Stima della sieroprevalenza di West – Nile Virus (WNV) in donatori di sangue del Veneto

Introduzione

Nel settembre 2008, il primo caso umano di West Nile neuroinvasive malattia in Italia è stato segnalato in Emilia-Romagna (provincia di Bologna) : una donna di 83 anni, residente in una zona rurale. Nel mese di ottobre altri due casi di malattia neuro invasiva sono stati segnalati nella stessa regione (provincia di Ferrara).
Nel mese di ottobre 2008, la sorveglianza umana passiva nel Veneto ha individuato e confermato la positività al virus WN in una donna di 81 anni residente della provincia di Rovigo, ricoverata in ospedale con meningoencefalite.
La sorveglianza attiva ha invece rilevato quattro infezioni da WNV asintomatiche.
Nel novembre 2008, una donna di 48 anni residente della provincia di Rovigo si è presentata spontaneamente presso il Centro per malattie tropicali a Negrar (Verona) segnalando un episodio di febbre risalente a tre mesi prima, accompagnata da rash cutaneo, adenopatia e forte mal di testa che ancora non si erano risolti. Anche questo caso è stato confermato come positivo al virus WN.
Nel corso del 2009 il Sistema di Sorveglianza ha riportato 6 casi di WN nell'uomo: di questi 5 sono residenti nella provincia di Rovigo e 1 al confine tra Rovigo e Venezia; un paziente è deceduto.

Come da protocollo, dopo il primo caso di malattia neuro invasiva sono iniziati i controlli sulle sacche di sangue di donatori che hanno soggiornato almeno una notte nella zona considerata a rischio. Nel Veneto nel 2009 sono state controllate con il test NAT circa 18.500 sacche di sangue: una sacca è risultata positiva.
E' stato inoltre effettuato uno studio di siero prevalenza tra luglio e novembre 2009 su 2.507 sacche prelevate da donatori della provincia di Rovigo che ha riscontrato 94 casi risultati positivi o dubbi ai test IgG o IgM: di questi sono stati confermati positivi 17 casi per una prevalenza globale di 6.8 per 1000 donazioni.
Tutti i confermati avevano test IgG positivo. Si è valutato meno significativo l'apporto del test IgM che non viene pertanto riproposto nel prossimo studio.

Obiettivi

1. Effettuare un nuovo studio a campione di sieroprevalenza di anticorpi (nei metodi)al WNV in donatori di sangue che effettueranno donazioni nei centri trasfusionali dell'intero territorio del Veneto nel periodo 1/8/2010 – 1/12/2010

Disegno dello studio
Campione casuale di "sieri" di donatori che effettueranno una donazione di sangue nel periodo agosto – novembre 2010.
Dimensione campionaria
Assumendo una prevalenza attesa di 6,8 per mille donazioni (cioè la stessa di quella stimata nello studio precedente) con un numero di circa 5.000 campioni l'incertezza nella stima calcolata per area è sempre inferiore a ±2,5 per mille.

Metodi per l'identificazione degli anticorpi a WNV
Le analisi sierologiche saranno effettuate presso il laboratorio di riferimento regionale dell'Azienda Ospedaliera di Padova (Centro Unico). Per tutti i sieri campionati sarà effettuato il test in immunoenzimatica per l'identificazione di IgG. Su tutti i casi positivi (IgG) sarà eseguito test di conferma PRNT.
L'indagine dovrà essere effettuata senza identificazione dei donatori, se nel periodo sono assenti segnalazioni di casi di neuro encefalite WNV correlata. Diversamente scatta il criterio adottato dal CNS per l'autunno 2008 nell'area di Rovigo.
I donatori daranno nel consenso informato complessivo l'assenso all'esecuzione anche del test sierologico per WNV finalizzato allo studio della sieroprevalenza, secondo quanto previsto dalle normative vigenti (DM 3/03/05 art. 16)

Modalità di campionamento
Il periodo in analisi conta 105 giorni lavorativi: ogni giorno si dovranno raccogliere 48 sieri in modo da ottenere la numerosità desiderata di 5.040 sieri (pari a circa un sedicesimo delle donazioni attese in tutto il Veneto nel periodo). I campioni da inviare saranno selezionati in modo sistematico come descritto nelle procedure.

Procedure
Il protocollo è stabilito dalla Regione del Veneto: lo studio di siero prevalenza è effettuato su un campione di 5.040 donazioni dal 1 agosto al 1 dicembre 2010.
Il territorio regionale è suddiviso nelle quattro macro aree sulle quali viene assunta un'ipotesi di omogeneità di sieroprevalenza. La numerosità è stata calcolata in modo proporzionale al numero di donazioni. Lo studio dello scorso anno ha evidenziato l'opportunità di raccogliere, sempre in anonimato, informazioni relative al sesso, all'anno di nascita, al comune di residenza (o al codice di avviamento postale), alla professione (se prevalentemente all'aperto o al chiuso) al tipo di donatore (periodico o no) e, solo per i casi eventualmente confermati positivi, all'indirizzo in modo da consentire una buona approssimazione nel disegno delle mappe.
Tali dati saranno analizzati, nel rispetto della legge della privacy, e tutte le tabelle e i grafici del rapporto del progetto saranno realizzate in maniera tale da non poter risalire in alcun modo al donatore

	Donazioni annuali		Donazioni nel periodo nell'area	Budget 5.000 donazioni: confronto con Trecenta*, pesante ipotesi di omogeneità sull'area		Stima con incertezza minore di….per mille
SIT ULSS N. 14 Chioggia	5.503			Su 105 gg	Al giorno	
SIT ULSS N. 17 Este	8.897					
SIT ULSS N. 18 Rovigo	18.524	Area1	10.975	525*	5	
SIT AO Padova	16.576					
SIT ULSS N. 10 Veneto Orientale	10.870					
SIT ULSS N. 12 Veneziana	16.495					
SIT ULSS N. 13 Mirano	11.614					
DIMT PADOVA PIOVE di SACCO	3.100	Area2	19.552	1260	12	<4,4
SIT AOUI Verona	28.683					
SIT ULSS N. 5 Ovest Vicentino	8.336					
SIT ULSS N. 6 Vicenza	12.269					
SIT ULSS N. 21 Legnago	8.990					
SIT ULSS N. 22 Bussolengo	15.061	Area3	24.446	1575	15	<4,0
SIT ULSS N. 1 Belluno	8.284					
SIT ULSS N. 2 Feltre	3.635					
SIT ULSS N. 3 Bassano del G.	9.282					
SIT ULSS N. 4 Alto Vicentino	11.116					
SIT ULSS N. 7 Pieve di Soligo	9.645					
SIT ULSS N. 8 Asolo	8.649					
SIT ULSS N. 9 Treviso	21.628					
SIT ULSS N. 15 Alta Padovana	11.152	Area4	27.797	1680	16	<3,8
	248.309					
			82.770	**5.040**		

*Trecenta: 17,8 per mille

1) Campionamento: Ogni giornata dal lunedì al sabato, i primi 5 donatori a Trecenta, i primi 12 dell'Area 2 (Piove di Sacco), i primi 15 dell'Area 3 (Bussolengo) e i primi 16 dell'Area 4 (Camposampiero) saranno invitati a partecipare allo allo studio. La scelta di questo tipo di selezione è dovuta a motivi organizzativi: tuttavia, non abbiamo motivo di pensare che questo possa indurre una distorsione.
2) Consenso: ai donatori individuati, dopo *una sintetica spiegazione, secondo un testo scritto previsto dal Direttore dei DIMT di Rovigo, Padova e Verona, è richiesto e raccolto il consenso "al prelievo aggiuntivo di un campione di sangue per sierologia immunoenzimatica e di uno per NAT per lo studio regionale per la sieroprevalenza del virus West Nile*"; il modulo di consenso è un foglio aggiuntivo prestampato, identificato con l'etichetta nominativa del donatore e della presentazione; il consenso resta agli atti del Servizio trasfusionale, allegato al corrente modulo di selezione e consenso.
3) Raccolta dei campioni: i campioni non sono caricati in Em*oNet* e sono etichettati con etichette prestampate con la seguente dicitura A101ggmm → A105ggmm; A201ggmm → A212ggmm e A301ggmm → A315ggmm, A401ggmm → A416ggmm rispettivamente nelle Aree 1,2,3,4 sopra definite ; una copia dell'etichetta è adesa al modulo di consenso. Il set di etichette è predisposto dal SIT in quattro serie: due presso il punto raccolta (provetta e modulo) e due presso il Servizio trasfusionale per l'etichettatura finale dei campioni (uno da inviare e uno da congelare a -80°C). La stampa delle 5 serie di etichette è eseguita dal

Servizio trasfusionale per le 18settimane. Le provette sono una per sierologia immunoenzimatica (6 mL, senza anticoagulante) e una per NAT(6 mL, K_2EDTA gel).

4) Preparazione campioni: i campioni giornalieri sono trattati presso il Servizio trasfusionale mediante centrifugazione con trasferimento del plasma in provette rietichettate con le stesse serie numeriche di tracciabilità; il campione per sierologia, pari a 2,5 mL di siero, va conservato a -20°C ordinato in rack fino al momento dell'invio; il campione per NAT (2,5 mL) resta congelato a -80°C ordinato in rack presso il Servizio trasfusionale.
5) Spedizione campioni sierologia: la spedizione al Laboratorio di riferimento regionale dell'Università di Padova va effettuata due volte alla settimana al lunedì (campioni di giov, ven e sab) e al giovedì (campioni di lun mar e mer), al raggiungimento del numero prestabilito. La spedizione è attuata secondo gli accordi con il citato Laboratorio e secondo le modalità di conservazione termica concordata; la lista di accompagnamento dei campioni con le relative sequenze è giornaliera, ed essendo anonima, è prestampata, con sola spunta dei campioni ed è datata e siglata dal tecnico che provvede alla separazione/conservazione e dal tecnico che provvede all'invio.
6) Conservazione campioni NAT: i campioni per eventuale NAT restano a disposizione presso il Servizio trasfusionale fino alla fine dello studio di siero prevalenza, con regolare tracciabilità di corretta conservazione in ambiente termico controllato a – 80°C. L'utilizzo dei campioni NAT stoccati permette l'eventuale immediata attivazione della procedura del CNS in caso di insorgenza di casi umani con sintomatologia neurologica di WNV.
7) Responsabilità del procedimento: il Direttore del DIMT di Rovigo,di Padova e di Verona provvede in via diretta a comunicare al personale strettamente addetto (raccolta e trattamento dei campioni) il presente protocollo, dando evidenza dell'applicazione e fornendo comunicazione mensile della sua applicazione al CRAT, e delle eventuali NC rilevate. Il Direttore del DIMT di Rovigo, di Padova e di Verona si impegna al richiamo della segnalazione, da parte del citato Laboratorio, dei donatori con eventuale reattività sierologica IgG WNV per la raccolta di dati anamnestici pertinenti.

Nel sito regionale verranno riportati contestualmente tutti gli aggiornamenti.
Se la prevalenza ottenuta dovesse risultare maggiore del livello superiore dell'intervallo di confidenza si procederà, di concerto con il Centro Nazionale Sangue, ad una attenta valutazione sull'opportunità di seguire nuove procedure compreso eventualmente l'utilizzo del test NAT.

Bibliografia

http://www.health.gov.sk.ca/west-nile-seroprevalence
http://www.health.gov.on.ca/english/public/pub/ministry_reports/wnv_rep_2003/executive_summary_110703.pdf
http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118690624/PDFSTART