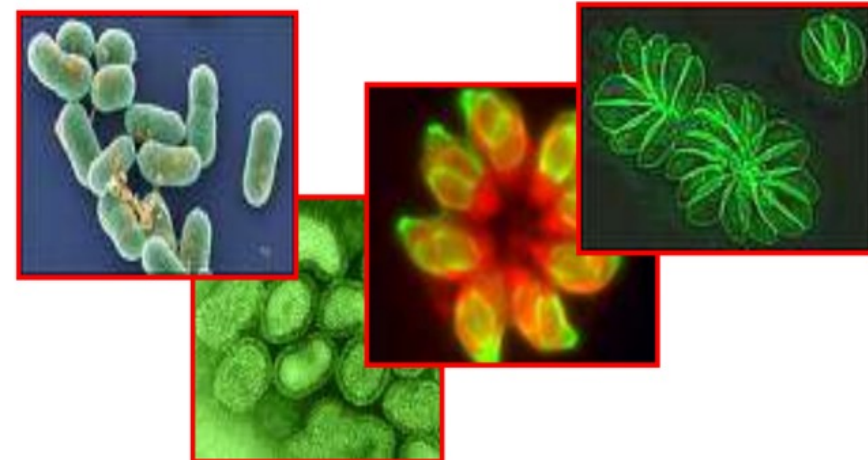
---



| 2014 and beyond?? |  |
|-------------------|--|
| 2010              | 2013 Avian Influenza (H7N9), China   |
|                   | 2012 Middle East Respiratory Syndrome (MERS), Arabian Peninsula<br>Salmonellosis [link to frogs, turtles, chicks, hedgehogs, United States]    |
|                   | 2011 Influenza A (H3N2) Variant Virus, United States   |
| 2000              | 2009 Pandemic Influenza A (H1N1), globally   |
|                   | 2005 Avian Influenza H5N1, Europe and Africa<br><i>Streptococcus suis</i> , China  |
|                   | 2004 Avian Influenza (H5N1), East Asia, Asia, Eurasia  |
|                   | 2003 Monkeypox, United States<br>Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), spreads globally<br>Bovine Spongiform Encephalopathy, United States |
|                   | 2002 Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), China   |
| 1990              | 1999 West Nile virus, United States  |
|                   | 1998 Nipah Virus, Malaysia   |
|                   | 1997 Avian Influenza (H5N1) in humans, Hong Kong   |
|                   | 1996 Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD), United Kingdom  |
|                   | 1994 Hendra virus, Australia   |
|                   | 1993 Hantavirus (Sin Nombre virus), Four Corners, United States  |
| 1980              | 1989 Ebola-Reston virus – monkeys imported from Philippines to United States   |
|                   | 1986 Bovine Spongiform Encephalopathy (mad cow disease) – United Kingdom   |
|                   | 1983 <i>Bartonella henselae</i> (causative agent for cat scratch disease)  |
|                   | 1982 <i>E. coli</i> O157:H7<br>Lyme disease ( <i>Borrelia burgdorferi</i> ) etiologic agent discovered   |
|                   | 1981 Human Immunodeficiency Virus/<br>Acquired Immune Deficiency Syndrome (HIV/AIDS), United States  |

*“Emerging infectious diseases are those due to newly identified and previously unknown infections which cause public health problems either locally or internationally”*

**In the past 20 years, at least 30 new diseases have emerged to threaten the health of hundreds of millions of people.**



---

## VIOLAZIONI DELLE BARRIERE DELLE SPECIE ANIMALI: INFEZIONI UMANE EMERGENTI DAL 1976



| Infection             | Animal linked to transmission | Year infection first reported |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Ebola virus           | Bats                          | 1976                          |
| HIV-1                 | Primates                      | 1981                          |
| E. coli O157:H7       | Cattle                        | 1982                          |
| Borrelia burgdorferi  | Rodents                       | 1982                          |
| HIV-2                 | Primate                       | 1986                          |
| Hendra virus          | Bats                          | 1994                          |
| BSE/vCJD              | Cattle                        | 1996                          |
| Australian lyssavirus | Bats                          | 1996                          |
| H5N1 influenza A      | Chickens                      | 1997                          |
| Nipah virus           | Bats                          | 1999                          |
| SARS coronavirus      | Palm civets                   | 2003                          |
| Influenza (H1N1)      | Swine                         | 2009                          |

---



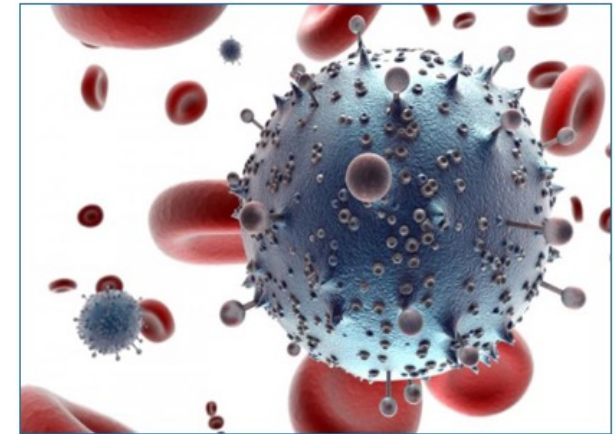
# ARBOVIROSI

- Le arbovirosi sono zoonosi trasmesse da vettori artropodi (arthropod-borne virus) tramite morso o puntura. Sono patologie che interessano sia l'uomo sia gli animali. Al momento si conoscono oltre 100 virus in grado di provocare diverse malattie nell'uomo, tra cui chikungunya, dengue, zika, febbre di West Nile, encefalite da zecca e altre
- Le arbovirosi rappresentano una problematica emergente a livello globale. Le cause del fenomeno sono molteplici ma, come abbiamo già detto, un ruolo di particolare importanza è svolto dai cambiamenti climatici che condizionano la presenza, la distribuzione e il ciclo di sviluppo di varie specie di artropodi di interesse sanitario.
- Nel corso degli ultimi anni, in Italia abbiamo assistito alla comparsa di infezioni esotiche trasmesse sia da vettori presenti nel nostro territorio sia da vettori di importazione.
- Il surriscaldamento del pianeta ha comportato la diffusione di alcune specie di zanzare (in particolare le specie *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) un tempo circoscritte alle aree tropicali, con conseguente l'emergenza in molte regioni, di nuove malattie definite arbovirosi.



➤ **1981: new acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).**

➤ As a global killer, AIDS threatens to overcome the 14th century black plague and the 1918-1920 flu pandemic, each of which killed at least 50 million people

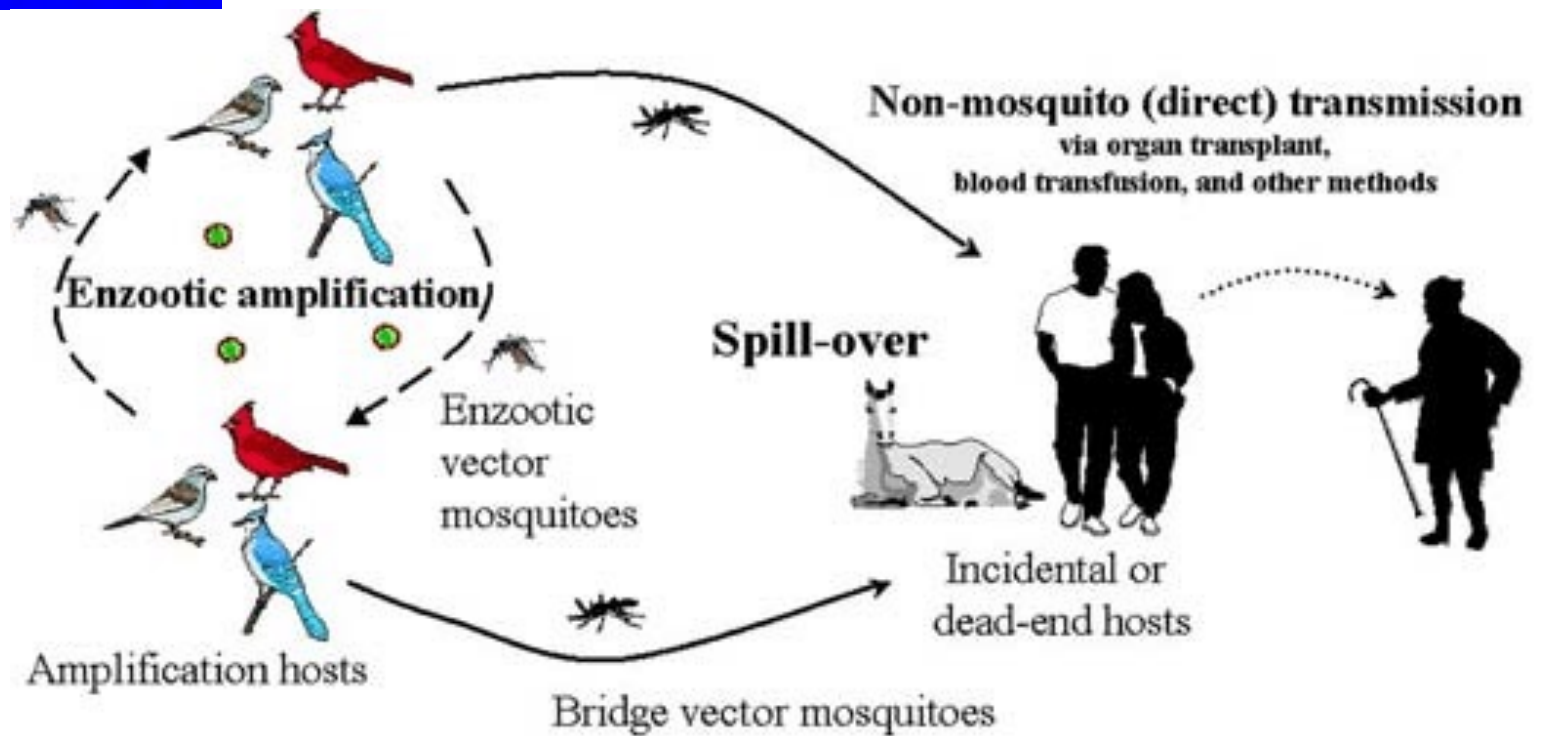


➤ **1998-1999: Nipah virus outbreak**

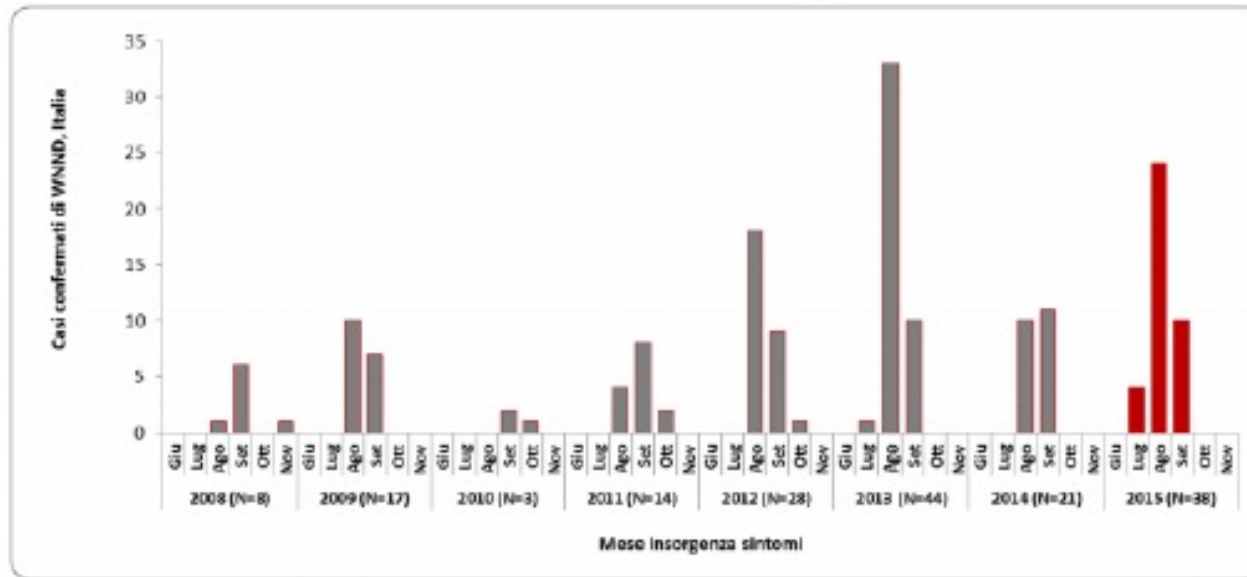
- Among pig-handlers
- September 1998 – May 1999
- Causative agent: A novel paramyxovirus i.e. Nipah virus
- Outcome:
  - 265 cases of acute encephalitis with 105 deaths
  - Mortality rate  $\approx$  40%
  - 1.1 million pigs culled
  - Direct economic impact



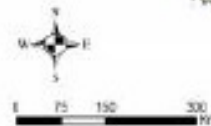
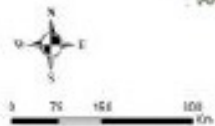
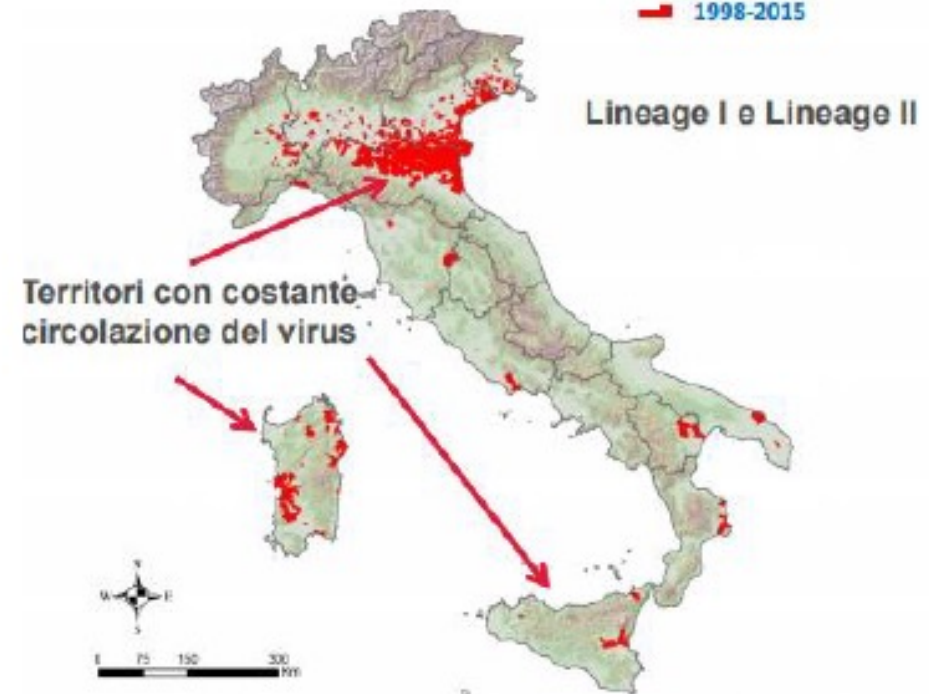
# August 1999: WNV Enters the U.S.



# WNV circulation in Italy, 2008-2015



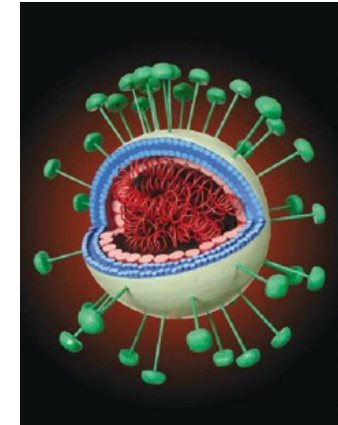
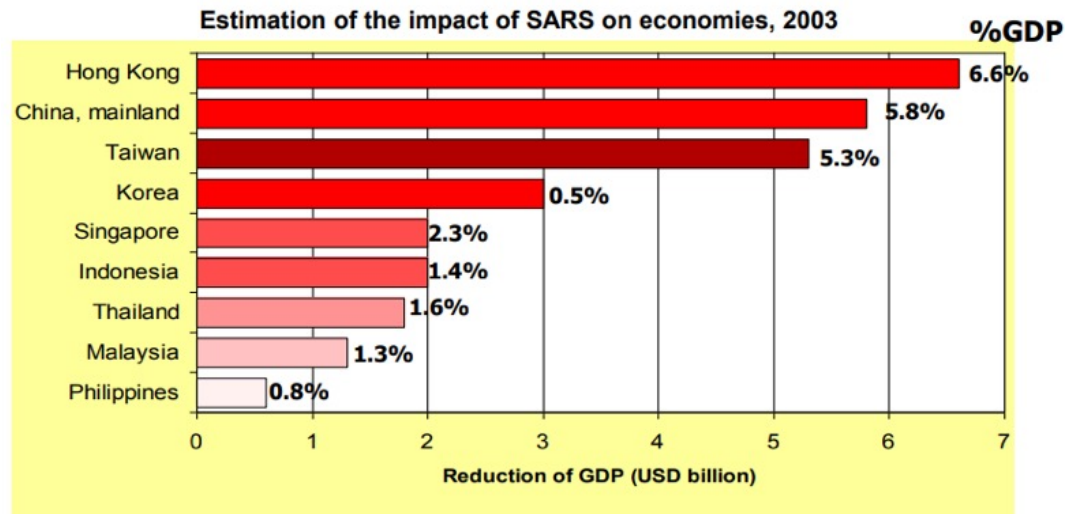
**West Nile News**  
 Aggiornamento epidemiologico settimanale



# Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)

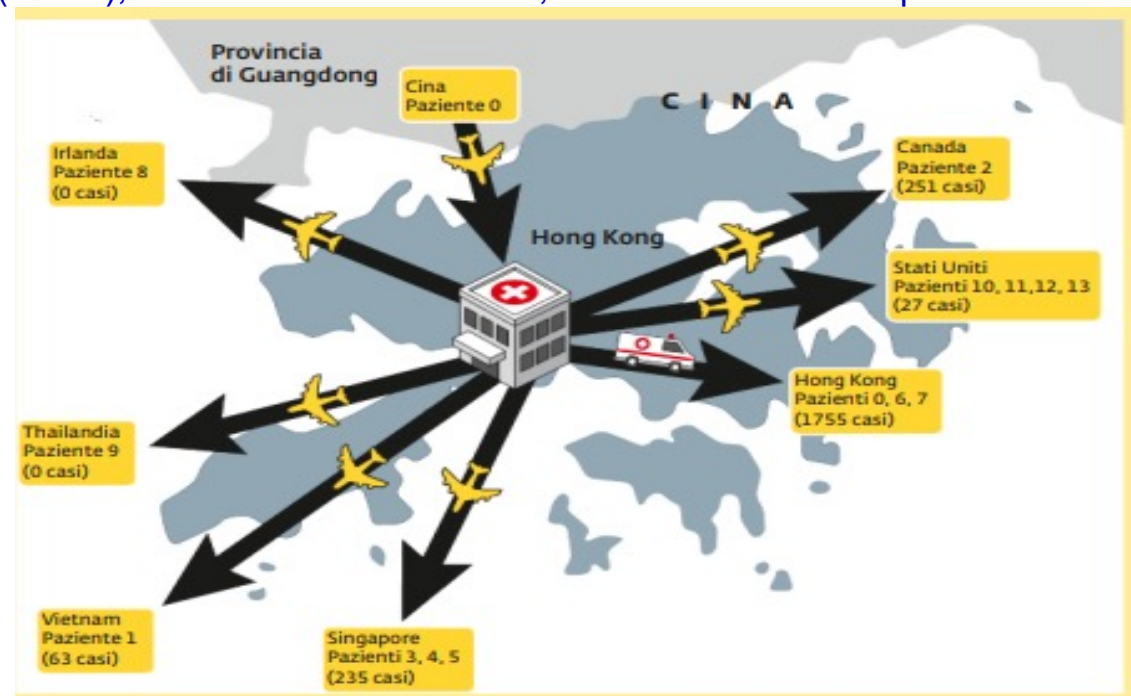
## Impact

No. of probable cases (1/11/2002 – 31/07/2003), = 8,097 cases,  
Deaths = 774 in 29 countries



altri, come la sindrome respiratoria acuta grave (SARS), emersa nel 2002-2003, hanno avuto un impatto a livello mondiale,

Tredici viaggiatori internazionali:  
come nasce un'epidemia globale



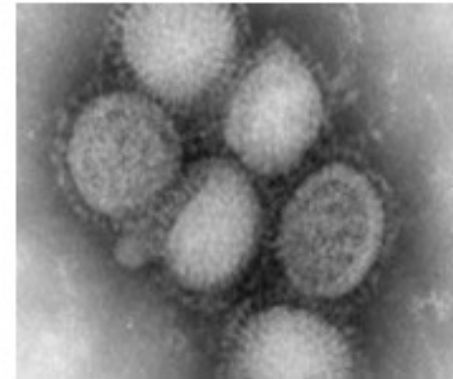
# Avian Influenza H5N1

- Series of outbreaks in poultry population:
  - **August 2004:** Kelantan (5 districts)
  - **February 2006:** Federal Territory Kuala Lumpur
  - **March 2006:** Perak (3 districts) & Pulau Pinang (1 district)
  - **June 2007:** Selangor ( 1 district)

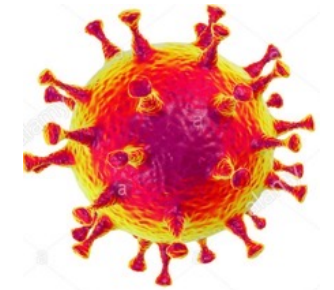


# Pandemic H1N1 2009

- 12 April 2009: an outbreak of influenza-like illness in Veracruz, Mexico reported to WHO
- 15 May 2009: Malaysia's first laboratory confirmed case (imported case)
- 11 June 2009: WHO declares pandemic alert level phase 6
- 21 June 2009: Malaysia's first local transmission case reported

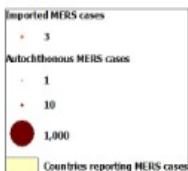
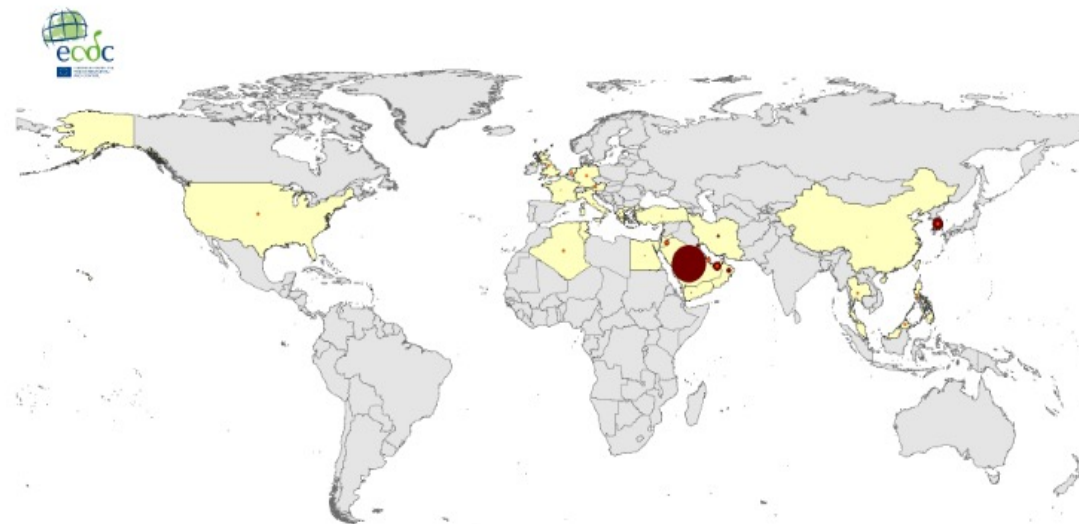


# Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)



- Primo caso di MERS segnalato a Jeddah, in Arabia Saudita, 24 settembre 2012.
- Origini del virus non ancora completamente chiare ma si ritiene che MERS-CoV si sia originato nei pipistrelli e che, in passato, sia stato trasmesso ai cammelli.
- Gli esseri umani si infettano attraverso il contatto diretto o indiretto con cammelli o dromedari infetti
- Le trasmissioni interumane sono state riportate solo in occasione di contatti ravvicinati; l'esempio tipico è il contagio tra paziente e operatore sanitario in ambito ospedaliero.
- Dal 2012 al 2019 segnalati circa 2500 casi, tra cui oltre 800 decessi.
- Episodi di MERS sono stati riportati in 27 Paesi, ma soprattutto (l'84%) in Arabia Saudita

Geographical distribution of confirmed MERS-CoV cases by reporting country, April 2012–4 April 2019





**06 attualità**

**Zoonosi. Conferenza internazionale sul virus della rabbia**  
**Rabbia al settimo posto per mortalità**  
**tra le malattie infettive**

Nei Paesi in via di sviluppo e in quelli settentrionali i principali serbatoi sono rappresentati, rispettivamente, dai cani e dalla fauna selvatica.

**O**gni anno, la rabbia uccide più di 55.000 persone nel mondo, soprattutto in Africa e in Asia. Per il 40% si tratta di bambini di età inferiore ai quindici anni. Questi tassi di mortalità sono identici a quelli che si registravano all'epoca di Pasteur: nonostante la scoperta dei vaccini, lo sviluppo di trattamenti post-esposizione nonoriamente efficaci e le maggiori conoscenze relative all'epidemiologia del virus rabido, la lotta

**Gli sforzi devono concentrarsi sugli animali serbatoio**  
 Questa situazione è ancor più inaccettabile se si considera che la maggior parte dei casi di rabbia possono essere eliminati. Come ha ricordato Jean Blancou, direttore generale onorario dell'Oie, "più del 99% dei casi umani di rabbia si deve ai morsi dei cani. Quindi, sarebbe sufficiente eradicare la rabbia canina per vedere sparire pressoché totalmente i casi umani".

inferiore rispetto a quello richiesto per il trattamento di una persona che ha contratto la rabbia. In ogni caso, "questa nuova ripartizione dei budget pubblici non deve rappresentare un ostacolo per il trattamento post-esposizione delle persone che ne hanno bisogno". Quindi, come ha sottolineato Bernard Valat a conclusione del suo intervento, "è indispensabile garantire la buona gestione dei servizi veterinari, lo sviluppo di laboratori diagnostici e la realiz-

»Messina

MESSINA

## Epidemia di brucellosi dopo una sagra a Tipoldo

23/02/2016

I casi rilevati in ospedale sono già una ventina, gli ammalati potrebbero essere un centinaio. I pazienti hanno raccontato che all'origine dell'infezione vi sarebbe una degustazione a Tipoldo



Seguici su Facebook | Venerdì 3 Febbraio 2017 | Milano

**LEGGO**

TRENDING TOPICS > Vasto • Trump • Whatsapp • Sanremo

NEWS SOCIETÀ SPETTACOLI GOSSIP SPORT TECH  
 ITALIA ESTERI ECONOMIA POLITICA

**EPIDEMIA DI SIFILIDE, "BEN 31 CASI NELL'ULTIMO ANNO". SCATTA L'ALLARME**

COMMENTA



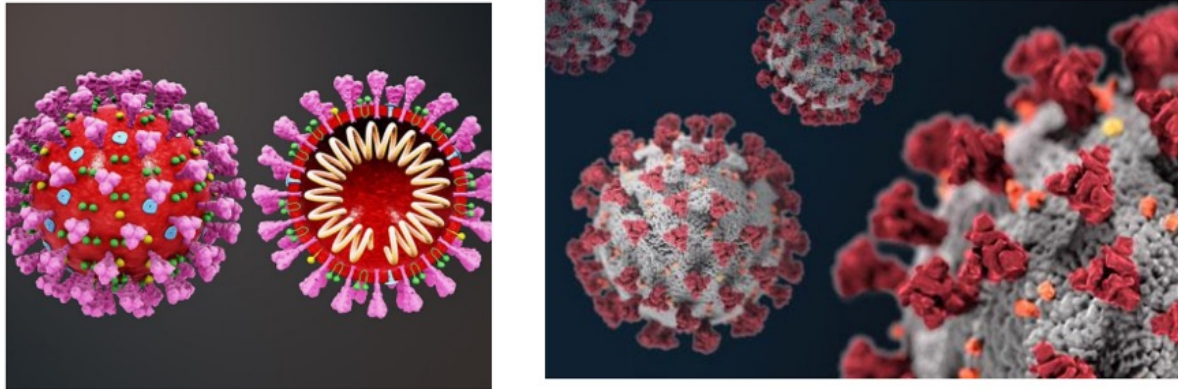
Mercoledì 23 Novembre 2016, 16:06

È allarme sifilide a Cagliari dove sono stati registrati quindici casi in poco più di due mesi, 31 dall'inizio dell'anno. Nel 2015 erano stati 9 in dodici mesi. Numeri preoccupanti, registrati dal Centro per le malattie sessualmente trasmissibili della Clinica Dermatologica dell'Azienda ospedaliera universitaria di Cagliari, e che segnano un picco mai registrato prima.

«Si tratta di una malattia molto contagiosa - dice Nazareno Pacifico, direttore sanitario dell'Azienda ospedaliera universitaria di Cagliari - ed è facilmente trasmissibile con tutti i tipi di rapporti non protetti. I dati parlano chiaro: aumentano le malattie sessualmente trasmissibili e si abbassa l'età dei pazienti: in particolare sono i giovani e i giovanissimi a

# CoViD-19 Pandemic (*Pandemia di Coronavirus Disease 2019*)

Malattia respiratoria acuta da SARS-CoV-2



Coronavirus SARS-CoV-2 (Image originale CDC-Atlanta)

Monkeypox is an emerging infectious eruptive disease, endemic in some African countries, rapidly spreading worldwide from May to December 2022. The new epidemic differs from the previous African ones by its mode of transmission, (intimate contact and/or sexual intercourse) Severe forms of the disease, responsible for significant mortality, have been described in immunosuppressed patients

[ViroL Sin.](#) 2022 Aug; 37(4): 477–482.

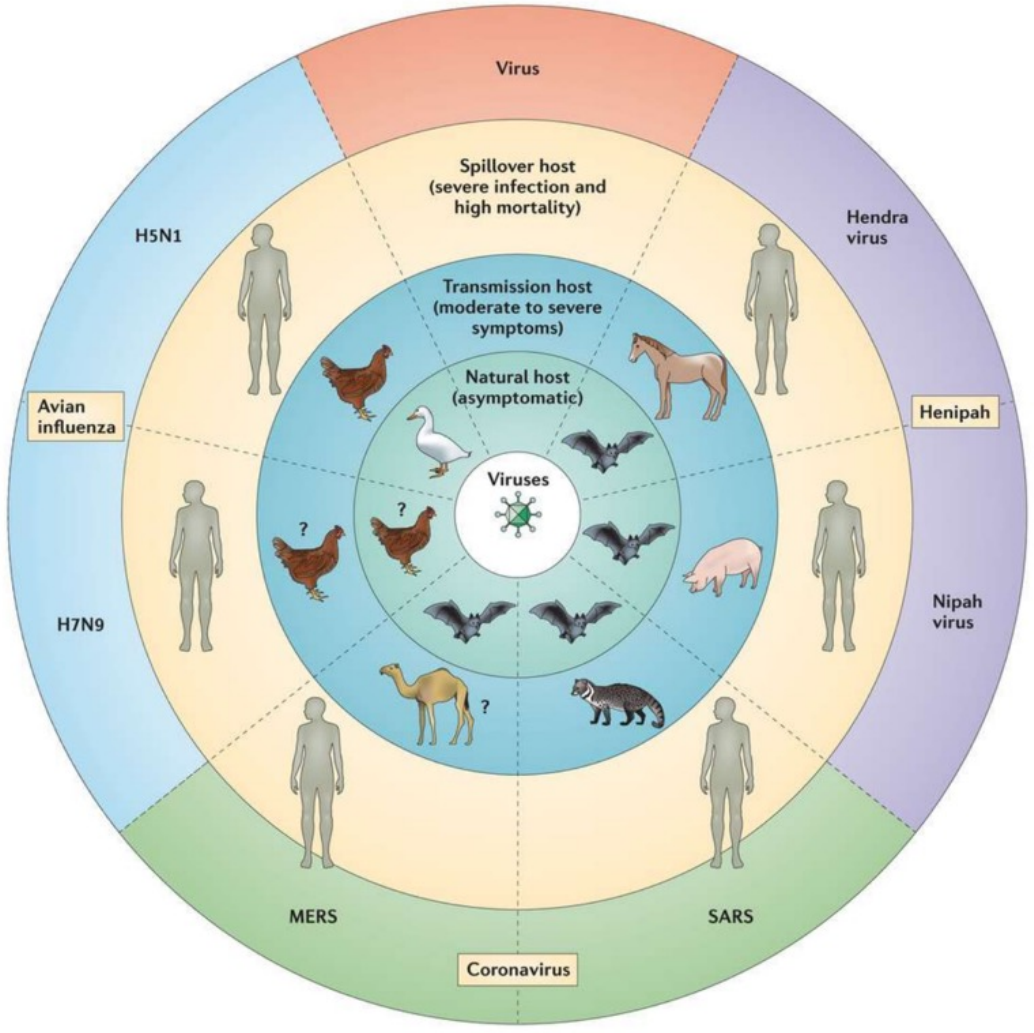
Published online 2022 Jul 9. doi: [10.1016/j.virs.2022.07.006](https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.07.006)

## Monkeypox virus: a re-emergent threat to humans

[Qizan Gong](#),<sup>a</sup> [Changle Wang](#),<sup>b</sup> [Xia Chuai](#),<sup>b,\*</sup> and [Sandra Chiu](#)<sup>a,\*</sup>

▶ [Author information](#) ▶ [Article notes](#) ▶ [Copyright and License information](#)





IL GRADO DI GRAVITÀ  
 DELLE MALATTIE  
 INFETTIVE EMERGENTI È  
 INFLUENZATO  
**DALLA INTERAZIONE  
 OSPITE-PATOGENO**

# Cosa determina l'emergenza o la riemergenza di un'infezione?



- ✓ I principali determinanti delle malattie emergenti possono essere dunque ricondotti al delicato equilibrio di questi 3 fattori:
  - microrganismo;
  - ospite;
  - ambiente e società
- ✓ Esiste una continua evoluzione dell'interazione tra patogeno, ospite, ambiente fisico e sociale.
- ✓ Microrganismi, ospite e ambiente sono in equilibrio dinamico e qualsiasi fattore in grado di modificare questo equilibrio produce effetti a cascata che possono determinare la diffusione di nuove malattie.

# Fattori che contribuiscono all'emergenza /riemergenza delle infezioni

- Aumento dei viaggi internazionali
- Migrazione delle popolazioni rurali nelle grandi città
- Cambiamento climatico (surriscaldamento globale)
- Cambiamento degli ecosistemi (caccia, disboscamento, distruzione degli habitat)
- Allevamenti intensivi e/o promiscui
- Povertà, aumento della popolazione, guerre o altre tragedie umanitarie
- Insorgenza di mutazioni/ ricombinazioni genetiche nei microrganismi patogeni
- Cambiamenti nell'ospite e/o nei vettori



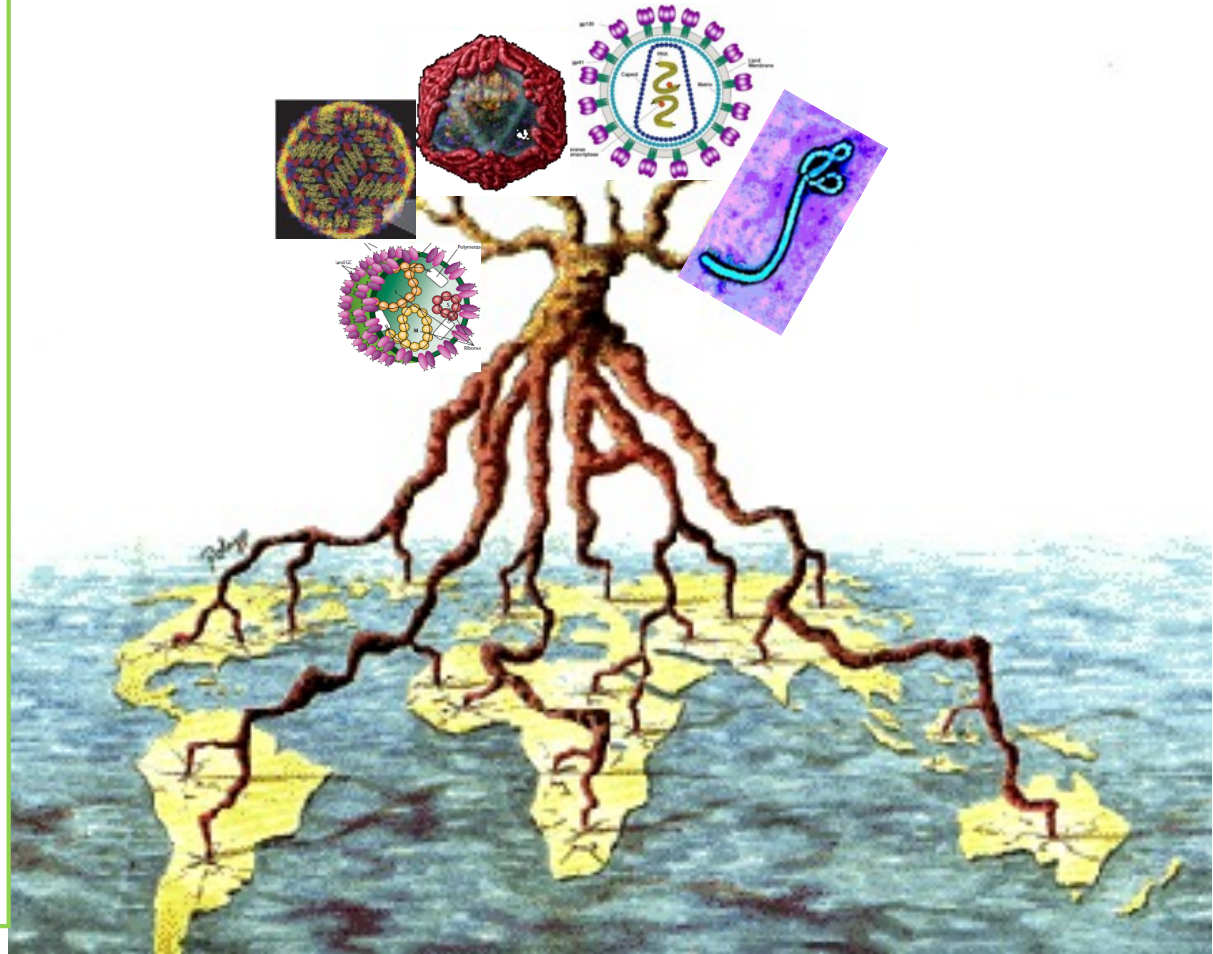
# International travel

- There is no where in the world from which we are remote and no one from whom we are disconnected
- Possibility to be rapidly connected

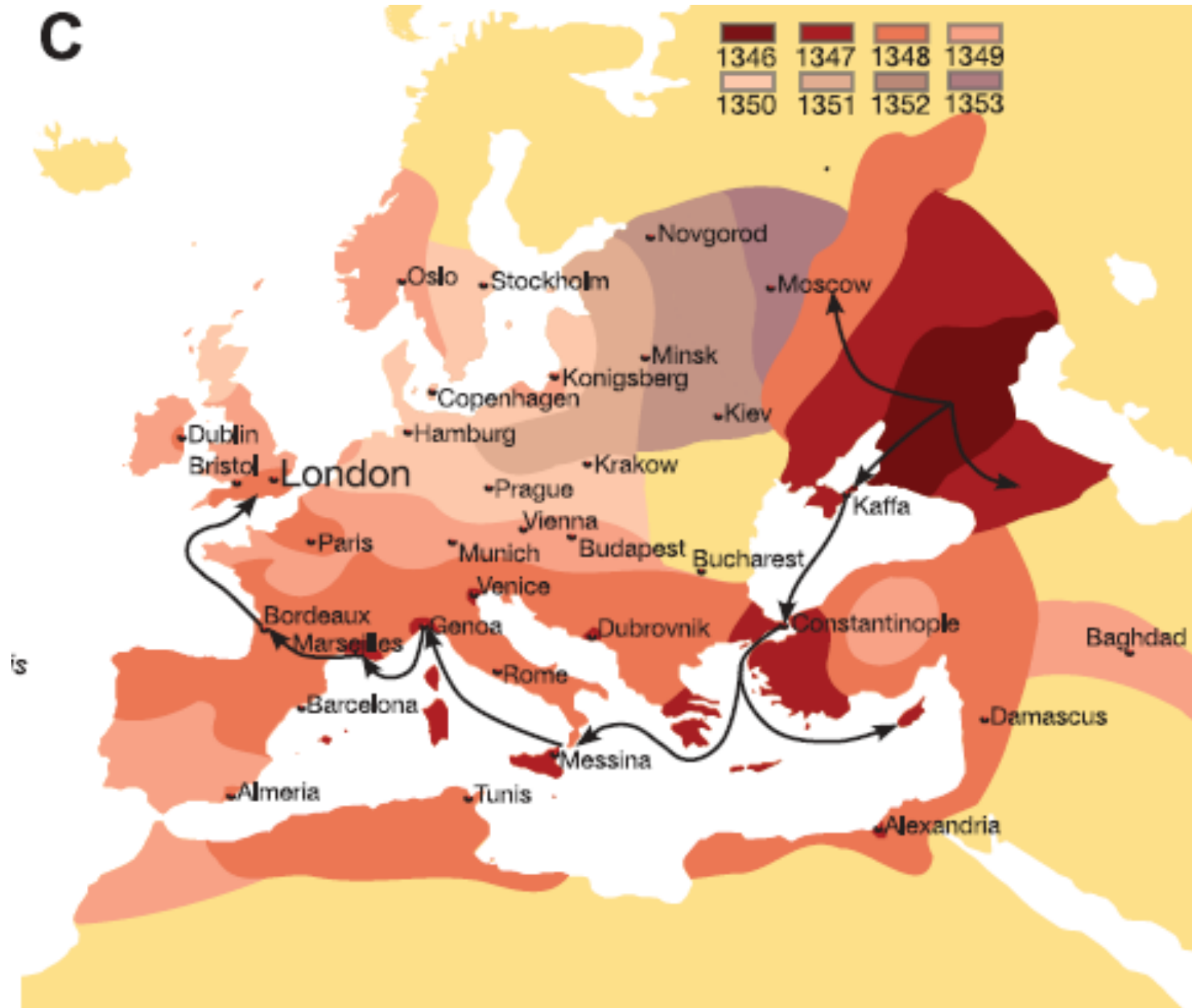


# Globalizzazione dei Virus

- Possibilità di viaggiare rapidamente trasportando virus da una parte all'altra dell'emisfero
- Periodi di incubazione delle infezioni superiori ai periodi necessari per viaggiare
- Periodo di incubazione spesso asintomatico
- La fase di incubazione è per la maggior parte delle infezioni una fase ad alto rischio di trasmissione

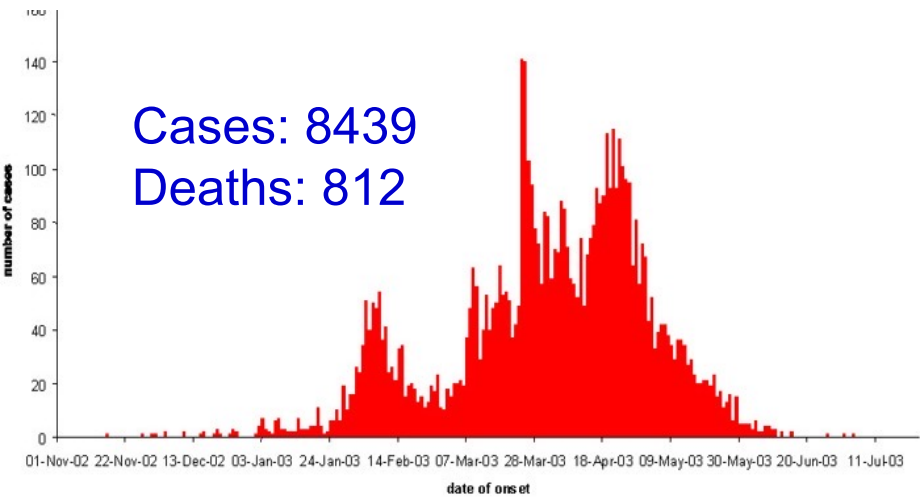


# Map of the movement of the Black Death

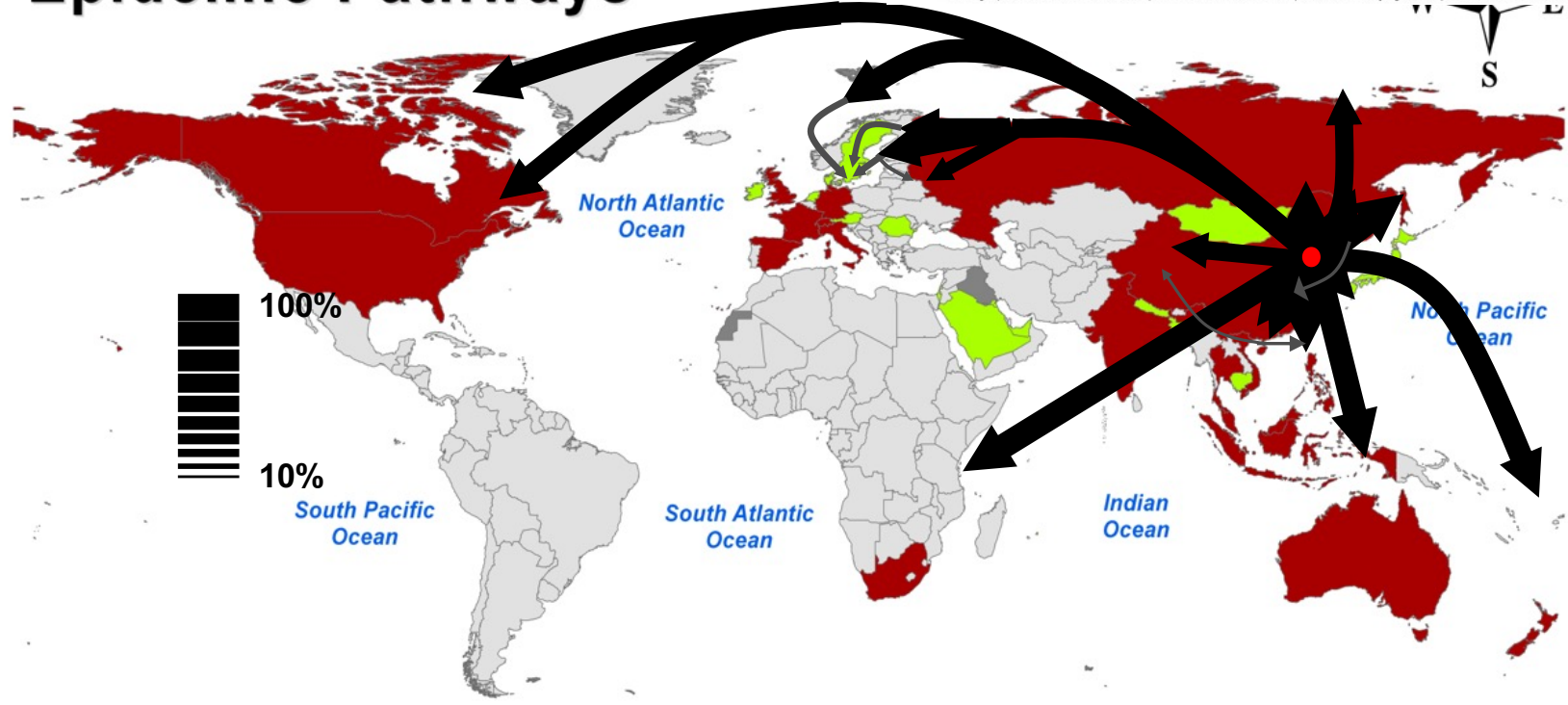




# SARS: Nov 2002-July 2003



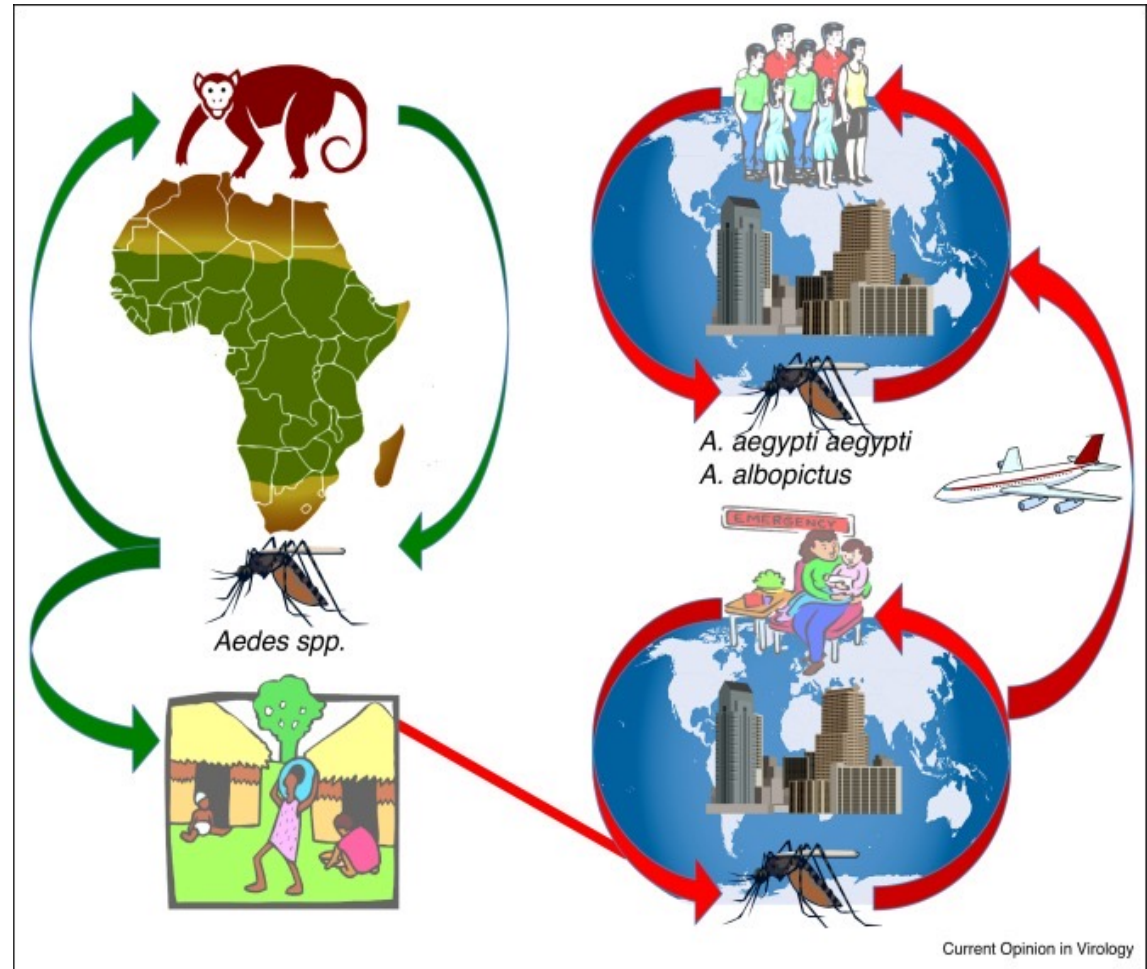
## Epidemic Pathways



\* This graph does not include 2,527 probable cases of SARS (2,521 from Beijing, China), for whom no dates of onset are currently available.

# Il ruolo dell'urbanizzazione nelle malattie infettive

- La crescente tendenza all'urbanizzazione in tutto il mondo ha spostato alcune malattie infettive, tradizionalmente percepite come rurali, in contesti urbani
- La rapida urbanizzazione ha anche interferito in ecosistemi precedentemente incontaminati.
- Questi nuovi insediamenti creano nuovi e più ravvicinati incontri con la fauna selvatica, che può essere una potenziale fonte di malattie zoonotiche.
- I centri urbani possono essere catalizzatori per una rapida diffusione di malattie infettive. La base di grandi gruppi di popolazione in un'area ristretta può fornire le condizioni perfette per diverse epidemie.
- Sia i patogeni precedentemente noti che quelli nuovi possono passare fare il salto di specie, passando dal loro ospite animale agli esseri umani.



Tsetsarkin KA, Curr Opin Virol 2016

- Le epidemie si verificano frequentemente nelle regioni in cui l'economia e la salute pubblica sono a livelli minimi, a causa di guerre civili, sottosviluppo
- Per sopravvivere, le persone si addentrano nelle foreste, alla ricerca di carbone, legno, cibo, aumentando le possibilità di esposizione al virus

### Game



### Deforestation (Guinea)



Allevamento intensivo nei PVS:

scarsi standard igienici e contatti tra  
specie diverse!





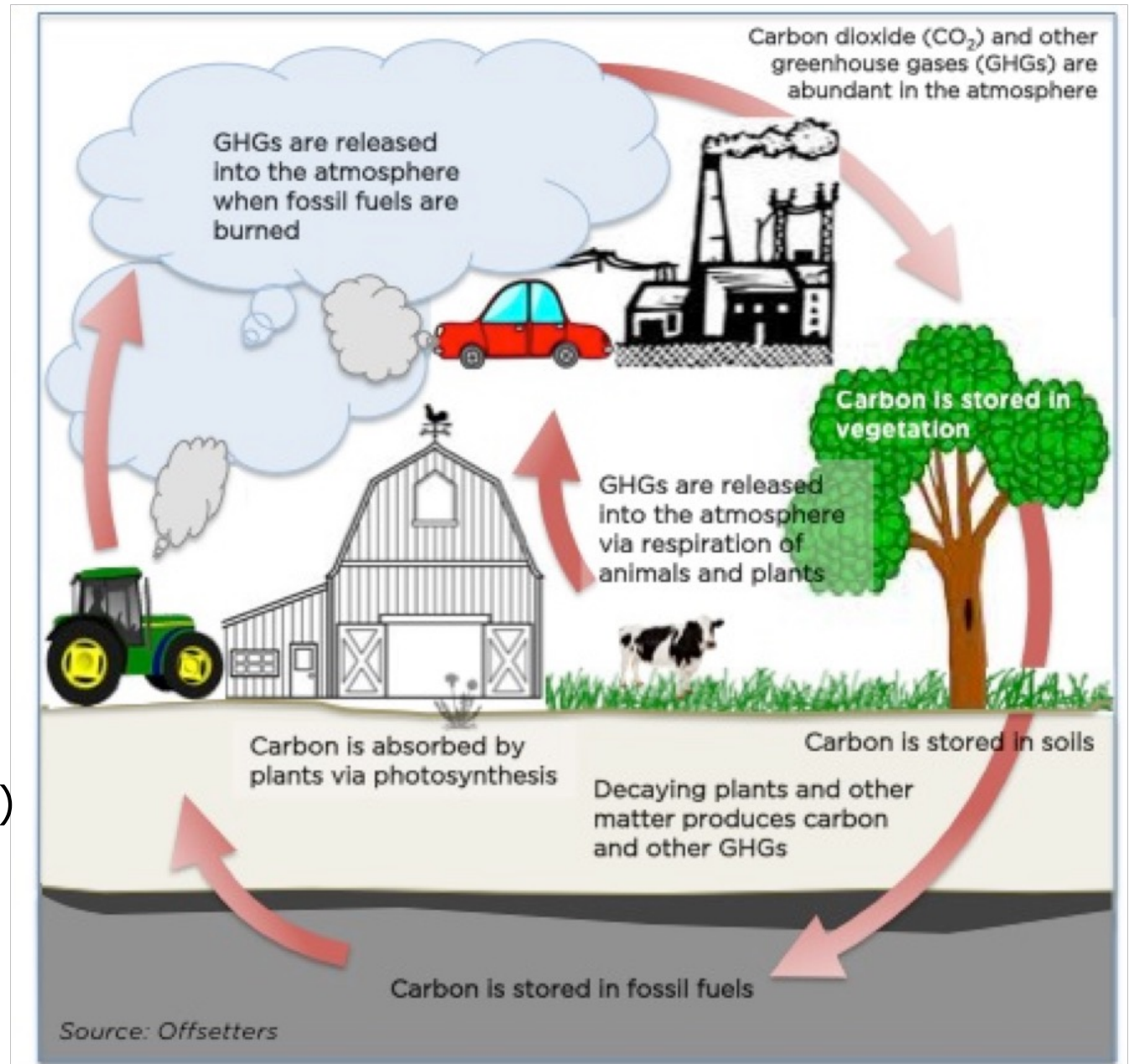
# Climate changes

- Plants
- Industrial revolution
- Demographic increase, increased life expectancy
- Intensive breeding
- Carbon fuels



## Greenhouse Gases

- Steam
- Carbon dioxide (CO<sub>2</sub>)
- Methane
- Nitrous oxide N<sub>2</sub>O



# Cambiamenti climatici: surriscaldamento globale



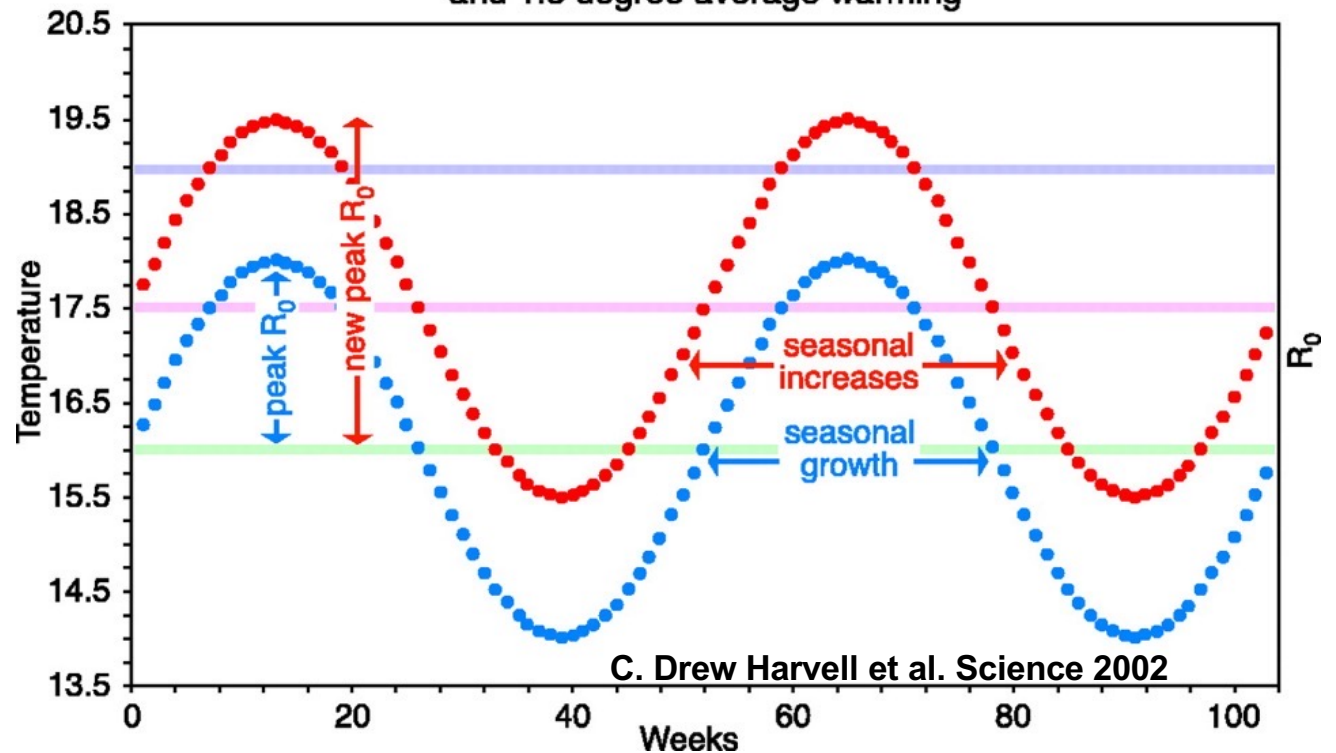
Aumento medio della temperatura di  $0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  per decennio  
(Karl et al., 1995)



- I vettori e i parassiti artropodi muiono o non riescono a svilupparsi al di sotto delle temperature di soglia ;
- tassi di riproduzione del vettore, crescita della popolazione e aumento del morso (fino a un limite) con l'aumento della temperatura;
- i tassi di sviluppo del parassita e il periodo di infettività aumentano con la temperatura



Response of pathogen growth rate to annual temperature and 1.5 degree average warming



..... average weekly Temp before climate change

..... average weekly Tem after an average 1.5° increase.

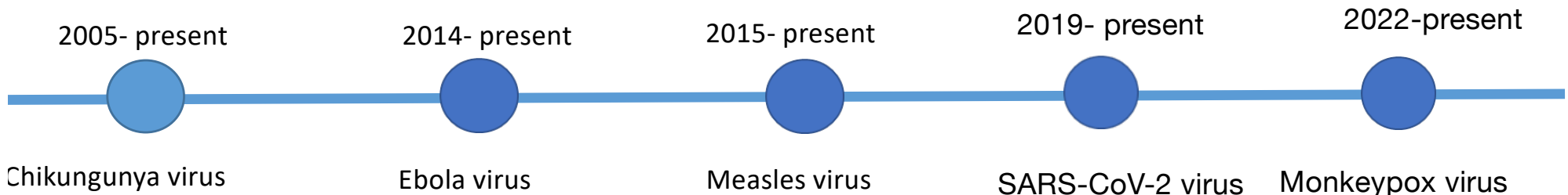
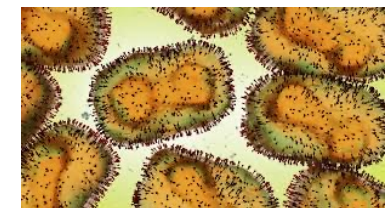
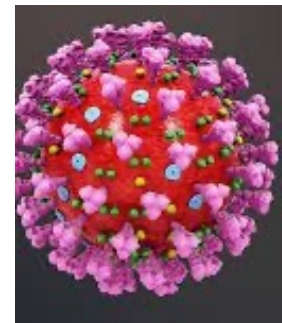
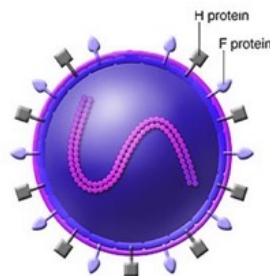
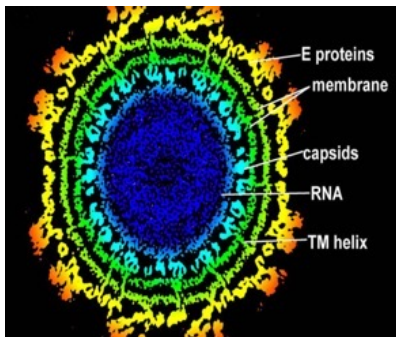
Unprecedented series of Chikungunya epidemics have been spreading throughout the Indian Ocean. Travellers have also been affected, and hundreds of imported cases have been reported from all over Europe (including Italy) and the United States.

West African Ebola virus epidemic was the most widespread outbreak of Ebola in the history, causing major loss of life and socioeconomic disruption in the region, with the case fatality rate above 70

In the 2015 outbreak, 189 cases of measles were diagnosed in 24. The majority of occurred in unvaccinated individuals.

On 31 December 2019, the Chinese health authorities notified an outbreak of pneumonia cases of unknown aetiology in the city of Wuhan  
On 11 March 2020, the WHO, declared that the COVID-19 epidemic can be considered a pandemic.

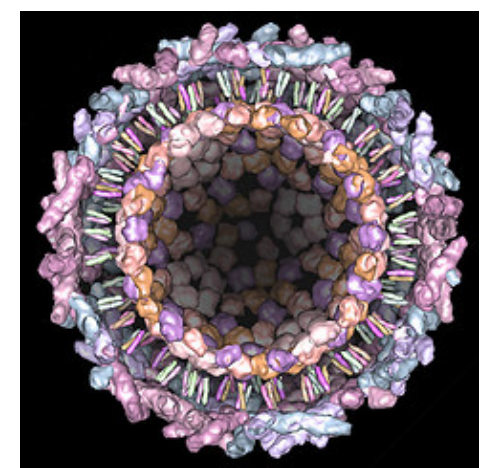
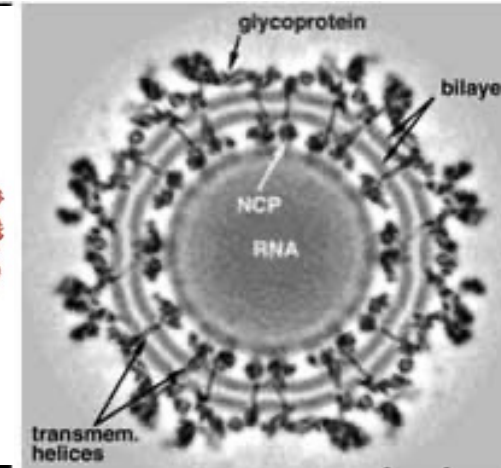
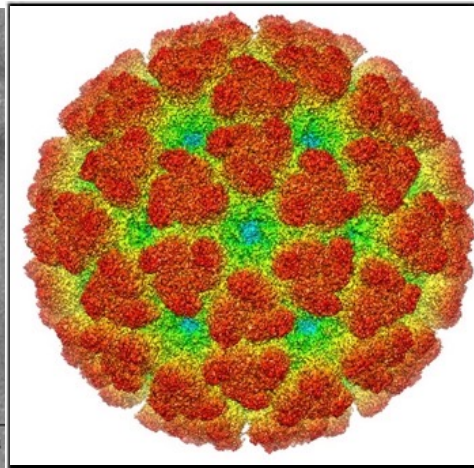
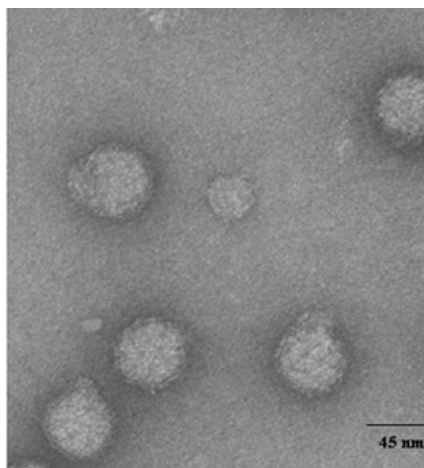
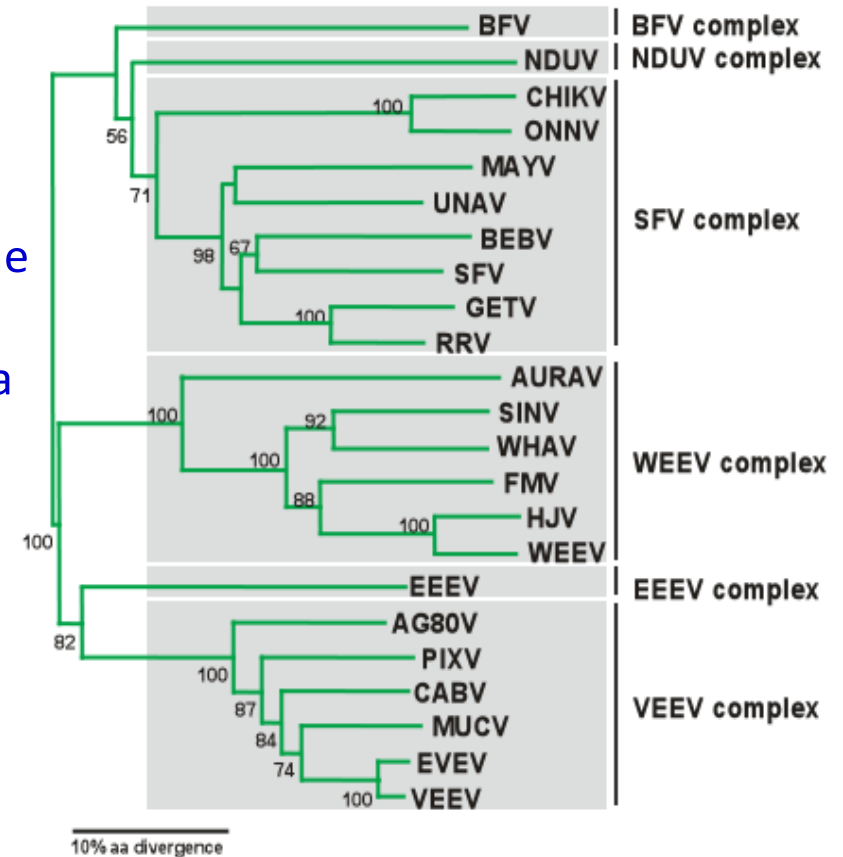
Monkeypox is an emerging infectious eruptive disease, endemic in some African countries, rapidly spreading worldwide from May to December 2022. The new epidemic differs from the previous African ones by its mode of transmission, (intimate contact and/or sexual intercourse) Severe forms of the disease, responsible for significant mortality, have been described in immunosuppressed patients

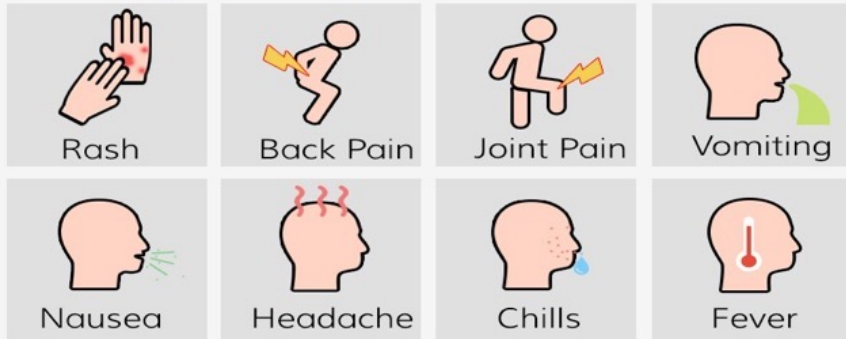




# Chikungunya

- ☀ Famiglia *Togaviridae*, genere *alphavirus*
- ☀ Sferico, diametro 40-70 nm, rivestito di un *envelope* contenente le glicoproteine E1 e E2 (funzione recettoriale ed emoagglutinante) appaiate tra loro a formare le spicole; capside icoesaedrico contenente la proteina C (induce anticorpi cross-reattivi nell'ambito del genere)
- ☀ Genoma: RNA a singolo filamento, polarità positiva
- ☀ Replicazione: citoplasmatica





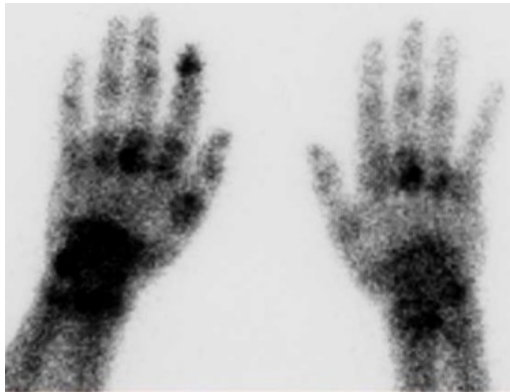
**STOP THE HYSTERIA,  
STOP THE CHIKUNGUNYA!**



- ☺ Incubazione 3-12 gg
- ☹ I<sup>a</sup> fase (6-10gg): febbre, cefalea, importanti e persistenti artralgie.
- ☺ II<sup>a</sup> fase (2-3gg): esantema maculo-papulare pruriginoso, ricomparsa della febbre

| Clinical Features     | Chikungunya Virus (CHIKV)                                    | Dengue Virus (DENV) | Reference          |
|-----------------------|--|---------------------|--------------------|
| 1) Fever, asthenia    | Common   | Common              | [6,8]              |
| 2) Myalgia            | Possible   | Very common         | [6]                |
| 3) Polyarthrits       | Very Common, edematous                                       | None                | [56]               |
| 4) Tenosynovitis      | Yes  | None                | [57]               |
| 5) Leukopenia         | None   | Yes                 | [58]               |
| 6) Thrombocytopaenia  | None   | Yes                 | [59]               |
| 7) Rash               | Days 1–4, important skin edema                               | Days 3–7            | [6,35,58]          |
| 8) Retro-orbital pain | Rare   | Common              | [60]               |
| 9) Hypotension        | Possible   | Common, Days 5–7    | [60,61]            |
| 10) Minor bleeding    | Chronic polyarthrits up to 1 year                            | Common              | [17,56]            |
| 11) Second stage      | Possible; Tenosynovitis at M2–M3 Raynaud's syndrome at M2–M3 | Fatigue up to 3 mo  | [6,56,57,58,62,63] |

Parola et al. EID 2006



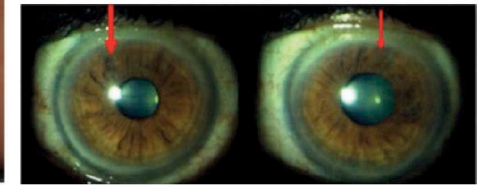
Bone scintigraphy of the wrists and hands showing an intense focus of technetium-99m-labeled methylene diphosphonate tracer uptake

Simon et al.  
Med Clin N Am 2008

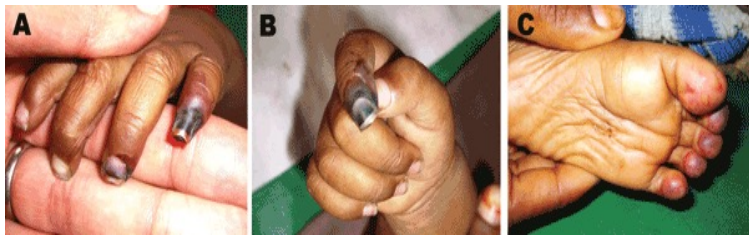


Fig. 4. Clinical manifestations of CHIK infection. (A) Edematous exanthema of the face (acute stage). (B) Raynaud's phenomenon at the third month after disease onset (chronic stage). (C) Polyarthritis in hands and hypertrophic tenosynovitis in wrists at the third month after disease onset (chronic stage). (D) Bursitis of dorsal side of the hand (chronic stage). (E) Chronic swelling and stiffness of the fingers with loss of grip strength (chronic stage).

Chikungunya Virus Infection Associated with Encephalitis and Anterior Uveitis



A 57-year-old man from Salvador Bahia had developed bilateral anterior uveitis with iris atrophy and a cotton wool spot on the left eye, and his serum, urine, saliva, and CSF were positive for CHIKV by RT-PCR



Lewthwaite et al EID 2009

**Digital gangrene** in an 8-month-old girl during week 3 of hospitalization

# Trasmissione: puntura di zanzare

## ☀ *Aedes albopictus* (zanzara tigre):

presente nei centri abitati; vettore nelle isole indiane; recentemente diffusa anche in Europa

## ☀ *Aedes aegypti*:

presente soprattutto in zone rurali

## ☀ *Varie specie di culex*:

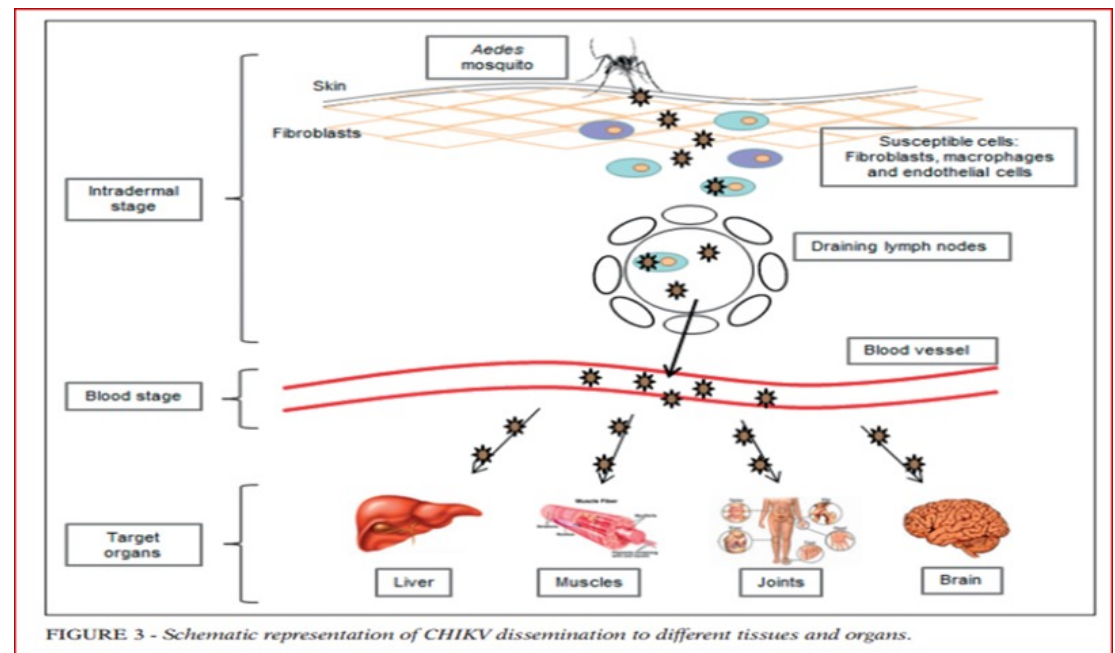
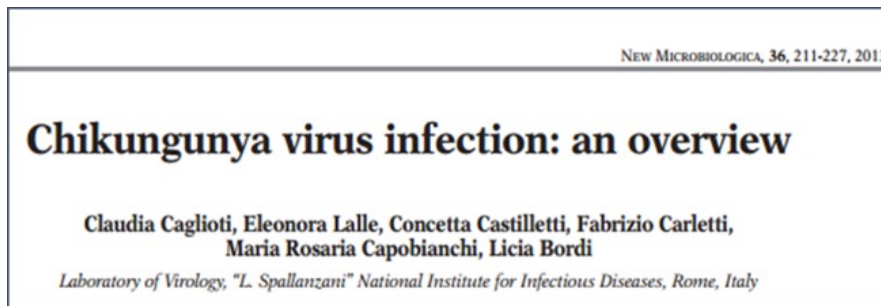
es: *Culex quinquefasciatus* sono state indicate come vettori



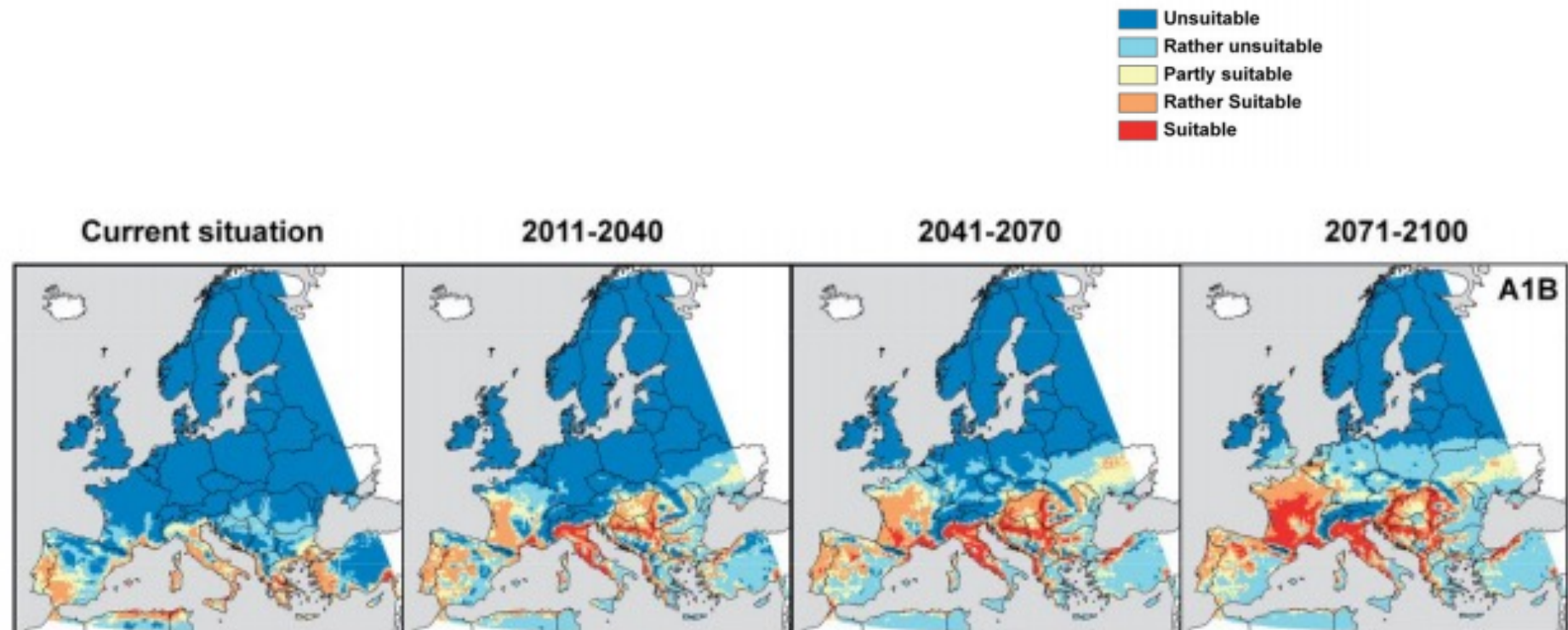
✚ descritti casi di trasmissione materno-fetale nell'isola di Réunion

✚ non ci sono dimostrazioni di trasmissione interumana

✚ trasmissione per esposizione accidentale al sangue (puntura con siringa) durante la fase viremica



- Although the current distributions in many parts of Africa of *A. albopictus* and the domesticated form of *A. aegypti* remain incompletely characterized, presumably a person infected from enzootic CHIKV spillover occasionally reaches a location where populations of these mosquitoes and their contact with people are sufficient to initiate interhuman transmission.
- climate change contributed to the introduction of *A. albopictus* mosquitoes into previously unaffected areas
- Endemic/epidemic transmission cycles were established when the virus was introduced into Asia around 1950, and into the Indian Ocean region, India and then Southeast Asia since 2005



# Estimation of Lasting Impact of a Chikungunya Outbreak in Reunion Island

Hafiz Muhammad Yaseen<sup>1,2</sup>, Fabrice Simon<sup>3</sup>, Xavier Deparis<sup>1,2</sup> and Catherine Marimoutou<sup>1,2\*</sup>



Centre Publications Countries Programmes Governance About WHO

## Global Alert and Response (GAR)

### Chikungunya in La Réunion Island (France)

17 February 2006

Between 28 March 2005 and 12 February 2006, 1 722 cases of chikungunya have been notified by physicians from a sentinel network in La Réunion, including 326 cases reported during the week 6 to 12 February. Estimations from a mathematical model indicate that 110 000 people may have been infected by chikungunya virus since March 2005 in La Réunion, including 22 000 persons during the week 6 to 12 February. During the first week of February, other countries in the south west Indian Ocean have reported cases: Mauritius (206 cases) and the Seychelles (1 255 cases).

[Emerg Infect Dis.](#) 2006 Dec; 12(12): 1994–1995.

PMCID: PMC3291364

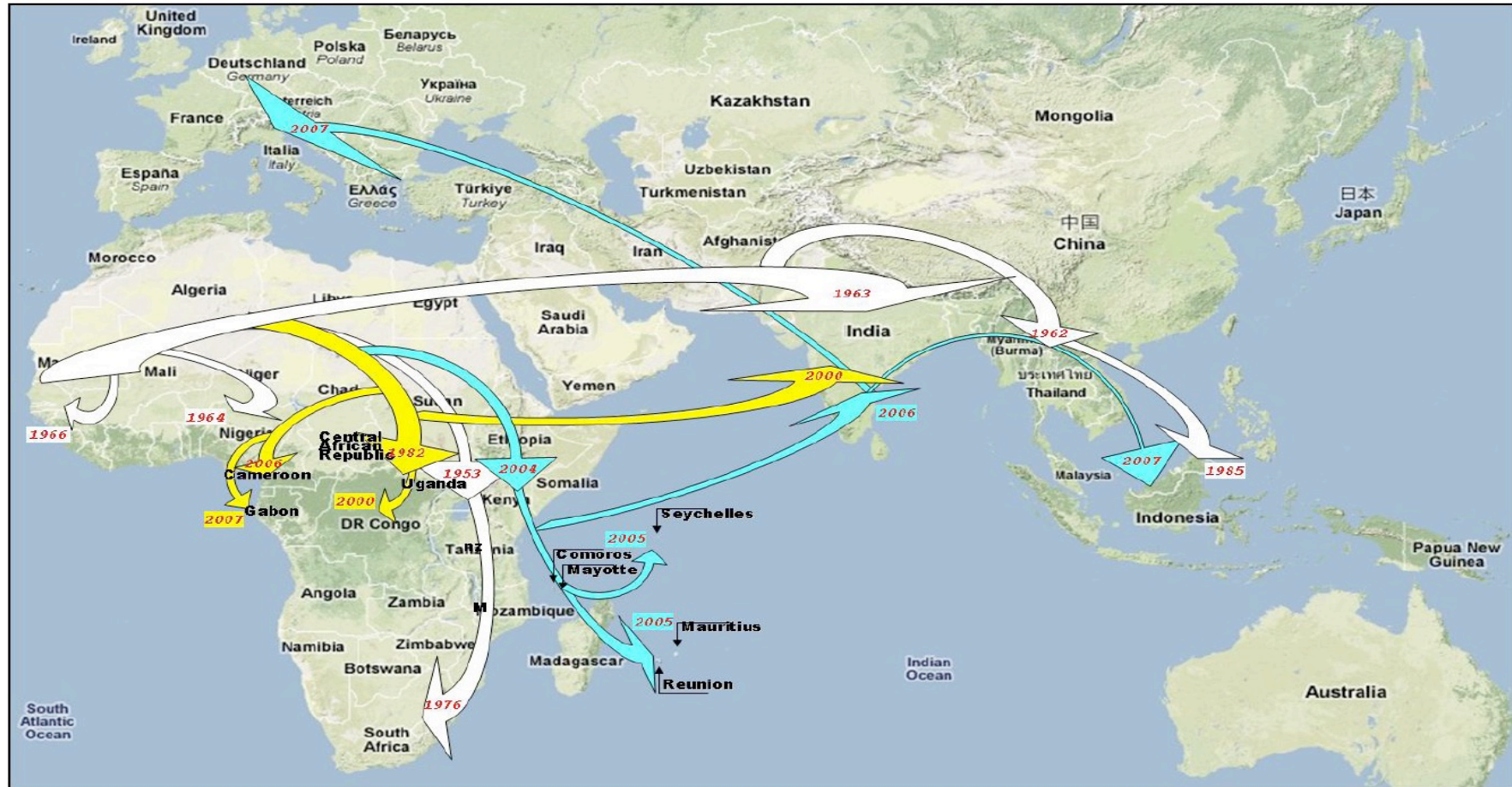
doi: [10.3201/eid1212.060710](https://doi.org/10.3201/eid1212.060710)

## Chikungunya Disease Outbreak, Reunion Island

[Loïc Josseran](#)<sup>✉</sup>, [Christophe Paquet](#)<sup>\*</sup>, [Abdelkrim Zehqnon](#)<sup>\*</sup>, [Nadège Caillere](#)<sup>\*</sup>, [Alain Le Tertre](#)<sup>\*</sup>, [Jean-Louis Solet](#)<sup>†</sup> and [Martine Ledrans](#)<sup>\*</sup>

[Author information](#) ▶ [Article notes](#) ▶ [Copyright and License information](#) ▶

# Predicted dispersal pattern of Chikungunya virus from Africa to the Indian Ocean and Europe during the past 20 to 50 years.



- Phylogenetic analyses of full-length genomes reveal that CHIKV is readily transported by infected travellers to distant locations, generating new outbreaks.
- Rapid adaptation of the virus to ecological perturbation and to new vector populations

# Chikungunya: Reasons for concern for Italy

Circolare del Ministero della Salute, Agosto 2006

ALLEGATO 1

## SORVEGLIANZA DELLA CHIKUNGUNYA

### Premessa

A partire dal Marzo 2005, l'isola de La Réunion (Repubblica Francese) ed altre zone limitrofe dell'Oceano Indiano sono state interessate da una epidemia di chikungunya di vaste dimensioni. La

*Le Infezioni in Medicina, n. 4, 238-245, 2006*

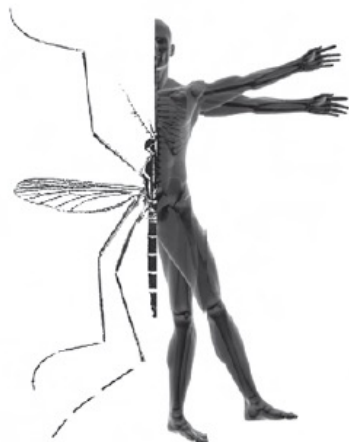
*Casi  
clinici*

*Case  
reports*

## **Casi di febbre Chikungunya in Italia in viaggiatori di ritorno dall'Oceano Indiano e rischio di introduzione nel territorio italiano**

***Cases of Chikungunya fever in Italy in travellers returning  
from the Indian Ocean and risk of introduction  
of the disease to Italy***

Francesco Maria Fusco<sup>1</sup>, Vincenzo Puro<sup>1</sup>, Antonino Di Caro<sup>2</sup>,  
Emanuele Nicastrì<sup>3</sup>, Novella Carannante<sup>4</sup>, Francesco Saverio Faella<sup>4</sup>,  
Luisa Barzon<sup>5</sup>, Simona Di Cesare<sup>6</sup>, Giorgio Palù<sup>7</sup>,  
Maria Rosaria Capobianchi<sup>2</sup>, Giuseppe Ippolito<sup>1</sup>



- *Tangible opportunity of autochthonous cases due to the presence of mosquito vector (Ae. Albopictus ) since the 90s and opportunity for local chains of transmission*



# Globalization and EID

## The perfect microbial storm: Chikungunya in Italy (2007)

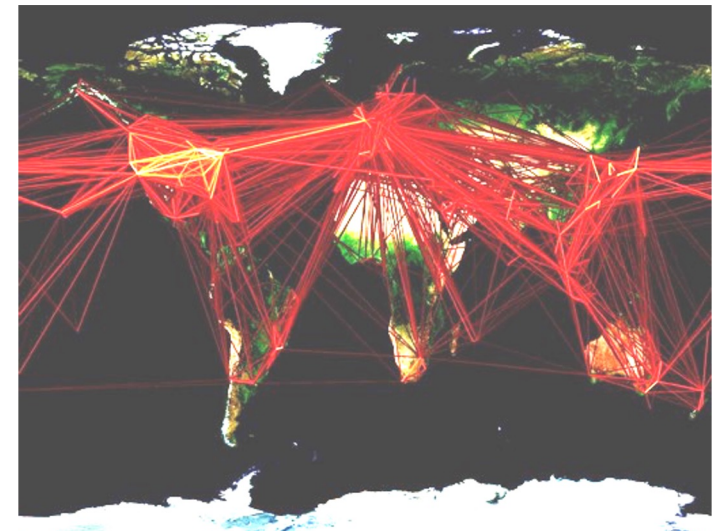
A mosquito from **ASIA** imported in **EUROPE** through used tires  
from **NORTH AMERICA**

+

A virus from **AFRICA** imported in **ITALY** from an immigrant from  
**INDIA**

=

247 cases of Chikungunya Fever in **EMILIA- ROMAGNA**



## The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system

Giancarlo Maria Liumbruno<sup>1,2</sup>, Deanna Calteri<sup>1,6</sup>, Kyriakoula Petropulacos<sup>3</sup>, Andrea Mattivi<sup>4</sup>, Claudio Po<sup>4</sup>, Pierluigi Macini<sup>4</sup>, Ivana Tomasini<sup>5</sup>, Paolo Zucchelli<sup>6</sup>, Anna Rita Silvestri<sup>6</sup>, Vittorio Sambri<sup>7</sup>, Simonetta Pupella<sup>1</sup>, Liviana Catalano<sup>1</sup>, Vanessa Piccinini<sup>1</sup>, Gabriele Calizzani<sup>1</sup>, Giuliano Grazzini<sup>1</sup>

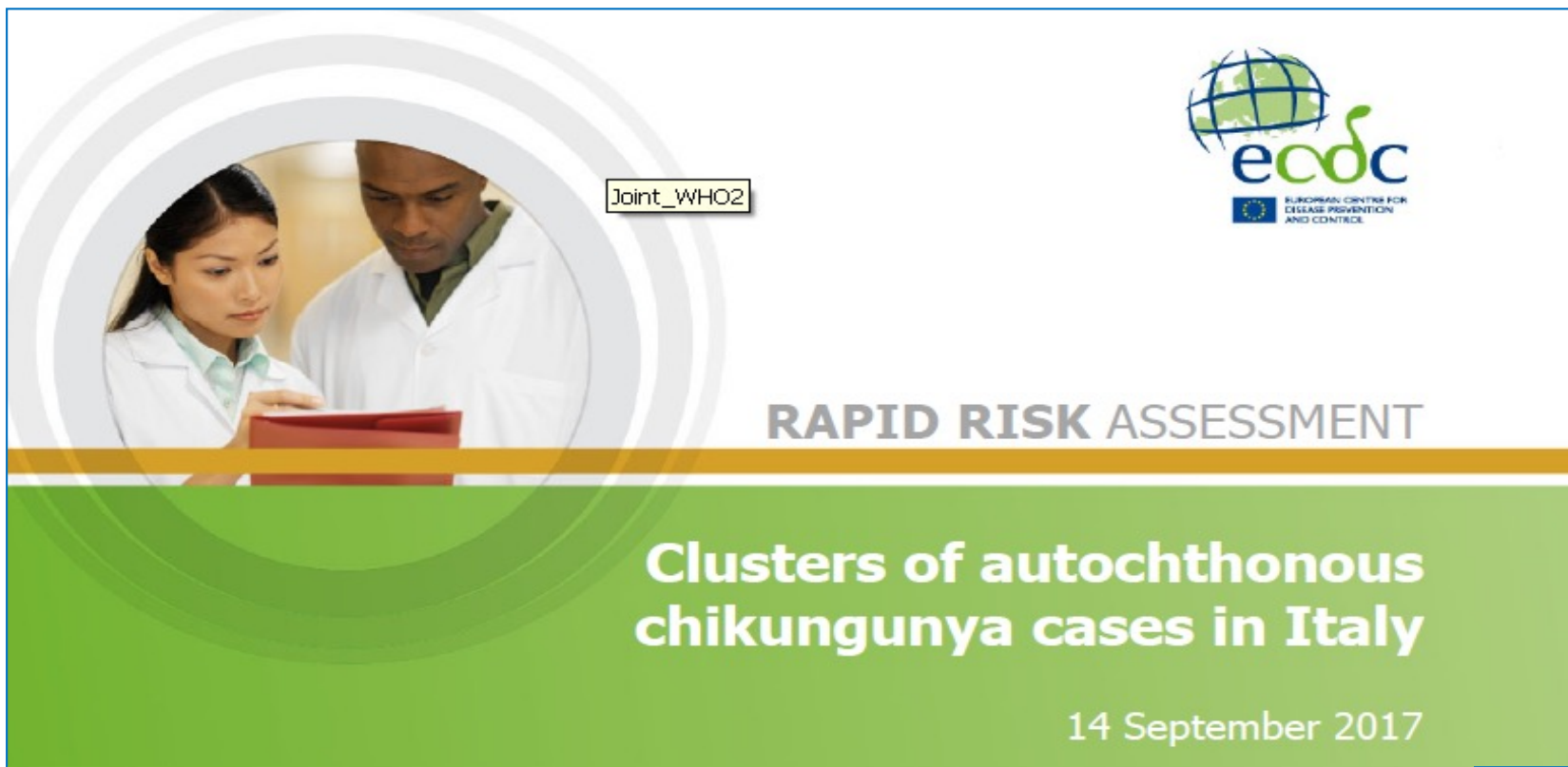


*Blood Transfus 2008*

|            | September 2007 |         |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |         |    |    |    |    |    |    |    |    | October 2007 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |
|------------|----------------|---------|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|--|--|--|--|--|--|--|--|
|            | 1              | 2       | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22      | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 1            | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ravenna    | 39 days        |         |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |         |    |    |    |    |    |    |    |    |              |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Cervia     | 44 days        |         |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |         |    |    |    |    |    |    |    |    |              |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Cesena     |                | 38 days |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |         |    |    |    |    |    |    |    |    |              |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Cesenatico |                | 12 days |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |         |    |    |    |    |    |    |    |    |              |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Rimini     |                |         |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 21 days |    |    |    |    |    |    |    |    |              |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |

**Figure 4 -** Periods of suspension of blood donations in the blood transfusion centres in the areas affected by the Chikungunya epidemic

The precautionary measures adopted produced  
**a considerable impact on the blood supply**



Joint\_WHO2

ecdc  
EUROPEAN CENTRE FOR  
DISEASE PREVENTION  
AND CONTROL

RAPID RISK ASSESSMENT

Clusters of autochthonous  
chikungunya cases in Italy

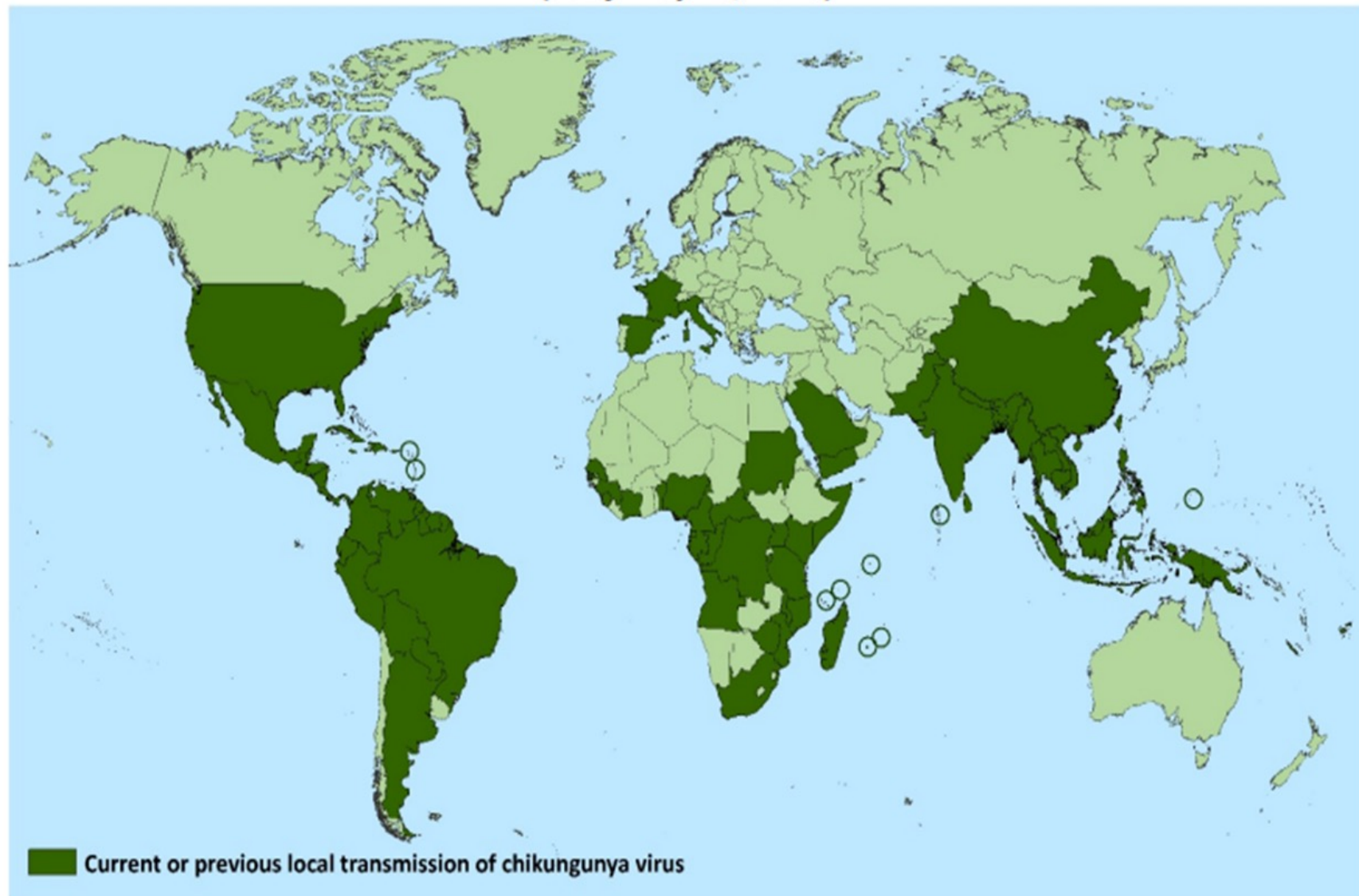
14 September 2017

## Conclusions and options for response

Two related clusters involving autochthonous transmission of chikungunya virus have been detected in the cities of Anzio and Rome, two areas located 60 km apart in the Lazio region of Italy. Transmission of this type, in areas where *Aedes albopictus* mosquitoes are established and at a time when environmental conditions are suitable for increased mosquito abundance and activity, is not unexpected. This event is the second introduction of chikungunya local transmission in Italy resulting in an outbreak, following a previous outbreak in the Emilia-Romagna region in 2007. Other autochthonous transmission events were detected in France in 2010, 2014 and 2017.

- ❖ The 1<sup>st</sup> INMI case-patient: Man resident of Anzio with no recent travel history abroad was admitted to INMI on August 30 with **suspected measles**. Arboviral disease suspected on September 3
- ❖ CHIK IgM positive on September 5.

**Countries and territories where chikungunya cases have been reported\***  
*(as of May 29, 2018)*



\*Does not include countries or territories where only imported cases have been documented.

# Chikungunya outbreak affects 8,000 in the Republic of the Congo

by NEWS DESK

🕒 April 20, 2019

Reports from [the Republic of the Congo \(computer translated\)](#) show that the chikungunya epidemic that began Jan. 7 has grown to 8,000 cases.



The outbreak has affected eight departments ( Kouilou, Bouenza, Pointe Noire, Plateaux, Pool and Brazaville, Niari, Lékoumu).

Officials from the National Public Health Laboratory reveal that the disease has already being seen in half the country.

Entomological investigation showed the presence of the vector, *Aedes albopictus*.

Chikungunya is a viral disease transmitted to humans by infected mosquitoes. It causes fever and severe joint pain, which is often debilitating. Other symptoms include muscle pain, headache, nausea, fatigue, and rash.

opTofs



- Au Congo, la première épidémie de chikungunya a été décrite en 2011 dans les départements de Brazzaville et du Pool avec au total, 11320 cas suspects notifiés.
- Le ministère de la santé et de la population a déclaré l'épidémie de chikungunya le 9 février 2019.

# Chikungunya in Congo. L'Italia guida la missione internazionale per gestire di un focolaio

*Il coordinamento della missione internazionale è stato affidato allo Spallanzani. La missione ha avuto inizio il 15 marzo e avrà la durata di 2 settimane con oneri che saranno interamente coperti dai finanziamenti Europei. Dall'Italia sono*



Chikungunya in the Republic of Congo

Mission report



**A Francesco Vairo - spiega lo Spallanzani in una nota - il compito di guidare** e gestire il team di risposta alle emergenze,- assicurare che venga condotta una valutazione esauriente delle esigenze,- sostenere il rafforzamento del piano di risposta alle emergenze, sostenere il rafforzamento del sistema di sorveglianza, coordinare la stesura di una proposta di ricerca sull'epidemia, elaborare una raccomandazione riguardante la sorveglianza e la risposta.

**A Concetta Castilletti quello di supportare l'implementazione della diagnostica** inclusi test molecolari e sierologia, supportare l'implementazione del sequenziamento virale, elaborare una raccomandazione riguardante la risposta di laboratorio.

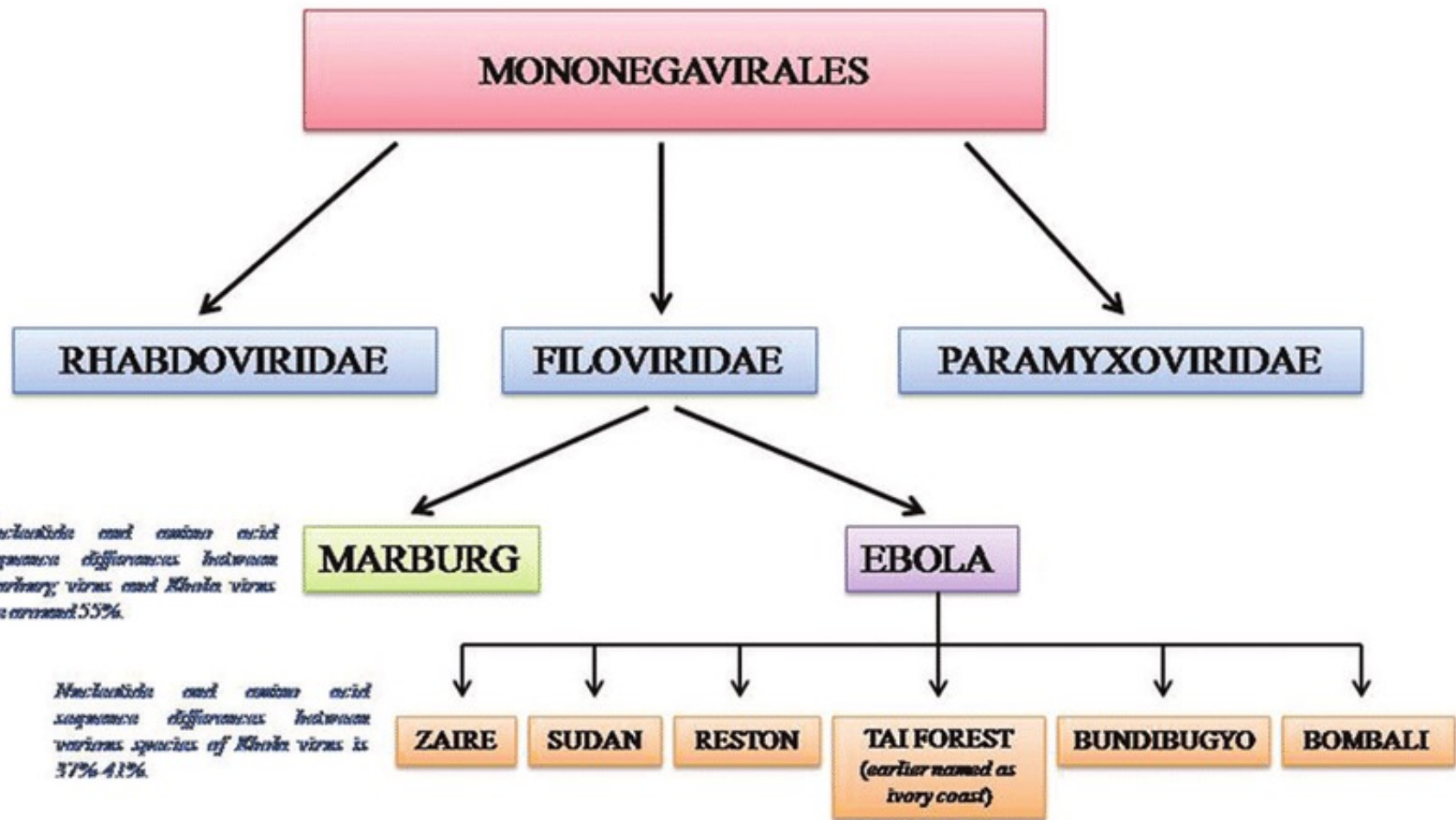
**Najmul Haider dovrà occuparsi dello sviluppo di un modello SES**, di supportare la raccolta e l'analisi dei dati, e della elaborazione di raccomandazioni riguardanti la sorveglianza entomologica; Patrick Kija Tungu sarà di supporto al piano di controllo vettoriale e al sistema di sorveglianza entomologica dalla trappola alla zanzara e all'analisi dei dati, e si occuperà della elaborazione di raccomandazioni riguardanti la sorveglianza entomologica.

**Marco Iannetta sarà di supporto alla implementazione di un piano di gestione clinica** e di un protocollo di follow up clinico, e alla elaborazione di raccomandazioni riguardanti la gestione clinica.

# Ebola Virus Disease (EVD)

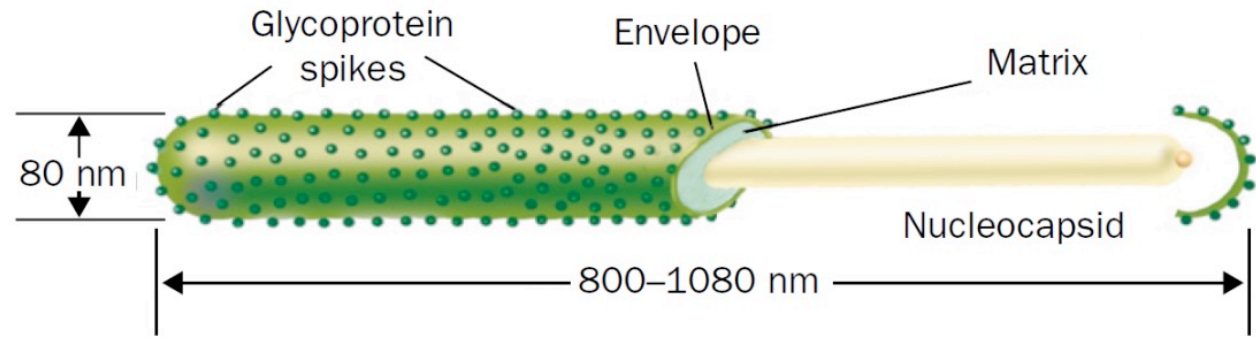
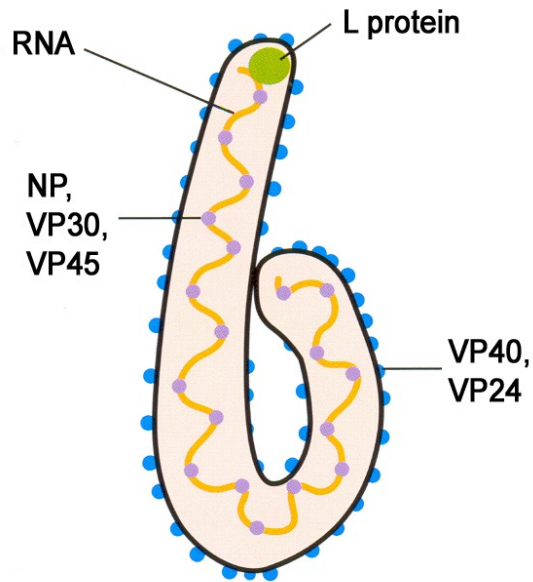
- Previous name:  
Ebola Hemorrhagic  
Fever (EHF)
- In the collective  
imagination EHF  
evokes more than  
any other disease the  
idea of a catastrophic  
event



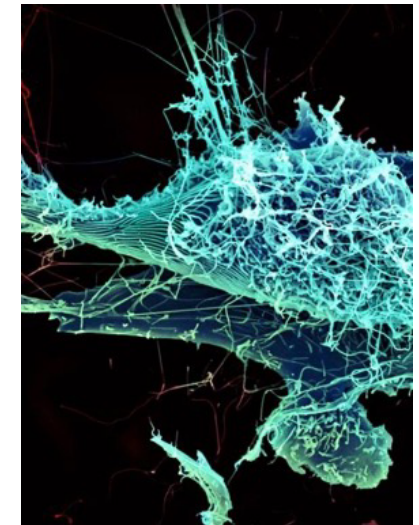
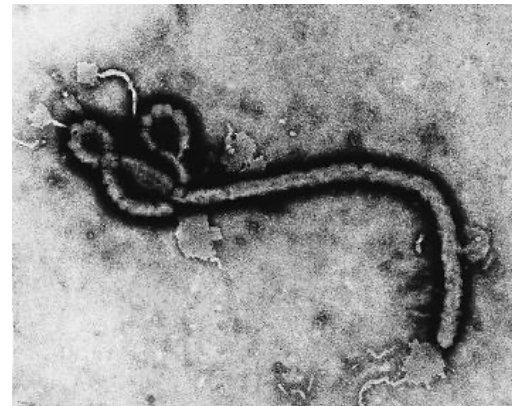
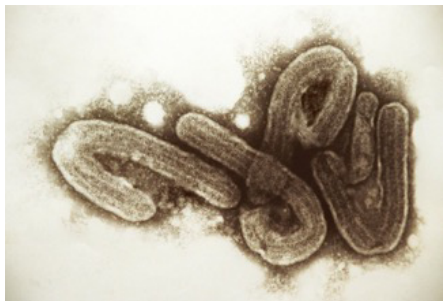
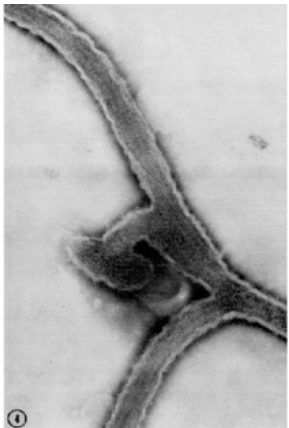




# The Virus



- Pleomorphic, elongated viral particle with envelope
- Size: 80nm x 130-14,000nm
- Order: mononegavirales (ssRNA-)
- Coding capacity: 7 proteins



Feldmann H., NAID

# Genoma

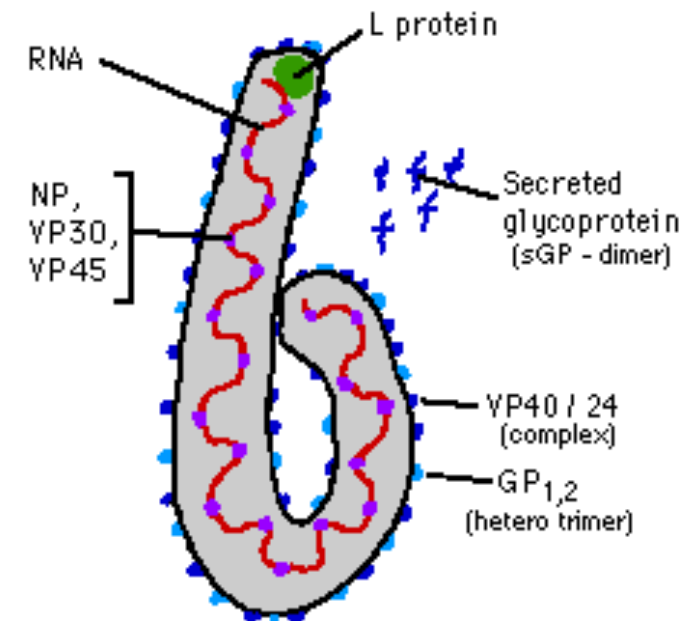
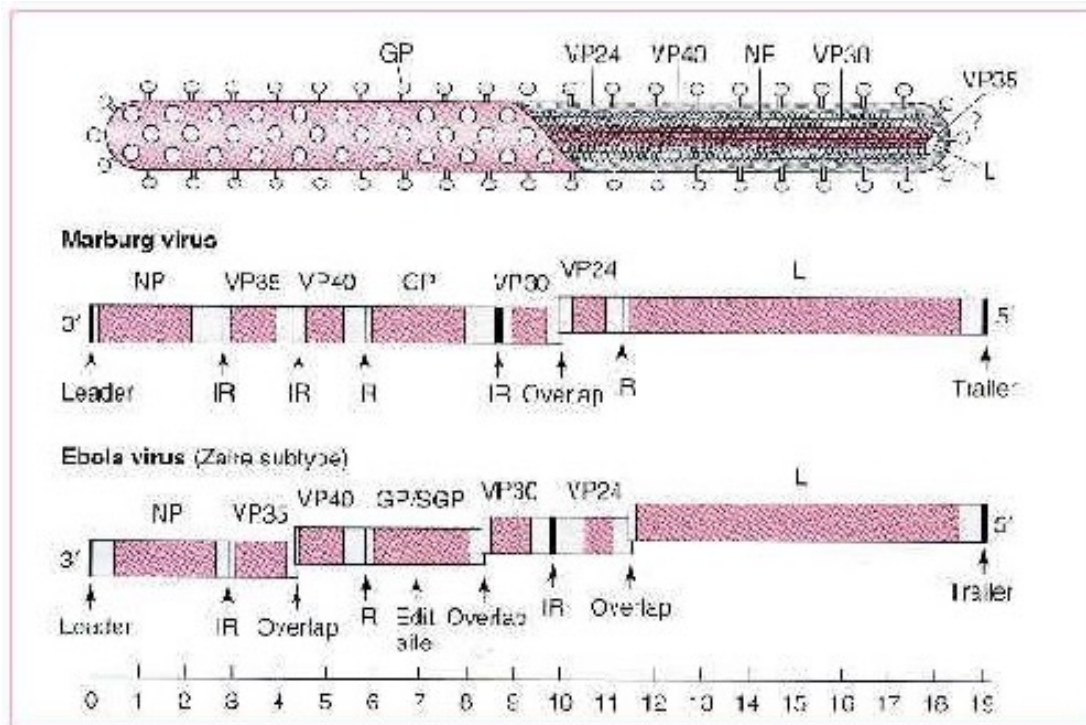
Il genoma è ad RNA, a singolo filamento, non segmentato (mononegavirales), a polarità negativa di circa 19kb.

Il genoma:

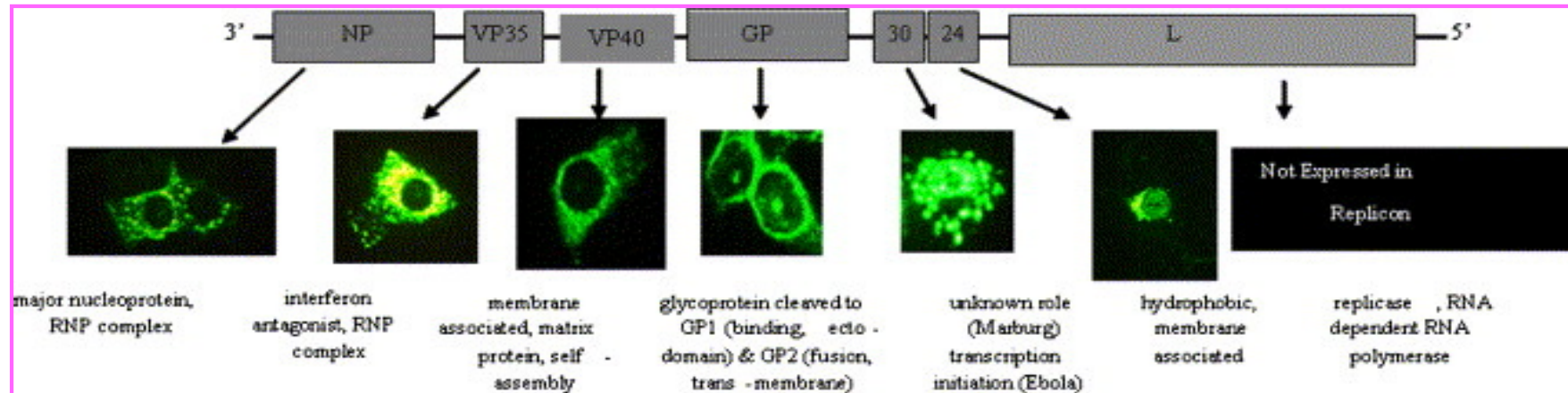
- ❖ Non può essere trascritto/copiato dagli enzimi dell'ospite
- ❖ Il pattern richiesto per la replicazione è all'interno di virione

RNA messaggero:

- ❖ complementare all'RNA virionico
- ❖ monocistronico
- ❖ codifica 7 proteine



# Le proteine virali



**Gene NP:** codifica per una proteina strutturale di 83.3 Kd

**Gene L:** codifica una RNA-polimerasi RNA dipendente che trascrive l' mRNA utilizzando come stampo l'RNA del virione.

**Gene GP:** codifica per una glicoproteina cruciale per l'entrata del virus, la citotossicità, la down-regolazione delle proteine di superficie dell'ospite; **implicata nel meccanismo di patogenesi di tutti i Filovirus. GP esiste sia in una forma di trans-membrana che in una forma secretoria.**

**Geni VP:**

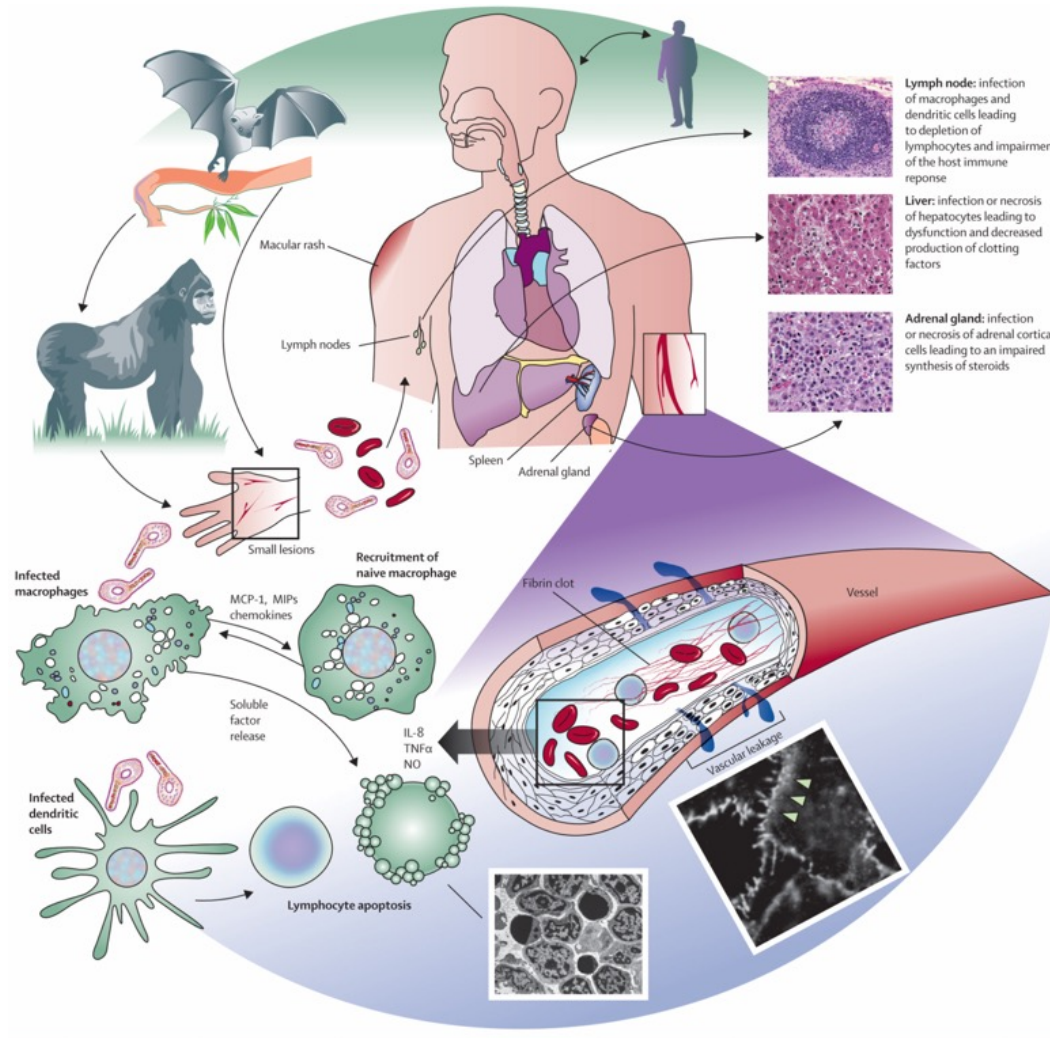
**VP40:** proteina di matrice per la sua carica positiva facilita la gemmazione

**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

# Ebola: patogenesi



➤ GP media l'entrata del virus nella cellula ospite e favorisce l'evasione alla risposta immunitaria.

➤ Il virus si diffonde attraverso il torrente circolatorio e si replica attivamente in:

- macrofagi/monociti
- cellule dendritiche
- cellule endoteliali
- organi  
fegato,  
reni,  
milza,  
ovaio, testicoli  
organi linfatici (necrosi cellulare)

➤ le lesioni principali sembrano essere a carico dell'endotelio vascolare.

**Sintomatologia:** comparsa di cefalea, malessere, mialgia, febbre elevata, diarrea, dolore addominale, disidratazione, e letargia.

**Altri segni:** dolore toracico da interessamento pleurico, tosse secca stizzosa e marcata faringite, eruzione maculopapulare.

Frequenti sono melena, sangue dal naso, dalle gengive e dalla vagina. Nelle donne gravide: aborto

Leucocitosi, neutrofilia, trombocitopenia e anemia emolitica

La morte si ha in genere nella seconda settimana della malattia ed è preceduta da gravi perdite ematiche e shock.





Ebola virus, as the other filovirus, is a virus of group risk 4

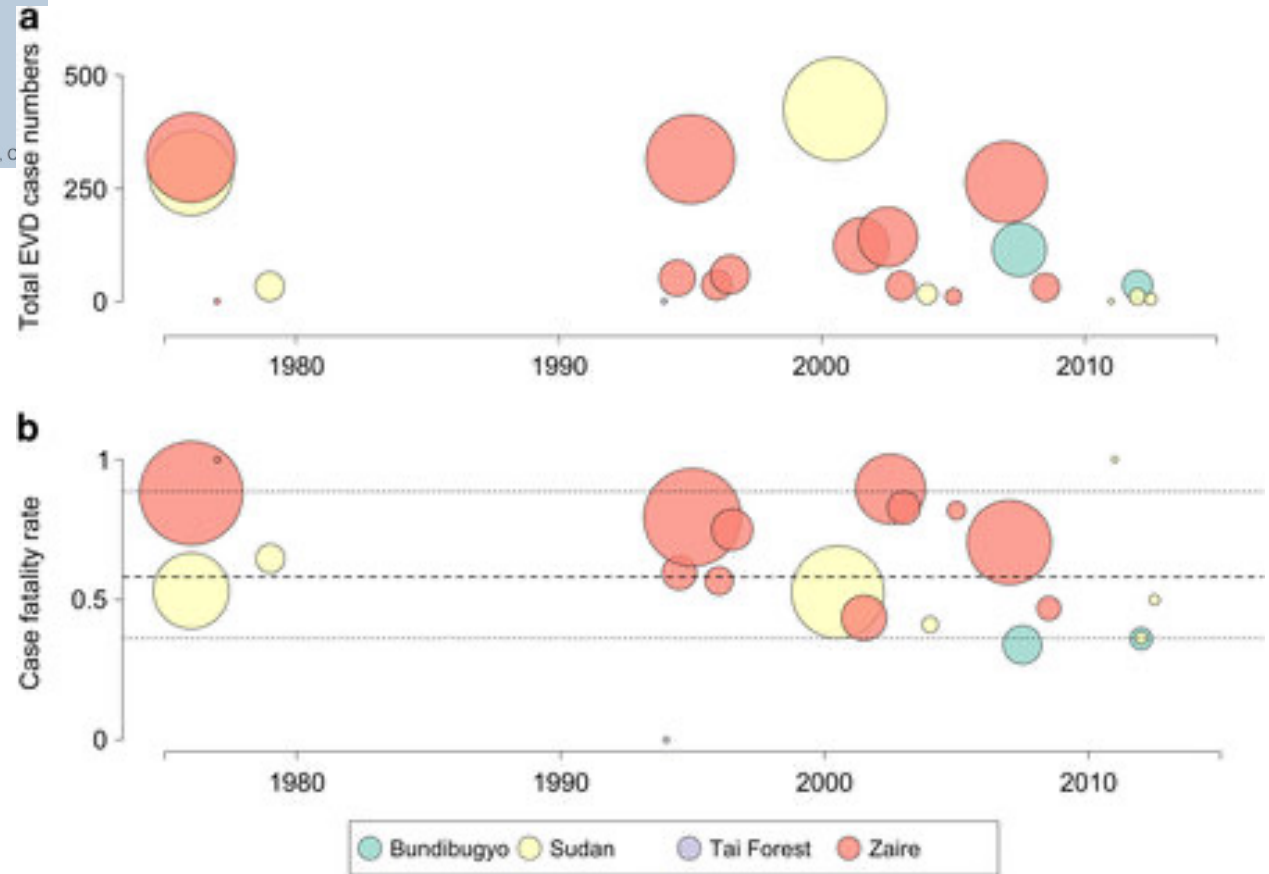
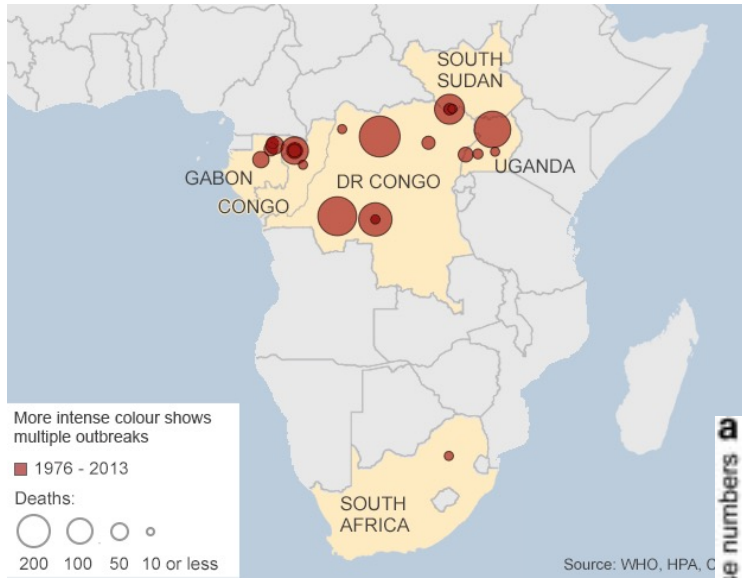
- Highly contagious
- High mortality
- Absence of a specific therapy
- Absence of vaccination

- The diagnosis for group risk 4 viruses is not comparable to analogous procedures used for other pathogens
- It involves structural and professional requirements and peculiar organizative aspects

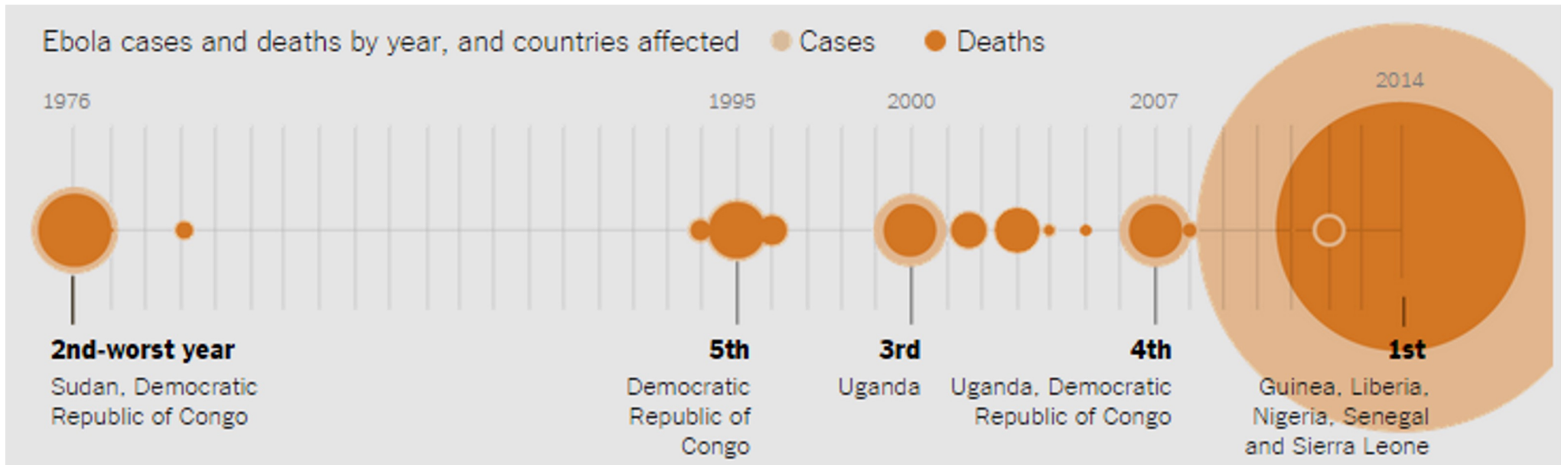


# Numbers of past Ebola outbreaks

- 22 outbreaks
- All in Central Africa, small villages
- 2,322 cases, 1,652 deaths



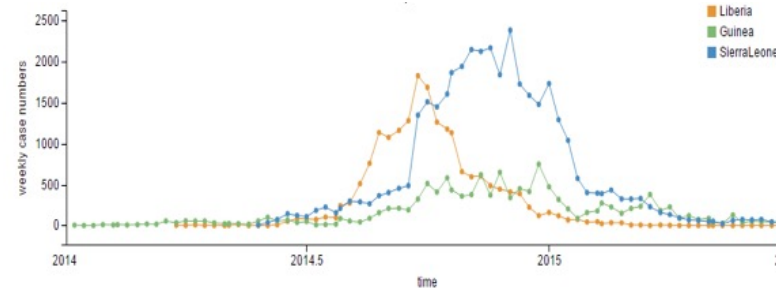
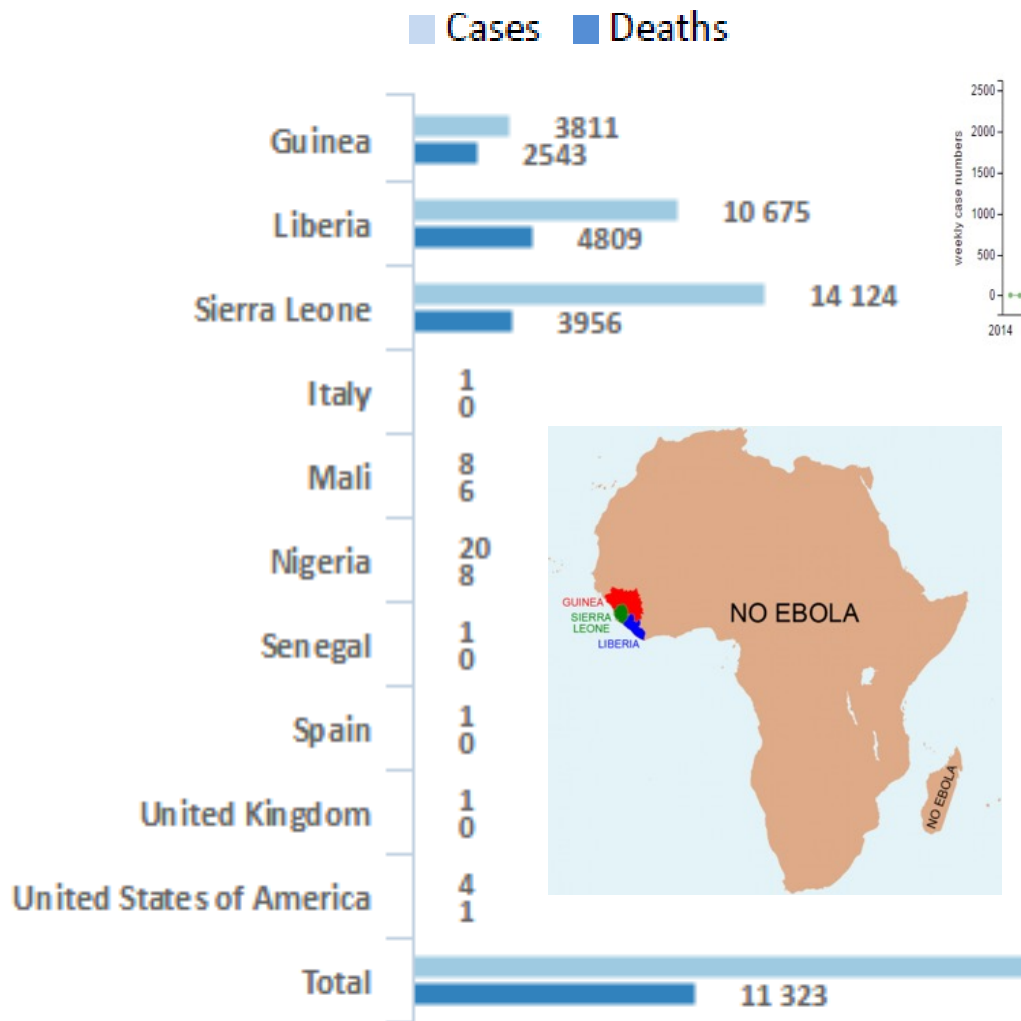
- The outbreak was announced by the WHO on March 23, 2014
- On August 8, 2014, WHO officially declared a public health emergency of international concern (PHEIC);
- Affected countries: Guinea, Liberia, Nigeria, Sierra Leone
- Compared to the previous outbreaks, the number of cases is unbelievably higher







27 March 2016



- 28 646 reported cases
- 11 323 reported deaths
- >881 cases (>513 deaths) among HCW
- Case fatality rate: 49-64%
- Most cases between August and December 2014

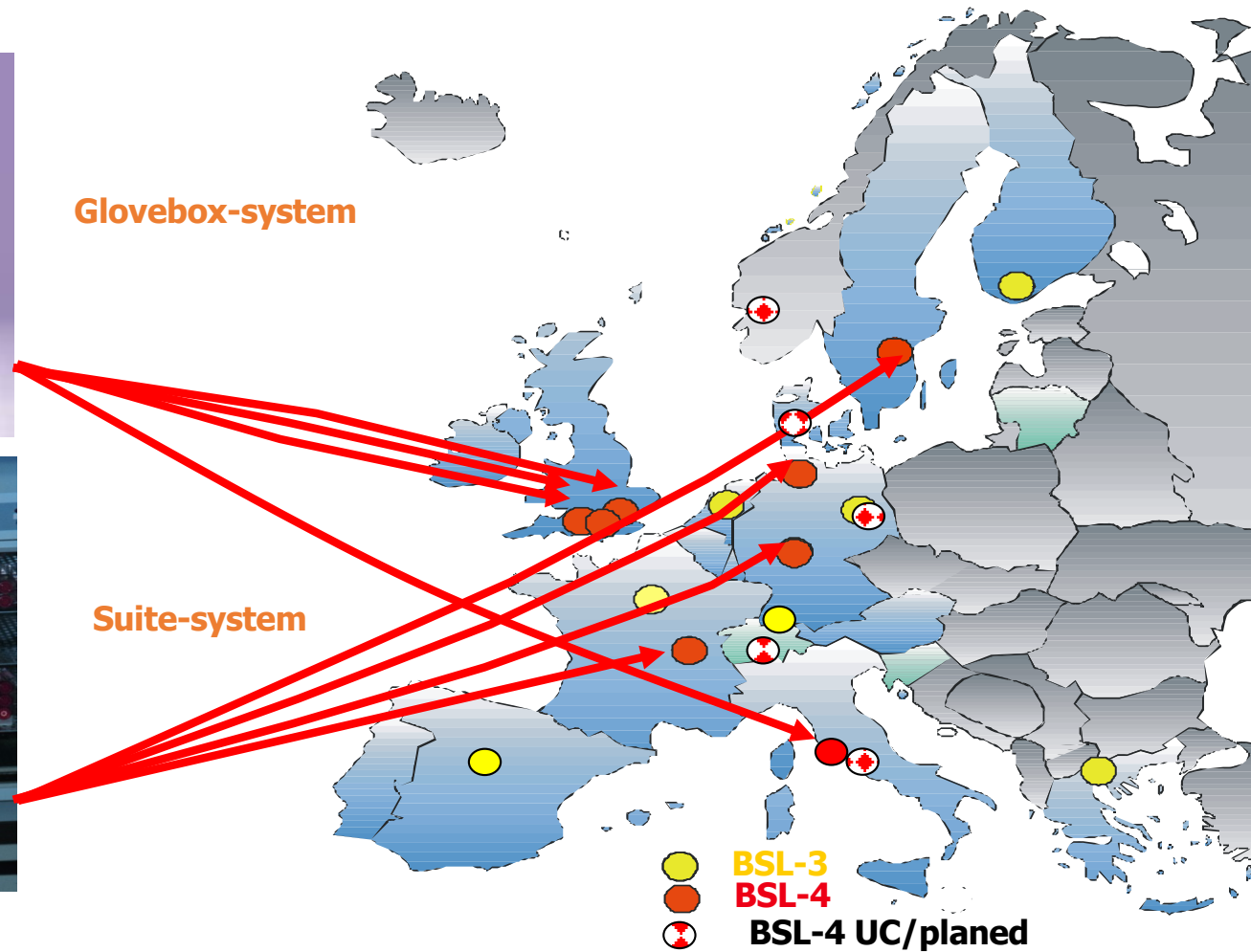
# BSL4 laboratories in Europe



Glovebox-system



Suite-system



- Outbreak announced by WHO on March 23, 2014
- Munich Airport. 26.03.14: First EMLab unit deployed to Guinea



4 EM Labs activated between March and December 2014 and deployed in Guinea, Nigeria, Liberia and Sierra Leone; all connected with ETC managed by MSF

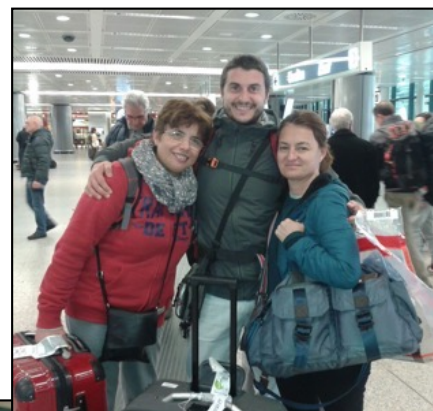
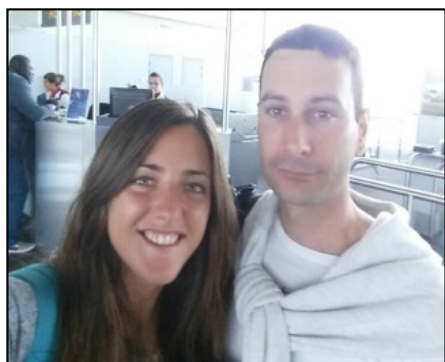




## INMI Laboratory in Goderich... at work

- 16 biologists and lab technicians from INMI deployed in the field laboratory from December 2014 – Jun 2015
- Missions of 5-weeks duration each, including a 1-week overlap between the teams (from 3 to 5 scientists for each team)
- ≈ 12 working hours daily

Before departure each team attended a 1-week training organised by INMI, in Rome. All the laboratory staff volunteers from INMI + 1 from Emergency





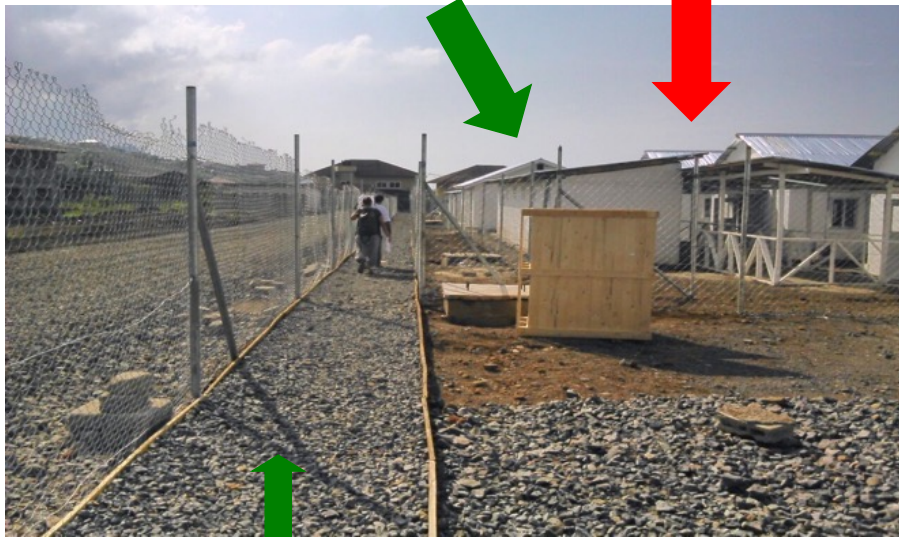
# Ebola Treatment Center - Goderich





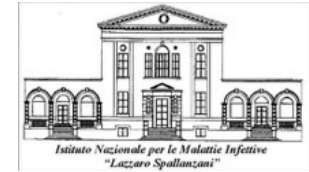
# INMI Laboratory in Goderich

INMI Lab





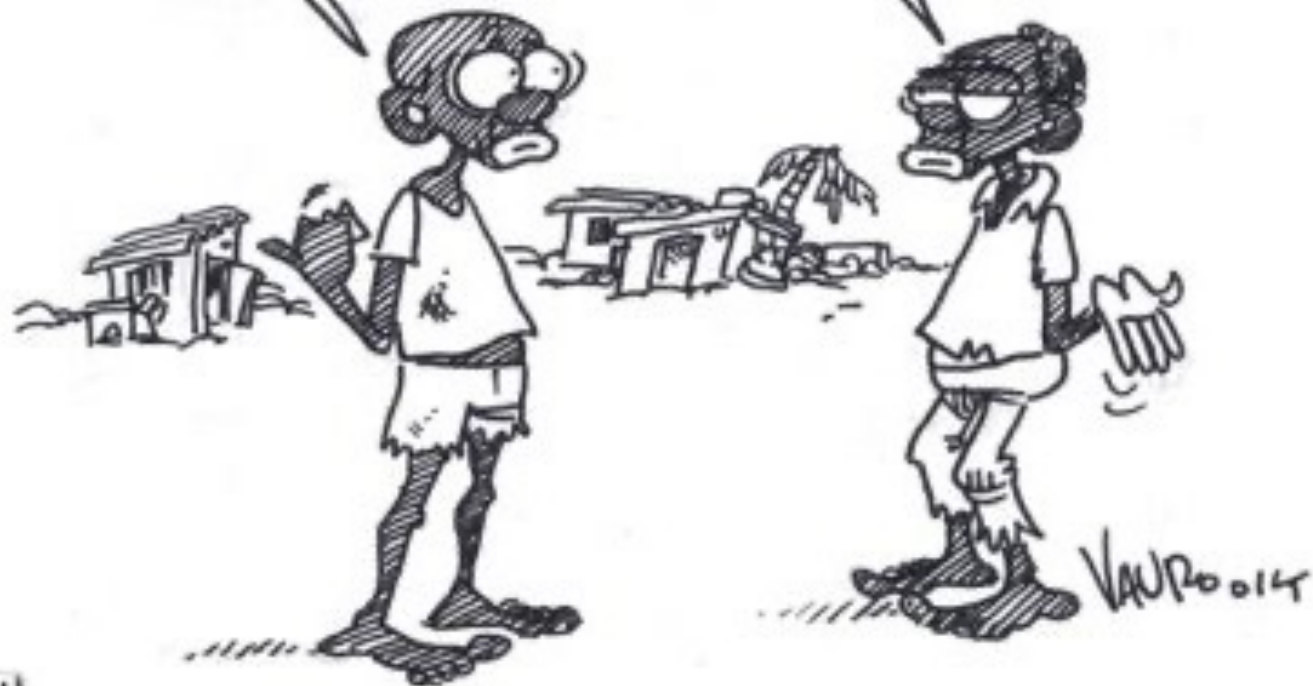
On 4 December 2014, INMI started a new lab, funded by Italian Development and Cooperation and located in the ETC managed by the NGO Emergency



# EBOLA

ANCHE ALCUNI  
OCCIDENTALI SI  
SONO PRESI  
IL VIRUS

E TI PAREVA CHE  
NON VENISSE A  
RUBARCI PURE QUELLO?!



# Italy: Patient Zero

Trasport with Italian Air Force aircraft KC 767

Arrival at Pratica di Mare, 24 Nov 2014



LA STAMPA CRONACHE

- Bossetti: "Prego ogni giorno per Yara"

- S Eternit, l'impegno di Renzi "Parte civile nel processo bis"

- S In un block notes i riti della 'ndrangheta

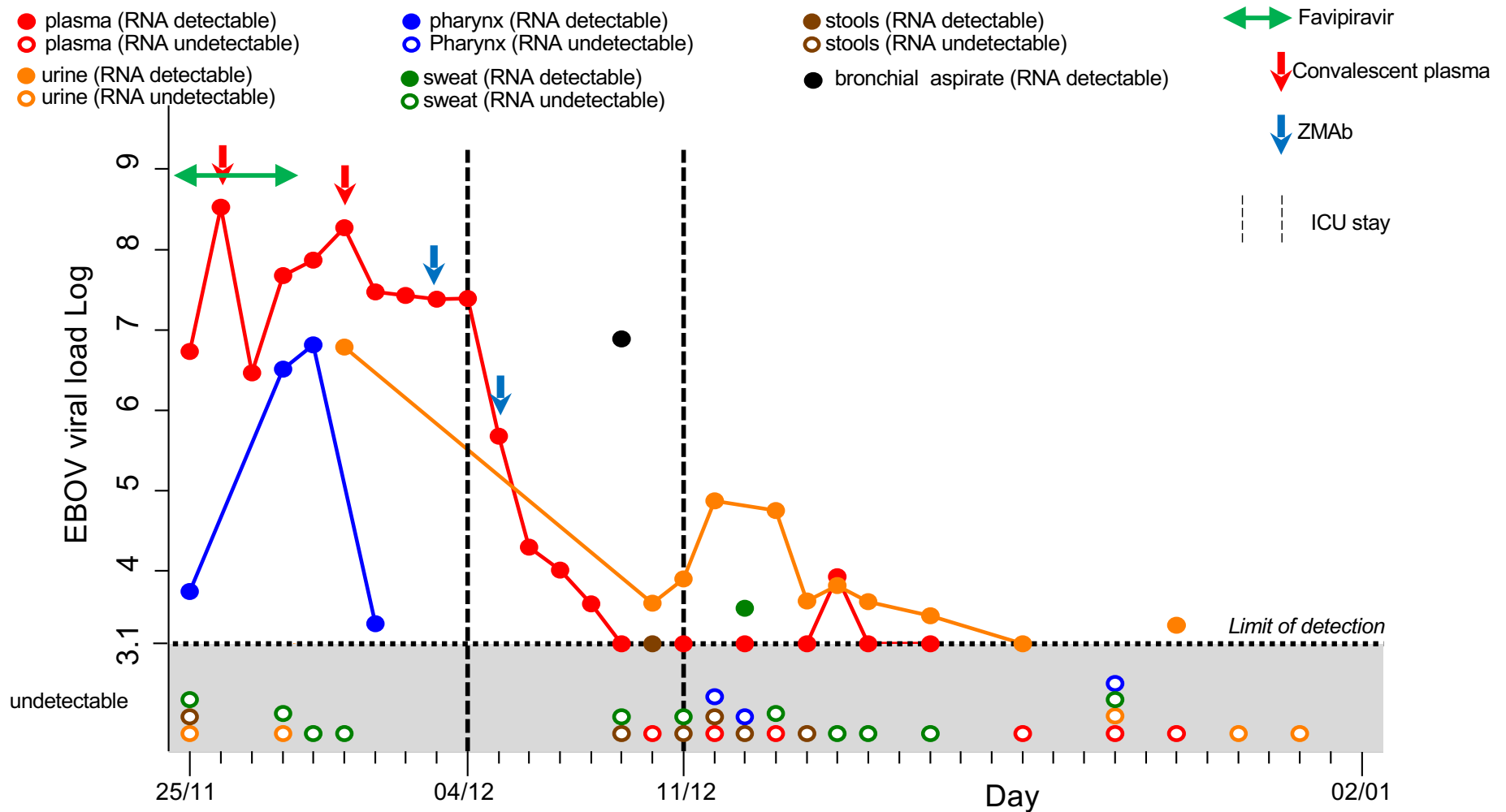
- S Non v partisse mai impegno

Ebola, l'arrivo allo Spallanzani del paziente italiano

(ANSA)



- Physician, 50 yrs old, Emergency
- First mission in Sierra Leone
- Not clear how he became infected
- Experimental treatment with drugs and convalescent plasma
- Discharged 2 Jan 2015



Petrosillo et al., BMC Infect Dis. 2015

In September 2014, while the Ebola outbreak was at its peak, the World Health Organization released a short list of drugs suitable for EVD research among which Favipiravir: an antiviral developed for the treatment of severe influenza

ZMAb: three mouse antibodies, 1H3, 2G4, and 4G7 with neutralizing activity

SALUTE

VERRÀ CURATO ALL'OSPEDALE SPALLANZANI

aA ✉ 🖨

# EBOLA, IN SARDEGNA IL SECONDO CASO ITALIANO: POSITIVO AL TEST UN INFERMIERE DI EMERGENCY

L'operatore, 37 anni, aveva lavorato nel Centro di cura dei malati di Ebola in Sierra Leone ed è arrivato in Sardegna l'8 maggio. Domenica sera ha manifestato i primi sintomi. Sarà trasferito a Roma. In corso controlli su alcune persone con cui è entrato in contatto. L'Azienda ospedaliera di Sassari: "Verifiche precauzionali"

f Condividi 61

Tweet 22

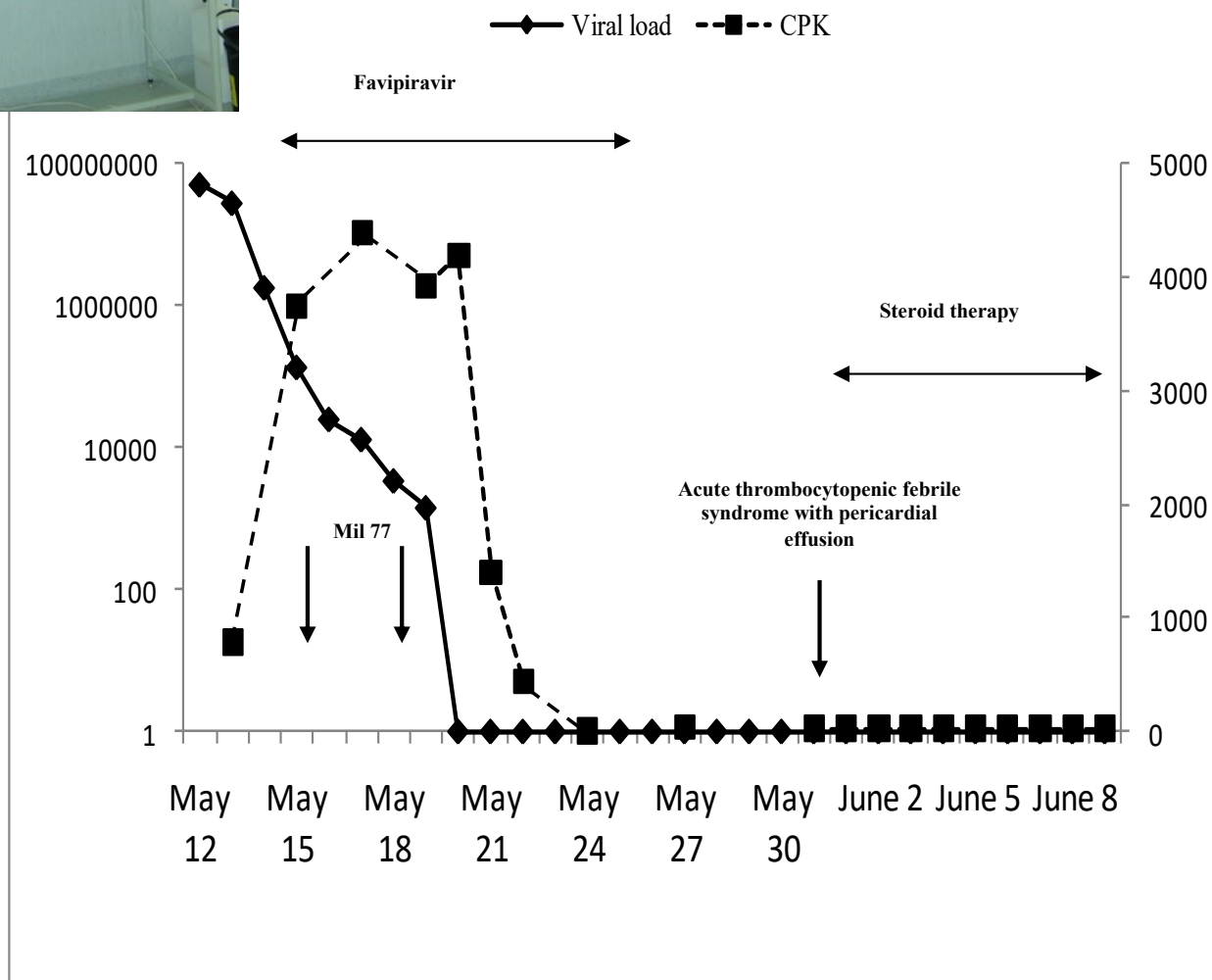
G+ 0



Sassari

12 maggio 2015

Un infermiere 37enne di Emergency originario della Sardegna, che ha prestato servizio in Sierra Leone, è risultato positivo al test per il virus Ebola eseguito nel pomeriggio all'ospedale "Lazzaro Spallanzani" di Roma su un suo campione di sangue. Si tratta del secondo caso italiano dopo quello, nel novembre scorso,





10 GIUGNO 2015 15:58

## Ebola, dimesso l'infermiere sardo: "Pensavo di morire, grazie allo Spallanzani"

Conferenza stampa all'ospedale per Stefano Marongiu: "Non ero un paziente ma un amico da salvare ad ogni costo"



## Ebola situation reports: Democratic Republic of the Congo

On 1 August 2018, the Ministry of Health of the Democratic Republic of the Congo declared a new outbreak of Ebola virus disease in North Kivu Province. The Ministry of Health, WHO and partners are responding to this event, and working to establish the full extent of this outbreak. Numbers may fluctuate on a daily basis due to many factors, including continuing monitoring, investigation and reclassification of cases. Alert and suspected cases (not reported here), are systematically investigated to confirm or exclude Ebola virus disease before inclusion in the case counts or discarded as non-cases.

Latest numbers as of 15 April 2019

**Total cases: 1273**

- Confirmed cases: 1207

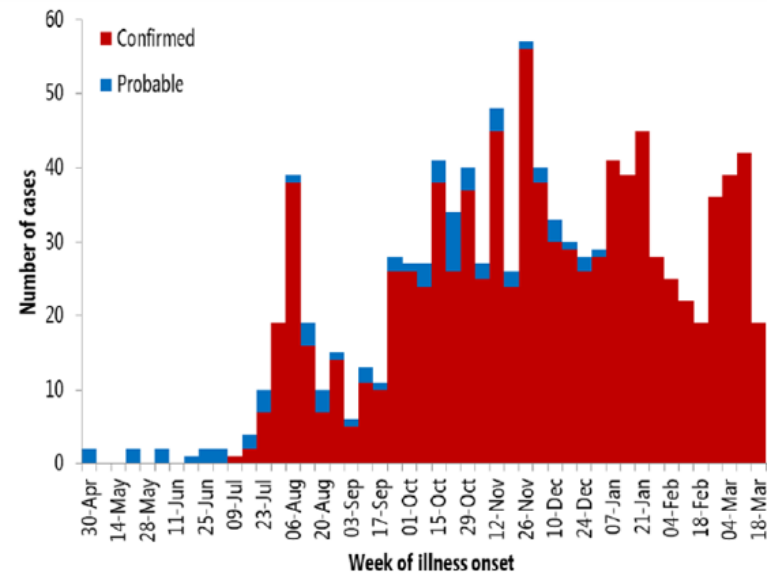
- Probable cases: 66

**Deaths: 821**

- Confirmed: 755

- Probable: 66

Figura 1: Casi confermati e probabili di malattia da virus Ebola per settimana d'insorgenza dei sintomi, dati al 26 marzo 2019\*







# Autorizzato in Europa il primo vaccino contro Ebola



## Preparazioni del vaccino contro Ebola

rVSV-ZEBOV è un vaccino virale ricombinante vivo attenuato. Esso fornisce una protezione contro la specie *Zaire ebolavirus* e non protegge contro altre specie di virus Ebola o Marburg.

Ad26.ZEBOV/MVA-BN-Filo è una combinazione di due vettori vaccinali che sono geneticamente modificati in modo che non possano replicarsi nelle cellule umane. Questi vaccini vettori portano il codice genetico di diverse proteine del virus Ebola per innescare una risposta immunitaria:

- Ad26.ZEBOV è un vaccino a DNA ricombinante basato sull'adenovirus tipo 26 (Ad26).
- MVA-BN-Filo è un vaccino a DNA ricombinante basato sulla vaccinia modificata Ankara (MVA).

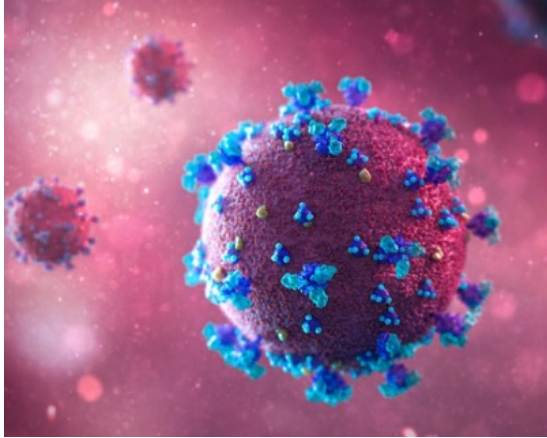
## Indicazioni per il vaccino contro Ebola

rVSV-ZEBOV è indicato per la prevenzione della malattia da virus Ebola causata dalla specie *Zaire ebolavirus* in persone di età pari o superiore a 18 anni. L'ACIP raccomanda la vaccinazione pre-esposizione con rVSV-ZEBOV per gli adulti di età pari o superiore a 18 anni negli Stati Uniti che sono ad alto rischio di esposizione professionale all'Ebola perché stanno svolgendo le seguenti attività:

- Rispondere a un focolaio della malattia da virus Ebola
- Lavorare come personale sanitario presso centri di trattamento dell'Ebola designati a livello Federale negli Stati Uniti
- Lavorare come personale di laboratorio o come altro personale presso strutture di livello 4 di sicurezza biologica negli Stati Uniti
- Lavorano come personale di laboratorio o come membri del personale di supporto presso le strutture del Laboratory Response Network

Ad26.ZEBOV/MVA-BN-Filo è indicato per la prevenzione della malattia da virus Ebola causata dalla specie *Zaire ebolavirus* in persone di età pari o superiore a 1 anno.

## I CORONAVIRUS umani (hCoV)



- Famiglia: Coronaviridae
- Sottofamiglia: Orthocoronavirinae
- 4 generi: AlphaCoV, BetaCoV, GammaCoV, DeltaCoV
  
- **7 tipi di hCoV:**

1. HCoV-229E (AlphaCoronavirus)
2. HCoV-NL63 (AlphaCoronavirus)
3. HCoV-OC43 (BetaCoronavirus)
4. HCoV-HKU1 (BetaCoronavirus)

spesso associati a **lievi infezioni** del tratto respiratorio superiore, quali raffreddore e sintomi simil-influenzali

5. **SARS-CoV (BetaCoronavirus)**
6. **MERS-CoV (BetaCoronavirus)**
7. **SARS-CoV-2 (BetaCoronavirus)**

responsabili di epidemie e pandemie con **sintomi respiratori gravi e ad elevato tasso di mortalità:**

**SARS** (Severe Acute Respiratory Syndrome) <sup>2003</sup>

**MERS** (Middle East Respiratory Syndrome) <sup>2012</sup>

**COVID-19** (Coronavirus Disease -2019) <sup>2020-2021</sup>

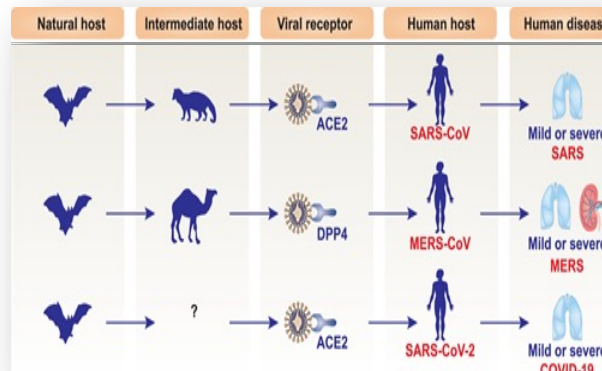
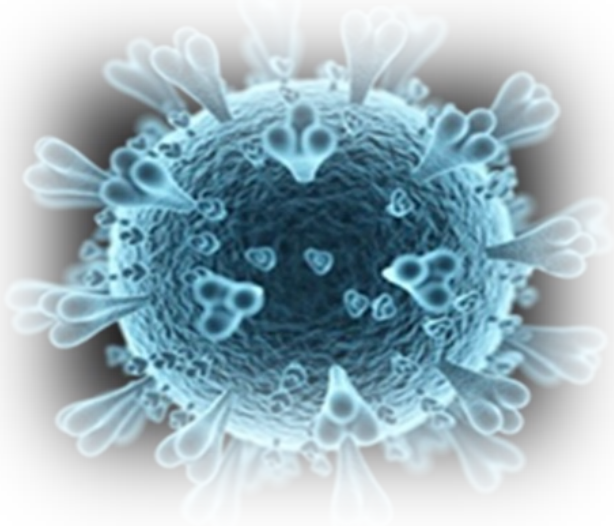


## SARS-CoV-2:

# IL VIRUS, LA SUE VARIANTI



- I coronavirus causano infezioni in vari animali, tra cui **uccelli e mammiferi** (come cammelli, gatti, pipistrelli).
- I Coronavirus sono virus ad RNA, pronti ad evolvere e a compiere il **salto di specie (*spillover*)**, cioè acquisire la capacità di passare direttamente dall'animale all'uomo infettandolo (***zoonosi***).
- I coronavirus umani già noti hanno come **ospiti intermedi**: i dromedari per MERS-CoV, forse lo zibetto per SARS-CoV.  
Per SARS-CoV-2 la fonte animale intermedia **non è stata ancora identificata**; forse il **pangolino**.



**Pangolino**

Mammiferi Foliodoti, con corpo ricoperto di larghe scaglie cornee, arti plantigradi, massicci, e lunga coda.

P. gigante (*Manis gigantea*), vive nell'Africa centro-occidentale;

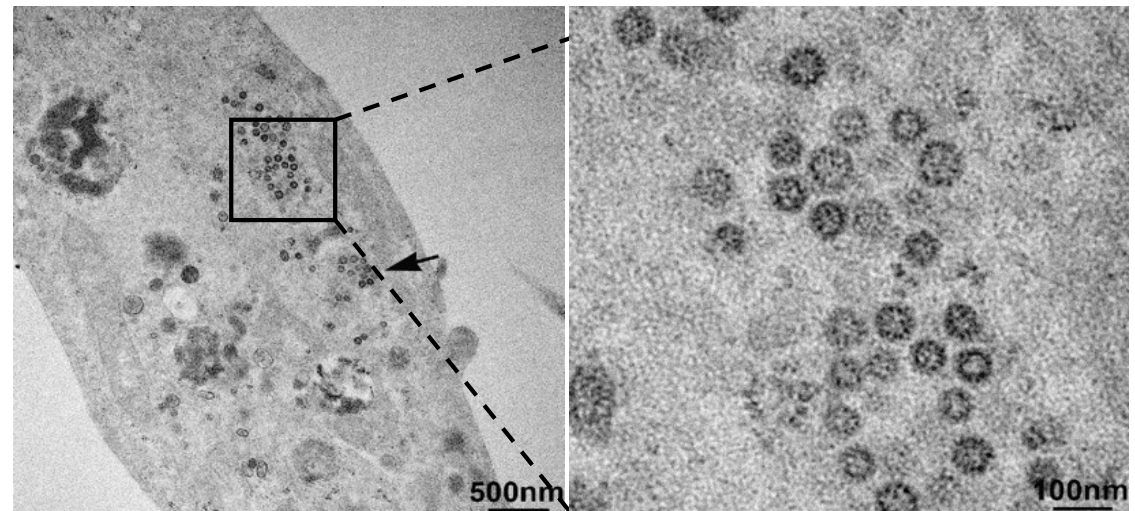
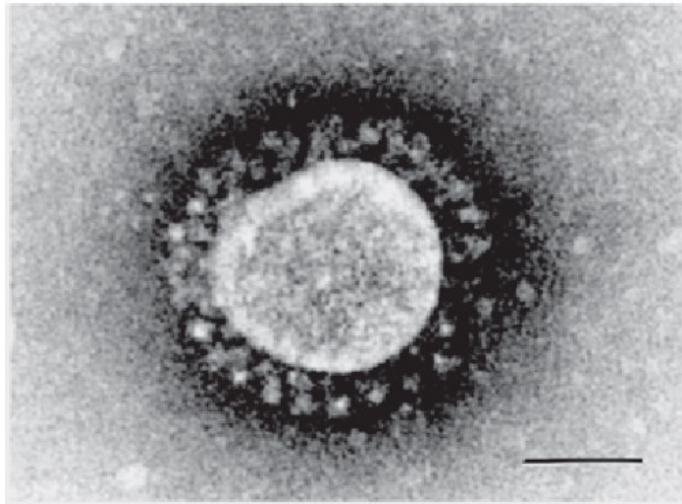
P. cinese (*Manis pentadactyla*), diffuso in Cina;

P. malese (*Manis javanica*), vivente nelle foreste malesi

Nel **Pangolino** sono presenti **coronavirus** con omologia di sequenza nucleotidica con SARS-CoV-2 compresa tra **85.5% e 92.4%\***

\*Dalle analisi genetiche e confronto con le sequenze genomiche di altri coronavirus isolati da diverse specie animali, è emerso che **SARS-CoV-2 è geneticamente molto simile (96%) ad un coronavirus presente nei pipistrelli *Rhinolophus affinis***, abbondanti e ampiamente presenti nella Cina meridionale, in tutta l'Asia, il Medio Oriente, l'Africa e l'Europa, zone dove vive anche il pangolino, dal quale si sarebbe separato nel 1969.

## SARS-CoV-2 al ME

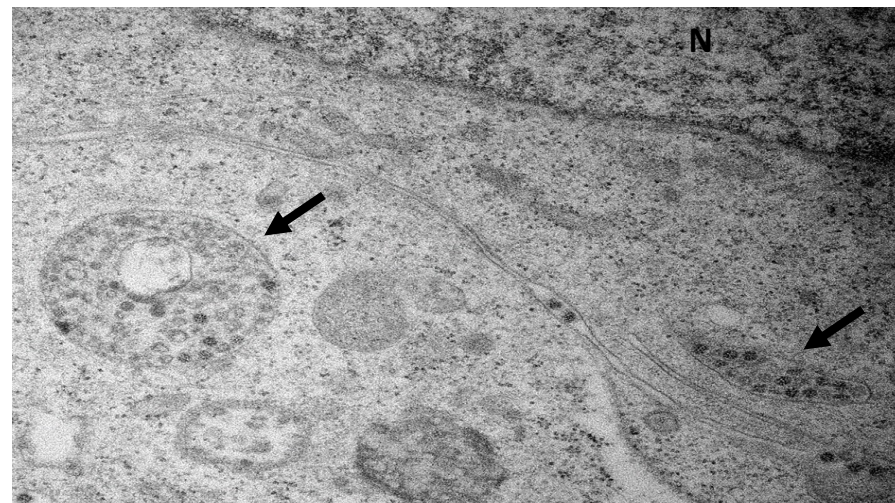


**Forma:** sferica

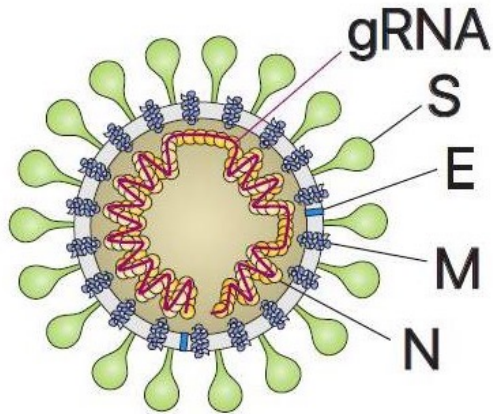
**Diametro:** 60-140nm

**Envelope:** rivestimento costituito da un doppio strato lipidico su cui sono inserite le glicoproteine S (spikes) che formano una «corona» sulla superficie del virione, le proteine M ed E

**Nucleocapside:** elicoidale, proteina N



## II GENOMA e le PROTEINE VIRALI



|                     | 5UTR  | orf1ab Gene        | S Gene               | ORF3a Gene    | E Gene           | M Gene                | ORF6a Gene   | ORF7a Gene    | ORF7b Gene    | ORF8 Gene    | N Gene                      | ORF10 Gene    | 3UTR                         |
|---------------------|-------|--------------------|----------------------|---------------|------------------|-----------------------|--------------|---------------|---------------|--------------|-----------------------------|---------------|------------------------------|
| Non Coding Sequence | 265nt | 21290nt            | 3822 nt              | 828nt         | 228nt            | 869nt                 | 186nt        | 386nt         | 132nt         | 183nt        | 908nt                       | 117nt         | Non Coding Sequence<br>229nt |
|                     |       | orf1ab Polyprotein | Surface Glycoprotein | ORF3a Protein | Envelope protein | Membrane Glycoprotein | ORF6 Protein | ORF7a Protein | ORF7b Protein | ORF8 Protein | Nucleocapsid Phosphoprotein | ORF10 Protein |                              |

Il genoma: RNA a filamento singolo, a polarit  positiva, lungo circa 30 Kb, incappucciato e poliadenilato.

Almeno 29 open reading frames (ORFs)

R.A. Khailany, et al.; Gene Reports 19 (2020)

### Proteine non-strutturali:

Codificate da **ORF1ab (replicasi)**: 67% del genoma virale

Numero: 16 nsp

Multifunzionali, processamento e replicazione virale

Proteine: **RdRp**; **proteasi (PLP, 3CLC)**, **elicasi**, **esonucleasi**, **endonucleasi**

### Proteine accessorie:

Codificate da **ORF3 (3a, 3b)**, **ORF6 (6)**, **ORF7a (7a)**, **ORF7b (7b)**, **ORF8 (8)** e **ORF10 (9b, 9c, e 10)**.

### Proteine strutturali:

Sintesi ed assemblaggio componenti virali, incapsidamento dell'RNA, formazione dell'envelope, gemmazione e rilascio di nuove copie di virus

Numero:4

Proteina **S**: aggancio e ingresso del virus nella cellula ospite; formazione dei sincizi.

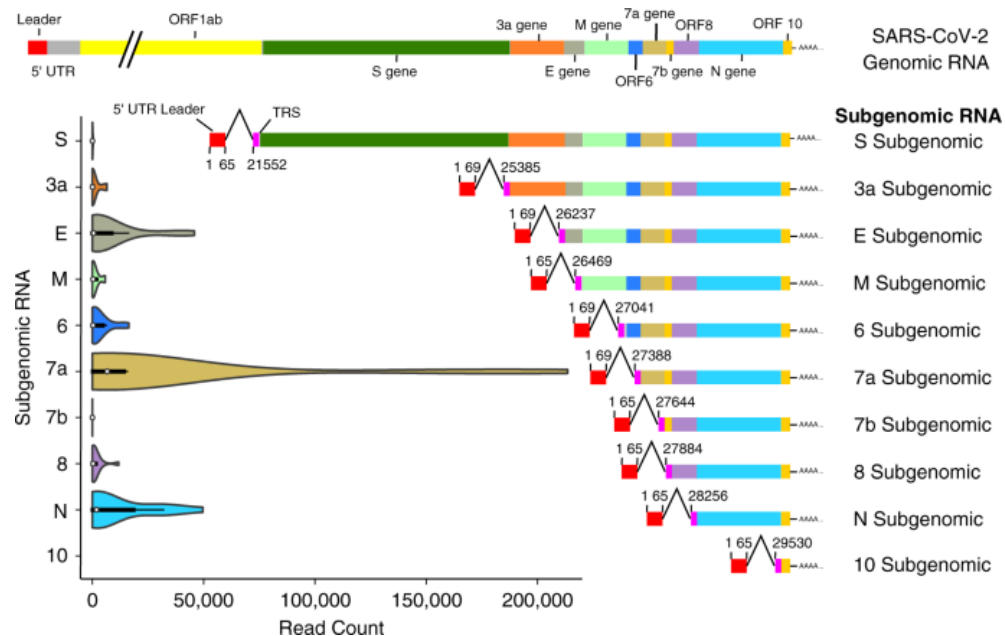
Proteina **M**: trasporto nutrienti; interagisce con l'RNA virale durante il processo di replicazione;

Proteina **E**: componente dell'envelope; coopera con la glicoproteina S nell'attacco alla cellula bersaglio

Proteina **N**: forma un complesso ribonucleocapsidico elicoidale con l'RNA genomico virale per aumentarne la stabilit ; interagisce con le proteine di membrana del virus durante l'assemblaggio della particella virale.

## La REPLICAZIONE VIRALE

- Dopo l'ingresso nella cellula, l'**RNA virale (gRNA) viene immediatamente tradotto** – dai ribosomi e da proteine specifiche della cellula ospite – **in una poliproteina gigante (pp1ab)**, codificata dal gene Replicasi (ORF1ab).
- Pp1ab è tagliato in 16 proteine non-strutturali (**nps**), tra cui la nsp12, RNA polimerasi RNA dipendente (**RdRp**), che provvedono alla **trascrizione e replicazione dell'RNA genomico (gRNA)** e alla **trascrizione dei differenti RNA messaggeri (mRNA) sub-genomici virali (sgRNA)** a partire dai geni che si trovano a valle della replicasi (ORF1ab) e che codificano per le proteine accessorie e strutturali.
- L'RNA genomico viene trascritto a partire da un **filamento intermedio a polarità negativa**, copia del genoma virale.
- Gli RNA subgenomici vengono trascritti a partire da **filamenti a polarità negativa**, che fanno da stampo.



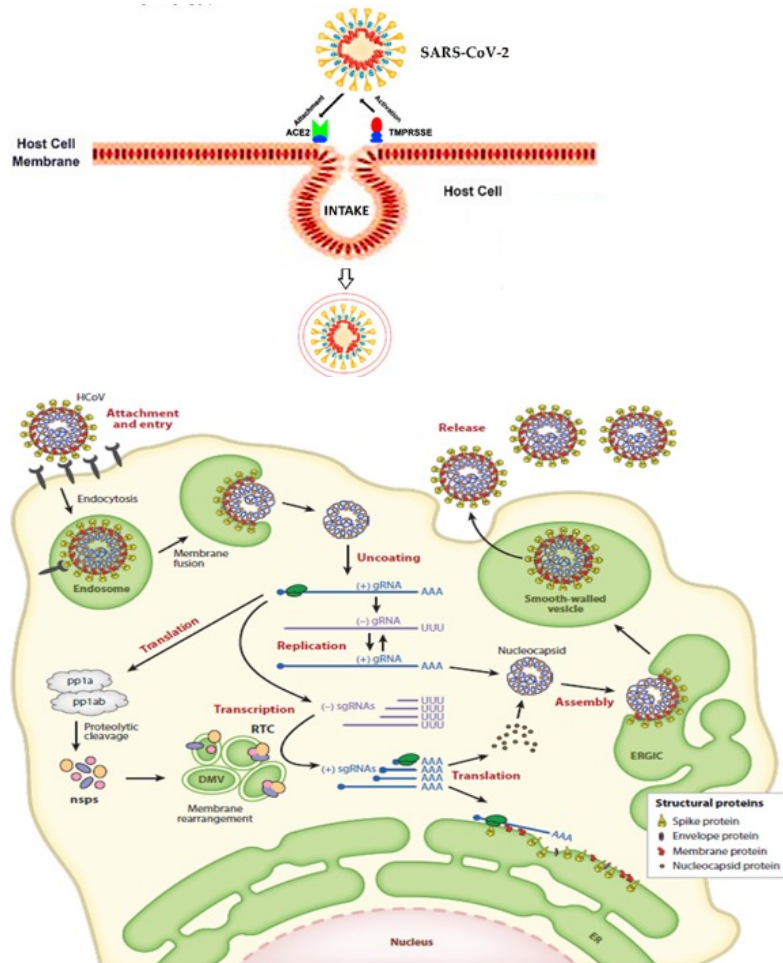
La replicazione dell'**RNA genomico (gRNA)** è un processo **continuo**.

Il nuovo RNA genomico (+) viene prodotto tramite la sintesi di un filamento intermedio "negativo", che serve da stampo per il nuovo gRNA positivo. Questo processo coinvolge principalmente la nsp12, con attività RNA polimerasi dipendente dall'RNA (RdRp), e che sintetizza il primo filamento negativo legandosi all'estremità 3' del gRNA.

La sintesi degli **RNA subgenomici (sgRNA)** è invece un processo **discontinuo**.

Attenzione nella diagnosi molecolare!!! se si usano PCR che hanno come target geni trascritti in modo più abbondante (es: N), la presenza di quel gene target non necessariamente riflette la presenza di RNA genomico

## L'infezione e la maturazione



### Infezione

- Inizia attraverso l'interazione fra il recettore cellulare ACE-2 e la proteina trimerica Spike (S), che dev essere tagliata nelle due subunità S1 e S2 (priming) per iniziare la fusione tra l'envelope e la membrana cellulare e favorire l'ingresso del virus.
- La proteina Spike viene attivata dalla Serine Protease TMPRSS2 cellulare.

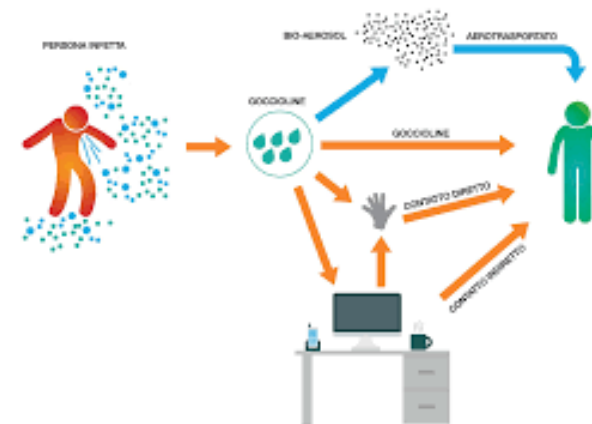
### Maturazione: nel citoplasma.

Le particelle virali maturano mediante gemmazione nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi, all'interno di vescicole delimitate da membrana che vengono veicolate fino alla superficie cellulare, da dove verranno emesse tramite esocitosi.



## VIE di TRASMISSIONE

1. **Per via aerea, attraverso droplet** (aerosol di secrezioni provenienti dalle vie aeree generati attraverso tosse/starnuti) **derivate da persone con infezione in atto**
2. **Per contatto diretto o ravvicinato con persone infette** (per es. attraverso la stretta di mano e toccando le mucose di bocca, naso, occhi con mani contaminate)
3. **Per contatto diretto con superfici contaminate** (per es. in ambienti in cui si trova un caso confermato di SARS-CoV-2)
4. Per via oro-fecale (più raro)



Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang XL, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9 (1):386–9. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1729071> PMID: 32065057; PubMed Central PMCID: PMC7048229.

van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.* 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2004973> PMID: 32182409.

Colavita F., Lapa D., Carletti F., et al., SARS-CoV-2 Isolation From Ocular Secretions of a Patient With COVID-19 in Italy With Prolonged Viral RNA Detection. *Ann Intern Med.* 2020; [Epub ahead of print 17 April 2020]. <https://doi.org/10.7326/M20-1176>

Xiao F, Sun J, Xu Y, Li F, Huang X, Li H, et al. Infectious SARS-CoV-2 in feces of patient with severe COVID-19. *Emerg Infect Dis.* 2020 Aug [date cited]. <https://doi.org/10.3201/eid2608.200681>

## La comparsa di SARS-CoV-2: breve cronologia della fase iniziale della pandemia



- **31 dicembre 2019**: le autorità cinesi segnalano all'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) un cluster di 27 casi di polmonite di origine sconosciuta nella città di Wuhan (Cina centro-meridionale).
- Il **7 gennaio 2020** viene isolato l'agente patogeno; 3 giorni dopo viene resa nota la sequenza: si tratta di un nuovo Betacoronavirus, temporaneamente denominato dal WHO **2019-nCoV**.
- Il **12 febbraio 2020** la Commissione internazionale per la tassonomia dei virus (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) assegna al nuovo virus il nome definitivo: **SARS-CoV-2** per la forte somiglianza con il virus della SARS (SARS-CoV).
- nello stesso giorno, l'OMS denomina la malattia causata dal nuovo virus con il nome **COVID-19**, acronimo di COronaVirus Disease 2019.

- **L'11 marzo 2020** l'OMS dichiara ufficialmente lo stato di **PANDEMIA** in quanto nella nuova epidemia da SARS-CoV-2, ormai diffusa in tutto il mondo, sussistono le 3 caratteristiche che la definiscono:

1. causata da un nuovo organismo, altamente virulento
2. assenza di immunizzazione specifica nella popolazione
3. possibilità di trasmissione diretta da uomo a uomo

>> **PANDEMIA**



### IN ITALIA

- Il **21 febbraio 2020** viene segnalato il primo caso italiano in Lombardia.
- Il **3 marzo 2020** tutte le regioni italiane presentano almeno un caso di infezione da SARS-CoV-2.

# Timeline



La coppia, atterrata il 23, era stata anche a Milano. Falso allarme su una nave da crociera a Civitavecchia. Per l'Oms è emergenza sanitaria globale

## Virus, primi due casi accertati in Italia

I turisti cinesi ricoverati a Roma, camera d'albergo sigillata. L'annuncio di Conte, bloccati i voli da e per la Cina

### LA MISURA DELLA PAURA

di Sergio Marai

È facile prevedere che la nuova infezione da coronavirus sarebbe arrivata anche nel nostro Paese, è impossibile controllare la diffusione di una malattia infettiva trasmissibile nell'era della globalizzazione. Dai dati di queste settimane sappiamo però che questo nuovo virus ha una contagiosità limitata, che solo una percentuale ridotta dei pazienti che lo contraggono ne sviluppano forme severe di malattia e che la mortalità, rispetto alla Sars e alla Mers, andrebbe calcolata da coronavirus, è bassa.

I primi due casi registrati nel nostro Paese potrebbero rappresentare casi epidemici e clinocritici, così come potrebbero verificarsi nei prossimi giorni altri casi, tuttavia non ci si attende una diffusione come quella avvenuta in breve tempo in Cina. Tutte le misure preventive sono state messe in atto tempestivamente e le attività di sorveglianza sanitaria nel nostro Paese sono già in essere e in stato di allerta. La rete dei reparti di malattie infettive è pronta a accogliere eventuali nuovi malati, così come sono stati identificati i laboratori diagnostici di riferimento per l'isolamento del coronavirus.

continua a pagina 3



Un turista cinese soccorso da un'ambulanza in un albergo in via Cassar. Nel centro di Roma

**CHI HONO I CONTAGIATI**  
I coniugi arrivati da Wuhan, è stata lei a chiamare i medici

di **Rinaldo Filgini** *aspirante*

**IRROGANDE E DISPOSTE**  
Maschere, contatti Cosa cambia adesso e come difendersi

di **Margherita de Biasi** *aspirante*

Mentre l'organizzazione mondiale della sanità dichiara l'emergenza globale per il coronavirus, l'Italia scopre i primi due contagiati. Si tratta di una coppia di turisti cinesi sbarcati a Napoli il 23 gennaio, rimasti in città per due giorni e poi arrivati a Roma, all'albergo Palatino, dove mercoledì sono stati ricoverati e messi in quarantena allo Spallanzani. A rivelarlo, ieri sera, il premier Conte. La loro camera d'albergo è stata sigillata, che si eviti di ricreare i loro spostamenti. Ricercati i voli da e per la Cina. Per un caso sospetto di contagio, a Civitavecchia ordinata per la nave da crociera Costa Concordia. Scattati i passeggeri in cinesse a bordo. Ma alla fine era solo un allarme.

di pagina 2 a pagina 6

**BRXIT L'addio a mezzanotte**  
Londra lascia l'Unione Europea  
Johnson: «Sarà un'alba nuova»

Una storia che rimane ancora aperta

**Giuseppe Severgnini**  
Mancano poche ore all'uscita del Regno Unito dall'Unione Europea, dove è entrato il 1° gennaio oggi. È uno strano effetto, in questo momento in cui le emozioni vanno man mano da parte, e bisogna provare a ragionare. Tutti gli europei del continente e gli europei dell'isola. Anzi, delle isole: perché l'Irlanda, in questa vicenda, ha una parte non piccola.

continua a pagina 24



**GIANNELLI**  
L'altro malato di M...  
A mezzanotte la Gran Bretagna lascia l'Ue. Boris Johnson padre di Paese sceglie un'altra nave. Cosa cambia da domani.

di pagina 9 a pagina 11

**Ucciso l'uomo che difendeva le farfalle**  
Come era responsabile di un'area protetta in Messico. La pista del clan del legname

**Guido Olimpio**  
In Messico chi difende la legalità è un bersaglio. Per bastardi, agiti, corrotti e grandi poteri diventa un ostacolo. Potrebbe esserci questo dietro la misteriosa fine di Federico Gomez, 50 anni, agronomo che si era dedicato alla protezione dell'ambiente e in particolare delle bellissime farfalle monarca. Il suo corpo è stato ritrovato, dopo lunghe ricerche, in un pozzo a El Soldado, Nido di Michoacan.

a pagina 17



**MAZARA DEL VALLO**  
Picchiata a morte dal marito  
Voleva andare via

di **Salvo Testano**  
L'inchiesta per giorni, fino alla morte. Fermato il marito che aveva lasciato: aveva già una denuncia per maltrattamenti.

a pagina 18

Coronavirus: primi due casi positivi in Italia a Roma  
31/01/2020



**Stanze singole, pc e cucina**  
Le regole della quarantena

di **Fabrizio Cascia**

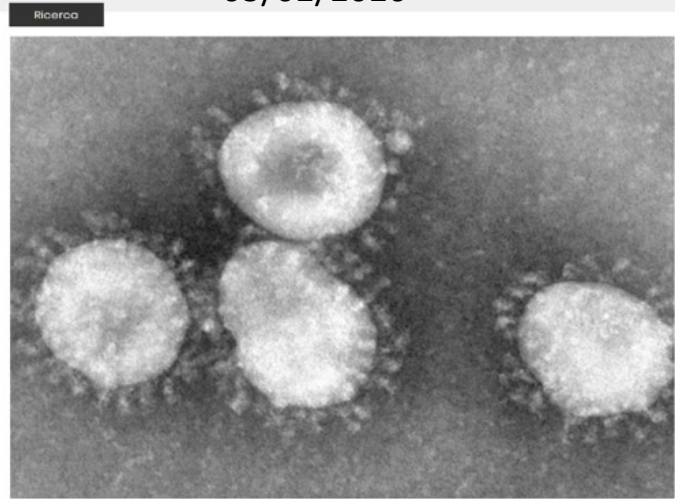
Le stanze singole con cucina, il computer e la tv. Tre elementi inediti al giorno. Ecco cosa dovranno possedere gli italiani di ritorno dalla Cina, in cinesse a bordo. Ma alla fine era solo un allarme.

di pagina 2 a pagina 6

## Coronavirus isolato allo Spallanzani: cosa vuol dire e perché è importante

03 febbraio 2020

03/02/2020

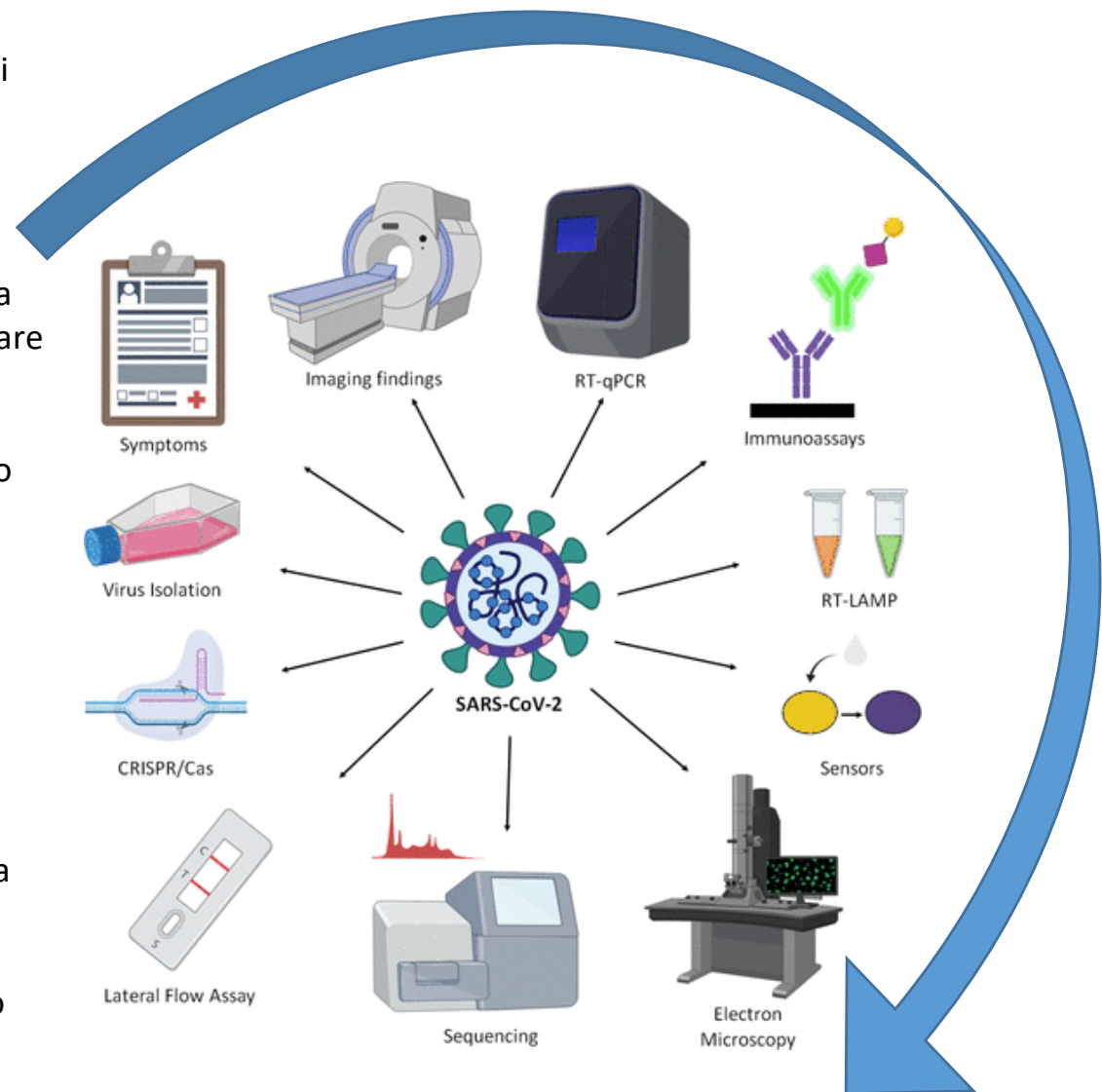


**Ricoverati allo Spallanzani di Roma, si ricostruiscono i loro spostamenti**

“Lo Spallanzani è la Bibbia in questo settore. Non c'è nessun motivo di creare panico e allarme sociale”. Sono in corso “attente verifiche per ricostruire il percorso” dei due turisti cinesi, primi casi accertati di Coronavirus in Italia, “per isolare i loro passaggi, per evitare assolutamente qualsiasi rischio ulteriore rispetto a quello già accertato”, ha affermato ancora il presidente Conte in conferenza stampa a Palazzo Chigi con il ministro della Salute Roberto Speranza.

“L’insorgenza di casi di Coronavirus in Italia è “un fatto abbastanza normale se pensiamo alla statistica, visto che in Europa ci sono 10 casi. Lo dice il ministro della Salute Roberto Speranza, in conferenza stampa a Palazzo Chigi, ci sono già dieci casi. Era abbastanza probabile, lo dicevano già da tempo i nostri scienziati”. Lo dice il ministro della Salute Roberto Speranza a Palazzo Chigi. “La situazione è seria ma non bisogna fare allarmismi, la situazione è totalmente sotto controllo” precisa il ministro.

- La diagnosi per SARS-CoV-2 include una serie di opzioni
- Nessun test è perfetto
- Conoscere le prestazioni del test e l'accuratezza clinica (PPV/NPV) è fondamentale per selezionare l'algoritmo di test più appropriato
- L'equilibrio tra guadagno e perdita è necessario per guidare la scelta della strategia di test
- I test fanno parte di una strategia coordinata
- Il test da solo, in assenza di altre comprovate strategie di prevenzione, non è sufficiente per prevenire la trasmissione comunitaria
- Altrettanto importante per la prevenzione della diffusione è ciò che accade prima e dopo la consegna dei risultati dei test. Anche il test migliore ha una sua efficacia nell'ambito di uno specifico contesto

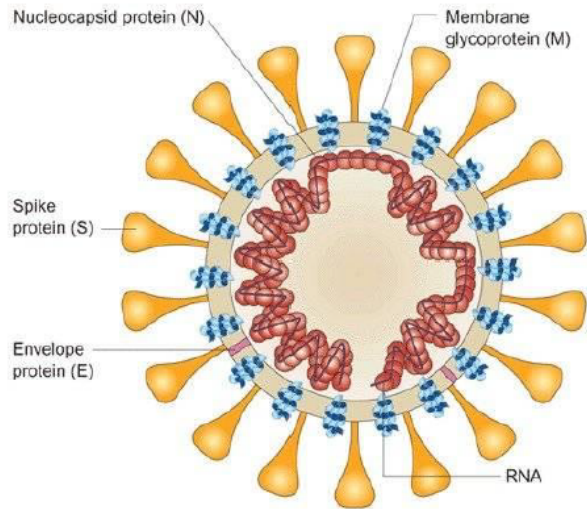


# What do the diagnostic tests for COVID-19 detect?

Diagnostic tests for COVID-19 detect either the **virus** or the **immune response**

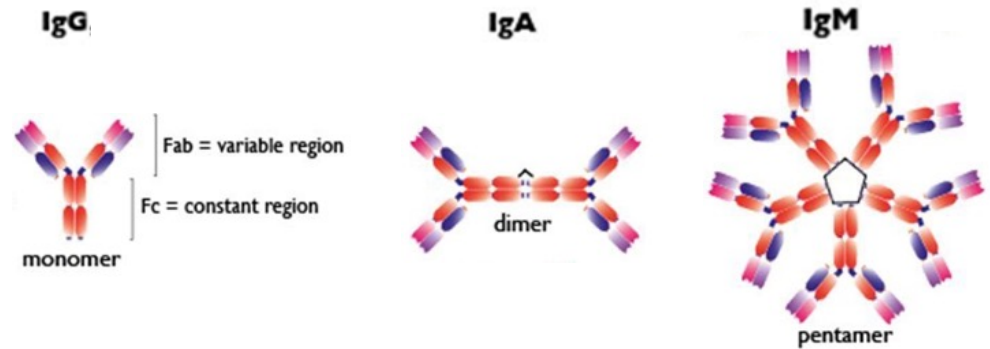
## The virus:

- Viral RNA detected by NAAT/RT-PCR (molecular testing)
- COVID-19 viral antigen



## The immune response:

- Antibodies against COVID-19 antigen (IgM, IgG, IgA) (serology testing)

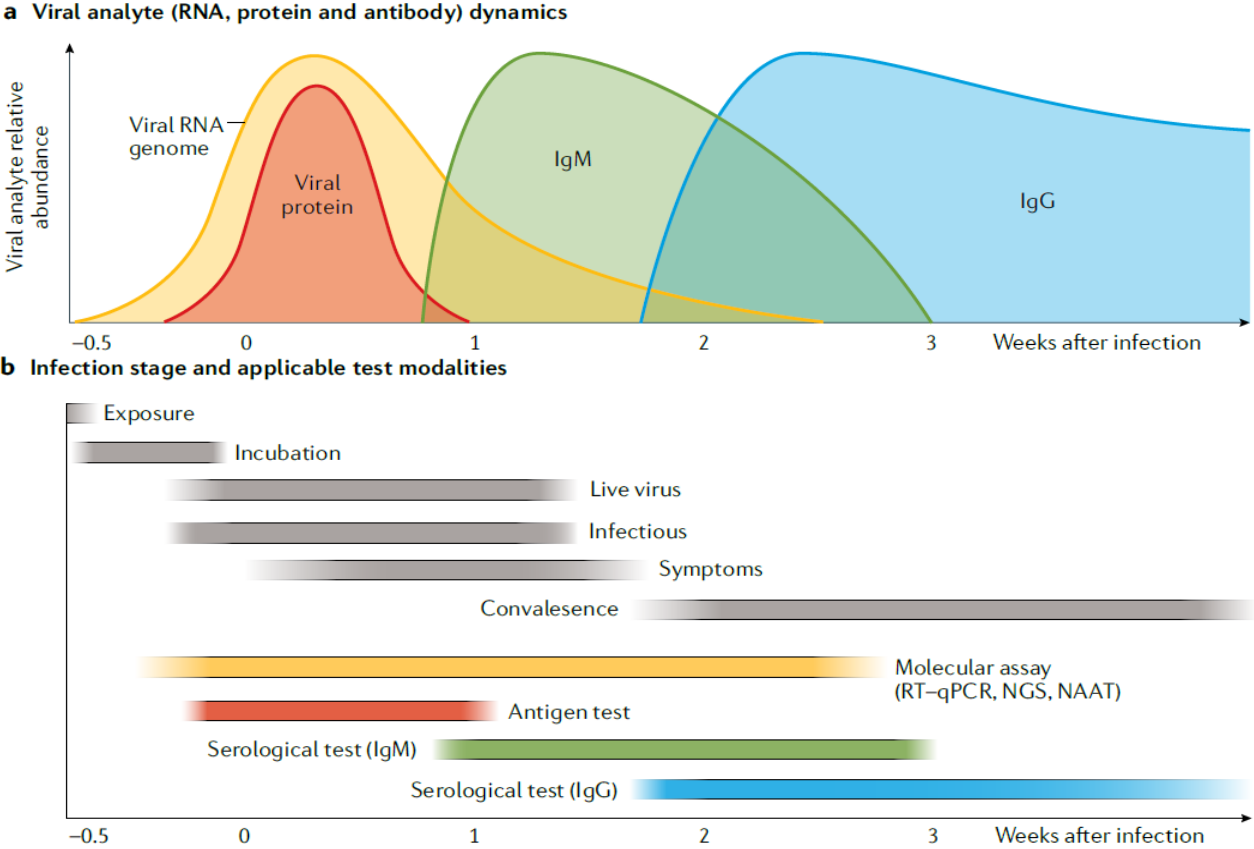


Monto, Cowling and Pereis. Coronaviruses. R.A. Kaslow et al. (eds.), Viral infections in humans.

[https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4899-7448-8\\_10.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4899-7448-8_10.pdf)

# Testing at scale during the COVID-19 pandemic

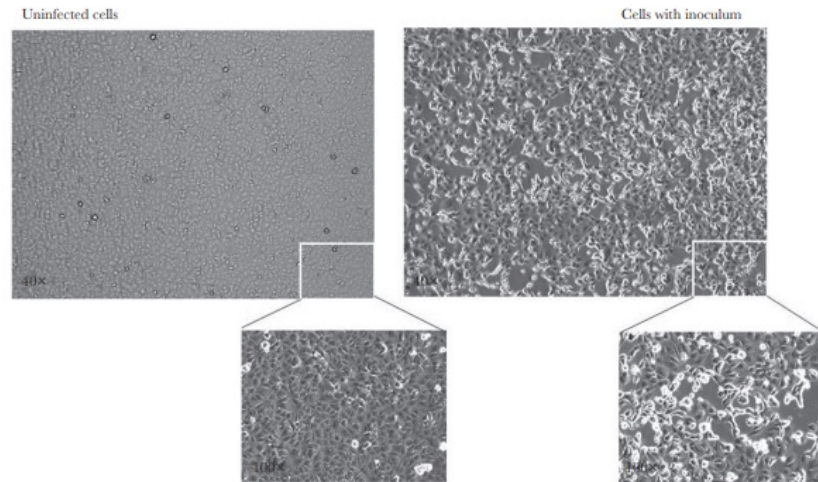
Tim R. Mercer<sup>1,2,3</sup> and Marc Salit<sup>4,5</sup>



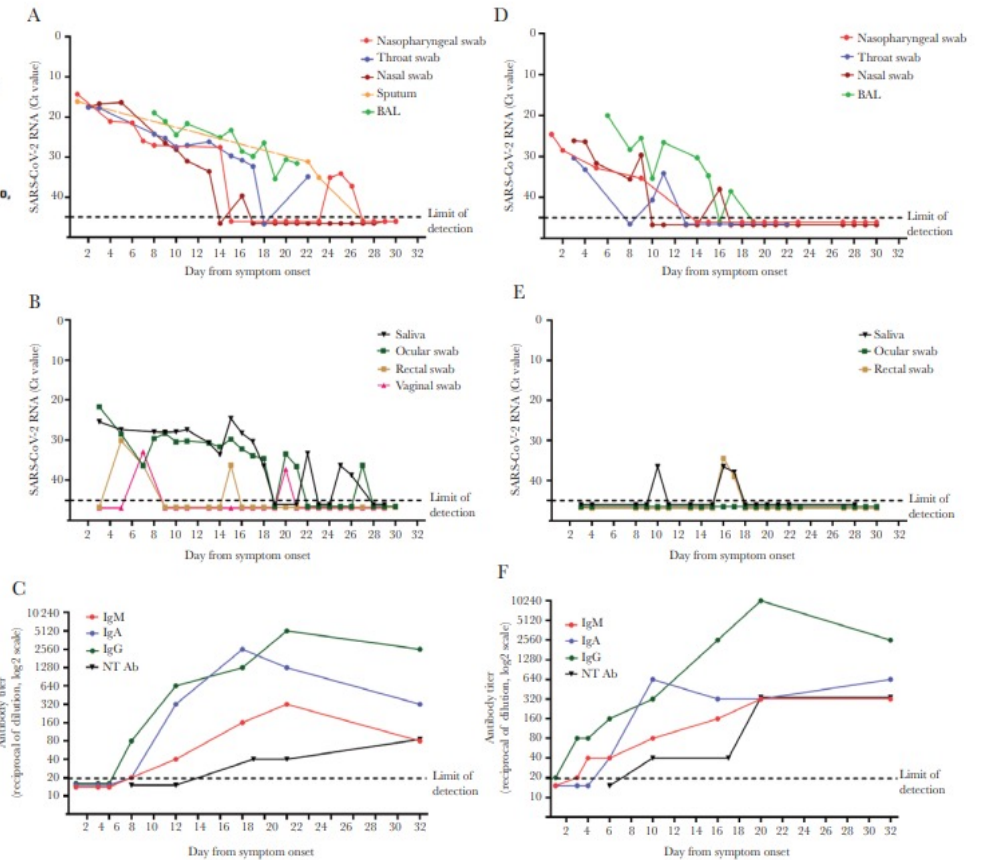
# Virological Characterization of the First 2 COVID-19 Patients Diagnosed in Italy: Phylogenetic Analysis, Virus Shedding Profile From Different Body Sites, and Antibody Response Kinetics

Francesca Colavita,\* Daniele Lapa,\* Fabrizio Carletti, Eleonora Lalle, Francesco Messina, Martina Rueca, Giulia Matusali, Silvia Meschi, Licia Bordi, Patrizia Marsella, Emanuele Nicastrì, Luisa Marchionni, Andrea Mariano, Laura Scorzolini, Tommaso Ascoli Bartoli, Antonino Di Caro, Giuseppe Ippolito, Maria Rosaria Capobianchi, and Concetta Castilletti; on behalf of the INMI COVID-19 Laboratory Team and INMI COVID-19 Study Group

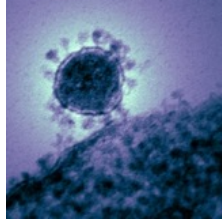
National Institute for Infectious Diseases "L. Spallanzani" IRCCS, Rome, Italy



**Figure 1.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) isolation in cell culture. Mock-infected Vero E6 cells (left) and cells inoculated with sputum from Pt1 (right) observed after 24 hours postseed. Magnification insets (100 $\times$ ) of selected regions are shown. Virus-induced cytopathic effect is evident in inoculated Vero E6 cells. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction test on spent cell growth medium confirmed SARS-CoV-2 replication (inoculum cycle threshold [Ct] value = 16.73 vs 24 hours postinoculum Ct value = 8.15). Images captured by Cyation 5, Biotek.



**Figure 3.** Kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA in different clinical samples and of antibody response in the first 2 coronavirus disease 2019 patients diagnosed in Italy. Viral RNA levels detected in respiratory tract secretions (A) and in non-respiratory tract samples (B) and antibody titers (C). Pt1 is shown on the left; pt2 is shown on the right. Antibody titers for IgM, IgG, IgA, and neutralizing antibodies (NT Ab) are expressed as the reciprocal of serum dilution and are shown on a log<sub>2</sub> scale; viral RNA levels are expressed as cycle threshold values (Ct) of E gene amplification. Dashed lines represent the limits of detection of immunofluorescence assay (1:20 in (C) and (F)) and of real-time reverse transcription polymerase chain reaction (Ct: 45 in (A), (B), (D), and (E)).



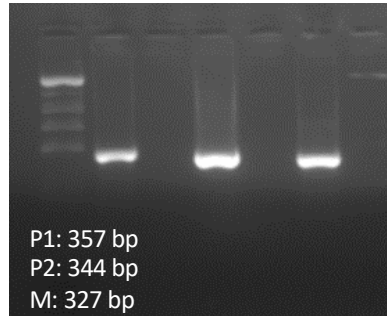
# 2019-nCoV diagnosi molecolare



- A viral genome sequence was released for immediate public health support via the community online resource [virological.org](http://virological.org) on **10 January 2020**

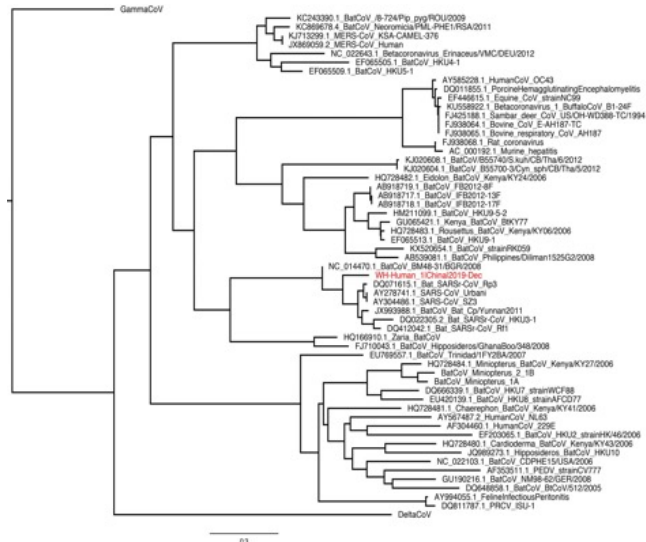
RT-PCR classica  
3 target:

| P1 |   | P2 |   | M |   |
|----|---|----|---|---|---|
| +  | - | +  | - | + | - |



Positive real time RT-PCR or  
RT-PCR

RT-PCR with different  
target (end point)  
Amplicon sequencing for  
✓ Confirmation and  
✓ Molecular  
characterization



Berlin, Jan 17th, 2020  
**Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR**  
-Protocol and preliminary evaluation as of Jan 17, 2020-

RESEARCH

## Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR

Victor M Corman<sup>1</sup>, Olmert Landt<sup>2</sup>, Marco Kaiser<sup>3</sup>, Richard Molenkamp<sup>1</sup>, Adam Mellor<sup>4</sup>, Daniel KW Chu<sup>5</sup>, Tobias Blecker<sup>1</sup>, Sebastian Brünink<sup>1</sup>, Julia Schneider<sup>1</sup>, Marie Luisa Schmidt<sup>1</sup>, Daphne GJC Mulders<sup>1</sup>, Bart L Haagmans<sup>1</sup>, Bas van der Veer<sup>4</sup>, Sharon van den Brink<sup>1</sup>, Lisa Wjlsman<sup>1</sup>, Gabriel Goderski<sup>1</sup>, Jean-Louis Romette<sup>6</sup>, Joanna Ellis<sup>7</sup>, Maria Zambor<sup>8</sup>, Malik Peiris<sup>1</sup>, Herman Goossens<sup>1</sup>, Chantal Reusken<sup>1</sup>, Marlon PG Koopmans<sup>1</sup>, Christian Drosten<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Charité – Universitätsmedizin Berlin Institute of Virology, Berlin, Germany and German Centre for Infection Research (DZIF), Berlin, Germany

<sup>2</sup> Tib-Molbiol, Berlin, Germany

<sup>3</sup> Department of Viroscience, Erasmus MC, Rotterdam, the Netherlands

<sup>4</sup> National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands

<sup>5</sup> University of Hong Kong, Hong Kong, China

<sup>6</sup> Université d'Aix-Marseille, Marseille, France

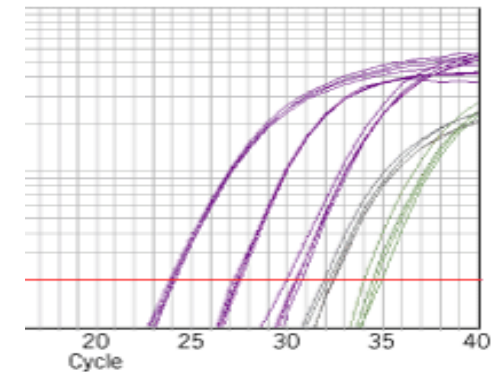
<sup>7</sup> Public Health England, London, United Kingdom

<sup>8</sup> Department of Medical Microbiology, Vaccine and Infectious Diseases Institute, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

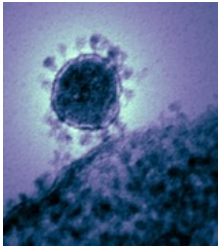
Correspondence: Christian Drosten ([christian.drosten@charite.de](mailto:christian.drosten@charite.de))

Eurosurveillance, Jan 25 2020

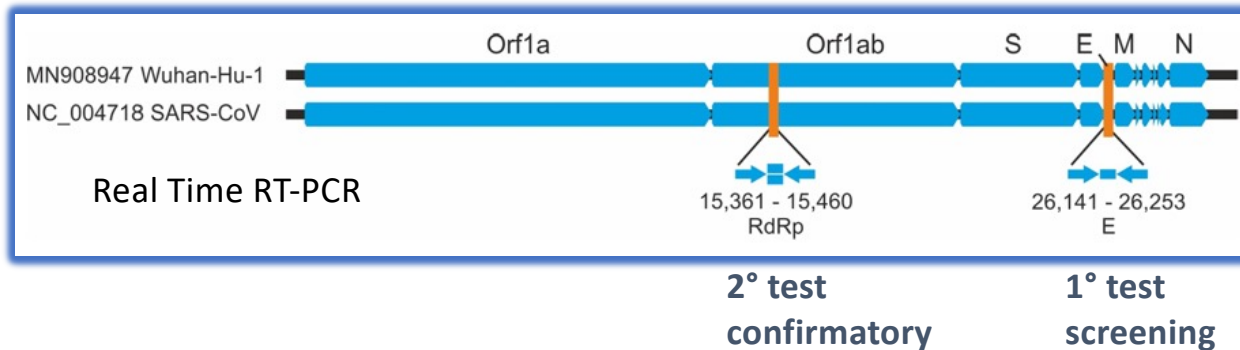
- CDC Primers and probes for detection SARS-Cov-2 were posted on **24 January 2020**  
real time RT-PCR  
3 geni target: RpRd, E, N







## COVID-19: early establishment of diagnostic response



**RESEARCH**

**Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR**

Victor M Corman<sup>1</sup>, Oliver Landt<sup>1</sup>, Marco Kaiser<sup>1</sup>, Richard Molenkamp<sup>1</sup>, Adam Meijer<sup>1</sup>, Daniel KW Chu<sup>2</sup>, Tobias Blecker<sup>1</sup>, Sebastian Brünke<sup>1</sup>, Julia Schneider<sup>1</sup>, Maria Luisa Schmidt<sup>1</sup>, Daghine GJ Walder<sup>1</sup>, Bart L Haagmans<sup>3</sup>, Bas van der Veer<sup>4</sup>, Sharon van den Brink<sup>5</sup>, Lisa Wijsman<sup>6</sup>, Gabriel Goderski<sup>7</sup>, Jean-Louis Romette<sup>8</sup>, Joanna Ellis<sup>7</sup>, Maria Zambon<sup>8</sup>, Malik Peiris<sup>8</sup>, Herman Goossens<sup>8</sup>, Chantal Reusken<sup>8</sup>, Marlon PG Koopmans<sup>8</sup>, Christian Drosten<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Charité – Universitätsmedizin Berlin Institute of Virology, Berlin, Germany and German Centre for Infection Research (DZIF), Berlin, Germany

<sup>2</sup> Tifo-Medbiol, Berlin, Germany

<sup>3</sup> Department of Viroscience, Erasmus MC, Rotterdam, the Netherlands

<sup>4</sup> National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands

<sup>5</sup> University of Hong Kong, Hong Kong, China

<sup>6</sup> Université d'Aix-Marseille, Marseille, France

<sup>7</sup> Public Health England, London, United Kingdom

<sup>8</sup> Department of Medical Microbiology, Vaccine and Infectious Diseases Institute, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

Correspondence: Christian Drosten (christian.drosten@charite.de)

Citation style for this article:  
Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, Blecker T, Brünke S, Schneider J, Schmidt ML, Walder DG, Haagmans BL, van der Veer B, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans M, Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(19):2000059. <https://doi.org/10.2807/1564-0696.2020.25.2000059>

Article submitted on 21 Jan 2020 / accepted on 22 Jan 2020 / published on 23 Jan 2020

Eurosurveillance, Jan 25 2020

7 different in-house developed molecular assays protocols (RT-PCR) have been posted on the WHO website.

- Hospital Charité (Berlin, Germany)
- Hong-Kong University-Faculty of Medicine (HKU Med) (Hong-Kong, China)
- Center for Disease Control of China (China CDC)
- Institut Pasteur (Paris, France)
- Center for Disease Control of USA (US CDC) (Atlanta, USA)
- National Institute of Infectious Diseases (Tokyo, Japan)
- National Institute of Health (Bangkok, Thailand)

All assays can use SARS-CoV as positive control.

Synthetic control for 2019-nCoV distributed through EVAg

**First line screening assay:** E gene assay. All Asian viruses are likely to be detected

- SARS
- SLBat CoV
- 2019-nCoV

**Confirmatory/discriminatory assay:** RdRp gene assay (including a probe that recognizes all Asian strains and a probe specific for 2019-nCoV)




# Options for molecular tests


•Require extraction+amplification:



QiaSymphony




96 samples in 5/6h




ALTONA RealStar  
SARS-CoV-2 RT-PCR  
Gene E; S


•Complete automation;  
high throughput:




Abbott RealTime  
Gene N; RpRd;  
192 samples in 9h



Abbott Alinity  
Gene N, RdRp; first result  
after 2 h; then 12  
results every 16 min



Cobas® SARS-CoV-2 Test;  
Gene E; ORF1ab;  
First 94 results in 210  
min; then 94 results/h



Aptima® SARS-CoV-2 Assay (Panther® System)  
2 targets on Orf 1ab; first result after 3h; then  
1 result/min

•Fast molecular test (PCR, TMA, LAMP, ecc);  
low throughput, rapid results, application  
to urgent samples:



Diasorin MDX  
gene S, Orf 1ab;  
70' x 8 samples



## The importance of having viral isolate to perform studies of validation of in house or commercial assays



### Rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA using the Simplexa™ COVID-19 direct assay

Licia Bordi<sup>a,1</sup>, Antonio Piralla<sup>b,1</sup>, Eleonora Lalle<sup>a</sup>, Federica Giardina<sup>b</sup>, Francesca Colavita<sup>a</sup>, Monica Tallarita<sup>b</sup>, Giuseppe Sberna<sup>a</sup>, Federica Novazzi<sup>b</sup>, Silvia Meschi<sup>a</sup>, Concetta Castillett<sup>a</sup>, Angela Brisci<sup>c</sup>, Giulia Minnucci<sup>c</sup>, Veronica Tettamanzi<sup>c</sup>, Fausto Baldanti<sup>b,d,\*</sup>, Maria Rosaria Capobianchi<sup>a</sup>



Table 1

Limit of Detection of the Simplexa™ COVID-19 Direct assay.

| Target   | Viral stock dilution (TCID <sub>50</sub> /ml)             | RNA cp/mL <sup>a</sup> | Gene 1 (S gene) |         |      | Gene2 (ORF1ab) |         |      | Overall % Determinations (replicates) |
|--|---|------------------------|-----------------|---------|------|----------------|---------|------|---------------------------------------|
|  |   |                        | % Det (reps)    | Mean Ct | SD   | % Det (reps)   | Mean Ct | SD   |                                       |
| SARS-CoV2 Viral particles 2019nCoV/ Italy-INMI | 10 <sup>-5</sup> (100 TCID <sub>50</sub> /ml)             | 4 × 10 <sup>5</sup>    | 100% (3/3)      | 23.5    | 0.06 | 100% (3/3)     | 24.1    | 0.12 | 100% (3/3)                            |
|  | 10 <sup>-6</sup> (10 TCID <sub>50</sub> /ml)              | 4 × 10 <sup>4</sup>    | 100% (3/3)      | 26.8    | 0.26 | 100% (3/3)     | 27.4    | 0.42 | 100% (3/3)                            |
|  | 10 <sup>-7</sup> (1 TCID <sub>50</sub> /ml)               | 4 × 10 <sup>3</sup>    | 100% (40/40)    | 29.8    | 0.66 | 100% (40/40)   | 30.2    | 0.74 | 100% (40/40)                          |
|  | 10 <sup>-8</sup> (0.1 TCID <sub>50</sub> /ml)             | 4 × 10 <sup>2</sup>    | 73.7% (14/19)   | 33.4    | 0.83 | 68.4% (13/19)  | 33.8    | 0.81 | 84.2% (16/19)                         |
|  | 5 · 10 <sup>-9</sup> (0.05 TCID <sub>50</sub> /ml)        | 2 × 10 <sup>2</sup>    | 20% (1/5)       | 33.5    | -    | 20% (1/5)      | 33.7    | -    | 20% (1/5)                             |
|  | 2.5 · 10 <sup>-9</sup> (0.025 TCID <sub>50</sub> /ml)     | 1 × 10 <sup>2</sup>    | 0% (0/5)        | -       | -    | 0% (0/5)       | -       | -    | 0% (0/5)                              |
|  | 1.25 · 10 <sup>-9</sup> (0.0125 TCID <sub>50</sub> /ml)   | 50                     | 20% (1/5)       | 34.2    | -    | 20% (1/5)      | 34.2    | -    | 20% (1/5)                             |
|  | 10 <sup>-9</sup> (0.01 TCID <sub>50</sub> /ml)            | 40                     | 50% (3/6)       | 34.4    | 0.12 | 16.7% (1/6)    | 34.6    | -    | 50% (3/6)                             |
|  | 6.25 · 10 <sup>-10</sup> (0.00625 TCID <sub>50</sub> /ml) | 25                     | 0% (0/4)        | -       | -    | 0% (0/4)       | -       | -    | 0% (0/4)                              |
|  | 3.13 · 10 <sup>-10</sup> (0.00312 TCID <sub>50</sub> /ml) | 12.5                   | 0% (0/5)        | -       | -    | 0% (0/5)       | -       | -    | 0% (0/5)                              |
|  | 10 <sup>-10</sup> (0.001 TCID <sub>50</sub> /ml)          | 4                      | 0% (0/3)        | -       | -    | 0% (0/3)       | -       | -    | 0% (0/3)                              |

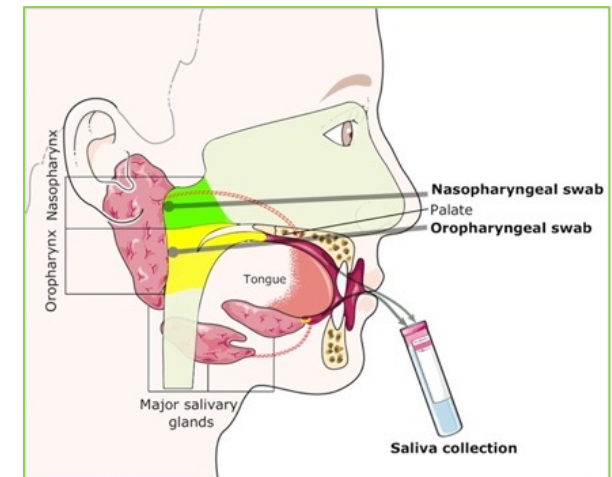
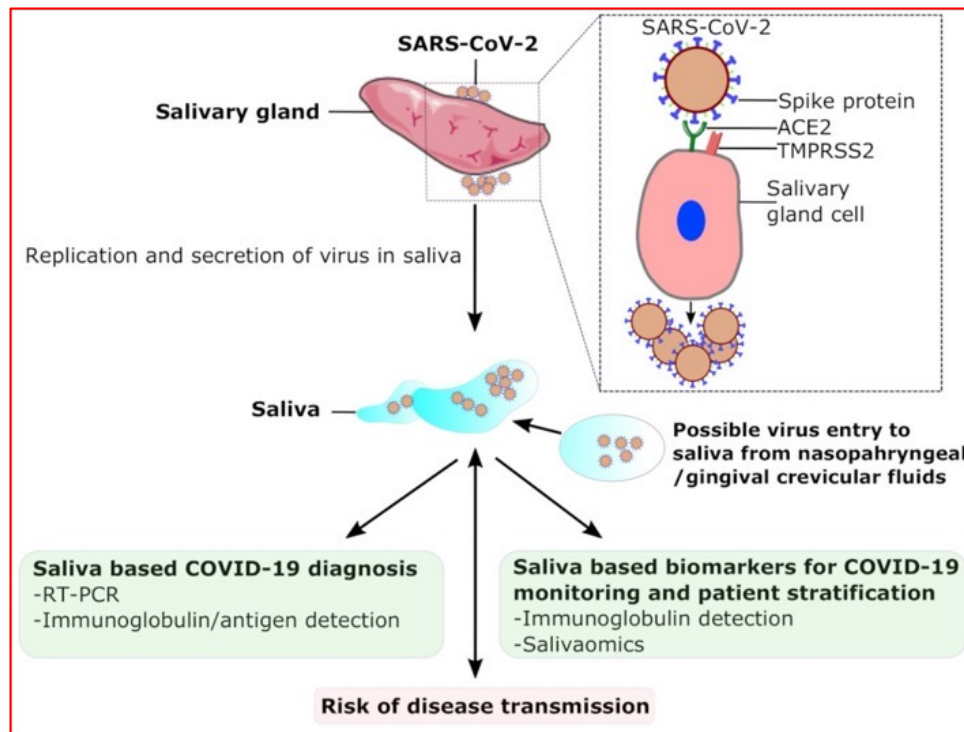
<sup>a</sup> RNA copies/mL are based on standard curve for gene E SARS-CoV-2.



- The LOD of the prototype assay, established with both SARS-CoV-2 viral particles and SARS-CoV2 extracted viral RNA, was less than 1000 cp/ml.
- All SARS-CoV-2 samples resulted positive with the reference test (Corman's method), also resulted positive with Simplexa™ COVID-19 Direct assay, with a diagnostic sensitivity of 100% and "almost perfect" concordance.
- An high performance of the test was also observed using different clinical specimens: (BAL and blood)
- 100% of clinical specificity was observed against swabs resulted positive to other viruses, particularly human coronaviruses, indicating no cross-reactivity with other similar viruses.
- The lack of extraction reduces turnaround time for the diagnosis of COVID-19, allowing prompt decision making regarding isolation of infected patients.

## COVID-19 salivary signature: diagnostic and research opportunities

Dipak Sapkota,<sup>1</sup> Tine Merete Søland,<sup>1,2</sup> Hilde Kanli Galtung,<sup>1</sup> Lars Peter Sand,<sup>1</sup> Simone Giannechini,<sup>3</sup> Kelvin K W To,<sup>4,5,6</sup> Maria Cassia Mendes-Correa,<sup>7</sup> Daniel Giglio,<sup>8</sup> Bengt Hasséus,<sup>9,10</sup> Paulo Henrique Braz-Silva<sup>7,11</sup>



- Saliva is good reservoir for viruses that originate from oral shedding, and secretions from the lower respiratory tract, nasopharynx and possibly infected salivary gland
- Chen et al detected SARS-CoV-2 RNA in 3/4 saliva samples directly collected from the salivary gland duct (precluding contamination from respiratory secretions) and demonstrated ACE2 expression in the salivary gland
- To et al demonstrated the presence of live SARS-CoV-2 in saliva.

## Increasing interest on saliva

WHO recommends RT-PCR testing using NPS, OPS or BAL as gold standard for SARS-CoV-2 diagnosis and for monitoring viral load



| Authors                             | Main finding(s) related to salivary specimens  |
|-------------------------------------|--|
| To <i>et al</i> <sup>28</sup>       | 91.7% of nasopharyngeal swab-diagnosed cases.<br>Live virus was detected in saliva using viral culture.                    |
| To <i>et al</i> <sup>29</sup>       | 87% of nasopharyngeal swab-diagnosed cases.<br>Salivary viral load was highest during the first week of symptom.           |
| Azzi <i>et al</i> <sup>32</sup>     | Detected in all nasopharyngeal swab-diagnosed cases.   |
| Kojima <i>et al</i> <sup>24</sup>   | Self-collected saliva and nasal swab had similar sensitivity as compared with the clinician-collected nasopharyngeal swabs |
| Wyllie <i>et al</i> <sup>25</sup>   | Saliva is more sensitive and consistent than nasopharyngeal swabs  |
| Williams <i>et al</i> <sup>31</sup> | 84.6% of nasopharyngeal swab-diagnosed cases.<br>Viral load was higher in the nasopharyngeal swab.                         |
| Pasomub <i>et al</i> <sup>33</sup>  | 84.2% of nasopharyngeal swab-diagnosed cases.<br>Saliva might be an alternative specimen for COVID-19 diagnosis.           |

Saliva as an alternate clinical sample:

- easy and safer to collect
- minimizing exposure of healthcare workers
- could be useful for making a diagnosis and measuring SARS-CoV-2 viral load and viral shedding during the course of the illness and convalescence

On 8th May 2020, the U.S. Food and Drug Administration had authorized the first diagnostic test with the option of using home-collected saliva samples for COVID-19 testing issuing an emergency use authorization (</media/137773/download>) (EUA) to Rutgers Clinical Genomics Laboratory for their COVID-19 laboratory developed test

## Analytical sensitivity of Simplexa Covid-19 Direct Assay applied to oral fluids (OF; ie: saliva)

| Diluted Saliva  | Viral stock dilution (TCID <sub>50</sub> /mL) | RNA cp/mL*         | Gene 1 (S gene) | Gene2 (ORF1ab) | Overall % Determinations (replicates) |
|---|---|--------------------|-----------------|----------------|---------------------------------------|
|   |   |                    | % Det (reps)    | % Det (reps)   |                                       |
| SARS-CoV2<br>Viral particles<br>2019nCoV/ Italy-INMI1 | 10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> /mL        | 4x10 <sup>10</sup> | 100% (3/3)      | 100% (3/3)     | 100% (3/3)                            |
|   | 10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> /mL        | 4x10 <sup>9</sup>  | 100% (3/3)      | 100% (3/3)     | 100% (3/3)                            |
|   | 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /mL        | 4x10 <sup>8</sup>  | 100% (3/3)      | 100% (3/3)     | 100% (3/3)                            |
|   | 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /mL        | 4x10 <sup>7</sup>  | 100% (3/3)      | 100% (3/3)     | 100% (3/3)                            |
|   | 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /mL        | 4x10 <sup>6</sup>  | 100% (3/3)      | 100% (3/3)     | 100% (3/3)                            |
|   | 10 <sup>2</sup> TCID <sub>50</sub> /mL        | 4x10 <sup>5</sup>  | 100% (3/3)      | 100% (3/3)     | 100% (3/3)                            |
|   | 10 TCID <sub>50</sub> /mL                     | 4x10 <sup>4</sup>  | 100% (3/3)      | 100% (3/3)     | 100% (3/3)                            |
|   | 5 TCID <sub>50</sub> /mL                      | 2x10 <sup>4</sup>  | 100% (3/3)      | 100% (3/3)     | 100% (3/3)                            |
|   | 2.5 TCID <sub>50</sub> /mL                    | 1x10 <sup>4</sup>  | 100% (3/3)      | 100% (3/3)     | 100% (3/3)                            |
|   | 1 TCID <sub>50</sub> /mL                      | 4x10 <sup>3</sup>  | 100% (10/10)    | 100% (10/10)   | 100% (10/10)                          |
|   | 0.5 TCID <sub>50</sub> /mL                    | 2x10 <sup>3</sup>  | 100% (5/5)      | 80% (4/5)      | 100% (5/5)                            |
|   | 0.25 TCID <sub>50</sub> /mL                   | 1x10 <sup>3</sup>  | 60% (3/5)       | 80% (4/5)      | 80% (4/5)                             |
|   | 0.1 TCID <sub>50</sub> /mL                    | 4x10 <sup>2</sup>  | 40% (2/5)       | 20% (1/5)      | 40% (2/5)                             |
|   | 0.05 TCID <sub>50</sub> /mL                   | 2x10 <sup>2</sup>  | 0% (0/3)        | 0% (0/3)       | 0% (0/3)                              |
|   | 0.025 TCID <sub>50</sub> /mL                  | 1x10 <sup>2</sup>  | 0% (0/3)        | 0% (0/3)       | 0% (0/3)                              |
| 0.01 TCID <sub>50</sub> /mL                           | 40  | 0% (0/3)           | 0% (0/3)        | 0% (0/3)       |                                       |
| 0.001 TCID <sub>50</sub> /mL                          | 4   | 0% (0/3)           | 0% (0/3)        | 0% (0/3)       |                                       |



Article

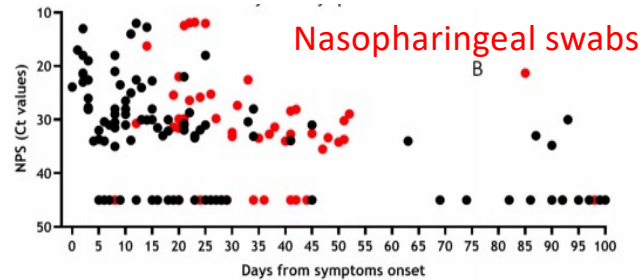
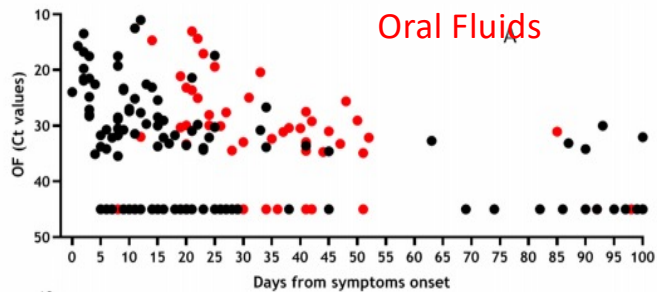
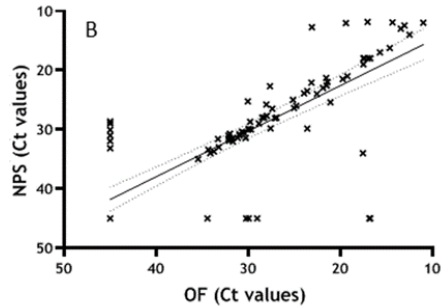
### Frequency and Duration of SARS-CoV-2 Shedding in Oral Fluid Samples Assessed by a Modified Commercial Rapid Molecular Assay

Licia Bordi <sup>1,\*</sup>, Giuseppe Sberna <sup>1,†</sup>, Eleonora Lalle <sup>1</sup>, Pierluca Piselli <sup>2</sup>, Francesca Colavita <sup>1</sup>, Emanuele Nicastrì <sup>3</sup>, Andrea Antinori <sup>3</sup>, Evangelo Boumis <sup>3</sup>, Nicola Petrosillo <sup>3</sup>, Luisa Marchioni <sup>3</sup>, Giulia Minnucci <sup>4</sup>, Elena D'Agostini <sup>4</sup>, Concetta Castilletti <sup>1</sup>, Franco Locatelli <sup>5</sup>, Alimuddin Zumla <sup>6,7</sup>, Giuseppe Ippolito <sup>8</sup>, Maria Rosaria Capobianchi <sup>1</sup> and on behalf of INMI ReCOVeRI Study Group ‡



Simplexa™ COVID-19 direct assay is a real-time RT-PCR system that enables the direct and quick amplification of Coronavirus SARS-CoV-2 RNA from several specimens, without sample processing like RNA extraction

- SARS-CoV-2 particles from viral stock spiked into a pool of OF coming from 25 healthy donors, mixed together and diluted 1:1 with 0.9% NaCl isotonic solution. Serial dilutions tested in multiple replicates
- LOD on saliva (~ 1900 cp/mL) comparable with that of two reference assays (1200 cp/mL)
- Similar to that obtained for NPS (~ 1500cp/ml; Bordi L et al J Clin Virol. 2020 Jul;128:104416)



|                      | Asymptomatic | Paucisymptomatic | Severe (PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> <100) | Negative | Total |
|----------------------|--------------|------------------|--|----------|-------|
| <b>Patients (N°)</b> | 14           | 61               | 12   | 77       | 164   |
| <b>Samples (N°)</b>  | 18           | 154              | 50   | 115      | 337   |

Concordance analyses on 337 samples showed a total of 309 concordant and 28 discordant results ( $\kappa = 0.831$ ; 95% CI = 0.771–0.891)

Linear regression analysis adjusted for cluster of repeated measures, sex and age on 292 samples for which Ct values were available for both matrices showed elevated correlation of Ct values among NPS and OF ( $r = 0.921$ ;  $p < 0.0001$ )

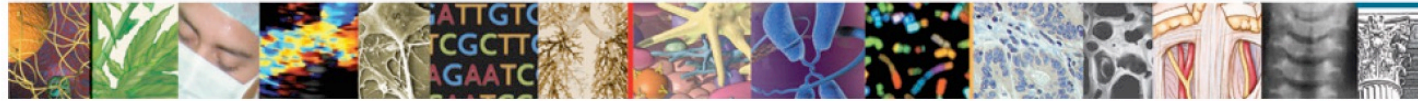
162 analysed samples:

- 50 severe patients (red symbols)
- 112 paucisymptomatic/asymptomatic patients (black symbols)

Presence of RNA in both matrices during the first 30 DSO (67% OF; 72% NPS), remaining stable between 30 and 60 DSO with similar frequency (65% OF; 76% NPS) and still observed until 100 DSO (32% OF; 29% NPS).

|            | OF: Median Ct Values (Range) | NPS: Median Ct Values (Range) |
|------------|------------------------------|-------------------------------|
| <b>Tot</b> | 32.2 (11.0-45)               | 32.0 (11.9-45)                |
| <b>DSO</b> |                              |                               |
| 0-30       | 31.0 (11.0-45)               | 31.0 (11.9-45)                |
| 31-60      | 33.3 (20.4-45)               | 33.4 (22.6-45)                |
| >60        | 45 (30.0-45)                 | 45 (21.3-45)                  |

No significant difference ( $p > 0.05$ ) between median Ct values in OF and NPS, neither in total nor according to different DSO intervals

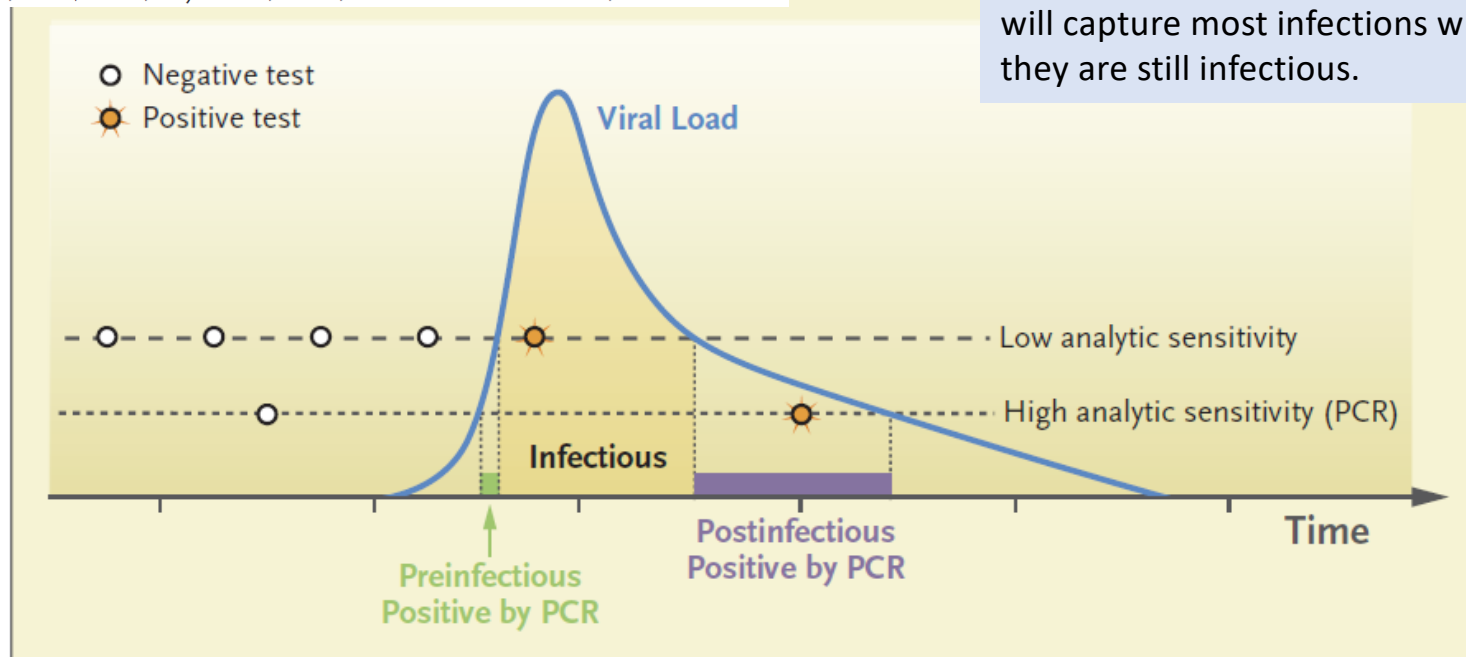


# The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

## Rethinking Covid-19 Test Sensitivity — A Strategy for Containment

Michael J. Mina, M.D., Ph.D., Roy Parker, Ph.D., and Daniel B. Larremore, Ph.D.

For an effective Covid filter that will stop this pandemic, we need tests that can enable regimens that will capture most infections while they are still infectious.



High-Frequency Testing with Low Analytic Sensitivity versus Low-Frequency Testing with High Analytic Sensitivity.



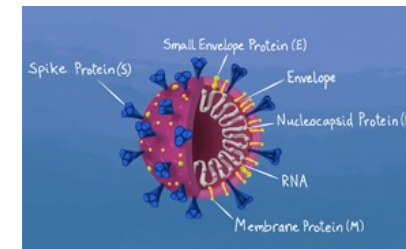
## Diagnosis of SARS-CoV-2 infection

### Molecular PCR

- 😊 detect current infection
- 😊 highly sensitive
- 😞 expensive and significant test complexity (sophisticated equipment and trained staff)
- 😞 turnaround time up to 24 hours

### Antigen test

- 😊 detect current infection
- 😊 turnaround time  $\approx$  15-30 minutes
- 😊 easy-to-use and low costs
- 😞 **low/moderate sensitivity**



### Possible role of Ag test:

- point-of-care for screening and where RT-PCR is not immediately available
- public health tool to rapidly identify highly infectious individuals within a community

# STANDARD F COVID-19 Ag FIA

## Laboratory evaluation – Analytical sensitivity

Replicates of a dilution series containing Vero E6 cell-cultured SARS-CoV-2 (2019nCoV/ItalyINMI1 isolate) spiked into oral swab-UTM matrix

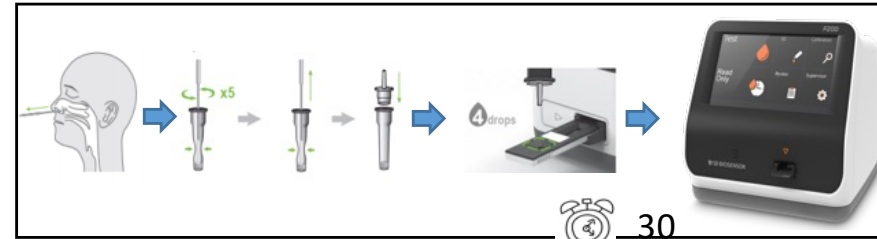


| Probit regression model        |                   | STANDARD F COVID-19 Ag FIA     |          |     |
|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|----------|-----|
| Viral preparation<br>TCID50/mL | RNA<br>cp/mL*     | Overall                        | %        |     |
|                                |                   | determinations<br>(replicates) | Mean COI | SD  |
| 1000 TCID50/mL                 | $4 \times 10^6$   | 100% (4/4)                     | 1.6      | 0.3 |
| 500 TCID50/mL                  | $2 \times 10^6$   | 100% (4/4)                     | 1.2      | 0.1 |
| 250 TCID50/mL                  | $1 \times 10^6$   | 50% (2/4)                      | 1.0      | 0.1 |
| 125 TCID50/mL                  | $5 \times 10^5$   | 25% (1/4)                      | 0.9      | 0.1 |
| 62.5 TCID50/mL                 | $2.5 \times 10^5$ | 0% (0/4)                       | 0.7      | 0.1 |

Overall clinical sensitivity 47.1% (37.2-57,1%); specificity: 98.4% (96.0-99.5)

## STANDARD F COVID-19 Ag FIA

| Ct range | Ag FIA positive/RT-PCR positive |
|----------|---------------------------------|
| <18      | 5/5 (100%)                      |
| 18-25    | 15/16 (95%)                     |
| 25-35    | 23/55 (42%)                     |
| >35      | 6/28 (21%)                      |



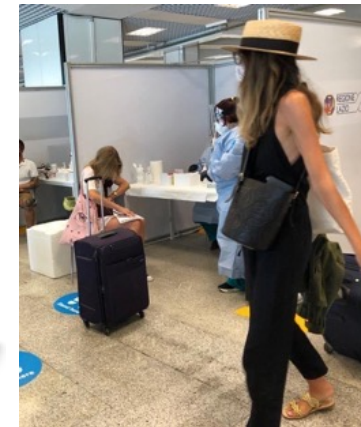
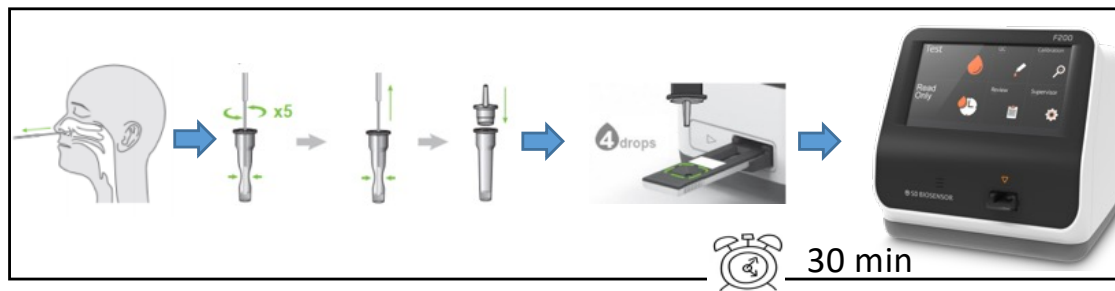
30  
mi  
n

| Theoretical estimates of PPV, NPV e accuracy based on COVID-19 prevalence |                     |             |             |               |
|---|---------------------|-------------|-------------|---------------|
|   | COVID-19 prevalence | PPV (%)     | NPV (%)     | Accuracy (%)  |
| <b>Value</b>  | 0.5%                | 13.1        | 99.7        | 98.17         |
| <b>95% CI</b>   |                     | 5.3 – 9.0   | 99.7 - 99.8 | 96.19 - 99.29 |
| <b>Value</b>  | 1%                  | 23.3        | 99.5        | 97.92         |
| <b>95% CI</b>   |                     | 10.1 - 45.0 | 99.4 - 99.6 | 95.9 - 99.1   |
| <b>Value</b>  | 2%                  | 38.0        | 98.9        | 97.4          |
| <b>95% CI</b>   |                     | 18.5 - 62.3 | 98.7 - 99.1 | 95.2 - 98.8   |
| <b>Value</b>  | 10%                 | 76.9        | 94.4        | 93.3          |
| <b>95% CI</b>   |                     | 55.3 - 90.0 | 93.3 - 95.3 | 90.2 - 95.7   |

## Preliminary evaluation as screening at Point-of-Entry in Lazio Region, Italy



Ag FIA test performed on-site on individuals returning from European countries identified as “high risk” for COVID-19 transmission by the Italian MoH: Spain, Malta, Croatia, Greece (**airport**); and from Sardinia Region in Italy (**port**), where outbreaks were recorded in August.



Nasopharyngeal swabs were collected on-site only from individuals resulted **positive by Ag FIA test** and sent to the INMI laboratory for molecular confirmation.

## Evaluation of Lumipulse antigen test on Saliva Samples

### Analytical sensitivity

| Viral preparation<br>TCID50/mL | RNA<br>cp/mL*   | Lumipulse G SARS-CoV-2 Ag             |
|--------------------------------|-----------------|---------------------------------------|
|                                |                 | Overall % determinations (replicates) |
| 1000000 TCID50/mL              | $4 \times 10^9$ | 100% (3/3)                            |
| 100000 TCID50/mL               | $4 \times 10^8$ | 100% (3/3)                            |
| 10000 TCID50/mL                | $4 \times 10^7$ | 100% (3/3)                            |
| 1000 TCID50/mL                 | $4 \times 10^6$ | 100% (3/3)                            |
| 100 TCID50/mL                  | $4 \times 10^5$ | 100% (3/3)                            |
| 10 TCID50/mL                   | $4 \times 10^4$ | 100% (5/5)                            |
| 5 TCID50/mL                    | $2 \times 10^4$ | 100% (5/5)                            |
| 2.5 TCID50/mL                  | $1 \times 10^4$ | 60% (3/5)                             |
| 1 TCID50/mL                    | $4 \times 10^3$ | 16,67% (1/6)                          |
| 0.1 TCID50/mL                  | $4 \times 10^2$ | 0% (0/3)                              |

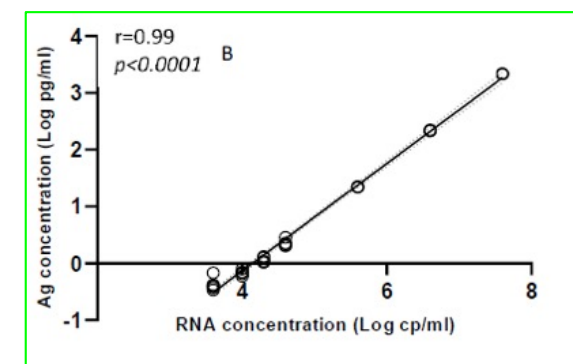
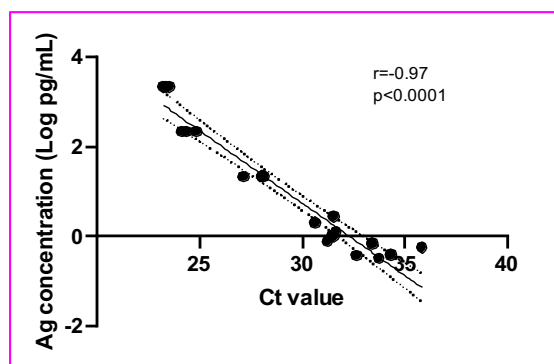
Lumipulse G SARS-CoV-2 Ag is an assay system for the quantitative measurement of SARS-CoV-2 N-antigen in NPS and OF specimens, based on CLEIA technology, by a specific two-step immunoassay method on the LUMIPULSE G System.



- SARS-CoV-2 particles from viral stock spiked into a pool of OF coming from 25 healthy donors, mixed together and diluted 1:1 with a specific diluent. Serial dilutions tested in multiple replicates
- Linear correlation between the quantitative data of antigen concentration and of SARS-CoV-2 RNA concentration ( $r = 0.99$ ;  $p < 0.0001$ ).
- Overall, the equivalence between pg of antigen and copies of RNA, referring to the virus preparation used, is as follows:
  - 1 pg / ml is equivalent to 4.24 Log cp / ml, that is, 17,378 cp/ ml.

### Probit analysis

|                |        |
|----------------|--------|
| LOD: TCID50/ml | 4,46   |
| LOD: RNA cp/ml | 18.197 |





## Clinical performance of Lumipulse G SARS-CoV-2 Ag vs RT- PCR Simplexa™ COVID-19 Direct Assay

|                                   | Proportion<br>(N Pos/N tot) | Percentage            |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Sensitivity                       | 22/42                       | 52.4% (36.4%- 68.0%)  |
| Specificity vs reference PCR      | 80/85                       | 94.1% (86.8% - 98.1%) |
| Specificity vs state of infection | 45/45                       | 100% (92.1%-100%)     |

| Ct range | Ag positive/RT-PCR positive (%) |
|----------|---------------------------------|
| <20      | 3/3 (100%)                      |
| 20-25    | 10/11 (90.9%)                   |
| 25.01-30 | 8/14 (57.1%)                    |
| >30      | 1/14 (7.1%)                     |

The low positive predictive value in a contest of low prevalence for SARS-CoV-2 underscores the need for confirmatory molecular testing in SARS-CoV-2 antigen-positive cases.

- Excluding patients recovered from COVID-19 the specificity increased to 100%.
- Stratifying into groups based on RT-PCR Ct ranges the percentage of positives distributed proportionally with the viral load, with greater antigen concentrations corresponding to higher viral loads (or lower Ct values)
- Sensitivity > 90.0% for samples with Ct value up to 25, which may be a good indicator of high viral load

Article

### Saliva Is a Valid Alternative to Nasopharyngeal Swab in Chemiluminescence-Based Assay for Detection of SARS-CoV-2 Antigen

Alessandra Amendola <sup>1,†</sup>, Giuseppe Sberna <sup>1,†</sup>, Eleonora Lalle <sup>1</sup>, Francesca Colavita <sup>1</sup>, Concetta Castilletti <sup>1</sup>, Giulia Menchinelli <sup>2,3</sup>, Brunella Posteraro <sup>3,4</sup>, Maurizio Sanguinetti <sup>2,3</sup>, Giuseppe Ippolito <sup>5</sup>, Licia Bordi <sup>1,\*</sup>, Maria Rosaria Capobianchi <sup>1</sup> and on behalf of INMI COVID-19 Study Group <sup>†</sup>

| Theoretical estimates of PPV, NPV e accuracy based on COVID-19 prevalence |                     |               |               |               |
|---|---------------------|---------------|---------------|---------------|
|   | COVID-19 prevalence | PPV (%)       | NPV (%)       | Accuracy (%)  |
| Value   | 0.5%                | 4.28          | 99.75         | 93.91         |
| 95% CI  |                     | 1.79 – 9.90   | 99.65 – 99.82 | 88.23 – 97.38 |
| Value   | 1%                  | 8.25          | 99.49         | 93.70         |
| 95% CI  |                     | 3.54 – 18.08  | 99.30 – 99.63 | 87.96 – 97.24 |
| Value   | 2%                  | 15.38         | 98.98         | 93.28         |
| 95% CI  |                     | 6.89 – 30.85  | 98.60 – 99.26 | 87.44 – 96.96 |
| Value   | 10%                 | 49.73         | 94.68         | 89.94         |
| 95% CI  |                     | 28.73 – 70,83 | 92.80 – 96.08 | 83.35 – 94.57 |

## Analytical sensitivity

| Viral preparation<br>TCID <sub>50</sub> /mL | RNA<br>cp/mL*     | Lumipulse G SARS-CoV-2 Ag             |
|---|-------------------|---------------------------------------|
|   |                   | Overall % determinations (replicates) |
| 1000000 TCID <sub>50</sub> /mL              | 4x10 <sup>9</sup> | 100% (3/3)                            |
| 100000 TCID <sub>50</sub> /mL               | 4x10 <sup>8</sup> | 100% (3/3)                            |
| 10000 TCID <sub>50</sub> /mL                | 4x10 <sup>7</sup> | 100% (3/3)                            |
| 1000 TCID <sub>50</sub> /mL                 | 4x10 <sup>6</sup> | 100% (7/7)                            |
| 500 TCID <sub>50</sub> /mL                  | 2x10 <sup>6</sup> | 42,8% (3/7)                           |
| 250 TCID <sub>50</sub> /mL                  | 1x10 <sup>6</sup> | 14,2% (1/7)                           |
| 100 TCID <sub>50</sub> /mL                  | 4x10 <sup>5</sup> | 0% (0/3)                              |

## Clinical performance

| ESPLINE SARS-CoV-2 Ag                      |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|
|  |     | Pos | Neg | Tot |
| RT- PCR Simplexa™<br>COVID-19 Direct Assay | Pos | 5   | 57  | 62  |
|  | Neg | 0   | 74  | 74  |
|  | Tot | 5   | 131 | 136 |

|                              | Proportion<br>(N Pos/N tot) | Percentage             |
|------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Sensitivity                  | 5/62                        | 8.1% (2.7% - 17.8%)    |
| Specificity vs reference PCR | 74/74                       | 100.0% (95.1% -100.0%) |

> *J Infect Chemother.* 2021 Apr 13;S1341-321X(21)00110-0. doi: 10.1016/j.jiac.2021.04.003.  
Online ahead of print.

**Letter of concern re: "Immunochromatographic test for the detection of SARS-CoV-2 in saliva. *J Infect Chemother.* 2021 Feb;27(2):384-386. doi: 10.1016/j.jiac.2020.11.016."**

Giuseppe Sberna<sup>1</sup>, Eleonora Lalle<sup>1</sup>, Maria Rosaria Capobianchi<sup>1</sup>, Licia Bordi<sup>2</sup>,  
Alessandra Amendola<sup>1</sup>

## Probit analysis

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| LOD: TCID <sub>50</sub> /ml | 997       |
| LOD: RNA cp/ml              | 3.890.451 |



- 136 fresh saliva samples within 1-3 days of collection
  - 62 positive with the Simplexa™ COVID-19 Direct
  - 5 positive for both assays
    - slight agreement between the two assays ( $\kappa = 0.087$ )
- Sensitivity on clinical saliva samples is lower than expected based on LOD estimate (Probit)
- Saliva matrix seems unsuitable for lateral flow migration, due mostly to the patient variability in viscosity
- In the current formulation, the lateral flow tests for saliva need careful evaluation

**PROCEDURE OPERATIVE FASE PILOTA SU USO TEST SALIVARI NELLE SCUOLE  
 PREPARAZIONE DELLA SEDUTA DI SCREENING**

- Pilot study coordinated by the Regional Health Authority
- Five primary schools in Rome; 1905 student; median age: 9 (2 -15); 970 males (50.9%) and 935 females (49.1%)
- Sample collected using Salivette by USCAR team; October 6th -November 2th, 2020
- Two-step approach: Lumipulse® G SARS-CoV-2 Ag assay for screening and molecular confirmation of positive samples by Simplexa™ COVID-19 Direct
- 1856/1905 (97.43%) eligible samples. Eight (0. 43%) positive for SARS-CoV-2 antigen, 4 of which confirmed positive with the molecular assay
- The rate of molecular confirmation consistent with PPV in very low prevalence settings.

**Table 1.** Description of the 8 saliva samples resulting antigen-positive with Lumipulse® G SARS CoV-2 Ag.

| Confirmatory test out come | ID   | School | Gender | Age | Lumipulse® G SARS-CoV-2 Ag (pg/mL) | Simplexa™ COVID-19 Direct assay (Ct values) |
|----------------------------|------|--------|--------|-----|------------------------------------|---|
| Positive                   | 6283 | n. 1   | M      | 13  | 44.36                              | 23.4  |
|                            | 4298 | n. 2   | F      | 5   | 33.19                              | 24.8  |
|                            | 4385 | n. 2   | F      | 8   | 1.82                               | 29.1  |
|                            | 4278 | n. 3   | M      | 9   | 1.24                               | 30.4  |
| Negative                   | 4425 | n. 3   | M      | 11  | 1.32                               | >40   |
|                            | 4404 | n. 3   | F      | 9   | 1.18                               | >40   |
|                            | 5481 | n. 4   | F      | 9   | 0.69                               | >40   |
|                            | 5465 | n. 4   | F      | 10  | 0.69                               | >40   |

The screening design and the workflow proved adequate to a large-scale screening in the school setting, with optimal timeline and diagnostic accuracy of the laboratory testing algorithm.

The model can be expanded in a modular way also to other contexts, similar for logistics aspects.





## Procedure operative per il monitoraggio della circolazione di SARS-CoV-2 nelle scuole del Lazio

Fin dall'ottobre 2020, nel Lazio le attività di identificazione dei casi sospetti e *contact tracing*, sono state affiancate da iniziative di sorveglianza attiva nelle scuole, attraverso l'utilizzo di test antigenici, preferibilmente salivari (note regionali n. 850997 del 5/10/2020 e n. 367456 del 23/4/2021).

Per l'anno scolastico 2021/2022, a livello nazionale è prevista l'attuazione del "Piano per il monitoraggio della circolazione del SARS-COV-2 nelle scuole primarie e secondarie di primo grado", approvato da Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute, Ministero dell'Istruzione, Struttura Commissariale per l'emergenza COVID-19 e Conferenza delle Regioni. Nel Lazio, il suddetto Piano prevede l'esecuzione **di un test molecolare su saliva, ogni 15 giorni**, ad un campione di oltre 5.000 studenti delle scuole primarie e secondarie di primo grado.

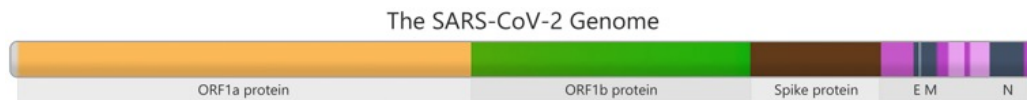
## Cosa si intende per sorveglianza genomica?

I virus sono **in continua evoluzione** e ciò include anche SARS-CoV-2, il virus che causa la COVID-19.

Le **variazioni genetiche si verificano nel tempo** e possono portare **all'emergere di nuove varianti** che possono avere caratteristiche diverse.

**Il sequenziamento genomico** consente di identificare SARS-CoV-2 e **monitorare i suoi cambiamenti nel tempo, sotto forma di nuove varianti**, capire come questi cambiamenti influenzano le caratteristiche del virus e utilizzare queste informazioni per capire meglio l'impatto sulla salute.

Ad esempio, **alcune varianti del virus sono particolarmente preoccupanti perché si diffondono più facilmente, causano malattia più grave o possono sfuggire alla risposta immunitaria.**



SARS-CoV-2 mutation rate estimate:

- Between **1.2/10,000** and **6.6/1,000** nucleotides per year
- Considering a genome of 30,000 nt, we expect about 2 mutations every months (average)
- Continuous check of recognition capacity of primer sets

## L'EVOLUZIONE di SARS-CoV-2

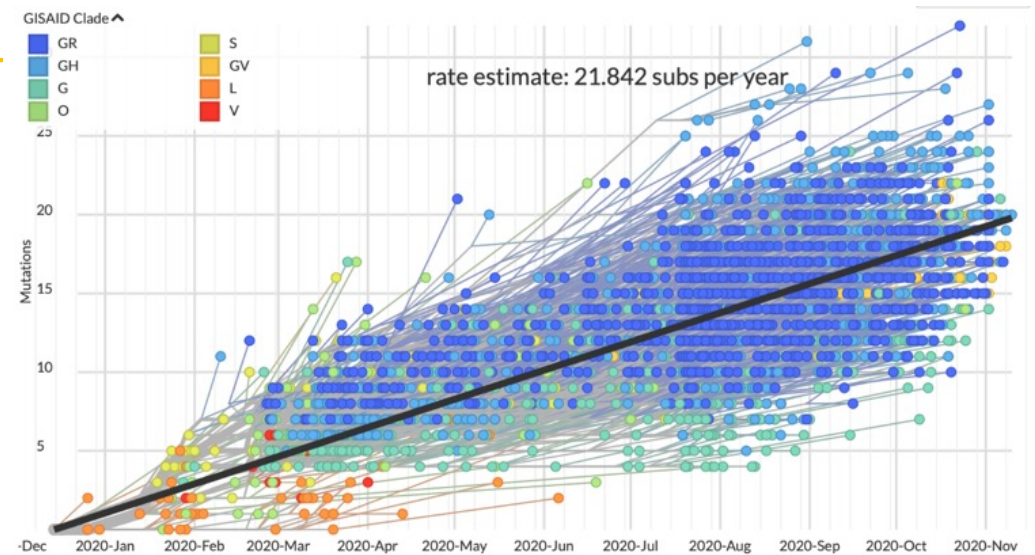
**1. Comparsa di mutazioni durante la trascrizione del genoma virale:** sebbene i coronavirus contengano l'enzima esonucleasi N (ExoN) che rende il loro tasso di mutazione *in-vivo* circa 10 volte inferiore rispetto a quello dell'influenza, durante la replicazione accumulano mutazioni:

Tasso di mutazione:

- Fra **1.2/10,000** e **6.6/1,000** nucleotidi/anno
- Con un genoma di 30,000 nt: **circa 2 mutazioni ogni mese** (media) nella popolazione globale

**2. Ricombinazione tra i genomi** (mediata da ExoN) quando varianti con mutazioni diverse infettano lo stesso ospite.

Una ipotesi è che proprio la ricombinazione tra diversi coronavirus correlati alla SARS potrebbe aver portato alla comparsa di SARS-CoV-2 e, sebbene sia difficile da rilevare a causa della somiglianza della maggior parte delle sequenze, la ricombinazione sta accadendo in una certa misura anche oggi, tra le varianti circolanti di SARS-CoV-2.



**3. Editing dell'RNA virale**, mediato da enzimi della cellula ospite APOBEC e ADAR, contribuisce alla modificazione dell'RNA virale e alla diversità di SARS-CoV-2.

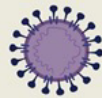
**È indispensabile limitare più possibile la circolazione del virus: non solo per ostacolarne la diffusione, ma anche per ridurre la comparsa di mutanti e diminuire la possibilità di incontro tra virus diversi, portatori di mutazioni complementari e vantaggiose che potrebbero segregare insieme in nuove varianti.**

## SARS-CoV-2 Variants of Concern



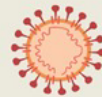
### Alpha Variant (B.1.1.7)

Detected in the United Kingdom in September 2020



### Beta Variant (B.1.351)

Detected in South Africa in October 2020



### Gamma Variant (P.1)

Detected in Brazil in November 2020



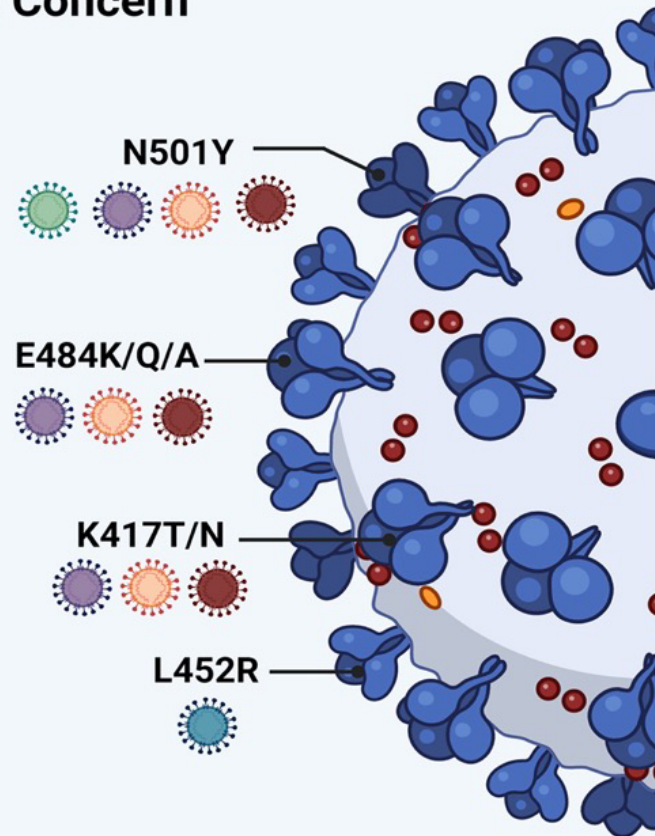
### Delta Variant (B.1.617.2)

Detected in India in December 2020



### Omicron Variant (B.1.1.529)

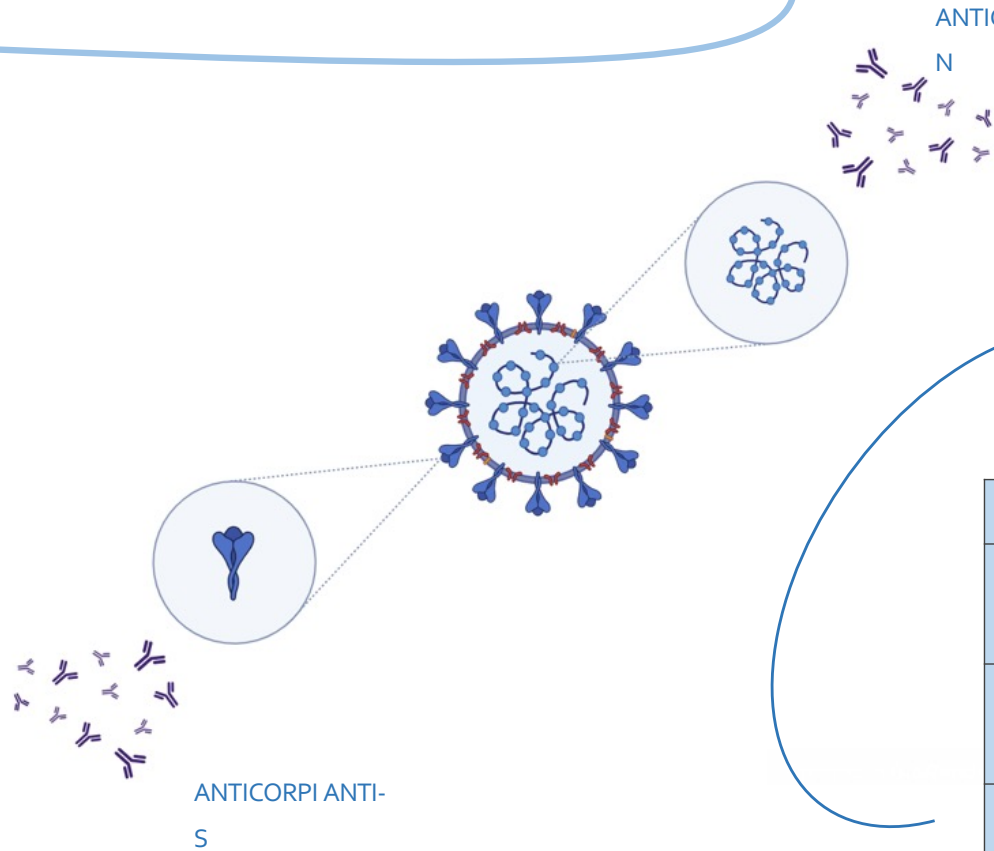
Detected in South Africa in November 2021



# Gli obiettivi del sequenziamento di SARS-CoV-2 durante COVID-19

- Sviluppare **sistemi diagnostici** per SARS-CoV-2
- Sostenere lo **sviluppo di terapie (Ab monoclonali) e vaccini**
- Studiare la **datazione dell'introduzione nell'uomo e l'origine** di SARS-CoV-2
- Studiare **modificazioni del genoma**, con conseguente **impatto su trasmissibilità o patogenicità**
- **Studiare la diffusione geografica** e le reintroduzioni tra le popolazioni
- **Studiare le epidemie in contesti e popolazioni specifiche** (es: ospedali-RSA), tramite campionamento mirato
- **MONITORAGGIO A SCOPO DI SORVEGLIANZA PER CARATTERIZZARE I CEPPI CIRCOLANTI ED INDIVIDUARE NUOVE VARIANTI DI INTERESSE O POTENZIALMENTE MINACCIOSE (SURVEY REGIONALI E NAZIONALI)**

# ANTICORPI ANTI-SARS-CoV-2



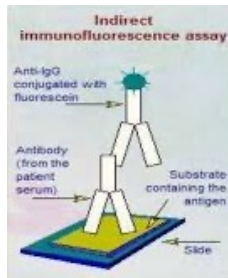
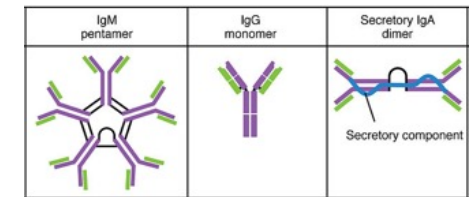
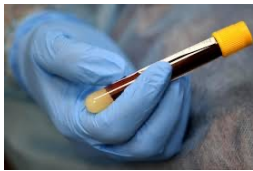
## scientific reports

### Neutralization activity of IgG antibody in COVID-19-convalescent plasma against SARS-CoV-2 variants

Kiyoto Tsuchiya<sup>1,2,3</sup>, Kenji Maeda<sup>2</sup>, Kouki Matsuda<sup>2</sup>, Yuki Takamatsu<sup>2</sup>, Noriko Kinoshita<sup>3</sup>, Satoshi Kutsuna<sup>3</sup>, Tsunefusa Hayashida<sup>1</sup>, Hiroyuki Gatanaga<sup>1,4</sup>, Norio Ohmagari<sup>3</sup>, Shinichi Oka<sup>2,4</sup> & Hiroaki Mitsuya<sup>2,5,6,7</sup>

|                          | ANTI-S | ANTI-N | ANTI-RBD |
|--------------------------|--------|--------|----------|
| POST-INFEZIONE           | ✓      | ✓      | ✓        |
| POST-VACCINO             | ✓      | X      | ✓        |
| CAPACITA' NEUTRALIZZANTE | ✓      | X      | ✓        |

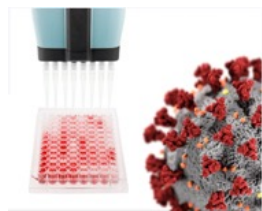
# Serologic test platforms



IFA detect IgA/G/M  
(Vero E6 infected cells)



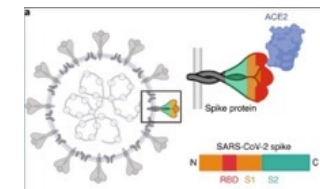
CMIA test detect anti-N IgG



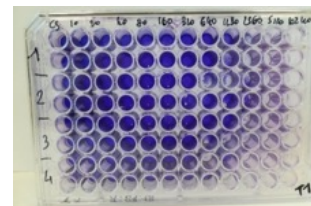
ELISA test detect IgA/G/M  
(crude extract)



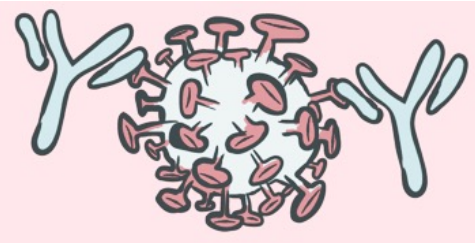
CLIA/CMIA/ELISA test detect anti-S (or anti-RBD) IgG



Immunocromatographic rapid tests for IgM/IgG  
poor sensitivity (and specificity for IgM)



Neutralization assays for neutralizing Antibodies detection



## I test di neutralizzazione vengono effettuati per valutare:

La presenza e persistenza di anticorpi neutralizzanti nei sieri di pazienti convalescenti;

L'idoneità alla donazione di plasma;

L'efficacia di anticorpi monoclonali;

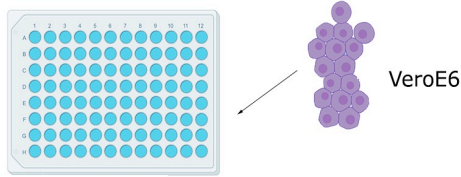
La risposta anticorpale ai vaccini.





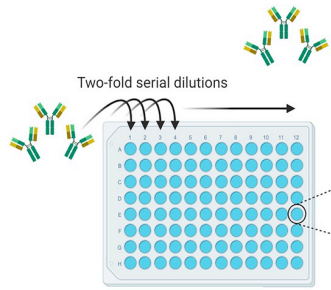
# Neutralization assay at INMI

1 Day 0 plate cells



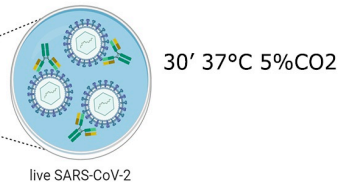
2 Day 1

Collect serum and heat inactivate



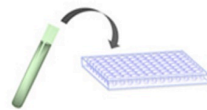
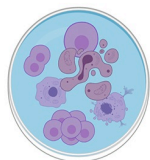
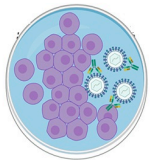
3 Add Virus to sera  
(100 TCID50)

**BSL3**



4 Add serum +/-virus to cells

5 Day 3 Measure Cytopathic effect



stain plates with Crystal Violet/PAF 30'

A large panel of in house neutralization assay has been developed by different laboratories either based on live virus (BSL3) or pseudo-typed viruses (BSL2). Moreover, surrogate tests have been used (e.g. ACE2 competitive assays). Difficult to compare results obtained and published by different groups.



**Wash, Let dry, read plates, calculate 90% neutralization (IC90, protection from CPE)**

|      | 1 | 2     | 3     | 4     | 5     | 6    | 7     | 8     | 1:320 |       | <1:10 Neg |      |       |
|------|---|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-----------|------|-------|
| 640  | A | 44,8  | 67,7  | 34,1  | 33,9  | 16,0 | 21,4  | 45,6  | 21,0  | 87,1  | 66,6      | 42,4 | 22,7  |
| 320  | B | 59,8  | 73,3  | 23,2  | 25,7  | 29,7 | 34,7  | 25,7  | 18,0  | 88,7  | 90,0      | 53,3 | 27,0  |
| 160  | C | 96,4  | 99,9  | 51,8  | 30,3  | 18,6 | 17,7  | 17,7  | 88,4  | 93,0  | 93,1      | 18,2 | 31,3  |
| 80   | D | 96,1  | 99,2  | 65,9  | 88,4  | 30,5 | 19,0  | 92,2  | 96,1  | 94,1  | 91,3      | 29,6 | 30,7  |
| 40   | E | 96,9  | 96,9  | 96    | 89    | 27,9 | 28,1  | 90,6  | 97,5  | 92,9  | 93,2      | 51,2 | 27,0  |
| 20   | F | 99,0  | 96,8  | 93,3  | 90,6  | 40,7 | 21,3  | 97,9  | 94,1  | 95,1  | 96,3      | 80,6 | 116,0 |
| 10   | G | 101,8 | 103,1 | 102,3 | 105,5 | 39,2 | 67,6  | 103,0 | 101,8 | 99,9  | 100,8     | 64,9 | 104,7 |
| Cntr | H | 96,4  | 103,6 | 99,6  | 100,4 | 95,4 | 104,6 | 98,9  | 101,1 | 101,5 | 98,5      | 99,4 | 100,6 |
|      |   | pt1   | pt2   | pt3   | pt4   | pt5  | pt6   |       |       |       |           |      |       |

# LA RISPOSTA ANTICORPALE

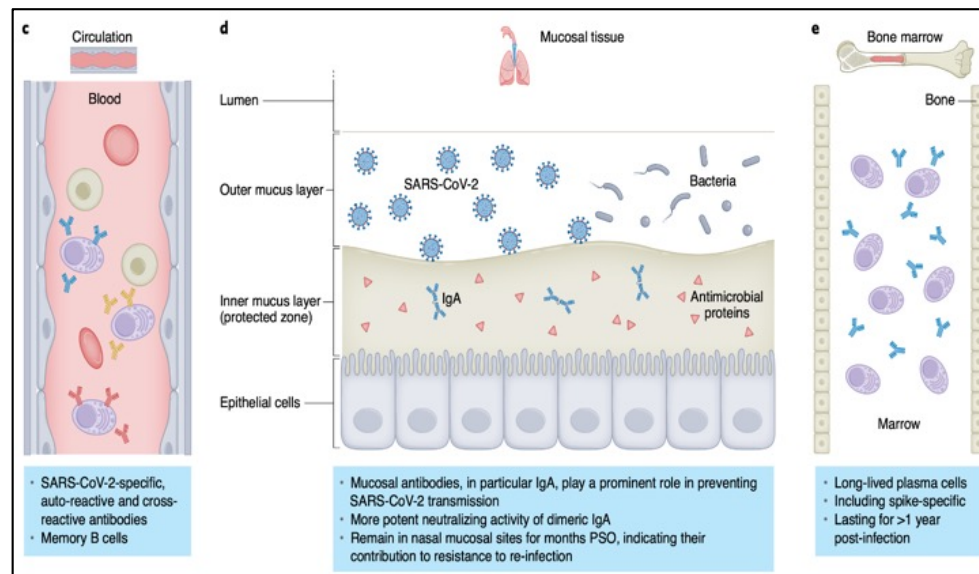
REVIEW ARTICLE | SERIES

<https://doi.org/10.1038/s41590-022-01248-5>

nature  
immunology

## The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection

Hai Qi<sup>1,2,3,4,5,6,9</sup>, Bo Liu<sup>1,2,3</sup>, Xinquan Wang<sup>6,7</sup> and Linqi Zhang<sup>3,4,6,8,9</sup>



### ❖ Risposta umorale sistemica

- ✓ IgG predominanti
- ✓ Rilevabili per diversi mesi

### ❖ Risposta umorale mucosale

- ✓ IgA predominanti
- ✓ Rilevabili per diversi mesi
- ✓ IgA secretorie (dimeriche) elevata attività neutralizzante

### ❖ Plasmacellule a lunga emivita

- ✓ Localizzate nel midollo osseo
- ✓ Protezione a lungo termine

# RISPOSTA ANTICORPALE SISTEMICA

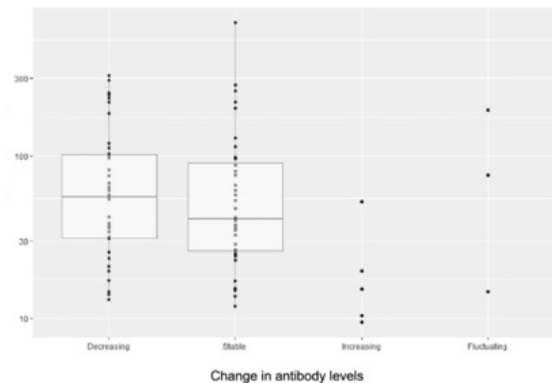
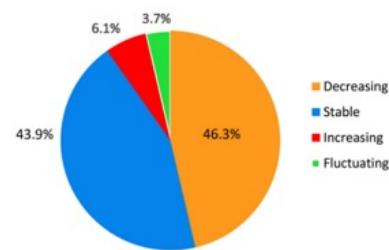
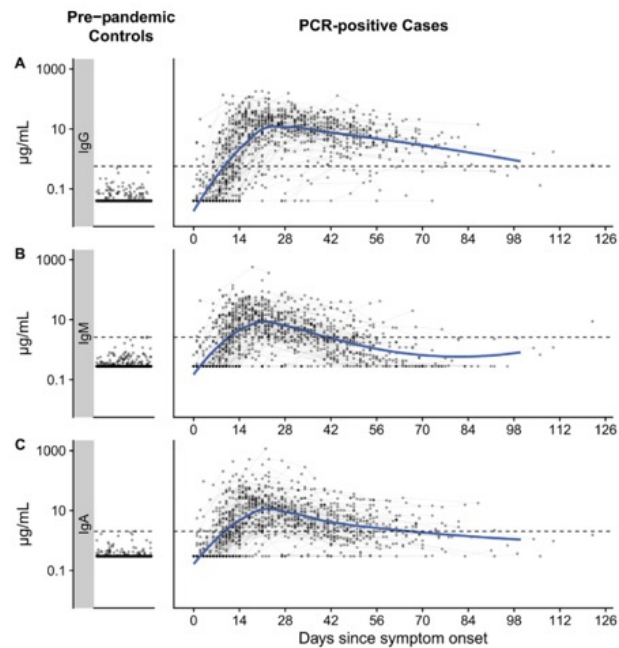
In seguito a infezione...

Science Immunology

## CORONAVIRUS

### Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients

Anita S. Iyer<sup>1,2\*</sup>, Forrest K. Jones<sup>1\*</sup>, Ariana Nodoushani<sup>1\*</sup>, Meagan Kelly<sup>1\*</sup>, Margaret Becker<sup>1\*</sup>, Damien Slater<sup>1\*</sup>, Rachel Mills<sup>1\*</sup>, Erica Teng<sup>1\*</sup>, Mohammad Kamruzzaman<sup>1\*</sup>, Wilfredo F. Garcia-Beltran<sup>1\*</sup>, Michael Astudillo<sup>1\*</sup>, Diane Yang<sup>1\*</sup>, Tyler E. Miller<sup>1\*</sup>, Elizabeth Oliver<sup>1\*</sup>, Stephanie Fischinger<sup>1\*</sup>, Caroline Atyeo<sup>1\*</sup>, A. John Iafrate<sup>1\*</sup>, Stephen B. Calderwood<sup>1,2,3,4\*</sup>, Stephen A. Lauer<sup>1\*</sup>, Jingyou Yu<sup>1\*</sup>, Zhenfeng Li<sup>1\*</sup>, Jared Feldman<sup>1\*</sup>, Blake M. Hauser<sup>1\*</sup>, Timothy M. Caradonna<sup>1\*</sup>, John A. Branda<sup>1\*</sup>, Sarah E. Turbett<sup>1,2,4\*</sup>, Regina C. LaRocque<sup>1,3\*</sup>, Guillaume Mellon<sup>1\*</sup>, Dan H. Barouch<sup>1,4\*</sup>, Aaron G. Schmidt<sup>1,4\*</sup>, Andrew S. Azman<sup>1\*</sup>, Galit Alter<sup>1\*</sup>, Edward T Ryan<sup>1,2,3,5\*</sup>, Jason B. Harris<sup>1,2\*</sup>, Richelle C. Charles<sup>1,2,6\*</sup>



International Journal of Infectious Diseases



### SARS-CoV-2 antibodies persist up to 12 months after natural infection in healthy employees working in non-medical contact-intensive professions

Dymphie Mioch<sup>1,2\*</sup>, Leonard Vanbrabant<sup>1\*</sup>, Johan Reimerink<sup>1\*</sup>, Sandra Kuiper<sup>1\*</sup>, Esther Lodder<sup>1\*</sup>, Wouter van den Bijllaardt<sup>1,2,3,4\*</sup>, Jan Kluytmans<sup>5\*</sup>, Michel D. Wissing<sup>1\*</sup>, for the COCO-study group<sup>#</sup>

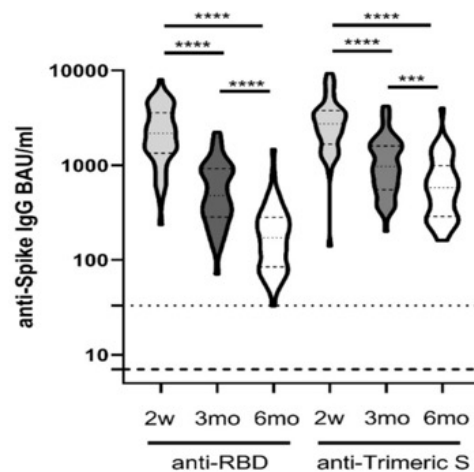
# RISPOSTA ANTICORPALE SISTEMICA

In seguito a vaccino...



Article  
**Differential Dynamics of SARS-CoV-2 Binding and Functional Antibodies upon BNT162b2 Vaccine: A 6-Month Follow-Up**

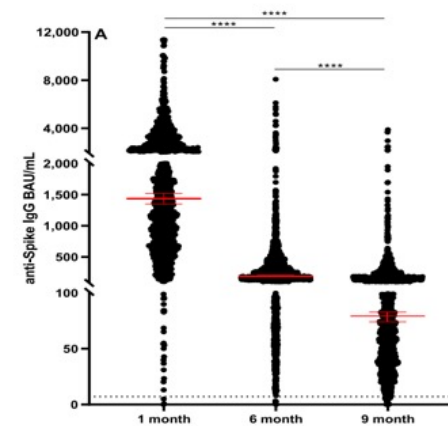
Giulia Matusali <sup>1</sup>, Giuseppe Sberna <sup>1</sup>, Silvia Meschi <sup>1,\*</sup>, Giulia Gramigna <sup>1</sup>, Francesca Colavita <sup>1</sup>, Daniele Lapa <sup>1</sup>, Massimo Francalancia <sup>1</sup>, Aurora Bettini <sup>1</sup>, Maria R. Capobianchi <sup>1</sup>, Vincenzo Puro <sup>2</sup>, Concetta Castilletti <sup>1</sup>, Francesco Vaia <sup>3</sup> and Licia Bordi <sup>1</sup>



Contents lists available at ScienceDirect  
 International Journal of Infectious Diseases  
 journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijid](http://www.elsevier.com/locate/ijid)

Longitudinal dynamics of SARS-CoV-2 anti-receptor binding domain IgG antibodies in a wide population of health care workers after BNT162b2 vaccination

Licia Bordi <sup>1,\*</sup>, Giuseppe Sberna <sup>1,\*</sup>, Cesira Natalina Piscioneri <sup>2</sup>, Rosario Andrea Cocchiara <sup>2</sup>, Anna Miani <sup>2</sup>, Paola Grammatico <sup>3</sup>, Bruno Mariani <sup>4,\*</sup>, Gabriella Parisi <sup>4</sup>



# RISPOSTA ANTICORPALE SISTEMICA

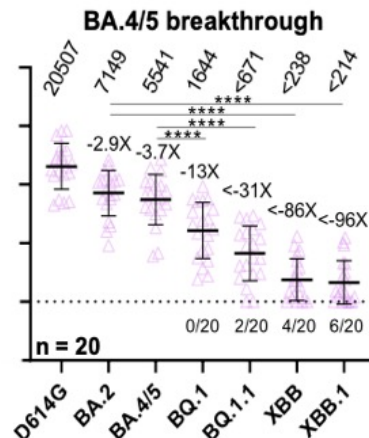
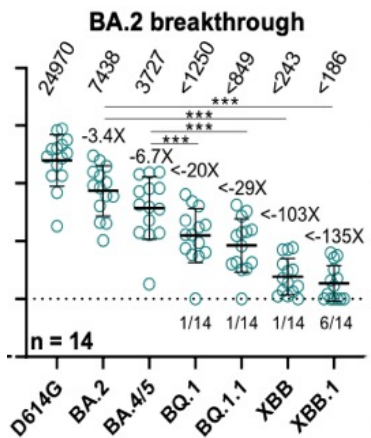
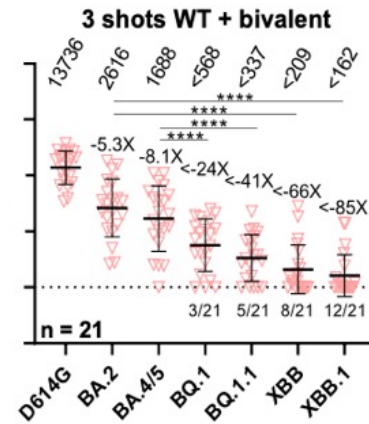
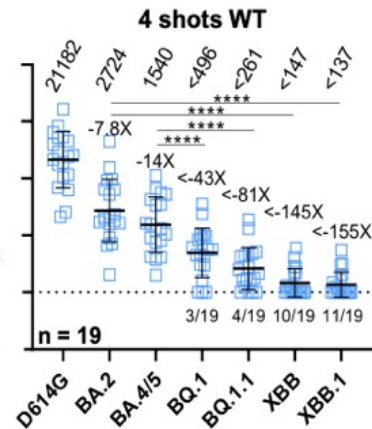
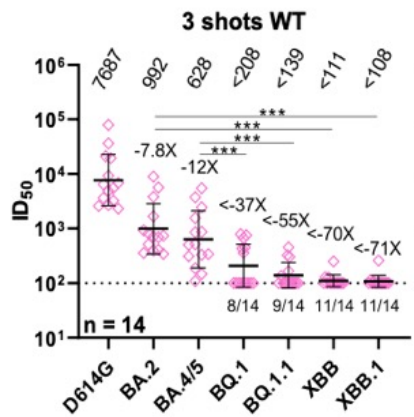
*In realtà..*



## ❖ Fattori che influiscono sulla risposta immunitaria

- ✓ evoluzione del virus  
*(Mlcochova P. et al, 2021; Wang Q. et al, 2023..)*
- ✓ immunità ibrida  
*(AbdelWareth L. et al, 2023..; Barateau V. et al, 2023; Minjun K. et al, 2024..)*
- ✓ età  
*(Kim M. et al, 2024..)*
- ✓ sesso  
*(Bordi L. et al, 2022..)*
- ✓ numero di dosi di vaccino  
*(Nah E. et al, 2023..)*
- ✓ comorbidity  
*(Das D. et al, 2023..)*
- ✓ condizioni di immunodepressione  
*(Strengert M. et al, 2021; Oyaert M. et al 2022..)*

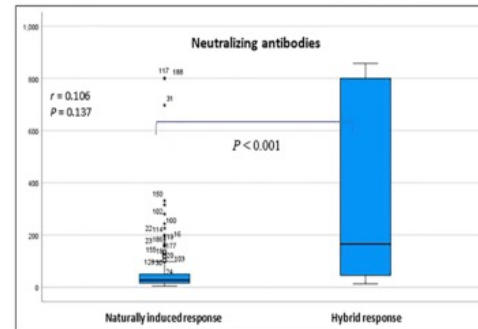
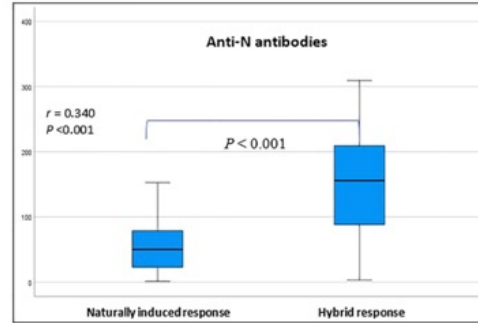
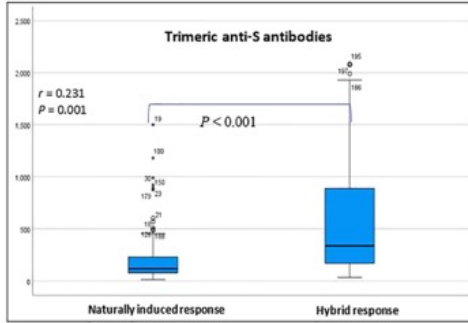
# EVOLUZIONE DEL VIRUS



Cell

## Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants

Qian Wang, Sho Iketani, Zhiteng Li, ...,  
Aubree Gordon, Lihong Liu, David D. Ho



frontiers | Frontiers in Immunology

## Natural infection versus hybrid (natural and vaccination) humoral immune response to SARS-CoV-2: a comparative paired analysis

Laila AbdelWareth<sup>1,2</sup>, Farida Alhousani<sup>1</sup>, Rowan Abuyadek<sup>1,4</sup>, James Donnelly<sup>1</sup>, Andrea Leinberger-Jabari<sup>1</sup>, Shereen Atef<sup>1,6a</sup> and Rami H. Al-Rifai<sup>7b</sup>

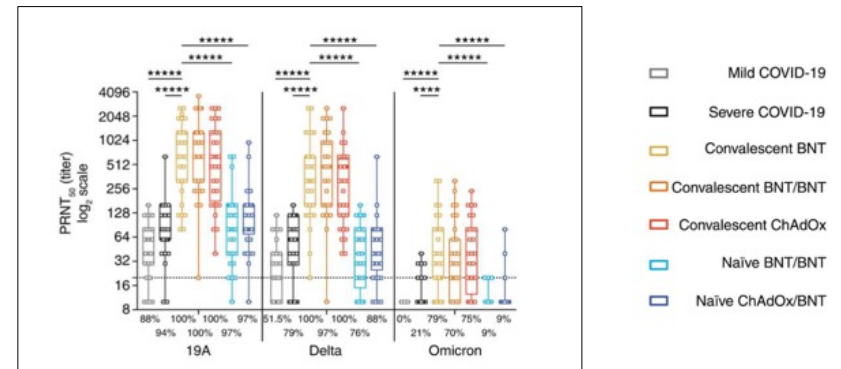
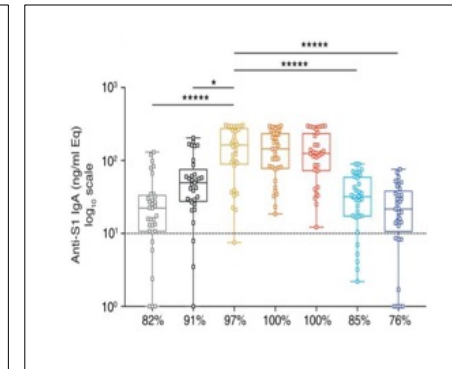
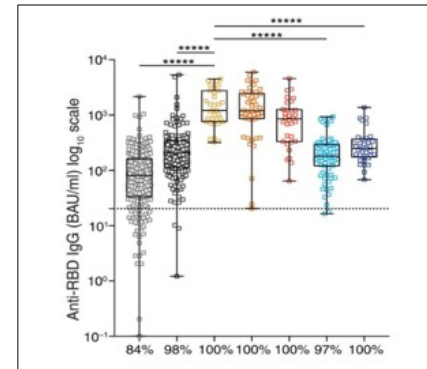
# IMMUNITA' IBRIDA

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

## CORONAVIRUS

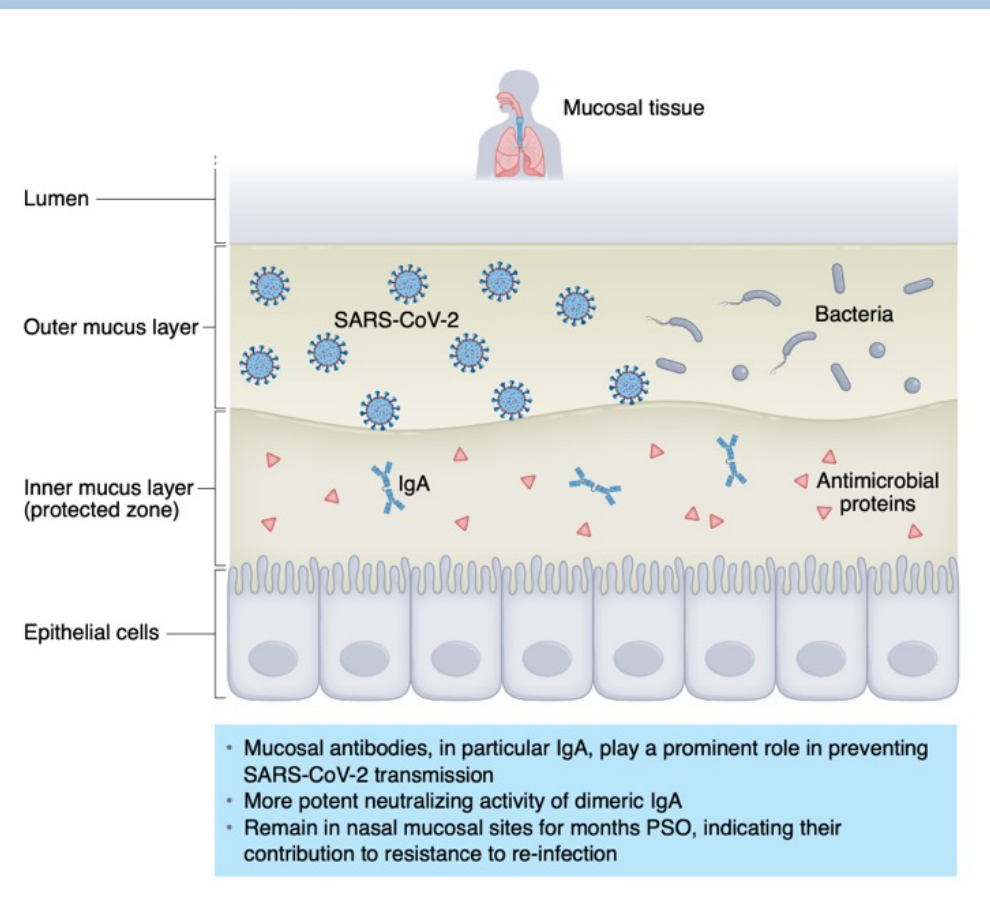
# Prior SARS-CoV-2 infection enhances and reshapes spike protein-specific memory induced by vaccination

Véronique Barateau<sup>1†</sup>, Loïc Peyrot<sup>1†</sup>, Carla Saade<sup>1†</sup>, Bruno Pozzetto<sup>1,2†</sup>, Karen Brengel-Pesce<sup>3†</sup>, Mad-Hélénie Elsensohn<sup>4,5</sup>, Omran Allatif<sup>1</sup>, Nicolas Guibert<sup>6</sup>, Christelle Compagnon<sup>3</sup>, Natacha Mariano<sup>7</sup>, Julie Chaix<sup>7</sup>, Sophia Djebali<sup>1</sup>, Jean-Baptiste Fassier<sup>6</sup>, Bruno Lina<sup>1,8</sup>, Katia Lefsilhane<sup>1</sup>, Maxime Espi<sup>1</sup>, Olivier Thauinat<sup>1</sup>, Jacqueline Marvel<sup>1</sup>, Manuel Rosa-Calatrava<sup>1</sup>, Andres Pizzorno<sup>1</sup>, Delphine Maucort-Boulch<sup>4,5</sup>, Laetitia Henaff<sup>1,9</sup>, Mitra Saadatian-Elahi<sup>1,9</sup>, Philippe Vanhems<sup>1,9</sup>, Stéphane Paul<sup>1,2a†</sup>, Thierry Walzer<sup>1a†</sup>, Sophie Trouillet-Assant<sup>1,2a†</sup>, Thierry Defrance<sup>1a†</sup>



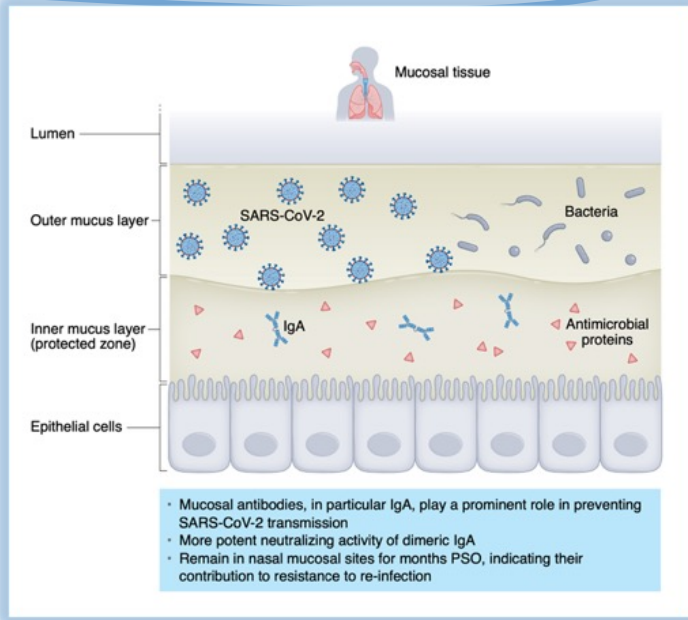
- Mild COVID-19
- ▣ Severe COVID-19
- ▤ Convalescent BNT
- ▥ Convalescent BNT/BNT
- ▦ Convalescent ChAdOx
- ▧ Naïve BNT/BNT
- ▨ Naïve ChAdOx/BNT

## LA RISPOSTA UMORALE MUCOSALE





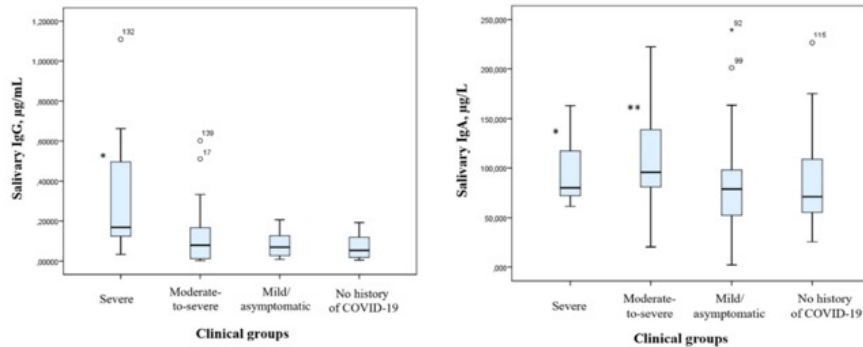
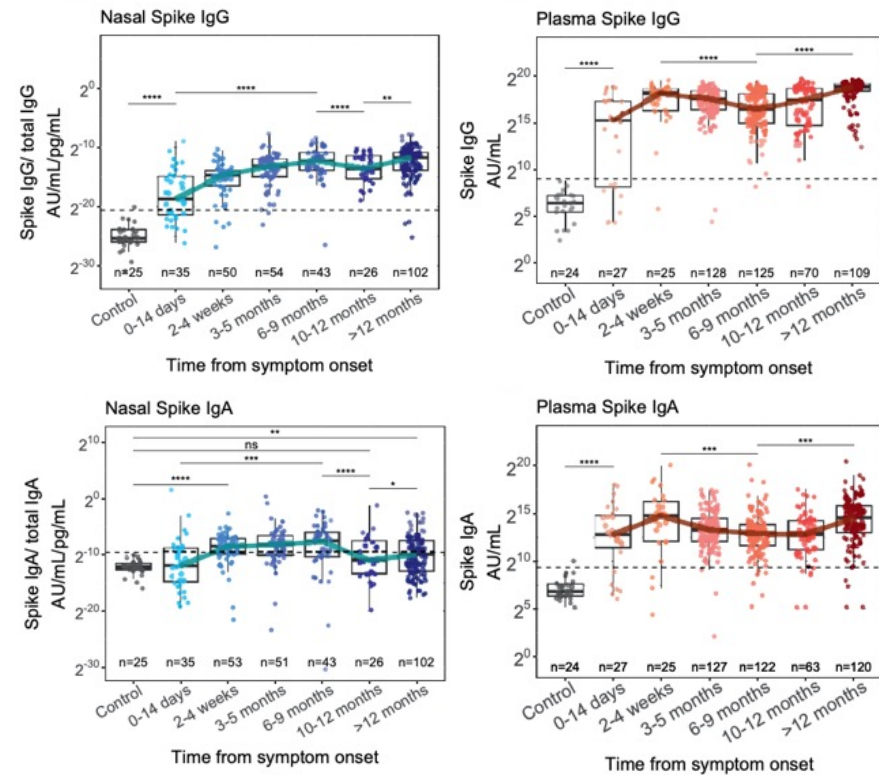
# RISPOSTA ANTICORPALE MUCOSALE



In seguito a infezione...

## SARS-CoV-2-specific nasal IgA wanes 9 months after hospitalisation with COVID-19 and is not induced by subsequent vaccination

Felicity Liew,<sup>1,2,3</sup> Shubha Talwar,<sup>4</sup> Andy Cross,<sup>5</sup> Brian J. Willett,<sup>6</sup> Sam Scott,<sup>7</sup> Nicola Logan,<sup>8</sup> Matthew K. Siggins,<sup>9</sup> Dawid Swiebeda,<sup>10</sup> Jasmin K. Sidhu,<sup>11</sup> Claudia Efsthathiou,<sup>12</sup> Shona C. Moore,<sup>13</sup> Chris Davis,<sup>14</sup> Noura Mohamed,<sup>15</sup> Jose Nunag,<sup>16</sup> Clara King,<sup>17</sup> A. A. Roger Thompson,<sup>18</sup> Sarah L. Rowland-Jones,<sup>19</sup> Annemarie B. Docherty,<sup>20</sup> James D. Chalmers,<sup>21</sup> Ling-Pei Ho,<sup>22</sup> Alexander Horsley,<sup>23</sup> Betty Raman,<sup>24</sup> Krishah Poinasamy,<sup>25</sup> Michael Marks,<sup>26</sup> Onn Min Kon,<sup>27</sup> Luke Howard,<sup>28</sup> Daniel G. Wootton,<sup>29</sup> Susanna Dunachie,<sup>30</sup> Jennifer K. Quint,<sup>31</sup> Rachael A. Evans,<sup>32</sup> Louise V. Wain,<sup>33</sup> Sara Fontanella,<sup>34</sup> Thushan I. de Silva,<sup>35</sup> Antonia Ho,<sup>36</sup> Ewan Harison,<sup>37</sup> J. Kenneth Bailie,<sup>38</sup> Malcolm G. Semple,<sup>39</sup> Christopher Brightling,<sup>40</sup> Ryan S. Thwaites,<sup>41,42,43,44,45</sup> Lance Turtle,<sup>46,47,48</sup> and Peter J. M. Openshaw,<sup>49,50</sup> on behalf of the ISARIC4C Investigators and the PHOSP-COVID collaborative group



scientific reports

## Mucosal immunity in health care workers' respiratory tracts in the post-COVID-19 period

Nadezhda Kryukova<sup>1,2,3</sup>, Irina Baranova<sup>1</sup>, Natalia Abramova<sup>2</sup>, Ekaterina Khromova<sup>2</sup>, Dmitry Pachomov<sup>2</sup>, Oksana Svitich<sup>2</sup>, Alexander Chuchalin<sup>1</sup> & Mikhail Kostinov<sup>2,3</sup>

# RISPOSTA ANTICORPALE MUCOSALE

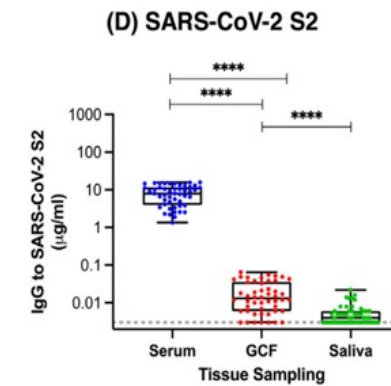
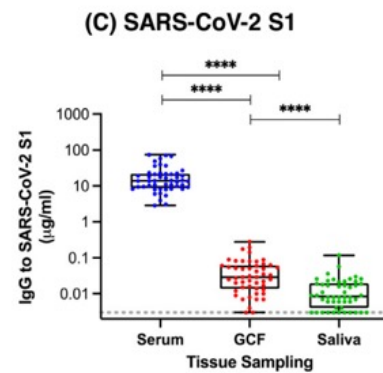
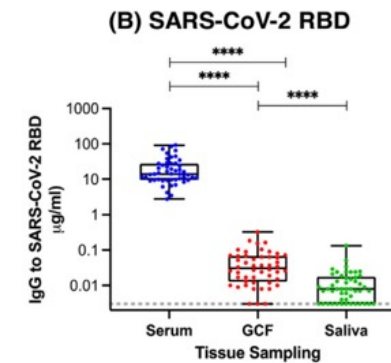
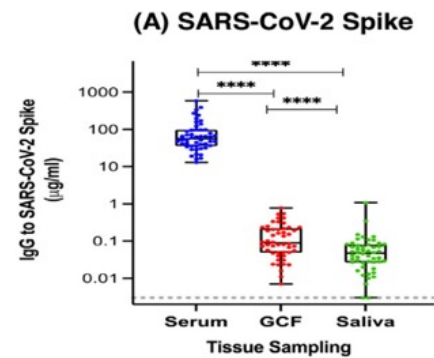
In seguito a vaccino...

INTERNATIONAL DENTAL JOURNAL 73 (2023) 435–442

Scientific Research Report

## BNT162b2 mRNA Vaccine–Induced Immune Response in Oral Fluids and Serum

Chaminda Jayampath Seneviratne<sup>a,b,1</sup>, Preethi Balan<sup>a,b,1</sup>,  
Ruklanthi de Alwis<sup>c,d</sup>, Nadeeka S. Udawatte<sup>e</sup>, Thanuja Herath<sup>a,b</sup>,  
Justin Z.N. Toh<sup>f,g</sup>, Goh Bee Tin<sup>h</sup>, Eng Eong Ooi<sup>i,j</sup>, Jenny Low Guek Hong<sup>c,d,k</sup>,  
Jean Sim Xiang Ying<sup>l</sup>

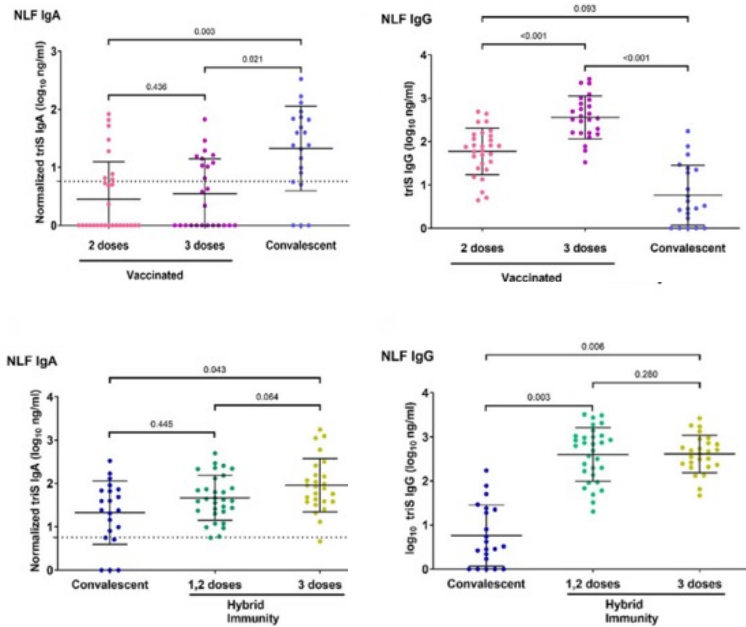


# RISPOSTA ANTICORPALE MUCOSALE

In seguito a vaccino...

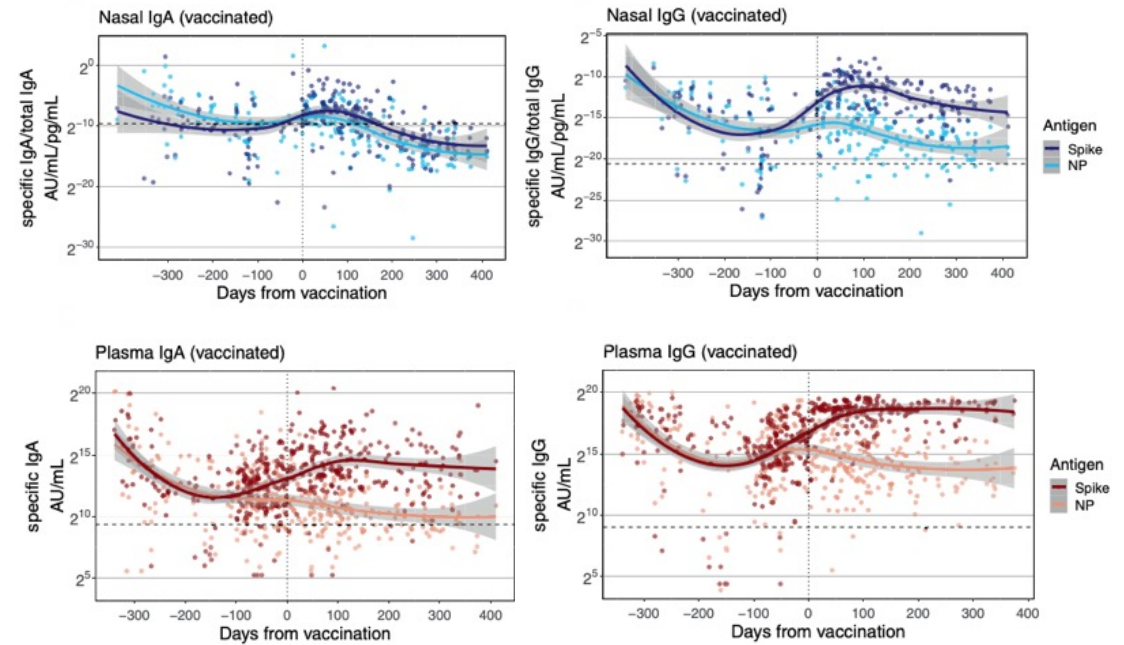
## SARS-CoV-2 convalescence and hybrid immunity elicits mucosal immune responses

Olha Puhach,<sup>a</sup> Mathilde Bellen,<sup>a</sup> Kenneth Adea,<sup>a</sup> Meriem Bekriz,<sup>a</sup> Krisztina Hosszu-Fellous,<sup>b,c</sup> Pascale Sattinnet,<sup>a</sup> Nicolas Hula,<sup>d</sup> Laurent Kaiser,<sup>b,c</sup> Isabella Eckerle,<sup>a,b</sup> and Benjamin Mever<sup>a\*</sup>

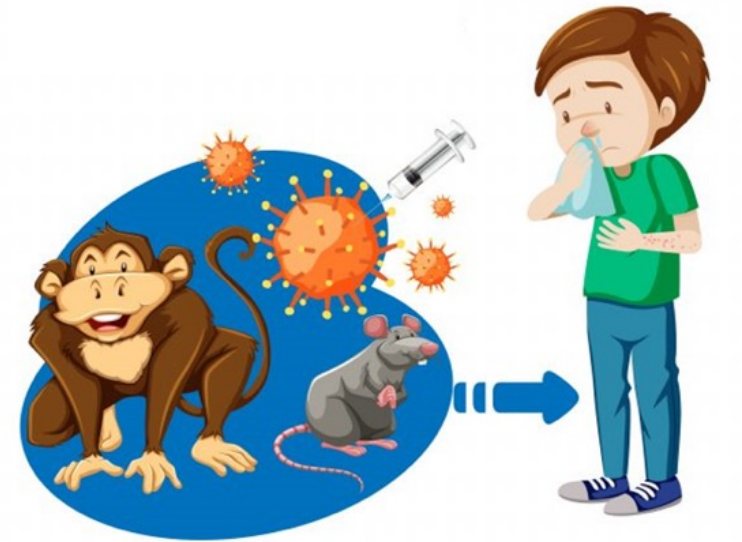


## SARS-CoV-2-specific nasal IgA wanes 9 months after hospitalisation with COVID-19 and is not induced by subsequent vaccination

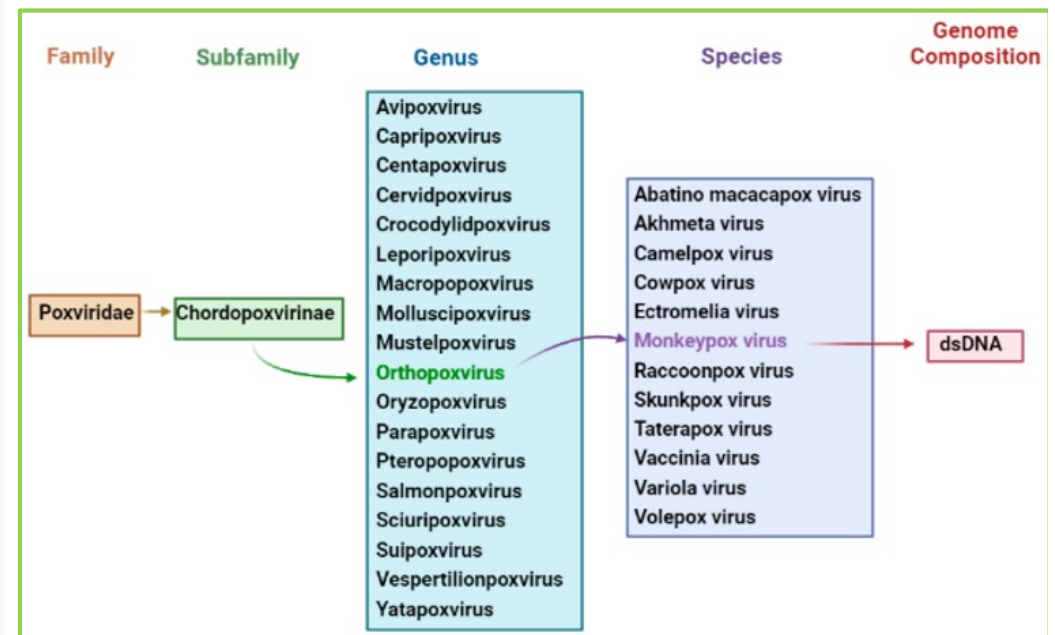
Felicity Liew,<sup>a,b</sup> Shubha Talwar,<sup>a</sup> Andy Cross,<sup>a</sup> Brian J. Willett,<sup>a</sup> Sam Scott,<sup>a</sup> Nicola Logan,<sup>a</sup> Matthew K. Siggins,<sup>a</sup> Dawid Swiebocka,<sup>a</sup> Jasmin K. Sidhu,<sup>a</sup> Claudia Efsthathiou,<sup>a</sup> Shona C. Moore,<sup>a</sup> Chris Davis,<sup>a</sup> Noura Mohamed,<sup>a</sup> Jose Nunag,<sup>a</sup> Clara King,<sup>a</sup> A. A. Roger Thompson,<sup>a</sup> Sarah L. Rowland-Jones,<sup>a</sup> Annemarie B. Docherty,<sup>a</sup> James D. Chalmers,<sup>a</sup> Ling-Pei Ho,<sup>a</sup> Alexander Horsley,<sup>a</sup> Betty Raman,<sup>a</sup> Krisnah Poinasamy,<sup>a</sup> Michael Marks,<sup>a</sup> Onn Min Kon,<sup>a</sup> Luke Howard,<sup>a</sup> Daniel G. Wootton,<sup>a</sup> Susanna Dunachie,<sup>a</sup> Jennifer K. Quint,<sup>a</sup> Rachael A. Evans,<sup>a</sup> Louise V. Wain,<sup>a</sup> Sara Fontanella,<sup>a</sup> Thushan I. de Silva,<sup>a</sup> Antonia Ho,<sup>a</sup> Ewen Harrison,<sup>a</sup> J. Kenneth Bailie,<sup>a</sup> Malcolm G. Semple,<sup>a</sup> Christopher Brightling,<sup>a</sup> Ryan S. Thwaites,<sup>a,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o</sup> Lance Turtle,<sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o</sup> and Peter J. M. Openshaw,<sup>a,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o</sup> on behalf of the ISARIC4C Investigators and the PHOSP-COVID collaborative group



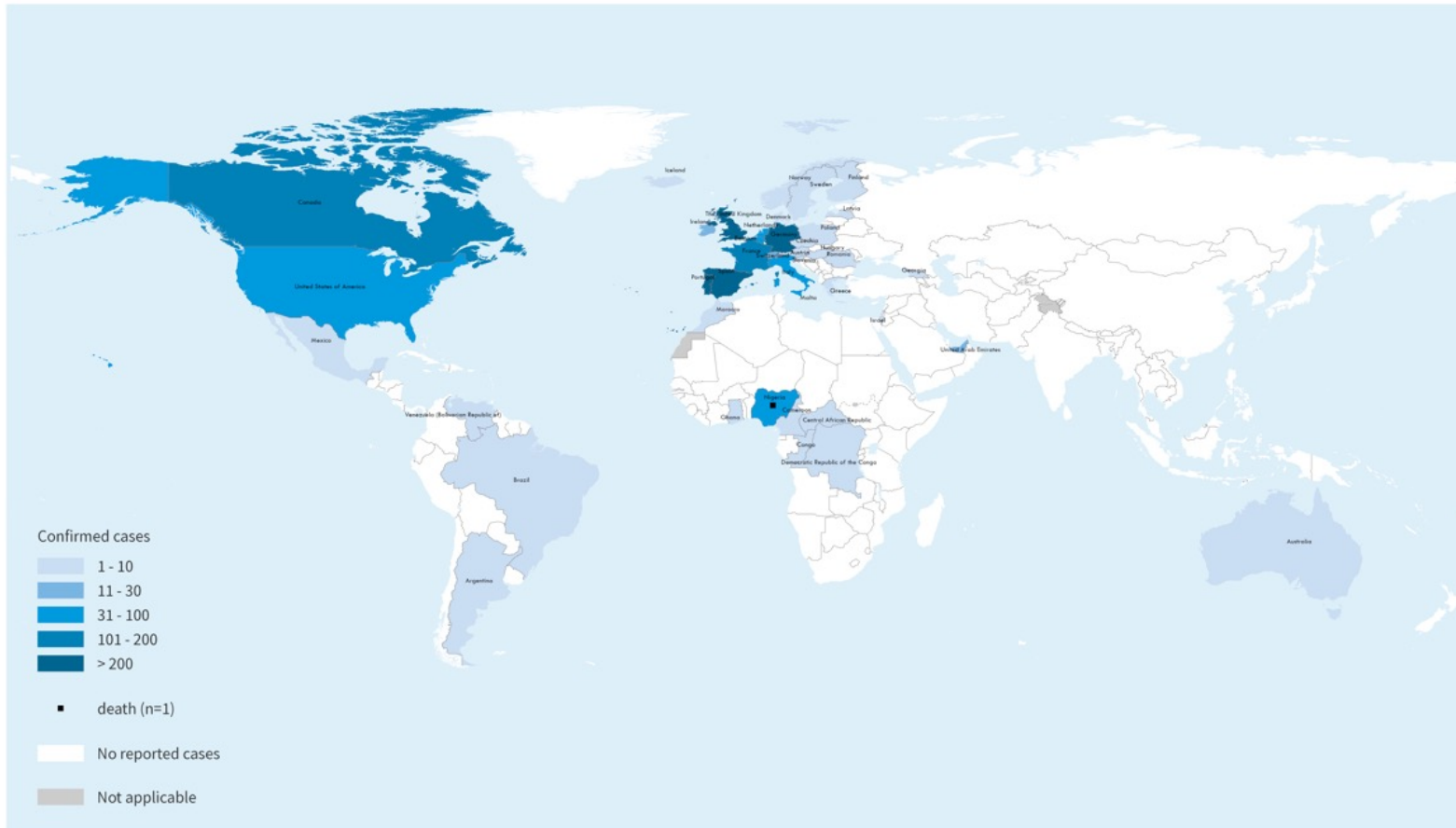
# Monkeypox Virus



- ✓ Virus zoonotico appartenente alla famiglia Poxviridae, genere Orthopoxvirus
- ✓ Due clade geneticamente distinti: Clade I (Africa centrale) + virulento con tasso di mortalità circa 10%; Clade II, (Africa occidentale) con sotto-clade IIa e IIb (recenti epidemie tasso di mortalità 3-6%)
- ✓ Primo rilevamento di MPXV in un essere umano nel 1970 nella regione equatoriale della Repubblica Democratica del Congo (RDC), nove mesi dopo l'eradicazione del vaiolo in quel paese.
- ✓ Casi sporadici nelle aree della foresta pluviale dell'Africa centrale e occidentale.
- ✓ Grandi focolai, soprattutto nella RDC, dove la malattia è attualmente considerata endemica
- ✓ Casi sporadici importati: Regno Unito , Israele e Singapore
- ✓ Maggio 2022: epidemia in più paesi dell'UE/SEE
- ✓ inserito dall'OMS nell'elenco delle malattie a potenziale epidemico o pandemico



## Distribuzione geografica dei casi di Monkeypox identificati dal WHO tra il 1 gennaio e il 15 giugno 2022

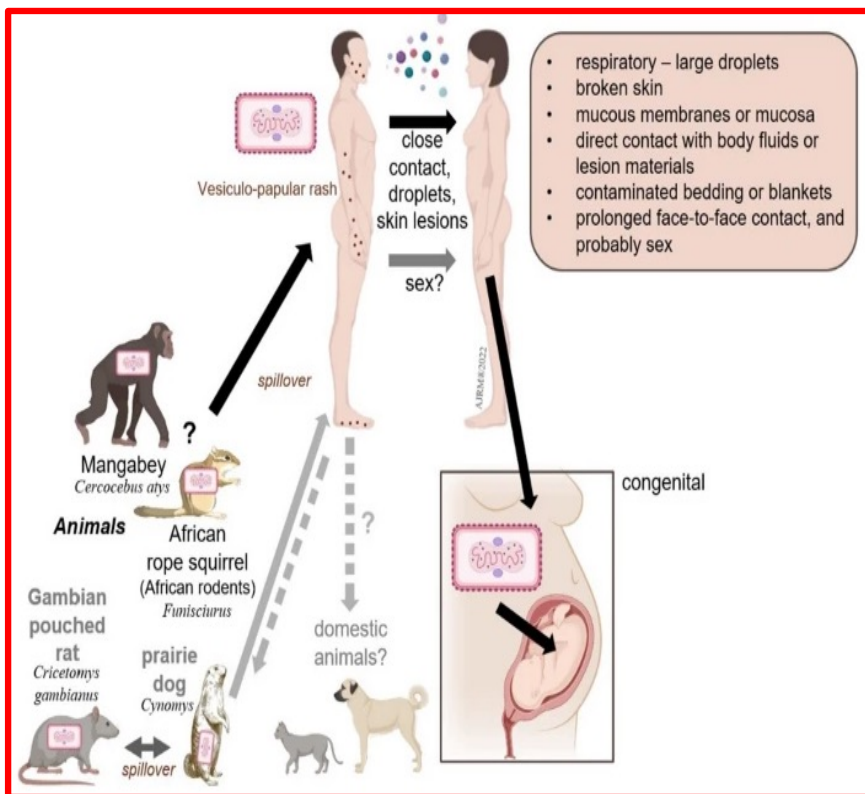


The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of WHO concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. 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  
Map Date: 17 June 2022

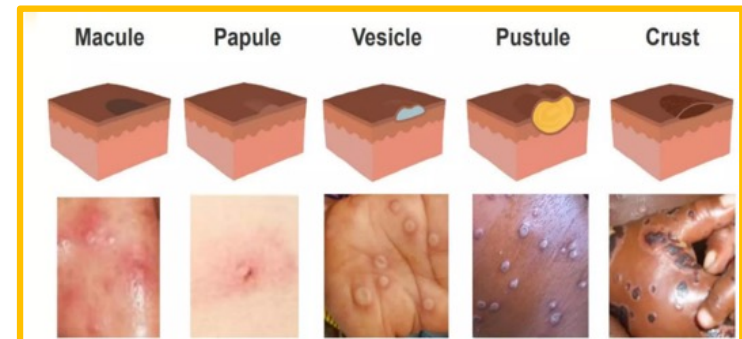
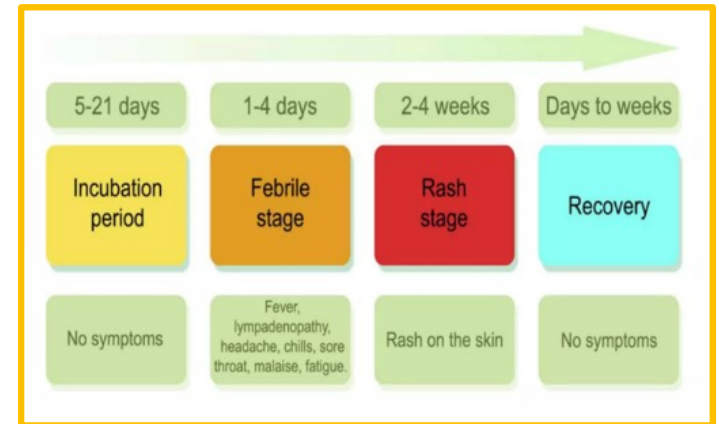
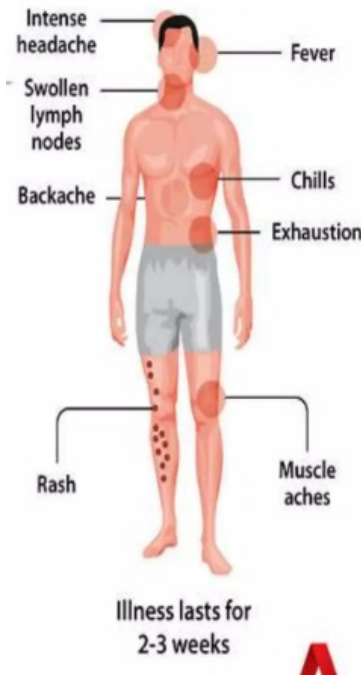
# Trasmissione e decorso

L'MPXV si trasmette all'uomo attraverso il contatto stretto con un animale o un essere umano infetto o attraverso il contatto con materiale contaminato dal virus. Il virus entra nel corpo attraverso la pelle rotta o le mucose. Descritta la trasmissione da madre a feto.



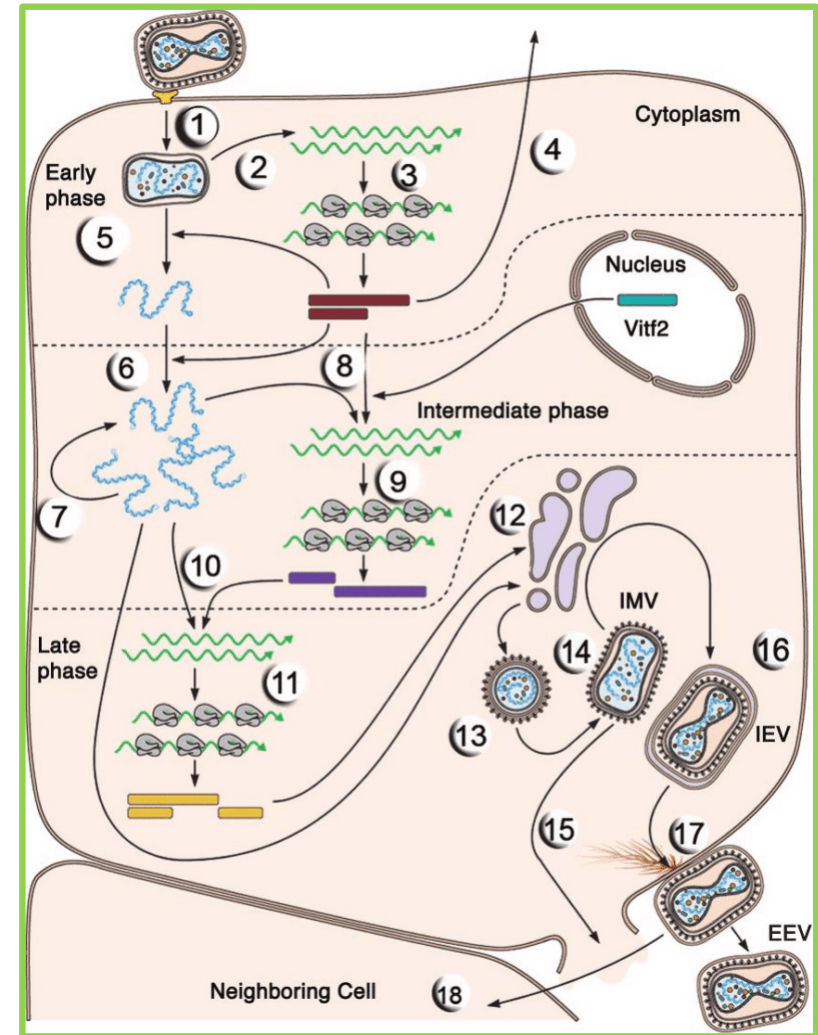
- respiratory – large droplets
- broken skin
- mucous membranes or mucosa
- direct contact with body fluids or lesion materials
- contaminated bedding or blankets
- prolonged face-to-face contact, and probably sex

## SYMPTOMS

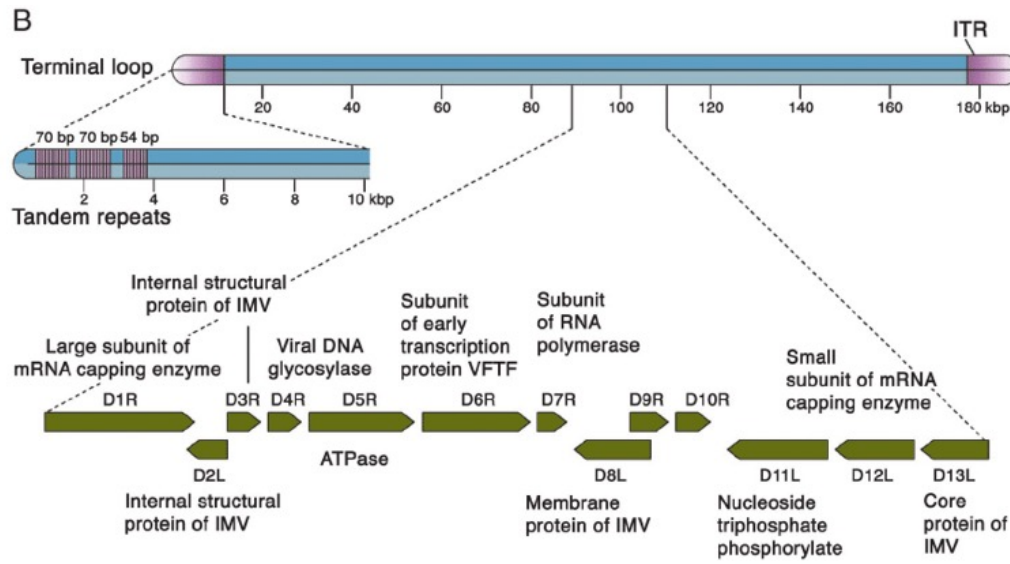
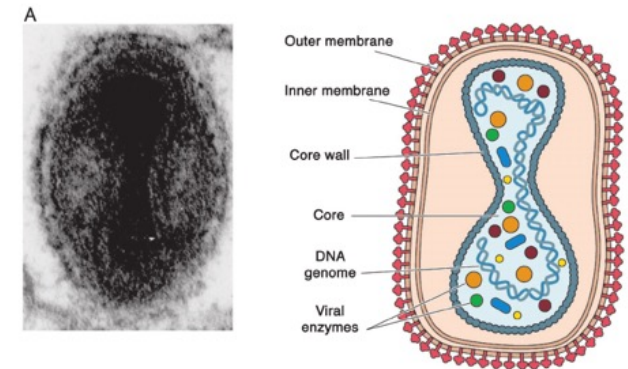


## CICLO REPLICATIVO

- Ingresso virale attraverso le interazioni tra più ligandi virali e recettori sulla superficie cellulare (condroitin solfato o l'eparan solfato)
- Attraversamento della membrana cellulare mediato dalla fusione virale o dall'assorbimento endosomiale (pH-dipendente).
- Replicazione CITOPLASMATICA... NON nucleare
- Nel citoplasma cellulare il virus rilascia fattori virali che disabilitano le difese cellulari e stimolano l'espressione dei geni precoci.
- La sintesi delle prime proteine promuove l'ulteriore rimozione del rivestimento, la replicazione del DNA e la produzione di fattori di trascrizione intermedi.
- I geni intermedi vengono trascritti e tradotti per indurre l'espressione di geni tardivi che funzionano principalmente come proteine strutturali, enzimi e fattori di trascrizione.
- Alla fine strutture di membrana e genomi virionici vengono assemblati in virioni nascenti che contengono tutti gli enzimi, i fattori e le informazioni genetiche necessarie per un nuovo ciclo infettivo.



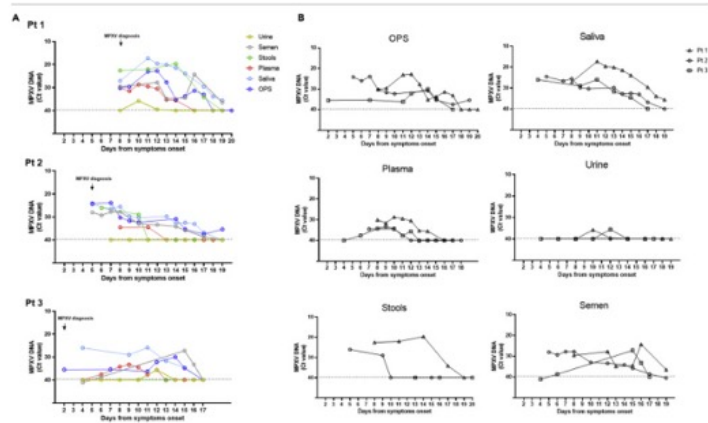
- ✓ Particelle virali dei *poxvirus* grandi e complesse, con **pericapside** formato da molteplici strati di membrane modificate
- ✓ Al microscopio elettronico:
  - all'esterno della cellula presentano una forma a manubrio, mentre appaiono a forma tondeggiante e compatta all'interno della cellula.
  - dimensioni del capsid: circa 200 nanometri in diametro e 300 nanometri in lunghezza.
  - core biconcavo



- Genoma dsDNA lineare di **130-300 Kbp**
- Regione centrale del genoma conservata; codifica per le proteine essenziali per la replicazione del virus
- Regioni fiancheggianti :codificano per proteine che determinano la gamma dell'ospite, la virulenza e l'immunomodulazione.
- Legame covalente che unisce i due filamenti di DNA su entrambe le estremità
- Le estremità di ciascun filamento di DNA hanno sequenze nucleotidiche ripetute in tandem lunghe invertite che formano anelli a filamento singolo

Structure and organization of the genome of vaccinia virus. ITR, inverted terminal repetitions; IMV, immature virion. Reproduced from Flint, S.J. et al., 2009. *Principles of Virology*, third ed., ASM Press, Washington, DC, with permission.

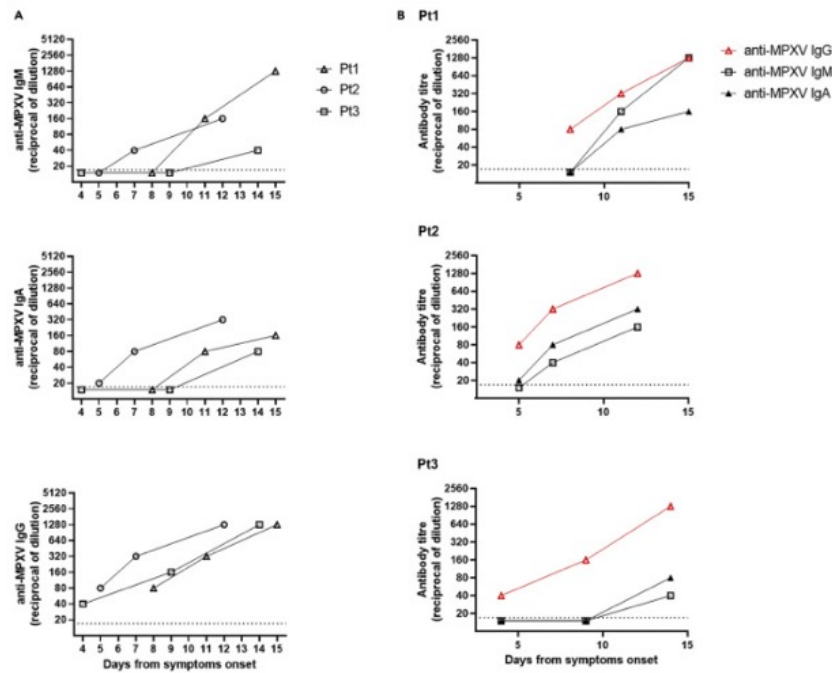
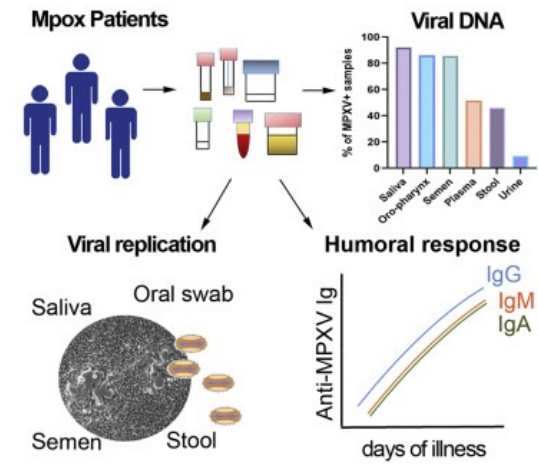




Download : [Download high-res image \(584KB\)](#)

Download : [Download full-size image](#)

Figure 1. Kinetics of MPXV DNA shedding in different biological samples (other than skin lesions samples) from the onset of the symptoms throughout infection



Download : [Download high-res image \(512KB\)](#)

Download : [Download full-size image](#)

Figure 3. Kinetics of anti-MPXV antibody response throughout the infection

Table 3. MPXV isolation from different body fluids

| Type of specimen | Pt | Days from symptoms onset | MPXV rtPCR Ct value <sup>a</sup> | Viral culture |
|------------------|----|--------------------------|----------------------------------|---------------|
| Saliva           | 1  | 13                       | 20.2                             | Pos           |
|                  |    | 15                       | 23.9                             | Neg           |
|                  |    | 17                       | 29.7                             | Neg           |
| OPS              | 1  | 12                       | <b>23.1</b>                      | <b>Pos</b>    |
|                  |    | 13                       | 22.8                             | Neg           |
|                  |    | 16                       | 31.4                             | Neg           |
| Semen            | 2  | 6                        | <b>29.3</b>                      | <b>Pos</b>    |
|                  |    | 8                        | 29.7                             | Neg           |
|                  |    | 8                        | 27.9                             | Neg           |
| Stool            | 1  | 12                       | 27.8                             | Neg           |
|                  |    | 16                       | 24.3                             | Neg           |
|                  |    | 2                        | 5                                | 26.2          |
| Plasma           | 1  | 11                       | <b>22.1</b>                      | <b>Pos</b>    |
|                  |    | 14                       | 19.8                             | Neg           |
|                  |    | 1                        | 8                                | 28.7          |
| Urine            | 1  | 10                       | 29.5                             | Neg           |
|                  |    | 11                       | 30.5                             | Neg           |

<sup>a</sup>

The Ct value is referred to the clinical sample tested for MPXV DNA. Positive results are shown in bold.



Comment

## Monkeypox virus isolation from a semen sample collected in the early phase of infection in a patient with prolonged seminal viral shedding

Daniele Lapa<sup>a</sup>, Fabrizio Carletti<sup>a</sup>, Valentina Mazzotta<sup>b</sup>, Giulia Matusali<sup>a</sup>, Carmelo Pinnetti<sup>b</sup>, Silvia Meschi<sup>a</sup>, Roberta Gagliardini<sup>b</sup>, Francesca Colavita<sup>a</sup>, Annalisa Mondì<sup>b</sup>, Claudia Minosse<sup>a</sup>, Laura Scorzoloni<sup>b</sup>, Stefania Cicalini<sup>b</sup>, Gaetano Maffionelli<sup>b</sup>, Eliana Specchiarellò<sup>a</sup>, Marta Camici<sup>b</sup>, Aurora Bettini<sup>a</sup>, Francesco Baldini<sup>b</sup>, Massimo Francalancia<sup>a</sup>, Klizia Mizzoni<sup>a</sup>, Anna Rosa Garbuglia<sup>a</sup>, Fabrizio Maggi<sup>a</sup>

Show more

+ Add to Mendeley Share Cite

Table. Timeline of monkeypox virus DNA detection in plasma, urine, and semen samples with increasing days from symptom onset

|                     | Day 5           | Day 6           | Day 7           | Day 8           | Day 9    | Day 10   | Day 11   | Day 13   | Day 14          | Day         |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------|----------|----------|----------|-----------------|-------------|
| Plasma              | NA              | NA              | NA              | Positive (34.5) | NA       | Negative | NA       | Negative | NA              | Neg         |
| Urine               | NA              | NA              | Negative        | NA              | Negative | NA       | Negative | Negative | NA              | Neg         |
| Semen               | Positive (28.0) | Positive (29.3) | Positive (27.8) | NA              | NA       | NA       | NA       | NA       | Positive (34.3) | Posi (35.0) |
| Rash or skin lesion | Positive        | Positive        | Positive        | Positive        | Positive | Positive | Positive | Positive | Positive        | Posi        |

|  | Participants | HIV-positive  | Skin*               |           | Anogenital          |           | Nasopharynx         |           | Plasma              |           | Urine               |           | Semen               |           | Saliva              |           | Fecal matter        |           |
|--|--------------|---------------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|
|  |              |               | MPXV DNA prevalence | Median Ct | MPXV DNA prevalence | Median Ct | MPXV DNA prevalence | Median Ct | MPXV DNA prevalence | Median Ct | MPXV DNA prevalence | Median Ct | MPXV DNA prevalence | Median Ct | MPXV DNA prevalence | Median Ct | MPXV DNA prevalence | Median Ct |
| France (Palich et al, 2022) <sup>†</sup>           | 50           | 22/50 (44%)   | 44/50 (88%)         | 20        | 30/42 (71%)         | 21        | 36/47 (77%)         | 27        | 13/45 (29%)         | 33        | 9/41 (22%)          | 31        | 13/24 (54%)         | 28        | NA                  | NA        | NA                  | NA        |
| Spain (Peiró-Mestres et al, 2022) <sup>†</sup>     | 12           | 4/12 (33%)    | 12/12 (100%)        | 20        | 11/12 (92%)         | 23        | 10/12 (83%)         | 31        | NA                  | NA        | 9/12 (75%)          | 35        | 7/9 (78%)           | 32        | 12/12 (100%)        | 29        | 8/12 (67%)          | 24        |
| 16 countries (Thornhill et al, 2022) <sup>††</sup> | 528          | 218/528 (41%) | 512/528 †           | -         | -                   | -         | 138/528 (26%)       | NA        | 35/528 (7%)         | NA        | 14/528 (3%)         | NA        | 29/32 (91%)         | NA        | NA                  | NA        | NA                  | NA        |
| France (Mailhe et al, 2022) <sup>†</sup>           | 264          | 73/256 (29%)  | 252/258 (98%)       | 23        | NA                  | NA        | 150/197 (76%)       | 32        | 8/26 (31%)          | 36        | NA                  | NA        | NA                  | NA        | NA                  | NA        | NA                  | NA        |
| Spain (Tarin-Vicente et al, 2022) <sup>†</sup>     | 181          | 72/181 (40%)  | 178/180 (99%)       | 23        | 43/55 (78%)         | 27        | 82/117 (70%)        | 32        | NA                  | NA        | NA                  | NA        | NA                  | NA        | NA                  | NA        | NA                  | NA        |
| Italy (Raccagni et al, 2022) <sup>†</sup>          | 36           | 15/36 (42%)   | 36/36 †             | -         | -                   | -         | -                   | -         | 24/36 (67%)         | 34        | 8/36 (22%)          | NA        | 22/36 (61%)         | 34        | NA                  | NA        | NA                  | NA        |

Data are n/N (%) unless otherwise specified. Ct=cycle threshold. MPXV=monkeypox virus. NA=not available. \*Includes perianal skin. †Argentina, Australia, Belgium, Canada, Denmark, France, Germany, Israel, Italy, Mexico, Portugal, Spain, Switzerland, The Netherlands, UK, and USA. ††Refers to skin or anogenital samples combined. ‡Refers to either skin, anogenital, or oropharyngeal samples combined.

**Table. Large case series reporting prevalence of MPXV DNA and median Ct of positive samples at PCR in at least two different bodily fluids**



# Infezione linee cellulari con MPXV

hMpxV/Italy/un-INMI-Pt2/2022, clade/lineage I Ib B.1, GISAID: EPI\_ISL\_13251120, GenBank: ON745215.1

carcinoma del polmone: A549  
carcinoma bronchiale ghiandola sottomucosa: CALU3  
carcinoma colon rettale: Caco-2  
cheratinociti immortalizzati umani: HaCaT  
cellule epiteliali immortalizzate tubuli renali: HK-2

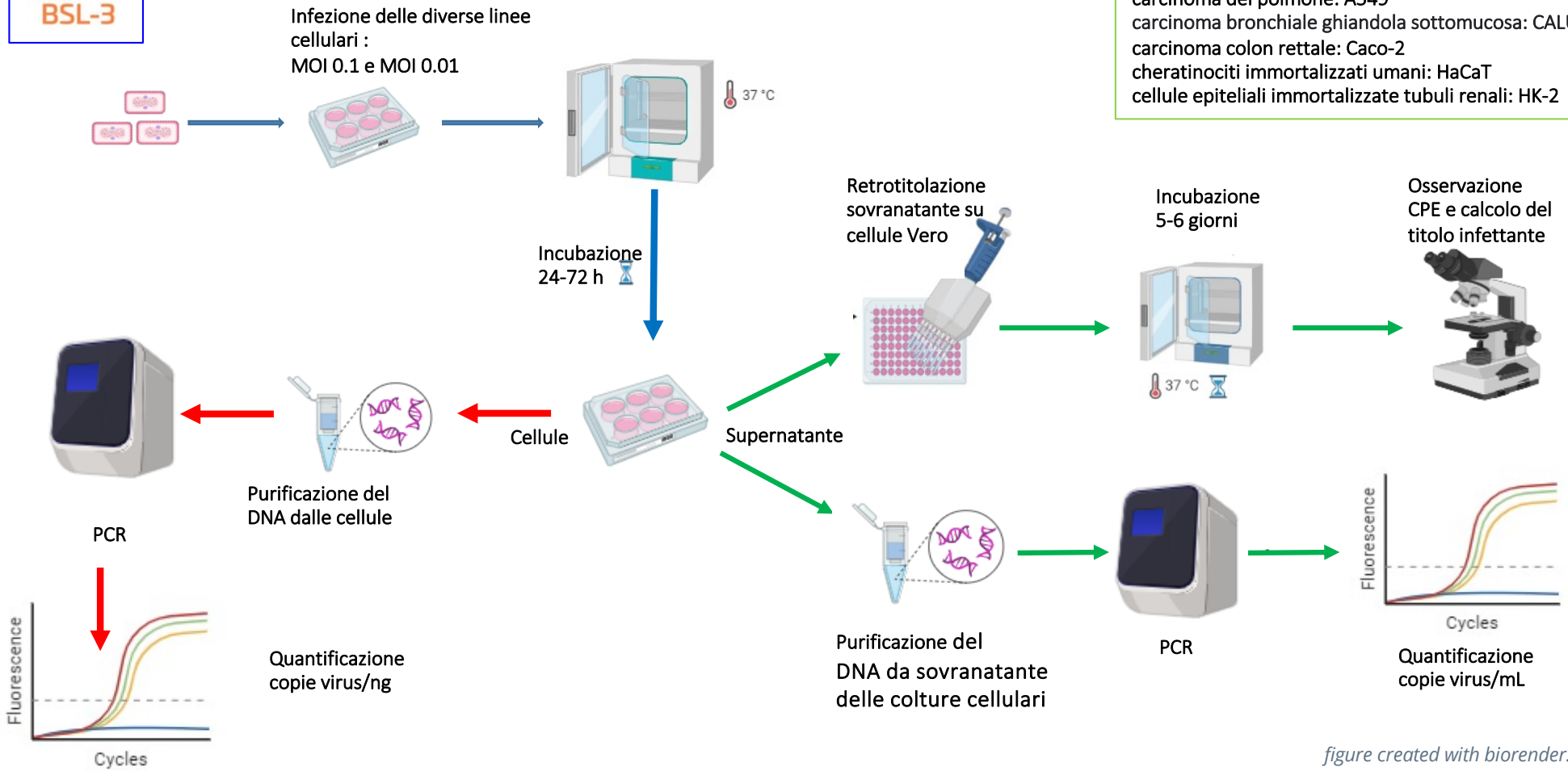
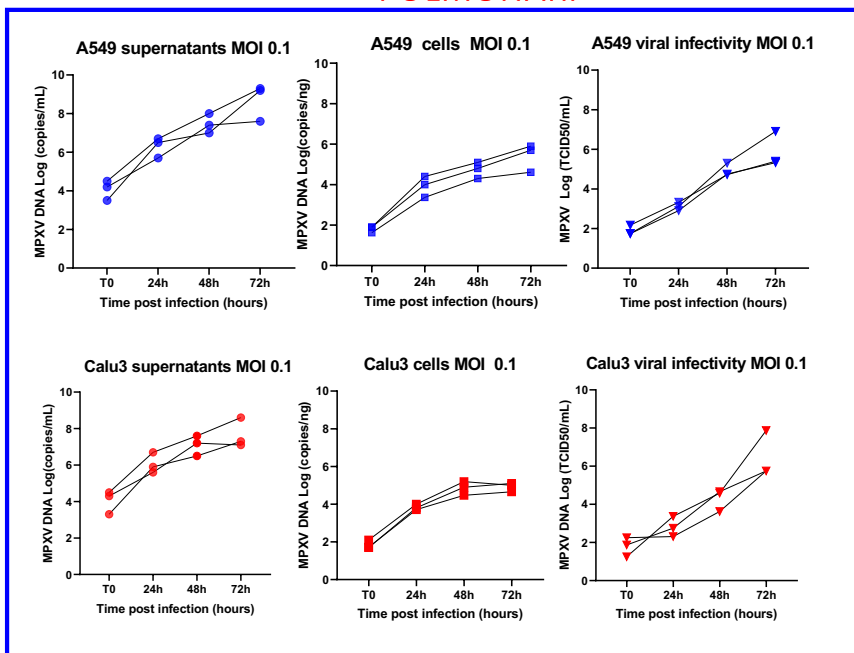
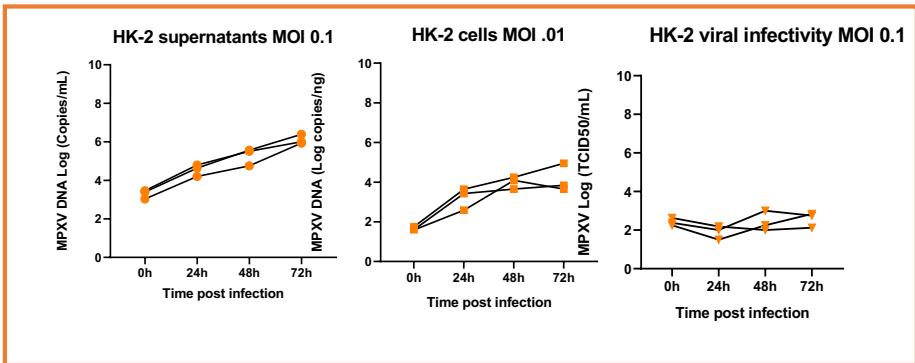


figure created with biorender.com

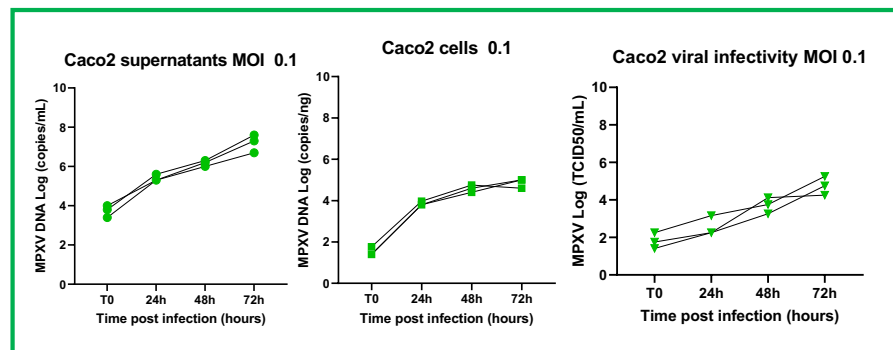
## POLMONARI



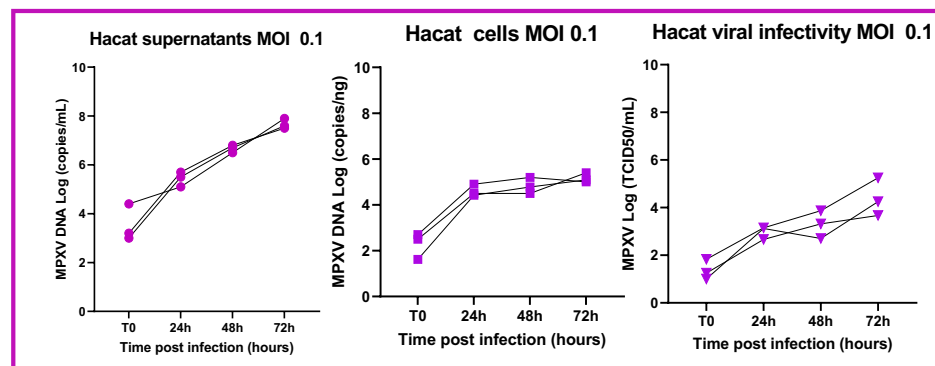
## RENALI

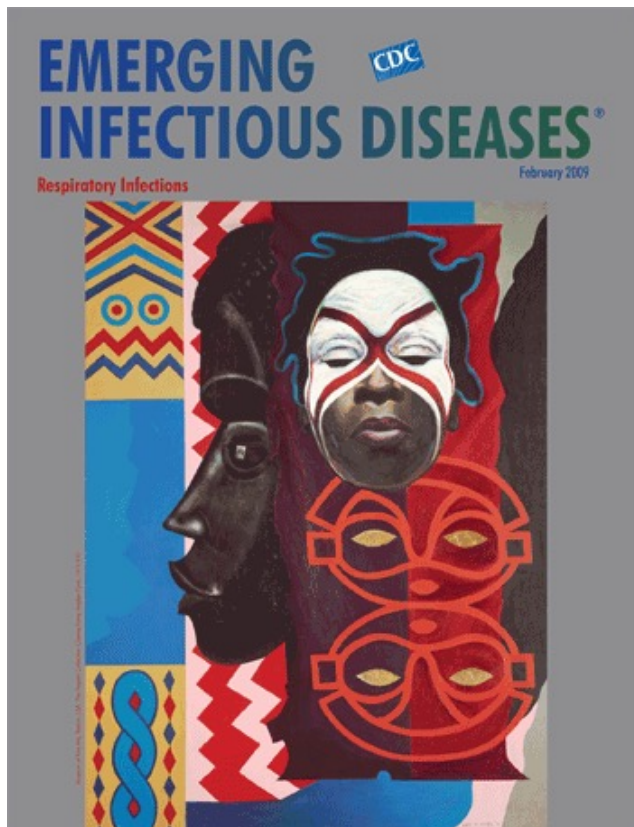


## GASTRO-INTESTINALI



## CHERATINOCITI





- Le malattie infettive sono in continua evoluzione, a un ritmo a volte sconvolgente.
- Negli ultimi anni, il mondo ha assistito a una combinazione di microbi emergenti, microbi resistenti che superano in astuzia i farmaci usati per curarli e la globalizzazione dei viaggi e del commercio.
- Mentre prevediamo sfide globali nuove e in evoluzione nelle malattie infettive, abbiamo bisogno di strumenti e tecnologie per affrontare diverse minacce, da quelle familiari a quelle nuove ed emergenti.

Who's next?

**EXPECT THE  
UNEXPECTED**



THANK  
YOU!