

Infezioni emergenti da ArBo virus in Italia

Un problema da conoscere e non sottovalutare

VITTORIO SAMBRI

UOC di Microbiologia, AUSL della Romagna e DIMES, Università di Bologna

Negli ultimi dieci anni si sono susseguiti episodi epidemici di infezioni virali trasmesse da artropodi ematofagi di limitata portata, che però hanno messo in evidenza la possibilità che queste infezioni possano divenire rilevanti anche nel panorama italiano. Questa review riassume gli aspetti clinici, diagnostici ed epidemiologici di alcune delle infezioni da ArBo virus che possono riguardarci.

ArBo virus è l'acronimo di *arthropod-borne virus*, cioè virus trasmessi agli uomini da artropodi. La definizione di ArBo virus è sostanzialmente funzionale, non avendo i virus compresi in questo gruppo stretta contiguità tassonomica; sono, al contrario, accomunati dalla trasmissibilità all'ospite da parte di vettori artropodi ematofagi. Si tratta di un vastissimo gruppo di virus che comprende molte famiglie e generi, non tutti trasmissibili con ruolo patogeno all'uomo e con ampia e capillare diffusione geografica.

Si può sostanzialmente affermare che ogni area geografica abbia i propri ArBo virus circolanti. Basandosi sull'epidemiologia degli ArBo virus maggiormente noti alla popolazione (ad esempio il virus della Dengue) si potrebbe concludere che la patologia umana da ArBo virus sia un problema limitato alle aree tropicali del pianeta. In realtà questa idea non corrisponde alla reale diffusione geografica delle infezioni arbovirali, che sono diffuse anche in zone a clima temperato-freddo (si pensi al caso del virus dell'encefalite da zecca o *tick-borne encephalitis* - TBEV - che è diffuso in ambiente alpino e nelle aree continentali di Europa e Asia).

In caso di trasmissione all'uomo, le infezioni da ArBo virus producono quadri clinici abbastanza differenti

ARBO VIRUS EMERGING INFECTIONS IN ITALY (*Medico e Bambino* 2019;38:231-236)

Key words

West Nile virus, Dengue virus, Chikungunya virus, Usutu virus, Toscana virus, Tick-borne encephalitis

Summary

In Italy the number of cases of arthropod-borne (ArBo) viral infection has increased in the last ten years, with both sporadic imported cases and self-limiting small epidemic outbreaks. The ArBo viruses that are presently identified as autochthonous include West Nile, Usutu, Toscana and Tick-Borne Encephalitis viruses. Dengue, Chikungunya and Zika are of great interest as possible causes of imported diseases, since the circulation of these agents is presently limited to tropical and sub-tropical climate areas, even though two local epidemics of Chikungunya occurred in Italy in the last ten years. This review highlights some clinical, diagnostic and epidemiological features of the most commonly identified ArBo viral infections observed in Italy in the last ten years.

uno dall'altro (come è ovvio viste le differenze biologiche fra i vari membri di questo gruppo), ma sostanzialmente accomunati da una stagionalità epidemica che correla strettamente con il periodo di attività biologica degli artropodi vettori.

In termini di diffusione epidemiologica, le arbovirosi possono venire distinte in due grandi categorie: quelli per cui il ciclo biologico si svolge fra vettore e animali (*reservoir*) e quelle che invece hanno l'uomo come rilevante serbatoio di infezione per il mantenimento del ciclo.

Nel primo gruppo, cui si ascrivono le infezioni da **West Nile**, **Usutu** e **Toscana virus**, l'uomo infetto non ha

capacità di infettare nuovi artropodi vettori e si considera un ospite "a fondo cieco".

Nel secondo gruppo, al contrario, cui appartengono **Chikungunya**, **Dengue** e **Zika**, l'uomo infetto raggiunge livelli viremici elevati al punto da consentire, tramite pasto ematico dell'artropode, di infettare nuovi vettori, giocando quindi un ruolo pivotale nel ciclo biologico del virus.

In questa breve rassegna sono inclusi i principali ArBo virus circolanti in Italia con una sommaria descrizione del ciclo biologico, del quadro clinico e delle possibili strategie di diagnosi e controllo ambientale.

VIRUS WEST NILE

Il virus West Nile (WNV) deriva il nome dal fatto di essere stato originariamente identificato nell'omologa regione dell'Uganda nel 1937 e sino al 1950 non si hanno ulteriori informazioni in merito a questo membro della famiglia dei Flavivirus (virus a RNA a singolo filamento circondato da un capsido proteico a simmetria icosaedrica con *envelope*, appartenente al sierocomplesso dell'encefalite giapponese - JEV).

Dal punto di vista genetico sono identificati 8 diversi *lineage* ma solo i virus appartenenti ai *lineage* 1 e 2 sono maggiormente rilevanti per la patologia umana.

Il virus viene trasmesso da molte specie di zanzare: il vettore che ha maggiore rilevanza epidemiologica nel nostro Paese è la zanzara del genere *Culex*. La diffusione geografica del virus si estende in pratica su tutti i continenti con la sola eccezione delle zone polari. In Italia WNV è stato identificato per la prima volta in cavalli nel 1998 in Toscana, mentre i primi casi di infezione umana sono stati riportati nel settembre del 2008 in Emilia. Da quel momento in poi WNV ha mostrato una variabile attività epidemiologica nel nostro Paese, con coinvolgimento di quasi tutte le aree geografiche, nel corso degli ultimi 10 anni. La stagione 2018 si è dimostrata come quella in cui il WNV ha avuto un picco di attività mai raggiunto con oltre 500 casi di infezione umana.

La clinica

La trasmissione all'uomo di WNV da parte della zanzara infetta può dare sostanzialmente origine a tre diversi eventi:

- il primo è un'**infezione** totalmente **asintomatica** (circa 80% dei casi) che però riveste notevole importanza per la possibile trasmissione del virus con donazione di sangue o organi solidi da questi soggetti infetti non sintomatici;
- il secondo quadro è quello della **febbre** da WNV, una forma febbrile di moderata o lieve severità clinica, che si autolimita in pochi giorni e che coinvolge circa il 20% dei pazienti;

- il terzo, e molto più severo quadro, è quello della **sindrome neurologica**. Questa forma si manifesta in meno dello 1% dei soggetti infetti e si estrinseca fundamentalmente in tre possibili forme: meningite, encefalite e paralisi flaccida acuta.

Senza dettagliare oltre questi quadri, va in ogni modo sottolineato che la sindrome neurologica è maggiormente rappresentata nella popolazione di età più avanzata (> 70 anni) e che la prognosi è peggiore in presenza di comorbidità importanti. Poiché l'uomo viremico non rappresenta una sorgente efficace di infezione del vettore e quindi non risulta rilevante per il mantenimento del ciclo biologico del virus, la diagnosi eziologica di WNV va solitamente posta al fine di identificare la causa delle sindromi neurologiche ed escludere altre eziologie.

La diagnosi

La diagnosi clinica è molto difficile da porre in termini eziologici, per cui il dato di laboratorio risulta di fondamentale importanza. La diagnosi microbiologica si ottiene mediante l'identificazione della risposta immune specifica per IgM (nelle fasi più precoci dell'infezione) che per IgG con tecniche di immunofluorescenza o immunoenzimatiche. Dal momento che le tecniche sierologiche routinariamente impiegate non sono in grado di discriminare la risposta immune verso WNV da quella prodotta da altri Flavivirus (ad esempio vaccinazione contro febbre gialla o TBEV o pregressa infezione da DENV), ogni campione sierico che dia un risultato positivo per WNV deve essere ulteriormente saggiato con tecnica di siero-neutralizzazione per conferma delle specificità degli anticorpi. Nelle fasi più precoci dell'infezione, prima della comparsa degli anticorpi sierici, è possibile identificare l'RNA virale nel plasma o nel siero, nel liquido cefalo-rachidiano e nelle urine dei pazienti. A questo proposito va sottolineato che l'indagine sulle urine è altamente sensibile e consente di identificare la viruria anche dopo alcune settimane dall'esordio dei sintomi, quando la stessa tecnologia non risulta solitamente più

in grado di mettere in evidenza lo RNA virale su plasma e liquor. Va sottolineato che WNV si può isolare in colture cellulari di vettore o di mammifero dai materiali biologici che contengano l'RNA, ma che questo approccio non riveste importanza diagnostica, ma esclusivamente di ricerca.

L'identificazione del virus nell'ambiente rappresenta l'unico sistema efficace di sorveglianza per ottenere il monitoraggio delle infezioni umane, sia sintomatiche che non clinicamente evidenti. In sostanza, nel periodo di attività del vettore (maggio-ottobre) WNV viene attivamente cercato in *pool* di zanzare (in vari stadi di sviluppo) raccolte in modo sistematico sul territorio e negli uccelli trovati morti o abbattuti. L'identificazione del virus nel vettore e/o in uccelli precede di qualche settimana la possibile comparsa di casi umani anche asintomatici: è proprio in base alle segnalazioni di circolazione virale ottenute con questo sistema di sorveglianza entomologica e veterinaria, nel più classico stile *One Health*, che vengono attivati i test di screening (con tecnologia di amplificazione genica NAAT) su base territoriale per garantire la sicurezza trasfusionale e della donazione di organo solido, in quanto si rammenti che WNV può causare viremia totalmente asintomatica in oltre l'80% dei soggetti infettati.

VIRUS USUTU

Il virus Usutu (USUV) è un Flavivirus strettamente correlato a WNV, con cui condivide le origini africane e la maggior parte degli artropodi vettori. Al contrario di WNV, scarsamente patogeno per gli uccelli, USUV ha dato segno della sua diffusione in Europa circa 20 anni fa provocando estese morie di corvidi specie nell'area centro-europea. L'attenzione verso questo virus è salita quando la moria si è estesa a rapaci ospitati nel giardino zoologico di Vienna: da quel momento in poi USUV è stato sorvegliato in modo particolare in ambito veterinario poiché si riteneva quasi nulla la sua capacità patogena per l'uomo.

Nel 2010, in modo simultaneo da due diversi gruppi di ricerca italiani, sono stati descritti i primi casi di infezione umana da USUV in soggetti immunocompromessi e successivamente il numero di *report* che indicano la patogenicità umana da USUV si sono estesi in modo sostanziale, per cui USUV è oggi considerato un patogeno che provoca infezione nell'uomo in modo sovrapponibile a WNV, ma di entità clinica più modesta. A oggi USUV viene identificato dal sistema di sorveglianza entomologico e veterinario in atto per WNV e la diagnosi di infezione si ottiene similmente a quanto descritto sopra per WNV.

VIRUS DEL DENGUE

L'infezione umana da virus del Dengue (DENV), un altro membro della famiglia dei Flavivirus, è causata da 4 diversi sierotipi che provocano sintomi di modesta entità in corso di infezione primaria. Al contrario, la reinfezione di soggetto immune con un sierotipo di DENV diverso dal primo provoca con elevata frequenza la Dengue emorragica, una sindrome grave con elevata percentuale di prognosi negativa. DENV è trasmesso da zanzare del genere *Aedes* (principalmente *A. aegypti* e *A. albopictus*) ed è diffuso in tutte le aree tropicali e subtropicali del globo. Recentemente DENV ha provocato alcuni casi di trasmissione autoctona (cioè senza importazione da parte di soggetti che abbiano acquisita l'infezione ai tropici) nel sud della Francia e in Spagna.

La clinica

La sintomatologia clinica della Dengue è, in caso di infezione primaria, rappresentata da febbre elevata, cefalea e dolore retroorbitario, astenia, rash cutaneo, nausea e vomito, dolori articolari.

In caso di reinfezione è probabile l'insorgenza della **Dengue emorragica**, che presenta i tipici sintomi delle febbri emorragiche. Contrariamente a quanto sopra riportato per WNV e USUV, l'uomo infetto costituisce un importante serbatoio di infezione per il

mantenimento del ciclo naturale di DENV in quanto il vettore solitamente si infetta proprio da soggetti umani viremici. Per questo motivo, la sorveglianza clinica e laboratoristica dei soggetti rientranti da zone endemiche in potenziale fase di viremia da DENV è l'unico sistema efficace per prevenire la diffusione di Dengue nelle zone temperate, dove ormai la diffusione di zanzare con elevata capacità vettoriale per questo virus (*A. albopictus*, la specie nota come zanzara tigre) è massima.

La diagnosi

La diagnosi eziologica di Dengue si ottiene mediante ricerca dell'antigene virale circolante denominato NS1 (con test *lateral flow assay*) nelle fasi più precoci dell'infezione. Quasi contestualmente alla presenza sierica di NS1 è possibile rilevare l'RNA di DENV in plasma e siero. In una fase più avanzata la diagnosi sierologica assume rilevanza per la negativizzazione dei test per NS1 e RNA: anche in caso di positività anticorpale per DENV deve essere eseguito il test di siero-neutralizzazione per definire la specificità degli anticorpi evidenziati, come sopra esposto per WNV.

VIRUS ZIKA

Anche il virus Zika (ZIKV) appartiene alla famiglia dei Flavivirus e come WNV e USUV ha origini africane: ZIKV è stato isolato nel 1947 da una scimmia utilizzata per uno studio in campo teso a ottenere isolati del virus della febbre gialla nella Zika Forest in Uganda. I vettori maggiormente competenti sono, come nel caso di DENV, le zanzare del genere *Aedes*. Fino al 2007, la diffusione di ZIKV era limitata a una circoscritta area tropicale, con la prima infezione umana descritta nel 1954 in Nigeria. Da quell'anno in avanti ZIKV si è diffuso largamente in varie aree geografiche: dall'Africa sub-sahariana fino a giungere nella remota isola di Yap in Micronesia, da cui ZIKV si è diffuso verso est attraverso il Pacifico fino a giungere nei Caraibi e poi nel Sud del continente americano, dove ha dato origine a un fenomeno epidemico

fra il 2015 e il 2016 (in particolare l'epidemia si è sviluppata in Brasile). A oggi l'Organizzazione Mondiale della Sanità include 86 Paesi nella lista delle aree affette da ZIKV.

La clinica

L'*outbreak* di Yap è stato il primo episodio durante cui i sintomi dell'infezione umana da ZIKV sono stati descritti in dettaglio: febbre con rash cutaneo, artralgie e artrite, mialgia e cefalea con dolore retroorbitario e congiuntivite non purulenta.

Nel corso dell'epidemia nella Polinesia Francese (2013-2014) sono altresì stati descritti numerosi casi di sindrome di Guillain-Barré associati a infezione da ZIKV. È stato comunque solo nel corso dell'epidemia brasiliana (2015) che è stata riportata l'associazione fra l'acquisizione di ZIKV in gravidanza e casi di neonati affetti da microcefalia (*congenital ZIKV syndrome*). È intuitivo che l'associazione fra infezione da ZIKV e microcefalia neonatale ha incrementato grandemente la preoccupazione per questa infezione: grazie all'attività di ricerca sviluppatasi conseguentemente, è stato scoperto che ZIKV è trasmissibile anche attraverso rapporti sessuali non protetti. Quest'ultima possibilità di trasmissione nuovamente identificata ha portato a piani di controllo epidemiologico più intensivo della possibile infezione da ZIKV. A oggi non sono stati riportati casi di trasmissione autoctona di ZIKV in Italia, mentre il numero totale di casi di importazione in Europa a fine 2017 superava i 2000 (di cui 102 in donne gravide).

La diagnosi

Si ottiene in modo simile a quanto sopra descritto per DENV: la combinazione, in relazione al supposto tempo intercorso fra acquisizione dell'infezione e procedimento diagnostico, di metodi che identificano direttamente l'RNA virale in siero, sangue intero, urine e/o liquor cefalo-rachidiano e la determinazione della risposta immune virus-specifica è in grado di consentire la massima sensibilità e specificità diagnostica.

CHIKUNGUNYA

Il virus che causa la Chikungunya (CHIKV), come sopra ricordato per ZIKV, è stato identificato negli anni '50 del secolo scorso in Africa (Makonde Plateau, Tanzania) nel corso di una ricerca sul campo per lo studio di un *cluster* di Dengue con caratteristiche cliniche non perfettamente coincidenti con quanto di norma atteso relativamente a quest'ultima infezione.

CHIKV è membro della famiglia Togavirus e condivide con DENV gran parte dei vettori (le zanzare del genere *Aedes*, in primo luogo *A. albopictus* e *A. aegypti*). Dal punto di vista epidemiologico, CHIKV si è diffuso in gran parte del continente africano da Ovest a Est, fino a raggiungere le Comore e l'isola di Réunion (territorio metropolitano francese) nell'Oceano Indiano dove nel 2007 ha provocato un'epidemia che ha coinvolto oltre il 40% della popolazione. Da queste isole CHIKV ha continuato a diffondersi verso Est fino a raggiungere il subcontinente indiano e il Sud-Est asiatico. A causa dell'arrivo di un paziente viremico in rientro dall'India nel nostro Paese nel 2007, in Romagna si è avuta la prima epidemia di CHIKV con trasmissione locale da vettore in un'area a clima temperato, con un numero di casi totali superiore a 250. Altri episodi di trasmissione autoctona in Europa si sono avuti nel Sud della Francia e, nel corso dell'estate 2017, in Lazio e in Calabria. In ultimo, negli anni seguenti il 2013, CHIKV ha continuato a diffondersi nell'area caraibica, in Sud America (Brasile in particolare) e nel Sud degli Stati Uniti d'America. Va sottolineato come la diffusione di CHIKV in Sud America lo porti a sovrapporsi all'areale di diffusione di DENV e ZIKV, con notevole conseguente incremento delle difficoltà diagnostiche viste le larghe similitudini sintomatologiche fra le tre infezioni.

La clinica

La patologia che consegue all'infezione umana da CHIKV è simile a quella da DENV e ZIKV: la caratteri-

stica maggiormente peculiare è però la presenza di **poli-artralgie severe** a insorgenza rapida dopo una fase acuta febbrile con modificazione posturale e impotenza funzionale articolare. La malattia progredisce rapidamente con mialgia, rash cutaneo, astenia, nausea e vomito. Ancorché sostanzialmente autolimitantesi, l'infezione da CHIKV può evolvere in una piccola percentuale di casi verso una forma più severa (specie nell'anziano in cui possono essere presenti sintomi di encefalopatia) e comunque la patologia lascia un corredo di sequele neuromotorie e artralgiche rilevante e perdurante per molti mesi, oltre la risoluzione della fase di acuzie clinica.

La diagnosi

Come riportato a proposito di ZIKV e soprattutto DENV, la sorveglianza sindromico-clinica e di laboratorio sui possibili soggetti rientranti da zone endemiche in fase viremica rappresenta la misura di massima efficacia per prevenire la trasmissione locale in tutte le zone di Europa con forte presenza vettoriale. Anche nel caso di infezione da CHIKV la combinazione di test molecolari e sierologici consente di ottenere la diagnosi eziologica con elevata sensibilità e specificità.

TOSCANA VIRUS

Il virus Toscana (TOSV) appartiene alla famiglia dei Bunyavirus e viene trasmesso all'uomo dalla puntura di flebotomi (pappataci). La sua scoperta avvenne negli anni '70 del secolo scorso a opera di un gruppo di virologi dell'Istituto Superiore di Sanità guidati da Paola Verani.

La diffusione dell'infezione da TOSV è stata oggi verificata essere diffusa in un areale geografico ben più esteso di quanto inizialmente stabilito: TOSV circola in tutti i Paesi che si affacciano sul Mediterraneo e la presenza di anticorpi specifici è stata descritta anche in Germania.

La clinica

La trasmissione all'uomo provoca una **sindrome meningitica** accompa-

gnata da febbre con caratteristiche cliniche di severità moderata nella maggioranza dei pazienti. In un limitato numero di casi i sintomi neurologici possono assumere un carattere di maggiore severità, fino alla necessità di sottoporre il paziente a cura intensiva. Dati di sieroprevalenza indicano anche la possibilità di casi di infezione totalmente asintomatici e la persistenza delle IgG va oltre un periodo di 20 mesi oltre la risoluzione dell'episodio clinico. Nel nostro Paese è verosimile che TOSV sia la più frequente causa di meningoencefalite nella stagione estiva in gran parte del territorio, almeno fino alla fascia alpina.

La diagnosi

È basata principalmente sull'identificazione della risposta immune IgM e IgG TOSV-specifica su siero e sulla messa in evidenza dello RNA virale in campioni di liquor cefalo-rachidiano mediante tecniche di amplificazione genica (fra cui la più usata è *real time polymerase chain reaction*).

La rilevanza dell'uomo infetto come fonte di infezione vettoriale, e quindi come fattore di mantenimento del ciclo naturale di TOSV è verosimilmente molto limitata; contestualmente non sono stati finora identificati vertebrati serbatoio per TOSV, per cui si ritiene che il vettore svolga anche il ruolo di serbatoio di amplificazione con trasmissione verticale del virus alla progenie. Per questi motivi la sorveglianza dell'infezione da TOSV è limitata alle popolazioni di flebotomi, mentre la diagnosi dei casi umani riveste soprattutto importanza clinica (anche in assenza di terapia antivirale specifica) per la diagnostica differenziale verso altre cause di meningoencefalite a liquor limpido e per scopi epidemiologici.

VIRUS DELL'ENCEFALITE DA ZECCHIE

Il virus dell'encefalite da zecche (TBEV) appartiene alla famiglia dei Flavivirus e, contrariamente a quelli sopra descritti, non viene trasmesso da insetti ma da zecche ematofaghe (genere *Ixodes*). La diffusione geogra-

MESSAGGI CHIAVE

□ Il problema delle infezioni da virus trasmesse da artropodi ematofagi è rilevante nel nostro Paese, visto l'incremento della presenza dei vettori e la possibilità di ingresso di viaggiatori in fase viremica di rientro da zone endemiche.

□ Negli ultimi anni si sono susseguiti episodi epidemici di limitata portata che però hanno messo in evidenza la possibilità che queste infezioni possano divenire rilevanti nel panorama italiano.

□ Le arbovirosi possono venire distinte in due grandi categorie: quelli per cui il ciclo biologico si svolge fra vettore e animali (*reservoir*) (West Nile, Usutu e Toscana virus) e quelle che invece hanno l'uomo come rilevante serbatoio di infezione per il mantenimento del ciclo (Chikungunya, Dengue e Zika).

□ La maggior parte delle infezioni da ArBo virus presentano quadri sintomatologici largamente sovrapponibili e pertanto di difficile distinzione clinica, per cui la diagnosi virologica riveste notevole rilevanza ai fini della corretta definizione del singolo caso.

fica di TBEV corrisponde a quella dei tre sottotipi virali che compongono la specie: il sottotipo dell'Europa occidentale, quello orientale e infine quello siberiano. Nel nostro Paese è presente il sottotipo dell'Europa occidentale limitatamente alle aree alpine e subalpine orientali.

La patologia provocata in caso di trasmissione umana consiste in una forma febbrile simil-influenzale che solo nel 30% dei casi viene seguita da una febbre elevata accompagnata da sintomi encefalitici con possibile paralisi e sviluppo di sequele neurologiche permanenti. La prognosi è infausta in una piccolissima percentuale di pazienti. La prevenzione è basata sulla somministrazione di vaccino specifico ai soggetti con rischio elevato di esposizione a zecche nelle aree endemiche e sulla prevenzione del morso dei vettori. La diagnosi è simile a quella indicata per gli altri membri della famiglia dei Flavivirus.

CONCLUSIONI

La presenza di infezioni virali trasmesse da artropodi ematofagi va inserita fra i problemi emergenti di Sanità pubblica nelle aree geografiche a clima temperato, e quindi anche nel nostro Paese. Alcune di queste infezioni hanno già dato luogo a epidemie localizzate con trasmissione autoctona in diverse zone d'Europa e pertanto assumono rilevanza la capacità di diagnosticare queste infezioni sia clinicamente che in laboratorio e le attività di sorveglianza epidemiologica.

Indirizzo per corrispondenza:

Vittorio Sambri

e-mail: vittorio.sambri@auslromagna.it

Bibliografia di riferimento

Il contesto generale delle infezioni da ArBo virus

- Barzon L. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *J Clin Virol* 2018;107:38-47.
- Charlier C, Beaudoin MC, Couderc T, Lortholary O, Lecuit M. Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects. *Lancet Child Adolesc Health* 2017;1:134-46.
- Dente MG, Riccardo F, Nacca G, Ret al. Strengthening preparedness for Arbovirus infections in Mediterranean and Black Sea Countries: a conceptual framework to assess integrated surveillance in the context of the One Health strategy. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15(3).
- Findlater A, Bogoch II. Human mobility and the global spread of infectious diseases: a focus on air travel. *Trends Parasitol* 2018;34:772-83.
- Musso D, Rodriguez-Morales AJ, Levi JE, Cao-Lormeau VM, Gubler DJ. Unexpected outbreaks of arbovirus infections: lessons learned from the Pacific and tropical America. *Lancet Infect Dis* 2018;18(11):e355-61.
- Paixão ES, Teixeira MG, Rodrigues LC. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ Glob Health* 2018;3(Suppl 1):e000530.
- Pierro A, Landini MP, Gaibani P, et al. A model of laboratory surveillance for neuro-arbovirology applied during 2012 in the Emilia-Romagna region, Italy. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:672-7.
- Sukhralia S, Verma M, Gopirajan S, Dhana Raj PS, Lal R, Mehla N, Kant CR. From Dengue to Zika: the wide spread of mosquito-borne arboviruses. *Eur J Clin Microbiol Infect*

Dis 2019;38(1):3-14.

- Weaver SC. Prediction and prevention of urban arbovirus epidemics: a challenge for the global virology community. *Antiviral Res* 2018;156:80-4.

Chikungunya virus

- Cavrini F, Gaibani P, Pierro AM, Rossini G, Landini MP, Sambri V. Chikungunya: an emerging and spreading arthropod-borne viral disease. *J Infect Dev Ctries* 2009;3(10):744-52.
- Gaibani P, Landini MP, Sambri V. Diagnostic methods for CHIKV based on serological tools. *Methods Mol Biol* 2016;1426:63-73.
- Pierro A, Rossini G, Gaibani P, Finarelli AC, Moro ML, Landini MP, Sambri V. Persistence of anti-chikungunya virus-specific antibodies in a cohort of patients followed from the acute phase of infection after the 2007 outbreak in Italy. *New Microbes New Infect* 2015;7:23-5.
- Silva JVJ Jr, Ludwig-Begall LF, Oliveira-Filho EF, et al. A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. *Acta Trop* 2018;188:213-24.
- Vairo F, Di Pietrantonj C, Pasqualini C, et al. The surveillance of Chikungunya virus in a temperate climate: challenges and possible solutions from the experience of Lazio Region, Italy. *Viruses* 2018;10(9).
- Ward CE, Chapman JI. Chikungunya in children: a clinical review. *Pediatr Emerg Care* 2018;34:510-5.

Dengue virus

- Giang HTN, Banno K, Minh LHN, et al. Dengue hemophagocytic syndrome: a systematic review and meta-analysis on epidemiology, clinical signs, outcomes, and risk factors. *Rev Med Virol* 2018;e2005.
- Guo C, Zhou Z, Wen Z, et al. Global epidemiology of Dengue outbreaks in 1990-2015: a systematic review and meta-analysis. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:317.
- Katzelnick LC, Coloma J, Harris E. Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *Lancet Infect Dis* 2017;17:e88-e100.
- Low GK, Ogston SA, Yong MH, Gan SC, Chee HY. Global dengue death before and after the new World Health Organization 2009 case classification: a systematic review and meta-regression analysis. *Acta Trop* 2018;182:237-45.
- Pierro A, Varani S, Rossini G, et al. Imported cases of dengue virus infection: Emilia-Romagna, Italy, 2010. *Clin Microbiol Infect* 2011;9:1349-52.
- Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, et al. Single-reaction, multiplex, real-time rt-PCR for the detection, quantitation, and serotyping of dengue viruses. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e2116.

Tick-borne encephalitis virus

- Chrdle A, Chmelik V, Růžek D. Tick-borne encephalitis: what travelers should know when visiting an endemic country. *Hum Vaccin Immunother* 2016;12:2694-9.
- Du Four S, Mertens R, Wiels W, De Keyser J, Bissay V, Flamez V. Meningoencephaloradiculitis following infection with tick borne encephalitis virus: case report and review

of the literature. *Acta Neurol Belg* 2018;118:93-6.

- Steffen R. Tick-borne encephalitis (TBE) in children in Europe: epidemiology, clinical outcome and comparison of vaccination recommendations. *Ticks Tick Borne Dis* 2018.
- Taba P, Schmutzhard E, Forsberg P, et al. EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis. *Eur J Neurol* 2017;24:1214-e61.

Toscana virus

- Charrel RN, Bichaud L, de Lamballerie X. Emergence of Toscana virus in the Mediterranean area. *World J Virol* 2012;1:135-41.
- Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveill* 2010;15:e19507.
- Marescotti G, Dal Bo S, Casadio L, Vieni G, Farneti C, Marchetti F. Meningoencefalite e Toscana virus: quando e perché pensarci. *Medico e Bambino Pagine Elettroniche* 2019; 22(1):86-8.
- Nicoletti L, Ciufolini MG, Verani P. Sandfly fever viruses in Italy. *Arch Virol Suppl* 1996; 11:41-7.
- Varani S, Gelsomino F, Bartoletti M, et al. Meningitis caused by Toscana virus is associated with strong antiviral response in the CNS and altered frequency of blood antigen-presenting cells. *Viruses* 2015;7:5831-43.
- Verani P, Nicoletti L, Ciufolini MG. Antigenic and biological characterization of Toscana virus, a new *Phlebotomus* fever group vi-

rus isolated in Italy. *Acta Virol* 1984;28:39-47.

- Vocale C, Bartoletti M, Rossini G, et al. Toscana virus infections in Northern Italy: laboratory and clinical evaluation. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012;12:526-9.

Usutu virus

- Bakonyi T, Erdélyi K, Brunthaler R, Dán Á, Weissenböck H, Nowotny N. Usutu virus, Austria and Hungary, 2010-2016. *Emerg Microbes Infect* 2017;6:e85.
- Cavrini F, Gaibani P, Longo G, et al. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill* 2009;14 (50).
- Gaibani P, Rossini G. An overview of Usutu virus. *Microbes Infect* 2017;19:382-7.
- Gaibani P, Cavrini F, Gould EA, et al. Comparative genomic and phylogenetic analysis of the first Usutu virus isolate from a human patient presenting with neurological symptoms. *PLoS One* 2013;8:e64761.
- Grottola A, Marcacci M, Tagliacuzzi S, et al. Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. *Clin Microbiol Infect* 2017;23:33-7.
- Vazquez A, Jimenez-Clavero M, Franco L, et al. Usutu virus: potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveill* 2011;16(31).

West Nile virus

- Barzon L, Pacenti M, Sinigaglia A, Berto A, Trevisan M, Palù G. West Nile virus infection in children. *Expert Rev Anti Infect Ther*

2015;13:1373-86.

- Lustig Y, Sofer D, Bucris ED, Mendelson E. Surveillance and diagnosis of West Nile virus in the face of Flavivirus cross-reactivity. *Front Microbiol* 2018;9:2421.
- Sambri V, Capobianchi MR, Cavrini F, et al. Diagnosis of West Nile virus human infections: overview and proposal of diagnostic protocols considering the results of external quality assessment studies. *Viruses* 2013;5: 2329-48.
- Sambri V, Capobianchi M, Charrel R, et al. West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:699-704.

Zika virus

- Charlier C, Beaudoin MC, Couderc T, Lortholary O, Lecuit M. Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects. *Lancet Child Adolesc Health* 2017;1:134-46.
- Dias ÍKR, Sobreira CLDS, Martins RMG, et al. Zika virus: - a review of the main aspects of this type of arbovirolosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2018;51:261-9.
- Heald-Sargent T, Muller W. Zika virus: a review for pediatricians. *Pediatr Ann* 2017;46: e428-32.
- Sakkas H, Bozidis P, Giannakopoulos X, Sofikitis N, Papadopoulou C. An update on sexual transmission of Zika virus. *Pathogens* 2018;7(3).
- Singh RK, Dhama K, Karthik K, et al. Advances in diagnosis, surveillance, and monitoring of Zika virus: an update. *Front Microbiol* 2018;8:2677.