

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE E DI COMUNITÀ
CORSO DI DOTTORATO IN "EPIDEMIOLOGIA, AMBIENTE E SANITÀ PUBBLICA"
XXXII CICLO
SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE MED/42
TESI DI DOTTORATO DI RICERCA



APPROCCI MOLECOLARI E BIOINFORMATICI INNOVATIVI PER STUDI DI EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL MORBILLLO NELL'AMBITO DEL WHO EUROPEAN REGION MEASLES STRATEGIC PLAN 2010-2020

DOTTORANDA: GIULIA CICERI

MATRICOLA R11800

TUTOR: PROF.SSA ANTONELLA AMENDOLA

COORDINATORE DEL DOTTORATO: PROF. CARLO LA VECCHIA

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

ABSTRACT

GIULIA CICERI

SERIAL NUMBER R11800

INNOVATIVE MOLECULAR AND BIOINFORMATICS APPROACHES FOR MOLECULAR MEASLES EPIDEMIOLOGY STUDIES UNDER THE WHO EUROPEAN REGION MEASLES STRATEGIC PLAN 2010-2020.

INTRODUCTION. Measles virus belongs to the morbillivirus genus of the family *Paramyxoviridae*. Infection with measles virus results in an extremely contagious exanthematic disease transmitted by air. It often causes severe complications and deaths, is preventable with vaccination and presents requirements for elimination. Italy is one of the 12 European countries where measles transmission is still endemic. The Global Measles and Rubella Strategic Plan 2012–2020 has set the goal of the elimination of endemic measles in the WHO European Region. To achieve this goal, high vaccination coverage must be obtained and maintained (>95%), and a sensitive and quality surveillance system must be ensured. Measles molecular surveillance is a key component to verify the endemic measles elimination, and a crucial tool both to establish any epidemiological link between cases occur in the same period and area, and to identify the importation sources. With the progress of the elimination program, the genetic diversity of circulating measles strains decreases. Continuous air travels and the ease world trade between countries facilitate imports into a given geographical area of viral variants belonging to the same genotype. In this context, traditional laboratory methods can not distinguish endemic transmission from import events of the same viral variant. In addition, as the vaccination program moves forward, an increasing proportion of measles cases occur in vaccinated individuals. New and advanced technologies must therefore allow us to broaden knowledge on measles in vaccinated people, and allow us to identify strains potentially capable of evading the immune response.

AIM. The aim of the PhD project is to study and monitor in time the molecular epidemiology of measles in view of the elimination goal, through the develop and the use of innovative molecular and bioinformatic methodologies. Therefore, the research aims to combine the traditional epidemiological methods with the molecular and bioinformatic techniques of the new era. A further objective is to study measles confirmed cases in vaccinated people, in order to assess vaccination failure and to identify any escape mutant in the measles H gene.

MATERIALS AND METHODS. From March 2017 to July 2019, biological specimens from patients with suspected measles were collected and analysed as part of the Measles and Rubella Integrated Surveillance System of the Lombardy Region (MoRoNET network). Viral RNA was extracted, and a Real Time RT-PCR was carried out for the measles genome identification. Retro-transcription was performed to all the measles positive samples, and a nested RT-PCR was conducted for the amplification of the N-450 region, in order to perform the genotyping. Samples of interest (N=50) have undergone two emi-nested PCR for the amplification of the H gene. Moreover, the amplification of the complete genome through specific couples of primers (which allow to obtain 10 overlapped fragments) has been conducted on the same samples. Amplicons were sequenced and a phylogenetic analysis was conducted on N-450 region, N-450/H region and on the whole genome, using the bioinformatic programs ClustalX2, BioEdit and MEGA7.

Vaccinated measles cases were studied through analysis on serological data obtained from the regional referent laboratory database. In addition, the amino acid sequence of measles H protein (obtained from the conversion of the nucleotide sequences with BioEdit) was analysed in 7 vaccinated measles cases and 80 non-vaccinated measles cases, as control group.

Personal, clinical and epidemiological data of measles cases analysed in this study were obtained from the Lombardy Region database of infectious diseases, MAINF.

RESULTS. Overall, from March 2017 to July 2019, 885 suspected measles cases reported in Milan and surrounding areas were investigated. The 74.2% of measles cases was confirmed by laboratory investigations. The largest number of measles cases was confirmed in 2017 (50.4%). The age groups 15-39 years and over-39 years were the most affected over the all three years (63.0% and 42.7% of measles cases, respectively). The 92.1% of measles cases was unvaccinated. Regional database MAINF allowed to classify measles cases as sporadic (57.4%) or belonging to outbreaks (42.7%). The 9.7% of measles cases confirmed by our laboratory was outside the examined area during the incubation period of the disease.

Genetic characterization was performed by the N-450 morbillivirus region sequencing and was completed with success in 95.3% of measles cases. The genotyping made possible to highlight the continuous co-circulation of two genotypes, D8 (72.9%) and B3 (26.1%).

The intra-genotype analysis identified overall 16 viral variants, 8 of them already classified as WHO named strain. In particular, 5 WHO named strains D8 (Mv/Osaka.JPN/29.15, Mvs/London.GBR/21.16/2, MVi/Hulu-Langat.MYS/26.11, MVs/Gir-Somnath.IND/42.16, Mvs/Victoria.AUS/6.18) and 3 WHO named strains B3 (MV/Dublin.IRL/8.16, MVs/Saint-Denis.FRA/36.17, Mvs/Ljubljana.SVN.27.17) have been identified.

The named strain D8-Osaka was the predominant genotype variant during the 2017. The named strain B3-Dublin was the predominant genotype variant during the 2018, and the named strain D8-Gir Somnath was the most frequently detected during the 2019. Moreover, 69 sequences not yet classified by the WHO have been identified and called "no-named strain". Twenty no-named strains belonged to genotype D8 and 49 belonged to genotype B3. Some of them were responsible of continued transmission events, sporadic cases or small familiar outbreaks that did not further spread into the population.

Molecular analysis has been deepened on strains correlated to nosocomial and familiar outbreaks and on strains correlated to sporadic cases occurred within short geographical and temporal distances from the outbreaks. It was therefore developed the sequencing and the phylogenetic analysis of a more than 2000 nucleotides region, which includes the N-450 region and the whole H gene (N-450/H). This made possible to evaluate the genetic variability of strains 100% identical in the N-450 region. Phylogenetic analysis of the N-450/H construct allowed to observe clusters within strains with the same N-450 region, whereas others 100% identical in N-450 were not strictly correlated. Subsequently, the whole genome sequencing was carried out on the same strains, and the phylogenetic analysis confirmed data obtained with N-450/H analysis. However, the whole genome sequencing analysis reached a greater match with the epidemiological investigation, and it resulted more sensitive outlining the single chains of transmission.

The serological profile of 33 measles cases with a vaccination history was investigated. Negativity in IgG test during the acute phase of the disease (7-10 days from rash) was found in 18.2% of measles cases, suggesting a failure in vaccination response (non-responder) and therefore a primary vaccine failure.

The majority of vaccinated measles cases (81.8%) showed an IgG response during the acute phase. Therefore, these cases could be placed in a secondary vaccine failure.

Ability to transmit the infection to secondary cases was found in the 12% of vaccinated measles cases. In addition, the median age at the time of the last vaccine dose of measles cases with primary vaccine failure was higher than the one of measles cases with secondary vaccine failure (12 and 6 years old, respectively).

Another goal of the present project was to analyse 87 aminoacidic sequences of measles H protein (first target of human neutralizing antibodies) identified in vaccinated and not vaccinated subjects. Of them, 30, of which 7 belonged to vaccinated measles cases, showed amino acid substitutions in antigenic epitopes. The substitutions were L247S, P247S, A400V, A192T, and Q575K. No mutations were found at functional sites of the protein, such as cysteine residues important for the maintenance of the tertiary protein structure, or on binding receptor sites, responsible for the recognition and the entry into the host cell.

CONCLUSIONS. The epidemiological trend and genotypes of measles cases identified in Milan and the surrounding areas in the 3 years of study reflect what found on the national territory. The intra-genotyping analysis identified overall 16 viral variants, 4 of them predominant, and a high variability for both the D8 and B3 genotypes. This result confirms the typical pattern of areas characterized from a reduction of vaccination coverage and with an increment of susceptible subjects.

To demonstrate the interruption of the virus circulation in the territory, countries must be able to distinguish endemic transmission from imported cases. Indeed, measles disease can be considered eliminated only in the absence of endemic outbreaks. The worldwide circulation of a small number of viral variants limits the information given by the phylogenetic analysis of the N-450 region, and makes more complex the reconstruction of transmission routes, as well as the outbreaks characterization. Furthermore, it is impossible to trace the chains of transmission and identify imported cases from different sources. It is therefore important to implement new methodologic strategies in order to extend the "window sequencing". The whole genome analysis was sensitive and resulted able to trace the chains of transmission and identify the imported cases. This technique, however, is extremely laborious and expensive, and it is not applicable as routine tool in the actual epidemiological context. It could be instead the optimal strategy for measles-free countries, or for which ones is approaching the measles elimination, with only few cases to verify. The results obtained on strains involved in important epidemic events in Milan and surrounding areas during the 3-years PhD study suggest that the N-450/H analysis could be considered a good implementation strategy of the molecular surveillance in the actual elimination program phase.

Regarding the study of measles cases in vaccinated subjects, it can be hypothesized that vaccination failure is not caused by an immunity system failure to vaccination (non-responder), but rather to a decline over the time of the immunity response vaccine-induced. However, the antibody evaluation was made during the acute phase of the disease, and it is not able to evaluate how many subjects had protective antibody titres before the infection. This evaluation would contribute to identified IgG boosters in acute phase caused by the wild-type measles strain exposure.

The finding of an important proportion of vaccinated measles cases able to originate outbreaks highlight the necessity to maintain a high attention for the containment measures and for the spread disease control even in presence of vaccinated subjects. More multidisciplinary studies must be conducted to confirm the obtained results and to outline appropriate resolutive planes.

Amino acid analysis of the measles H protein has led to identify mutations in critical protein sites observed for the first time. Data obtained are on the one hand reassuring because no escape mutant was found. On the other hand, data document a measles H protein variability which impose a constant monitoring.

In conclusion, in this PhD project the innovative techniques developed and applied were found to be useful for the correct evaluation of the actual epidemiological scenario, which is characterized by the circulation of endemic measles strains, the continuous introduction of viral variants and a significant number of vaccine failures.

RIASSUNTO

GIULIA CICERI

MATRICOLA R11800

APPROCCI MOLECOLARI E BIOINFORMATICI INNOVATIVI PER STUDI DI EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL MORBILLO NELL'AMBITO DEL WHO EUROPEAN REGION MEASLES STRATEGIC PLAN 2010-2020.

INTRODUZIONE. Il morbillo è una malattia esantematica estremamente contagiosa trasmissibile per via aerea causata da un virus della famiglia *Paramyxoviridae*, genere *Morbillivirus*. L'infezione spesso è causa di complicanze severe e decessi, è prevenibile con la vaccinazione e presenta i requisiti per l'eliminazione. L'Italia fa parte dei 12 paesi europei dove la trasmissione del morbillo è ancora endemica. Il *Global Measles and Rubella Strategic Plan 2012 – 2020* ha fissato il *goal* di eliminazione del morbillo endemico nella Regione Europea dell'OMS. Per raggiungere tale obiettivo è necessario ottenere e mantenere coperture vaccinali elevate (>95%) e disporre di un sistema di sorveglianza sensibile e di qualità. La sorveglianza molecolare del morbillo è una componente chiave della verifica dell'eliminazione del morbillo endemico ed è uno strumento cruciale sia per stabilire eventuali *link* epidemiologici tra casi che si verificano nello stesso periodo in una determinata area geografica sia per identificare le possibili fonti di importazione. Con il progredire del programma di eliminazione, la diversità genetica dei ceppi di morbillo circolanti diminuisce. I continui viaggi aerei e la facilità di scambi tra i paesi favoriscono le importazioni in una determinata area geografica di varianti virali appartenenti allo stesso genotipo. In questo contesto, i tradizionali metodi di laboratorio non consentono di distinguere la trasmissione endemica da eventi di importazione delle stesse varianti virali. Con il progredire del programma di vaccinazione, inoltre, una quota sempre più alta di casi di morbillo si verifica in soggetti vaccinati. Le nuove e avanzate tecnologie devono quindi permettere di ampliare le conoscenze su questi aspetti e consentire di identificare ceppi potenzialmente in grado di eludere la risposta immunitaria.

SCOPO. Scopo del presente progetto di dottorato è quello di studiare e sorvegliare nel tempo l'epidemiologia molecolare del morbillo in vista dell'obiettivo di eliminazione, attraverso lo sviluppo e l'utilizzo di metodologie innovative molecolari e bioinformatiche. La ricerca pertanto si propone di combinare il metodo epidemiologico tradizionale con le tecniche molecolari e bioinformatiche che la nuova era offre. Un ulteriore obiettivo è stato quello di studiare casi confermati di morbillo in soggetti precedentemente vaccinati, al fine di valutare il fallimento vaccinale e identificare eventuali mutanti *escape* a livello del gene H.

MATERIALI E METODI. Sono stati analizzati i campioni biologici provenienti da pazienti con diagnosi sospetta di morbillo raccolti nell'ambito della Sistema di Sorveglianza Integrata Morbillo e Rosolia della Regione Lombardia (rete MoRoNET), da marzo 2017 a luglio 2019. I campioni sono stati sottoposti a estrazione dell'RNA e a test di *Real Time* RT-PCR per l'identificazione del genoma del virus del morbillo. Tutti i campioni risultati positivi sono stati sottoposti a retrotrascrizione e a successiva amplificazione genica della regione N-450 del virus del morbillo mediante *nested* RT-PCR per la caratterizzazione genotipica. Campioni di interesse (N=50) sono stati sottoposti ad amplificazione del gene virale H mediante due *emi-nested* PCR e ad amplificazione dell'intero genoma attraverso l'utilizzo di specifiche coppie di *primer* per l'amplificazione di 10 frammenti parzialmente sovrapposti.

Gli amplificati sono stati sequenziati e sono state analizzate filogeneticamente le sequenze N-450, N-450/H e l'intero genoma attraverso diversi programmi bioinformatici (ClustalX2, BioEdit, MEGA7) per le valutazioni filogenetiche. Lo studio dei casi vaccinati è stato condotto attraverso l'analisi dei dati sierologici ottenuti dal database del laboratorio di riferimento regionale; in aggiunta, è stata analizzata la sequenza amminoacidica (ottenuta tramite la conversione delle sequenze nucleotidiche grazie al programma BioEdit) della proteina H di 7 casi vaccinati e di 80 casi non vaccinati come gruppo controllo.

I dati anagrafici, clinici ed epidemiologici relativi ai casi di morbillo analizzati nel presente lavoro sono stati ottenuti dal database della Regione Lombardia per le malattie infettive MAINF.

RISULTATI. Complessivamente, tra marzo 2017 e luglio 2019 sono stati indagati 885 casi sospetti di morbillo segnalati a Milano e nelle aree limitrofe. Il 74.2% dei casi indagati è stato confermato in laboratorio. Il maggior numero di casi è stato confermato nel 2017 (50.4%). Le fasce d'età più colpite sono state quelle dei giovani tra i 15 e i 39 anni (63.0%) e degli adulti *over-39* anni (21.5%), dato che si è confermato per tutti e tre gli anni esaminati. Il 92.1% dei casi confermati di morbillo non era vaccinato.

La consultazione del database regionale MAINF ha permesso di classificare i casi confermati come sporadici (57.4%) o appartenenti a focolai (42.7%). Il 9.7% dei casi confermati dal nostro laboratorio si trovava fuori dal territorio in esame durante il periodo di incubazione della malattia. In questo modo è stato possibile definire l'importazione dell'infezione, sia dall'estero (44.3% dei casi importati) che da altre regioni italiane (55.7% dei casi importati).

La caratterizzazione genotipica mediante sequenziamento della regione N-450 di *Morbillivirus* è stata completata con successo per il 95.3% dei casi. È stato possibile evidenziare la costante co-circolazione di due genotipi, il D8 (72.9%) e il B3 (26.1%).

L'analisi intra-genotipica ha permesso di identificare complessivamente 16 varianti virali, di cui 8 già classificate dall'OMS e definite *WHO named strain*. In particolare, sono state identificate 5 *WHO named strain* D8 (Mv/Osaka.JPN/29.15, Mvs/London.GBR/21.16/2, MVi/Hulu-Langat.MYS/26.11, MVs/Gir-Somnath.IND/42.16, Mvs/Victoria.AUS/6.18) e 3 *WHO named strain* B3 (MV/Dublin.IRL/8.16, MVs/Saint-Denis.FRA/36.17, Mvs/Ljubljana.SVN.27.17). La D8-Osaka è stata la variante predominante nel 2017, la B3-Dublino nel 2018 e la D8-Gir Somnath nel 2019. Sono state inoltre identificate 69 sequenze non ancora classificate dall'OMS e momentaneamente denominate "*no named strain*". Venti erano di genotipo D8 e 49 di genotipo B3. Alcune di queste sequenze hanno dato origine a eventi di trasmissione continua, altre a casi sporadici o a piccoli focolai familiari non propagandosi ulteriormente nella popolazione.

È stata approfondita l'analisi molecolare di ceppi correlati a importanti eventi epidemici (focolai nosocomiali e familiari) e a casi notificati come sporadici avvenuti a breve distanza geografica e temporale dai focolai. È stato quindi sviluppato il sequenziamento e l'analisi filogenetica di una regione di più di 2000 nucleotidi, comprendente l'N-450 e tutto il gene H (N-450/H). Ciò ha reso possibile valutare la variabilità genetica (intra-variante) di ceppi 100% identici in N-450. L'analisi filogenetica di questa regione ha permesso di osservare che sequenze tra loro identiche nella sola regione N-450 formavano dei *cluster* e altre invece risultavano non strettamente correlate. In un secondo momento, gli stessi ceppi sono stati sottoposti a sequenziamento dell'intero genoma, la cui analisi filogenetica ha confermato i dati ottenuti in N-450/H, ma raggiungendo un maggior *match* con l'indagine epidemiologica e risultando più sensibile nel delineare le singole catene di trasmissione.

È stato studiato il profilo sierologico di 33 casi confermati di morbillo con storia di vaccinazione documentata nel database regionale MAINF. Nel 18.2% dei casi, il riscontro di negatività in IgG in fase acuta (7-10 giorni dall'esordio del *rash*) ha suggerito una mancata risposta al vaccino (*non-responder*) e quindi un fallimento primario della vaccinazione. La gran parte dei casi vaccinati (81.8%) ha mostrato una risposta in IgG in fase acuta e pertanto inquadrabile come fallimento verosimilmente secondario. La capacità di trasmettere l'infezione da parte di soggetti con fallimento vaccinale è stata dimostrata nel 12% dei casi. Infine, i soggetti con fallimento primario avevano un'età mediana all'epoca dell'ultima dose più elevata rispetto a quelli con fallimento secondario (12 anni e 6 anni rispettivamente).

Un ulteriore obiettivo del presente progetto è stato quello di analizzare 87 sequenze amminoacidiche della proteina H (target principale degli anticorpi neutralizzanti) identificate in soggetti vaccinati e non vaccinati. Di queste, 30, di cui 7 appartenenti a ceppi di casi vaccinati, presentavano sostituzioni in siti immunoepitopici. Le sostituzioni riscontrate sono state L247S, P247S, A400V, A192T e Q575K. Non sono invece state riscontrate mutazioni in siti funzionali della proteina, come per esempio residui di cisteina importanti per il mantenimento della struttura terziaria, o in siti di legame col recettore, responsabili del riconoscimento e dell'ingresso nella cellula ospite.

CONCLUSIONI. L'andamento epidemiologico e genotipico dei casi di morbillo identificato nei 3 anni di studio a Milano e nelle aree limitrofe rispecchia quello riscontrato sul territorio nazionale. L'analisi intra-genotipica condotta ha permesso di identificare complessivamente 16 varianti virali, di cui 4 predominanti e un'elevata variabilità per entrambi i genotipi individuati (D8 e B3). Ciò conferma il *pattern* tipico nelle aree caratterizzate da un abbassamento delle coperture vaccinali e un aumento dei soggetti suscettibili alla malattia.

Per dimostrare l'interruzione della circolazione all'interno del proprio territorio, i paesi devono essere in grado di distinguere le trasmissioni endemiche dai casi importati, in quanto la malattia può essere considerata eliminata solo in assenza di focolai endemici. La circolazione a livello mondiale di un ristretto numero di varianti virali limita l'informazione data dall'analisi filogenetica della regione N-450 e rende più complessa la ricostruzione delle rotte di trasmissione e la caratterizzazione dei focolai epidemici. Inoltre, non consente di ricostruire le catene di trasmissione e identificare i casi di importazione da fonti diverse. È pertanto importante mettere in atto nuove strategie metodologiche per ampliare la "finestra di sequenziamento". L'analisi dell'intero genoma è risultata sensibile e in grado di ricostruire le catene di trasmissione e identificare i casi di importazione. Questa tecnica risulta tuttavia estremamente laboriosa e costosa e, nell'attuale contesto epidemiologico, non applicabile come metodica di routine. Potrebbe risultare invece la strategia ottimale per i paesi *measles-free* o che si stanno avvicinando all'eliminazione del morbillo, dove è necessario verificare l'introduzione solo di pochi ceppi virali. I risultati ottenuti nel corso dei 3 anni di dottorato sui ceppi coinvolti in importanti eventi epidemici a Milano e nelle aree limitrofe suggeriscono che l'analisi della regione N-450/H possa essere considerata una valida strategia di implementazione della sorveglianza molecolare in questa fase del programma di eliminazione. Per quanto riguarda lo studio dei casi confermati di morbillo in soggetti vaccinati, i risultati hanno dimostrato che la maggior parte dei fallimenti vaccinali non sono dovuti a una mancata risposta immunitaria (*non-responder*), ma piuttosto ad una perdita nel tempo della risposta immunologica vaccino-indotta. Tuttavia, la valutazione del titolo anticorpale è stata fatta durante la fase acuta della malattia e non si è potuto valutare quanti soggetti presentavano titoli

anticorpali protettivi prima dell'infezione. Questa valutazione avrebbe contribuito a identificare i *booster* delle IgG in fase acuta causati dall'incontro col virus selvaggio.

Il riscontro di una percentuale non trascurabile di casi di morbillo tra soggetti vaccinati che ha dato origine a focolai evidenzia la necessità di mantenere alta l'attenzione nel mettere in atto le misure di contenimento e diffusione della malattia anche in presenza di casi vaccinati. Ulteriori studi multidisciplinari devono essere condotti per confermare i risultati ottenuti e delineare opportuni piani risolutivi.

L'analisi amminoacidica della proteina H ha permesso di identificare mutazioni in siti critici della proteina non osservate da studi precedenti. I dati ottenuti sono da un lato rassicuranti in quanto non mostrano la circolazione di mutanti *escape*, dall'altro documentano una variabilità della proteina H che impone la necessità di un monitoraggio costante.

In conclusione, nel presente progetto di dottorato, sono state sviluppate e applicate metodologie innovative risultate utili per la corretta valutazione dello scenario epidemiologico attuale, caratterizzato dalla circolazione di ceppi endemici, dalla continua introduzione di varianti virali e da una quota non trascurabile di fallimenti vaccinali.

Education is not something you can finish.

Isaac Asimov



SOMMARIO

INTRODUZIONE	1
Il virus del morbillo	2
Virologia	2
Tassonomia	2
Morfologia e struttura genomica dei <i>Morbillivirus</i>	3
Ciclo replicativo	7
Morbillo, la malattia	9
Decorso naturale della malattia	9
Complicanze	11
Complicanze a carico del sistema nervoso centrale	12
Diagnosi	13
Terapia	14
Risposta immunitaria	14
Immunità adattativa umorale: risposta anticorpale	15
Immunità adattativa cellulare: <i>clearance</i> virale	15
Immunità protettiva di lunga vita	17
Soppressione del sistema immunitario	17
Il vaccino contro il morbillo	18
Effetti collaterali e problematiche del vaccino attuale	21
Sviluppo di nuovi vaccini	22
L'obiettivo della vaccinazione	23
Programmi per le coperture vaccinali	26
Vaccinazione di routine con una singola dose	26
Sviluppo di una strategia di vaccinazione a due dosi	27
Coperture vaccinali	28
Durata dell'immunità protettiva dopo la vaccinazione	29
Fallimenti vaccinali	29
Esitazione vaccinale	30
Esitazione vaccinale in Italia	31
Accumulo della popolazione suscettibile – <i>gap</i> immunitari	32
Impatto della malattia sulla popolazione - <i>disease burden</i>	34
Programmi di eliminazione	42
<i>Global measles and rubella strategic plan, 2012–2020.</i>	43
Sorveglianza molecolare	47
I genotipi di <i>Morbillivirus</i> e relativa distribuzione geografica	47
Struttura e attività della rete di laboratori OMS per la sorveglianza del morbillo e della rosolia	51
Metodi d'azione della sorveglianza contro il morbillo	53
Importanza della sorveglianza molecolare	58
SCOPO	59
MATERIALI E METODI	61
Area e popolazione in studio	62
Definizione di caso, notifica e raccolta dei campioni biologici	62
Classificazione degli eventi epidemici	63

Conferma molecolare dei casi e dei focolai	65
Estrazione degli acidi nucleici	65
Valutazione quantitativa dell'RNA estratto	65
Identificazione dell'RNA virale mediante <i>Real Time</i> RT-PCR	65
Caratterizzazione genetica dei <i>Morbillivirus</i>	67
Retrotrascrizione	67
Amplificazione della regione N-450 di <i>Morbillivirus</i>	67
Amplificazione del gene H di <i>Morbillivirus</i>	69
Rilevamento degli amplificati	71
Purificazione del prodotto di amplificazione	71
Sequenziamento	72
Sequenziamento dell'intero genoma	72
Analisi bioinformatica	74
Analisi delle sequenze	75
RISULTATI	79
Sorveglianza del morbillo nella città di Milano e aree limitrofe, marzo 2017 – luglio 2019	80
Sorveglianza epidemiologica	82
Sorveglianza molecolare del morbillo	83
Analisi genotipica	83
Analisi intra-genotipica	83
Analisi genomica per la caratterizzazione di eventi epidemici	90
Studio dei casi di morbillo in soggetti vaccinati	97
Profilo sierologico dei casi vaccinati	97
Studio delle mutazioni amminoacidiche della proteina H	98
CONCLUSIONI	102
BIBLIOGRAFIA	112

INTRODUZIONE

IL VIRUS DEL MORBILLO

Il virus del morbillo è geneticamente correlato al virus della peste bovina, un patogeno del bestiame dichiarato eradicato dal *World Organization for Animal Health* nel maggio 2011, e probabilmente evolutasi come infezione zoonotica nelle comunità in cui uomini e bestiame vivevano a stretto contatto tra loro [1]. Nonostante manchino certezze storiche, evidenze epidemiologiche suggeriscono quindi che il morbillo sia diventata una malattia dell'uomo circa 5.000-10.000 anni fa, quando le prime civiltà agrarie raggiunsero una popolosità sufficiente a mantenere la trasmissione del virus [2, 3].

Il morbillo è una malattia infettiva acuta altamente contagiosa derivante dall'infezione con l'agente eziologico *Morbillivirus*, che colpisce elettivamente - ma non esclusivamente - il bambino ed è clinicamente caratterizzato da febbre ed esantema maculo-papulare.

Anteriormente all'introduzione della vaccinazione negli anni '60 del secolo scorso e prima che le coperture vaccinali negli anni '80 si alzassero grazie ai programmi di immunizzazione, il morbillo rappresentava una delle principali cause di morte, con più di due milioni e mezzo di decessi l'anno, soprattutto tra i bambini.

Nonostante gli enormi progressi raggiunti fino a oggi, il morbillo rimane una causa importante di morbosità e mortalità prevenibile da vaccino, responsabile di più di 100.000 morti ogni anno, passando da una letalità dello 0.1% nei paesi sviluppati al 15% nei paesi in via di sviluppo [4].

VIROLOGIA

TASSONOMIA

Il morbillo (genere *Morbillivirus*) è un virus a RNA non segmentato e a polarità negativa, membro della famiglia *Paramyxoviridae* dell'ordine *Mononegavirales*. L'ordine al momento viene suddiviso in 8 famiglie e comprende altri diversi virus responsabili di malattie importanti per l'uomo, quali il virus ebola, il virus respiratorio sinciziale, il virus della parotite e della rabbia.

La famiglia *Paramyxoviridae* comprende 7 generi (Figura 1), di cui il *Morbillivirus* è quello più conosciuto e oltre al virus del morbillo che colpisce l'uomo (MV) comprende anche il *Rinderpest Virus* (RPV), analogo del morbillo nei bovini e ruminanti selvatici, il *Peste-des-Petits-Ruminants Virus* (PPRV) in pecore e capre e il virus del cimurro (*Canine Distemper Virus*, CDV), l'analogo del morbillo in canidi, procinoidi e mustelidi. Il genere virale infetta anche alcuni mammiferi marini, come foche e delfini, colpiti rispettivamente dal *Phonine Distemper Virus* (PDV) e *Cetacean Morbillivirus* (CeMV) [5].

Altri generi inclusi nella famiglia e di particolare interesse sono il *Respirovirus*, responsabili di gravi malattie respiratorie, e il *Rubelavirus*, che racchiude i virus parainfluenzali e della parotite.

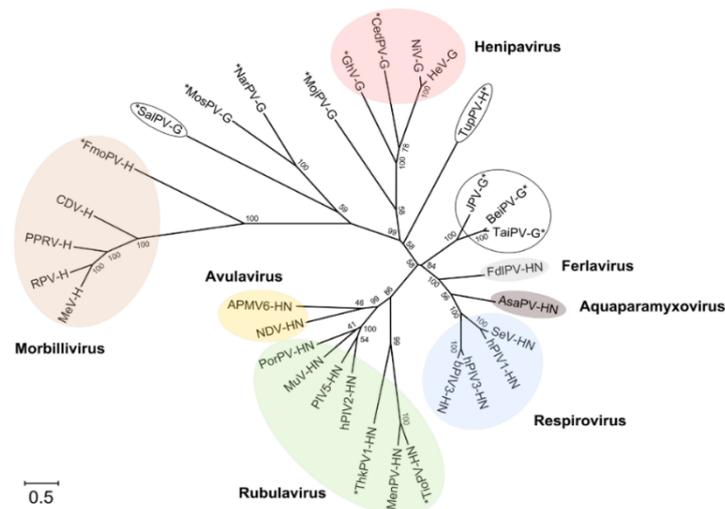


Figura 1 Albero filogenetico della famiglia *Paramyxoviridae*. Zeltina A, et al. (2016).

MORFOLOGIA E STRUTTURA GENOMICA DEI *MORBILLIVIRUS*

I *Morbillivirus* sono caratterizzati da un virione pleiomorfo di forma sferica e con un diametro di circa 150-300 nm (Figura 2). Sono dotati di *envelope* e di un genoma a singolo filamento di RNA lungo circa 16 kb, non segmentato e a polarità negativa. L'*envelope* ha proiezioni superficiali composte dalle emoagglutinine virali (H) e dalle proteine di fusione (F). La proteina della matrice (M) delinea l'interno dell'involucro del virione. Il nucleocapside elicoidale è formato dall'RNA genomico avvolto con la proteina del nucleocapside (N) ed è impacchettato sotto forma di una bobina simmetrica con le fosfoproteine (P) e le grandi proteine della polimerasi (L) annesse. Il genoma contiene 6 unità trascrizionali (N, P, M, F, H, L) separate da sequenze intergeniche non trascritte e codificano per le 8 proteine del virus, le 6 strutturali appena citate e 2 non strutturali, C e V, codificate all'interno del gene della fosfoproteina P tramite un processo di *splicing* alternativo (Figura 2) [6, 7].

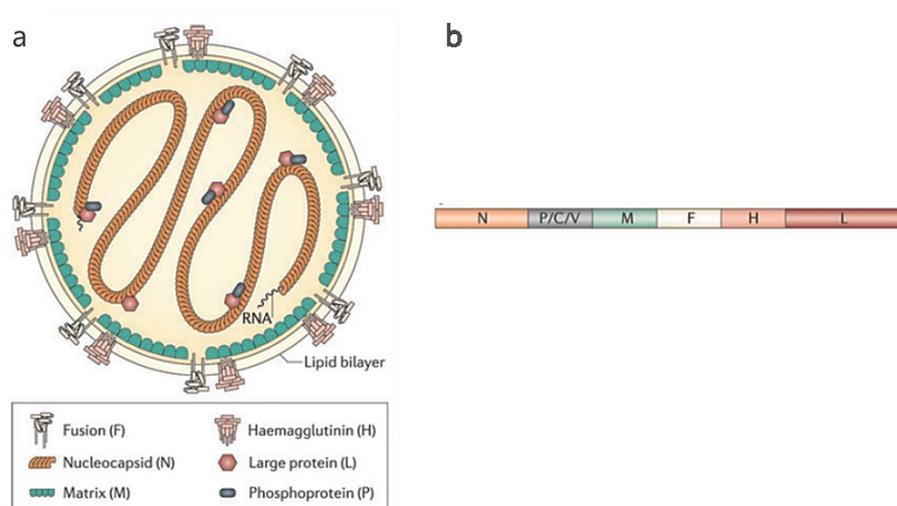


Figura 2 a. Diagramma schematico del virione del morbillo. b. Struttura schematica del genoma del morbillo (Moss & Griffin, 2006).

FUNZIONI DELLE PROTEINE

La nucleoproteina (N; 525 aminoacidi) è il polipeptide più abbondante ed è essenziale per impacchettare il genoma in un complesso di ribonucleoproteine (RNP) che funge da modello per la trascrizione, la replicazione e il confezionamento nei virioni della progenie [8]. La regione amino-terminale della proteina N (N_{CORE}; aminoacidi 1–400) forma il nucleo (*core*) del nucleocapside elicoidale, mentre la regione carbossile-terminale (N_{TAIL}; aminoacidi 401–525) costituisce un dominio disordinato situato al di fuori del *core* [9]. Questa regione è ipervariabile tra i virus di tipo selvatico e pertanto la sequenza nucleotidica viene utilizzata per l'assegnazione del genotipo durante la caratterizzazione molecolare dei ceppi di morbillo circolanti [10, 11]. La regione N_{TAIL} interagisce con la proteina P [12, 13] e la proteina M [14].

La fosfoproteina (P; 507 aminoacidi) si organizza in oligomeri, è una subunità dell'RNA polimerasi virale che agisce da *chaperone* interagendo e regolamentando la localizzazione cellulare della proteina N e probabilmente assiste anche nell'assemblaggio del nucleocapside [13, 15, 16]. Le proteine P, insieme alle proteine V (299 aminoacidi) e C (186 aminoacidi), giocano tutte un ruolo nell'antagonizzare le risposte dell'interferone (IFN) dell'ospite [17].

La proteina V condivide la metionina di inizio e la regione amino-terminale della proteina P, ma presenta un residuo di guanosina aggiunto attraverso l'*editing* dell'RNA, che sposta il *frame* di lettura e produce ricche regioni di cisteine con legami di zinco [18, 19]. Né C né V sono necessari per la replicazione del virus [20, 21], ma entrambe interagiscono con le proteine cellulari per regolare la risposta all'infezione [15, 22]. La proteina V blocca la via di segnalazione Jak/STAT e contrasta la segnalazione cellulare data dall'interferone [23, 24]. Blocca anche il percorso di induzione di IFN mediato da MDA5 [25, 26]. Un'interferenza diretta con la segnalazione IFN avviene anche da parte delle proteine P e C [27-29].

La proteina della matrice (M; 335 aminoacidi) si dispone lungo la superficie interna dell'*envelope* virale e partecipa alla maturazione del virione [8, 30], svolgendo un ruolo cruciale nell'assemblaggio del virus attraverso l'interazione con le code citoplasmiche delle proteine H e F [31-33]. Essa lega il nucleocapside e regola negativamente la trascrizione, presumibilmente sequestrando il nucleocapside alla membrana plasmatica [14, 34, 35].

La proteina di fusione (F) è tradotta come precursore di 550 aminoacidi che viene clivato da proteasi cellulari *furin-like* nelle proteine F1 e F2, collegate da ponti disolfuro. È una glicoproteina di tipo I che media la fusione con la cellula ospite a pH neutro [8, 36]. Gli aminoacidi 113-145, che si trovano al nuovo amino-terminale di F1, formano il peptide di fusione idrofobico [37], che si inserisce nella membrana della cellula ospite durante il processo di fusione [38].

L'emoagglutinina virale (H; 617 aminoacidi) è la proteina che lega il recettore e un importante determinante del tropismo cellulare. È una glicoproteina transmembrana di tipo II che risiede sulla superficie delle cellule infette e dei virioni come omodimero, collegato con ponti disolfuro tra i residui di cisteina nella posizione 154 che si auto-associano a formare tetrameri. La proteina H ha una coda citoplasmica di 34 aminoacidi che precede una singola regione transmembrana idrofobica e un grande dominio carbossile-terminale, che presenta una struttura elicoidale e 13 cisteine fortemente conservate. La sequenza genica H è variabile, in particolare nella regione della glicosilazione [39]. La funzione della proteina H è quella di legarsi a un recettore cellulare sulle cellule bersaglio. Quando si lega a un recettore, vengono attivati cambiamenti conformazionali nella proteina F, che mediano la fusione tra l'involucro virale e la membrana plasmatica delle cellule ospiti. Le interazioni funzionali e fisiologiche tra le proteine H e F sono fondamentali per innescare la fusione della membrana [40].

Sebbene entrambe le proteine F e H siano il bersaglio della neutralizzazione degli anticorpi, la risposta immunitaria umorale è diretta principalmente contro la proteina H [41-43]. Ad oggi, molti studi basati sugli anticorpi monoclonali (MAbs) hanno determinato gli epitopi antigenici della proteina H, classificabili in cinque tipi: *hemagglutinating and noose epitope* (HNE), *sugar-shielded epitope* (SSE), *neutralizing epitope* (NE), *loop epitope* (LE) e *receptor-binding epitope* (RBE) [44].

HEMAGGLUTINATING AND NOOSE EPITOPE (HNE)

Gli aminoacidi 379-400 formano un epitopo immuno-dominante. La sequenza amminoacidica di questa regione è scarsamente conservata tra le proteine H dei *Morbillivirus*, eccetto le due cisteine in posizione 386 e 394, che sono altamente conservate. Pertanto, il legame disulfide potrebbe essere importante per la funzione o la stabilità conformazionale delle proteine H.

SUGAR-SHIELDED EPITOPE (SSE)

La proteina H è glicosilata in quattro posizioni amminoacidiche, 168, 187, 200 e 215 [45]. Alcuni genotipi hanno acquisito un ulteriore sito di glicosilazione legato a N nella posizione 416 (N416-*sugar*) [39, 46], ma il vantaggio non è chiaro.

NEUTRALIZING EPITOPE (NE)

È un epitopo lineare costituito dagli aminoacidi in posizione 244-250 [47] ed è probabilmente coinvolto nella formazione del tetramero. Pertanto, è possibile che gli anticorpi che riconoscono NE inibiscano l'innescamento del processo di fusione interferendo con la disposizione del tetramero.

LOOP EPITOPE (LE).

Costituito dagli amminoacidi in posizione 309-318, produce un grande anello sporgente nella parte inferiore del tetramero, potendo di conseguenza interagire direttamente con la proteina F [48]. Inoltre, LE interagisce anche con NE [49]. Pertanto, gli anticorpi che riconoscono LE interferiscono con l'interazione dimero-dimero del tetramero [50]. Queste interazioni possono generare vincoli strutturali verso i cambiamenti nel dominio LE. A sostegno di questo, un ceppo virale mutante con una mutazione in LE (Q311R) si replica in modo meno efficiente rispetto al ceppo parentale [51].

RECEPTOR-BINDING EPITOPE (RBE)

È il sito di riconoscimento dei recettori cellulari (Figura 3). A oggi, sono stati individuati tre recettori: i recettori cellulari SLAM (*Signalling Lymphocyte Activation Molecule* o CD150) su linfociti, monociti, macrofagi e cellule dendritiche [52], la molecola CD46 e Nectin-4 o poliovirus recettore 4 (PVRL4), un componente delle giunzioni aderenti delle cellule epiteliali, in particolar modo di quelle alveolari [53, 54]. La distribuzione di questi recettori determina la vasta gamma di tipi cellulari e di tessuti che il virus del morbillo è in grado di infettare.

SLAM è una molecola espressa nelle cellule attivate del sistema immunitario e funge da co-stimolatore [55].

CD46 è un regolatore complementare proteico largamente distribuito nella popolazione cellulare umana, espresso in tutte le cellule nucleate, che agisce come co-fattore del fattore I per l'inattivazione proteolitica di C3b/C4b [56], ma è anche responsabile della proliferazione e del differenziamento delle cellule T regolatorie [57].

Nectin-4 è una proteina della superfamiglia delle immunoglobuline dedita a giunzione aderente ed espressa nelle cellule epiteliali [58, 59].

Una fenilalanina nella posizione 552 interagisce col recettore SLAM, così come gli acidi aspartici nelle posizioni 505 e 507 [49], mentre il residuo nella posizione 546 modula la capacità di legame della proteina H ai recettori CD46 [60] e Nectin-4 [61].

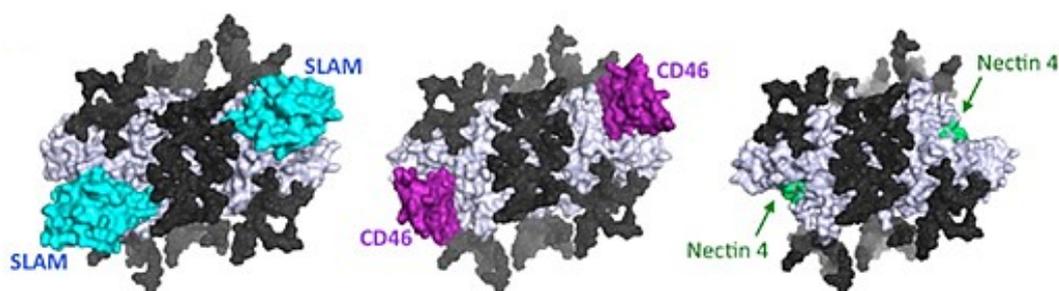


Figura 3 Sito di legame coi recettori della proteina H del virus del morbillo.

CICLO REPLICATIVO

La Figura 4 riassume in maniera schematica il ciclo replicativo del virus del morbillo.

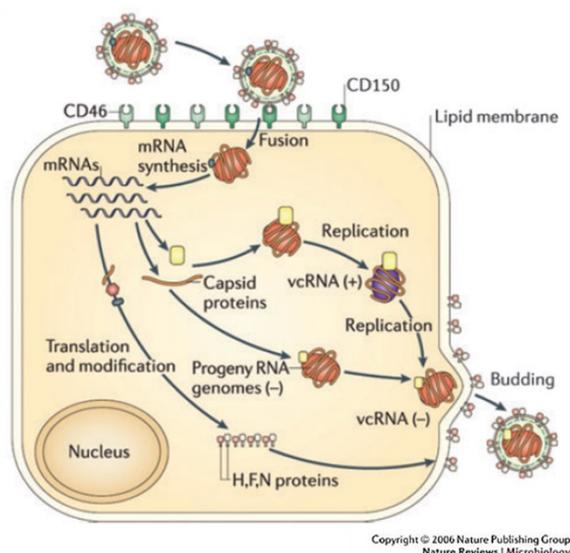


Figura 4 Ciclo di replicazione del virus del morbillo. La proteina H interagisce con uno dei recettori di membrana della cellula ospite, generando la fusione mediata dalla proteina F. La replicazione avviene nel citoplasma e i virioni assemblati gemmano dalla membrana citoplasmatica della cellula ospite.

PROCESSO DI FUSIONE

Diversamente da altri patogeni umani come il virus dell'influenza, dell'HIV o dell'ebola, il macchinario per l'entrata dei *Paramyxovirus* è composto da due glicoproteine dell'*envelope* codificate separatamente. L'emoagglutinina virale H e la glicoproteina di fusione F formano delle protrusioni sull'*envelope* e sono responsabili dell'assemblaggio di nuovi virioni, del legame col recettore e dell'entrata nella cellula ospite mediante fusione con la membrana delle cellule target.

Il primo step è rappresentato dall'adsorbimento del virus alla cellula ospite mediato dalla proteina H [62]. Sia il vaccino che i ceppi selvaggi sono in grado di utilizzare SLAM come recettore, mentre diversamente, i ceppi selvaggi non sono in grado di legarsi in maniera efficiente a CD46 [63-65]. Inoltre, il virus del morbillo potrebbe utilizzare anche altri recettori addizionali; nelle infezioni acute, le cellule endoteliali, così come quelle epiteliali e quelle del sistema immunitario vengono infettate [66-68], mentre nelle infezioni persistenti sono target importanti i neuroni e le cellule della glia [69], tuttavia i recettori di entrata non sono noti.

Una volta avvenuto il riconoscimento proteina H-recettore cellulare, il virus penetra all'interno della cellula con un processo di fusione mediato dalla proteina F1. Il dominio idrofobico della proteina F1 consente sia la fusione del pericapside con la membrana cellulare sia la formazione di sincizi cellulari. La proteina F2 invece, più piccola, si ancora alla F1.

L'uso di un enzima cellulare per la modifica di F0 ha due importanti conseguenze: il tropismo del virus, ristretto ai tipi cellulari che possiedono l'enzima adatto, e la maggiore o minore sensibilità delle diverse F0 all'azione enzimatica, che è direttamente collegata alla patogenicità.

PROCESSO DI REPLICAZIONE

A questo punto la prima necessità dei *Paramyxovirus*, che hanno un genoma a RNA a polarità negativa, è di trascrivere il proprio genoma che deve svolgere la doppia funzione di stampo sia per la trascrizione dei messaggeri, sia per la propria replicazione.

La trascrizione avviene nel citoplasma mediante una RNA polimerasi RNA-dipendente associata al virione, codificata probabilmente dal gene L. Gli mRNA prodotti sono monocistronici e la regolazione della trascrizione è mediata da sequenze poste all'estremità di ogni gene, indicandone l'inizio e la fine. Il complesso proteico della polimerasi virale è responsabile anche della replicazione e, ignorando i segnali di stop tra un gene e l'altro, sintetizza uno stampo di RNA a polarità positiva dal quale vengono copiati i genomi per la progenie.

I precursori del nucleocapside sono prodotti in largo eccesso: parte di questi migrano in siti della membrana dove, per mezzo della proteina M, si compattano con H, N e F0; il resto forma caratteristici corpi di inclusione intracitoplasmatici nella cellula bersaglio.

I virus completi terminano il loro ciclo di replicazione attraverso gemmazione [70].

INFEZIONE SISTEMICA E CONTAGIO

Dal punto di vista sistemico, il virus entra nell'organismo a livello dei polmoni mediante l'inalazione di goccioline (*droplets*) o particelle di aerosol che sono rilasciate nell'ambiente esterno da un soggetto infetto e che rimangono sospese nell'aria fino a 2 ore. Le particelle virali viaggiano attraverso il tratto respiratorio fino ad incontrare le cellule target SLAM/CD150 a livello alveolare. Infettano quindi i linfociti, le cellule dendritiche e macrofagi alveolari nel tratto respiratorio [71, 72]. Il virus si diffonde inizialmente al tessuto linfoide locale e successivamente attraverso il circolo sanguigno trasportato dai linfociti infetti e raggiungendo così anche cellule epiteliali ed endoteliali, principalmente attraverso la trasmissione diretta cellula-cellula, in quasi tutti gli organi del sistema come reni, tratto intestinale, fegato e tutto il tratto respiratorio [73, 74]. Qui, le cellule del sistema immunitario infette trasferiscono il virus alle cellule epiteliali attraverso l'uso del recettore Nectin-4 [75].

Il virus del morbillo gemma dalla superficie apicale delle cellule epiteliali respiratorie e viene poi diffuso attraverso l'epitelio danneggiato, consentendo la trasmissione respiratoria agli ospiti suscettibili [76].

MORBILLO, LA MALATTIA

Si pensa che il morbillo si sia propagato dopo lo sviluppo delle prime civiltà nel Medio Oriente. Dal terzo al decimo secolo d.C. infatti, i primi medici identificarono e diagnosticarono in Asia e in Nord America una malattia estremamente contagiosa, simile al vaiolo, che provocava sfoghi cutanei e dolori. Sono state ritrovate testimonianze già nel 340 d.C., con l'alchimista cinese Ko Hung, in cui venivano descritte le differenze tra il vaiolo e il morbillo; circa 300 anni dopo, il prete cristiano Ahrun fece lo stesso in Egitto, e nel 910 un medico persiano chiamato Rhazes, pubblicò il trattato "Il libro sul Vaiolo e Morbillo" dove descrisse tali patologie con la parola "*hasbah*", traducibile in eruzione, in riferimento all'esantema, carattere distintivo della malattia [77].

Poiché il morbillo è una malattia estremamente contagiosa, si può facilmente immaginare l'impatto che ebbe sulle popolazioni native americane quando i coloni arrivarono nel Nuovo Mondo. Nel 1492 le spedizioni di Cristoforo Colombo introdussero in America una serie di malattie, tra cui il morbillo, il vaiolo, il tifo, la malaria e la peste bubbonica, che stavano decimando la popolazione in Europa ma che ebbero un esito ancora più infausto nelle Americhe, dove si stima che la popolazione nativa si decimò del 95% nei 150 anni successivi all'arrivo dei coloni. Due anni più tardi il morbillo fu responsabile della morte di metà della popolazione in Honduras e da lì poi si propagò in Messico, in America Centrale, mietendo molte vittime tra gli Incas [77]. Nel 1676, il medico inglese Thomas Sydenham, grazie alle sue osservazioni sull'epidemia di morbillo che scoppiò a Londra nel 1670, fece un'accurata indagine con una dettagliata descrizione dei sintomi, del decorso e delle complicazioni della malattia. Una situazione simile a quella americana colpì le Hawaii tra il 1824 e il 1848. I re hawaiani fecero visita e re Giorgio IV a Londra, contrassero il morbillo e lo introdussero nelle loro isole native, dove morì un terzo della popolazione.

DECORSO NATURALE DELLA MALATTIA

L'infezione dal virus del morbillo decorre nei soggetti suscettibili in maniera quasi sempre sintomatica. In assenza di complicanze, il decorso della malattia è di 15-20 giorni e inizia con l'ingresso del virus per via aerea.

La malattia percorre 4 fasi caratteristiche, riassunte nella Figura 5.

FASE D'INCUBAZIONE

Il contatto tra virus e tratto nasofaringeo dell'ospite avviene tramite *droplets* o particelle di aerosol. Il periodo di incubazione, dal momento dell'infezione all'insorgenza dei primi sintomi (fase prodromica), è di circa 10 giorni. In media, il periodo di incubazione varia dai 12 ai 18 giorni, mentre il periodo di incubazione più lungo riportato è di 23 giorni [78].

Circa tre giorni dopo l'introduzione del virus nel tratto respiratorio, le cellule dendritiche polmonari immature o i macrofagi alveolari catturano e trasportano il virus del morbillo ai linfonodi regionali, dove si moltiplica e dove viene avviata la risposta immunitaria [79, 80].

Sette-undici giorni dopo l'entrata del virus nell'ospite le cellule immunitarie infette (cellule B, cellule T di memoria CD4 e CD8, monociti) entrano nella circolazione e diffondono il virus in organi linfoidi (ad esempio, milza, timo, linfonodi) e non linfoidi (ad esempio, pelle, congiuntiva, rene, polmone, fegato) [81, 82].

FASE PRE-ESANTEMATICA/PRODROMICA

La risposta immunitaria innata iniziale è limitata a causa dell'inibizione della risposta all'interferone e consente un'estesa replicazione e diffusione del virus durante la prima fase latente e silenziosa di circa 10 giorni. La prima comparsa clinica della malattia è febbre alta (38,5°C), accompagnata da tosse secca, congiuntivite e rinite [83]. Piccole papule bianche a livello della mucosa buccale e in corrispondenza dei molari, definite placche di Koplik, appaiono in circa l'80% dei casi e consentono di diagnosticare clinicamente la malattia del morbillo uno o due giorni prima della comparsa del *rash*.

FASE ESANTEMATICA

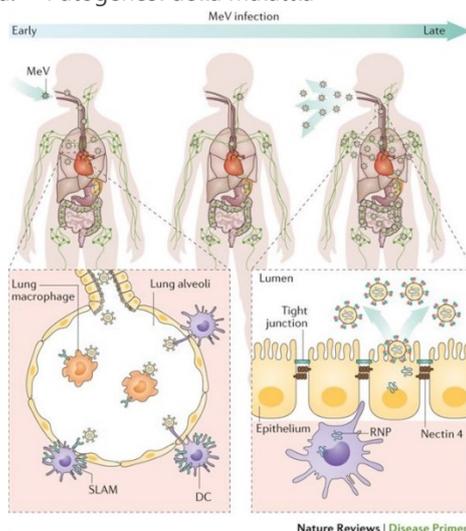
Il caratteristico *rash* maculo-papulare appare 2-4 giorni dopo la fase prodromica e circa 2 settimane dopo l'infezione, prima sul volto e dietro le orecchie, poi diffondendosi nell'arco di 2-3 giorni su tutto il tronco e all'estremità. Sono esclusi dall'eruzione cutanea palmi e piante dei piedi. I pazienti sono contagiosi a partire da circa 4 giorni prima della comparsa del *rash* e 4 giorni dopo. In tale periodo si verifica il picco viremico, tosse e corizza sono più intensi e facilitano la trasmissione virale. La sorgente di trasmissione esatta è spesso sconosciuta, in quanto il paziente viene generalmente infettato da un malato in fase prodromica. L'esantema si attenua in 3-4 giorni.

FASE DI CONVALESCENZA

L'eruzione cutanea è una manifestazione della risposta immunitaria cellulare adattiva specifica del morbillo e coincide con la *clearance* virale. Tuttavia, la rimozione dell'RNA virale dal sangue e dai tessuti è molto più lenta dell'eliminazione del virus infettivo e procede per settimane o mesi dopo la risoluzione del *rash*.

Il periodo di persistenza dell'RNA coincide con una minore resistenza dell'ospite all'infezione che può essere prolungata [84], ma generalmente, nelle persone senza complicanze, la risoluzione avviene entro una settimana dopo il *rash*. La febbre diminuisce rapidamente, lo stato generale migliora e il *rash* cutaneo si attenua fino alla completa scomparsa.

a. Patogenesi della malattia



b. Decorso naturale della malattia

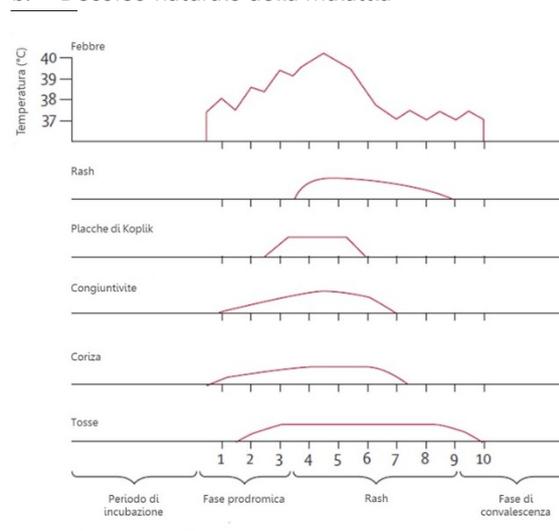


Figura 5 a. Patogenesi del morbillo (Paul Rota et al., 2016.) e b. decorso naturale della malattia (William J Moss, 2017). L'infezione iniziale a livello dei macrofagi alveolari e DC tramite SLAM raggiunge i linfonodi regionali, dove il virus replica e si diffonde in tutti gli altri organi. Le cellule epiteliali ricevono il virus tramite Nectin-4 e lo rilasceranno nel tratto respiratorio dalla membrana apicale.

L'RNA del virus del morbillo può essere rilevato nel sangue, nelle urine e nel tratto naso-faringeo anche diversi mesi dopo l'insorgenza del *rash* [85], aumentando la probabilità, anche se rara, di prolungare il periodo di trasmissione del virus.

Le complicazioni da morbillo quali polmonite, diarrea acuta ed encefalite possono insorgere fino nel 30% dei pazienti, in base all'età e alle condizioni predisponenti, come per esempio la malnutrizione e condizioni di immunosoppressione. Queste complicanze in genere si manifestano 2-3 settimane dopo la comparsa del *rash*.

COMPLICANZE

Le complicanze da morbillo sono relativamente frequenti e sono dovute principalmente a sovrainfezioni di natura batterica: le più diffuse sono diarrea, stomatite, cherato-congiuntivite (una causa frequente di cecità prima che si diffondesse il vaccino contro il morbillo e venissero somministrati integratori di vitamina A [86]), otite media, laringite e polmonite. Le complicazioni da morbillo possono coinvolgere molti organi e sono più comuni nei giovani infanti, negli adulti *over-20* anni e nelle persone immunocompromesse, ma anche nei bambini malnutriti (in particolare in bambini con deficienza di vitamina A [87]) e nelle donne in gravidanza, in questo caso associato a un incremento del rischio di basso peso alla nascita, aborti spontanei, morti fetali intrauterine e morti materne [88].

COMPLICANZE A CARICO DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Complicazioni gravi risultano solitamente di natura neurologica e sono più rare, ma sono anche il fattore maggiormente motivante nel prevenire l'infezione attraverso la vaccinazione.

Tra queste, l'encefalite acuta disseminata (ADEM) ha una frequenza di circa 1 su 1000-5000 e un tasso di mortalità del 15%, mentre il 20-40% dei casi presenta conseguenze neurologiche permanenti. È una malattia autoimmune demielinizante che viene scatenata dal virus del morbillo e si manifesta entro giorni o settimane dall'infezione. È caratterizzata da febbre, convulsioni e altri deficit neurologici [89].

Un'altra forma di encefalite che può incorrere è quella subacuta da corpi inclusi del virus del morbillo (MIBE), che interessa prevalentemente i soggetti fortemente immunocompromessi, soprattutto a carico dell'immunità cellulare. Il periodo di incubazione è lungo (5-6 mesi) e la patologia si manifesta inizialmente con convulsioni e paralisi locali e un deterioramento neurologico progressivo [89]. La MIBE È stata descritta in bambini con un sistema immunitario soppresso a causa di trapianti d'organo e in persone affette da HIV [90]. Spesso viene confusa con la panencefalite subacuta sclerosante o PESS, ma a differenza di questa ha un decorso molto più veloce, nell'ordine delle settimane o qualche mese.

La PESS, la più rara tra le forme di encefalite causate da morbillo (un caso su un milione), è una malattia neurodegenerativa a lenta insorgenza che provoca deterioramento comportamentale, deterioramento intellettivo e convulsioni. Il 50% dei pazienti che presentano la patologia ha contratto il morbillo prima dei due anni di età [91, 92]. Si stima che il periodo medio di comparsa della PESS dopo l'infezione acuta sia essere tra i 6 e i 10 anni, ma può variare da 1 a 24 anni [93, 94]. Il deterioramento è progressivo e si protrae per circa 1-3 anni, fino alla morte. Al momento della manifestazione dei sintomi neurologici i neuroni e le cellule della glia contengono inclusioni nucleari e citoplasmatiche del virus del morbillo e vi è un'estesa reazione infiammatoria nel sistema nervoso centrale che coinvolge le cellule T e B del sistema immunitario, accentuando una significativa produzione di anticorpi specifici contro il morbillo dalle cellule del plasma residenti nel sistema nervoso centrale [95, 96]. Di conseguenza, non vi è evidenza di un difetto globale della risposta immunitaria, bensì questa risposta risulta piuttosto inefficace nella *clearance* del virus dal sistema nervoso centrale. I ceppi virali di morbillo differiscono nell'abilità di stabilire una infezione persistente nelle stesse cellule ospiti *in vitro* [97], ma non vi sono casi di PESS che suggeriscano che vi sia un particolare virus selvaggio in grado di dare questa complicanza.

Il sequenziamento dell'RNA virale da diverse regioni del cervello mostrano che il virus è clonale [98], dimostrando che esso raggiunge il cervello durante l'infezione acuta, molto probabilmente attraverso l'infezione delle cellule endoteliali del sistema nervoso centrale, diffondendosi gradualmente lungo il sistema nervoso [99, 100].

Una volta all'interno dei neuroni il virus può diffondersi da neurone a neurone, senza il rilascio di particelle infettive, attraverso l'interazione tra la proteina F virale con il recettore Neurochinina-1 a livello delle sinapsi [101]. La degenerazione cerebrale è accompagnata anche da una progressiva perdita della vista (causata da corio-retinite) e da tipici cambiamenti dell'elettroencefalogramma che sono considerati patognomonici per la malattia.

DIAGNOSI

La diagnosi di morbillo è clinicamente semplice da effettuare. I sintomi prodromici sono la febbre e il raffreddore, ai quali seguono i sintomi caratteristici quali tosse, congiuntivite e l'esantema maculo-papulare.

Tuttavia, in alcuni casi la diagnosi clinica è molto più complicata, ad esempio per gli operatori sanitari che non sono famigliari con la malattia, nella fase prodromica o in soggetti immunocompromessi in cui il *rash* potrebbe essere assente o atipico, oppure in individui che presentano anticorpi acquisiti passivamente dall'immunità materna o tramite una vaccinazione precedente, o ancora tramite la somministrazione di immunoglobuline, in cui la fase prodromica e il *rash* potrebbero risultare più attenuati rispetto all'infezione dal virus selvaggio. Per tale motivo è fondamentale affiancare l'aspetto clinico alla diagnosi di laboratorio.

La diagnosi di laboratorio indiretta si basa sul riscontro con metodi immuno-enzimatici ELISA di anticorpi IgM antimorbillo, su campioni di siero prelevati entro pochi giorni dalla comparsa del *rash*. Circa il 75-90% dei casi di morbillo è IgM positivo 72 ore dopo l'insorgenza dell'eruzione cutanea e quasi tutte le persone affette da morbillo presentano IgM dopo 4 giorni [102]. Il livello di anticorpi IgM raggiunge il picco dopo circa 7-10 giorni, per poi declinare rapidamente, divenendo raramente rilevabile dopo 6-8 settimane. L'infezione acuta può essere anche confermata sierologicamente attraverso la misurazione dell'innalzamento degli anticorpi morbillo specifici IgG nel siero raccolto tra la fase acuta e quella di convalescenza. La sierconversione, infatti, cioè la comparsa di anticorpi IgG e la diminuzione e scomparsa di quelli IgM, inizia nella seconda settimana dopo l'esordio del *rash* e raggiunge il picco massimo entro circa 4 settimane, persistendo dopo l'infezione.

L'infezione può essere confermata anche attraverso l'individuazione dell'RNA virale tramite *real time* RT-PCR (diagnosi di laboratorio diretta) in campioni biologici quali tampone orofaringeo, nasofaringeo e urine, prima ancora che le IgM siano rilevabili. Tali campioni devono essere prelevati preferenzialmente nella stessa seduta di prelievo del siero, entro 3 giorni dall'esordio dell'esantema [103].

TERAPIA

Attualmente non esiste una cura farmacologica specifica per il morbillo, vengono impiegati medicinali che attenuano o risolvono i sintomi della malattia, ma non la curano. La gestione dei pazienti affetti da morbillo consiste quindi in una terapia che supporti la corretta idratazione e nutrizione, che riconosca e tratti prontamente infezioni secondarie da batteri e che fornisca l'integrazione di vitamina A, quest'ultima soprattutto a bambini ospedalizzati di età compresa tra i 6 mesi e i 2 anni [104].

Non esistono terapie specifiche antivirali contro il morbillo eccetto la Ribavirina (il cui beneficio per la cura del morbillo non è ancora stato del tutto dimostrato), l'Interferone Alfa e altri farmaci antivirali che vengono usati per trattare casi severi di morbillo, in cui il sistema immunitario del paziente risulta particolarmente indebolito [105].

Non vi sono evidenze sostanziali che supportino l'utilizzo di profilassi antibiotiche in bambini affetti da morbillo e di conseguenza l'utilizzo non ne è raccomandato [106]. Tuttavia, gli antibiotici vengono indicati per le persone affette da morbillo che abbiano segni clinici evidenti di infezioni secondarie batteriche, incluse polmoniti e otiti medie.

Il modo più efficace per combattere il morbillo resta dunque quello di prevenire tale malattia attraverso la vaccinazione, la quale si traduce in risposte immunitarie umorali e cellulari simili a quelle generate dalla malattia naturale, ma senza incorrere nella malattia stessa [107].

RISPOSTA IMMUNITARIA

Le risposte immunitarie contro il virus del morbillo sono cruciali per la *clearance* virale e stabiliscono immunità protettiva, ma sono anche le basi patologiche dei segni clinici e dei sintomi che contribuiscono alla morbilità del morbillo e alla mortalità. Segni e sintomi della malattia perciò vanno di pari passo con la risposta immunitaria e il *rash* del morbillo, per esempio, caratterizza l'infiltrazione linfocitaria perivascolare [108].

La risposta immunitaria innata primaria si attiva durante la fase prodromica, prima della comparsa del *rash*. Le due proteine virali non strutturali V e C sopprimono la produzione di interferone (IFN) da parte dell'ospite, pertanto, IFN non viene prodotto per sopprimere l'infezione, con il conseguente periodo latente durante il quale vi è la diffusione del virus a livello sistemico senza segni o sintomi dell'infezione e facilitando così la replicazione virale [26]. Tuttavia, ci sono prove dell'impiego di proteine in risposta allo stress e dell'attivazione infiammatoria da parte dell'infezione dal virus del morbillo, tra cui l'aumento dei livelli nel plasma di un sottoinsieme di citochine e chemochine importanti per l'avvio della risposta immunitaria adattativa [109-111]. La risposta immunitaria adattativa è successiva e consiste nella risposta cellulare e umorale, la prima essenziale per il ricovero dall'infezione, la seconda per stabilire l'immunità protettiva a lungo termine.

IMMUNITÀ ADATTATIVA UMORALE: RISPOSTA ANTICORPALE

La risposta umorale iniziale consiste nella formazione delle immunoglobuline M (IgM) che aumentano con la comparsa del *rash* e persistono fino a 6-8 settimane, seguita da un passaggio dell'isotipo a IgG3 e poi, nella fase di memoria, a IgG1 e IgG4 [42, 112]. Le IgG sono inizialmente di bassa avidità, ma aumenta costantemente nel corso di diversi mesi (Figura 6) [113].

L'anticorpo più abbondante e più rapidamente prodotto è verso la nucleoproteina N, mentre la proteina M suscita solo piccole quantità di anticorpi [114, 115]. Gli anticorpi verso l'emoagglutinina H sono gli anticorpi misurati mediante test basati sulla neutralizzazione dell'infettività del virus nelle indagini indirette [41, 116]. Gli anticorpi verso la proteina di fusione F contribuiscono alla neutralizzazione dei virus, probabilmente prevenendo la fusione della membrana virale con la membrana cellulare al momento dell'ingresso del virus [117].

Gli anticorpi sono in grado di proteggere dall'infezione dal virus del morbillo e possono contribuire al recupero dalla malattia [118]. Essi risultano essere sufficienti per la protezione verso la malattia, dal momento che i neonati sono protetti dagli anticorpi materni e il trasferimento passivo di immunoglobuline, oltre a interferire con la vaccinazione contro il morbillo, può proteggere parzialmente i bambini dal morbillo dopo l'esposizione al virus [119, 120].

Il livello di anticorpi neutralizzanti presenti nel sangue definisce la capacità di protezione dall'infezione. Prove sperimentali suggeriscono che gli anticorpi H- (in misura maggiore) e F-specifici contribuiscono alla neutralizzazione e alla protezione dai virus [41]. Pertanto, gli anticorpi neutralizzanti sono la manifestazione della protezione o della suscettibilità alla malattia, con un titolo anticorpale di 120 mIU/ml che conferisce protezione contro la malattia (ma non contro l'infezione da parte del virus) e un titolo superiore a 1.000 mIU/ml che conferisce protezione contro la malattia e l'infezione [121].

IMMUNITÀ ADATTATIVA CELLULARE: *CLEARANCE* VIRALE

La maggior parte dei virus a RNA, tra cui il morbillo, si replica nel citoplasma senza integrare il proprio genoma in quello della cellula ospite e sono perciò considerati suscettibili alla *clearance* immuno-mediata. La risposta immunitaria cellulare adattativa è generalmente considerata come la risposta più importante per la *clearance* virale del morbillo. Infatti, i bambini con agammaglobulinemia guariscono dall'infezione, mentre quelli con difetti nelle cellule immunitarie (ad esempio infezione da HIV, deficit immunitari congeniti e chemioterapia) sono propensi a sviluppare un'infezione progressiva dei polmoni (cellule giganti multinucleate) o a livello del sistema nervoso centrale (encefaliti da corpi inclusi) [122].

La risposta immunitaria cellulare e la secrezione di anticorpi contro il morbillo appaiono coincidenti con l'insorgenza del *rash* (Figura 6) e le biopsie a livello delle cellule epiteliali coinvolte mostrano infiltrazione di linfociti CD4+ e CD8+. In particolare, i linfociti CD8+ sono particolarmente importanti per il controllo della *clearance* e dell'infezione virale. Nelle scimmie, la privazione delle cellule T CD8+, ma non delle cellule B, al tempo dell'infezione risulta in una viremia molto più alta e prolungata [123].

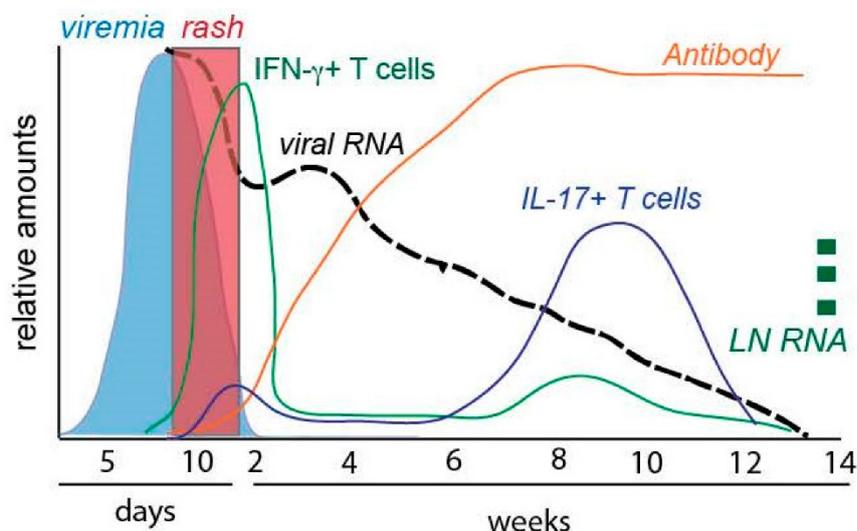


Figura 6 Diagramma schematico della *clearance* del virus del morbillo e della risposta immunitaria. L'infezione da parte di un virus selvaggio provoca viremia e *rash*, quest'ultimo associato alla presenza di cellule T che producono interferone, che declinano subito dopo la *clearance* virale. Durante la *clearance* gli anticorpi aumentano in numero e avidità, mentre vi è uno *shift* da cellule T che producono interferone a quelle che producono interleuchina-17. Vi è una fase prolungata della *clearance* dell'RNA virale dal sangue periferico e che persiste nei linfonodi (LN). (Diane E. Griffin, 2016)

La *clearance* dell'infezione virale e la risoluzione del *rash* che l'accompagna sono associate al ricovero clinico in molti bambini. Tuttavia, in studi prospettici che hanno coinvolto bambini malati di morbillo e ospedalizzati, l'RNA virale è stato rilevato nel 62% dei bambini in almeno un sito biologico (sangue periferico, urine, tampone orofaringeo) a 1-2 mesi dopo le dimissioni dall'ospedale e nel 37% a 3-4 mesi dopo la dimissione ospedaliera [86, 124]. Questi dati indicano che la *clearance* dell'RNA virale dopo l'infezione è un processo lungo.

I recenti studi sulla patogenesi mettono quindi in dubbio la visione tradizionale che il morbillo sia una malattia acuta e che duri dalle 2 alle 3 settimane. Infatti, l'RNA virale del morbillo rimane rilevabile nel tessuto linfoide anche dopo che non è più presente nel sangue e il sistema immunitario rimane attivato per molti mesi [125]. Il sequenziamento dell'RNA isolato da campioni prelevati tardivamente non ha identificato mutazioni nelle regioni variabili del gene N né del gene H [85].

Questi dati suggeriscono che la presenza di RNA virale a distanza di mesi dall'infezione acuta non dipenda da mutazioni che promuovono l'*escape* virale dalla risposta immunitaria, ma piuttosto viene attribuita a una *clearance* lenta del virus.

La presenza prolungata dell'RNA virale offre nuove intuizioni su almeno tre aspetti importanti, ma poco compresi, della patogenesi del morbillo, come lo sviluppo tardivo di malattie neurologiche progressive. Inoltre, la presenza continua dell'RNA e delle proteine virali nel tessuto linfoide dopo la fase acuta dell'infezione può spiegare anche la soppressione della risposta immunitaria a nuove infezioni, così come è altrettanto probabile che sia responsabile della maturazione della risposta immunitaria protettiva e di lunga vita contro il morbillo, promuovendo la maturazione delle cellule B e contribuendo alla continua produzione di cellule che secernono anticorpi, le plasmacellule [126]. Il miglioramento continuo della qualità degli anticorpi, come dimostrato dalla crescente avidità, suggerisce una continua attività delle cellule T-*helper* e la selezione delle cellule B nei centri germinali del tessuto linfoide, mentre lo sviluppo di plasmacellule longeve è necessario per sostenere i livelli di anticorpi plasmatici per la vita [127], in particolar modo le IgG neutralizzanti la proteina H, che bloccano il legame tra quest'ultima e il recettore della cellula ospite [128].

IMMUNITÀ PROTETTIVA DI LUNGA VITA

Studi epidemiologici hanno dimostrato che il titolo di anticorpi neutralizzanti al momento dell'esposizione al virus selvatico nella comunità è un buon indicatore di protezione dall'infezione, e che sono richiesti titoli anticorpali più elevati per prevenire del tutto l'infezione rispetto a quelli necessari per prevenire il *rash*. Poiché è necessario l'aiuto delle cellule T CD4 per la maturazione degli anticorpi e della loro avidità, la risposta immunitaria cellulare è importante anche per l'induzione dell'immunità protettiva. Si è visto inoltre che le cellule T risultano dare protezione a individui con bassi livelli di anticorpi [129]. Gli effetti antivirali delle cellule T possono essere mediati sia dalla secrezione di citochine che sopprimono la replicazione del virus sia dall'eliminazione citotossica delle cellule infette. Poiché le cellule T non bloccano direttamente l'infezione, il loro contributo è generalmente considerato minore rispetto a quello degli anticorpi neutralizzanti.

SOPPRESSIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Il morbillo è stata la prima infezione immunosoppressiva a essere descritta [130]. La viremia è infatti accompagnata da linfocitopenia, con una riduzione delle cellule T CD4 e CD8 che può essere dovuta alla morte di cellule infette o al traffico alterato di linfociti: durante il morbillo avviene infatti una linfocitopenia transitoria [131] dovuta molto probabilmente non tanto a una vera e propria mancanza di linfociti, ma piuttosto a una loro redistribuzione dal sangue periferico al tessuto linfatico [81], provocando una cosiddetta "amnesia" verso antigeni precedentemente

incontrati [132] e causando la soppressione immunitaria che aumenta il rischio di contrarre infezioni secondarie batteriche e virali. Studi suggeriscono che questa condizione duri da svariate settimane fino ai mesi successivi alla malattia [133, 134]. Comunque, un recente studio osserva che questo stato di rischio potrebbe estendersi fino anche a 2-3 anni dopo aver contratto il morbillo [84].

IL VACCINO CONTRO IL MORBILLO

La storia della creazione del vaccino contro il morbillo nasce da studi e osservazioni della malattia fatti secoli fa. Nella prima metà dell'800 un medico danese, Peter Ludwig Panum, studiando un *outbreak* di morbillo nella popolazione delle isole Faroe, osservò che chi era già stato infettato non contraeva la malattia una seconda volta.

Agli inizi del Novecento, l'immunologo Clemens von Pirquet aggiunse un nuovo livello di conoscenza alla malattia. Attraverso le applicazioni di un test cutaneo che aveva sviluppato in precedenza per la diagnosi della tubercolosi, scoprì un'interazione tra la tubercolina e il morbillo fornendo numerosi elementi aggiuntivi per la conoscenza della sua infettività, immunità dell'ospite e sua ipersensibilità.

Quasi mezzo secolo dopo, nel 1954, il medico Thomas C. Peebles isolò il virus da un bambino di 13 anni malato, di nome David Edmonston, e aprì la prima strada verso il vaccino [135]. Fu poi John Enders a sviluppare il vaccino isolandolo in colture tissutali umane e di scimmie e a renderlo disponibile per la distribuzione di massa. John Enders è considerato "il padre dei moderni vaccini" e il suo infaticabile lavoro venne premiato con il Nobel per la Medicina nel 1954 [135, 136].

VACCINO INATTIVATO IN FORMALINA

Il primo vaccino contro il morbillo, sviluppato nel 1960, conteneva il ceppo Edmonston B ucciso mediante l'inattivazione in formalina [137]. Le persone venivano vaccinate mediante 3 dosi [137, 138] e sviluppavano livelli moderati di anticorpi neutralizzanti, risultando protetti verso la malattia quando l'esposizione al morbillo si verificava entro qualche mese dopo l'immunizzazione [139]. Tuttavia, il titolo anticorpale diminuiva rapidamente e i soggetti divenivano nuovamente suscettibili al morbillo [140]. Inoltre, a causa della formazione di immunocomplessi, gli individui precedentemente vaccinati col vaccino ucciso in formalina avevano la tendenza a sviluppare una malattia più grave quando infettati dal virus selvatico, denominata morbillo atipico e caratterizzata da febbre più alta e prolungata, lesioni cutanee insolite e polmonite grave [141-143]. L'eruzione era spesso accompagnata da emorragia o vescicole e partiva dalle estremità invece che dalla testa e dal tronco.

La risposta immunitaria al vaccino inattivato dalla formalina era caratterizzata dall'assenza di cellule T citotossiche e da anticorpi di bassa avidità. Il vaccino inattivato fu inizialmente concesso in licenza nel 1963, ma ritirato nel 1967 [144].

VACCINO VIVO ATTENUATO

Il processo di adattamento del virus del morbillo coltivato in cellule animali naturalmente non ospiti del virus, come cellule embrionali di pollo, ha portato con successo allo sviluppo di ceppi vivi attenuati [145, 146]. L'inoculazione di questo virus nei primati non produceva sintomi clinici, viremia rilevabile e nessuna diffusione al tratto respiratorio, ma induceva una risposta immunitaria che proteggeva le scimmie dalla successiva esposizione con il virus di tipo selvaggio [147].

Il primo vaccino vivo attenuato contro il morbillo è stato concesso in licenza negli Stati Uniti nel marzo del 1963. Un primo vaccino candidato, il ceppo Edmonston B, derivava dal passaggio in serie del ceppo Edmonston nelle cellule renali umane e di scimmia e nei fibroblasti dell'embrione di pollo, ma si è dimostrato in seguito insufficientemente attenuato, inducendo febbre e *rash* in gran parte dei bambini immunizzati [144, 148]. Tali reazioni avverse potevano essere ridotte somministrando in contemporanea le gamma globuline [120].

Una seconda generazione più attenuata di vaccini contro il morbillo (ceppi di Schwarz, Edmonston, AIK-C e Moraten) appartengono tutti al lignaggio Edmonston e sono attualmente utilizzati. Passaggi ulteriori del virus Edmonston B in fibroblasti embrionali di pollo hanno portato alla produzione di un vaccino (Schwarz) più attenuato [149] che attualmente funge da vaccino standard contro il morbillo in gran parte del mondo (prodotto in Brasile e in Europa). Il ceppo Moraten ("*more attenuated*") prodotto nel 1968 e usato negli Stati Uniti è strettamente imparentato con il ceppo Schwarz [150]. Anche altri ceppi di vaccino derivati da Edmonston (ad es. Zagreb, il più usato nei programmi di immunizzazione dell'OMS, India, Croazia, Svizzera, AIK-C utilizzato in Giappone) e ceppi non-Edmonston (ad esempio CAM-70, prodotto e utilizzato in Giappone e Indonesia, Leningard-16, prodotto e utilizzato in Russia, Changchun-47 e le varianti Shanghai-191, prodotti e utilizzati in Cina [10]) sono vaccini di successo [151].

Tutti i vaccini contro il morbillo sono di genotipo A e le sequenze dei ceppi vaccinali non differiscono notevolmente l'una dall'altra [6].

Genetica per l'attenuazione

L'attenuazione è il risultato dell'adattamento del virus a condizioni di crescita in coltura cellulare non permissiva, nel caso del morbillo, specialmente in linee cellulari aviarie. Presumibilmente, in questo modo si producono mutazioni che aumentano l'interazione tra proteine e cellule aviarie, ma riducono la capacità delle proteine virali di svolgere le proprie funzioni nell'ospite umano, attenuandone quindi l'impatto.

Il vaccino vivo attenuato si replica in modo meno efficiente rispetto al tipo selvaggio [152], ma è in grado di indurre sia risposte anticorpali neutralizzanti che risposte immunitarie cellulari qualitativamente simili a quelle indotte dalla malattia naturale, anche se i titoli anticorpali sono più bassi [153].

Non è stato dimostrato alcun cambiamento funzionale comune ai vaccini. Ciò può essere dovuto al fatto che l'attenuazione sia il risultato di molteplici cambiamenti cumulativi e storie di passaggi slegate tra loro possono aver dato a ogni vaccino una strada diversa verso l'attenuazione. Pertanto, anche se si sono compiuti progressi significativi nell'analisi delle differenze funzionali tra i virus di tipo selvaggio e vaccinale, la base molecolare dell'attenuazione rimane sconosciuta. Quasi ogni gene contribuisce in qualche modo a un fenotipo adattato alla coltura cellulare, complicando l'identificazione della base molecolare per l'attenuazione nell'uomo.

La ricombinazione, che è un mezzo efficace per un rapido cambiamento genetico per molti virus, non si verifica nei *Paramyxovirus*, nessun virus ricombinante è stato infatti isolato dalle infezioni naturali. Un vincolo che può spiegare l'assenza di ricombinazione è la "regola del 6" [154]: le lunghezze del genoma nella sottofamiglia *Paramyxoviridae* devono essere equamente divisibili per 6 e i genomi con mutazioni che violano la regola porterebbero portare a virus non vitali. Infine, il complesso percorso verso l'adattamento alla coltura cellulare e l'attenuazione, insieme all'assenza di ricombinazione, suggeriscono una estrema improbabilità per i ceppi vaccinali contro il morbillo di un ritorno a un fenotipo virulento.

Oltre al vaccino inattivato in formalina, un altro vaccino contro il morbillo venne ritirato dal commercio dopo che si ebbe mostrato aver dato gravi effetti collaterali. Il secondo vaccino ritirato conteneva un alto titolo di virus del morbillo e fu approvato dall'OMS nel 1990 per sovrastare l'effetto inibitorio che le immunoglobuline materne avevano sulla vaccinazione, ma risultò in una ancora non chiara mortalità "a effetto ritardato" nelle donne [155]. L'OMS aveva infatti raccomandato l'uso del vaccino Edmonston-Zagreb (ZE) a 6 mesi di età nei paesi in cui il morbillo era stata una causa significativa di morte prima dei 9 mesi di età. Purtroppo, il successivo *follow-up* dei bambini che ricevettero questo vaccino ad alto titolo mostrò un aumento della mortalità nelle ragazze nei successivi 2-3 anni e il vaccino fu immediatamente ritirato [156, 157]. La patogenesi dell'aumento della mortalità ritardata dopo il vaccino ad alto titolo non è ancora conosciuta, ma si verificò principalmente in coloro che svilupparono *rash* dopo la vaccinazione e potrebbe dunque essere correlata alla soppressione a lungo termine della risposta immunitaria simile a quella indotta dal morbillo, lasciando i bambini più suscettibili alle infezioni secondarie [158].

EFFETTI COLLATERALI E PROBLEMATICHE DEL VACCINO ATTUALE

Il vaccino vivo attenuato viene somministrato a livello sottocutaneo o intramuscolare e gli effetti collaterali legati alla vaccinazione si possono dividere in due categorie:

- A livello locale: le reazioni locali non sono rare e si verificano entro 24 ore dalla vaccinazione. Si può sperimentare dolore, arrossamento e gonfiore presso il sito di iniezione, sintomi generalmente lievi, transitori e che si risolvono entro 2-3 giorni [159, 160].
- A livello sistemico: le reazioni sistemiche si verificano in circa il 5-15% dei destinatari del vaccino, 7-12 giorni dopo la vaccinazione e durano circa 1-2 giorni. Includono nella maggior parte dei casi febbre alta (>39.4 °C) e nel 2-5% dei casi anche un'eruzione cutanea (*rash*) che si risolve in circa 2 giorni [159, 160].

Questi eventi avversi lievi si verificano meno frequentemente dopo la seconda dose e tendono a verificarsi solo in soggetti non protetti dalla prima dose, questo perché dove la prima dose ha già conferito protezione si ha una risposta neutralizzante agli effetti collaterali della seconda dose (a esclusione delle reazioni allergiche). Allo stesso modo, non c'è motivo di credere che le persone che ricevono più di 2 dosi siano soggette a un rischio più elevato di reazioni avverse.

Eventi avversi severi si verificano raramente e comportano:

- Ipersensibilità e allergie al vaccino o ai suoi componenti, tra cui orticaria nel sito di iniezione. Reazioni anafilattiche sono ritenute estremamente rare: il tasso di anafilassi è stato documentato tra 3,5-10 dosi per milione [160].
- Convulsioni: il vaccino contenente morbillo può causare crisi febbrili, con un tasso di convulsioni di 1 per 1000-3000 dosi. I bambini con una storia personale o familiare di crisi epilettiche sono maggiormente a rischio di epilessia idiopatica, tuttavia, il rischio sembra essere minimo e le crisi febbrili dopo la vaccinazione non aumentano la probabilità che l'epilessia o altri disturbi neurologici si sviluppino in questi bambini [160].
- Trombocitopenia: il rischio di trombocitopenia a seguito della vaccinazione è di 1 su 30.000-40.000 bambini vaccinati. Il rischio di trombocitopenia a seguito della vaccinazione può essere maggiore per chi presenta una diagnosi precedente di porpora trombocitopenica immunitaria, o morbo di Werlhof, una malattia autoimmunitaria acquisita, ad eziologia ignota, a patogenesi immune, caratterizzata da piastrinopenia dovuta a distruzione periferica dei trombociti e da un numero aumentato o normale di megacariociti midollari. Il decorso clinico di questi casi è solitamente transitorio e benigno e ad oggi è comunque impossibile attribuire queste reazioni a uno dei componenti virali del vaccino [160].

Il vaccino attuale è controindicato in individui con gravi carenze di immunità cellulare a causa della possibilità di sviluppare infezioni polmonari progressive o a carico del sistema nervoso centrale [161, 162].

Il vaccino è liofilizzato ed è relativamente stabile, ma quando ricostituito perde rapidamente la sua efficacia. Inoltre, i vaccini vivi attenuati vengono inattivati da luce e calore e dopo la ricostituzione perdono circa la metà dell'efficacia a 20°C e quasi tutta a 37°C entro un'ora [163]. Pertanto, deve essere mantenuta una catena del freddo prima e dopo la ricostituzione del vaccino. Un esempio del risultato della rottura della catena del freddo è stato dimostrato nelle Isole Marshall, in cui i fallimenti secondari del vaccino furono causati da una catena del freddo compromessa e provocarono la prima epidemia di morbillo dopo più di due decenni [164].

SVILUPPO DI NUOVI VACCINI

Nonostante la disponibilità di un efficace sistema di somministrazione di vaccini, sono in corso diverse strategie di vaccinazione alternative. Le motivazioni alla base del desiderio di migliorare l'attuale metodo di somministrazione del vaccino includono l'eliminazione o la riduzione della catena del freddo durante il trasporto, le preoccupazioni relative alla sicurezza delle iniezioni e allo smaltimento dei rifiuti contaminati e la riduzione della necessità di personale qualificato per la somministrazione del vaccino [144]. Inoltre, si stanno esplorando percorsi alternativi di immunizzazione per determinare se gli effetti inibitori degli anticorpi materni possano essere superati per consentire l'immunizzazione dei neonati in età più giovane, in particolare nelle regioni ad alta endemicità [144]. Un nuovo vaccino sarebbe vantaggioso se in grado di consentire la vaccinazione dei neonati prima dei 6 mesi di età. Ciò chiuderebbe la "finestra di suscettibilità" tra il decadimento degli anticorpi materni e la vaccinazione e faciliterebbe la somministrazione del vaccino contro il morbillo contemporaneamente ad altri vaccini inclusi nel programma OMS *Expanded Program for Immunization* (EPI). Un'ulteriore motivazione per lo sviluppo di un nuovo vaccino sarebbe quella di fornire un vaccino sicuro per gli individui immunocompromessi [165].

Vi sono studi che dimostrano una significativa associazione tra la via di somministrazione del vaccino con la risposta immunitaria risultante, pertanto, vi è un notevole interesse nella valutazione delle diverse vie di somministrazione. Le vie alternative di vaccinazione attualmente in fase di valutazione sono la vaccinazione attraverso la via respiratoria e la via intradermica per mezzo di micro-ago o iniettori usa e getta, con l'intento di eliminare la logistica dell'utilizzo di oggetti taglienti attualmente utilizzati per la via di somministrazione sottocutanea [166, 167]. Essi sono in fase di sviluppo dalla metà degli anni '90 e le formulazioni più recenti utilizzate per valutare la somministrazione di vaccini contro il morbillo includono la loro dissoluzione, in cui

il vaccino è incapsulato nella punta dell'ago, aumentando l'igiene ed eliminando la necessità dello smaltimento di rifiuti pericolosi [168, 169]. Un ulteriore vantaggio è che la loro somministrazione può essere fatta da individui con formazione minima. Questo nuovo e promettente metodo di somministrazione non sarà disponibile nell'immediato futuro perché lo sviluppo è ancora in fase preclinica.

La vaccinazione respiratoria attraverso aerosol è stata valutata in due formulazioni, quella tramite nebulizzatore e quella in polvere. La somministrazione del vaccino tramite aerosol genera una risposta immunitaria senza reazioni avverse ed è efficace per fornire una seconda dose di vaccino [170-172]. Il vaccino in polvere, invece, verrebbe ricostituito in vivo dall'umidità nel tratto respiratorio. I vantaggi della formulazione in polvere riguardano la maggiore termostabilità, non dovendo più dipendere dal mantenimento della catena del freddo. La formulazione del vaccino in polvere valutata negli studi clinici di fase 1 presenta immunogenicità e non produce eventi avversi [173].

L'OBBIETTIVO DELLA VACCINAZIONE

In generale, gli obiettivi di un programma vaccinale mirano al controllo della malattia attraverso una significativa riduzione dell'incidenza nella popolazione, all'eliminazione, ovvero alla scomparsa dei casi, oppure all'eradicazione dell'agente eziologico, vale a dire alla sua rimozione definitiva a livello mondiale. In questo ultimo caso si arriva in una condizione in cui sia il patogeno sia la malattia non sono più presenti e quindi la vaccinazione non è più necessaria. Ad oggi le uniche malattie a essere state eradicate sono il vaiolo e, più recentemente, la peste bovina causata dal *Rinderpest virus*, appartenente alla stessa famiglia del *Morbillivirus*.

Per raggiungere l'eradicazione vi devono essere particolari condizioni necessarie: il microrganismo deve essere geneticamente stabile e l'uomo la sola sorgente di infezione, la cui guarigione costituisca una immunità a vita. Tutti gli individui infetti devono risultare sintomatici, ovvero non esiste lo stato di portatore o di fasi latenti e la malattia deve essere diagnosticabile. Inoltre, deve esistere un vaccino sicuro ed efficace.

Il virus del morbillo presenta tutte queste caratteristiche e si può pertanto giungere alla sua eradicazione attraverso piani mirati di sorveglianza e di vaccinazione.

Nel momento in cui sussistono tutte le condizioni sopra citate e si raggiunge una percentuale critica di soggetti vaccinati si ottiene ciò che gli epidemiologi chiamano *herd immunity*, ovvero l'immunità di gregge. Con questo termine si intende l'immunità o la resistenza collettiva a un determinato patogeno da parte di una comunità o popolazione (Figura 7).

Ciò è possibile perché esiste una soglia del numero di ospiti suscettibili presenti in un ambito geografico al di sotto del quale il microorganismo non può mantenersi nella popolazione e, di conseguenza, saranno protetti dall'infezione anche tutti gli individui non vaccinati. Per il morbillo, il numero di individui minimo per sostenere la trasmissione virale è di 300.000-500.000 [2]. Per definire le linee generali della strategia vaccinale antimorbillo è fondamentale valutare il tasso di riproduzione di base del patogeno, o R_0 . Questo equivale al numero medio di persone infettate direttamente da un individuo già infetto, in una popolazione completamente suscettibile [174].

Tasso di riproduzione di base e coperture vaccinali

R_0 dipende da tre parametri: la durata del periodo di infettività (ovvero la contagiosità del soggetto infetto, D), il numero medio di contatti per unità di tempo (C) e la probabilità di trasmissione per singolo contatto (che tiene in considerazione il tipo di contatto e il livello di contagiosità dell'agente eziologico) β . Queste tre variabili sono correlate a R_0 in maniera direttamente proporzionale secondo l'equazione: $R_0 = DC\beta$.

R_0 può assumere diversi valori in base ai quali si può definire lo stato di circolazione del virus nella popolazione. Quando $R_0=1$ il virus è endemico, ha raggiunto cioè la condizione soglia per la persistenza nella popolazione o in un territorio. Se, invece, $R_0<1$ significa che si è raggiunta una condizione tale da determinare l'interruzione della trasmissione nella popolazione. Infine, se $R_0>1$, è molto probabile che si scateni un'epidemia. Nel caso del morbillo, il tasso di riproduzione di base è tra i più elevati conosciuti. In base alle caratteristiche di trasmissione e alla densità di popolazione il suo R_0 ha infatti un valore che normalmente varia tra 16 e 18, ma può raggiungere anche picchi più alti (Figura 7) [174]. Ciò significa che un soggetto malato può contagiare 16-18 persone suscettibili e queste, una volta infettate, possono a loro volta trasmettere l'infezione a 16-18 individui e così via. Questo permette di avere un'idea sull'elevata contagiosità del morbillo nella popolazione. Inoltre, questo valore di R_0 risulta ancor più notevole se si considera che è significativamente più elevato di quello del virus del vaiolo ($R_0 = 5-7$) e di quello dell'influenza ($R_0 = 2-3$) [175]. Tuttavia, bisogna considerare che R_0 è un valore puramente teorico che prende in considerazione una popolazione ideale interamente suscettibile. Pertanto, una situazione più realistica è descritta dal tasso di riproduzione effettivo R_E , che tiene conto della porzione di popolazione immune ed è calcolabile secondo la relazione: $R_E = R_0S(t)$, dove con $S(t)$ si intende la frazione di soggetti suscettibili all'istante "t" nella popolazione.

Nell'eziopatogenesi delle malattie di natura infettiva, al contrario di molte altre malattie nelle quali il processo patogenetico è spesso complesso e molte volte sconosciuto nei dettagli, concorrono due fattori essenziali: l'esposizione all'agente patogeno e la suscettibilità dell'ospite. La vaccinazione elimina il secondo fattore determinando una drastica diminuzione della circolazione del patogeno nella popolazione e abbassando il tasso di riproduzione effettivo (R_E). Il morbillo è dato da un virus che si trasmette solo nell'uomo e questo offre un vantaggio perché agendo sulla seconda causa, indirettamente e gradualmente si agisce anche sulla prima, cosa che non si verifica in virus che contano su serbatoi animali.

Obiettivo quindi della prevenzione vaccinale è ridurre R_E il più possibile, puntando a un valore inferiore all'1, in modo tale da interrompere le catene di trasmissione. Questi parametri matematici tornano utili per capire quale deve essere la copertura vaccinale per una malattia infettiva, avendo noto il suo tasso di riproduzione effettivo. Quindi, considerando " P_c " come la proporzione critica di soggetti immuni necessaria per interrompere la trasmissione della malattia:

$$R_E < 1 \rightarrow R_0(1-p) < 1 \rightarrow P_c > 1 - (1/R_0)$$

Risolvendo la formula finale si può determinare la quota critica di copertura vaccinale per ottenere risultati ottimali in materia di prevenzione. Una semplice stima analitica basata su una popolazione *random* di soggetti suscettibili e non, assume infatti che per raggiungere l'eliminazione della malattia del morbillo i livelli di immunizzazione della popolazione debbano essere più alti del 90-95% (Figura 7). Tuttavia, questa stima è teorica e non tiene conto di alcuni contesti ambientali e sociali, come l'eterogeneità spaziale delle popolazioni suscettibili e i contatti non casuali [176].

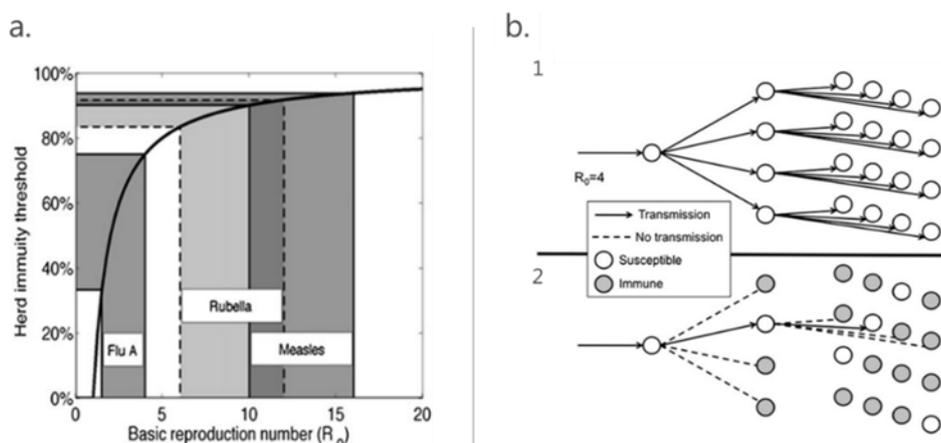


Figura 7 a. Relazione tra soglia di immunità di gregge e numero di riproduzione di base R_0 , in una popolazione omogenea con contatti casuali. Per il morbillo, la soglia critica di immunità di gregge supera il 90%. b. Diagramma che illustra la trasmissione di un'infezione con $R_0=4$. Trasmissione su 3 generazioni in una popolazione totalmente sensibile (1) e se parte della popolazione è immune (2). (Fine P, et al., 2011).

I livelli di copertura vaccinale sono di conseguenza proporzionali a R_0 , in quanto più è elevato il suo valore, maggiore sarà la proporzione di persone da vaccinare.

Raggiunti i primi risultati della vaccinazione, bisogna evitare quello che viene chiamato "effetto luna di miele": in assenza di programmi vaccinali e se la natalità rimane costante, i picchi epidemici di una malattia infettiva si susseguono ad intervalli regolari; se invece in una popolazione viene introdotto un programma vaccinale, si riduce la velocità di accumulo dei suscettibili, quindi è necessario un tempo maggiore per raggiungere la soglia epidemica e creare le condizioni per il verificarsi di un'epidemia. Tutto ciò potrebbe dare la temporanea illusione di aver raggiunto gli obiettivi di controllo ed eradicazione alla base della campagna e questo porterebbe ad un pericoloso abbassamento della soglia di attenzione.

PROGRAMMI PER LE COPERTURE VACCINALI

La copertura vaccinale è un utile indicatore dell'evoluzione epidemiologica di una malattia e della forza dei programmi di immunizzazione.

Il vaccino vivo attenuato contro il morbillo fa attualmente parte del programma di vaccinazione infantile di tutti i paesi. Al momento, un'Attività di Immunizzazione Supplementare (SIAs) (campagne di immunizzazione di massa) è parte integrante del programma di immunizzazione di molti paesi e mira a fornire la vaccinazione a specifiche classi di età. La *policy* attuale dell'OMS è quella di raggiungere la seconda dose di vaccino nei bambini come standard di tutte le nazioni e che i paesi che abbiano raggiunto l'immunizzazione superiore al 90-95% sia per la prima dose che per la seconda per almeno 3 anni consecutivi possano cessare le campagne vaccinali [177].

VACCINAZIONE DI *ROUTINE* CON UNA SINGOLA DOSE

L'età raccomandata per la vaccinazione varia da 6 a 15 mesi, a seconda di un equilibrio tra l'età ottimale per la sieroconversione e la probabilità di acquisire il morbillo prima di tale età [170]. Statisticamente, le percentuali di bambini che sviluppano livelli protettivi di anticorpi sono circa l'85% a 9 mesi di età e il 95% a 12 mesi di età [178].

L'OMS raccomanda che la prima dose di vaccino (MCV1) sia somministrata al nono mese di età in contesti endemici e prima di 6 mesi in particolari circostanze, come focolai epidemici o persone ad alto rischio di mortalità (bambini affetti da HIV) [179]. I bambini affetti da HIV dovrebbero essere rivaccinati contro il morbillo, a causa del fallimento nel mantenere i livelli di anticorpi sufficientemente alti.

Nelle aree con pochi casi la vaccinazione è spesso a 12-15 mesi; in questo modo si ha una proporzione più alta dei bambini protetti dal morbillo, ma ciò può essere fatto solo in contesti dove il rischio di contrarre la malattia è basso.

In contesti di eliminazione del morbillo, una percentuale crescente di donne avrà l'immunità indotta dalla vaccinazione piuttosto che dall'infezione naturale. Ciò si tradurrà in livelli più bassi di anticorpi acquisiti passivamente nei neonati e nella eventualità di abbassare l'età della vaccinazione [180-182].

SVILUPPO DI UNA STRATEGIA DI VACCINAZIONE A DUE DOSI

A causa dell'elevata infettività del virus e del fatto che non tutti gli individui sviluppano immunità protettiva dopo la vaccinazione, una singola dose di vaccino non raggiunge un livello sufficiente di immunità della popolazione per eliminare la trasmissione endemica. Per ottenere il 95% dell'immunità è necessaria una seconda dose di vaccino (MCV2) che immunizzi le persone che non hanno risposto alla prima dose [183, 184].

In paesi dove la MCV1 viene somministrata al nono mese di età, la MCV2 può essere somministrata attraverso il sistema routinario di immunizzazione al 15-18° mese di età con un minimo di 4 settimane tra le dosi. In paesi con bassa circolarità del virus del morbillo e dove la MCV1 sia stata somministrata all'anno di età o oltre, la MCV2 può essere somministrata a 15-18 mesi di età o in età scolastica.

In Italia, l'ultimo PNPV 2017-2019 (Piano Nazionale Prevenzione Vaccinale) prevede la somministrazione di due dosi di vaccino contro il morbillo: la prima è eseguita a partire dai 12 mesi compiuti e comunque entro i 15 mesi d'età, la seconda dose è attualmente prevista a 5-6 anni, da eseguire contemporaneamente alla dose di richiamo di vaccino DTP (Difterite-Tetano-Pertosse). La somministrazione è rivolta soprattutto ai bambini dopo il primo anno di età ma anche agli adolescenti e ai giovani adulti suscettibili, alle persone non immuni che sono a contatto con un malato di morbillo, ai bambini fra i 6 e 12 mesi se è in corso un'epidemia di morbillo e ad individui con infezione di HIV ma senza i sintomi di AIDS. Sono da astenersi o da mantenersi sotto stretta sorveglianza medica persone con allergie gravi a dosi precedenti del vaccino o a suoi componenti, come la gelatina o la neomicina, le donne che sono gravide o che cercano di diventarle, persone con gravi alterazioni del sistema immunitario, pazienti che assumono alte dosi di cortisone e coloro che hanno in corso malattie acute gravi o moderate [185, 186].

COPERTURE VACCINALI

Grazie al miglioramento delle attività di immunizzazione di *routine*, le campagne di prevenzione e maggiori sforzi per raggiungere le popolazioni emarginate, a partire dal 2000 si è registrato un costante aumento delle coperture vaccinali, fino all'83% nel 2008, dove si è poi arrestato.

È chiaro che lo stato vaccinale è direttamente correlato con la stabilità economica del paese: nel 2008, per esempio, nei paesi a basso reddito il 76% dei bambini di età compresa tra 12-23 mesi aveva ricevuto la vaccinazione contro il morbillo, contro l'82% nei paesi a medio reddito, il 94% nei paesi a reddito medio alto, e il 93% nei paesi ad alto reddito. Tra il 2010 e il 2015, il numero di paesi con una copertura della MCV1 $\geq 90\%$ è aumentato dal 44% al 61%. Dal 2015, è stata distribuita una seconda dose di vaccino contro il morbillo attraverso il servizio di immunizzazione in 160/194 (82%) Stati membri dell'OMS, rispetto ai 97 (51%) del 2000.

Nel 2017 l'85% della popolazione mondiale era vaccinata con la 1° dose di MCV e solo il 67% con la 2° dose [187].

Secondo i dati di copertura dell'OMS e dell'UNICEF pubblicati nel luglio 2019, l'86% dei bambini ha ricevuto la prima dose di vaccino contro il morbillo e il 69% la seconda dose. Ciò significa che circa 20 milioni di bambini non hanno ricevuto alcun vaccino contro il morbillo attraverso i programmi di vaccinazione di *routine*. Inoltre, 23 paesi devono ancora introdurre la seconda dose di vaccino nel loro programma nazionale (Figura 8) [188].

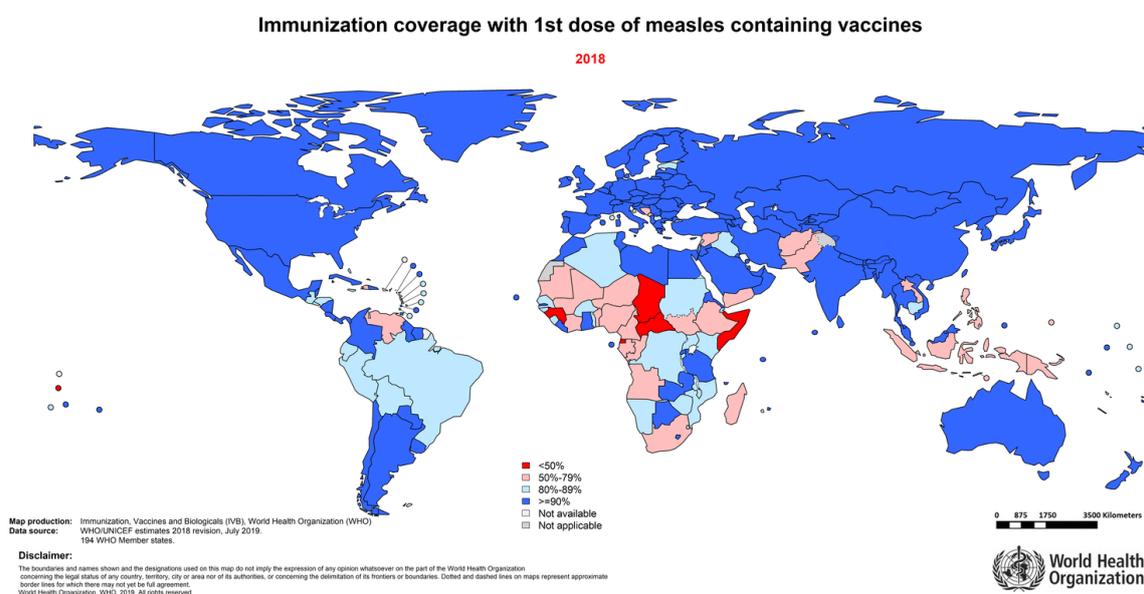


Figura 8 copertura vaccinale per la prima dose di vaccino nel mondo, 2018. Fonte WHO.

Per quanto riguarda la situazione in Italia, stando alle valutazioni dell'OMS la copertura vaccinale è ancora lontana dall'ideale 95%. Anche se nel 2003 le coperture vaccinali erano attestate al 95%, dal 2007 sono diminuite, rimanendo costanti attorno al 90%. Nel 2014 fino alla fine del 2016 si è verificato un ulteriore abbassamento fino all'86-87% [189].

In generale, la copertura vaccinale negli ultimi anni è diminuita soprattutto per una crescente diffidenza nei confronti delle vaccinazioni, avvalorate da tesi spesso semplicistiche o false (si guardi il caso Wakefield [190]) e da pressioni mediatiche e politiche che invitano a non vaccinare.

DURATA DELL'IMMUNITÀ PROTETTIVA DOPO LA VACCINAZIONE

La durata dell'immunità indotta dal vaccino è variabile. In generale, i livelli di anticorpi sono più bassi dopo la vaccinazione rispetto al ricovero dalla malattia naturale [191]. I tassi di fallimento secondario del vaccino sono stati stimati approssimativamente del 5% dopo 10-15 anni dalla vaccinazione, probabilmente più bassi quando la vaccinazione viene somministrata dopo i 12 mesi di età [192]. Tuttavia, la diminuzione del titolo anticorpale non implica necessariamente una perdita completa di immunità protettiva, poiché la riesposizione al virus genera un *booster* della risposta immunitaria, con un rapido aumento degli anticorpi e senza lo sviluppo della malattia clinica [193]. Questi individui possono comunque costituire una popolazione di individui protetta, ma contagiosa [194].

FALLIMENTI VACCINALI

Un'importante caratteristica del virus del morbillo è quella di essere antigenicamente monotipico, nonostante la sua diversità genotipica e nonostante il fatto che generalmente i virus a RNA presentano un'alta frequenza di mutazione [195]. Di conseguenza, è possibile utilizzare il vaccino vivo attenuato derivante da un unico genotipo isolato negli anni '50 [135]. Quindi, da questo punto di vista lo sviluppo di nuovi vaccini può sembrare non necessario, in quanto gli epitopi neutralizzanti della proteina H che conferiscono protezione contro il virus sono altamente conservati rispetto al tasso di mutazione che si verificano nei virus a RNA, fatto probabilmente dovuto a una costrizione funzionale sulla sequenza amminoacidica e sulla struttura terziaria della proteina [196]. Nonostante la sua efficacia però, il corrente vaccino vivo attenuato presenta dei fallimenti vaccinali. Per raggiungere l'eradicazione del morbillo è necessaria un'immunità di popolazione del 95-98%, in modo da prevenire focolai endemici persistenti. In un recente studio sulla efficacia vaccinale dal 1960 al 2010, essa risultava solo del 94% [197].

I fallimenti vaccinali, come per esempio il fallimento per l'individuo nel raggiungere o mantenere una risposta immune protettiva, avvengono anche in seguito al ricevimento di 2 dosi di vaccino [198, 199], consentendo l'accumulo di individui suscettibili e l'insorgenza di focolai che presenteranno una percentuale maggiore di persone precedentemente vaccinate [200, 201].

Il fallimento primario della vaccinazione si verifica quando un individuo vaccinato non sviluppa una risposta immunitaria protettiva dopo l'immunizzazione. Il fallimento secondario invece si verifica quando un individuo sviluppa una risposta immunitaria protettiva dopo la vaccinazione, ma non riesce a conferire protezione dalla successiva infezione al momento dell'esposizione col virus. L'approccio attuale per l'eradicazione del morbillo necessita quindi di nuove considerazioni riguardo lo sviluppo di un nuovo vaccino più efficace e di strategie vaccinali che siano in grado di superare le limitazioni correnti [202].

IMPATTO DELLA GENETICA DELL'INDIVIDUO SULLA RISPOSTA AL VACCINO

Si ritiene che i fattori genetici dell'ospite modulino l'immunità in seguito alla vaccinazione contro il morbillo. Le mutazioni a livello dei singoli nucleotidi (SNP), insieme agli alleli HLA (*Human Leukocyte Antigen*), possono spiegare il 30% della variabilità interindividuale nei tipi di anticorpi specifici per il morbillo [203].

Comprendere il controllo genetico delle risposte immunitarie indotte dal vaccino contro il morbillo permette di comprendere in modo più olistico come viene generata la risposta immunitaria e capire come le variazioni genetiche ed epigenetiche dell'ospite influenzano le risposte immunitarie al vaccino. Inoltre, migliora la nostra comprensione di come gli agenti patogeni interagiscono con il sistema immunitario. Tali conoscenze forniscono un metodo di "*reverse engineering*" per creare nuovi candidati al vaccino ricondotti dall'immunogenetica (a livello individuale) e dall'immunogenomica (a livello di popolazione) [204].

ESITAZIONE VACCINALE

L'atteggiamento nei confronti della vaccinazione può essere visto come un *continuum* che va dall'accettazione totale al completo rifiuto. Gli individui che esitano sono un gruppo eterogeneo all'interno di questo *continuum*. Il Gruppo di Esperti dell'OMS per le Strategie sull'immunizzazione (SAGE) ha riconosciuto l'importanza globale dell'esitazione vaccinale come un problema crescente. Essa non è limitata a nessuna regione o continente specifico, bensì esiste in tutto il mondo. Inoltre, anche se in alcuni scenari è associata a particolari gruppi religiosi o etnici [205], l'esitazione vaccinale non è limitata a comunità specifiche ed esiste in tutti gli strati socioeconomici delle popolazioni.

I determinanti più frequenti per le preoccupazioni verso i vaccini riguardano principalmente la loro sicurezza, a volte a causa di eventi avversi scientificamente provati dopo la vaccinazione, o innescati da voci, idee errate o storie negative non dimostrate e trasmesse dai *media*. Uno dei principali è la paura verso danni ipoteticamente inferti dal vaccino trivalente combinato con morbillo, parotite e rosolia, sollevata da uno studio, subito smentito e screditato da numerose prove scientifiche, pubblicato sul Lancet nel 1998 [190].

Il movimento anti-vaccini nacque principalmente in maniera marginale, ma è oggi un consistente strumento di dissuado amplificato dai *media* e *social-media*, che hanno permesso di acquisire sempre più visibilità attraverso centinaia di siti web, libri e video senza rilevanza scientifica, facilitando lo sviluppo di comunità geograficamente diffuse con salde opinioni inespugnabili, in cui le dicerie si diffondono intensamente, mentre solide prove scientifiche e pareri medici hanno purtroppo poca influenza. Un esempio della misura in cui i pericoli della cosiddetta esitazione vaccinale possono degenerare è dato dalle Filippine, dove sono stati segnalati migliaia di casi di morbillo e almeno 189 decessi dall'inizio del 2019, principalmente nei bambini [206].

L'esitazione verso i vaccini è un comportamento individuale, ma è anche il risultato di influenze sociali più ampie e dovrebbe sempre essere esaminata nel contesto storico, politico e socioculturale in cui avviene.

È probabilmente imprudente pensare di usare un singolo approccio per cercar di far cambiare queste idee, che costituiscono uno dei principali motivi dei *gap* di immunizzazione. La fiducia e l'accettazione del vaccino da parte della popolazione potrebbe essere migliorata attraverso mobilitazioni sociali e attività di promozione e comunicazione [207], dove informazioni di alta qualità dovrebbero essere facilmente accessibili alla popolazione generale [177, 208], utilizzando anche esempi di buona condotta da parte di altri paesi o di successi vaccinali di altre malattie.

ESITAZIONE VACCINALE IN ITALIA

Studi condotti nel nostro paese tramite questionari consegnati ai genitori hanno riportato che i genitori esitanti e contro i vaccini hanno dubbi maggiormente sulla sicurezza dei vaccini e sono meno favorevoli all'uso di vaccini combinati e co-somministrati [209].

Non sorprende che i problemi di sicurezza siano il motivo principale per rifiutare la vaccinazione, confermando altri risultati riportati nella letteratura [210-211], pensando che vi sia il rischio associato di sviluppare, nonostante la smentita da parte di molti studi di qualsiasi associazione, l'autismo o che molti vaccini contengano mercurio. Tuttavia, i genitori esitanti sono consapevoli che malattie molto rare potrebbero riemergere se si smettesse di vaccinare e che l'intera comunità tragga beneficio dalla vaccinazione, suggerendo che le vaccinazioni vengono considerate uno strumento valido per la prevenzione. Sempre nello studio, si ribadisce che gli operatori sanitari svolgono un ruolo chiave nell'informare i genitori sulle vaccinazioni. Infatti, i pediatri di famiglia e altri medici sono stati la fonte di informazione più consultata e affidabile tra genitori pro-vaccino e quelli esitanti, confermandone il ruolo cruciale nell'influenzare la scelta dei genitori sulla vaccinazione [212].

Non tutti i genitori, però, avevano ricevuto la raccomandazione da parte del pediatra di vaccinare il proprio bambino, confermando che l'esitazione vaccinale è anche una preoccupazione tra operatori sanitari, come riportato in letteratura [213, 214]. Quando a dubitare del vaccino sono gli operatori sanitari è particolarmente allarmante, in quanto le conoscenze e gli atteggiamenti dei professionisti della salute nei confronti dei vaccini sono un importante fattore determinante nel promuovere le strategie di vaccinazione ai loro pazienti [215, 216].

Sebbene il 60% dei genitori intervistati nello studio cerchi informazioni su Internet, il web non è classificato tra le tre fonti di informazione più consultate ed è considerato sufficientemente affidabile solo dal 33% dei genitori. Ciò suggerisce che la popolazione è consapevole che la qualità delle informazioni presenti nel web può essere altamente variabile e deve essere attentamente valutata. Precedenti studi sulle vaccinazioni condotte in Italia [217, 218] hanno concluso che potrebbe essere utile aumentare l'attivismo delle istituzioni e delle società scientifiche per affrontare i contenuti anti-vaccinisti fuorvianti che appaiono nei siti web e nei *social-media*.

I risultati dell'indagine sono in linea con i risultati di uno studio su larga scala del 2016 sugli atteggiamenti a livello mondiale nei confronti della vaccinazione, condotto in 67 paesi [219]. Secondo tale studio, l'Italia è classificata tra i paesi dell'OMS della Regione Europea con i più alti livelli di scetticismo legati all'importanza delle vaccinazioni (15,9%), dei dubbi legati all'efficacia (19,3%) e lo scetticismo del vaccino basato sulla sicurezza (22,7%). Questa scoperta è coerente con i dati di copertura delle vaccinazioni [220].

ACCUMULO DELLA POPOLAZIONE SUSCETTIBILE – GAP IMMUNITARI

Cluster geografici con alte quote di persone non vaccinate possono supportare ampi focolai epidemici nonostante il resto della popolazione sia ben protetta da una adeguata copertura vaccinale [221]. Questi tipi di focolai sono stati riportati in paesi come gli Stati Uniti [222], dove il controllo del morbillo è pressoché eccellente, e in Europa [223]. Questi *outbreak* non necessariamente ripongono una seria minaccia allo stato di eliminazione, purché rimangano circoscritti nel tempo e nello spazio e fintanto che l'immunità di gregge sia elevata. Tuttavia, quando i *gap* immunitari sono troppo ampi e le coperture vaccinali sono sub-ottimali, il virus sarà in grado di circolare prima in "sacche" di popolazioni vulnerabili e successivamente si diffonderà all'interno del paese [224]. In alcuni paesi europei dell'OMS l'alto numero di individui suscettibili al morbillo ha provocato catene di trasmissione sostenute anche in regioni con uno stato di post-eliminazione. Ciò apre la possibilità di ristabilire trasmissioni endemiche anche in quei paesi dove il morbillo è già stato eliminato.

Per chiudere i *gap* di immunizzazione nella popolazione si può ricorrere a particolari procedure. Negli infanti e nei bambini, ad esempio, si dovrebbero rinforzare i programmi di immunizzazione impostando le età di vaccinazione in maniera tale da raggiungere il massimo della copertura vaccinale nella seconda dose somministrata [179]. Inoltre, nel caso di necessità in una risposta tempestiva durante un *outbreak*, o di un viaggio in un paese endemico, dev'esser presa in considerazione la somministrazione di una dose supplementare di vaccino (MCV0) agli infanti di 6 mesi di età o superiore, oltre quindi alla prima e seconda dose nell'età raccomandata dal calendario vaccinale. In aggiunta, l'inizio e la fine di ciascun ciclo scolastico dovrebbero rappresentare una opportunità di controllo dello stato vaccinale o della sua somministrazione. Negli adulti invece, possono essere considerate misure di controllo le attività supplementari di immunizzazione in fasce d'età mirate, mentre ogni rapporto con il sistema sanitario, incluse per esempio le visite post-parto o la consultazione medica per i viaggi all'estero, dovrebbe essere una occasione per il controllo dello stato vaccinale e per la somministrazione del vaccino contro il morbillo, dove appropriato. Inoltre, gli impiegati delle strutture sanitarie, soprattutto per professioni che coinvolgono il contatto frequente e diretto con altri individui, sono particolarmente esposti a potenziali fonti di contagio e di conseguenza sono un target prioritario per l'immunizzazione contro il morbillo [225, 226].

IMPATTO DELLA MALATTIA SULLA POPOLAZIONE - *DISEASE BURDEN*

Il morbillo endemico presenta un *pattern* temporale tipico, caratterizzato da cicliche epidemie stagionali annuali (ogni 2-5 anni) dovute all'accumulo di soggetti suscettibili con le nuove coorti di nascita interposte tra periodi inter-epidemici [227]. La stagionalità delle epidemie di morbillo nei climi temperati accorre tipicamente in tardo inverno e a inizio primavera, a causa di contesti sociali che ne facilitano la trasmissione (per esempio gli ambienti circoscritti di scuole o uffici) e da fattori ambientali che favoriscono la viabilità e la trasmissione del virus del morbillo [227].

La gravità del morbillo è in gran parte determinata dalla modalità di trasmissione aerea e dall'alta contagiosità. Essa rappresenta il principale ostacolo verso la sua eliminazione, in quanto il virus si diffonde rapidamente nelle popolazioni suscettibili e richiede alti livelli di immunità di gregge per interromperne la trasmissione. Si stima che il 76% delle esposizioni domestiche al morbillo in persone sensibili porti alla malattia [204].

I decessi causati dal morbillo si sono ridotti in maniera sostanziale nei decenni passati, prima di tutto grazie al miglioramento della nutrizione, dello stato socioeconomico e della Sanità Pubblica e, successivamente, grazie all'aumento delle coperture vaccinali [228]. Questo progresso ha avuto l'effetto paradossale di diminuire la percezione dell'impatto che il morbillo ha sulla salute della popolazione e il valore che assume la vaccinazione contro il virus.

L'OMS pubblica annualmente il numero di casi di morbillo nel mondo e stima il numero di decessi, così come la copertura vaccinale nelle nazioni per entrambe le dosi di vaccino raccomandate. Globalmente non è possibile fornire dati precisi riguardo l'incidenza e la mortalità correlata al morbillo in quanto la maggior parte dei casi si verifica in paesi con un sistema non adeguato di sorveglianza, basato sulla sola osservazione del caso e senza il rispetto degli standard previsti dal *Global Measles and Rubella Laboratory Network* dell'OMS [229].

L'OMS stima che dal 2010 al 2015 a livello mondiale il numero di casi sia diminuito almeno del 70%, che i decessi siano calati del 79% e che la vaccinazione contro il morbillo abbia evitato oltre 20 milioni di morti in quindici anni. Nel 2016, i decessi sono calati dell'84% rispetto al 2000 [230].

Il vaccino contro il morbillo è in grado di modificare fortemente l'epidemiologia del virus. L'età media dei casi di morbillo dipende dal declino degli anticorpi materni protettivi, dall'età in cui i bambini vengono vaccinati e dal contatto con individui suscettibili e infetti.

Gli anticorpi acquisiti passivamente dalla madre sono in grado di proteggere il neonato nei primi mesi di vita, ma potrebbero anche interferire con la risposta alla vaccinazione neutralizzando il vaccino vivo attenuato [119].

È noto che i figli di donne che hanno acquisito l'immunità attraverso la vaccinazione diventano più precocemente suscettibili al morbillo rispetto a figli di donne che hanno acquisito l'immunità tramite infezione naturale, vedendosi quindi conferire un titolo anticorpale più elevato [231].

In contesti urbani ad alta densità di popolazione e con una bassa copertura vaccinale, la fascia d'età più colpita è quella dei bambini tra 1-4 anni, tanto che il morbillo viene riconosciuto come una malattia infantile. Con l'incremento delle coperture vaccinali, o con la diminuzione dei soggetti suscettibili, vi è uno *shift* d'età dell'infezione verso i bambini più grandi (5-14 anni) e negli adulti, suscettibili a causa del fallimento vaccinale primario o secondario [232]. Questo è ciò che sta accadendo in molti paesi in cui vi è stato un aumento delle coperture vaccinali [233]. Inoltre, vengono sempre più riscontrati focolai epidemici all'interno dei *gap* immunologici anche in contesti di alte coperture vaccinali e tra gli individui che hanno ricevuto due dosi di vaccino [185, 201, 234].

L'eliminazione del morbillo ha fatto un passo indietro nel 2017. Nonostante l'incidenza della malattia sia più che dimezzata dal 2010, è però aumentata nel 2017 in 4 delle 6 regioni dell'OMS. Focolai considerevoli si sono verificati attorno al globo, il più significativo in Venezuela, coinvolgendo anche altre regioni delle Americhe, riportando allo stato di endemia la circolazione del virus nella regione (ma non nel resto delle Americhe) [235]. Focolai in Nord America e in Europa enfatizzano come il morbillo si diffonda facilmente anche in paesi con un sistema sanitario maturo. Si sono infatti verificati focolai di morbillo in paesi che riportano una buona copertura vaccinale, evidenziando i *gap* di immunizzazione e sottolineando la necessità di un'alta copertura anche a livello sub-nazionale, specialmente tra le comunità vulnerabili. Vi sono anche dubbi riguardo ai programmi supplementari di immunizzazione (SIAs). Se, da una parte, nel 2017 quasi 200 milioni di bambini siano stati raggiunti da questi programmi, in meno della metà si è raggiunta una copertura vaccinale superiore al 95% e sebbene i SIAs possano essere importanti per coprire i *gap* di immunizzazione, risultano altamente costosi e laboriosi. Rafforzare il calendario vaccinale porterebbe a una riduzione del bisogno delle SIAs, così come alla riduzione dei costi associati al trattamento della malattia (il costo per affrontare un focolaio epidemico è di gran lunga più alto del costo della vaccinazione che lo prevenirebbe).

Nei primi sei mesi del 2019, i casi segnalati di morbillo nelle regioni dell'OMS sono stati i più elevati dal 2006. La Repubblica Democratica del Congo, Madagascar e Ucraina sono gli Stati che hanno segnalato il maggior numero di casi quest'anno (Figura 9) [188].

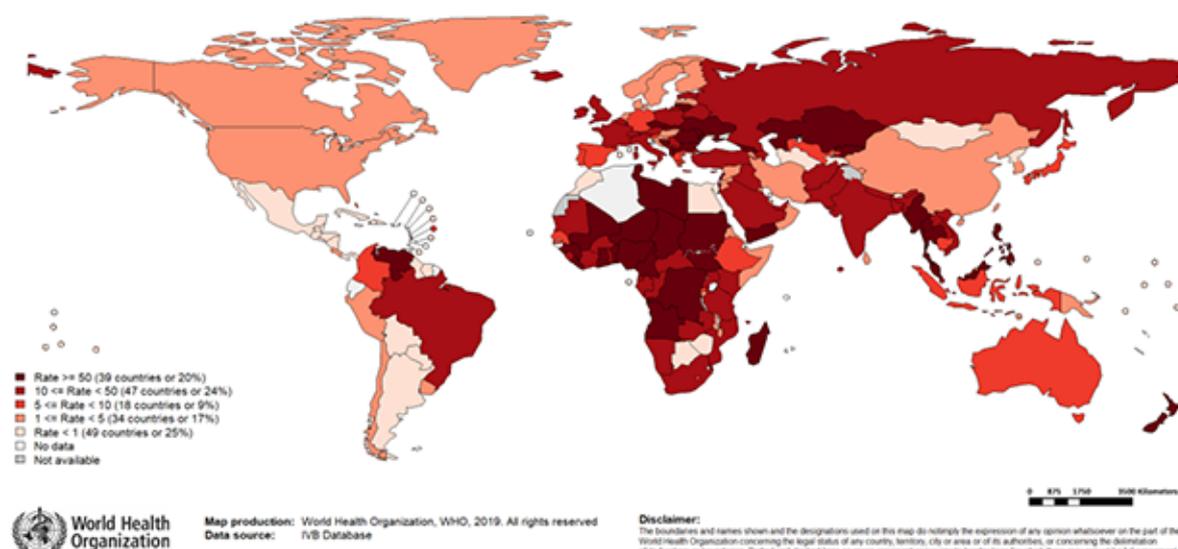


Figura 9 Casi di morbillo nel mondo, novembre 2018 – aprile 2019. Fonte WHO.

EPIDEMIOLOGIA IN AFRICA

L’Africa rappresenta il caso più controverso in fatto di strategie vaccinali da adottare. Questo perché è un’area che generalmente ha un livello di sviluppo umano medio-basso, per cui garantire una corretta copertura vaccinale è spesso difficile a causa della mancanza di strumenti adeguati, guerre o altre ragioni contingenti. Negli ultimi anni si sono fatti notevoli passi avanti anche in questa parte del mondo, con un aumento della copertura dal 53 al 74% della prima dose del vaccino nei bambini e una complessiva riduzione della mortalità dell’84%, rispetto ai dati del 2000 [236]. Vi sono tuttavia aree che negli ultimi tempi stanno regredendo dai progressi fatti. Eloquenti sono le condizioni in cui versano Etiopia e Nigeria: nel 2016, per un totale di 17.577 casi confermati di morbillo in Africa, 8.431 si osservarono in Nigeria e 3.627 in Etiopia. Altri paesi attualmente flagellati da epidemie di morbillo sono il Chad e la Liberia, dove si è registrato il maggior numero di morti ad inizio 2016 [237].

Nel 2019 un focolaio di morbillo ha colpito la Repubblica Democratica del Congo, causando 161.397 casi e 3.117 decessi [238].

EPIDEMIOLOGIA IN MEDIO ORIENTE

L’Ufficio Regionale del Mediterraneo Orientale (EMR) aveva stabilito nel 1997, come obiettivo possibile, l’eliminazione del morbillo entro il 2010. Tutti i 22 paesi della Regione, a questo proposito, hanno attivato i laboratori per la sorveglianza e la prevenzione del morbillo e della rosolia. Purtroppo, l’obiettivo non è stato raggiunto, soprattutto per l’inefficienza del sistema sanitario in alcune aree falcidiate da disastri naturali e/o disordini sociali [239]. Nonostante ciò, rispetto alle stime degli anni ‘80 con 200 mila casi identificati annualmente, si è passati ai 20.885 casi del 2013, con un decremento del 49% delle morti nell’ultimo decennio.

EPIDEMIOLOGIA NEL SUD-EST ASIATICO

Nel Sud-Est asiatico, il 78% dei paesi offre due dosi di vaccino come strategia vaccinale e questo è stato associato ad una riduzione della mortalità del 63% e dell'incidenza del morbillo del 73% [240]. Tuttavia, nel 2013 sono stati registrati 31.000 decessi che rappresentano il 26% della mortalità globale. Una grande fetta di questi decessi proviene dall'India, un paese con diffusa circolazione endemica del morbillo e che non ha implementato le strategie di controllo dell'OMS, con un totale di 248 epidemie, la maggior parte avuta tra bambini di 1-4 anni [240].

EPIDEMIOLOGIA NEL PACIFICO OCCIDENTALE

L'OMS aveva stabilito l'obiettivo di eliminazione del morbillo per l'area del Pacifico Occidentale entro il 2012. La Corea del Sud ha dichiarato di essere *measles-free* nel 2006 (anche se sono stati recentemente segnalati degli *outbreak*) e dal 2000 al 2013 nell'intera Regione si è registrato un calo dell'82% e dell'88% nel tasso di morbilità e mortalità, rispettivamente [236].

Il target di eliminazione della malattia in tutta la Regione non è stato però possibile, a causa dell'inadeguata sorveglianza e dei carenti servizi di Sanità Pubblica che caratterizzano alcuni paesi del Pacifico Occidentale.

In questi anni la maggior parte dei casi di morbillo sono stati segnalati in Cina, anche se *outbreak* di notevoli dimensioni si sono verificati sia nelle Filippine che in Vietnam [241].

Nonostante una copertura vaccinale (a due dosi) attorno al 90%, la Regione ha avuto più di 78.000 casi di morbillo nel 2014 [242], dimostrando l'importanza di raggiungere livelli ancor più elevati per stabilire l'immunità di gregge.

EPIDEMIOLOGIA NELLE AMERICHE

Il morbillo è la quinta malattia ad essere stata eliminata dalla Regione americana insieme al vaiolo (1971), la polio (1994), la rosolia e la sindrome congenita da rosolia (2015). In tutti e cinque i casi, questa Regione dell'OMS è stata la prima a raggiungere lo stato di eliminazione grazie a strategie vaccinali e di sorveglianza molto efficaci. Con l'ultimo caso endemico nel 2002, l'America ha formalmente eliminato il morbillo e nel 2009 è stato raggiunto lo stesso risultato anche per la rosolia [243].

Negli Stati Uniti, dal 2002 al 2011 sono stati segnalati mediamente 63 casi (range 37-220) ogni anno [244]. Secondo il CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) però, nel biennio 2014-15 si sono verificati più di 850 casi di morbillo negli USA. Questi dati costituiscono un campanello d'allarme se si pensa che, da quando l'eliminazione del morbillo negli Stati Uniti è stata dichiarata nel 2002, i livelli si mantengono, in media, poco superiori ai 100 casi l'anno.

In particolare, nel 2014 sono stati identificati 23 *outbreak*, di cui uno scoppiato all'interno della comunità Amish (non vaccinata) in Ohio che ha contato 383 casi. Molti di questi casi sono stati ricondotti a ceppi virali importati dalle Filippine [244].

Il 2015 è stato l'anno di esplosione di una epidemia multi-stato partita dal parco divertimenti Disneyland, in California, nel dicembre 2014 [245]. Nel periodo gennaio-agosto 2016, 52 persone in 15 Stati sono state segnalate come contagiate dal morbillo [244]. Nel 2018, vi sono gruppi di persone che dichiarano l'esenzione medica per la vaccinazione contro il morbillo, negli Stati in cui è permesso farlo [246], generando nuovi punti focali di attività anti-vacciniste stabilitesi nelle maggiori aree metropolitane. Nel 2019 sono stati segnalati, tra gennaio e giugno, 1.722 casi riportati da 13 Stati della Regione delle Americhe dell'OMS, di cui più di mille solo negli Stati Uniti. Quattro focolai epidemici sono stati rilevati in California, New York, Pennsylvania e Washington, tutti collegati a casi di importazione [247]. La maggior parte dei casi attualmente registrati non è più del tutto riconducibile a fenomeni migratori di persone affette dal virus, a residenti di ritorno da viaggi all'estero o in occasione di eventi che comportano l'arrivo sul territorio di persone provenienti da tutto il mondo, ma sono dovuti in buona parte anche alle sacche di anti-vaccinisti sempre più allargate presenti sul territorio.

EPIDEMIOLOGIA IN EUROPA

L'OMS aveva fissato il 2015 come anno limite per l'eliminazione del morbillo sul territorio europeo. Questo obiettivo però non è stato raggiunto e il morbillo endemico continua a perdurare in diversi paesi, tra cui l'Italia. I punti deboli del sistema di prevenzione sono soprattutto la non sufficiente copertura vaccinale in alcune fasce d'età e il non adeguato controllo delle persone che viaggiano. Inoltre, vi è una diffidenza generale nei confronti del vaccino, causata da presunti effetti collaterali gravi (per lo più scientificamente smentiti). Vi è quindi da migliorare il sistema informativo, al fine di ridurre se non azzerare quei casi di persone che rifiutano la vaccinazione anche se offerta. Inoltre, a differenza di paesi come gli Stati Uniti dove esiste un'unica strategia preventiva e quindi una chiara linea di azione contro il virus, in Europa, nei diversi Stati, si adottano strategie differenti a seconda dei casi. Questo è un limite che rende più difficile l'eliminazione del morbillo in quest'area. Succede quindi che l'Europa si trovi in una condizione di profonda eterogeneità, con paesi o aree in cui il morbillo è stato eliminato e altre in cui risulta essere ancora troppo presente.

Tra il 1° Gennaio 2009 e il 31 Marzo 2019, sono stati notificati quasi 145.000 casi di morbillo [248]. Gli *outbreak* più ampi si sono verificati nel 2010 e nel 2011 in Bulgaria, Francia, Italia, Romania e Spagna [248]. Tra il 2012 e il 2016 il numero di casi riportati decresce in maniera sostanziale, per quadruplicare invece nel 2017 e nel 2018, in cui si osservano rispettivamente 18.363 e 17.228 casi rispetto ai 4.642 del 2016 [248, 249]. Nel giugno 2018, 37 paesi europei hanno dichiarato di aver raggiunto l'eliminazione del morbillo, 5 ne hanno interrotto la trasmissione per 24 mesi (per definizione, il morbillo risulta essere eliminato da una Regione se la sua circolazione endemica risulta assente per almeno 36 mesi), mentre 10, tra cui l'Italia, hanno ancora trasmissioni endemiche sul proprio territorio [250].

Nonostante molti paesi abbiano dichiarato lo *status* di eliminazione, il morbillo non può essere considerato eliminato nell'intero territorio europeo finché tutti gli Stati Membri non abbiano raggiunto tale target. Come prevedibile, molti dei paesi che hanno raggiunto l'eliminazione hanno comunque riscontrato casi sporadici o focolai di morbillo dovuti a casi di importazione, sia nel 2017 che nel 2018 [250, 251]. In questi paesi, il costante movimento di persone da e per paesi con morbillo endemico costituisce una minaccia non solo per casi sporadici di importazione, ma anche per l'introduzione di catene di trasmissione durature sostenute da comunità con una copertura vaccinale non ottimale.

La ripresa del morbillo nel 2018 è attribuibile alla trasmissione del virus cominciata nel 2017 e proseguita nel 2018 in Francia, Grecia, Romania, Russia, Serbia e Ucraina. Inoltre, le importazioni di virus del morbillo si sono verificate anche in paesi che avevano raggiunto l'eliminazione, tra cui Albania, Bielorussia, Repubblica Ceca, Israele e Montenegro [224]. Nonostante l'elevata copertura nazionale segnalata, i fattori associati alla rinascita includevano serbatoi di virus del morbillo persistente nei paesi europei con risorse limitate e sistemi di immunizzazione deboli, l'accumulo di bambini piccoli con età di copertura vaccinale non ideale in comunità emarginate e un accumulo di giovani adulti suscettibili sfuggiti sia all'infezione dal morbillo sia alla vaccinazione. La revisione intermedia dell'*European Vaccine Action Plan* nel 2018 [252] ha evidenziato: infrastrutture di somministrazione dei vaccini inadeguate in alcuni paesi a medio reddito, che hanno portato a una copertura vaccinale non ottimale e a un sentimento anti-vaccinista; grandi popolazioni di persone non vaccinate, comprese le minoranze etniche e religiose e gli adulti; una percentuale maggiore di casi in persone di età superiore ai 20 anni, difficili da raggiungere con i servizi di immunizzazione di *routine*; focolai nosocomiali che hanno colpito i pazienti e il personale sanitario con successiva diffusione nella comunità. La revisione intermedia ha inoltre sottolineato la raccomandazione da parte del Gruppo Consultivo Strategico dell'OMS per l'Immunizzazione secondo cui i paesi debbano formalizzare i controlli di accesso alle scuole per colmare i *gap* immunitari, come strategia chiave per l'eliminazione del morbillo [253].

Nei primi sei mesi del 2019 sono stati segnalati quasi 90.000 casi, numero che supera quelli registrati per l'intero 2018 (84.462, già il più alto del decennio in corso) e con più di 100 decessi registrati, dichiarando una drammatica ripresa del morbillo rispetto agli anni precedenti [188].

La Commissione Regionale per la verifica della eliminazione, riunitasi nel giugno 2019, ha concluso che 12 paesi sono rimasti endemici e in 4, che avevano precedentemente raggiunto l'eliminazione, è stata ristabilita la trasmissione endemica. L'Italia è uno dei 12 Paesi europei ancora endemici [254].

Il morbillo continua a diffondere tra i vari paesi europei a causa della copertura vaccinale non idonea a bloccare la sua circolazione. Negli anni più recenti si è avuto un *trend* decrescente nel numero di paesi appartenenti all'Unione Europea con una copertura vaccinale (2 dosi) del 95%, passando da 14 paesi nel 2007 a solo 4 (Ungheria, Portogallo, Slovacchia e Svezia) nel 2017 [248]. È stato stimato che più di 4 milioni e mezzo di persone nate dal 1999 e in un'età eleggibile per la vaccinazione non sono immuni al morbillo a causa della mancata vaccinazione o perché non hanno mai contratto l'infezione naturale. Questa stima aumenta se si considerano gli infanti troppo piccoli per esser vaccinati (ma troppo grandi per essere ancora protetti dagli anticorpi materni) e i sostanziali *gap* immunitari che incorrono negli adulti nati prima del 1999.

Vi è un alto rischio di importazione di virus in Europa attraverso le comunità di rifugiati e di persone non immunizzate che viaggiano verso aree endemiche. La mobilità attraverso l'Europa di gruppi di persone suscettibili e i *gap* immunitari che ancora esistono nella popolazione residente di alcuni paesi europei favoriscono la nascita di catene di trasmissione sovranazionali, associate a grandi focolai epidemici [255-257].

La recente ripresa della circolazione del virus ha evidenziato sfide per raggiungere e mantenere l'eliminazione in quel 70% dei paesi all'interno della Regione europea che ha dichiarato di aver raggiunto l'eliminazione del morbillo [224]. Di conseguenza, tutti i paesi devono rafforzare i programmi di immunizzazione per raggiungere e sostenere l'immunità elevata della popolazione, mantenere una sorveglianza di alta qualità e garantire la preparazione alle epidemie e la risposta tempestiva per contenere i focolai. Gli sforzi di eliminazione che si concentrano sul raggiungimento di comunità vulnerabili e adulti forniranno probabilmente opportunità per migliorare l'accesso ai servizi di vaccinazione per tutti e contribuire a raggiungere il piano d'azione europeo per i vaccini e i futuri obiettivi sanitari universali.

EPIDEMIOLOGIA IN ITALIA

In un rapporto ISTAT pubblicato nel 1953, si evidenzia una mortalità per morbillo in diminuzione, da 4,8 a 1,2 decessi ogni 100.000 abitanti nel periodo 1937-1950 [258]. La mortalità per questo virus ha continuato a diminuire negli anni seguenti, raggiungendo meno di 1 decesso ogni 100.000 abitanti nei primi anni '50, con cifre significativamente più elevate osservate nei bambini al di sotto dei 5 anni di età [259]. Negli anni Sessanta, immediatamente precedenti all'introduzione della vaccinazione, in Italia venivano notificati circa 74.000 casi di morbillo all'anno. Da quando è stata raccomandata la vaccinazione in Italia (1979) si è via via immunizzata la fascia dei più piccoli, con il risultato che la circolazione del virus all'interno della popolazione è cambiata. I soggetti suscettibili si sono accumulati nelle fasce di età più avanzate e l'età della prima infezione si è spostata verso quella adulta. Ciò comporta una maggiore probabilità di complicanze, soprattutto per le donne in gravidanza.

Negli anni Novanta le notifiche erano bruscamente diminuite a poche migliaia [260]. Si sono avute, però, ancora tre grandi epidemie, nel 1997, nel 2003 e nel 2017.

Nel 1997 sono state registrate circa 41.000 notifiche, il 95% delle quali nella fascia di età compresa tra 0 e 14 anni. Nel 2002-2003, in quello che è stato chiamato il "biennio nero", sono state registrate 60.000 persone contagiate e 8 decessi. A pagarne di più le conseguenze i giovanissimi delle regioni del Sud, dove l'incidenza del virus è stata di 22 volte superiore a quelle del Nord e 8 volte rispetto alle regioni del Centro. Nel biennio 2006-07 si è nuovamente registrato un aumento dei casi di morbillo, tra cui uno mortale [261].

Nel 2003, nel tentativo di eradicare la trasmissione endemica di morbillo e rosolia entro il 2007, il Ministero della Salute italiano lancia il Piano Nazionale di Eliminazione del Morbillo e della Rosolia Congenita (PNEMoRC), raccomandando l'introduzione di due dosi di vaccino in tutte le regioni italiane verso l'obiettivo di raggiungere il 95% di copertura vaccinale [262]. Negli anni successivi, la copertura vaccinale ha continuato ad aumentare tra la popolazione italiana, con una copertura a singola dose che raggiunge un massimo del 90.6% nel 2010. Purtroppo, le coperture per il morbillo hanno iniziato a diminuire costantemente dopo il 2010, raggiungendo un minimo dell'85.2% nel 2015 [263]. Negli anni seguenti alla caduta della copertura vaccinale per morbillo si è riscontrato il riemergere di epidemie in Italia, con 844 casi segnalati nel 2016 rispetto ai 251 del 2015 [263]. Solo da gennaio 2017 al 31 ottobre 2017 sono stati riportati 4775 casi con ben 4 decessi e il 44% ospedalizzati [264].

EPIDEMIA DI MORBILLO IN ITALIA NEL 2017

Nel periodo tra il primo gennaio e il 31 dicembre 2017 sono stati segnalati 4.991 casi. L'epidemia del 2017 ha interessato 20 delle 21 regioni italiane, ma il 90% dei casi (4.015) sono stati segnalati solo da 7 regioni. La regione Lazio ha riportato il maggior numero di casi (1.588), la maggior parte (73.8%) sopra i 15 anni di età, anche se la più alta incidenza si è registrata in bambini al di sotto dell'anno di età. Il 35.1% dei casi ha riscontrato delle complicanze, con la diarrea risultata la più frequente, seguita da stomatite, cherato-congiuntivite ed epatite. Sono inoltre stati riportati 2 casi di encefalite, uno in un giovane adulto di 27 anni e l'altro in una bambina di un anno. Tre morti dovute ad insufficienza respiratoria si sono verificate in bambini di età inferiore ai 16 mesi, 6 anni e 9 anni, rispettivamente. Nessuno di loro era vaccinato e un bambino era immunocompromesso perché sottoposto a chemioterapia a causa di una forma leucemica [265]. Vista la rapida crescita del numero dei casi di morbillo, le autorità nazionali hanno prontamente richiesto alle regioni di intensificare la sorveglianza e la descrizione degli *outbreak*. È stato raccomandato a pediatri di famiglia, ginecologi e medici rianimatori di vaccinare i bambini al compimento dei 6 mesi e di somministrare immunoglobuline ai soggetti suscettibili ad alto rischio di complicanze, come donne incinta, bambini al di sotto dei 6 mesi d'età e soggetti immunocompromessi.

Il Ministero della Salute, con una nota del 4 aprile 2017, ha divulgato le indicazioni per la gestione dell'epidemia, tra cui la vaccinazione dei contatti suscettibili entro 72 ore dall'esposizione e l'allertamento dei medici di medicina generale, pediatri, ginecologi e medici ospedalieri e di Pronto Soccorso, per renderli consapevoli dell'epidemia in atto. Inoltre, in presenza di *outbreak* segnalati in asili nido è stato possibile offrire la seconda dose di vaccino ai bambini esposti e ai loro fratelli o sorelle vaccinati con una sola dose, anche se di età inferiore a quella prevista dal calendario vaccinale per la seconda dose, e offrire la prima dose ai bambini suscettibili esposti a partire dai 6 mesi d'età. Sempre nella stessa nota sono state divulgate le indicazioni per la prevenzione delle epidemie nosocomiali, comprendendo l'offerta di vaccinazione agli operatori sanitari al momento dell'assunzione, la verifica dello stato immunitario nei confronti del morbillo degli operatori già assunti e la vaccinazione dei soggetti suscettibili [266]. Il CDC nell'aprile 2017 ha pubblicato un avvertimento per coloro che si recavano in Italia, raccomandando la vaccinazione contro il morbillo [267].

I dati dei primi sei mesi del 2018 hanno indicato che l'epidemia non si era ancora arrestata, con 2.029 casi di morbillo e altri 4 decessi riportati, con un'incidenza di 6.7 casi di morbillo ogni 100.000 abitanti [268]. Dal 1° gennaio al 30 giugno 2019 sono stati segnalati 1.334 casi di morbillo e nel mese di febbraio è stato segnalato un decesso per complicanze respiratorie in una persona adulta, non vaccinata e con patologie concomitanti. Si sono osservati inoltre due casi di encefalite, rispettivamente in una persona adulta non vaccinata e in un bambino sotto l'anno di età. Tutte le regioni, ad eccezione della Basilicata, hanno segnalato casi di morbillo nel periodo considerato, ma oltre due terzi sono stati segnalati da tre regioni (Lazio, Lombardia ed Emilia-Romagna), con il Lazio riportante dell'incidenza più elevata. L'incidenza nazionale è stata 44.1 casi per milione di abitanti [269].

PROGRAMMI DI ELIMINAZIONE

Il tentativo di eradicazione del morbillo (e della rosolia, una malattia esantematica con caratteristiche molto simili a quelle del morbillo) nel mondo ha una lunga storia, formata da piani imposti dall'OMS per tutte le regioni appartenenti, regolamentati ulteriormente da disciplinamenti nazionali e locali. Inizialmente, nel 1998, l'OMS adottò l'obiettivo di eliminare il morbillo attraverso la "*Measles Initiative*" (lanciata poi nel 2001), un partenariato tra Croce Rossa Americana, Nazioni Unite, CDC, Unicef e OMS stesso, con l'obiettivo di ridurre la mortalità del 50% entro il 2005 [270].

Nel 2005 il Comitato Regionale Europeo dell'OMS amplia l'impegno fissato nel 1998 attraverso il piano strategico "*WHO European Region strategic plan 2005–2010*", includendo quindi la lotta contro la rosolia e fissando la data per l'eliminazione di entrambe le malattie entro il 2010 [271].

Il piano rinforza le indicazioni precedentemente fornite, prevedendo il potenziamento dei sistemi di sorveglianza attraverso una più vigorosa indagine dei casi sospetti, compresa la conferma di laboratorio. Arrivati al 2010, i propositi fissati dal piano strategico non vengono però raggiunti, per cui il Comitato Regionale dell'OMS per l'Europa stabilisce come nuova demarcazione il 2015. Viene istituita inoltre la Commissione Regionale Europea di Verifica per l'eliminazione del morbillo e della rosolia (CVR), il cui compito è quello di valutare la documentazione presentata dagli Stati tramite le relative Commissioni Nazionali di Verifica (CNV), al fine di verificare l'eliminazione del morbillo e rosolia a livello regionale europeo [272]. L'eliminazione del morbillo e della rosolia è una delle principali priorità di immunizzazione dei 53 Stati membri della Regione europea dell'OMS. Questa ambizione comune è stata inclusa in uno dei sei obiettivi principali del Piano d'Azione Europeo per i Vaccini 2015-2020, approvato dal Comitato regionale europeo dell'OMS nel settembre 2014 [273].

A livello mondiale, il *Global Vaccine Action Plan* approvato dall'Assemblea Mondiale della Sanità nel 2012 e il *Global Measles And Rubella Strategic Plan 2012–2020* includono entrambi l'obiettivo di eliminazione del morbillo, della rosolia e della rosolia congenita [273, 274]. In linea con questi documenti, tutte le regioni dell'OMS hanno stabilito obiettivi per eliminare il morbillo (e in alcune regioni anche rosolia) entro il 2020 [275].

GLOBAL MEASLES AND RUBELLA STRATEGIC PLAN, 2012–2020.

Nel 2012 l'OMS lancia a livello globale lo *Strategic Plan 2012-2020*, messo a punto dalla *Measles and Rubella Initiative* e firmata da tutti i 194 paesi appartenenti all'OMS, che si prefiggeva di ridurre i decessi per morbillo in tutto il mondo di almeno il 95% rispetto ai livelli del 2000, con l'obiettivo di eliminare tali malattie esantematiche in almeno 5 regioni dell'OMS entro la fine del 2020 [276].

Sono stati articolati 5 piani di strategia per raggiungere tale obiettivo:

- Raggiungere e mantenere alti livelli di immunità di gregge attraverso un'alta copertura vaccinale con due dosi di vaccino trivalente Morbillo-Parotite-Rosolia
- Monitorare la malattia usando una sorveglianza efficace
- Sviluppare un piano d'azione di rapida risposta ai focolai e alla gestione dei casi
- Comunicare e render partecipe la popolazione in maniera da costruire una confidenza pubblica nei confronti dell'immunizzazione
- Effettuare ricerca e sviluppo necessari a supportare gli strumenti diagnostici e di vaccinazione in maniera costi-effettiva

Per misurare il progresso lungo l'obiettivo imposto per il 2020, sono stati stabiliti specifici traguardi intermedi da raggiungere entro il 2015. Le 3 pietre miliari imposte per la fine del 2015 erano:

- I. copertura vaccinale del 90% o superiore a livello nazionale e 80% o superiore in ogni distretto
- II. incidenza dei casi di morbillo inferiore ai 5 casi per milione di persone
- III. ridurre la mortalità del 95% o superiore

Purtroppo, nessuna di queste pietre miliari è stata raggiunta e il gruppo di strategia di esperti in immunizzazione dell'OMS ha raccomandato ulteriori obiettivi:

- Fornire una *review* dei progressi raggiunti e le ragioni politiche, finanziarie e tecniche per le quali non siano stati raggiunti i target del 2015
- Fornire raccomandazioni su quali strategie e principi dovrebbero essere ridefiniti per indirizzare le debolezze del sistema di immunizzazione e per accelerare il progresso a livello regionale e mondiale
- Formulare una serie di lezioni su rischi e priorità finanziarie, politiche e programmatiche nei prossimi cinque anni (2016-2020) per paesi e partner al fine di eseguire il lavoro

L'IMPEGNO DELL'ITALIA

A livello nazionale, l'Italia approva nel 2003 il Piano Nazionale per l'Eliminazione del Morbillo e della Rosolia Congenita (PNEMoRc) [262]. Gli obiettivi del Piano, da conseguire entro il 2007, consistevano nel raggiungimento e nel mantenimento dell'eliminazione del morbillo a livello nazionale, interrompendone la trasmissione endemica e permettendo, inoltre, la riduzione ed il mantenimento dell'incidenza della rosolia congenita a valori inferiori a 1 caso ogni 100.000 nati vivi. Si è affidato all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) il ruolo di referente scientifico per la componente epidemiologica e di laboratorio, assegnando all'attuale Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS) il compito di raccogliere i dati epidemiologici e collocando presso l'attuale Dipartimento Malattie Infettive Parassitarie Immuno-mediate (MIPI) il Laboratorio Nazionale di Riferimento per Morbillo e Rosolia (LNR), per la conferma dei casi e dei focolai e la tipizzazione molecolare dei ceppi virali. Negli anni di validità del Piano vi è stato un miglioramento delle coperture vaccinali per la prima dose di vaccino Morbillo-Parotite-Rosolia (MPR) nei bambini entro 24 mesi di età (da 79.8% nel 2002 a 89.6% nel 2007) e vi sono state importanti novità quali l'introduzione della seconda dose di MPR a 5-6 anni o 11-12 anni e l'introduzione della notifica obbligatoria della rosolia in gravidanza e della rosolia congenita.

Come conseguenza al piano strategico " *WHO European Region strategic plan 2005–2010*", ad aprile 2007 viene istituito un Sistema di Sorveglianza Speciale per Morbillo al fine di migliorare la sorveglianza, in termini di tempestività, completezza ed esaustività delle notifiche. Con l'introduzione della conferma di laboratorio dei casi di morbillo e rosolia, al Laboratorio di Riferimento Nazionale dell'ISS viene dato il compito di trasmettere mensilmente all'OMS i risultati dei test inerenti ai casi confermati.

Con il mancato raggiungimento degli obiettivi posti per il 2010, il 23 marzo 2011 viene approvato dalla Conferenza Stato-Regioni il nuovo PNEMoRc 2010-2015, in linea con gli obiettivi generali e di termine della Regione europea dell'OMS, rinnovando inoltre l'intento di ridurre l'incidenza dei casi di rosolia congenita a < 1 caso ogni 100.000 nati vivi [277]. Le principali strategie del nuovo Piano di eliminazione comprendevano principalmente la riduzione dei tempi di segnalazione dei casi sospetti da 48 ore di tempo dalla diagnosi a 12, il miglioramento della conferma di laboratorio e dell'indagine epidemiologica con la gestione dei focolai epidemici, l'incremento della copertura vaccinale al fine di raggiungere un tasso > 95% per due dosi di vaccino MPR e l'individuazione di laboratori di riferimento regionali nelle Regioni che non li avessero già designati. Fu richiesto inoltre un maggior coinvolgimento e formazione del personale sanitario.

Con l'ultima circolare di febbraio 2013 emanata dal Ministero della Salute, recependo le direttive dell'OMS si istituisce in Italia un sistema di sorveglianza integrato per il morbillo e per la rosolia, prevedendo la conferma di laboratorio per la rosolia nei casi di sospetto morbillo risultati negativi ai test di conferma (IgM morbillo-specifiche o ricerca degli acidi nucleici) e, viceversa, per morbillo nei casi di sospetta rosolia risultati negativi.

DECRETO-LEGGE DEL 7 GIUGNO 2017

L'insorgenza del focolaio di morbillo di grandi dimensioni nel gennaio 2017 ha innescato l'istituzione di una nuova legge, adottata nel luglio 2017, che ha esteso il numero di vaccini obbligatori da quattro (difterite, tetano, poliomielite ed epatite B) a 10 vaccini (pertosse, MPR, Hib, meningococco e pneumococco, un tempo solo raccomandati) per i bambini di età compresa tra 0 e 16 anni, ovvero tutti i bambini nati dal 2001 in poi e per i tutti i nuovi nati a partire dall'anno 2017 [278]. Secondo la legge, tutte le persone che rifiutano la vaccinazione potrebbero essere soggette a un'ammenda compresa tra i 100 e i 500€, o ai bambini venire negata la frequenza ai servizi educativi fino all'età di 6 anni. La legislazione è stata accompagnata da documenti operativi e da una campagna mediatica per sensibilizzare la popolazione in generale sull'importanza della vaccinazione e per promuovere una cultura della vaccinazione più forte. Tutti i vaccini obbligatori e raccomandati sono stati offerti attivamente e gratuitamente (come già stabilito) con una campagna di recupero per i bambini fino all'età di 16 anni.

L'impatto della legge sull'assorbimento dei vaccini è stato positivo nella prima stima di tutte le coperture vaccinali (dicembre 2017) subito dopo 6 mesi dall'attuazione della legge [279]. Nel 2017 la copertura vaccinale è aumentata del 4.4% rispetto al 2016 (87.2%), raggiungendo il 91.6% nazionale e superando il 93% in 5 regioni. C'è stato anche un aumento delle vaccinazioni raccomandate. I dati del 2018 mostrano un aumento della copertura vaccinale a livello nazionale e in quasi tutti i distretti regionali [280], con una copertura del 94.1% per il vaccino MPR e superiore del 95% in 6 regioni. L'aumento delle coperture vaccinali ha coinvolto tutti i 10 vaccini ed è stato molto probabilmente il risultato dell'entrata in vigore del decreto-legge sostenuto dalla relativa campagna di comunicazione amplificata dai media. Tuttavia, c'è ancora un piccolo gruppo di genitori che si oppone a tale decreto. Si è stimato che l'83.7% dei genitori era positivo nei confronti della vaccinazione, il 15.6% sosteneva e lo 0.7% era contrario [209].

LE NOVITÀ INTRODOTTE DAL NUOVO PIANO NAZIONALE PREVENZIONE VACCINALE 2017-2019

Il Piano Nazionale Prevenzione Vaccinale 2017-2019 (PNPV), approvato in Conferenza Stato-Regioni il 19 gennaio 2017 e pubblicato in Gazzetta Ufficiale il 18 febbraio 2017, costituisce il documento di riferimento in cui si riconosce, come priorità di Sanità Pubblica, la riduzione o l'eliminazione del carico delle malattie infettive prevenibili da vaccino, attraverso l'individuazione di strategie efficaci e omogenee da implementare sull'intero territorio nazionale. Infatti, oltre a ribadire la fondamentale importanza di mantenere lo stato di *polio-free* (la Regione europea dell'OMS ha raggiunto lo *status polio-free* nel 2002) e di raggiungere quello di *morbillo-free* e *rosolia-free*, perseguendo gli obiettivi del PNEMoRc, il PNPV si è impegnato per sensibilizzare da una parte la popolazione generale e dall'altra gli operatori sanitari e i professionisti, per aumentare l'adesione consapevole e spontanea alle vaccinazioni anche attraverso la conduzione di campagne di vaccinazione per il consolidamento della copertura vaccinale, e per migliorare la sorveglianza delle malattie prevenibili con la vaccinazione.

SORVEGLIANZA MOLECOLARE

Come parte integrante del sistema di sorveglianza del morbillo, l'indagine molecolare è un importante strumento per monitorare la circolazione dei virus selvaggi nel corso del tempo. Informazioni sul genotipo e sulle sequenze delle varianti dei virus circolanti, insieme a una correlazione di essi anche a livello epidemiologico, possono aiutare a identificare le potenziali sorgenti di importazione e a riconoscere catene di trasmissione di lunga durata.

La sorveglianza molecolare è quindi utilizzata per monitorare il processo di eliminazione, documentarne la progressione e infine supportare l'evidenza che l'interruzione delle trasmissioni di virus endemici sia stata raggiunta e venga mantenuta. Il database MeaNS (*Measles Nucleotide Surveillance*) è accessibile on-line [281, 282] ed è stato creato dal *Public Health England for the WHO Global Measles and Rubella Laboratory Network* (GMRLN) [229], una rete di laboratori accreditati OMS che consiste di 703 laboratori che danno supporto alla sorveglianza epidemiologica in 191 paesi, in cui viene impiegata una sorveglianza basata sui casi e test di laboratorio standardizzati per la conferma diagnostica ed epidemiologico-molecolare. Le sequenze di morbillo vengono sottomesse con nomi standardizzati dall'OMS e servono a indicare sia il luogo (città o provincia, stato e paese) e il tempo (per settimana epidemiologica e anno di eruzione cutanea o raccolta campioni) del caso di morbillo [283, 284]. I laboratori di riferimento nazionale facenti parte del GMRLN sono incoraggiati a sottomettere in MeaNS i loro dati appena questi diventano disponibili, in maniera tale da risultare accessibili a tutti gli utilizzatori contribuenti in tempo reale e aiutare quindi a riconoscere e analizzare le catene di trasmissione del virus in un contesto globale.

I GENOTIPI DI *MORBILLIVIRUS* E RELATIVA DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

La circolazione dei ceppi virali di morbillo nel mondo viene studiata sulla base del profilo genetico, o genotipo. L'OMS attualmente riconosce per i *Morbillivirus* 8 gruppi genetici maggiori, denominati *clade*, designati con lettere (A-H) e numeri, dove le lettere identificano il *clade* principale e i numeri dei *sub-clade*, identificati attraverso il sequenziamento della regione N-450 della nucleoproteina e supportato, dove ritenuto utile, dall'intera sequenza del gene H [285, 286]. Nuovi genotipi vengono designati quando il virus differisce dalla sequenza di riferimento più vicina di oltre il 2.5% in N-450 e del 2.0% in H [286].

Ciascun genotipo è infatti rappresentato da una o due sequenze di riferimento stabilite dall'OMS (sequenze consensus) [287]. La variabilità genetica del morbillo all'interno di uno stesso genotipo definisce un ulteriore livello di discriminazione dei virus selvaggi circolanti, definendo i *lineage* composti da ceppi con sequenze N-450 identiche o quasi identiche.

Per le sequenze N-450 frequentemente rilevate, l'OMS ne designa ufficialmente il ceppo rappresentativo (*named strain*) [288]. Questa ulteriore caratterizzazione intra-genotipica consente di monitorare meglio la trasmissione delle catene di contagio in un'area ben definita. Le informazioni sul genotipo aiutano a caratterizzare lo stato di eliminazione di un paese, in quanto sono stati descritti tre *pattern* tipici di distribuzione dei genotipi di morbillo.

Nei paesi in cui esiste ancora trasmissione endemica del morbillo la maggior parte dei casi è sostenuta da un unico genotipo endemico all'interno del quale si identificano *lineage* (varianti) co-circolanti. Nei paesi dove il morbillo endemico è stato eliminato, i pochi casi, tutti di importazione, sono sostenuti da differenti genotipi che riflettono la sorgente di importazione virale. I paesi che in precedenza hanno avuto un'elevata copertura vaccinale, ma hanno cominciato ad accumulare un aumento del numero di individui suscettibili possono sperimentare la reintroduzione del morbillo che può provocare focolai sostenuti da più genotipi, di cui uno predominante, caratterizzati da un unico *lineage* virale con sequenze identiche o quasi identiche [10].

Il fatto che questi genotipi abbiano una caratteristica distribuzione geografica, rende possibile individuare in un paese in cui la circolazione dei ceppi autoctoni è assente o molto limitata, l'origine del genotipo responsabile di un'epidemia e le sue modalità di trasmissione.

Molti dei 24 genotipi riconosciuti non circolano più. Solo 13 dei 24 genotipi conosciuti sono stati identificati tra il 2005 e il 2014 e solo 6 a partire dal 2015 [289].

I genotipi attualmente più diffusi al mondo sono il B3 e il D8, distribuiti un po' in tutti i continenti [281, 290] (Figura 10).

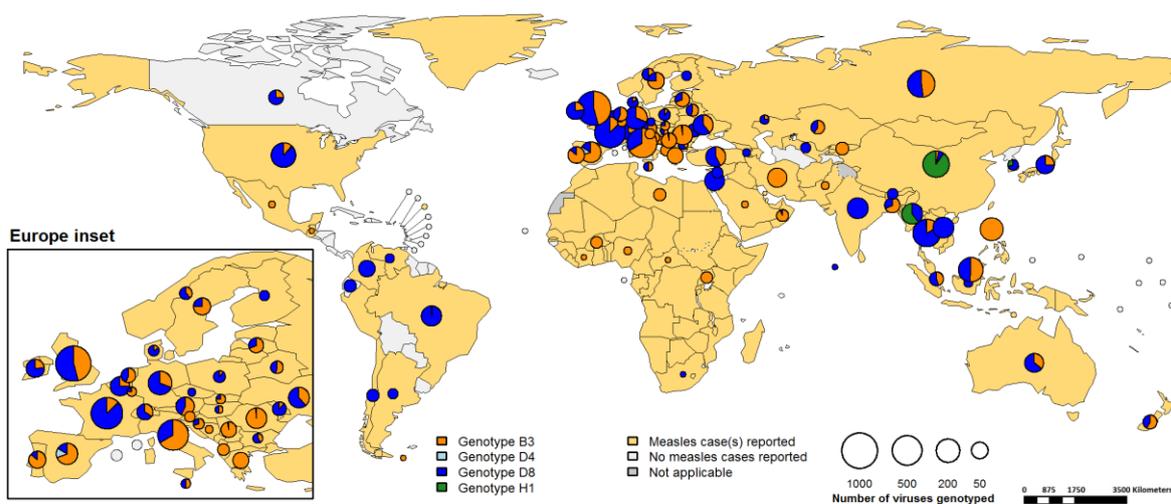


Figura 10 Genotipi circolanti nel mondo, 2019 (Dati MeaNS)

Il genotipo più diffuso negli ultimi anni nel continente africano si è rivelato essere il B3 [291]. Nel sud e nell'est dell'Africa, oltre al B3, fu riscontrata la presenza anche dei genotipi D2, D4 e D10, non più circolanti. Altri genotipi sporadici sono il B2 e il D8, per lo più rari casi di importazione [282]. Il genotipo più frequentemente rilevato nel Medio Oriente è stato il D4, che rappresenta il 53% dei genotipi individuati [282]. Il genotipo D4 è stato associato a gravi epidemie in Siria, Egitto, Iraq e Iran. Il genotipo B3 ha rappresentato il secondo genotipo più comune nella Regione (29%). Ha causato epidemie in Libia nel 2009 ed è stato importato in Tunisia, divenendo poi il genotipo predominante a partire dal 2012.

Prima del 2007, i genotipi D4 e D8 sono stati isolati in India e Nepal e sono tutt'oggi i genotipi prevalenti. Il genotipo D7 è stato osservato in alcuni casi sporadici in India, per la prima volta nel 2008, mentre nel 2009 in Thailandia sono stati rilevati i genotipi D5 e D9 [282, 292].

In Cina, principale serbatoio dei casi della Regione, il genotipo predominante è l'H1. Altri genotipi minoritari sono il D4 e D9. Il genotipo D3 invece, un tempo presente, non viene trovato da circa 10 anni, mentre il D8 è presente in Cina da circa quindici anni [293].

GENOTIPI NEGLI STATI UNITI

Nel corso di un'epidemia registrata tra il 1989 e il 1991 (oltre 55.000 casi) [294] sono stati isolati esclusivamente ceppi appartenenti alla variante D3, che mostravano un elevato grado di similarità. Probabilmente il genotipo D3 è penetrato negli Stati Uniti verso la fine degli anni Ottanta ed è circolato per 3 anni senza accumulare mutazioni a causa dell'elevato numero di soggetti suscettibili. Negli anni Novanta la sorveglianza epidemiologica ha inoltre permesso di documentare l'interruzione della circolazione del genotipo D3 e di identificare i ceppi responsabili dei singoli casi e delle epidemie. La loro caratterizzazione ha mostrato l'interruzione della trasmissione, la quasi totale scomparsa dei casi autoctoni e la sempre più maggiore rilevanza di quelli importati da paesi con copertura vaccinale subottimale [295].

Nel Texas è stata poi osservata la circolazione del genotipo D6 proveniente dall'Italia; nel Nevada e nel Minnesota le epidemie di tipo H sono invece attribuibili a ceppi derivanti dalla Cina e dal Vietnam.

Oggi i genotipi più diffusi sono il D8 e il B3, responsabili delle più recenti epidemie [296].

GENOTIPI IN EUROPA

L'inizio della sorveglianza molecolare nelle regioni dell'Europa nei primi anni Novanta ha individuato due genotipi circolanti (C2 e D6) che erano diffusi in tutti i paesi e perciò riferiti come genotipi indigeni europei [255]. Questi genotipi sparirono tra il 2000 e il 2007 in coincidenza a lunghi cicli di trasmissione di nuovi ceppi [297-299]. I genotipi B3, D4, D5, D7 e D8, originari di aree endemiche oltremare, diedero vita a lunghe catene di trasmissione in Europa [300, 301].

I genotipi predominanti nel periodo 2013-2016 furono il D8 e il B3. Il genotipo B3 è endemico del continente africano e frequentemente importato nei paesi europei [300]. Molti dei *WHO named strain* di questo genotipo erano circolanti in Europa. Le trasmissioni endemiche nel contesto europeo per questo genotipo possono essere imputate ai *named strain* MVs/Niger.NGA/8.13 e MVs/Dublin.IRL/8.16, entrambi identificati principalmente in Europa e dove continuano tutt'ora a circolare (data in MeaNS).

Il genotipo D8 è endemico del subcontinente indiano [302] ed è stato frequentemente importato in Europa e largamente diffuso nelle regioni tra il 2013 e il 2016, mostrando un'alta diversità genetica [303, 304]. I *WHO named strain* più osservati di questo genotipo erano i prevalenti in Europa e le trasmissioni endemiche possono essere associate ai *named strain* MVs/Frankfurt Main.DEU/17.11, MVs/Republic of Komi.RUS/35.13 e MVs/Rostov on Don.-RUS/47.13/2 (data in MeaNS).

GENOTIPI IN ITALIA

Nel periodo 2002-2004 le analisi filogenetiche di sequenze di morbillo hanno mostrato in Italia una circolazione predominante di genotipo D7. Questo è stato poi rimpiazzato nel biennio 2006-2007 dal D4 e dal B3 [305]. Dal 2002 al 2007 erano presenti anche i genotipi C2, D5 e D8. Il genotipo D8, di minoranza in Italia fino al 2007, incominciò a diffondersi a partire dal 2008. Nel 2010-2011 ci fu una co-circolazione dei genotipi D4 e D8, insieme a casi sporadici di D9 e B3 [306]. Negli anni successivi, si attesta il profilo epidemiologico e genotipico attuale, che vede la presenza maggioritaria dei genotipi D8 e B3, con regressione notevole, fino alla sua scomparsa, del D4. In particolare, nel 2013 ha prevalso il genotipo D8, nel 2014 il genotipo B3, mentre nel biennio 2015-2016 i due genotipi coesistono, con prevalenza del genotipo B3 nel Nord Italia [307-309]. La co-circolazione di questi genotipi è stata osservata anche nel biennio 2017-2018. La variante più osservata del genotipo B3 era la MVs/Dublin.IRL/8.16, introdotta in Italia nel 2017, mentre i ceppi più frequenti del genotipo D8 appartenevano alla *named strain* MVs/GirSomnath.IND/42.16/ [310].

STRUTTURA E ATTIVITÀ DELLA RETE DI LABORATORI OMS PER LA SORVEGLIANZA DEL MORBILLO E DELLA ROSOLIA

L'esperienza ha dimostrato che la rete dei laboratori deve essere organizzata in contemporanea ai programmi di controllo e di eliminazione regionali, con personale qualificato, attrezzature e reagenti adatti. Il *Network* Globale dei Laboratori OMS per morbillo/rosolia è organizzato su quattro livelli:

LABORATORI GLOBALI SPECIALIZZATI (GSL). Si tratta di laboratori che hanno fissato gli standard tecnici per la diagnosi di laboratorio. Le loro indicazioni vengono estese ai laboratori per morbillo e rosolia in tutte le regioni e i paesi dell'OMS.

LABORATORI DI RIFERIMENTO REGIONALE (RRL). Sono i centri di eccellenza di ogni Regione OMS con responsabilità internazionale. Essi serviranno come laboratori di riferimento per i laboratori nazionali dei paesi vicini e come laboratori nazionali nei paesi di origine. Ogni regione OMS può averne fino a 3-4.

LABORATORI DI RIFERIMENTO NAZIONALI (NRL). Questi laboratori hanno i legami più stretti con i responsabili dei programmi di controllo e prevenzione nazionali. Saggiano i campioni da casi sospetti tramite test sierologici (IgM ELISA), molecolari (RT-PCR e/o *Real Time* RT-PCR) e procedono alla genotipizzazione dei ceppi, riportando direttamente ai responsabili del programma. Il numero di laboratori nazionali dipenderà dalla epidemiologia, dalle priorità e dalle risorse disponibili.

LABORATORI SUB-NAZIONALI (SNL). A causa della dimensione della popolazione significativa e/o dei problemi logistici di alcuni paesi, l'esecuzione dei saggi sui campioni per il morbillo può andare al di là della capacità di un singolo laboratorio nazionale, ricorrendo quindi a ulteriori laboratori.

MORONET: IL RUOLO DEI LABORATORI PER LA SORVEGLIANZA INTEGRATA MORBILLO E ROSOLIA IN ITALIA

Per dotare il paese di una sorveglianza di laboratorio omogenea su tutto il territorio nazionale e adeguata agli standard richiesti dall'OMS, il Ministero della Salute ha incaricato il Laboratorio Nazionale di Riferimento per il morbillo e la rosolia di istituire una rete nazionale di laboratori, denominata MoRoNET (Morbillo e Rosolia NETwork), formata da 15 laboratori sub-nazionali e da un laboratorio nazionale con sede presso l'Istituto Superiore di Sanità [311]. Obiettivo di tale rete è quello di dotare il paese di punti accreditati secondo gli standard dell'OMS, in maniera tale che tutte le conferme di laboratorio dei casi vengano eseguite in queste sedi.

Perciò, la rete MoRoNET è nata per rafforzare la sorveglianza di morbillo e rosolia in vista del *goal* di eradicazione del *Global Measles and Rubella Strategic Plan*. Le regioni che non dispongono di un laboratorio accreditato si rivolgeranno per la conferma dei casi sospetti al LNR. Un laboratorio MoRoNET ha due funzioni principali: il monitoraggio e la verifica della trasmissione virale attraverso la conferma di casi e focolai e la caratterizzazione genetica degli isolati virali e il monitoraggio del profilo di suscettibilità della popolazione, stabilendo la necessità di eventuali campagne di vaccinazione.

Il Laboratorio Nazionale di Riferimento, agendo da interfaccia del Laboratorio Regionale europeo dell'OMS, ha quindi il compito di preparare le linee guida, organizzare i corsi di formazione tecnica e di fornire supporto in termini di indicazioni su materiali e di informazioni non reperibili dai database pubblici utili alla valutazione della qualità dei dati ottenuti dai singoli Laboratori sub-nazionali. In più, valuterà i test di diagnosi sierologica e molecolare dei Laboratori sub-nazionali per la conferma e caratterizzazione virale dei casi di morbillo e rosolia attraverso il *retesting* di campioni già esaminati e allestirà, in collaborazione con i Laboratori Regionali Europei dell'OMS, i *Proficiency test* per valutare la prestazione di ogni singolo Laboratorio sub-nazionale così da definire lo *status* del laboratorio come ammesso alla rete MoRoNET, ammesso con riserva o non ammesso.

I dati relativi alle sequenze e i risultati e dei Laboratori sub-nazionali regionali, d'altra parte, verranno inviati mensilmente all'LNR che li inserirà nelle piattaforme OMS dedicate ai dati di laboratorio e alle sequenze, MeaNS e RubeNS (database analogo a MeaNS istituito per la sorveglianza della rosolia).

METODI D'AZIONE DELLA SORVEGLIANZA CONTRO IL MORBILLO

L'obiettivo chiave della sorveglianza del morbillo è di identificare le aree in cui il virus si trasmette e i *gap* immunitari. Tutto ciò è il timone di una efficace e responsiva Sanità Pubblica in previsione del raggiungimento dell'eliminazione del morbillo endemico e nel sostentamento dello stato nel conseguente contesto post-eliminazione.

SORVEGLIANZA A LIVELLO NAZIONALE O LOCALE

Gli obiettivi della sorveglianza a livello nazionale/locale sono:

- l'individuazione e la conferma dei casi attraverso l'implementazione di strategie di Sanità Pubblica appropriate per la loro gestione e per il controllo delle trasmissioni future
- la determinazione della sorgente di infezione, se importata, correlata all'importazione oppure endemica
- l'identificazione di aree con bassa copertura vaccinale e quindi ad alto rischio di focolai epidemici; in questo caso è opportuno anche determinare le ragioni per le quali si è formato il *gap* immunitario:
 - “ Il vaccino è raccomandato ma le persone non lo usano (fallimento del programma vaccinale)
 - “ le persone risultano vaccinate in accordo con il programma vaccinale (fallimento della vaccinazione)
 - “ il vaccino non è stato ricevuto perché non raccomandato per le persone coinvolte (per esempio più giovani rispetto all'età per la seconda dose di vaccino)
- la verifica dell'assenza di casi endemici per documentare l'eliminazione del virus endemico

DEFINIZIONE DI CASO E CLASSIFICAZIONE

Si definisce caso sospetto quello in cui un paziente presenta febbre e *rash* maculo-papulare (non vescicolare), oppure in cui un operatore sanitario sospetti il morbillo. Il caso sospetto viene confermato o smentito attraverso diverse classificazioni qui riportate [312]:

- il caso di morbillo viene confermato da indagini di laboratorio: il caso sospetto è stato confermato positivamente attraverso indagini molecolari svolte in un laboratorio competente, in cui reazioni associate alla vaccinazione siano state smentite. Un laboratorio si definisce competente quando accreditato dall'OMS, o abbia un certificato di garanzia di qualità riconosciuto, quali ISO (*International Organization for Standards*) o CLIA (*Clinical Laboratory Improvement Amendments*) [313]
- il caso di morbillo è epidemiologicamente correlato: si tratta di un caso di morbillo sospetto geograficamente e temporalmente correlato con l'insorgenza di *rash* (7-23 giorni) di un caso laboratorio-confermato
- il caso di morbillo è clinicamente compatibile: è un caso sospetto in cui non è possibile prelevare campioni biologici per i test di laboratorio e non vi è un *link* epidemiologico con altri casi di morbillo confermati, ma che presenta febbre, *rash* maculo-papulare (non vescicolare) e almeno un sintomo tra tosse, rinite e congiuntivite. Tuttavia, in contesti molto vicini alla eliminazione, è difficile che un caso sospetto clinicamente compatibile col morbillo lo sia realmente
- il caso di morbillo non è confermato: è un caso sospetto che è stato analizzato e classificato come non morbillo. Un caso sospetto non è morbillo quando qualsiasi delle seguenti enunciazioni sia vera:
 - “ i test di laboratorio condotti in un laboratorio competente su campioni biologici adeguati raccolti nel periodo appropriato dopo la comparsa del *rash* sono negativi
 - “ è presente un *link* epidemiologico a un focolaio di un'altra malattia che non sia il morbillo e dove vi sono casi confermati in laboratorio
 - “ viene confermata un'altra eziologia
 - “ non vi è una clinica compatibile con la definizione di caso di morbillo

In base alla natura del caso di morbillo confermato, esso può essere:

- endemico: è un caso di morbillo confermato risultante dalla trasmissione endemica del virus. L'endemia della catena di trasmissione viene sostenuta dalla sua presenza continua sul territorio per un periodo pari o superiore ai 12 mesi. Per quanto possibile, la catena di trasmissione dovrebbe essere definita basandosi sull'evidenza genotipica in accordo con l'investigazione epidemiologica. Molto spesso, per il morbillo le catene di trasmissione non sono chiare a causa dell'alta infettività e il movimento di massa della gente
- importato: si tratta di un viaggiatore di rientro o di un ospite esposto al morbillo al di fuori del Paese durante i 7-23 giorni precedenti alla comparsa del *rash*. In questo caso l'indagine sull'esposizione è atta a determinare la sorgente di infezione, per poter confermare se il caso possa essere considerato importato. I casi importati sono definiti dal luogo in cui il soggetto è stato infettato e non dal Paese di residenza o natio del caso stesso
- correlato all'importazione: si tratta di una infezione acquisita localmente che fa parte di una catena di trasmissione originatasi da un caso importato, così come supportato da evidenze epidemiologiche o virologiche. Spesso, in presenza di dati di genotipizzazione robusti, è possibile che un caso senza un *link* epidemiologico ben identificato abbia evidenze genetiche che lo colleghino a una catena di trasmissione importata. Se la catena di trasmissione dei casi legati all'importazioni persiste per un periodo ≥ 12 mesi all'interno del paese, tali casi non sono più considerati importati, bensì endemici
- a sorgente sconosciuta: è un caso confermato per il quale né *link* epidemiologici né virologici di importazione o di trasmissione endemica siano stati stabiliti dopo l'investigazione del caso
- associato alla vaccinazione: è un caso sospetto di morbillo che incontra tutti e 5 i seguenti criteri:
 - I. il paziente presenta *rash*, ma non tosse o qualsiasi altro sintomo respiratorio correlato
 - II. il *rash* si manifesta 7-14 giorni dopo la vaccinazione
 - III. i campioni di sangue sono positivi per il test IgM e sono stati raccolti in un tempo idoneo dopo la vaccinazione (8-56 giorni)
 - IV. non sono stati identificati casi secondari
 - V. investigazioni sul campo e di laboratorio hanno fallito nell'identificare altre cause, o il genotipo A è stato isolato dai campioni biologici del caso sospetto (il genotipo A è legato solo al vaccino vivo attenuato e non si presenta nelle catene di trasmissione del virus selvaggio)

- Decesso associato alla patologia di morbillo acuto: qualsiasi morte intercorsa entro 30 giorni dalla comparsa del *rash* di un caso di morbillo confermato che sia legata a complicazioni date dalla malattia del morbillo (come per esempio polmonite)

DEFINIZIONE DI OUTBREAK

Un *outbreak*, o focolaio epidemico, viene definito nel momento in cui due o più casi confermati da laboratorio sono temporalmente associati (all'interno dei 7-23 giorni dalla comparsa del *rash*) ed epidemiologicamente e/o virologicamente correlati. Un *outbreak* viene considerato estinto dopo che non siano stati osservati ulteriori casi epidemiologicamente o virologicamente correlati per almeno due periodi di incubazione (46 giorni) dalla data della comparsa del *rash* dell'ultimo caso coinvolto.

INVESTIGAZIONE DEL CASO

I paesi vicini all'eliminazione del morbillo dovrebbero indagare tutti i casi sospetti e ottenere i campioni biologici per effettuare i test di laboratorio. Inoltre, è opportuno collezionare dati sui potenziali rischi di esposizione e diffusione tra i contatti in maniera da identificare i pattern di trasmissione e le vie per interrompere le catene. Il caso indice non sempre è individuabile, soprattutto quando si tratta di casi correlati a viaggi. In alcuni casi, l'interpretazione dei risultati di laboratorio è complicata (per esempio in persone con una recente storia vaccinale o cross-reattività con altre infezioni). Falsi positivi sierologici possono diventare relativamente frequenti in contesti di eliminazione del morbillo, dove il valore predittivo della positività diminuisce nel momento in cui l'incidenza del morbillo si avvicina allo zero e per questo motivo nel contesto dell'eliminazione è opportuno valutare sia i test sierologici risultati positivi sia quelli risultati negativi.

RACCOLTA DEI CAMPIONI BIOLOGICI

In base alla tempistica di investigazione, vengono raccolti differenti tipi di campioni biologici. Come minimo, tutti i casi dovrebbero comprendere un campione idoneo alla individuazione di anticorpi (generalmente siero o sangue). In aggiunta, se il caso non fa parte di una catena di trasmissione già conosciuta, è opportuno raccogliere campioni biologici per la genotipizzazione (tampone orofaringeo e urine).

TEST DI LABORATORIO

La conferma di laboratorio del caso di morbillo può avvenire attraverso l'individuazione di anticorpi IgM con test immunoenzimatico ELISA o attraverso l'osservazione di un incremento significativo del titolo delle IgG durante la fase acuta della malattia o la convalescenza. In aggiunta, test positivi di RT-PCR o l'isolamento virale in colture cellulari supportano la conferma del caso.

TEST DI GENOTIPIZZAZIONE

I test di genotipizzazione del morbillo e l'impiego delle *named strain* possono aiutare a identificare la catena di trasmissione alla quale appartiene il caso. È raccomandato che almeno l'80% dei focolai confermati da laboratorio siano determinati a livello genotipico. In alcune situazioni, estendere la finestra di sequenziamento o sequenziare direttamente l'intero genoma può essere considerato un valido supporto all'indagine di un focolaio in corso o davanti a un nuovo caso di importazione.

INDICATORI DI PERFORMANCE DELLA SORVEGLIANZA

La sorveglianza del morbillo viene routinariamente valutata a livello nazionale e regionale. L'OMS ha stabilito una lista di 10 indicatori con la quale è possibile valutare la qualità del sistema di sorveglianza del morbillo, al fine di contribuire a individuare i problemi e apportare gli opportuni miglioramenti [312].

La qualità della sorveglianza di laboratorio, insieme alla sensibilità del sistema di individuazione e indagine dei casi sospetti, viene valutata secondo 4 indicatori di *performance*:

- Sensibilità del sistema di sorveglianza: rappresenta il tasso di casi scartati (non-casi) tramite test di laboratorio o attraverso un *link* epidemiologico con un focolaio laboratorio-confermato di un'altra malattia trasmissibile, rispetto ai casi notificati come sospetti. Il target è ≥ 2 casi per 100000 per anno
- Raccolta dei campioni e verifica dell'adeguatezza: è la percentuale di casi sospetti con campioni adeguati per la diagnosi di infezione acuta di morbillo raccolti e testati in un laboratorio accreditato. Il target è $\geq 80\%$ e deve essere raggiunto per ogni metodologia di indagine (sierologica e molecolare)
- *Viral detection*: ovvero la percentuale di focolai caratterizzati da un punto di vista virologico-molecolare da parte di un laboratorio accreditato (target: $\geq 80\%$). Questo indicatore riflette il contributo fondamentale della caratterizzazione molecolare del virus del morbillo e viene calcolato come la percentuale di successo di genotipizzazione
- Tempistica nel riportare i risultati di laboratorio: è definita dalla percentuale di risultati riportati dal laboratorio entro 4 giorni dalla ricezione dei campioni (target: $\geq 80\%$)

IMPORTANZA DELLA SORVEGLIANZA MOLECOLARE

L'epidemiologia molecolare del morbillo è uno strumento inestimabile per monitorare le catene di trasmissione e i casi di importazione, studio necessario per dimostrare l'assenza di una trasmissione prolungata del virus. Eppure, con il progredire dell'eliminazione del morbillo e della diminuzione della variabilità genetica tra i ceppi, la capacità dell'epidemiologia molecolare per dimostrare l'assenza di trasmissione endemica è stata messa alla prova. I protocolli di genotipizzazione del virus del morbillo sono stati inizialmente sviluppati nel 1998. Sebbene la generazione di sequenze N-450 fosse essenziale per determinare la variabilità genetica complessiva dei virus del morbillo e per rilevare nuovi genotipi, l'uso di questa "finestra" di sequenziamento ha delle limitazioni. Poiché i *lineage* nominati possono circolare in tutto il mondo per diversi anni, l'analisi delle sequenze N-450 spesso non è sufficiente a distinguere tra circolazione continua in una singola catena di trasmissione e le importazioni multiple del virus da diverse fonti, distinzione vitale per la verifica dell'eliminazione del morbillo.

Si è quindi iniziato a proporre l'ampliamento della "finestra di sequenziamento" per migliorare la risoluzione dei dati di sequenza.

Oltre alla regione N-450, i laboratori possono confrontare le sequenze intere dei geni P e H, oppure la sequenza di una regione non tradotta e altamente variabile che si trova tra le regioni di codifica per la proteina M e F. In questo modo, ceppi virali con sequenze N-450 identiche vengono spesso distinti in *cluster* diversi [314, 315].

In definitiva, la finestra di sequenziamento ottimale sarebbe la sequenza del genoma virale completo. I miglioramenti nella tecnologia di sequenziamento rendono ora possibile il sequenziamento dell'intero genoma (*Whole Genome Sequencing, WGS*) per studiare l'epidemiologia molecolare del virus del morbillo anche se, naturalmente, l'aumento delle dimensioni della "finestra di sequenziamento" aumenta la complessità dei protocolli.

SCOPO

La genotipizzazione del virus del morbillo e l'indagine epidemiologica sono raccomandati dall'OMS per la sorveglianza e il controllo delle epidemie. L'epidemiologia molecolare è una componente chiave della verifica dell'eliminazione del morbillo endemico ed è uno strumento cruciale durante le indagini di sanità pubblica, sia per stabilire se esistono dei *link* epidemiologici tra casi che si verificano nello stesso periodo e in una determinata area geografica sia per identificare le possibili fonti di importazione.

Con il progredire del programma di eliminazione, la diversità genetica dei ceppi di morbillo circolanti diminuisce. Ad oggi infatti i genotipi circolanti a livello globale sono solo 4, di cui i genotipi B3 e D8 sono quelli maggiormente diffusi in Europa. I continui viaggi aerei e la facilità di scambi tra i paesi favoriscono le importazioni in una determinata area geografica delle stesse varianti virali. In questo contesto, coi metodi tradizionali risulta difficile distinguere la trasmissione endemica da eventi di importazione. È perciò necessario estendere il sequenziamento oltre la regione N-450, sempre più insufficiente nella descrizione degli eventi di trasmissione. Con il progredire del programma di vaccinazione, inoltre, una quota sempre più alta di casi di morbillo si verifica in soggetti vaccinati. Le nuove e avanzate tecnologie devono permettere di ampliare le conoscenze su questi aspetti e consentire il monitoraggio di eventuali ceppi in grado di eludere la risposta immunitaria.

Scopo del presente progetto di dottorato è quello di studiare e sorvegliare nel tempo l'epidemiologia molecolare del morbillo in vista dell'obiettivo di eliminazione, attraverso lo sviluppo e l'utilizzo di metodologie innovative molecolari e bioinformatiche. La ricerca pertanto si propone di combinare il metodo epidemiologico tradizionale con le tecniche molecolari e bioinformatiche che la nuova era offre. Sono stati inoltre studiati i casi confermati di morbillo in soggetti precedentemente vaccinati, al fine di valutare il fallimento vaccinale e identificare eventuali mutanti *escape* a livello del gene H.

Gli obiettivi specifici sono pertanto:

- 1) Sequenziare e genotipizzare i ceppi di morbillo circolanti a Milano e nelle aree limitrofe, delineandone il profilo epidemiologico
- 2) Analizzare filogeneticamente le varianti virali circolanti sul territorio
- 3) Studiare le caratteristiche filogenetiche delle varianti virali attraverso lo studio di estese regioni nucleotidiche e dell'intero genoma, in modo da ampliare la "finestra" di indagine
- 4) Identificare le catene di trasmissione e le nuove introduzioni di virus del morbillo nell'area geografica in studio
- 5) Studiare i casi di morbillo in soggetti vaccinati attraverso il profilo sierologico e l'analisi della sequenza amminoacidica della proteina H

MATERIALI E METODI

AREA E POPOLAZIONE IN STUDIO

In Lombardia, da luglio 2013, il laboratorio EpiSoMi (Epidemiologia e Sorveglianza Molecolare delle Infezioni) del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute dell'Università degli Studi di Milano, dove è stato svolto il presente lavoro di tesi, è il Laboratorio di Riferimento Regionale (LRR) per la Sorveglianza Integrata Morbillo-Rosolia. L'area oggetto di studio risulta pertanto essere quella predisposta dall'azzoneamento del territorio da parte della Regione Lombardia, che affida al laboratorio EpiSoMi l'area coperta dall'Agenzia di Tutela della Salute ATS Città Metropolitana (con un territorio di 195 comuni del milanese e lodigiano e una popolazione di circa 4 milioni di abitanti). Questo azzoneamento non è mandatorio e pertanto il laboratorio EpiSoMi può ricevere campioni anche dalle aree limitrofe (Figura 11).



Figura 11 Azzoneamento per ATS della regione Lombardia

DEFINIZIONE DI CASO, NOTIFICA E RACCOLTA DEI CAMPIONI BIOLOGICI

In accordo con le linee guida europee 2002/253/E [316] e con quelle dell'OMS [313], la classificazione dei casi avviene in base a criteri clinici, epidemiologici o di laboratorio. Risponde ai criteri clinici qualsiasi soggetto che presenti febbre con esantema maculo-papulare e almeno uno dei sintomi tra tosse, corizza (rinite) e congiuntivite. I criteri epidemiologici sono soddisfatti quando viene stabilita una correlazione epidemiologica (tra casi diversi) mediante trasmissione interumana, mentre i criteri di laboratorio devono rispondere ad almeno uno dei seguenti parametri: ¹isolamento del virus del morbillo dal campione clinico; ²identificazione dell'acido nucleico del morbillo nei campioni clinici; ³risposta anticorpale specifica per morbillo in fase acuta nel siero e nella saliva (indagine diretta); ⁴identificazione della risposta anticorpale specifica per morbillo in fase acuta nel siero (indagine indiretta).

I risultati dei test di laboratorio devono essere sempre interpretati in relazione alla presenza o meno di vaccinazione e, nel caso in cui il paziente sia stato vaccinato, è necessario ricercare il virus selvaggio.

In base a quanto detto, un caso può essere definito:

- Possibile, se ha soddisfatti i criteri clinici
- Probabile, se ha soddisfatti i criteri clinici ed epidemiologici
- Confermato, se è avvenuta la conferma di laboratorio

Se il caso risulta negativo alle indagini di laboratorio, viene considerato come un non-caso.

In Italia il morbillo è una malattia soggetta a notifica obbligatoria dal 1934 e rientra nelle malattie di classe II, in cui il caso va notificato da parte dei medici alle ATS entro 48 ore dalla comparsa dei sintomi. L'iter informativo della segnalazione prevede la compilazione di una scheda di notifica da parte dell'operatore sanitario, contenente dati sulla segnalazione, dati anagrafici del paziente, il suo stato vaccinale, dati clinici e di laboratorio, esiti e complicanze, informazioni sull'origine del contagio ed eventuale ricovero. A ciò seguono la conduzione di un'indagine epidemiologica da parte della ATS e la conferma della diagnosi attraverso appropriate indagini di laboratorio.

CLASSIFICAZIONE DEGLI EVENTI EPIDEMICI

Il Sistema di Sorveglianza della Regione Lombardia richiede agli operatori sanitari di riportare tutti i casi sospetti di morbillo alle ATS non oltre le 12 ore dalla comparsa dei primi sintomi.

Le ATS e le strutture ospedaliere (ora definite Aziende Socio-Sanitarie Territoriali, ASST, reparti di malattie infettive) hanno il compito di condurre l'indagine epidemiologica del caso e di collezionare gli isolati clinici per ogni caso sospetto. I dati anagrafici, clinici ed epidemiologici del caso vengono riportati sistematicamente al database per le malattie infettive della Regione Lombardia (MAINF). ATS e ASST sono anche incaricate di raccogliere i campioni biologici dei casi sospetti e di inviarli al Laboratorio di Riferimento Regionale (LRR, Laboratorio EpiSoMI). Tutti i campioni devono essere accompagnati dalle informazioni relative al paziente, al suo stato vaccinale e all'esordio della malattia (Allegato 6 della circolare del Ministero della Salute del 12 novembre 2018, Materiale supplementare, Supplemento A). La raccolta dei campioni è prevista generalmente tra il quarto e decimo giorno dall'esordio della sintomatologia. Tuttavia, il metodo di raccolta richiesto dal laboratorio EpiSoMI si riferisce alle nuove indicazioni dell'OMS per gli standard della sorveglianza nel contesto dell'eliminazione del morbillo e della rosolia, ovvero la raccolta dei campioni al primo contatto col paziente e ai primi sintomi (strategia "*fever and rash*"), in maniera tale da aumentare la sensibilità delle indagini dei casi sospetti [317].

In particolare, è previsto che venga prelevato un campione di sangue fresco e/o essiccato su Guthrie Card (DBS, *Dried Blood Spot*) per la ricerca degli anticorpi specifici contro morbillo e rosolia (può essere effettuato fino a 28 giorni dall'insorgenza dell'esantema), un campione di urine e un tampone orofaringeo (TOF) per indagini dirette e per la genotipizzazione dei ceppi virali [318]. Nel laboratorio EpiSoMI, il materiale clinico raccolto viene opportunamente conservato (a +4°C i campioni ematici e a -20°C i campioni respiratori e le urine) fino alle esecuzioni delle indagini di laboratorio.

I dati utili a condurre l'indagine epidemiologica relativa ai casi di morbillo segnalati al laboratorio EpiSoMI nel periodo marzo 2017 – luglio 2019 ed esaminati nel presente lavoro, sono stati ottenuti attraverso l'interrogazione del database della Regione Lombardia MAINF e usati per distinguere i casi sporadici da quelli correlati a focolai e i casi di importazione da quelli indigeni o connessi a casi importati.

Gli eventi epidemici sono stati classificati in base all'incrocio dei dati epidemiologici con quelli molecolari in questo modo:

- Pathway di trasmissione, evento generato da una catena di trasmissione continua della stessa variante genetica (autoctona o importata) in un'area geografica delimitata e in un periodo di tempo limitato
- Variante autoctona, gruppi di virus con una sequenza nucleotidica della regione N-450 uguale o molto simile presente all'interno di una precisa area geografica e isolata in casi non correlati con l'importazione
- Variante importata, gruppi di virus con una sequenza nucleotidica della regione N-450 uguale o molto simile precedentemente non identificata presente all'interno di una precisa area geografica e isolata in casi importati o correlati con l'importazione

I risultati delle indagini vengono poi inviati al Laboratorio di Riferimento Nazionale che provvede ad aggregare i dati nazionali, sia per valutare l'incidenza del morbillo nella popolazione italiana, sia per discriminare i ceppi attualmente circolanti.

CONFERMA MOLECOLARE DEI CASI E DEI FOCOLAI

La conferma dei casi e dei focolai è stata eseguita con metodo di *Real Time* RT-PCR (indagine diretta) che ha permesso di individuare la presenza del genoma del virus del morbillo nei campioni biologici (tampone oro-faringeo e/o urina) prelevati da casi sospetti di morbillo.

ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

L'estrazione dell'RNA dai campioni di urine e/o da tamponi orofaringei è stata effettuata utilizzando un estrattore automatico (NucliSENS® EasyMAG®, Biomérieux, Francia).

Il processo di estrazione prevede 4 fasi consecutive: la fase di lisi ha lo scopo di degradare le membrane cellulari, consentendo il rilascio degli acidi nucleici contenuti, e di inattivare le DNasi e le RNasi presenti nel campione. La fase di legame degli acidi nucleici alla silice vede l'aggiunta di 100µL di una soluzione ad alta concentrazione salina contenente biglie di silice, alle quali si legano gli acidi nucleici, seguendo il principio della chimica di *Boom*. La terza fase consiste in una serie di lavaggi con tre diversi buffer (composizione non nota). La quarta fase e ultima fase è quella di eluizione: dopo 10 minuti di incubazione a 60°C con un buffer di eluizione (composizione non nota), la silice magnetica viene eliminata e gli acidi nucleici, eluiti in 100µL di buffer, vengono trasferiti manualmente in una provetta da 1,5mL, conservata a -20°C fino al momento delle indagini molecolari.

VALUTAZIONE QUANTITATIVA DELL'RNA ESTRATTO

Per quantificare l'RNA estratto e determinarne il grado di purezza è stata eseguita un'analisi spettrofotometrica mediante utilizzo di uno spettrofotometro (NanoDrop ND2000/220C, Euroclone® Thermo Scientific, USA), che ne misura l'assorbanza a diverse lunghezze d'onda. All'inizio di ogni sessione di lavoro, viene impostato il "bianco" dello strumento, tarato mediante la lettura di un campione contenente il buffer di eluizione privo di acidi nucleici e di proteine. Successivamente vengono caricati singolarmente (letture singole) i campioni di interesse: sono sufficienti volumi di 1-1,5µL. Il grado di purezza viene calcolato facendo il rapporto tra l'assorbanza a 260 nm (assorbanza degli acidi nucleici) e l'assorbanza a 280 nm (assorbanza delle proteine). Il campione viene definito puro se il rapporto è compreso tra 1.8 e 2; al contrario un rapporto basso (<1.8) indica la presenza di inquinanti/contaminanti proteici.

IDENTIFICAZIONE DELL'RNA VIRALE MEDIANTE *REAL TIME* RT-PCR

Per identificare l'RNA del virus morbillo da campioni respiratori e/o da urina è stata condotta una *Real-Time* RT-PCR utilizzando set di *primer* e sonde specifici; per il virus del morbillo, il target è rappresentato da un frammento della regione conservata del gene N.

La *Real-Time* RT-PCR è stata condotta mediante la chimica TaqMan, utilizzando un kit commerciale (AgPath-ID™ one step RT-PCR kit, *Life Technologies*) che permette di effettuare in un unico saggio la retrotrascrizione dell'RNA in DNA complementare (cDNA) e l'amplificazione del cDNA. Per l'identificazione dei *Morbillivirus* sono stati usati i seguenti *primer* e sonda, con i quali è stato amplificato un frammento di 111 nt (nt 584 - 697) del gene M [319]:

- MV-F 5'-CCCTGAGGGATTCAACATGATTCT-3
- MV-R 5'-ATCCACCTTCTTAGCTCCGAATC-3
- MV-PROBE 5'-TCTTGCTCGCAAAGGCGTTACGG-3'

Per ciascun campione, il protocollo operativo prevede la preparazione delle mix di reazione per un volume finale di 20µL, così composte:

Reagente	Volume(µL)
RT-PCR Enzyme Mix 25X	1
RT-PCR Buffer 2X	12.5
Primer MVF, 30µM	0.5
Primer MVR, 30µM	0.5
Probe MV, 10µM	0.5
H2O nuclease-free	5
RNA estratto	5

Vengono inclusi, inoltre, almeno un controllo negativo (*No Template Control*, NTC), rappresentato da acqua *nuclease-free*, e un controllo positivo (*Positive Template Control*, PTC), rappresentato da campioni risultati positivi in precedenza per il target ricercato.

Al termine della reazione di amplificazione, lo strumento fornisce una rappresentazione grafica data dalle sigmoidi prodotte dall'amplificazione, in cui vengono messi in relazione il numero dei cicli con l'emissione della fluorescenza. Sono considerati positivi i campioni la cui curva di reazione interseca la linea soglia (*threshold*) prima dei 40 cicli.

Affinché la seduta analitica sia validata, devono verificarsi le seguenti condizioni:

- la curva di amplificazione del NTC deve sempre fornire un risultato negativo (assenza di sequenze target a cui possano legarsi le sonde), al fine di escludere la presenza di falsi positivi
- la curva di amplificazione del PTC deve sempre fornire un risultato positivo e intersecare il *threshold* prima del quarantesimo ciclo
- tutti i campioni clinici di origine umana devono presentare curve di RP che intersecano il *threshold* prima del trentesimo ciclo. In caso contrario, la seduta non è valida e l'intera procedura deve essere ripetuta

CARATTERIZZAZIONE GENETICA DEI *MORBILLIVIRUS*

Una volta identificata la presenza del virus del morbillo attraverso la *Real Time* RT-PCR, viene effettuata la caratterizzazione a livello genetico, con lo scopo di identificare i genotipi di appartenenza, analizzare la sequenza nucleotidica del gene H e amminoacidica della proteina e infine analizzare il genoma completo dei virus di morbillo identificati.

RETROTRASCRIZIONE

La retrotrascrizione dell'RNA virale a cDNA viene eseguita utilizzando una miscela di reazione contenente:

Reagente	Volume(μ L)
RT-PCR Buffer 5X (250mM Tris HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15mM MgCl₂)	5
DTT 0.1 mM	2.5
dNTP 2.5 mM (FINNZYMES, Finland)	3
pd(N)6 50ng/μL <i>Random Hexamer Primer</i>	1
M-MLV <i>Reverse Transcriptase</i> 200U/μL (Thermo Fisher - Invitrogen, USA)	1
RNAse 40U/μL (Promega, USA)	0.5
H₂O nuclease-free	2.5
RNA estratto	15

La reazione di retrotrascrizione è avvenuta grazie all'utilizzo di un termociclatore (GeneAmp®PCR System 9700– Applied Biosystems, USA) in 3 fasi: 25°C per 5 minuti; 42°C per 60 minuti; 99°C per 10 minuti.

AMPLIFICAZIONE DELLA REGIONE N-450 DI *MORBILLIVIRUS*

La caratterizzazione dei genotipi avviene attraverso il sequenziamento della regione C-terminale del gene N (N-450), così come indicato dall'OMS [296].

La reazione di amplificazione consiste in una *nested* PCR. Da un frammento più grande si ottiene un frammento interno più piccolo, comprendente la regione di interesse, che viene infine sequenziato. Per ottenere ciò bisogna procedere attraverso due step, di cui il primo consente di ottenere un frammento di 1.076 bp, mentre il secondo permette di determinare un frammento di 891 bp interno al segmento amplificato nel primo step di amplificazione.

I *primer* utilizzati nel primo step sono:

- MN-PV-F1 (*forward*): 5'-CCTGCTCTGGACTGCATGAA-3', temperatura di melting di 67.7 °C, posizionato sul genoma di *Morbillivirus* tra il nt.844 e il nt.864 (ID GenBank: KT732220).
- MN-PV-R1 (*reverse*): 5'-CCGCCTTCAGTTGATCCAATTGCTG-3', temperatura di melting di 74.6 °C, posizionato sul genoma di *Morbillivirus* tra il nt. 1.920 e il 1.896 (ID GenBank: KT732214)

La reazione di amplificazione è stata effettuata mediante l'utilizzo del termociclatore (GeneAmp®PCR System 9700 – Applied Biosystems, USA) alle condizioni seguenti:

N° cicli	Condizioni	Fase
1	94°C x 5'	Denaturazione iniziale
	94°C x 30"	Denaturazione
40	60°C x 30"	<i>Annealing</i>
	72°C x 2'15"	Estensione
1	72°C x 7'	Estensione finale

I *primer* utilizzati nel secondo step sono:

- MN-1F (*forward*): 5'-GCTATGCCATGGGAGTAGGA-3', temperatura di melting di 63,9 °C, posizionato sul genoma di *Morbillivirus* tra il nt.1.001 e il nt.1.020 (ID GenBank: KT732220)
- MN-PV-R2 (*reverse*): 5'-GCATGGTTTGCTGAGACCCGAA-3', temperatura di *melting* di 73,7 °C, posizionato sul genoma di *Morbillivirus* tra il nt.1.891 e il nt.1.870 (ID GenBank: KT732220)

N° cicli	Condizioni	Fase
1	94°C x 5'	Denaturazione iniziale
	94°C x 30"	Denaturazione
40	58°C x 30"	<i>Annealing</i>
	72°C x 1'	Estensione
1	72°C x 7'	Estensione finale

AMPLIFICAZIONE DEL GENE H DI *MORBILLIVIRUS*

L'intero gene del virus del morbillo che codifica per la proteina emoagglutinina è stato amplificato e sequenziato col fine di esaminare la conseguente proteina che codifica.

L'amplificazione del gene H consiste in due *emi-nested* PCR, eseguite attraverso 2 step.

Nel primo step di amplificazione viene impiegata la seguente coppia di *primer*:

- MH-F1 (*forward*): sequenza 5'-CCTCTGGCCGAACAATATCG-3', temperatura di melting di 59,4 °C, posizionato sul genoma di *Morbillivirus* tra il nt.7.107 e il nt.7.124
- MH-R1 (*reverse*): sequenza 5'-CAGATAGCGAGTCCATAACG-3', temperatura di melting di 57,3 °C, posizionato sul genoma di *Morbillivirus* tra il nt.9.142 e il nt.9.123

Sono stati inoculati 10 μ L di cDNA in 40 μ L di mix di reazione, composta da:

Reagente	Volume μ L
Buffer (5X GoTaqR Reaction Buffer, 7.5mM MgCl₂; pH 8.5)	10
dNTP [10 mM]	1
Primer forward [30 pmol/μL]	1
Primer reverse [30 pmol/μL]	1
GoTaq Promega [5 U/μL]	0,25
H₂O	31,75

La reazione di amplificazione è stata effettuata mediante l'utilizzo del termociclatore (GeneAmp ®PCR System 9700 – Applied Biosystems, USA) alle condizioni seguenti:

N° cicli	Condizioni	Fase
1	94°C x 4'	Denaturazione iniziale
	94°C x 30"	Denaturazione
40	57°C x 30"	<i>Annealing</i>
	72°C x 2'15"	Estensione
1	72°C x 7'	Estensione finale

Nel secondo step, per ottenere il frammento A si è utilizzata la seguente coppia di *primer*:

- MH-F1 (*forward*), utilizzato nel primo step.
- MH-ER (*reverse*): sequenza 5'-GAACCGTGTGTGATCAATGG-3', temperatura di *melting* di 57,3 °C, posizionato sul genoma di *Morbillivirus* tra il nt.8.479 e il nt.8.460.

Per ottenere il frammento B si è utilizzata la seguente coppia di *primer*:

- MH-DF (*forward*): sequenza 5'-GTACCGAGTGTGTTGAAGTAGG-3', temperatura di *melting* di 57,9 °C, posizionato sul genoma di *Morbillivirus* tra il nt.7.916 e il nt.7.936
- MH-R1 (*reverse*), utilizzato nel primo step

A tal proposito sono state preparate due mix di reazione, una contenente la prima coppia di *primer* e l'altra con la seconda coppia. Entrambe le miscele sono composte da:

Reagente	Volume μ L
Buffer (5X GoTaqR Reaction Buffer, 7.5mM MgCl ₂ ; pH 8.5)	10
dNTP [10 mM]	1
<i>Primer forward</i> [30 pmol/ μ L]	1
<i>Primer reverse</i> [30 pmol/ μ L]	1
GoTaq Promega [5 U/ μ L]	0,25
H ₂ O	31,75

Ai 40 μ L di entrambe le mix si inoculano 10 μ L del primo step.

La reazione di amplificazione è stata effettuata mediante l'utilizzo del termociclatore (*GeneAmp RPCR System 9700 – Applied Biosystems, USA*) alle seguenti condizioni:

N° cicli	Condizioni	Fase
1	94°C x 4'	Denaturazione iniziale
	94°C x 30"	Denaturazione
40	50°C x 30"	<i>Annealing</i>
	72°C x 1'30"	Estensione
1	72°C x 7'	Estensione finale

Con il secondo step si ottengono un frammento A di 1.373 bp, che copre la prima metà del gene H, e un frammento B di 1.227 bp, per la seconda metà. In ogni seduta di lavoro sono stati inseriti controlli positivi e negativi di reazione, processati contemporaneamente agli altri campioni biologici.

Nel caso in cui la metodica non andasse a buon fine, sono state utilizzate altre due coppie di *primer* per il primo e secondo step, disegnate *ex novo* e allineati sulla sequenza del genoma completo del virus del morbillo (ID GenBank: NC_001498.1):

Primo step:

- MH-F2 (*forward*): sequenza 5'-CATCCACAATGTCACC-3', T_m 54.5°C, posizionato sul genoma da 7.156 a 7.171 pb
- MH-R2 (*reverse*): sequenza 5'-TTCCCAACTCCACATT-3', T_m 55.9°C, posizionato sul genoma da 9.319 a 9.335 pb

N° cicli	Condizioni	Fase
1	94°C x 4'	Denaturazione iniziale
	94°C x 30"	Denaturazione
45	50°C x 30"	<i>Annealing</i>
	72°C x 2'15"	Estensione
1	72°C x 7'	Estensione finale

Secondo step, frammento A:

- MH-F2 (*forward*) del primo step
- MH-LR (*reverse*): sequenza 5'-ACGCCTGCTGGAAG-3', Tm 57.3°C, posizionato sul genoma da 8306 a 8319 pb

Secondo step, frammento B:

- MH-iF (*forward*): sequenza 5'-ATCCCCAACCGACATGC-3', Tm 62.2°C, posizionato sul genoma da 8147 a 8163 pb.
- MH-R2 (*reverse*) del primo step

Entrambe le mix sono state amplificate alle seguenti condizioni:

N° cicli	Condizioni	Fase
1	94°C x 4'	Denaturazione iniziale
	94°C x 30"	Denaturazione
45	55°C x 30"	<i>Annealing</i>
	72°C x 1'30"	Estensione
1	72°C x 7'	Estensione finale

RILEVAMENTO DEGLI AMPLIFICATI

I prodotti di amplificazione vengono analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%, contenente etidio-bromuro, e confrontati con un tracciante (BenchTop 100bp DNA ladder, Promega, USA) per identificarne il peso molecolare.

PURIFICAZIONE DEL PRODOTTO DI AMPLIFICAZIONE

I prodotti di amplificazione sono stati opportunamente purificati e/o concentrati attraverso l'uso di un kit commerciale (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, USA). Il protocollo di purificazione permette anche l'estrazione del DNA/RNA direttamente dal gel per la corsa elettroforetica, attraverso il taglio e lo scioglimento dell'agarosio. L'acido nucleico viene caricato su colonna e centrifugato a 16.000xg per un minuto, in modo tale da legarlo alla membrana e consentire l'eliminazione del materiale di scarto. Successivamente viene sottoposto a due lavaggi consecutivi con Membrane Wash Solution (contenente acetato di potassio 10mM (pH 5), EDTA 16,7µM (pH 8) ed etanolo 95%) e nuovamente a centrifugazioni a 16.000xg.

La colonna viene infine trasferita in una provetta eppendorf da 1,5mL e, in essa, si aggiungono 50µL di *Nuclease-Free Water*, dopo aver lasciato incubare a temperatura ambiente per almeno 1', il campione è stato eluito centrifugando a 16.000xg per 2 minuti.

Il DNA, purificato e concentrato, può essere conservato a 4°C fino al momento del sequenziamento.

SEQUENZIAMENTO

Il sequenziamento degli amplificati viene condotto da un *service* esterno al laboratorio EpiSoMI. Al *service* di sequenziamento vengono inviate provette, adeguatamente etichettate, contenenti 12µL del DNA purificato alla concentrazione di 15ng/µL per i prodotti di amplificazione con lunghezza fra le 500-1000bp e 5µL del *primer forward* alla concentrazione di 5 pmol/µL.

Il sequenziamento avviene mediante metodo Sanger, automatico a tecnologia capillare ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems), il quale assicura la decodifica di sequenze lunghe fino a 10001200 bp. La sequenza è mostrata in forma di picchi colorati (elettroferogramma), dove ogni picco corrisponde alla posizione di ciascun nucleotide nella sequenza. Normalmente, l'elettroferogramma è interpretato in modo automatico dal software utilizzato per il sequenziamento. Le sequenze ottenute con il sequenziatore automatico cominciano approssimativamente 15-20 basi dopo la sequenza del *primer*. Inoltre, il sequenziatore automatico opera una singola lettura del segnale e questo può comportare la generazione di errori o ambiguità in qualche punto; per questo è sempre necessario ricontrollare e correggere a seconda della necessità la sequenza in base all'elettroferogramma (lettura manuale, tramite l'utilizzo del programma BioEdit [320]).

SEQUENZIAMENTO DELL'INTERO GENOMA

L'amplificazione dell'intero genoma ha richiesto la preparazione di 10 mix di reazione allestite con le rispettive coppie di *primer* specifici (Tabella 1), usate per amplificare l'intero genoma suddividendolo in 10 frammenti parzialmente sovrapposti [321].

Sono stati inoculati 5µL di cDNA in 45 µL di una miscela di reazione composta da:

Reagente	VolumeµL
Buffer (5X GoTaqR Reaction Buffer, 7.5mM MgCl₂; pH 8.5)	10
dNTP [10mM]	1
Primer forward [25 pmol/µL]	1
Primer reverse [25 pmol/µL]	1
GoTaq Promega [5 U/µL]	0,25
H₂O	31,75

La reazione di amplificazione è stata condotta in un termociclatore (GeneAmpR PCR System 9700, Applied Biosystems, alle seguenti condizioni:

N° cicli	Condizioni	Fase
1	95°C x 5'	Denaturazione iniziale
	94°C x 30"	Denaturazione
55	X°C x 30"	<i>Annealing</i>
	72 °C x 2'	Estensione
1	72 °C x 7'	Estensione finale

^{*}X= la temperatura dipende dalla coppia di primer utilizzata ed è indicata in Tabella 1

Tabella 1 Coppie di *primer* specifici per l'amplificazione del genoma del morbillo.

Frammento	Nome	Sequenza (3'-5')	Posizione (ID GenBank NC_001498.1)	Tm	Lunghezza frammento
A	L1-3F (forward)	TTGGGTAAGGATAGATCAATCAAT G	12-36	61°C	1823pb
	L2-1R (reverse)	TTGACATGGCGTGCCTGC	1818-1835	58 °C	
B	L3-1F (forward)	TCTAGACTAGGTGCRAGRGGCCG	1676-1698	68°C	1785pb
	L4-1R (reverse)	GTCGAAGTCGTAGATCTCTG	3442-3461	58 °C	
C	L5-1F (forward)	GTCGAAGTCGTAGATCTCTG	3246-3265	58°C	1811pb
	L6-3R (reverse)	CCCCCGTCTTGGAYTGTCG	5037-5057	66°C	
D	L7-1F (forward)	CGCACAAGCGACCGAGGTG	4792-4810	64°C	1836pb
	L8-1R (reverse)	CACAATTGGCTATTAGGTTCCC	6607-6628	60°C	
E	L9-1F (forward)	TTCATGCCAGAGGGGACTGTG	6463-6483	63°C	1806pb
	L10-1R (reverse)	CATGTCGGTTGGGGATTTC	8251-8269	57°C	
F	L11-1F (forward)	GAGTGTGTTGARGTAGGTGKATCA G	8028-8052	64°C	1834pb
	L12-1R (reverse)	ACAAGGTCACGAGAGATTAGC	9842-9862	59°C	
G	L13-1F (forward)	AACTCACGGCTTGGCCTAG	9627-9645	59°C	1864pb
	L14-1R (reverse)	GGAATGGTGCTGATGGTCC	11235-11258	62°C	
H	L15-1F (forward)	TGCCTTAATTGGAGATATGAGACC	11235-11258	62°C	1741pb
	L16-1R (reverse)	GCCCATGAGTACACTGTTGC	12957-12976	60°C	
I	L17-1F (forward)	TGAGAGAACAGACATGAAGCTKG	12817-12909	62°C	1776pb
	L18-4R (reverse)	AAGAACAAGCCGTCTTCCC	14575-14593	60°C	
L	L19-1F (forward)	CATGCTTCCGAGAATCGGG	14487-14507	63°C	1406pb
	L20-1R (reverse)	CCAGACAAAGCTGGGAATAG	15874-15893	58°C	

I prodotti di amplificazione sono stati evidenziati mediante corsa elettroforetica su gel al 1.5% di agarosio e purificati utilizzando il kit di purificazione (NucleospinR Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel, Germany GmbH & Co. KG).

Il sequenziamento dei genomi completi è stato effettuato attraverso metodiche di *Next Generation Sequencing* (NGS) mediante piattaforma Illumina®. Tutte le piattaforme NGS prevedono il sequenziamento parallelo massivo di molecole di DNA, separate spazialmente in una cella a flusso (*flow cell*). Questa strategia è radicalmente differente rispetto al metodo di sequenziamento descritto da Sanger, che si basa sulla separazione elettroforetica di frammenti di lunghezza diversa ottenuti mediante singole reazioni di sequenziamento. Nelle tecnologie NGS, invece, il sequenziamento viene effettuato mediante cicli ripetuti di estensioni nucleotidiche ad opera di una DNA polimerasi. Poiché la procedura è parallela e massiva, tali piattaforme consentono di sequenziare da milioni a miliardi di paia di basi di DNA in un'unica seduta analitica, a seconda del tipo di tecnologia NGS utilizzata. Il maggior vantaggio della tecnologia NGS è il sequenziamento *paired-end* (PE), ossia il sequenziamento di entrambe le estremità dei frammenti di DNA in una library di sequenziamento (*sequency library*) e l'allineamento delle *reads*, *forward* e *reverse*, come coppie di *reads* per conferire maggior accuratezza all'allineamento. Per il nostro studio abbiamo utilizzato il MiSeq System di Illumina®.

La metodica utilizzata per la creazione delle librerie è quella prevista dal protocollo del kit Nextera XT *sample preparation* (Illumina), che permette la frammentazione del DNA e l'aggancio immediato di corte sequenze nucleotidiche denominate adattatori, tramite l'azione di una trasposasi, allo scopo di ancorare i frammenti di DNA al supporto sul quale avverrà la reazione di sequenziamento. L'insieme dei frammenti di DNA preparati tramite l'aggiunta degli adattatori costituisce la *sequencing library*. I frammenti della *sequencing library* vengono amplificati e sequenziati fino a ottenere numerose copie complementari di ciascun frammento, che vengono denominate *reads*. Il sequenziamento può essere eseguito a partire da una sola estremità del frammento (sequenziamento con *single-end reads*) o partendo da entrambe le estremità e proseguendo in direzioni opposte (sequenziamento con *paired-end reads*). La corsa della libreria di frammenti ottenuti è stata condotta sulla piattaforma Illumina MiSeq (Illumina), con chimica 2x250 bp *paired-end*.

ANALISI BIOINFORMATICA

Editing delle sequenze

Le sequenze nucleotidiche di *Morbillivirus* ottenute vengono analizzate con il programma BioEdit (versione 7.2.5; www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html).

Le sequenze sono state raggruppate in file di testo in formato FASTA e corrette dove possibile. Il programma consente infatti di apportare modifiche alla sequenza quando quest'ultima presenta basi degenerate (indicate con un preciso codice alfabetico) a causa di ambiguità a livello di picchi, rilevabili grazie all'osservazione dell'elettroferogramma.

Attraverso l'*editing* delle sequenze è possibile anche appaiare sequenze sovrapposte e contigue in modo da generare frammenti più lunghi; è questo il caso della costruzione dell'intero gene H in seguito alla sua amplificazione attraverso due frammenti separati.

ANALISI DELLE SEQUENZE

Le sequenze nucleotidiche (N-450) ottenute vengono allineate con le sequenze presenti nelle banche dati di BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) per la determinazione del genotipo di appartenenza, assegnato in base alla similarità con la sequenza *consensus* per quel genotipo [285]. Dopo aver determinato i genotipi di appartenenza e la presenza o meno di ceppi già inseriti nel database GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), le sequenze vengono analizzate per valutare le differenze intra-genotipiche e studiare le varianti circolanti nella popolazione lombarda.

Tutte le sequenze ottenute vengono allineate tra loro e tra le sequenze di riferimento, *consensus* e *named variant*, scaricate dal database MeaNS (*Measles Nucleotide Surveillance*; <http://www.who-measles.org>) (Tabelle 2 e 3) e altre sequenze ottenute da GenBank, mediante l'utilizzo del software ClustalX2 (versione 2.1.0; www.clustal.org). In seguito, utilizzando questi allineamenti come dataset, viene eseguita l'analisi filogenetica delle sequenze nucleotidiche.

Per tutti i genotipi individuati viene utilizzato il metodo di *clustering Maximum Likelihood*, modello Kimura 2 parametri, utilizzando il software MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, versione 7.0.21; www.megasoftware.net). La significatività degli alberi filogenetici costruiti è stata stimata attraverso il metodo *Bootstrap*. Questo metodo calcola una stima statistica dell'affidabilità dei vari raggruppamenti attraverso sotto campionamenti casuali dei dati. A ogni nodo viene assegnato un valore che rappresenta il numero di volte che un dato raggruppamento è stato ottenuto nei set campionati a partire dai dati originari. Sono state utilizzate campionature da 1.000 set. La sequenza *Vaccine Strain Edmonston Moraten* del genotipo A è stata utilizzata come *outgroup* per la costruzione dell'albero.

I dati ottenuti sono stati impiegati per distinguere tra casi sporadici e focolai e per individuare eventuali nuove varianti e/o mutanti.

Tabella 2 Sequenze di riferimento del genotipo B3, Regione N-450. In azzurro sono evidenziate le sequenze consenso.

Nome WHO <i>named strain</i>	Paese isolamento	Città isolamento	Anno	ID GenBank	Numero di identificazioni
MVs/Dublin.IRL/8.16/	Irlanda	Dublino	2016	KY013331	2810
MVi/Harare.ZWE/38.09/	Zimbabwe	Harare	2009	JF973033	2012
MVs/Saint Denis.FRA/36.17	Francia	Saint Denis	2017	AVV81842	564
MVs/Liverpool.GBR/5.12/	Regno Unito	Liverpool	2012	JX162015	492
MVs/Allada.BEN/3.10/	Benin	Allada	2010	JF973026	360
MVs/Kabul.AFG/20.2014/3	Afghanistan	Kabul	2014	KP714335	352
MVs/Nottingham.GBR/50.05/	Regno Unito	Nottingham	2005	EU416323	319
MVs/Niger.NGA/8.13/	Nigeria	Niger	2013	KX943236.1	305
MVs/Kansas.USA/1.12/	USA	Kansas	2012	JX315576	219
MVi/Gombak.MYS/40.15/	Malesia	Gombak	2015	KU714612	188
MVi/Gombak.MYS/44.16/	Malesia	Gombak	2016	KY678417	178
MVs/Bradford.GBR/13.18/	Regno Unito	Bradford	2018	MK628227	146
MVs/Ljubljana.SVN/27.17	Slovenia	Ljubljana	2017	MF593153	115
MVs/Belgrade.SRB/44.17	Serbia	Belgrado	2017	-	102
MVs/Islamabad.PAK/1.13/	Pakistan	Islamabad	2013	KR028488	96
MVs/Como.ITA/32.15/	Italia	Como	2015	KX785098.1	86
MVs/Tonbridge.GBR/5.14/	Regno Unito	Tonbridge	2014	KJ650198	79
MVs/Western Australia.AUS/2.14/	Australia	Western Australia	2014	KJ364637	59
MVs/Minnesota.USA/15.17/	USA	Minnesota	2017	MF045442	58
MVi/Ibadan.NGA/0.97/	Nigeria	Ibadan	1997	AJ232203	1
MVi/New York.USA/0.94/	USA	New York	1994	L46753	1

Tabella 3 Sequenze di riferimento del genotipo D8, Regione N-450. In azzurro è evidenziata la sequenza consenso.

Nome WHO <i>named strain</i>	Paese isolamento	Città isolamento	Anno	ID GenBank	Numero di identificazioni
<u>MVs/Gir Somnath.IND/42.16/</u>	India	Gir Somnath	2016	KY120864	3799
<u>MVs/Taunton.GBR/27.12/</u>	Regno Unito	Taunton	2012	JX984461	1345
<u>MVs/Osaka.JPN/29.15/</u>	Giappone	Osaka	2015	LC072667	1285
<u>MVs/Herborn.DEU/05.17/</u>	Germania	Herborn	2017	KY973620	964
<u>MVs/Frankfurt Main.DEU/17.11/</u>	Germania	Frankfurt-Main	2011	KF683445	784
<u>MVi/Hulu Langat.MYS/26.11/</u>	Malesia	Hulu Langat	2011	JX486001	695
<u>MVi/Villupuram.IND/03.07/</u>	India	Villupuram	2007	FJ765078	597
<u>MVs/Rostov on Don.RUS/47.13/2</u>	Russia	Rostovskaya Oblast	2013	KT588029	580
<u>MVs/Cambridge.GBR/5.16/</u>	Regno Unito	Cambridge	2016	KX161662	568
<u>MVs/Samut Sakhon.THA/49.16</u>	Tailandia	Samut Sakhon	2016	MK079566	399
<u>MVs/Victoria.AUS/6.11/</u>	Australia	Victoria	2011	KF469368	309
<u>MVs/Republic of Komi.RUS/35.13/</u>	Russia	Republic of Komi	2013	KT588030	245
<u>MVs/London.GBR/21.16/2</u>	Regno Unito	London	2016	MH596006	195
<u>MVi/Pune.IND/10.13/</u>	India	Pune	2013	KC862249	188
<u>MVs/Chui.KGZ/53.14/</u>	Kyrgyzstan	Chui-Tokmak City	2014	KU728741	118
<u>MVi/Delhi.IND/01.14/06</u>	India	Delhi	2014	KT183501	106
<u>MVs/Gadag.IND/02.13/</u>	India	Gadag	2013	KC862252	96
<u>MVs/Swansea.GBR/4.13/</u>	Regno Unito	Swansea	2013	KF214761	74
<u>MVs/Thiruvananthapuram.IND/ 18.12/</u>	India	Thiruvananthapu ram	2012	KX257635	73
<u>MVs/Pernambuco.BRA/25.13/6</u>	Brasile	Pernambuco	2013	MH447525	55
<u>MVi/Manchester.GBR/30.94/</u>	Regno Unito	Manchester	1994	AF280803	2

Le sequenze del gene H ottenute sono state allineate con il software ClustalX2 fra di loro e con la sequenza del gene H del virus vaccinale (*strain Edmonston*). Utilizzando il programma BioEdit, le sequenze nucleotidiche ottenute nello studio sono state convertite in forma amminoacidica; successivamente, è stato valutato l'effetto delle mutazioni amminoacidiche individuate e, in particolare, se queste potessero considerarsi neutre dal punto di vista chimico-fisico (amminoacidi con simile carica, polarità, ingombro sterico) oppure potessero portare a variazioni della struttura proteica (rilevanti differenze chimico fisiche), considerando soprattutto la possibile vicinanza a siti immunoepitopici [44].

L'albero filogenetico della proteina H è stato creato attraverso il metodo di *clustering Maximum Likelihood*, modello Jones-Taylor-Thornton (JTT).

RISULTATI

SORVEGLIANZA DEL MORBILLO NELLA CITTÀ DI MILANO E AREE LIMITROFE, MARZO 2017 – LUGLIO 2019

Tra marzo 2017 e luglio 2019 sono stati raccolti 806 campioni per la ricerca sierologica (sangue, siero e DBS) e 1.707 campioni per la ricerca virologica (urina, TOF), per un totale di 2.513 campioni provenienti da 885 casi sospetti di morbillo (Tabella 4). La maggior parte dei campioni raccolti dai casi sospetti per la conferma di laboratorio è stata inviata dalle ASST (777 casi, 87.8%), seguite dalle ATS (108 casi, 12.2%). Il 68.9% (610/885) dei casi sospetti risiedeva a Milano e provincia, seguita dalle province di Monza Brianza (90/885, 10.2%), Como (84/885, 9.5%) e Brescia (66/885, 7.5%) (Figura 12).

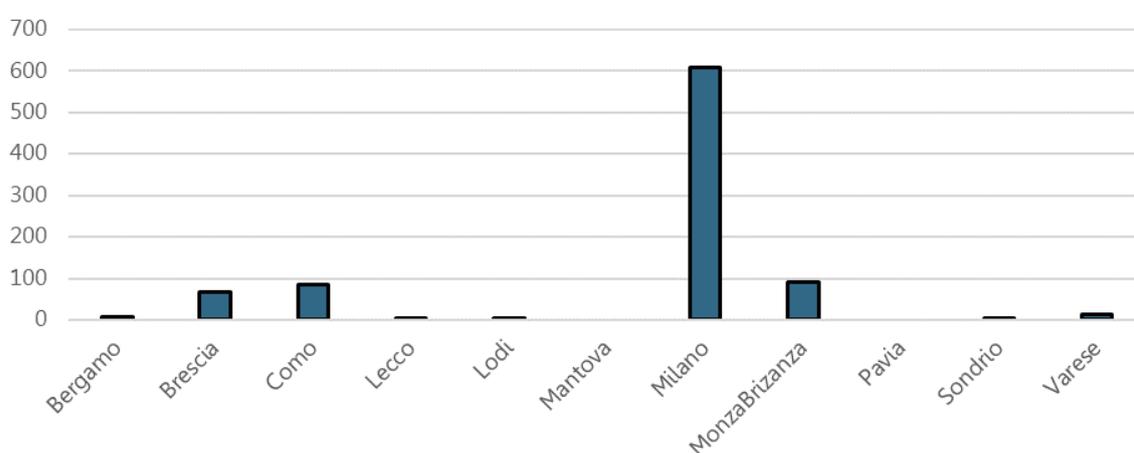


Figura 12 Numero dei casi di morbillo indagati per provincia nel periodo in studio.

In tutti e tre gli anni in studio, i casi sospetti di morbillo osservati si sono verificati maggiormente nei mesi più caldi (giugno – luglio) piuttosto che in quelli freddi (ottobre – dicembre) (Figura 13). Nel 2017 si sono osservati due picchi, ad aprile e luglio, mentre nel 2018 e nei primi sette mesi del 2019 si è raggiunto un *plateau* dei casi che è poi calato verso i mesi freddi.

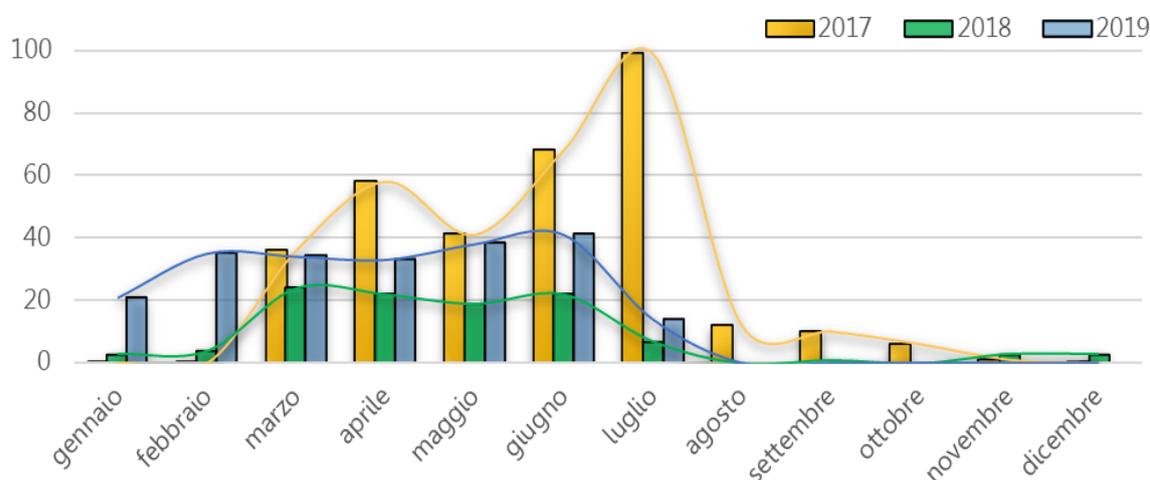


Figura 13 Distribuzione per mese dei casi di morbillo confermati negli anni in studio.

Degli 885 casi indagati, 657 (74.2%) sono stati confermati, in quanto risultati positivi ai test sierologici e/o virologici. In particolare, quasi la metà dei casi (326/657, 49.6%) è stata confermata con indagini sierologiche e con indagini virologiche, il 47.5% (312/657) solamente con indagini virologiche, mentre il 2.9% (19/643) è stato confermato solamente con indagini sierologiche (Figura 14).

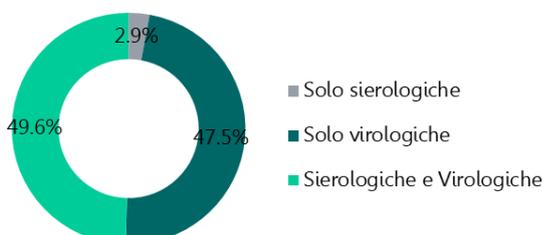


Figura 14 Distribuzione percentuale delle conferme sierologiche e virologiche.

Il maggior numero di conferme è stato registrato nell'anno 2017, con 331/413 casi confermati (80.1%), mentre il 2018 è stato l'anno con meno casi confermati (109/176, 61.9%). Nei primi sette mesi del 2019 si sono indagati 296 casi, di cui confermati 217 (73.3%) (Tabella 4).

Tabella 4 Numero e percentuali dei casi di morbillo segnalati e confermati per anno.

	Marzo-dicembre 2017	Gennaio-dicembre 2018	Gennaio-luglio 2019	Totale
Totale Casi Indagati	413	176	296	885
Totale Casi Confermati	331	109	217	657
Percentuali casi confermati	80.15	61.93	73.31	74.23

Il maggior numero di casi confermati è stato registrato nelle fasce d'età dei giovani tra i 15 e i 39 anni (414/657, 63.0%) e degli adulti *over-39* anni (141/657, 21.5%); questo dato è tale per tutti e tre gli anni e l'età mediana dei casi confermati è stata 29 anni (*range*: 0 – 78 anni). Il 50.1% (329/657) dei casi si è verificato in persone di sesso femminile (Figura 15).

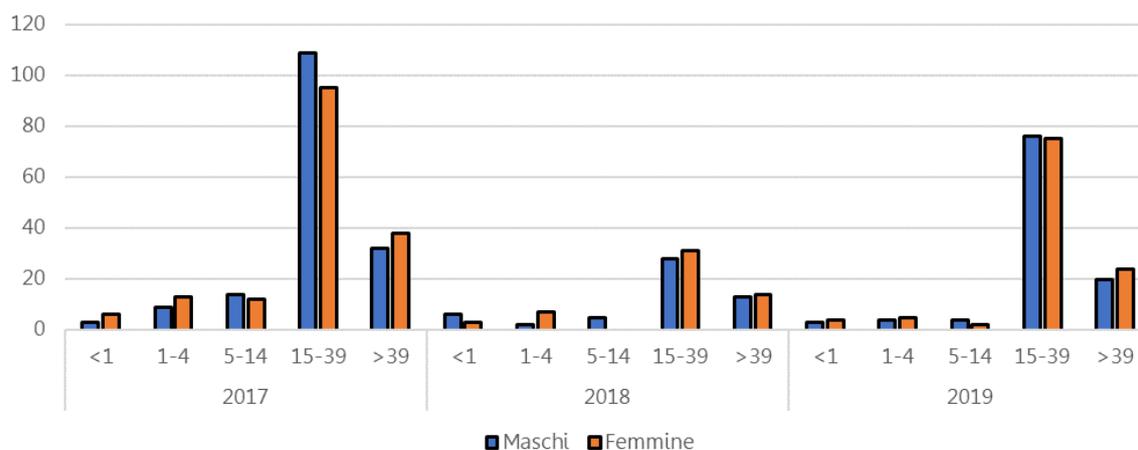


Figura 15 Numero dei casi di morbillo confermati per fasce d'età e sesso.

SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA

Sul database regionale MAINF vengono inseriti tutti quei casi per cui è stato completato l'iter di notifica. Rispetto agli 885 casi pervenuti al nostro laboratorio per la conferma di morbillo, ha completato questo iter l'89.2% (789/885). Dei 789 casi notificati, 629 sono stati confermati come morbillo, mentre i restanti 160, risultando negativi ai test di conferma, sono stati definiti non-caso. L'indagine epidemiologica ha permesso di classificare i casi confermati come sporadici (361/629, 57.4%) e i restanti 268 (42.6%) appartenenti a 123 focolai. Il 9.7% (61/629) dei casi confermati dal nostro laboratorio ha riferito di aver viaggiato 7-23 giorni prima della comparsa dei sintomi. Il 55.7% (34/61) ha viaggiato in Italia, mentre il 44.3% (27/61) all'estero.

Al momento del contagio il 92.1% (579/629) dei casi di morbillo non era vaccinato (dato MAINF), mentre il restante 7.9% (50/629) aveva dichiarato di aver ricevuto almeno una dose di vaccino antimorbillo (Figura 16).

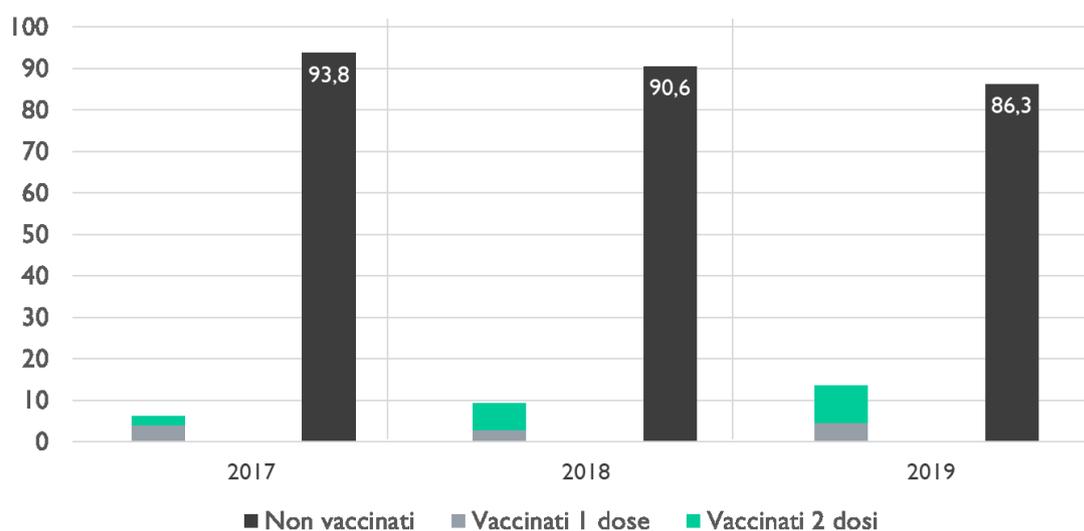


Figura 16 Percentuale dei casi confermati di morbillo in soggetti vaccinati e non vaccinati, per anno.

SORVEGLIANZA MOLECOLARE DEL MORBILLO

ANALISI GENOTIPICA

Dei casi con campioni idonei per l'indagine molecolare, il 97.1% (638/657) è risultato positivo. La caratterizzazione genetica mediante sequenziamento della regione C-terminale del gene N di *Morbillivirus* è stata completata con successo nel 95.3% (608/638) dei casi confermati e ha permesso di evidenziare una co-circolazione del genotipo D8 (443/608, 72.9%) e del B3 (159/608, 26.1%) (Figura 17). L'1% (6/608) dei campioni genotipizzati è risultato di genotipo A vaccinale, identificato in campioni provenienti da soggetti sottoposti a vaccinazione nelle due settimane precedenti all'esordio dei sintomi. L'individuazione del genotipo vaccinale permette di escludere il soggetto indagato come caso di morbillo. Solo l'analisi genotipica consente di escludere gli eventi avversi alla vaccinazione dalla definizione di caso.

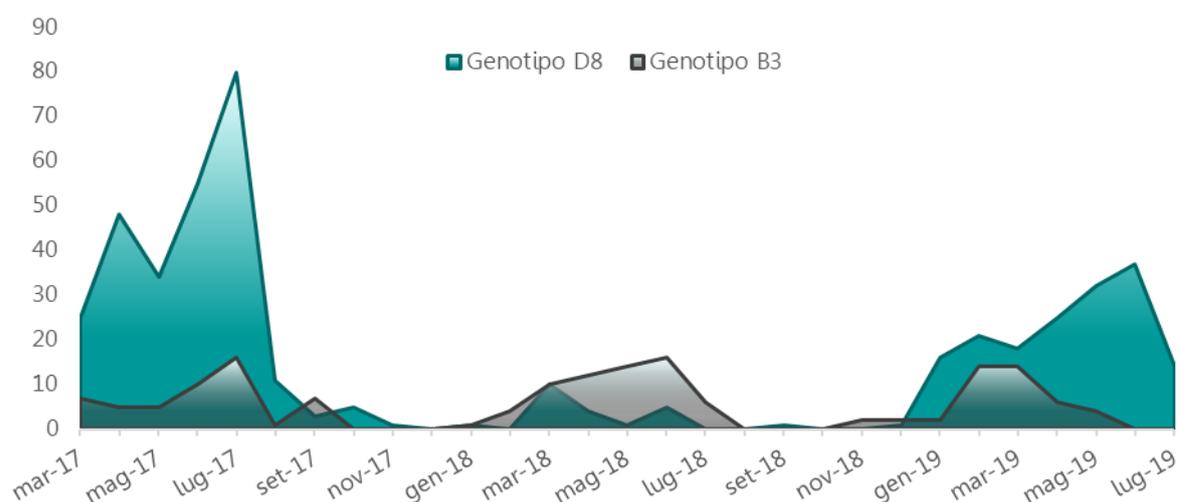


Figura 17 Distribuzione per mese di identificazione dei genotipi circolanti.

ANALISI INTRA-GENOTIPICA

L'albero filogenetico rappresentato in Figura 18 mostra l'analisi delle 602 sequenze N-450 identificate nel periodo in studio. Dall'albero è possibile identificare 16 varianti, di cui 8 particolarmente diffuse in più aree geografiche e già denominate dall'OMS (*WHO named strain*) e 8 non ancora classificate (*no-named strain*).

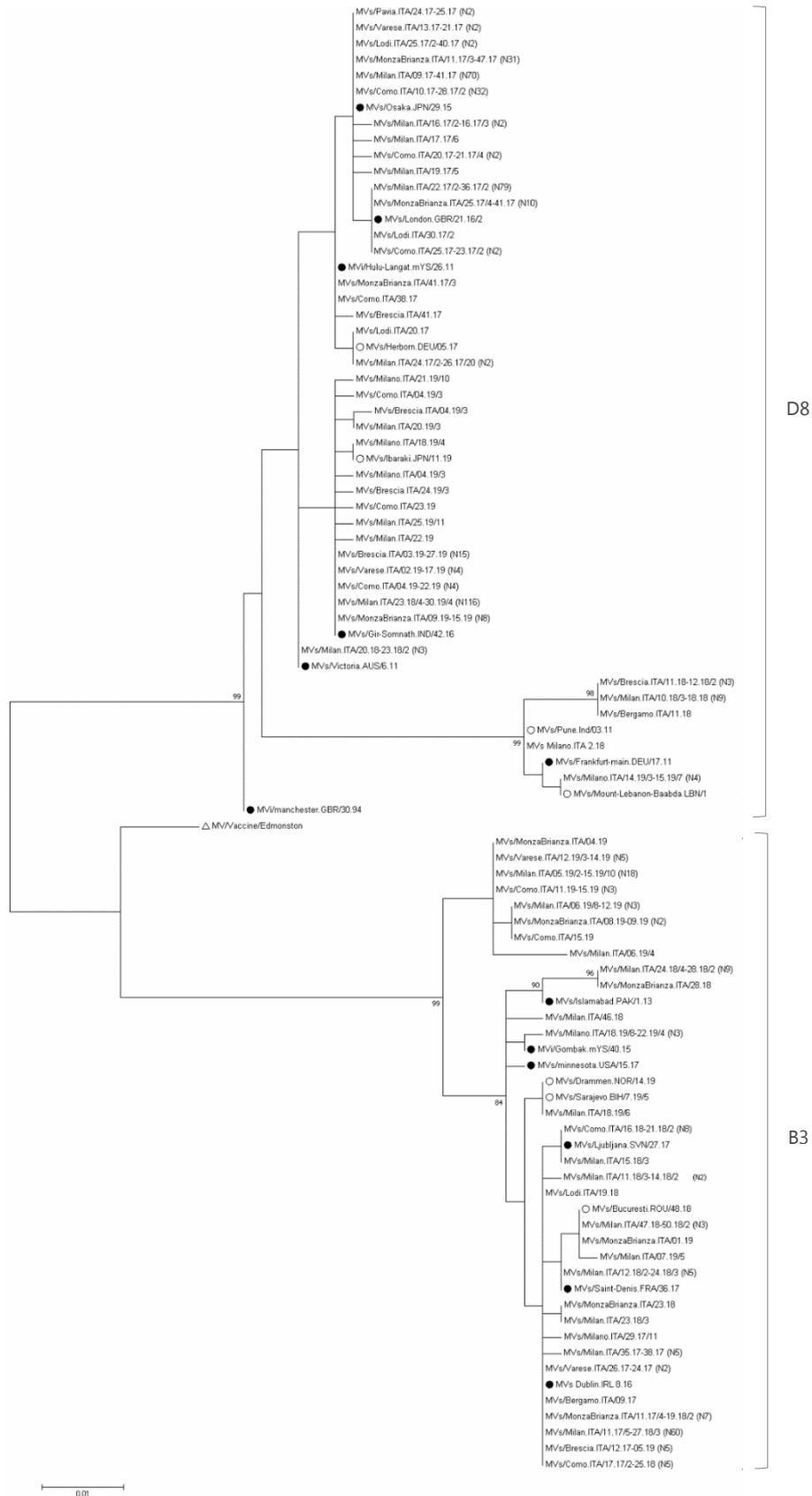


Figura 18 Albero filogenetico delle sequenze N-450 dei casi di morbillo identificati a Milano e aree limitrofe (marzo 2017-luglio 2019). Le *WHO named strain* sono rappresentate dai pallini neri, i ceppi identici a sequenze incluse nello studio sono rappresentate dai pallini bianchi, il ceppo vaccinale Edmonston è rappresentato dal triangolo bianco ed è stato utilizzato come *outgroup*. Metodo *Maximum Likelihood*, modello Kimura due parametri.

WHO NAMED STRAIN

In totale, nel periodo e nell'area in studio, sono state identificate 5 *WHO named strain* D8 (Mv/Osaka.JPN/29.15, Mvs/London.GBR/21.16/2, MVi/Hulu-Langat.MYS/26.11, MVs/Gir-Somnath.IND/42.16, Mvs/Victoria.AUS/6.18) e 3 *WHO named strain* B3 (MV/Dublin.IRL/8.16, MVs/Saint-Denis.FRA/36.17, Mvs/Ljubljana.SVN.27.17) (Tabella 5, Figura 18).

Tabella 5 Varianti classificate dall'OMS (*WHO named strain*) identificate a Milano e aree limitrofe, marzo 2017 -luglio 2019.

Genotipo	<i>Who named strain</i>	N identificazioni	Periodo (da a)	N Importazioni
D8	Mv/Osaka.JPN/ 29.15	146	Marzo 2017 Novembre 2017	0
	Mvs/London.GBR/21.16/2	94	Giugno 2017 Ottobre 2017	5
	MVi/Hulu-Langat.MYS/26.11	2	Settembre 2017 Ottobre 2017	1
	MVs/Gir-Somnath.IND/42.16	151	Giugno 2018 Luglio 2019	20
	Mvs/Victoria.AUS/6.18	3	Maggio 2018 Giugno 2018	1
B3	MV/Dublin.IRL/8.16	82	Marzo 2017- Settembre 2017 Gennaio 2019	11
	MVs/Saint-Denis.FRA/36.17	5	Marzo 2018 Giugno 2018	2
	Mvs/Ljubljana.SVN.27.17	9	Aprile 2018 Maggio 2018	1

La variante **D8-Osaka** è stata identificata per la prima volta a Osaka in Giappone nel luglio del 2015. A marzo 2017 è stata osservata per la prima volta a Milano (MV/Milan.ITA/09.17) e ha circolato nel territorio fino a novembre dello stesso anno (Mvs/MonzaBrianza.ITA/47.17). Tutte le 146 sequenze identiche a questa variante sono state identificate in casi che non avevano storie di viaggi e pertanto non sono state correlate ad eventi di importazione, risultando di conseguenza autoctone. Fra i casi notificati causati da questa variante 58 sono stati classificati come sporadici e 88 come coinvolti in 47 focolai.

La variante **D8-London** è stata identificata per la prima volta a Londra nel maggio 2016 (Mvs/London.GBR/21.16/2). La circolazione di questa variante nell'area in studio si è osservata da giugno (MV/Milan.ITA/22.17/2) a ottobre 2017 (MV/MonzaBrianza.ITA/41.17). L'indagine epidemiologica ha evidenziato 5 eventi di importazione da altre regioni italiane. Complessivamente, questa variante è stata riscontrata in 94 casi di cui 59 notificati come sporadici e 35 correlati a 20 focolai.

La variante **D8-Gir Somnath** è stata identificata in India a ottobre del 2016 ed è stata osservata per la prima volta a Milano a giugno del 2018 in 4 casi sporadici. Per 2 di questi casi l'indagine epidemiologica riportava evidenze di importazione dalla Gran Bretagna (MVs/Milano/25.18.5) e dalla Liguria (MVs/Milano.ITA/35.18). La stessa variante è ricomparsa nell'area in studio a gennaio del 2019, quando si sono osservati casi di rientro da viaggi nel sud Italia (Puglia e Campania) e in Olanda. La variante D8-Gir Somnath si è poi stabilmente inserita nel territorio, dove ha dato origine a 80 casi sporadici e 30 focolai, di cui alcuni nosocomiali. In totale sono state identificate, da gennaio a luglio 2019, 158 sequenze identiche alla D8-Gir Somnath, di cui 21 correlabili all'importazione da paesi esteri e da regioni italiane.

La variante **D8-Hulu-Langat** (MVi/Hulu-Langat.MYS/26.11), identificata per la prima volta in Malesia nel luglio 2011 e già descritta sul territorio nel 2014 in un caso sporadico senza alcuna storia di viaggio [322], è stata nuovamente osservata in due casi del 2017, di cui uno notificato come importato dal Sudafrica nel settembre 2017 (MVs/Como.ITA/38.17).

La variante **D8-Victoria** (Mvs/Victoria.AUS/6.18) è stata identificata in Australia nel febbraio del 2018 e ha circolato da maggio a giugno 2018 sul territorio in esame. La prima identificazione proveniva da un soggetto di ritorno da un viaggio in Thailandia (MVs/Milano.ITA/20.18), suggerendo l'introduzione di questo ceppo dall'Oriente. I casi associati a questa variante sono stati definiti tutti come sporadici.

La variante **B3-Dublino** è stata identificata per la prima volta in Irlanda a marzo del 2016 e ha circolato nel territorio da marzo 2017 (MVs/Bergamo.ITA/9.17) a settembre dello stesso anno (MVs/Milan.ITA/36.17). Nel gennaio 2018 si è osservata un'altra introduzione di questa variante (MVs/Milano.ITA/4.18), che ha poi dato nuovamente origine a numerosi casi di morbillo (36/100, 36.0%), fino a luglio (MVs/Milano.ITA/27.18/3). L'ultima osservazione della variante B3-Dublino nel territorio è stata a febbraio del 2019 (Mvs/Brescia.ITA/5.19) in un ragazzino di etnia Sinti.

La variante B3-Dublino è stata introdotta numerose volte nel territorio nel corso del periodo di osservazione. Nel 2017 sono state osservate introduzioni da diverse Regioni italiane (Puglia, Lazio, Piemonte) ed europee (Francia e Romania); nel corso del 2018 alcuni ceppi identici alla B3-Dublino sono stati importati dal Centro/Sud Italia (Lazio, Sicilia, Calabria). In totale sono state identificate 82 sequenze identiche alla B3-Dublino che hanno dato origine a 44 casi sporadici e 18 focolai.

La variante **B3-Saint Denis** (MVs/Saint-Denis.FRA/36.17), identificata per la prima volta in Francia nel settembre del 2017, è stata osservata da marzo a giugno 2018 ed è stata responsabile di 2 focolai legati all'importazione, uno dall'Egitto (MVs/Bergamo.ITA/21.18) e un caso di importazione associato a un focolaio verificatosi nella regione Lazio (MVs/Milano.ITA/12.18/2).

La variante **B3-Ljubljana** (Mvs/Ljubljana.SVN/27.17), identificata in Slovenia a luglio del 2017, è stata introdotta a Milano (aprile 2018) da un caso di importazione dalla Repubblica Ceca (MVs/Milano.ITA/15.18/3) ed è stata successivamente responsabile di 3 focolai e di 2 casi sporadici.

NO-NAMED STRAIN

Contemporaneamente alla circolazione di varianti predominanti a livello internazionale e pertanto classificate dall'OMS, 69 varianti, momentaneamente delineate come "*no-named strain*", hanno dato origine a eventi di trasmissione continua (Tabella 6). Di queste varianti, 20 erano di genotipo D8 e 49 di genotipo B3 (Figura 18).

In entrambi i genotipi alcune varianti erano strettamente correlate (100% identiche) a ceppi osservati in altre aree geografiche. Per le varianti di genotipo D8, 3 erano identiche alla MVs/Herborn.DEU/05.17, 13 alla Mvs/Liege.BEL/16.18/1 e 4 alla Mvs/Mount-Lebanon-Baabda.LBN/18.18/1. Per le varianti di genotipo B3, 4 erano identiche alla MVs/Bucaresti.ROU/48.18, mentre per le restanti 4 varianti *no-named* di genotipo B3 non si sono riscontrate altre osservazioni al di fuori del territorio indagato. Evidenze di importazione sono state stabilite grazie all'inchiesta epidemiologica (Tabella 6).

Tabella 6 Varianti non classificate dall'OMS (*no-named strain*) identificate a Milano e aree limitrofe tra marzo 2017 e luglio 2019.

Genotipo	<i>No-named strain</i> *	N identificazioni	Periodo (da a)	N importazioni
D8	MVs/Lodi.ITA/20.17	3	Maggio 2017 Giugno 2017	0
	MVs/Milan.ITA/10.18/3	13	Marzo 2018 Aprile 2018	2
	MVs/Milan.ITA/14.19/3	4	Aprile 2019	0
B3	MVs/Milan.ITA/35.17	5	Settembre 2017	0
	MVs/Milan.ITA/24.18/4	10	Giugno 2018 Luglio 2018	1
	MVs/Milan.ITA/47.18	4	Novembre 2018 Gennaio 2019	0
	MVs/Milan.ITA/18.19/8	3	Maggio 2019	2
	MVs/MonzaBrianza.ITA/4.19	27	Gennaio 2019 Aprile 2019	1

*si riporta solo il primo caso osservato per ogni *no-named strain*

Altre "no-named strain" sono state osservate sul territorio e hanno dato origine a casi sporadici o piccoli focolai familiari non propagandosi ulteriormente nella popolazione (Tabella 7, Figura 18).

L'inchiesta epidemiologica ha stabilito 10 ingressi da differenti aree geografiche per altrettanti ceppi, evidenziandone lo stato di importazione. In tre pazienti sono state identificate varianti provenienti dalla stessa area di importazione, in India (MVs/Pune.ITA/03.11), in Vietnam (Mvs/Ibaraki.JPN/11.19) e in Bosnia ed Erzegovina (MVs/Sarajevo.BIH/7.19/5).

Tabella 7 Varianti no-named strain che hanno dato origine a casi sporadici o piccoli focolai a Milano e aree limitrofe tra marzo 2017 e luglio 2019

Genotipo	No-named strain	N identificazioni	Importazione	Note
D8	MVs/Milan.ITA/13.17/1	2		Focolaio lavorativo
	MVs/Como.ITA/11.17			
	MVs/Milan.ITA/13.17/4	1		Sorgente non nota
	MVs/MonzaBrianza.ITA/14.17/1	1		Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/17.17/6	1		Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/19.17/5	1	Regno Unito	Sorgente non nota
	MVs/Como.ITA/20.17	2		Focolaio familiare
	MVs/Como.ITA/21.17/4			
	MVs/MonzaBrianza.ITA/20.17	1		Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/22.17	1		Sorgente non nota
	MVs/Brescia.ITA/41.17	1		Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/2.18	1	India	MVs/Pune.ITA/03.11
	MVs/Como.ITA/4.19/3	1	Myanmar	Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/4.19/3	1	Ucraina	Sorgente non nota
	MVs/Brescia.ITA/4.19/3	1	India	Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/18.19/4	1	Vietnam	Mvs/Ibaraki.JPN/11.19
	MVs/Milan.ITA/20.19/3	1		Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/21.19/10	1		Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/22.19	1		Sorgente non nota
	MVs/Como.ITA/23.19	1		Sorgente non nota
MVs/Brescia.ITA/24.19/3	1		Sorgente non nota	
MVs/Milan.ITA/25.19/11	1		Sorgente non nota	

B3	MVs/Milan.ITA/27.17/14	1		Sorgente non nota
	MVs/Varese.ITA/26.17	1		Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/29.17/11	1		Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/11.18/3			
	MVs/Milan.ITA/14.18/2	2		Focolaio lavorativo
	MVs/MonzaBrianza.ITA/23.18			
	MVs/Milan.ITA/23.18/3	2	Emilia-Romagna	Casi sporadici con area geografica sorgente in comune
	MVs/Milan.ITA/46.18	1	Bangladesh	Sorgente non nota
	MVs/MonzaBrianza.ITA/1.19	1		Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/6.19/4	1		Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/6.19/8	1		Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/7.19/5	1		Sorgente non nota
	MVs/MonzaBrianza.ITA/8.19			
	MVs/MonzaBrianza.ITA/9.19	2		Focolaio lavorativo
	MVs/Milan.ITA/12.19	1		Sorgente non nota
	MVs/Como.ITA/15.19	1		Sorgente non nota
	MVs/Milan.ITA/18.19/6	1	Bosnia ed Erzegovina	MVs/Sarajevo.BIH/7.19/5
	MVs/Milan.ITA/30.19/5	1		Sorgente non nota

In Figura 19 è possibile osservare l'andamento nel tempo delle diverse varianti che hanno dato origine ad eventi di trasmissione continua.

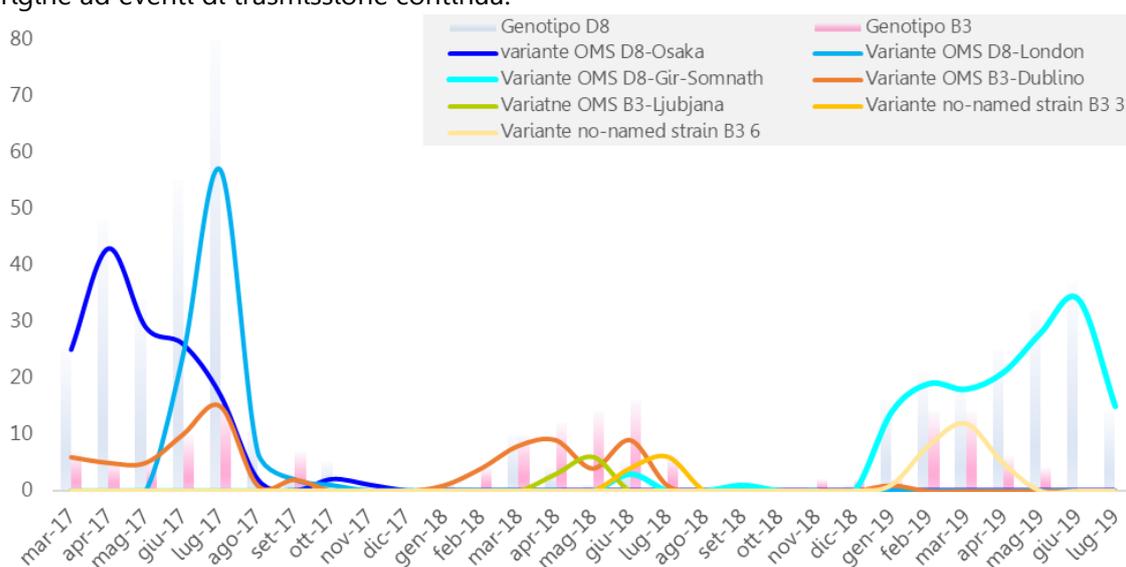


Figura 19 Andamento nel tempo delle varianti intra-genotipiche responsabili di eventi di trasmissione continua.

ANALISI GENOMICA PER LA CARATTERIZZAZIONE DI EVENTI EPIDEMICI

È stata approfondita l'analisi molecolare di ceppi correlati a importanti eventi epidemici (focolai nosocomiali e familiari) e a casi notificati come sporadici avvenuti a breve distanza geografica e temporale dai focolai. A tale scopo, sono stati selezionati 50 ceppi, di cui 21 appartenenti al genotipo D8 e 29 al genotipo B3. In particolare, questi ceppi appartenevano a 5 varianti intra-genotipiche: la *named strain* D8-Osaka, la *named strain* B3-Dublino, la *named strain* B3-Ljubljana, e le due *no-named strain* B3-MVs/Milano.ITA/24.18/4 e D8-MVs/Milano.ITA/17.18 (Tabella 8). I ceppi appartenenti a ogni variante risultavano 100% identici nella regione N-450.

Tabella 8 Ceppi esaminati attraverso l'analisi genomica suddivisi per variante intra-genotipica di appartenenza.

Nome variante genotipica e correlate	Nome ceppo	Note
D8 Osaka	MVs/Como.ITA/14.17/2	Focolaio familiare
	MVs/MonzaBrianza.ITA/12.17/2	
	MVs/Milan.ITA/24.17/2	Focolaio nosocomiale
	MVs/Milan.ITA/24.17/7	
	MVs/Milan.ITA/25.17/15	
	MVs/Milan.ITA/26.17/16	
	MVs/Milan.ITA/26.17/2	
	MVs/Milan.ITA/26.17/6	
	MVs/Milan.ITA/26.17/8	
	MVs/Milan.ITA/12.17/6	
MVs/Milan.ITA/27.17/19	Caso sporadico	
D8 no-named strain MVs/Milan.ITA/10.18/3	MVs/Brescia.ITA/11.18	Focolaio familiare
	MVs/Brescia.ITA/12.18/2	
	MVs/Milan.ITA/14.18/3	Focolaio familiare
	MVs/Brescia.ITA/11.18/2	Francia
	MVs/Milan.ITA/10.18/3	Caso sporadico
	MVs/Milan.ITA/10.18/4	Caso sporadico
	MVs/Milan.ITA/13.18	Caso sporadico
	MVs/Milan.ITA/15.18	Caso sporadico
	MVs/Milan.ITA/17.18	Emilia-Romagna
	MVs/Milan.ITA/18.18	Caso sporadico
B3 Dublino	MVs/Bergamo.ITA/9.17	Prima introduzione (Francia)
	MVs/Milan.ITA/10.18/2	Focolaio nosocomiale 1
	MVs/Milan.ITA/11.18	
	MVs/Milan.ITA/8.18/2	
	MVs/Milan.ITA/11.18/3	Focolaio nosocomiale 2
	MVs/Milan.ITA/13.18/2	
MVs/Milan.ITA/14.18/2		

	MVs/Milan.ITA/21.17/3	
	MVs/Milan.ITA/22.17/4	Focolaio nosocomiale 3
	MVs/Milan.ITA/23.17/3	
	MVs/Brescia.ITA/17.18	Focolaio familiare
	MVs/Brescia.ITA/12.17	Piemonte
	MVs/Milan.ITA/14.18	Caso sporadico
	MVs/Milan.ITA/15.18/4	Sicilia
	MVs/Milan.ITA/16.18	Caso sporadico
	MVs/Milan.ITA/23.17/4	Caso sporadico
	MVs/Milan.ITA/25.17/12	Caso sporadico
	MVs/Milan.ITA/26.17/3	Caso sporadico
	MVs/Milan.ITA/47.18	Focolaio lavorativo
	MVs/Como.ITA/16.18	Caso sporadico
B3 Ljubljana	MVs/Como.ITA/17.18	Caso sporadico
	MVs/Como.ITA/18.18/2	Caso sporadico
	MVs/Milan.ITA/15.18/3	Repubblica Ceca
	MVs/Milan.ITA/27.18/2	
	MVs/Milan.ITA/27.18/4	Focolaio comunitario
B3 no-named strain	MVs/Milan.ITA/28.18	
MVs/Milan.ITA/27.18	MVs/MonzaBrianza.ITA/28.18	
	MVs/Milan.ITA/28.18/2	Focolaio familiare
	MVs/Milan.ITA/27.18	Caso sporadico

I ceppi sono stati sottoposti a sequenziamento dell'intero gene H e successivamente l'analisi filogenetica è stata condotta sulle sequenze N-450 in combinazione a quelle del gene H (N-450/H, 2304 nucleotidi). In questo modo è stato possibile valutare l'eventuale variabilità genetica di ceppi 100% identici in N-450. In un secondo momento, tutti i ceppi sono stati sottoposti a sequenziamento dell'intero genoma (WGS) per definire la reale variabilità genetica tra i virus circolanti. Gli alberi filogenetici delle sequenze N-450, N-450/H e WGS sono raffigurati rispettivamente nelle Figure 20, 21 e 22.

Variante *named strain* D8-Osaka

- Le 11 sequenze *named strain* D8-Osaka hanno mostrato in N-450/H una similarità del 99.9-100%. La Figura 21 mostra l'albero filogenetico ed è interessante osservare che la variabilità riscontrata supporta quasi totalmente l'indagine epidemiologica. In particolare, le due sequenze identificate nel focolaio familiare (MVs/Como.ITA/14.17/2 e MVs/MonzaBrianza.ITA/12.17/2) risultano 100% identiche, la sequenza di uno dei due casi sporadici risulta differente dalle altre (MVs/Milan.ITA/12.17/6), tutte le sequenze appartenenti al focolaio nosocomiale e la sequenza identificata nell'altro caso sporadico (MVs/Milan.ITA/27.17/19) sono 100% identiche.
- Lo studio dell'intero genoma ha mostrato una similarità compresa tra 99.9-100%. L'analisi filogenetica conferma quanto suggerito da quella in N-450/H (Figura 22). Anche in questa analisi la sequenza del caso sporadico MVs/Milan.ITA/27.17/19 *clusterizza* con quelle del focolaio nosocomiale e, in particolare, viene strettamente correlata a una di esse, suggerendo una trasmissione diretta.

Variante *no-named strain* D8-MVs/Milano.ITA/17.18

- Le 10 sequenze in studio sono risultate 100% identiche in N-450/H, pertanto l'analisi filogenetica non ha fornito maggiori informazioni rispetto quella della sola regione N-450 e non supporta le informazioni emerse dall'indagine epidemiologica (Figura 21).
- All'analisi del WGS, le 10 sequenze mostravano una similarità compresa tra 99.9-100%. Nel dettaglio, le due sequenze del focolaio familiare *clusterizzano* separatamente rispetto alle altre (Figura 22). La sequenza MVs/Milan.ITA/18.18 identificata in un caso sporadico si separa dalle altre, mentre la variabilità riscontrata nelle restanti 7 sequenze identificate in diversi casi sporadici e in un focolaio familiare è ridotta (media di similarità 99.9%), ma non risultano 100% identiche. Quindi, a differenza di quanto emerso dalle analisi in N-450/H, l'indagine dell'intero genoma supporta quella epidemiologica.

Variante *named strain* B3-Dublino

- Le 19 sequenze mostravano una similarità compresa tra 99.6-100%. L'analisi filogenetica in N-450/H conferma in parte l'indagine epidemiologica (Figura 21): le sequenze identificate nel focolaio nosocomiale 1 sono risultate 100% identiche e strettamente correlate a quelle identificate nel focolaio nosocomiale 2 (avvenuto nella stessa area nello stesso periodo) e a un caso notificato a Milano nello stesso periodo come sporadico (MVs/Milan.ITA/14.18). Le sequenze identificate nel focolaio nosocomiale 3 (100% identiche) correlano con le sequenze identificate in tre casi notificati come sporadici a Milano nello stesso periodo. Le restanti sequenze si separano tutte una dall'altra (media di similarità 99.8%).

- Lo studio dell'intero genoma ha mostrato una similarità compresa tra 99.4-100%. L'analisi filogenetica dell'intero genoma conferma in gran parte l'analisi precedente, ma permette di separare una sequenza dal focolaio nosocomiale 1 (MVs/Milan.ITA/8.18/2) e una dal focolaio nosocomiale 2 (MVs/Milan.ITA/13.18/2), a suggerire l'appartenenza a catene di trasmissione differenti (Figura 22).

Variante *named strain* B3-Ljubljana

- Dall'analisi N-450/H, le 4 sequenze in studio risultano 100% identiche (Figura 21). Si tratta di 4 casi notificati come sporadici, di cui uno importato dalla Repubblica Ceca. Verosimilmente, fanno invece parte di un'unica catena di trasmissione.
- Lo studio dell'intero genoma mostra una similarità molto elevata delle 4 sequenze (99.9%). In particolare, dall'analisi filogenetica emerge una stretta correlazione tra il ceppo isolato a Milano importato dalla Repubblica Ceca e i primi due casi identificati a Como, che sembrerebbero pertanto casi direttamente correlati all'importazione (Figura 22). L'ultimo caso identificato a Como (MVs/Como.ITA/18.18/2) si separa leggermente (99.9%) dagli altri; il ceppo in questione potrebbe non far parte della stessa catena di trasmissione oppure potrebbe aver subito una mutazione.

Variante *no-named strain* B3-MVs/Milano.ITA/24.18/4

- Le 7 sequenze in studio sono risultate 100% identiche all'analisi N-450/H, che pertanto non ha fornito maggiori informazioni rispetto all'analisi della sola regione N-450 e non supporta ciò che è emerso dall'analisi epidemiologica (Figura 21).
- Lo studio dell'intero genoma ha mostrato una similarità compresa tra 99.2-100%. L'analisi filogenetica ha permesso di correlare le sequenze di Milano appartenenti al focolaio comunitario e la sequenza di Milano identificata nel focolaio familiare (MVs/Milan.ITA/28.18/2) (Figura 22). Si tratta quindi di ceppi che si possono ricondurre a un unico evento di trasmissione continua, mentre la sequenza identificata a Monza-Brianza non fa parte della stessa catena di trasmissione del focolaio comunitario. La sequenza MVs/Milan.ITA/27.18/2 identificata in un caso sporadico si distacca completamente da tutte le altre, a conferma di ciò che è emerso dall'indagine epidemiologica.



Figura 20 Albero filogenetico delle sequenze N-450 dei casi di morbillo selezionati nello studio. I ceppi correlati a focolai sono evidenziati da colori differenti. Metodo *Maximum Likelihood*, modello Kimura due parametri.

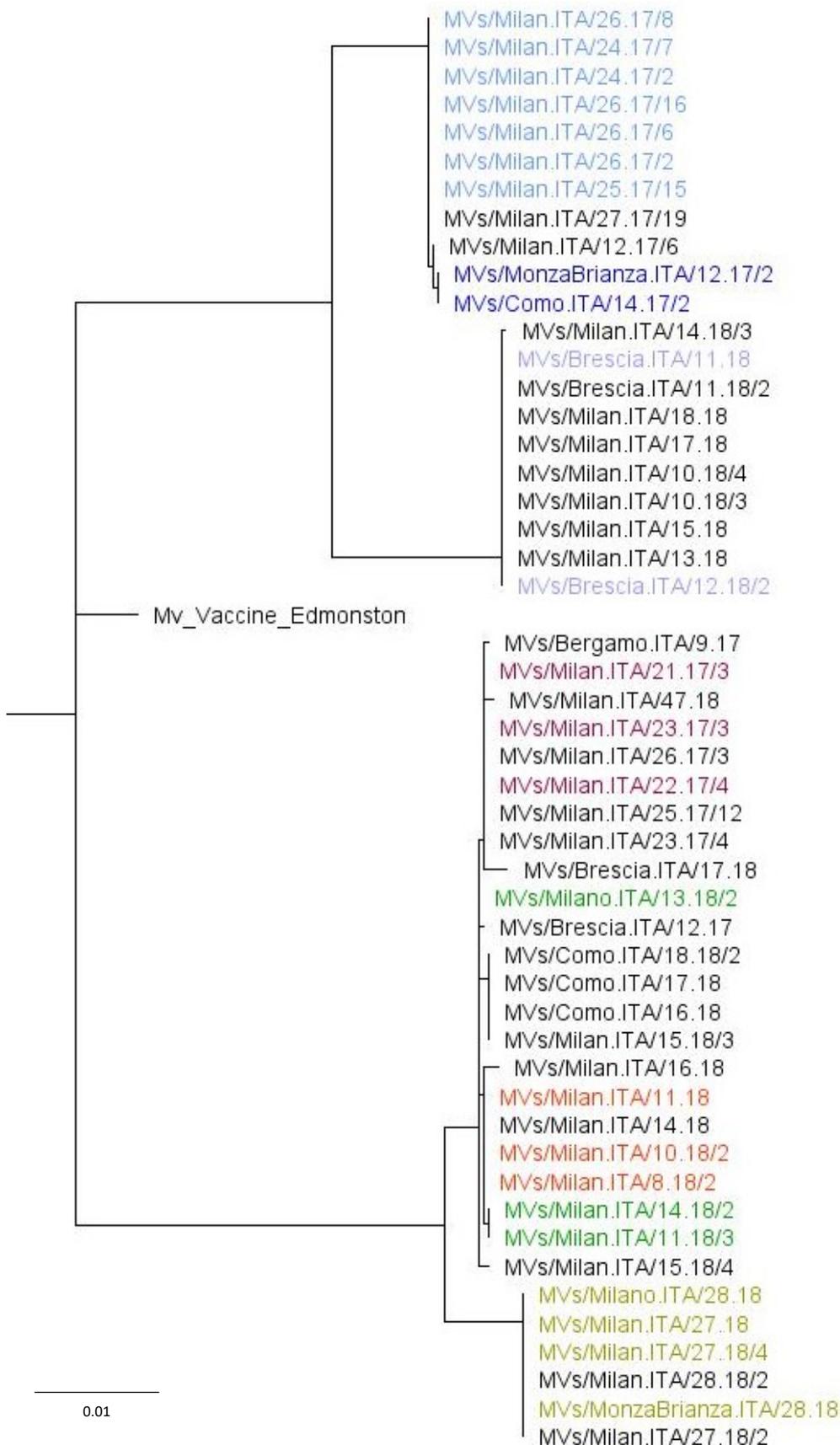


Figura 21 Albero filogenetico delle sequenze N-450/H dei casi di morbillo selezionati nello studio. I ceppi correlati a focolai sono evidenziati da colori differenti. Metodo *Maximum Likelihood*, modello Kimura due parametri.

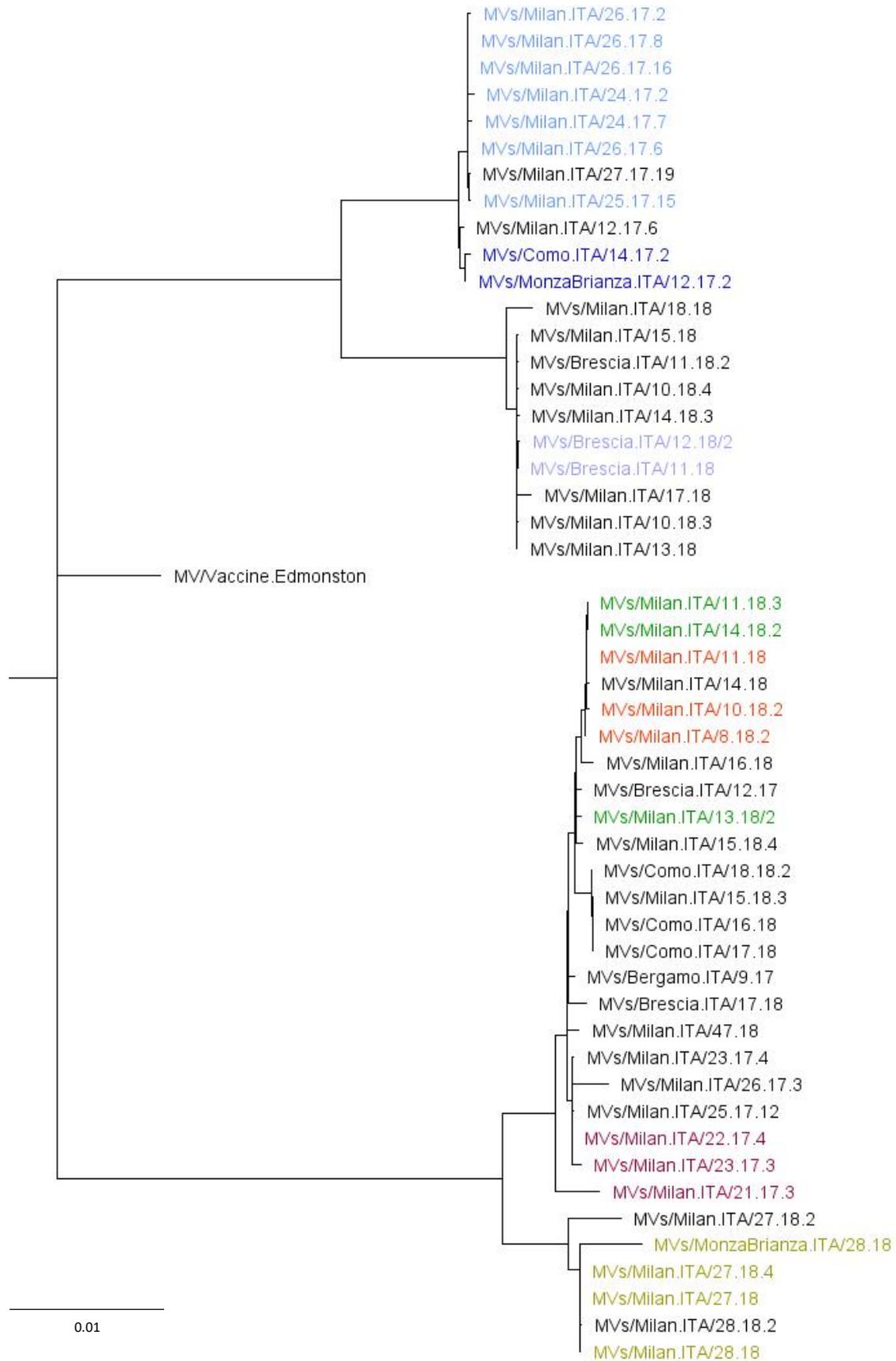


Figura 22 Albero filogenetico dell'intero genoma (WGS) dei casi di morbillo selezionati nello studio. I ceppi correlati a focolai sono evidenziati da colori differenti. Metodo *Maximum Likelihood*, modello Kimura due parametri.

STUDIO DEI CASI DI MORBILLO IN SOGGETTI VACCINATI

Da marzo 2017 a luglio 2019 complessivamente sono stati confermati 50 casi di morbillo in soggetti vaccinati. Di questi, 19 (19/331, 5.7%) sono stati confermati nell'arco del 2017, 10 (10/109, 9.2%) nel 2018 e 21 (21/217, 9.7%) nel 2019. Quindi, si è voluto indagare il fallimento vaccinale attraverso l'analisi del profilo sierologico dei casi vaccinati e lo studio delle mutazioni dell'emoagglutinina (H), proteina target principale degli anticorpi neutralizzanti.

PROFILO SIEROLOGICO DEI CASI VACCINATI

Il profilo sierologico è stato indagato per 33 (33/50, 66%) casi.

Il fallimento vaccinale è stato classificato secondo quanto riportato in letteratura:

- Fallimento primario: casi di morbillo confermati IgG-; è dovuto a una mancata risposta del sistema immunitario nei confronti del vaccino (*non-responder*).
- Fallimento secondario: casi di morbillo confermati IgG+ durante la fase acuta della malattia; è attribuibile a un declino degli anticorpi che rende il soggetto nuovamente suscettibile.

I risultati sono riassunti nella Tabella 9.

Tabella 9 Caratteristiche cliniche e demografiche dei 33 casi vaccinati identificati a Milano e aree limitrofe nel periodo in studio.

Caratteristiche demografiche e cliniche	Fallimento primario (IgG-) (N=6)	Fallimento secondario (IgG+) (N=27)
Età mediana (<i>range</i>)	30 (5-42)	18.5 (2-38)
Maschi, n/N (%)	3/6 (50)	11/27 (40.7)
Ospedalizzato	5/6 (83.3)	20/27 (74.1)
Caso indice di un focolaio	0/6	4/27
Vaccinato 2 dosi n/N (%)	3/6 (50)	14/27 (51.9)
Mediana anni dall'ultima dose (<i>range</i>)	19 (5-26)	14 (1-39)
Età mediana ultima dose (<i>range</i>)	12 (1-33)	6 (1-27)

Sei casi di morbillo (18.2%) sono stati associati al fallimento vaccinale primario (IgG-), mentre 27 (81.8%) sono stati identificati come fallimento vaccinale secondario. Nei due gruppi la gran parte dei casi ha richiesto ospedalizzazione o accesso al pronto soccorso. Per il 12.1% dei casi è stato possibile documentare la trasmissione dell'infezione a casi secondari (4/33, di cui tutti fallimenti secondari). I soggetti con fallimento primario avevano una età mediana più elevata, così come l'età mediana all'epoca della somministrazione dell'ultima dose di vaccino (12 anni) rispetto ai soggetti con fallimento secondario (6 anni).

STUDIO DELLE MUTAZIONI AMMINOACIDICHE DELLA PROTEINA H

Lo studio delle mutazioni amminoacidiche della proteina H è stato condotto su 23 ceppi appartenenti a soggetti vaccinati identificati nell'area di interesse tra marzo 2017 e luglio 2019. Diciotto erano di genotipo D8 e 5 di genotipo B3. In aggiunta, l'analisi è stata condotta anche su 64 casi non vaccinati, per un totale di 87 ceppi analizzati, 43 di genotipo D8 e 44 di genotipo B3. Per tutte le sequenze è stata condotta l'analisi amminoacidica. Ogni sequenza è stata confrontata con la sequenza di riferimento del genotipo.

In particolare, sono state studiate le mutazioni in siti vincolanti della struttura proteica e i siti funzionali, ovvero i residui di cisteina, i siti di glicosilazione e i siti immunoepitopici (Tabella 10).

Tabella 10 Sostituzioni aminoacidiche a livello di siti funzionali, di legame e immunoepitopici della proteina H di ceppi di morbillo identificati a Milano e aree limitrofe nel periodo in studio. In rosso i ceppi di casi vaccinati.

Domini	Posizione degli aa critici	Mutazioni trovate	Ceppi
Siti funzionali			
Residui di cisteina	139, 154, 188, 287, 300, 381, 386, 394, 494, 570, 579, 583, 606	-	-
Siti di glicosilazione	168, 187, 200, 215	-	-
Siti di legame col recettore			
SLAM	505, 507, 524, 529-531, 533, 545, 552-554	-	-
Nectin-4	482, 483, 497, 541, 543, 544	-	-
CD46	451, 464, 481, 488, 500, 526, 546	-	-
Siti immunoepitopici			
Receptor-binding epitope	187, 190, 483, 505-507, 524, 526, 529-531, 533, 541, 543-547, 552	-	-
Neutralizing epitope	235, 244-250	L247S	MVs/Como.ITA/17.17/2 MVs/MonzaBrianza.ITA/12.17/2 MVs/Como.ITA/14.17/2 MVs/Como.ITA/14.17/4 MVs/Milan.ITA/12.17/6 MVs/MonzaBrianza.ITA/15.17/5 MVs/Milan.ITA/12.17/1
		P247S	MVs/Milan.ITA/14.18/3 MVs/Milan.ITA/17.18 MVs/Milan.ITA/15.18 MVs/Brescia.ITA/12.18/2 MVs/Milan.ITA/18.18 MVs/Milan.ITA/10.18/4 MVs/Milan.ITA/13.18 MVs/Brescia.ITA/11.18/2 MVs/Brescia.ITA/11.18
Loop epitope	309-318	-	-
Hemagglutinin noose epitope	379-400	A400V	MVs/Milan.ITA/16.18
Sugar-shielded epitope	473-477, 491	-	-
Epitopo non classificato ma riconosciuto come tale	190-200, 302, 377, 378, 488, 571-579	A192T	MVs/Milan.ITA/27.18/4 MVs/Milan.ITA/28.18 MVs/Milan.ITA/28.18/2 MVs/MonzaBrianza.ITA/28.18 MVs/Milan.ITA/27.18 MVs/Milan.ITA/27.18/2 MVs/Milan.ITA/26.18 MVs/Milan.ITA/4.19
		Q575K	MVs/MonzaBrianza.ITA/9.19 MVs/Varese.ITA/12.19/6 MVs/Milan.ITA/5.19/2 MVs/Milan.ITA/6.19/7 MVs/Varese.ITA/12.19/3

Mutazione L247S: sette sequenze appartenenti alla variante D8-Osaka avevano una sostituzione dell'aminoacido serina in posizione 247 con l'aminoacido leucina. Di queste, 3 sequenze (42.9%) appartenevano a ceppi di soggetti vaccinati. Il 13.0% (3/23) delle sequenze di ceppi appartenenti a soggetti vaccinati presentavano tale mutazione.

La serina (S) è un aminoacido polare e di piccole dimensioni. Può essere sostituita da altri aminoacidi con le stesse caratteristiche chimiche, come in particolare la treonina, che differisce solo per un gruppo metilico al posto di un gruppo idrogeno. La serina è abbastanza comune nei centri funzionali proteici e le sue piccole dimensioni le consentono di risiedere comunemente all'interno di giri stretti della conformazione della proteina, a livello di superficie, dove spesso permette la formazione di un legame idrogeno con la struttura portante della proteina stessa (lavoro solitamente svolto dalla prolina). La leucina (L) è un aminoacido idrofobico e di piccole dimensioni e per questo motivo è spesso presente in siti interni della proteina. La sua catena laterale non è reattiva e quindi raramente è direttamente coinvolta in funzioni proteiche metaboliche (come la catalisi), ma può svolgere un ruolo nel riconoscimento del substrato. In particolare, come tutti gli aminoacidi idrofobici, può essere coinvolto nel legame/riconoscimento di ligandi idrofobici come i lipidi.

Mutazione P247S: questa mutazione è stata trovata in 10 sequenze della variante *no-named strain* MVs/Milan.ITA/10.18/3-D8, di cui 2 (20.0%) appartenenti a soggetti vaccinati. La mutazione P247S è stata osservata nell'8.7% (2/23).

La prolina (P) è un aminoacido idrofobico di piccole dimensioni, a volte può sostituire altri piccoli aminoacidi, anche se in maniera non del tutto efficiente. La sua particolare composizione le impedisce di occupare molte delle conformazioni assunte dalla proteina, facilmente adottate da tutti gli altri aminoacidi, ma si trova spesso in curve molto strette, dove la catena dei polipeptidi deve cambiare direzione. La difficoltà nell'adottare diverse posizioni e le proprietà poco reattive pongono questo aminoacido in siti proteici poco significativi o vincolanti.

Mutazione A400V: un ceppo appartenente alla variante B3-Dublino presentava l'aminoacido valina (V) in posizione 400 sostituito con un aminoacido alanina (A). Nessun soggetto vaccinato presentava questa mutazione.

La valina ha proprietà molto simili alla leucina, è infatti un aminoacido idrofobico e di piccole dimensioni, con funzioni analoghe. L'alanina, piccolo e idrofobico, non possiede particolari proprietà e per questo motivo è spesso presente in contesti considerati non critici.

Mutazione A192T: la posizione 192 presentava una mutazione in sette sequenze della variante *no-named strain* MVs/Milan.ITA/24.18/4-B3, di cui una di un soggetto vaccinato, in cui era presente una alanina in sostituzione alla treonina (T).

La treonina è polare e di piccole dimensioni; può essere sostituita da altri aminoacidi polari, in particolare dalla serina. Essendo un aminoacido abbastanza indifferente dal punto di vista chimico, la treonina può risiedere sia all'interno che sulla superficie proteica. Il gruppo idrossile è abbastanza reattivo, essendo in grado di formare legami di idrogeno con una varietà di substrati polari, e per questo motivo è abbastanza comune nei centri funzionali proteici.

Mutazione Q575K: la mutazione Q575K è stata trovata in 4 sequenze di genotipo B3 appartenenti alla variante *no-named strain* MVs/MonzaBrianza.ITA/9.19, in una sequenza correlata a essa e appartenente a un focolaio lavorativo (MVs/MonzaBrianza.ITA/9.19) e in una sequenza della variante D8-Gir Somnath di un soggetto vaccinato.

La lisina (K) è un aminoacido a carica positiva e svolge spesso un ruolo importante nel mantenimento della struttura proteica. Inoltre, è spesso presente in siti proteici attivi o vincolanti. Anche la glutammina (Q), un aminoacido polare, è molto spesso coinvolto in siti proteici attivi o vincolanti, in quanto la catena laterale polare interagisce con altri atomi polari o carichi.

CONCLUSIONI

Il *Global Measles and Rubella Strategic Plan 2012–2020* ha posto come obiettivo l'eliminazione del morbillo e della rosolia in almeno 5 regioni dell'OMS entro la fine del 2020 [274]. La trasmissione endemica del morbillo è tale quando una variante virale circola in maniera continuativa per un anno o più in un'area geografica definita, mentre la sua eliminazione all'interno di un Paese è verificata quando la trasmissione endemica si è interrotta per almeno 36 mesi [323]. Pertanto, per dimostrare l'interruzione della circolazione all'interno del proprio territorio, i paesi devono essere in grado di distinguere le trasmissioni endemiche dai casi importati. Un sistema di sorveglianza sensibile e di qualità è dunque fondamentale per raggiungere e dimostrare l'eliminazione del morbillo. La sorveglianza del morbillo deve essere supportata dall'indagine molecolare, importante e indispensabile strumento per ottenere informazioni sul genotipo e sulle varianti intra-genotipiche e caratterizzare i ceppi circolanti.

L'integrazione dei dati molecolari con quelli epidemiologici è quindi utilizzata per monitorare il processo di eliminazione, documentarne la progressione e infine dimostrare che l'interruzione della trasmissione di ceppi endemici sia stata raggiunta e venga mantenuta.

Su tali presupposti è stata istituita una rete di laboratori accreditati *WHO Global Measles and Rubella Laboratory Network* (GMRLN) [229]. In Italia, la rete di laboratori accreditati OMS per la sorveglianza del morbillo è stata istituita nel 2017; è denominata MoRoNET (Morbillo e Rosolia NETwork) ed è formata da 14 laboratori sub-nazionali e da un laboratorio nazionale con sede presso l'Istituto Superiore di Sanità. Il laboratorio del Centro di Ricerca Coordinata "EpiSoMI" (Epidemiologia e Sorveglianza Molecolare delle Infezioni) dell'Università degli Studi di Milano, dove è stato svolto il presente lavoro di tesi, fa parte della rete MoRoNET ed è il laboratorio di riferimento per la sorveglianza integrata di morbillo e rosolia della regione Lombardia.

In Europa, dal 2016 si è vista una drammatica ripresa del morbillo rispetto agli anni precedenti. Il numero dei casi di morbillo è quadruplicato nel 2017 e nel 2018 e nei primi sei mesi del 2019 sono stati notificati più di 100 decessi [324]. La Commissione Regionale per la Verifica della Eliminazione, riunita nel giugno 2019, ha concluso che 12 paesi sono rimasti endemici e in 4, che avevano precedentemente raggiunto l'eliminazione, è stata ristabilita la trasmissione endemica. L'Italia è uno dei 12 paesi europei ancora endemici [254]. Nel 2017 si è assistito a una grande epidemia di morbillo che ha coinvolto circa 5.000 casi e la Lombardia è stata una delle 8 regioni con maggior notifiche [325]. Inoltre, insieme a Lazio ed Emilia-Romagna, è stata la regione che ha segnalato il maggior numero di casi di morbillo anche nei primi sei mesi del 2019 [324].

Nel presente lavoro di tesi vengono riportati i dati della sorveglianza del morbillo a Milano e nelle aree limitrofe dalla istituzione della rete MoRoNET (marzo 2017) a luglio 2019.

La sorveglianza del morbillo in Lombardia prevede che per tutti i casi sospetti segnalati dalle autorità mediche competenti venga compilata la scheda di notifica e successivamente vengano inseriti i dati nel database regionale delle malattie infettive (MAINF) da parte delle ATS. I dati di MAINF vengono infine inviati al centro di riferimento nazionale presso gli ISS. Inoltre, oltre alla segnalazione del caso è necessario procedere, come da circolare regionale (01-03-2017 Regione Lombardia, Decreto n° 2131), alla raccolta di campioni biologici e al relativo invio al laboratorio di riferimento regionale per la conferma virologica.

Complessivamente, tra marzo 2017 e luglio 2019 sono pervenuti al laboratorio 885 casi sospetti di morbillo, di cui il 74.2% è stato confermato. L'87.8% dei casi è stato segnalato da strutture ospedaliere (ASST), indicando che la maggior parte dei casi è dovuta ricorrere all'accesso al pronto soccorso e/o all'ospedalizzazione con una clinica piuttosto severa.

Il confronto del database del laboratorio EpiSoMi con quello della regione Lombardia MAINF ha permesso di evidenziare che per il 10.9% dei casi sospetti di morbillo non è stato completato l'iter di notifica. La sotto-notifica dei casi influisce sulla sensibilità del sistema di sorveglianza e incide negativamente sugli indicatori di *performance* richiesti dall'OMS [312].

Il maggior numero dei casi è stato confermato nel 2017 (50.4%). In quell'anno anche a Milano, come nel resto di Italia, si è osservata la presenza di due picchi epidemici nei mesi di aprile e luglio [324]. Il 2018 è stato l'anno con il minor numero di casi confermati (16.6%) come atteso, in quanto l'epidemia dell'anno precedente ha contribuito a diminuire il numero di soggetti suscettibili alla malattia. Il restante 33.0% di casi confermati è stato registrato nei primi sette mesi del 2019. In tutti e tre gli anni in studio, il maggior numero di casi di morbillo si è verificato nei periodi primaverili ed estivi, quando le probabilità di contatto negli ambienti pubblici e comunitari affollati sono più elevate per via del cambiamento delle abitudini sociali [227].

Le fasce d'età più colpite sono state quelle dei giovani tra i 15 e i 39 anni (63.0%) e degli adulti over-39 anni (21.5%), dato che si è confermato per tutti e tre gli anni esaminati e che rispecchia l'andamento nazionale. Tuttavia, in Italia, l'incidenza maggiore si ha nei bambini al di sotto dell'anno di età, non vaccinati per motivi anagrafici.

La consultazione del database regionale MAINF ha permesso di classificare i casi confermati come sporadici o appartenenti a focolai. Molti dei casi confermati sono stati notificati come sporadici (57.4%), mentre il 42.7% è stato correlato a un focolaio. Il 9.7% dei casi confermati si trovava fuori dal territorio in esame durante il periodo di incubazione della malattia (7-23 giorni prima della comparsa dei sintomi). In questo modo è stato possibile definire l'importazione dell'infezione, sia dall'estero (44.3% dei casi importati) che da altre regioni italiane (55.7% dei casi importati).

Sono state applicate tecniche molecolari e bioinformatiche innovative per studiare il profilo epidemiologico-molecolare dei ceppi circolanti, indagare i focolai e i casi sporadici e caratterizzare le rotte di trasmissione delle varianti virali.

La caratterizzazione genotipica mediante sequenziamento della regione N-450 di *Morbillivirus* è stata completata con successo per il 95.3% dei casi confermati. È stato possibile evidenziare la costante co-circolazione di due genotipi, il D8 (72.9%) e il B3 (26.1%).

Il genotipo D8 origina dal subcontinente indiano, mentre il genotipo B3 da quello africano; entrambi sono stati ampiamente importati in Europa negli anni passati, dove hanno sostituito definitivamente i genotipi autoctoni C2 e D6 [255]. In Italia, l'attuale profilo epidemiologico e genotipico vede la predominante presenza dei genotipi D8 e B3. In particolare, i due genotipi co-circolano, con prevalenza del genotipo B3 nel Nord Italia [309].

I genotipi assumono uno specifico *pattern* di distribuzione a seconda del progresso dello stato di eliminazione della malattia. Nei paesi come l'Europa Occidentale caratterizzati da coperture vaccinali non ottimali, la continua reintroduzione del morbillo causa epidemie d'intensità moderata sostenute da pochi genotipi (in relazione alla sorgente di introduzione), di cui uno è predominante ed è caratterizzato da varianti multiple [10].

L'analisi intra-genotipica condotta nel presente lavoro di tesi ha permesso di identificare complessivamente 16 varianti virali, di cui 4 predominanti. A eccezione della variante *named strain* B3-Dublino, le altre varianti maggiormente diffuse (*named strain* Osaka, *named strain* London e *named strain* Gir Somnath) appartenevano al genotipo D8, che è risultato predominante nell'area in studio. L'analisi filogenetica ha dimostrato un'alta variabilità intra-genotipica sia per il genotipo D8 che per il B3; ciò conferma il *pattern* tipico nelle aree caratterizzate da un abbassamento delle coperture vaccinali e un aumento dei soggetti suscettibili alla malattia.

La *named strain* D8-Osaka e la *named strain* B3-Dublino sono state le varianti responsabili dei picchi epidemici avvenuti nel 2017. La prima ha circolato tra febbraio e novembre del 2017 ed è stata responsabile del picco epidemico nell'aprile 2017, associata a un vasto focolaio nosocomiale. È stata isolata in varie regioni italiane (Lazio, Piemonte, Emilia-Romagna, Toscana e Lombardia) dove ha causato diversi decessi. A Milano è stata correlata al decesso per *distress* respiratorio di un bambino leucemico di 6 anni (giugno 2017) e al decesso per encefalite tardiva di un ragazzo di 27 anni trapiantato.

La *named strain* B3-Dublino è stata responsabile di una importante epidemia in Romania tra il 2016 e il 2017, diffondendosi poi in altri paesi europei [326]. In Italia è stata definita endemica, dal momento che ha circolato sul territorio per più di 12 mesi. A Milano è stato possibile documentare diverse importazioni di questa variante che ha di fatto sostituito, da marzo 2017, la variante autoctona *named strain* B3-Como che circolava sul territorio da agosto 2015 [309].

Essa è stata responsabile del secondo picco epidemico del 2017. È importante sottolineare che le varianti D8-Osaka e B3-Dublino sono state associate a 12 focolai nosocomiali che hanno probabilmente facilitato la loro diffusione nella comunità [225, 327].

La *named strain* D8-Gir Somnath è stata identificata per la prima volta in India a ottobre del 2016 ed è ora la variante del genotipo D8 più diffusa in tutto il mondo [310, 328-330]. La prima identificazione a Milano è stata a giugno del 2018 in 4 casi sporadici, per poi inserirsi stabilmente nel 2019, dove ha dato origine a 80 casi notificati come sporadici e 30 focolai, alcuni dei quali nosocomiali.

Contemporaneamente alla circolazione di varianti predominanti a livello mondiale e già classificate dall'OMS, si è osservata la circolazione di nuove varianti (*no-named strain*). Di queste, 20 erano di genotipo D8 e 49 di genotipo B3. Molte sono state osservate solo in casi sporadici o all'interno di piccoli focolai familiari, mentre altre hanno dato origine a eventi di trasmissione continua, di cui la più numerosa, importata dall'Etiopia, appartiene al genotipo B3 (*no-named strain* MVs/MonzaBrianza.ITA/4.19), osservata tra gennaio e aprile del 2019 e responsabile di un focolaio nosocomiale.

L'analisi filogenetica della regione N-450 ha evidenziato che molti casi notificati come sporadici sono in realtà 100% identici. La diffusione ubiquitaria di un numero ristretto di varianti limita l'informazione data dall'analisi filogenetica della regione N-450 e rende complessa la ricostruzione delle rotte di trasmissione e la caratterizzazione dei focolai epidemici. Infatti, una sorveglianza globale ben condotta permette di documentare la progressiva diminuzione dei casi di morbillo e la continua riduzione dei genotipi e delle varianti circolanti [255]. Inoltre, poiché le varianti possono circolare per diversi anni in più aree geografiche, l'analisi della regione N-450 può risultare non sufficiente a distinguere ceppi endemici da ceppi importati.

Dal momento che tale distinzione è fondamentale per verificare l'eliminazione della malattia, è importante mettere in atto nuove strategie metodologiche per ampliare la "finestra di sequenziamento". Ciò permette di implementare la sorveglianza molecolare e ottenere una risoluzione più elevata delle rotte di trasmissione e identificare tutte le sorgenti di infezione.

Una strategia è stata quella di sviluppare il sequenziamento e l'analisi filogenetica di una regione di più di 2000 nucleotidi, comprendente l'N-450 e tutto il gene H (N-450/H). Questa metodologia è stata quindi applicata per l'analisi di un gruppo rappresentativo di ceppi virali circolanti sul territorio in studio (N=50) appartenenti a 5 varianti: la *named strain* D8-Osaka, la *named strain* B3-Dublino, la *named strain* B3-Ljubljana e le due *no named strain* B3-MVs/Milano.ITA/24.18/4 e D8-MVs/Milano.ITA/17.18. Ciò ha reso possibile valutare l'eventuale variabilità genetica (intra-variante) di ceppi 100% identici in N-450.

L'analisi filogenetica della regione N-450/H ha permesso di osservare che sequenze tra loro identiche nella sola regione N-450 formavano dei *cluster* e altre invece risultavano non strettamente correlate, separandosi dalle altre sequenze. Complessivamente, l'analisi filogenetica ha quasi totalmente confermato l'indagine epidemiologica per 4 varianti. Solo per la variante *no named strain* B3-MVs/Milano.ITA/24.18/4 le sequenze in N-450/H sono risultate 100% identiche e non è stato possibile osservare differenze tra i ceppi correlati al focolaio comunitario, a quello familiare e al caso sporadico.

Idealmente, la finestra di sequenziamento ottimale è data dal sequenziamento dell'intero genoma (WGS) [331]. Pertanto, una seconda strategia è stata quella di sviluppare l'analisi del WGS e applicarla sugli stessi ceppi analizzati in N-450/H. L'analisi filogenetica ha confermato i dati ottenuti in N-450/H, mostrando la presenza degli stessi *cluster*, ma raggiungendo un maggior *match* con l'indagine epidemiologica. Infatti, rispetto alla precedente analisi, ha permesso di escludere all'interno della variante *no named strain* B3-MVs/Milano.ITA/24.18/4 un caso (ceppo identificato nella provincia di Monza Brianza) precedentemente incluso nel focolaio comunitario (tutte sequenze identificate a Milano). Analogamente, è stato possibile osservare la non correlazione genetica di un caso importato da Cremona con le sequenze appartenenti alla stessa variante identificate a Milano. L'analisi del WGS è stata sensibile nel delineare le singole catene di trasmissione. In particolare, ha confermato la similarità delle sequenze appartenenti alla variante *named strain* B3-Ljubljana identificate in 4 casi tutti notificati come sporadici, solo uno dei quali di importazione dalla Repubblica Ceca. È stato possibile quindi collegare i casi in un unico *cluster* correlato all'importazione. L'ultima sequenza (in ordine di tempo) differisce dalle altre (similarità 99.9%), a suggerire una mutazione alla fine della catena di trasmissione.

Inoltre, l'analisi dell'intero genoma ha evidenziato la stretta correlazione tra casi che si sono verificati nella stessa area e nelle stesse settimane, ma che sono stati notificati come sporadici, in quanto senza chiari *link* epidemiologici. Nonostante il WGS fornisca la completa caratterizzazione dei ceppi virali risulta essere una metodologia estremamente indaginosa. Per ottenere la sequenza completa dell'intero genoma è necessario un arricchimento dei campioni prima della preparazione della libreria per il *Next Generation Sequencing* (NGS). L'amplificazione tramite PCR è la scelta prevalente per l'arricchimento, tuttavia la lunghezza dell'intero genoma (quasi 16.000 nucleotidi) richiede l'amplificazione di regioni sovrapposte di dimensioni tali da consentire un'elevata sensibilità per il successivo step di sequenziamento. A tale scopo vengono utilizzati almeno 16-20 *primer*, risultando in un lavoro lento, costoso e laborioso. Per questi motivi, l'analisi del WGS non può essere utilizzata *routinariamente* per il monitoraggio del programma di eliminazione. Potrebbe risultare invece la strategia ottimale per i paesi che abbiano già raggiunto o si stanno avvicinando all'eliminazione del morbillo, dove è necessario verificare l'introduzione solo di pochi ceppi virali.

La letteratura suggerisce alternative al sequenziamento dell'intero genoma, come il sequenziamento della regione non codificante situata tra i geni M e F, che sembra in grado di fornire informazioni più complete subito dopo il WGS. Essa è infatti la regione più variabile dell'intero genoma ed è facilmente sequenziabile tramite la tecnologia Sanger [321]. Tuttavia, sono necessarie ulteriori analisi per stimare il tasso di sostituzione nucleotidica di questa regione e capire se risulta adeguato come strumento ausiliario per la caratterizzazione delle epidemie [321]. Se infatti il tasso di mutazione risultasse essere troppo elevato, il rischio potrebbe essere quello di escludere casi appartenenti a uno stesso focolaio.

I risultati ottenuti nel corso dei 3 anni di dottorato sui ceppi coinvolti in importanti eventi epidemici a Milano e nelle aree limitrofe, suggeriscono che l'analisi del costrutto N-450/H possa essere considerata una valida strategia di implementazione della sorveglianza molecolare in questa fase del programma di eliminazione.

Secondo i dati di copertura vaccinale dell'OMS e dell'UNICEF pubblicati nel luglio 2019, l'86% dei bambini ha ricevuto la prima dose di vaccino contro il morbillo e il 69% la seconda dose. Ciò significa che circa 20 milioni di bambini nel 2018 non hanno ricevuto alcun vaccino contro il morbillo attraverso i programmi di vaccinazione di *routine* [188].

In Europa, negli anni più recenti si è avuto un *trend* decrescente nel numero di paesi con una copertura vaccinale del 95% (per 2 dosi), passando da 14 paesi nel 2007 a solo 4 (Ungheria, Portogallo, Slovacchia e Svezia) nel 2017 [248]. È stato inoltre stimato che più di 4 milioni e mezzo di persone eleggibili alla vaccinazione non siano immuni al morbillo. Questa stima aumenta se si considerano i bambini troppo piccoli per esser vaccinati (ma troppo grandi per essere ancora protetti dagli anticorpi materni) e gli adulti nati prima del 1999.

In Italia, dal 2007 al 2017, la copertura vaccinale contro il morbillo è rimasta sotto il 90%. Con l'introduzione dell'obbligo vaccinale per l'ingresso nelle scuole (Decreto-legge del 7 giugno 2017) le coperture sono aumentate fino a raggiungere valori intorno al 93% [189].

Sulla base di studi clinici [332, 333], il titolo sierico di anticorpi IgG è indicativo della suscettibilità dell'individuo: livelli anticorpali inferiori di 8mIU/mL indicano una suscettibilità sia all'infezione sia allo sviluppo della malattia; un titolo anticorpale compreso tra 8 e 120mIU/mL indica una probabile suscettibilità all'infezione e alla malattia; livelli anticorpali compresi tra 121 e 900 mIU/mL indicano una potenziale suscettibilità all'infezione, ma non allo sviluppo della malattia; infine, un elevato titolo anticorpale, superiore a 900 mIU/mL, protegge sia dall'infezione che dalla malattia. Oggi, l'OMS riconosce come protettivi nei confronti della malattia titoli anticorpali al di sopra di 120 mIU/mL [178].

Il raggiungimento della copertura immunitaria adeguata per l'eliminazione del morbillo può essere ostacolato dai fallimenti vaccinali, come per esempio il fallimento nel raggiungere o mantenere una risposta immune protettiva, anche in seguito al ricevimento di 2 dosi di vaccino [198, 199]. Ciò contribuisce all'accumulo di individui suscettibili e l'insorgenza di focolai epidemici [200, 201].

Il fallimento primario della vaccinazione si verifica quando un individuo vaccinato non sviluppa una risposta immunitaria protettiva dopo l'immunizzazione. Il fallimento secondario invece si verifica quando un individuo sviluppa una risposta immunitaria protettiva dopo la vaccinazione, ma non rimane protetto nel tempo dalla successiva infezione al momento dell'esposizione col virus. Dalla letteratura si evince infatti che dal 2 al 10% dei soggetti vaccinati con 2 dosi di vaccino antimorbillo falliscano nello sviluppare una immunità umorale protettiva, con livelli di anticorpi che diminuiscono nel tempo [334-336]. Inoltre, i tassi di fallimento secondario del vaccino sono approssimativamente del 5% dopo 10-15 anni dall'immunizzazione, e sono probabilmente più bassi quando la vaccinazione viene somministrata dopo 12 mesi di età [192]. La diminuzione del titolo anticorpale non implica necessariamente una perdita completa di immunità protettiva, poiché la riesposizione al virus genera un *booster* della risposta immunitaria [193]. Tuttavia, è stato documentato che questi individui possono costituire una popolazione di individui parzialmente protetta (con sintomatologia modesta), ma contagiosa [194].

Nell'area e nel periodo in studio, il 92.1% dei casi confermati di morbillo non era vaccinato, mentre il restante 7.9% aveva ricevuto almeno una dose di vaccino antimorbillo.

Il lavoro è stato finalizzato allo studio dei casi confermati di morbillo in soggetti vaccinati con una o due dosi, con l'obiettivo di indagare il profilo sierologico e identificare eventuali fallimenti vaccinali primari o secondari. A tale scopo, è stato studiato il profilo sierologico di 33 casi con stato vaccinale documentato nel database regionale MAINF.

Circa il 50% dei soggetti con fallimento vaccinale identificati nello studio aveva ricevuto due dosi di vaccino. Nel 18.2% dei casi è stata dimostrata una mancata risposta del sistema immunitario (*non-responder*), a suggerire un fallimento primario della vaccinazione, mentre il restante 81.8% è riconducibile a un fallimento secondario della vaccinazione. I dati mostrano che i soggetti con fallimento primario avevano un'età mediana più elevata rispetto ai soggetti con fallimento secondario; in questo gruppo, inoltre, la vaccinazione era stata somministrata in età più tardiva (età mediana all'epoca dell'ultima dose 12 anni e 6 anni, rispettivamente). Se confermati in altri studi, questi risultati supportano la raccomandazione alla somministrazione della seconda dose a 5/6 anni, in quanto la vaccinazione in età più avanzata potrebbe aumentare il rischio di *non-responder*.

Per il 12% dei soggetti vaccinati, tutti con fallimento secondario, è stata documentata la trasmissione dell'infezione a casi secondari. Sebbene la maggior parte degli studi presenti in letteratura abbia dimostrato che raramente casi di morbillo con precedente storia vaccinale possano trasmettere l'infezione a casi secondari, è stato dimostrato che in contesti particolari, come lo stretto e prolungato contatto tra familiari, la trasmissione del virus può avvenire anche tra soggetti con fallimento vaccinale [257, 337, 338]. Il riscontro di una percentuale non trascurabile di casi di morbillo tra soggetti vaccinati che ha dato origine a focolai evidenzia la necessità di mantenere alta l'attenzione nel mettere in atto le misure di contenimento e diffusione della malattia anche in presenza di casi vaccinati.

Complessivamente, dai risultati ottenuti si evince che la maggior parte dei fallimenti vaccinali non sono dovuti a una mancata risposta immunitaria, ma piuttosto ad una perdita nel tempo della risposta immunologica vaccino-indotta. Tuttavia, la valutazione del titolo anticorpale è stata fatta durante la fase acuta della malattia, per mancanza di siero raccolto prima dell'infezione e non si è potuto valutare quanti soggetti presentavano titoli anticorpali superiori a 120 mIU/mL prima dell'infezione. Questa valutazione avrebbe contribuito a identificare i *booster* delle IgG in fase acuta causati dall'incontro col virus selvaggio.

Ulteriori studi multidisciplinari devono essere condotti per confermare i risultati ottenuti e delineare opportuni piani risolutivi. Una strategia potrebbe essere quella di utilizzare una schedula a 3 dosi che preveda l'ultima durante l'adolescenza, sebbene alcuni studi la reputino poco efficace [339]. Altri studi rivelano un aumento del titolo anticorpale attraverso l'incremento della dose antigenica vaccinale [340]. Tuttavia, sebbene ciò potrebbe essere utile a mantenere una risposta immunitaria più robusta e duratura, potrebbe comportare anche un aumento delle reazioni avverse, con effetti negativi sulla percezione della vaccinazione nella popolazione.

Lo sviluppo e l'utilizzo di vaccini mediante strategie differenti da quella tradizionale potrebbe essere una via di successo nel contrastare i fallimenti vaccinali; per esempio, un vaccino ricombinante che esprima selettivamente copie aggiuntive della proteina H potrebbe essere in grado di aumentare lo stimolo immunogenico mantenendo invariati i dosaggi standard approvati dall'OMS [341]. Risposte immunitarie più robuste inciderebbero positivamente sull'immunità verso il morbillo raggiungendo in modo più efficiente l'immunità di gregge.

Un ulteriore obiettivo del presente progetto di dottorato è stato quello di analizzare la sequenza amminoacidica della proteina H, che codifica per la proteina target principale degli anticorpi neutralizzanti, di 87 ceppi appartenenti a soggetti vaccinati e non vaccinati. Nonostante la struttura della proteina H sia abbastanza stabile e siano stati identificati ceppi mutanti in grado di eludere il sistema immunitario solo parzialmente [195], risulta fondamentale studiare le caratteristiche molecolari della proteina H dei ceppi isolati per verificare che l'antigenicità rimanga stabile nel tempo, soprattutto quando la maggior parte della popolazione sarà immune. È quindi necessario accumulare informazioni molecolari sul virus per delineare possibili e ulteriori misure preventive.

Delle 23 sequenze amminoacidiche analizzate appartenenti a soggetti vaccinati, il 30.4% presentava sostituzioni in siti immunoepitopici. Una percentuale simile è stata osservata anche per le sequenze di ceppi appartenenti a casi non vaccinati (35.9%).

Le sostituzioni riscontrate sono state L247S, P247S, A400V, A192T e Q575K. Il 21.7% dei vaccinati presentava mutazioni a carico della posizione 247. Non sono invece state riscontrate mutazioni in siti funzionali della proteina, come per esempio residui di cisteina importanti per il mantenimento della struttura terziaria, o in siti di legame col recettore, responsabili del riconoscimento e dell'ingresso nella cellula ospite.

Le due differenti sostituzioni a carico della serina in posizione 247 (L247S e P247S) sono state identificate in sequenze di genotipo D8. In entrambi i casi la serina, che è un aminoacido polare, è stata sostituita da un aminoacido apolare e idrofobico. Essa si trova spesso in conformazioni molto strette, siti che possono essere raggiunti anche dalla leucina e dalla prolina che l'hanno sostituita, in quanto di piccole dimensioni. Dalla comparazione con altre sequenze in GenBank (dati non mostrati), la mutazione L247S risultava presente solo in sequenze italiane.

La sostituzione A400V è stata trovata in una sola sequenza in studio, l'unica appartenente alla *named strain* B3-Dubliano. Questa sostituzione era già stata osservata in altre sequenze che avevano circolato sul territorio tra il 2015 e il 2016 e in letteratura è risultata una mutazione comune a molte sequenze di genotipo B3 [342, 343]. Tale sostituzione sembra dunque essere ben fissata nella popolazione virale del genotipo B3. Pur essendo all'interno di un sito immunoepitopico, sia la valina che l'alanina sono aminoacidi spesso presenti in posizioni non critiche. Anche la sostituzione A192T potrebbe dunque non influire sulle proprietà della proteina H, in quanto la treonina viene sostituita dall'alanina, aminoacido dalle stesse caratteristiche chimico-fisiche. Questa mutazione è stata riscontrata in una variante *no named strain* B3 circolata sul territorio in esame nel 2018 ed era stata precedentemente identificata anche in una sequenza indiana nel 2015.

La mutazione Q575K è stata osservata in ceppi appartenenti alla *no named strain* B3-MVs/MonzaBrianza.ITA/4.19 e in un ceppo appartenente alla *named strain* D8-Gir Somnath, di un caso vaccinato e importato dall'Ucraina. La lisina (K) è un aminoacido basico e spesso coinvolto in siti proteici attivi o vincolanti. Anche la glutammina, polare, è molto spesso coinvolta in siti attivi e, inoltre, presenta una massa molare molto simile a quella della lisina. Questa mutazione è stata osservata anche in ceppi di genotipo D5 circolanti in Giappone nel 2008 [342]. Anche se questa posizione è strutturalmente esposta sulla superficie virale, la mutazione può essere comunque mantenuta perché lontana dal sito di legame del recettore. È importante sottolineare che le sequenze che presentavano la stessa mutazione amminoacidica appartenevano anche alla stessa variante genotipica. Ciò spiega come la mutazione venga selezionata e si sia mantenuta nelle generazioni successive all'interno della variante.

I risultati ottenuti suggeriscono che la proteina H del virus del morbillo può essere caratterizzata da regioni funzionali più o meno conservate o non conservate. Le mutazioni trovate a livello dei siti immunoepitopici possono considerarsi silenti da un punto di vista funzionale, in quanto gli aminoacidi coinvolti sono stati sostituiti da aminoacidi molto simili sia nella struttura chimica che nelle dimensioni. Sono comunque state identificate mutazioni in siti critici della proteina non osservate da studi precedenti [44, 342, 343], dimostrando una variabilità che rimane opportuno tener sotto controllo.

I dati ottenuti sono da un lato rassicuranti in quanto non mostrano la circolazione di mutanti *escape*, dall'altro documentano una variabilità della proteina H che impone la necessità di un monitoraggio costante.

In conclusione, nel presente progetto di dottorato sono state sviluppate e applicate metodologie innovative risultate utili per la corretta valutazione dello scenario epidemiologico attuale, caratterizzato dalla circolazione di ceppi endemici e dalla continua introduzione di varianti virali. Per raggiungere gli obiettivi fissati dall'OMS, ad oggi ancora molto lontani, sarà necessario indirizzare il programma di eliminazione attraverso strategie mirate. Per fare ciò è necessario essere guidati da risultati ottenuti da una sorveglianza sensibile e di qualità, frutto di una ricerca orientata e tecnologicamente avanzata.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Nambulli S, Sharp CR, Acciardo AS, *et al.* (2016) **Mapping the evolutionary trajectories of morbilliviruses: what, where and whither.** *Curr Opin Virol* 2016; 16: 95–105
- [2] Black F (1996) **Measles endemicity in insular populations: critical community size and its evolutionary implication.** *J Theor Biol* 1966; 11: 207–11
- [3] Keeling MJ & Grenfell BT (1997) **Disease extinction and community size: modeling the persistence of measles.** *Science* 1997; 275: 65–67
- [4] Strebel PM, Papania MJ, Gastañaduy PA, *et al.* (2018) **Measles vaccines.** Elsevier; 2018 [chapter 38]
- [5] The ICTV **Elevation of the paramyxoviral subfamily Pneumovirinae to family status as family Pneumoviridae in the order Mononegavirales; and renaming of one pneumoviral genus.** Accessible at link: <https://talk.ictvonline.org/ICTV/proposals/2015.011a-iM.A.v2.Pneumoviridae.pdf>
- [6] Bankamp B, Takeda M, Zhang Y, *et al.* (2011) **Genetic characterization of measles Vaccine strains.** *J Infect Dis.*, 2011; 204 Suppl 1:S533-48
- [7] Dowling PC, Blumberg BM, Menonna J, *et al.* (1986) **Transcriptional Map of the Measles Virus Genome.** *J. gen. Virol.*, 1986; 67: 1987-1992
- [8] Griffin DA (2007) **Measles virus.** In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology.* 5th ed. Vol 2. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins, 2007; 1551–85
- [9] Longhi S, Receveur-Brechot V, Karlin D, *et al.* (2003) **The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein.** *J Biol Chem* 2003; 278:18638–48
- [10] Rota PA, Featherstone DA & Bellini WJ (2009) **Molecular epidemiology of measles virus.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 330:129–50
- [11] Taylor MJ, Godfrey E, Baczko K, ter Meulen V, *et al.* (1991) **Identification of several different lineages of measles virus.** *J Gen Virol* 1991; 72:83–8
- [12] Bankamp B, Horikami SM, Thompson PD, *et al.* (1996) **Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly.** *Virology* 1996; 216:272–7
- [13] Harty RN & Palese P (1995) **Measles virus phosphoprotein (P) requires the NH2- and COOH-terminal domains for interactions with the nucleoprotein (N) but only the COOH terminus for interactions with itself.** *J Gen Virol* 1995; 76:2863–7
- [14] Iwasaki M, Takeda M, Shirogane Y, *et al.* (2009) **The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein.** *J Virol* 2009; 83:10374–83
- [15] Liston P, DiFlumeri C & Briedis DJ (1995) **Protein interactions entered into by the measles virus P, V, and C proteins.** *Virus Res* 1995; 38:241–59
- [16] Sedlmeier R & Neubert WJ (1998) **The replicative complex of paramyxoviruses: structure and function.** *Adv Virus Res* 1998; 50:101–39
- [17] Fontana JM, Bankamp B & Rota PA (2008) **Inhibition of interferon induction and signaling by paramyxoviruses.** *Immunol Rev* 2008; 225:46–67
- [18] Cattaneo R., K.Kaelin, K.Baczko *et al.* **Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein.** *Cell* 56, 759-764
- [19] Liston P & Briedis DJ (1994) **Measles virus V protein binds zinc.** *Virology* 198, 399-404

- [20] Radecke F & Billeter MA (1996) **The nonstructural C protein is not essential for multiplication of Edmonston B strain measles virus in cultured cells.** *Virology* 217, 418421
- [21] Schneider H, Kaelin K & Billeter MA (1997) **Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells.** *Virology* 227, 314322
- [22] Tober C, Seufert M, Schneider H, *et al.* (1998) **Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis.** *J.Virol.* 72, 8124-8132
- [23] Caignard G, Guerbois M, Labernardiere JL, *et al.* (2007) **Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling.** *Virology* 2007; 368:351–62
- [24] Palosaari H, Parisien JP, Rodriguez JJ, *et al.* (2003) **STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein.** *J Virol* 2003; 77:7635–44
- [25] Ikegame S, Takeda M, Ohno S, *et al.* (2010) **Both RIG-I and MDA5 RNA helicases contribute to the induction of alpha/beta interferon in measles virus-infected human cells.** *J Virol* 2010; 84:372–9
- [26] Nakatsu Y, Takeda M, Ohno S, *et al.* (2008) **Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins.** *J Virol* 2008; 82:8296–306
- [27] Ohno S, Ono N, Takeda M, *et al.* (2004) **Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction.** *J Gen Virol* 2004; 85:2991–9
- [28] Fontana JM, Bankamp B, Bellini WJ, *et al.* (2008) **Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wildtype strains of measles virus.** *Virology* 2008; 374:71–81
- [29] Shaffer JA, Bellini WJ & Rota PA (2003) **The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response.** *Virology* 2003; 315:389–97
- [30] Wild TF & Buckland R (1995) **Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 191:51–64
- [31] Cathomen T, Mrkic B, Spehner D, *et al.* (1998) **A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain.** *EMBO J* 1998; 17:3899–908
- [32] Cathomen T, Naim HY & Cattaneo R (1998) **Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence.** *J Virol* 1998; 72:1224–34
- [33] Spielhofer P, Bachi T, Fehr T, *et al.* (1998) **Chimeric measles viruses with a foreign envelope.** *J Virol* 1998; 72:2150–9
- [34] Hirano A, Ayata M, Wang AH, *et al.* (1993) **Functional analysis of matrix proteins expressed from cloned genes of measles virus variants that cause subacute sclerosing panencephalitis reveals a common defect in nucleocapsid binding.** *J Virol* 1993; 67:1848–53
- [35] Suryanarayana K, Baczkko K, ter Meulen V, *et al.* (1994) **Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue.** *J Virol* 1994; 68:1532–43

- [36] Richardson C, Hull D, Greer P, *et al.* (1986) **The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion protein of measles virus (Edmonston strain): a comparison of fusion proteins from several different paramyxoviruses.** *Virology* 1986; 155:508–23
- [37] Richardson CD & Choppin PW (1983) **Oligopeptides that specifically inhibit membrane fusion by paramyxoviruses: studies on the site of action.** *Virology* 1983; 131:518–32
- [38] Samuel O & Shai Y (2001) **Participation of two fusion peptides in measles virus-induced membrane fusion: emerging similarity with other paramyxoviruses.** *Biochemistry* 2001; 40:1340–9
- [39] Rota JS, Hummel KB, Rota PA & Bellini WJ (1992) **Genetic variability of the glycoprotein genes of current wild-type measles isolates.** *Virology* 188, 135-142
- [40] Jardetzky TS & Lamb RA (2014) **Activation of paramyxovirus membrane fusion and virus entry.** *Curr. Opin. Virol.* 2014, 5, 24–33
- [41] De Swart RL, Yuksel S & Osterhaus AD (2005) **Relative contributions of measles virus hemagglutinin- and fusion protein-specific serum antibodies to virus neutralization.** *J. Virol.* 2005, 79, 11547–11551
- [42] Bouche FB, Ertl OT & Muller CP (2002) **Neutralizing B cell response in measles.** *Viral Immunol.* 2002, 15, 451–471
- [43] De Swart RL, Yuksel S, Langerijs CN, *et al.* (2009) **Depletion of measles virus glycoprotein-specific antibodies from human sera reveals genotype-specific neutralizing antibodies.** *J. Gen. Virol.* 2009, 90, 2982–2989
- [44] Tahara M, Bürckert JP, Kanou K, *et al.* (2016) **Measles Virus Hemagglutinin Protein Epitopes: The Basis of Antigenic Stability.** *Viruses* 2016, 8, 216
- [45] Hu A, Cattaneo R, Schwartz S, *et al.* (1994) **Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein.** *J.Gen. Virol.* 1994,75,1043–1052
- [46] Kimura H, Saitoh M, Kobayashi M, *et al.* (2015) **Molecular evolution of haemagglutinin (H) gene in measles virus.** *Sci. Rep.* 2015
- [47] Fournier P, Brons NH, Berbers GA, *et al.* (1997) **Antibodies to a new linear site at the topographical or functional interface between the haemagglutinin and fusion proteins protect against measles encephalitis.** *J. Gen. Virol.* 1997, 78, 1295–1302
- [48] Apte-Sengupta S, Negi S, Leonard VH, *et al.* (2012) **Base of the measles virus fusion trimer head receives the signal that triggers membrane fusion.** *J.Biol. Chem.* 2012, 287, 33026–33035
- [49] Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, *et al.* (2011) **Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011, 18, 135–141
- [50] Nakashima M, Shirogane Y, Hashiguchi T, *et al.* (2013) **Mutations in the putative dimer-dimer interfaces of the measles virus hemagglutinin head domain affect membrane fusion triggering.** *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 8085–8091
- [51] Tahara M, Ito Y, Brindley MA, *et al.* (2013) **Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein.** *J. Virol.* 2013, 87, 666–675
- [52] Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, *et al.* (2000) **SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus.** *Nature* 2000; 406: 893–97

- [53] Muhlebach MD, Mateo M, Sinn PL, *et al.* (2011) **Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus.** *Nature*. 2011 Nov 2;480(7378):530-3
- [54] Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, *et al.* (2011) **Tumor Cell Marker PVRL4 (Nectin 4) Is an Epithelial Cell Receptor for Measles Virus.** *PLoS Pathog*. 2011 Aug;7(8):e1002240
- [55] Sidorenko & Clark (2003) **The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction.** *Nat Immunol*. 2003 Jan;4(1):19-24
- [56] Vargas R, Gill DB, Kemper C, *et al.* (2004) **CD46: expanding beyond complement regulation.** *Trends Immunol*. 2004 Sep;25(9):496-503
- [57] Kemper C, Chan AC, Green JM, *et al.* (2003) **Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype.** *Nature* 2003 421: 388–392
- [58] Sinn PL, Williams G, Vongpunsawad S, *et al.* (2002) **Measles virus preferentially transduces the basolateral surface of well-differentiated human airway epithelia.** *J Virol* 2002 76: 2403–2409
- [59] Shirogane Y, Takeda M, Tahara M, *et al.* (2010) **Epithelial-mesenchymal transition abolishes the susceptibility of polarized epithelial cell lines to measles virus.** *J Biol Chem* 2010 285: 20882–20890 2010
- [60] Yanagi Y, Takeda M, Ohno S & Hashiguchi T (2009) **Measles virus receptors.** *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2009, 329, 13–30
- [61] Seki F, Yamada K, Nakatsu Y, *et al.* (2011) **The SI strain of measles virus derived from a patient with subacute sclerosing panencephalitis possesses typical genome alterations and unique amino acid changes that modulate receptor specificity and reduce membrane fusion activity.** *J. Virol*. 2011, 85, 11871–11882
- [62] Noton SL & Fearn R (2015) **Initiation and regulation of Paramyxovirus transcription and replication.** *Virology*. 2015; 479-480: 545-54
- [63] Ono N, Tatsuo H, Hidaka Y, *et al.* (2001) **Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor.** *J Virol*. 2001 May;75(9):4399-401
- [64] Erlenhofer C, Duprex WP, Rima BK, *et al.* (2002) **Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus.** *J Gen Virol* 2002 83: 1431–143
- [65] Yanagi Y, Ono N, Tatsuo H, Hashimoto K & Minagawa H (2002) **Measles virus receptor SLAM (CD150).** *Virology* 2002 299: 155–161
- [66] Esolen LM, Takahashi K, Johnson RT, *et al.* (1995) **Brain endothelial cell infection in children with acute fatal measles.** *J Clin Invest* 1995 96: 2478–248
- [67] Andres O, Obojes K, Kim KS, *et al.* (2003) **CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses.** *J Gen Virol* 2003 84: 1189–1197
- [68] Takeuchi K, Miyajima N, Nagata N, *et al.* (2003) **Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM(CD150)-independent mechanism.** *Virus Res* 2003 94: 11–16
- [69] McQuaid S & Cosby SL (2002) **An immunohistochemical study of the distribution of the measles virus receptors, CD46 and SLAM, in normal human tissues and subacute sclerosing panencephalitis.** *Lab Invest* 82: 403–409
- [70] Plattet P & Plemperb RK (2013) **Envelope Protein Dynamics in Paramyxovirus Entry.** *MBio*. 2013; 4(4): e00413-13

- [71] de Swart RL, Ludlow M, de Witte L, *et al.* (2007) **Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques.** PLoS Pathog 2007; 3: e178
- [72] Ludlow M, de Vries RD, Lemon K, *et al.* (2013) **Infection of lymphoid tissues in the macaque upper respiratory tract contributes to the emergence of transmissible measles virus.** J Gen Virol 2013; 94: 1933–44
- [73] Singh BK, Li N, Mark AC, *et al.* (2016) **Cell-to-cell contact and nectin-4 govern spread of measles virus from primary human myeloid cells to primary human airway epithelial cells.** J Virol 2016; 90: 6808–17
- [74] Ludlow M, McQuaid S, Milner D, *et al.* (2015) **Pathological consequences of systemic measles virus infection.** J Pathol 2015; 235: 253–65
- [75] Leonard VH, Sinn PL, Hodge G, *et al.* (2008) **Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed.** J Clin Invest 2008; 118: 2448–58
- [76] de Vries RD, Mesman AW, Geijtenbeek TB, *et al.* (2012) **The pathogenesis of measles.** Curr Opin Virol 2012; 2: 248–55
- [77] Cohen SG (2008) **The allergy archives: pioneers and milestones,** Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2008; 121: 543-544
- [78] Fitzgerald TL, Durrheim DN, Merritt TD, *et al.* (2012) **Measles with a possible 23 day incubation period.** Commun Dis Intel Quart Report 2012; 36: E277–80
- [79] Ludlow M, Lemon K, de Vries RD, *et al.* (2013) **Measles virus infection of epithelial cells in the macaque upper respiratory tract is mediated by subepithelial immune cells.** J. Virol. 2013, 87,4033–4042
- [80] Mesman AW, de Vries RD, McQuaid S, *et al.* (2012) **A prominent role for DC-SIGN+ dendritic cells in initiation and dissemination of measles virus infection in non-human primates.** PLoS ONE 2012, 7, e49573
- [81] De Vries RD, McQuaid S, van Amerongen G, *et al.* (2012) **Measles immune suppression: Lessons from the macaque model.** PLoS Pathog. 2012, 8, e100288 5
- [82] McChesney MB, Miller CJ, Rota PA, *et al.* (1997) **Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host.** Virology 1997, 233, 74–84
- [83] Battegay R, Itin C & Itin P (2012) **Dermatological signs and symptoms of measles: a prospective case series and comparison with the literature.** Dermatology, 2012; 224: 1-4
- [84] Mina MJ, Metcalf CJ, de Swart RL, *et al.* (2015) **Long-term measles-induced immunomodulation increases overall childhood infectious disease mortality.** Science 2015, 348, 694–699
- [85] Riddell MA, Moss WJ, Hauer D, *et al.* (2007) **Slow clearance of measles virus RNA after acute infection.** J Clin Virol 2007; 39: 312–17
- [86] Foster A & Sommer A (1986) **Childhood blindness from corneal ulceration in Africa: causes, prevention, and treatment.** Bull World Health Organ 1986; 64: 619–23
- [87] Stevens GA, Bennett JE, Hennocq Q, *et al.* (2015) **Trends and mortality effects of vitamin A deficiency in children in 138 low-income and middle-income countries between 1991 and 2013: a pooled analysis of population-based surveys.** Lancet Glob Health 2015; 3: e528–36

- [88] Ogbuanu IU, Zeko S, Chu SY, *et al.* (2014) **Maternal, fetal, and neonatal outcomes associated with measles during pregnancy: Namibia, 2009–2010.** Clin Infect Dis 2014; 58: 1086–92
- [89] Griffin DE (2014) **Measles virus and the nervous system.** Handb Clin Neurol 2014; 123: 577–90
- [90] Hardie DR, Albertyn C, Heckmann JM & Smuts HE (2013) **Molecular characterisation of virus in the brains of patients with measles inclusion body encephalitis (MIBE).** Virol J 2013; 10: 283
- [91] Yaqub BA (1996) **Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE): early diagnosis, prognostic factors and natural history.** Journal of the Neurological Sciences. 1996; 139: 227-234. 106
- [92] Kweder H, Ainouze M, Brunel J, *et al.* (2015) **Measles Virus: identification in the M protein primary sequence of a potential molecular marker for Subacute Sclerosing Panencephalitis.** Advances in Virology. 2015
- [93] Modlin JF, Jabbour JT, Witte JJ & Halsey NA (1977) **Epidemiologic studies of measles, measles vaccine, and subacute sclerosing encephalitis.** Pediatrics 59: 505–512
- [94] Campbell H, Andrews N, Brown KE & Miller E (2007) **Review of the effect of measles vaccination on the epidemiology of SSPE.** Int J Epidemiol 36: 1334–1348
- [95] Anlar B, Soylemezoglu F, Aysun S, *et al.* (2001) **Tissue inflammatory response in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE).** J Child Neurol 16: 895–900
- [96] Burgoon MP, Keays KM, Owens GP, *et al.* (2005) **Laser-capture microdissection of plasma cells from subacute sclerosing panencephalitis brain reveals intrathecal disease-relevant antibodies.** P Natl Acad Sci USA 102: 7245–7250
- [97] Fernandez-Munoz R & Celma ML (1992) **Measles virus from a long-term persistently infected human T lymphoblastoid cell line, in contrast to the cytocidal parental virus, establishes an immediate persistence in the original cell line.** J Gen Virol 73: 2195–2202
- [98] Baczko K, Lampe J, Liebert UG, *et al.* (1993) **Clonal expansion of hypermutated measles virus in a SSPE brain.** Virology 197: 188–195
- [99] Dittmar S, Harms H, Runkler N, *et al.* (2008) **Measles virus-induced block of transendothelial migration of T lymphocytes and infection-mediated virus spread across endothelial cell barriers.** J Virol 82: 11273–11282
- [100] Ludlow M, Allen I & Schneider-Schaulies J (2009) **Systemic spread of measles virus: overcoming the epithelial and endothelial barriers.** Thromb Haemost 102: 1050–1056
- [101] Makhortova NR, Askovich P, Patterson CE, *et al.* (2007) **Neurokinin-1 enables measles virus trans-synaptic spread in neurons.** Virology 362: 235– 244
- [102] Helfand RF, Heath JL, Anderson LJ, *et al.* (1997) **Diagnosis of measles with an IgM capture EIA: the optimal timing of specimen collection after rash onset.** J Infect Dis 1997; 175: 195–99
- [103] World Health Organization (WHO). **Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection 2nd ed.** Geneva, Switzerland: WHO/IVB/07.01; 2007
- [104] Huiming Y, Chaomin W & Meng M (2005) **Vitamin A for treating measles in children.** The Cochrane Database of Systematic Reviews. 2005; 1479
- [105] Barnard DL (2004) **Inhibitors of measles virus.** Antiv Chem Chemother 2004; 15: 111–19

- [106] Kabra SK & Lodha R (2013) **Antibiotics for preventing complications in children with measles.** Cochrane Database Syst Rev 2013; 8: Cd001477
- [107] Rota PA, Moss WJ, Takeda M, *et al.* (2016) **Measles.** Nat. Rev. Dis. Primers 2016,2
- [108] Kimura A, Tosaka K & Nakao (1975). **Measles rash. Light and electron microscopic study of skin eruptions.** Arch Virol 1975; 47: 295–307
- [109] Zilliox MJ, Moss WJ & Griffin DE (2007) **Gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells during measles virus infection.** Clin. Vaccine Immunol. 2007, 14, 918–923
- [110] Phillips RS, Enwonwu CO, Okolo S & Hassan A (2004) **Metabolic effects of acute measles in chronically malnourished Nigerian children.** J. Nutr. Biochem. 2004, 15, 281–288
- [111] Okada H, Sato TA, Katayama A, *et al.* (2001) **Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines.** Arch. Virol. 2001,146,859–874
- [112] Isa MB, Martinez L, Giordano M, *et al.* (2001) **Measles virus specific immunoglobulin G isotype immune response in early and late infections.** J Clin Microbiol 39, 170-174
- [113] Tuokko H (1995) **Detection of acute measles infections by indirect and mu-capture enzyme immunoassays for immunoglobulin M antibodies and measles immunoglobulin G antibody avidity enzyme immunoassay.** J.Med.Virol. 45, 306-311
- [114] Graves MC, Griffin DE, Johnson RT, *et al.* (1984)**Development of antibody to measles virus polypeptides during complicated and uncomplicated measles virus infections.** J.Virol. 49, 409-412
- [115] Machamer CE, Hayes EC, Gollobin SD & Westfall LK (1980) **Antibodies against the measles matrix polypeptide after clinical infection and vaccination.** Infect.Immun. 27, 817-825
- [116] Giraudon P & Wild TF (1981) **Monoclonal antibodies against measles virus.** J.Gen.Virol. 54, 325-332
- [117] Polack F, Lee S, Permar S, *et al.* (2000) **Successful DNA immunization against measles: Neutralizing antibody against either the hemagglutinin or fusion glycoprotein protects rhesus macaques without evidence of atypical measles.** Nat Med 6, 776-781
- [118] Endo A, Izumi H, Miyashita M, *et al.* (2001) **Current efficacy of postexposure prophylaxis against measles with immunoglobulin.** J Pediatr. 138, 926-928
- [119] Albrecht P, Ennis FA, Saltzman EJ & Krugman S (1977) **Persistence of maternal antibody in infants beyond 12 months: Mechanism of measles vaccine failure.** J.Pediatr. 91, 715-178
- [120] Reilly CM, Stokes J Jr, Buynak EB, *et al.* (1961) **Living attenuated measles-virus vaccine in early infancy. Studies of the role of passive antibody in immunization.** N.Engl.J.Med. 265, 165-169
- [121] Haralambieva IH, Ovsyannikova IG, Vierkant RA & Poland GA (2008) **Development of a novel efficient fluorescence-based plaque reduction microneutralization assay for measles immunity.** Clin Vaccine Immunol. 2008; 15:1054–1059
- [122] Albertyn C, van der Plas H, Hardie D, *et al.* (2011) **Silent casualties from the measles outbreak in South Africa.** S Afr Med J 101: 313–317
- [123] Permar SR, Klumpp SA, Mansfield KG *et al.* (2004) **Limited contribution of humoral immunity to the clearance of measles viremia in rhesus monkeys.** J Infect Dis 190: 998– 1005

- [124] Van Binnendijk RS, van den HS, van den KH, *et al.* (2003) **Evaluation of serological and virological tests in the diagnosis of clinical and subclinical measles virus infections during an outbreak of measles in The Netherlands.** *J Infect Dis* 188: 898–903
- [125] Lin WH, Kouyos RD, Adams RJ, *et al.* (2012) **Prolonged persistence of measles virus RNA is characteristic of primary infection dynamics.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 14989–94
- [126] Nair N, Moss WJ, Scott S, *et al.* (2009) **HIV-1 infection in Zambian children impairs the development and avidity maturation of measles virus-specific immunoglobulin G after vaccination and infection.** *J. Infect. Dis.* 2009, 200, 1031–1038
- [127] Amanna IJ & Slifka MK (2010) **Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity.** *Immunol. Rev.* 2010, 236, 125–138
- [128] Tahara M, Ohno S, Sakai K, *et al.* (2013) **The receptor-binding site of the measles virus hemagglutinin protein itself constitutes a conserved neutralizing epitope.** *J Virol* 2013; 87: 3583–86
- [129] Griffin DE (2016) **The Immune Response in Measles: Virus Control, Clearance and Protective Immunity** *Viruses.* 2016 Oct 12;8(10)
- [130] von Pirquet C (1908) **Das Verhalten der kutanen Tuberkulin-reaktion während der Masern.** *Dtsch Med Wochenschr* 1908; 34: 1297–300
- [131] Ryon JJ, Moss WJ, Monze M & Griffin D (2002) **Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized Zambian children with measles.** *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 994-1003
- [132] de Vries RD & de Swart RL (2014) **Measles immune suppression: functional impairment or numbers game?** *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004482
- [133] Tamashiro VG, Perez HH & Griffin DE (1987) **Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during uncomplicated and complicated measles.** *Pediatr Infect Dis J* 1987; 6: 451–54
- [134] Akramuzzaman SM, Cutts FT, Wheeler JG & Hossain MJ (2000) **Increased childhood morbidity after measles is short-term in urban Bangladesh.** *Am J Epidemiol* 2000; 151: 723–35
- [135] Ender's JF & Peebles TC (1954) **Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles.** *Proc Soc Exp Biol Me.* 1954: 86(2): 277-86
- [136] Baker JP (2011) **The first Measles vaccine.** *Pediatrics.* 2011; 128(3): 436-437
- [137] Warren J & Gallian MJ (1962) **Concentrated inactivated measles-virus vaccine: Preparation and antigenic potency.** *Amer.J.Dis.Child.* 103, 248-253
- [138] Carter CH, Conway TJ, Cornfeld D, *et al.* (1962) **Serologic response of children to inactivated measles vaccine.** *JAMA* 179, 848-853
- [139] Measles Vaccines Committee (1968) **Vaccination against measles: Clinical trial of live measles vaccine given alone and live vaccine preceded by killed vaccine.** *Brit.Med.J.* 2, 449-452
- [140] Rauh LW & Schmidt R (1965) **Measles immunization with killed virus vaccine.** *Amer.J.Dis.Child.* 109, 232-237
- [141] Polack FP, Hoffman SJ, Crujeiras G & Griffin DE (2003) **A role for nonprotective complement-fixing antibodies with low avidity for measles virus in atypical measles.** *Nat Med* 2003; 9: 1209–13

- [142] Nader PR, Horwitz MS & Rousseau J (1968) **Atypical exanthem following exposure to natural measles: Eleven cases in children previously inoculated with killed vaccine.** J.Pediatr. 72, 22-28
- [143] Fulginiti VA, Eller JJ, Downie AW & Kempe CH (1967) **Altered reactivity to measles virus: Atypical measles in children previously immunized with inactivated measles virus vaccines.** JAMA 202, 1075
- [144] Griffin DE & Pan CH (2009) **Measles: Old vaccines, new vaccines.** Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2009, 330, 191–212
- [145] Katz SL, Milovanovic MV & Enders JF (1958) **Propagation of measles virus in cultures of chick embryo cells.** Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 97, 23
- [146] Milovanovic MV, Enders JF & Mitus A (1957) **Cultivation of measles virus in human amnion cells and in developing chick embryo.** Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 95, 120-127
- [147] Enders JF, Katz SL, Milovanovic MV & Holloway A (1960) **Studies of an attenuated measles virus vaccine: I. Development and preparation of the vaccine: Technics for assay of effects of vaccination.** N.Engl.J.Med. 263, 153-159
- [148] Katz SL, Enders JF & Holloway A (1960) **Studies on an attenuated measles-virus vaccine. II. Clinical, virologic and immunologic effects of vaccine in institutionalized children.** N.Engl.J.Med. 263, 159-160
- [149] Schwarz AJF (1962) **Preliminary tests of a highly attenuated measles vaccine.** Am.J.Dis.Child. 103, 216-219
- [150] Rota JS, Wang ZD, Rota PA & Bellini WJ (1994) **Comparison of sequences of the H,F, and N coding genes of measles virus vaccine strains.** Virus.Res. 31, 317-330
- [151] Griffin DE (2018) **Measles vaccines** Viral Immunol. 2018 Mar 1; 31(2): 86–95
- [152] Van Binnendijk RS, van der Heijden RVJ, van Amerongen G, *et al.* (1994) **Viral replication and development of specific immunity in macaques after infection with different measles virus strains.** J.Infect.Dis. 170, 443-448
- [153] Ovsyannikova IG, Dhiman N, Jacobson RM, *et al.* (2003) **Frequency of measles virus-specific CD4+ and CD8+ T cells in subjects seronegative or highly seropositive for measles vaccine.** Clin Diagn Lab Immunol 10, 411-416
- [154] Calain P & Roux L (1993) **The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA.** J Virol 1993; 67:4822–30
- [155] World Health Organization (WHO). **Expanded programme on immunization (EPI). Safety of high titre measles vaccines.** Wkly Epidemiol Rev 1992; 67: 357–61
- [156] Holt EA, Moulton LH, Siberry GK & Halsey NA (1993) **Differential mortality by measles vaccine titer and sex.** J.Infect.Dis. 168, 1087-1096
- [157] Knudsen KM, Aaby P, Whittle H, *et al.* (1996) **Child mortality following standard, medium or high titre measles immunization in West Africa.** Int.J.Epidemiol. 25, 665-673
- [158] Seng R, Samb B, Simondon F, *et al.* (1999) **Increased long term mortality associated with rash after early measles vaccination in rural Senegal.** Pediatr.Infect.Dis.J. 18, 48-52
- [159] Wellington K & Goa L (2003) **Measles, Mumps, Rubella Vaccine (PriorixR; GSK-MMR) A Review of its Use in the Prevention of Measles, Mumps and Rubella.** Drugs. 2003; 63(19): 2107-2126

- [160] World Health Organization. **Information sheet observed rate of vaccine reactions measles, mumps and rubella vaccines. May 2014.** Accessible at link: https://www.who.int/vaccine_safety/en/
- [161] Bohlke K, Davis RL, Marcy SM, *et al.* (2003) **Risk of Anaphylaxis After Vaccination of Children and Adolescents.** *Pediatrics*, Oct 2003, Vol. 112, No. 4
- [162] Bitnun A, Shannon P, Durward A, *et al.* (1999) **Measles inclusion-body encephalitis caused by the vaccine strain of measles virus.** *Clin Infect Dis* 29, 855-861
- [163] Melnick JL (1996) **Thermostability of poliovirus and measles vaccines.** *Dev.Biol.Stand.* 87, 155-160
- [164] Hales CM, Johnson E, Helgenberger L, *et al.* (2014) **Measles outbreak associated with low vaccine effectiveness among adults in Pohnpei state, federated states of Micronesia, 2014.** *Open Forum Infect. Dis.* 2016, 3
- [165] Napier G, Lee D, Robertson C, *et al.* (2016) **A model to estimate the impact of changes in MMR vaccine uptake on inequalities in measles susceptibility in Scotland, Statistical methods in Medical Research.** 2016; Vol.25: pp. 2001-2009
- [166] Mitragotri S. (2005) **Immunization without needles.** *Nat Rev Immunol* 5, 905-916
- [167] Coughlin MM, Collins M, Saxon G, *et al.* (2015) **Effect of jet injection on infectivity of measles, mumps, and rubella vaccine in a bench model.** *Vaccine* 2015, 33, 4540-4547
- [168] Sarno MJ, Blase E, Galindo N, *et al.* (2000) **Clinical immunogenicity of measles, mumps and rubella vaccine delivered by the injexjet injector: Comparison with standard syringe injection.** *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000, 19, 839-842
- [169] Kim YC, Park JH & Prausnitz MR (2012) **Microneedles for drug and vaccine delivery.** *Adv. DrugDeliv. Rev.* 2012, 64, 1547-1568
- [170] Dilraj A, Cutts FT, de Castro JF, *et al.* (2000) **Response to different measles vaccine strains given by aerosol and subcutaneous routes to schoolchildren: A randomised trial.** *Lancet* 2000, 355, 798-803
- [171] Bennett JV, Fernandez de Castro J, Valdespino-Gomez JL, *et al.* (2002) **Aerosolized measles and measles-rubella vaccines induce better measles antibody booster responses than injected vaccines: Randomized trials in Mexican schoolchildren.** *Bull. World Health Organ.* 2002, 80, 806-812
- [172] Sepulveda-Amor J, Valdespino-Gomez JL, Garcia-Garcia L, *et al.* (2002) **A randomized trial demonstrating successful boosting responses following simultaneous aerosols of measles and rubella (MR) vaccines in school age children.** *Vaccine* 2002, 20, 2790-2795
- [173] Chaudhari A, Vaidya V, Mulay R, *et al.* (2014) **Safety and immunogenicity of dry powder measles vaccine administered by inhalation: A randomized controlled phase I clinical trial.** *Vaccine* 2014, 32, 6791-6797
- [174] Monto AS (1999) **Interrupting the transmission of respiratory tract infections: theory and practice, Clinical Infectious Diseases.** *Clin Infect Dis*, 1999; 28: 200-204
- [175] Van Boven M, Kretzschmar M, Wallinga J, *et al.* (2010) **Estimation of measles vaccine efficacy and critical vaccination coverage in a highly vaccinated population.** *Journal of the Royal Society Interface*, 2010; 7: 1537-1544
- [176] Anderson RMR (1991) **Infectious Diseases of Humans.** Oxford: Oxford University Press, 1991
- [177] Wallinga J, Heijne JC, Kretzschmar M (2005) **A measles epidemic threshold in a highly vaccinated population.** *PLoS Med* 2005; 2: e316

- [178] World Health Organization (WHO) **Measles vaccines: WHO position paper—April 2017**. *Wkly Epidemiol Rec* 2017; 92: 205–27
- [179] Cutts FT, Grabowsky M & Markowitz LE (1995) **The effect of dose and strain of live attenuated measles vaccines on serological responses in young infants**. *Biologicals* 23, 95-106
- [180] Lennon JL & Black FL (1986) **Maternally derived measles immunity in era of vaccine-protected mothers**. *J.Pediatr.* 108, 671-676
- [181] Maldonado YA, Lawrence EC, DeHovitz R, *et al.* (1995) **Early loss of passive measles antibody in infants of mothers with vaccine-induced immunity**. *Pediatrics* 96, 447-450
- [182] Pabst HF, Spady DW, Maruskyk RG, *et al.* (1992) **Reduced measles immunity in infants in a well-vaccinated population**. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 11, 525-529
- [183] Cutts FT, Henao-Restrepo A & Olive JM (1999) **Measles elimination: progress and challenges**. *Vaccine* 17 Suppl 3, S47-S52
- [184] Orenstein WA, Hinman AR & Strebel PJ (2006) **Measles: the need for 2 opportunities for prevention**. *Clin Infect Dis* 42, 320-321
- [185] Mina MJ (2017) **Measles. Immune suppression and vaccination: direct and indirect nonspecific vaccine benefits**. *Journal of Infection*. 2017; 74: S10-S17
- [186] Bester JC (2016) **Measles and measles vaccination: a review**. *JAMA Pediatrics*. 2016; 170(12): 1209-1215
- [187] Orenstein WA, Cairns L, Hinman A, *et al.* (2018) **Measles and Rubella Global Strategic Plan 2012–2020 midterm review report: Background and summary**. *Vaccine*. 2018 Jan 11;36 Suppl 1:A35-A42
- [188] World Health Organization (WHO). **New Measles Surveillance Data**. Accessibile al link: <https://www.who.int/immunization/newsroom/new-measles-data-august-2019/en/>
- [189] EpiCentro. Il portale dell'epidemiologia per la sanità pubblica, a cura dell'Istituto Superiore di Sanità. **Copertura vaccinale in Italia**. Accessibile al link: http://www.epicentro.iss.it/temi/vaccinazioni/dati_Ita.asp#morbillo
- [190] Wakefield AJ, Murch SH, Anthony A. *et al.* (1998) **Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children**. *The Lancet*, 1998; 351: 637-641
- [191] Christenson B & Bottiger M (1994) **Measles antibody: comparison of long-term vaccination titres, early vaccination titres and naturally acquired immunity to and booster effects on the measles virus**. *Vaccine* 12, 129-133
- [192] Anders JF, Jacobson RM, Poland GA, *et al.* (1996) **Secondary failure rates of measles vaccines: a metaanalysis of published studies**. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 15, 62-66
- [193] Ozanne G & d'Halewyn MA (1992) **Secondary immune response in a vaccinated population during a large measles epidemic**. *J.Clin.Microbiol.* 30, 17781782
- [194] Damien B, Huiss S, Schneider F & Muller CP (1998) **Estimated susceptibility to asymptomatic secondary immune response against measles in late convalescent and vaccinated persons**. *J.Med.Virol.* 56, 85-90
- [195] Beaty SM & Lee B (2016) **Constraints on the genetic and antigenic variability of measles virus**. *Viruses* 2016; 8: 109

- [196] Fulton BO, Sachs D, Beaty SM, *et al.* (2015) **Mutational analysis of measles virus suggests constraints on antigenic variation of the glycoproteins.** *Cell Reports* 2015; 11: 1331–38
- [197] Uzicanin A & Zimmerman L (2011) **Field effectiveness of live attenuated measles-containing vaccines: a review of published literature.** *J. Infect. Dis.* 204(Suppl. 1), S133–S148
- [198] Seward JF & Orenstein WA (2012) **A rare event: a measles outbreak in a population with high 2-dose measles vaccine coverage.** *Clin. Infect. Dis.* 55(3), 403–405
- [199] De Serres G, Boulianne N, Defay F *et al.* (2012) **Higher risk of measles when the first dose of a 2-dose schedule of measles vaccine is given at 12-14 months versus 15 months of age.** *Clin. Infect. Dis.* 55(3), 394–402
- [200] Mathias RG, Meekison WG, Arcand TA & Schechter MT (1989) **The role of secondary vaccine failures in measles outbreaks.** *Am. J. Public Health* 79(4), 475–478
- [201] Sugerman DE, Barskey AE, Delea MG *et al.* (2010) **Measles outbreak in a highly vaccinated population, San Diego, 2008: role of the intentionally undervaccinated.** *Pediatrics* 125(4), 747–755
- [202] Griffin DE & Moss WJ (2006) **Can we eradicate measles?** *Microbe* 1(9), 409–413
- [203] Haralambieva IH, Ovsyannikova IG, Pankratz VS, *et al.* (2013) **The genetic basis for interindividual immune response variation to measles vaccine: new understanding and new vaccine approaches.** *Expert Review of Vaccines.* 2013; 12:57– 70
- [204] Poland GA, Jacobson RM & Ovsyannikova IG (2009) **Trends affecting the future of vaccine development and delivery: the role of demographics, regulatory science, the anti-vaccine and consumer culture and vaccinomics.** *Vaccine* 27(25–26 Special Issue), 3240–3244
- [205] Dubé E, Gagnon D, Nickels E, *et al.* (2014) **Mapping vaccine hesitancy—Country-specific characteristics of a global phenomenon.** *Vaccine.* 2014 Nov 20;32(49):6649-54
- [206] Relief Web. Republic of the Philippines. National Disaster Risk Reduction and Management Council. **Update Sitrep No.05 re Measles Outbreak, 22 February 2019, 5:00 PM.** Accessible al link: <https://reliefweb.int/report/philippines/ndrrmc-update-sitrep-no-05-re-measles-outbreak-22-february-2019-500-pm>
- [207] Nowak GJ, Shen AK & Schwartz JL (2017) **Using campaigns to improve perceptions of the value of adult vaccination in the United States: Health communication considerations and insights.** *Vaccine.* 2017;35(42):5543-50
- [208] Reef SE, Harris JB, Kriss JL, *et al.* (2018) **Report for the SAGE Working Group on Measles and Rubella: The Roadmap to Immunity.** Geneva: Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) on Immunization
- [209] Giambi C, Fabiani M, D'Ancona F, *et al.* (2018) **Parental vaccine hesitancy in Italy – Results from a national survey.** *Vaccine.* 2018 Feb 1;36(6):779-787
- [210] Marti M, de Cola M, MacDonald NE, *et al.* (2017) **Assessments of global drivers of vaccine hesitancy in 2014-Looking beyond safety concerns.** *PLoS One* 2017;12(3):e0172310
- [211] Yaqub O, Castle-Clarke S, Sevdalis N, *et al.* (2016) **Attitudes to vaccination: a critical review.** *Soc Sci Med* 2014;112:1–11
- [212] Dubé E, Gagnon D, Zhou Z & Deceuninck G (2016) **Parental vaccine hesitancy in Quebec (Canada).** *PLoS Curr* 2016;8

- [213] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). **Vaccine hesitancy among healthcare workers and their patients in Europe – A qualitative study**. Stockholm: ECDC; 2015
- [214] Verger P, Collange F, Fressard L, *et al.* (2016) **Prevalence and correlates of vaccine hesitancy among general practitioners: a cross-sectional telephone survey in France, April to July 2014**. *Euro Surveill* 2016;21(47). pii: 30406
- [215] Hollmeyer HG, Hayden F, Poland G & Buchholz U (2009) **Influenza vaccination of health care workers in hospitals: a review of studies on attitudes and predictors**. *Vaccine*. 2009;27(30):3935–3944
- [216] Posfay-Barbe KM, Heininger U, Aebi C, *et al.* (2005) **How do physicians immunize their own children? Differences among pediatricians and nonpediatricians**. *Pediatrics*. 2005;116(5):e623–e633
- [217] Regione Veneto, ASL Verona. **Indagine sui determinanti del rifiuto dell'offerta vaccinale in Regione Veneto**. 2011. Accessibile al link: https://www.epicentro.iss.it/vaccini/pdf/Ulss20Verona_04-2012ReportDeterminantiRifiutoVaccinale.pdf
- [218] Giambi C, D'Ancona F, Del Manso M, *et al.* (2014) **Local representatives for VALORE. Exploring reasons for nonvaccination against human papillomavirus in Italy**. *BMC Infect Dis* 2014 Nov;14:545
- [219] Larson HJ, de Figueiredo A, Xiaohong Z, *et al.* (2016) **The state of vaccine confidence 2016: global insights through a 67-country survey**. *EBioMedicine* 2016;12 (2016):295–301
- [220] World Health Organization (WHO). **Immunization, vaccines and biologicals. Data, statistics and graphics**. Accessibile al link: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/data/en/
- [221] Lam P, Williams L, Gadiant S, *et al.* (2015) **Maintaining measles elimination in Canada: Moving forward**. *Can Commun Dis Rep*. 2015;41(7):175-8
- [222] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Measles Cases and Outbreaks [internet]**. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2019. Accessibile al link: <https://www.cdc.gov/measles/cases-outbreaks.htm>
- [223] World Health Organization (WHO). **Measles – European Region; Disease outbreak news - update 6 May 2019 [internet]**. Geneva: World Health Organization; 2019 Accessibile al link: <https://www.who.int/csr/don/06-may-2019-measles-euro/en>
- [224] Zimmerman LA, Muscat M, Singh S, *et al.* (2019) **Progress Toward Measles Elimination — European Region, 2009–2018**. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2019.68(17):396–401
- [225] Syndor E & Perl TM (2014) **Healthcare providers as sources of vaccine-preventable diseases**. *Vaccine*. 2014;32(38):4814-22
- [226] Fiebelkorn AP, Seward JF & Orenstein W (2014) **A global perspective of vaccination of healthcare personnel against measles: systematic review**. *Vaccine*. 2014;32(38):4814-4822
- [227] Fine PE & Clarkson JA (1982) **Measles in England and Wales—I: An analysis of factors underlying seasonal patterns**. *Int J Epidemiol* 1982; 11: 5–14
- [228] Shanks GD, Waller M, Briem H & Gottfredsson M (2015) **Age-specific measles mortality during the late 19th-early 20th centuries**. *Epidemiol Infect* 2015; 143: 3434–41

- [229] Mulders MN, Rota PA, Icenogle JP, *et al.* (2016) **Global Measles and Rubella Laboratory Network Support for Elimination Goals, 2010–2015.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2016; 65: 438–42
- [230] Patel MK, Gacic-Dobo M, Strebel PM, *et al.* (2016) **Progress toward regional measles elimination—worldwide, 2000–2015.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2016; 65: 1228–33
- [231] Waaijenborg S, Hahne SJ, Mollema L, *et al.* (2013) **Waning of maternal antibodies against measles, mumps, rubella, and varicella in communities with contrasting vaccination coverage.** J Infect Dis 2013; 208: 10–16
- [232] Gustafson TL, Lievens AW, Brunell PA, *et al.* (1987) **Measles outbreak in a fully immunized secondary-school population.** N.Engl.J.Med. 316, 771-774
- [233] Durrheim DN, Crowcroft NS & Strebel PM (2014) **Measles—the epidemiology of elimination.** Vaccine 2014; 32: 6880– 83
- [234] Phadke VK, Bednarczyk RA, Salmon DA & Omer SB (2016) **Association between vaccine refusal and vaccine-preventable diseases in the United States: A review of measles and pertussis.** JAMA 2016; 315: 1149–58
- [235] Paniz-Mondolfi AE, Tami A, Grillet ME, *et al.* (2019) **Resurgence of Vaccine-Preventable Diseases in Venezuela as a Regional Public Health Threat in the Americas.** Emerg Infect Dis. 2019;25(4):625-632
- [236] Perry RT, Gacic-Dobo M, Dabbagh A, *et al.* (2014) **Progress toward regional measles elimination - worldwide, 2000-2013.** Morbidity and Mortality Weekly Report. 2014; 63(45): 1034-8
- [237] All Africa. **Liberia, Chad Top Measles Deaths.** Accessible al link: <http://allafrica.com/stories/201603290762.html>
- [238] World Health Organization (WHO). Regional Office for Africa. Accessible al link: <https://www.afro.who.int/node/11663>
- [239] Sharara SL & Kanj SS (2014) **War and infectious diseases: challenges of the Syrian civil war.** PLoS pathogens, 2014;10(10):e1004438
- [240] Thapa A, Khanal S, Sharapov U, *et al.* (2015) **Progress toward Measles elimination – South-East Asia Region, 2003-2013.** Morbidity and Mortality Weekly Report. 2015; 64: 613-617
- [241] Takashima Y, Schluter WW, Mariano KML, *et al.* (2015) **Progress toward measles elimination, Philippines, 1998-2014.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2015;64:357e62
- [242] World Health Organization (WHO). Western Pacific Region. **Health Information and Intelligence Platform (HIIP).** Accessible al link: <http://hiip.wpro.who.int/portal/Dashboards/Immunization/Immunizationdashboards/TabId/169/ArtMID/905/ArticleID/235/Measles.aspx>
- [243] Centers for Disease Control and Prevention (CDC) **Measles - United States, January-July 2008.** Morbidity and Mortality Weekly Report. 2008; 57: 89
- [244] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Measles cases and outbreaks.** Accessible al link: <http://www.cdc.gov/measles/cases-outbreaks.html>
- [245] Halsey NA & Salmon DA (2015) **Measles at Disneyland, a problem for all ages.** Annals of Internal Medicine. 2015; 162: 655-656
- [246] Olive JK, Hotez PJ, Damania A & Nolan MS (2018) **The state of the antivaccine movement in the United States: A focused examination of nonmedical exemptions in states and counties.** PLoS Med. 2018; 15(7):e1002578

- [247] Pan American Health Organization / World Health Organization. **Epidemiological Update: Measles**. 18 June 2019, Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2019
- [248] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) **Who is at risk for measles in the EU/EEA? Identifying susceptible groups to close immunity gaps towards measles elimination**. Stockholm: ECDC; 2019
- [249] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). **Monthly measles and rubella monitoring report, October 2017**. Stockholm: ECDC; 2017
- [250] World Health Organization (WHO). Regional Office for Europe. **Seventh meeting of the European Regional Verification Commission for measles and rubella elimination (RVC); 13–15 June 2018, Paris France**. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe 2018
- [251] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). **Monthly measles and rubella monitoring report February 2019**. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2019
- [252] World Health Organization (WHO). Regional office for Europe. **7th meeting of the European Regional Verification Commission for Measles and Rubella Elimination (RVC). Report (2018)** Accessibile al link: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0008/378926/7th-RVC-Meeting-Report-FINAL.pdf?ua=1
- [253] World Health Organization (WHO). Regional office for Europe. **European Vaccine Action Plan 2015-2020 Midterm report** Accessibile al link: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0007/381184/evap-midterm-report-eng.pdf?ua=1
- [254] World Health Organization (WHO). Regional office for Europe. **8th meeting of the European Regional Verification Commission for Measles and Rubella Elimination (RVC). Report (2019)** Accessibile al link: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0019/413236/8th-RVC-Report.pdf?ua=1
- [255] Santibanez S, Hübschen JM, Ben Mamou MC, *et al.* (2017) **Molecular surveillance of measles and rubella in the WHO European Region: new challenges in the elimination phase**. Clin Microbiol Infect. 2017; 23:516-523
- [256] Unicef. **Over 20 million children worldwide missed out on measles vaccine annually in past 8 years, creating a pathway to current global outbreaks**. Accessibile al link: <https://www.unicef.org/press-releases/over-20-million-children-worldwide-missed-out-measles-vaccine-annually-past-8-years>
- [257] Santibanez S, Proscenc K, Lohr D, *et al.* (2014) **Measles virus spread initiated at international mass gatherings in Europe, 2011**. Eurosurveillance 2014;19. pii¼20891
- [258] Istituto Centrale di Statistica. **Cause di Morte**, serie III, volume II. Roma 1953
- [259] Pezzotti P, Bellino S, Prestinaci F, *et al.* (2018) **The impact of immunization programs on 10 vaccine preventable diseases in Italy: 1900–2015**. Vaccine.2018;36:1435
- [260] Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT) **La mortalità dei bambini ieri e oggi in Italia;** 2014
- [261] Istituto superiore di sanità - Centro nazionale per la prevenzione delle malattie e la promozione della salute **Morbillo;** 2018
- [262] Conferenza stato regioni seduta del 13 novembre 2003. **Accordo tra il Ministro della salute, le Regioni e le Province Autonome sul documento recante: “Piano nazionale per l’eliminazione del morbillo e della rosolia congenita”**. Accessibile al link: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_730_allegato.pdf

- [263] EpiCentro. Il portale dell'epidemiologia per la sanità pubblica, a cura dell'Istituto superiore di sanità. **Morbillo - Aspetti epidemiologici in Italia : Istituto superiore di sanità - Centro nazionale per la prevenzione delle malattie e la promozione della salute**; 2018 Accessibile al link: <http://www.epicentro.iss.it/problemi/morbillo/epidItalia.asp>
- [264] Istituto superiore di sanità. **Morbillo & Rosolia news -Rapporto N° 34. 2017** Accessibile al link: http://www.salute.gov.it/portale/temi/documenti/morbillo/Bollettino_morbillo_34-2017.pdf
- [265] Istituto superiore di sanità. **Morbillo & Rosolia news -Rapporto N° 37. Gennaio 2018** Accessibile al link: https://www.epicentro.iss.it/morbillo/bollettino/RM_News_2018_37%20def.pdf
- [266] Ministero della Salute **Situazione epidemiologica del morbillo – Indicazioni operative per la gestione dell'epidemia in atto**. Circolare N. 10740 del 4 aprile 2017. Accessibile al link: <http://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2017&codLeg=58889&parte=1%20&serie=null>
- [267] Centers for Disease Control and Prevention (CDC) **CDC reminds travelers to Europe: Protect against measles** Accessibile al link: <https://www.cdc.gov/media/releases/2017/p0719-europe-measles.html>
- [268] Istituto superiore di sanità. **Morbillo & Rosolia news -Rapporto N° 43. Luglio 2018** Accessibile al link: https://www.epicentro.iss.it/morbillo/bollettino/RM_News_2018_43.pdf
- [269] Istituto superiore di sanità. **Morbillo & Rosolia news -Rapporto N° 53. Giugno 2019** Accessibile al link: https://www.epicentro.iss.it/morbillo/bollettino/RM_News_2019_53.pdf
- [270] Measles and Rubella Initiative. A global partnership to stop measles and rubella. Accessibile al link: <https://measlesrubellainitiative.org/>
- [271] World Health Organization (WHO). Regional office for Europe. **Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection. WHO European Region strategic plan 2005–2010**. Accessibile al link: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0008/79028/E87772.pdf
- [272] World Health Organization (WHO). Regional office for Europe. **Regional Committee for Europe Sixtieth session. Moscow, 13-16 Septemeber 2010** Accessibile al link: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0008/119546/RC60_edoc15.pdf
- [273] World Health Organization (WHO). Regional Office for Europe. **European Vaccine Action Plan 2015-2020**. Copenhagen: World Health Organization; 2015. Accessibile al link: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0007/255679/WHO_EVAP_UK_v30_WEBx.pdf
- [274] World Health Organization (WHO). **Global measles and rubella strategic plan: 2012-2020**. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2012. Accessibile al link: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44855/1/9789241503396_eng.pdf
- [275] World Health Organization (WHO). **Measles fact sheet, reviewed March 2016**. Accessibile al link: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en>
- [276] Orenstein WA, Hinman A, Nkowane B, *et al.* (2018) **Global measles and rubella strategic plan: 2012-2020, Midterm Review. 2012** Vaccine. 2018 Jan 11;36 Suppl 1:A1-A34
- [277] Ciofi M, Azzari C, Bartolazzi G, *et al.* (2011) **Il Piano nazionale per l'eliminazione del morbillo e della rosolia congenita 2010-2015**. Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica, 2011; 34: 38

- [278] Ministero della Salute. **Decreto legge 7 giugno 2017, n. 73, Disposizioni urgenti in materia di prevenzione vaccinale, come modificato dalla Legge di conversione 31 luglio 2017, n. 119.** Rome: Ministry of Health; Accessibile al link: <http://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/dettaglioAtto?id=60201>
- [279] D'Ancona F, D'Amario C, Maraglino F, *et al.* (2018) **Introduction of new and reinforcement of existing compulsory vaccinations in Italy: first evaluation of the impact on vaccination coverage in 2017.** Euro Surveill. 2018;23(22):1800238
- [280] Ministero della Salute. **Vaccinazioni dell'età pediatrica e dell'adolescente - Coperture vaccinali** Rome: Ministry of Health, 2018 Accessibile al link: http://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_8_3_1.jsp?lingua=italiano&id=20
- [281] World Health Organization. **Measles Nucleotide Surveillance database.** Accessibile al link: <http://www.who-measles.org>
- [282] Rota PA, Brown K, Mankertz A, *et al.* (2011) **Global distribution of measles genotypes and measles molecular epidemiology.** Journal of Infectious Disease. 2011; 204 Suppl 1: S514-23
- [283] World Health Organization (WHO) (1998) **Standardization of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses.** Wkly Epidemiol Rec. 1998; 73:265-272
- [284] World Health Organization (WHO) (2012) **Measles virus nomenclature update: 2012** Wkly Epidemiol Rec. (3) 2012; 9(87):73-80
- [285] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Measles (Rubeola).** Accessibile al link: <http://www.cdc.gov/measles/lab-tools/genetic-analysis.html>
- [286] Hiebert J & Saverini A (2014) **Measles molecular epidemiology: what does it tell us and why is it important?** Canada Communicable Disease Report. 2014; 40(12)
- [287] World Health Organization (WHO) (1998) **Expanded Programme on Immunization (EPI). Standardization of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses.** Wkly Epidemiol Rec 1998, 73:265-269
- [288] World Health Organization (WHO) (2001) **Nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses (update). Part I.** Wkly Epidemiol Rec 2001, 76:242-247
- [289] Perry RT, Murray JS, Gacic-Dobo M, *et al.* (2015) **Progress toward regional measles elimination—worldwide, 2000–2014.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2015; 64: 1246–51
- [290] World Health Organization (WHO) (2015) **Genetic diversity of wild-type measles viruses and the global measles nucleotide surveillance database (means).** Wkly. Epidemiol. Rec. 2015, 90, 373–380
- [291] Ndongo D, Ameth F, Rouguiyatou K, *et al.* (2015) **Epidemiology and genetic characterization of Measles strains in Senegal, 2004-2013.** PLoS One, 2015; 10
- [292] Vaidya SR, Wairagkar NS, Raja D, *et al.* (2008) **First detection of measles genotype D7 from India.** Virus Genes, 2008;36: 31-34
- [293] Li S, Qian X, Yuan Z, *et al.* (2014) **Molecular epidemiology of measles virus infection in Shanghai in 2000-2012: the first appearance of genotype D8** The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2014; 18: 581-590
- [294] Katz SL, Rota PA, Rota JS, *et al.* (2004) **Genetic Analysis of Measles Viruses Isolated in the United States between 1989 and 2001: Absence of an Endemic Genotype since 1994.** The Journal of Infectious Diseases, 2004; 189 Suppl 1: S160–S164

- [295] Orenstein WA, Hinman AR & Papania MJ (2004) **Evolution of Measles Elimination Strategies in the United States**. The journal of infectious diseases, 2004; 189 Suppl 1: S17–S22
- [296] Bellini WJ & Rota PA (1998) **Genetic diversity of wild-type measles viruses: implications for global measles elimination programs**. Emerg Infect Dis. 1998; 4(1): 29–35
- [297] Rima BK, Earle JAP, Yeo RP, *et al.* (1995) **Temporal and geographical distribution of measles virus genotypes**. J Gen Virol. 1995;76:1173e80
- [298] Santibanez S, Tischer A, Heider A, *et al.* (2002) **Rapid replacement of endemic measles virus genotypes**. J Gen Virol. 2002;83:2699e708
- [299] Shulga SV, Rota PA, Kremer JR, *et al.* (2009) **Genetic variability of wild-type measles viruses, circulating in the Russian Federation during the implementation of the National Measles Elimination Program, 2003-2007**. Clin Microbiol Infect. 2009;15:528e37
- [300] Kopel E, Amitai Z, Savion M, *et al.* (2012) **Ongoing African measles virus genotype outbreak in Tel Aviv district since April, Israel, 2012**. Euro Surveill. 2012;17:pii=20272
- [301] Rota J, Lowe L, Rota P, *et al.* (2006) **Identical genotype B3 sequences from measles patients in 4 countries, 2005**. Emerg Infect Dis. 2006;12:1779e81
- [302] Wairagkar N, Chowdhury D, Vaidya S, *et al.* (2011) **Molecular epidemiology of measles in India, 2005-2010**. J Infect Dis. 2011;204(S1):403e13
- [303] World Health Organization (WHO). Regional Office for Europe. **WHO EpiBrief No. 1/2014**. Accessibile al link: http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0005/247487/EpiBrief_1_2014_FINAL_REVISED.pdf?ua=1
- [304] World Health Organization (WHO). Regional Office for Europe. **WHO EpiBrief No. 1/2016**. Accessibile al link: http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0009/313020/EpiBrief_EpiData_1_2016-rev1.pdf?ua=1
- [305] Chironna M, Prato R, Sallustio A, *et al.* (2007) **Genetic characterization of measles virus strains isolated during an epidemic cluster in Puglia, Italy 2006-2007**. Virology Journal. 2007; 4:90
- [306] Urone N, Colomba C & Ferraro D (2016) **Characterization of measles virus strains circulating in Southern Italy (Palermo area, Sicily) between 2010 and 2011**. Infect Gen Evol. 2016;38:117-121
- [307] Piccirilli G, Chierighin A, Pascucci MG, *et al.* (2016) **Molecular detection and genetic characterization of circulating measles virus in northern Italy**. J Clin Virol. 2016;81:34-42
- [308] Magurano F, Baggieri M, Fortuna C, *et al.* (2015) **Measles elimination in Italy: data from laboratory activity, 2011-2013**. Journal of Clinical Virology. 2015; 64:34-39.
- [309] Filia A, Amendola A, Faccini M, *et al.* (2016) **Outbreak of a new measles B3 variant in the Roma/Sinti population with transmission in the nosocomial setting, Italy, November 2015 to April 2016**. Euro Surveill, 2016; Vol. 21
- [310] Magurano F, Baggieri M, Mazzilli F, *et al.* (2019) **Measles in Italy: Viral strains and crossing borders** Int J Infect Dis. 2019 Feb;79:199-201
- [311] MoRoNet. Liberi da morbillo e rosolia. Accessibile al link: <http://moronetlab.it/index.php/la-rete/>

- [312] World Health Organization (WHO). **Vaccine-Preventable Diseases Surveillance Standards WHO Last updated: October 15, 2018** Accessibile al link: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/WHO_SurveillanceVaccinePreventable_11_Measles_R2.pdf?ua=1
- [313] World Health Organization (WHO). **Manual for the laboratory-based surveillance of measles, rubella, and congenital rubella syndrome, 3rd edition.** Geneva: World Health Organization; 2018 Accessibile al link: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/laboratory/manual/en
- [314] Bankamp B, Lopareva EN, Kremer JR, *et al.* (2008) **Genetic variability and mRNA editing frequencies of the phosphoprotein genes of wild-type measles viruses.** *Virus Res.* 2008; 135: 298–306
- [315] Kessler JR, Kremer JR, Shulga SV, *et al.* (2011) **Revealing new measles virus transmission routes by use of sequence analysis of phosphoprotein and hemagglutinin genes.** *J Clin Microbiol.* 2011; 49:677–683
- [316] Official Journal of the European Communities. **Commission Decision of 19 March 2002 laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council.** Accessibile al link: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:086:0044:0062:EN:PDF>
- [317] Sniadack DH, Crowcroft NS, Durrheim DN & Rota PA (2017) **Roadmap to elimination-standard measles and rubella surveillance** *Wkly Epidemiol Rec.* 2017;92(9-10):97-105
- [318] Istituto Superiore di Sanità (ISS). **La sorveglianza integrata morbillo-rosolia e la sorveglianza della rosolia congenita e in gravidanza in vista dell'obiettivo di eliminazione Roma 26 giugno 2015** Accessibile al link: [Http://www.epicentro.iss.it/problemi/morbillo/pdf/workshop2015/Melissa%20Baggieri.%20Sorveglianza%20di%20laboratorio,importanza%20del%20campionamento%20final.pdf](http://www.epicentro.iss.it/problemi/morbillo/pdf/workshop2015/Melissa%20Baggieri.%20Sorveglianza%20di%20laboratorio,importanza%20del%20campionamento%20final.pdf)
- [319] Hubschen JM, Kremer JR, De Landtsheer S, *et al.* (2008) **A multiplex TaqMan PCR assay for the detection of measles and rubella virus.** *J Virol Methods.* 2008;149(2): 246-250
- [320] Hall T (1999) **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucleic Acids Symposium Series.* 1999; 41:95-98
- [321] Penedos AR, Myers R, Hadeef B, *et al.* (2015) **Assessment of the Utility of Whole Genome Sequencing of Measles Virus in the Characterisation of Outbreaks.** *PLoS One.* 2015;10(11):e014308
- [322] Amendola A, Bianchi S, Lai A, *et al.* (2017) **Measles re-emergence in Northern Italy: Pathways of measles virus genotype D8, 2013–2014.** *Infect Genet Evol.* 2017;48:120-126
- [323] World Health Organization (WHO). Regional Office for Europe. **Eliminating Measles and Rubella. Framework for the Verification Process in the WHO European Region.** Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2014
- [324] Istituto superiore di sanità. **Morbillo & Rosolia news -Rapporto N° 54 luglio 2019** Accessibile al link: https://www.epicentro.iss.it/morbillo/bollettino/RM_News_2019_54.pdf
- [325] Filia A, Bella A, Del Manso M, *et al.* (2017) **Ongoing outbreak with well over 4,000 measles cases in Italy from January to end August 2017 – what is making elimination so difficult?** *Euro Surveill.* 2017;22(37):pii=30614

- [326] European Centre for Disease Prevention and Control (2017) **Epidemiological update: Measles - monitoring European outbreaks, 7 July 2017**. ECDC. Accessibile al link: <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-measles-monitoring-european-outbreaks-7-july-2017>
- [327] Botelho-Nevers E, Gautret P, Biellik R & Brouqui P (2012) **Nosocomial transmission of measles: an updated review**. *Vaccine*. 2012;30(27):3996-4001
- [328] Brown KE, Rota PA, Goodson JL, *et al.* (2019) **Genetic Characterization of Measles and Rubella Viruses Detected Through Global Measles and Rubella Elimination Surveillance, 2016–2018** *Weekly / July 5, 2019 / 68(26);587–591*
- [329] Government of Canada. **Measles & Rubella Weekly Monitoring Report – Week 6, 2019: February 3 to February 9, 2019** Accessibile al link: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/diseases-conditions/measles-rubella-surveillance/2019/week-6-february-3-february-9-2019.html>
- [330] Pan American Health Organization (PAHO) **Epidemiological Update Measles 18 April 2019**. Accessibile al link: <https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/2019-april-18-phe-epi-update-measles.pdf>
- [331] Rota PA & Bankamp B (2015) **WGS During Measles Outbreaks**. *J Infect Dis*. 2015;212:1529–30
- [332] Chen RT, Markowitz LE, Albrecht P, *et al.* (1990) **Measles antibody: reevaluation of protective titers**. *J Infect Dis* 1990; 162:1036–42
- [333] Samb B, Aaby P, Whittle HC, *et al.* (1995) **Serologic status and measles attack rates among vaccinated and unvaccinated children in rural Senegal**. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:203–9
- [334] Poland GA, Jacobson RM, Thampy AM, *et al.* (1997) **Measles reimmunization in children seronegative after initial immunization**. *JAMA*. 1997;277(14):1156–1158
- [335] Haralambieva IH, Ovsyannikova IG, O'Byrne M, *et al.* (2001) **A large observational study to concurrently assess persistence of measles specific B-cell and T-cell immunity in individuals following two doses of MMR vaccine**. *Vaccine*. 2001;29(27):4485–4491
- [336] Glass K & Grenfell BT (2004) **Waning immunity and subclinical measles infections in England**. *Vaccine*. 2004;22(29–30):4110–4116
- [337] Sundell N, Dotevall L, Sansone M, *et al.* (2019) **Measles outbreak in Gothenburg urban area, Sweden, 2017 to 2018: low viral load in breakthrough infections**. *Euro Surveill*. 2019 Apr;24(17)
- [338] Cherry JD & Zahn M (2018) **Clinical Characteristics of Measles in Previously Vaccinated and Unvaccinated Patients in California**. *Clin Infect Dis*. 2018 Oct 15;67(9):1315-1319
- [339] Fiebelkorn AP, Coleman LA, Belongia EA, *et al.* (2015) **Measles virus neutralizing antibody response, cell-mediated immunity, and IgG antibody avidity before and after a third dose of measles-mumps-rubella vaccine in young adults**. *J Infect Dis*. 2016 Apr 1;213(7):1115-23
- [340] Markowitz LE, Sepulveda J, Diaz-Ortega JL, *et al.* (1990) **Immunization of six-month-old infants with different doses of Edmonston-Zagreb and Schwarz measles vaccines**. *N Engl J Med*. 1990 Mar 1;322(9):580-7
- [341] Julik E & Reyes-Del Valle J (2016) **Generation of a More Immunogenic Measles Vaccine by Increasing Its Hemagglutinin Expression**. *J Virol*. 2016 May 12;90(11):5270-5279

- [342] Miyoshi M, Komagome R, Yamaguchi H, *et al.* (2018) **Genetic characterization of hemagglutinin protein of measles viruses in Hokkaido district, Japan, 2006–2015.** *Microbiol Immunol.* 2018;62(6):411-417
- [343] Ciceri G, Canuti M, Bianchi S, *et al.* (2019) **Genetic variability of the measles virus hemagglutinin gene in B3 genotype strains circulating in Northern Italy.** *Infect Genet Evol.* 2019 Jun 28;75:103943

MATERIALE SUPPLEMENTARE

ALLEGATO 6

Modello scheda per l'invio dei campioni ad un laboratorio della Rete MoRoNet, per la conferma di laboratorio dei casi di morbillo, rosolia e parotite

REGIONE _____ ASL _____ COMUNE _____

DATI ANAGRAFICI DEL PAZIENTE

Cognome e nome Sesso M F
Nato il^a Provincia
Domicilio: Comune Provincia
Residenza (se diversa da domicilio):
Comune Provincia

DIAGNOSI CLINICA

Morbillo Rosolia Parotite

STATO VACCINALE

Precedente vaccinazione contro morbillo, rosolia, parotite e varicella.

No Non so, non ricordo

Vaccino MPR

Sì, 1 dose Sì, 2 dosi Sì, non ricordo le dosi

Vaccino MPRV

Sì, 1 dose Sì, 2 dosi Sì, non ricordo le dosi

Sì solo Morbillo Sì solo Parotite Sì solo Rosolia Sì solo Varicella

Se sì, quando ha effettuato l'ultima dose (gg/mm/aaaa): ____/____/____
(gg/mm/aaaa)

DATI CLINICI

Data di comparsa dell'esantema o della tumefazione parotidea: (gg/mm/aaaa) ____/____/____

Tipo di prelievo: Sangue Saliva Urine Altro (Specificare:)

Data del prelievo (gg/mm/aaaa): ____/____/____

Il caso appartiene ad un focolaio? No Sì Non so

Medico referente (a cui inviare i risultati di laboratorio):

Nome Cognome

Struttura:

Via Comune: Provincia

N° di telefono N.Fax: Email:

Supplemento A Allegato 6. Scheda standard di accompagnamento per ogni campione biologico inviato al Laboratorio Nazionale di Riferimento o al Laboratorio Regionale di Riferimento.

Ministero della Salute, Aggiornamento del sistema di sorveglianza integrata del morbillo e della rosolia, per il rafforzamento degli obiettivi di eliminazione (http://moronetlab.it/wp-content/uploads/2019/01/aggiornamento_circolare_sorvegliazaintegratamorbillo_12_nov2018.pdf).