



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
METODOLOGIE IN MEDICINA PREVENTIVA E TERAPIA

CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO XXII

Titolo della tesi

STUDIO E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI  
ROTAVIRUS CIRCOLANTI IN ALBANIA ED IN DIFFERENTI  
AREE ITALIANE.

Dr.ssa Petrinca Anna Rita

A.A. 2009/2010

Docente Guida: Prof. Maurizio Divizia

Coordinatore: Prof. Giovanni Rocchi

## INDICE

PRESENTAZIONE DELLO STUDIO	<i>Pag.1</i>
I ROTAVIRUS	
<i>La virologia</i>	<i>Pag.4</i>
<i>Sierotipi e genotipi dei Rotavirus</i>	<i>Pag.6</i>
<i>Modalità di trasmissione</i>	<i>Pag.8</i>
<i>Diagnosi</i>	<i>Pag.8</i>
<i>Quadro clinico e terapia</i>	<i>Pag.9</i>
EPIDEMIOLOGIA DEI ROTAVIRUS E PROFILASSI VACCINALE ANTI-RV	<i>Pag.11</i>
MATERIALI E METODI	
<i>Progettazione del piano di ricerca e campionamento</i>	<i>Pag.17</i>
<i>Screening dei campioni Rotavirus-positivi</i>	<i>Pag.19</i>
<i>Genotipizzazione dei Rotavirus isolati</i>	<i>Pag.23</i>
<i>Studio e analisi delle sequenze genomiche virali</i>	<i>Pag.29</i>
RISULTATI	
<i>Screening dei campioni Rotavirus-positivi</i>	<i>Pag.30</i>
<i>Determinazione del genotipo virale</i>	<i>Pag.32</i>
<i>Analisi filogenetica</i>	<i>Pag.36</i>
CONCLUSIONI	<i>Pag.43</i>
BIBLIOGRAFIA	<i>Pag.46</i>

## PRESENTAZIONE DELLO STUDIO

I Rotavirus (RV) sono diffusi in tutto il mondo e sono la principale causa di gastroenterite acuta nell'infanzia. Ogni anno nel mondo i RV sono responsabili di circa 114 milioni di episodi di diarrea, 2,4 milioni di ospedalizzazioni e più di 600.000 decessi nei bambini di età inferiore ai 5 anni (Greenberg HB, Estes MK 2009) (WHO). L'onere della malattia non è limitato ai soli Paesi in via di sviluppo: si stima che negli Stati Uniti i RV causino in un anno 20-60 morti, 55.000-70.000 ospedalizzazioni e 410.000 visite mediche (Fischer TK et al. 2007), mentre in Europa ogni anno avvengono 3,6 milioni di casi tra i bambini con età inferiore ai 5 anni, con 231 morti, quasi 87.000 ricoveri, 700.000 visite ambulatoriali e 2,8 milioni di casi gestiti a domicilio (Soriano-Gabarrò M et al. 2006). In Italia si effettuano ogni anno circa 40.000 ricoveri per gastroenterite con pazienti di età <5 anni, con una degenza media di 4,7 giorni e un costo di circa 60 milioni di euro ogni anno per il Servizio Sanitario Nazionale (SSN) ([www.epicentro.iss.it](http://www.epicentro.iss.it)).

Dei cinque gruppi (A-E) di RV noti, quelli del gruppo A sono responsabili della maggioranza dei casi nell'uomo e di ampia parte delle infezioni in animali domestici. I RV del gruppo A sono a loro volta distinti in sierotipi e/o genotipi e finora sono state identificate 19 varianti G (proteina Vp7, gene 9) e 28 varianti P (proteina Vp4, gene 4); per la natura segmentata del genoma virale (11 segmenti) sono possibili 42 combinazioni sierotipiche G-P in seguito ad eventi di riassortimento genico in caso di infezione di un unico soggetto con due ceppi virali distinti. Inoltre, nonostante ciascuna specie animale appare infettarsi con

specifici ceppi virali, il salto di specie ospite e la trasmissione zoonotica dei RV è stata documentata in svariate occasioni (Tsugawa T, Hoshino Y 2008). I RV si comportano pertanto come i virus influenzali, proponendo il rischio costante dell'evoluzione di ceppi pandemici, particolarmente aggressivi e/o diversi antigenicamente.

Nonostante le combinazioni antigeniche teoriche G-P siano numerose, la maggior parte dei ceppi umani diffusi nel mondo appartengono ai sierotipi G1, G2, G3, G4 e G9, combinati con P[4], P[8] o P[6]. In particolare, le formule antigeniche G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8] rappresentano la maggioranza di quelle riscontrate in Europa e negli Stati Uniti. Esistono tuttavia eccezioni, quali ad esempio G8P[6], G2P[6] e soprattutto G9P[6] e G9P[11], quest'ultimi isolati nell'uomo dal 1999 in tutto il mondo. La recente introduzione in Italia e in Europa di due vaccini vivi attenuati anti-RV rende urgente il monitoraggio dei tipi virali circolanti già nel periodo precedente le campagne vaccinali. Questo infatti appare essere l'unico metodo per giudicare in merito alla congruità delle formule antigeniche dei vaccini da porre in commercio e per valutare gli effetti della vaccinazione di massa sul pool di sierotipi di RV già circolanti e quindi predisporre eventuali modifiche alle formule antigeniche vaccinali. Inoltre è necessario monitorare l'eventuale emergenza di nuove varianti antigeniche virali a seguito della forte pressione selettiva esercitata dalla vaccinazione sulle popolazioni di RV preesistenti. Infine, la sorveglianza epidemiologica molecolare è in grado di verificare il livello di cross-protezione fornito dai diversi vaccini.

Questo progetto ha avuto l'obiettivo principale di sorvegliare la diffusione dei diversi ceppi di RV nella popolazione infantile attraverso

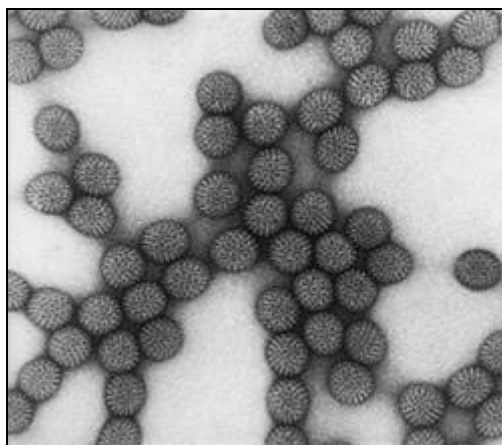
lo studio di pazienti pediatrici ospedalizzati o visitati in pronto soccorso per enterite acuta. E' stata organizzata una rete di centri ospedalieri pediatrici in due diverse regioni italiane, Lazio e Puglia, al fine di evidenziare differenze epidemiologiche legate alla geografia nazionale. Inoltre nel progetto è stato coinvolto il Policlinico Universitario Madre Teresa di Tirana, centro di riferimento nazionale con un campione rappresentativo delle forme di diarrea gravi che colpiscono la popolazione pediatrica in Albania, al fine di evidenziare una possibile co-circolazione di ceppi virali tra il nostro Paese e l'Albania, considerando il continuo movimento della popolazione. Dal 2001 al 2007, soprattutto durante i mesi invernali, i centri arruolati hanno provveduto alla raccolta e conservazione dei campioni: per ciascun caso è stato raccolto un campione di feci in fase acuta, il quale è stato esaminato per la presenza dei RV mediante RT-PCR per il gene Vp6, una proteina altamente antigenica che costituisce l'80% del *core* virale. I campioni positivi sono stati successivamente sottoposti a caratterizzazione molecolare mediante test di nested-RT-PCR per i geni 4 e 9, al fine di identificare il genotipo binario G-P, secondo protocolli standardizzati a livello internazionale e migliorati con modifiche sia nei reagenti di reazione che nei protocolli termici. La genotipizzazione dei ceppi di RV è stata eseguita presso il laboratorio di virologia della cattedra di Igiene, Dipartimento di Sanità Pubblica e Biologia Cellulare della Facoltà di Medicina di Tor Vergata. E' stato infine condotto il sequenziamento nucleotidico dei geni in questione per valutare la possibile diversità genomica tra ceppi virali di identico tipo G in zone geografiche differenti. I dati di caratterizzazione virale sono stati infine raccolti e quindi elaborati.

## I ROTAVIRUS

### 1. VIROLOGIA

I Rotavirus (RV) sono virus ad RNA appartenenti alla famiglia dei Reoviridae con aspetto al microscopio elettronico a ruota (fig.1)

**Figura 1:** RV al microscopio elettronico.

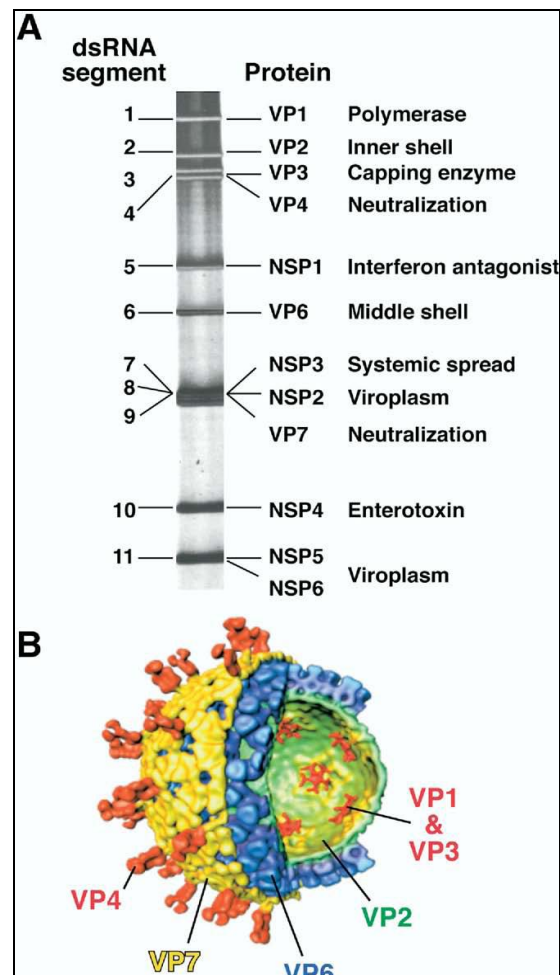


[techalive.mtu.edu/meec/module02/Viruses.htm](http://techalive.mtu.edu/meec/module02/Viruses.htm)

La particella virale icosaedrica dal diametro di circa 70 nm è composta di tre strati: il capsid esterno, il capsid interno (*core*) e il nucleo centrale, che racchiude il genoma virale costituito da 11 segmenti di RNA a doppio filamento per un totale di circa 19.000 basi. Ogni segmento di RNA codifica per una proteina virale, di tipo strutturale (Vps) e non (NSPs), ad eccezione dei geni 9 e 11 che ne codificano due (fig.2A). Le sei proteine non strutturali NSP1-NSP6 sono sintetizzate nelle cellule infette durante la replicazione del virus e intervengono nelle varie fasi della replicazione virale, della patogenesi e della risposta immunitaria all'infezione. Il capsid interno è costituito da quattro proteine (Vp1, Vp2, Vp3 e Vp6): la più rappresentata è la proteina Vp6 che costituisce l'80% del *core*; essa è

altamente antigenica e viene utilizzata per identificare i RV. Il capside esterno è costituito da due proteine strutturali: la proteina Vp4 lega le molecole recettore sulla superficie delle cellule e media l'ingresso del virus nella cellula, mentre la proteina Vp7 è una glicoproteina sensibile alle proteasi coinvolta nell'immunità alle infezioni (fig.2B) (Greenberg HB and Estes MK 2009) (Surendran S. 2008).

**Figura 2.** Struttura e proteine dei RV.



(A) Elettroforesi con gel di poliaccrilamide del genoma virale dei RV costituito da 11 segmenti a doppio filamento di RNA.

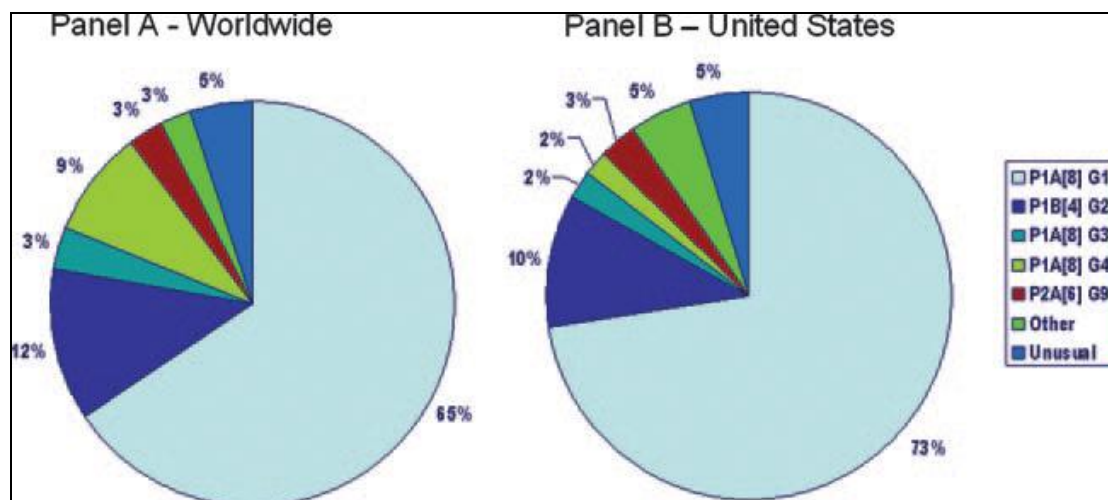
(B) La struttura virale secondo una ricostruzione fatta con criomicroscopia elettronica: la figura mostra le proteine componenti di ogni strato capsidico.

## 2. SIEROTIPI E GENOTIPI DEI RV

In base alla diversità antigenica e genomica, i RV sono classificati in 7 gruppi (indicati con le lettere da A a G) ed il gruppo A in 4 sottogruppi. Il gruppo A non presenta relazioni con gli altri gruppi e include i comuni patogeni umani. Il gruppo B è stato identificato come responsabile di una grave malattia dell'infanzia e degli adulti in Cina, ma non nel resto del mondo. Occasionalmente si verificano epidemie di RV del gruppo C. Tutti e sette i gruppi causano malattia negli animali. In base alle caratteristiche antigeniche delle proteine Vp7 e Vp4 si conoscono almeno 19 sierotipi G e 28 sierotipi P, con 14 identificati nell'uomo. Il sierotipo dei RV è dunque definito da una doppia combinazione G-P in base alle due proteine Vp7 e Vp4. Mentre per i tipi G vi è una completa concordanza tra sierotipo e genotipo, ciò non accade per i tipi P: il sierotipo è indicato con un numero che segue la lettera P (es. P1, P2), mentre il genotipo è indicato con un numero tra parentesi quadra (es. P[12]) (Desselberger U et al. 2006). I RV umani mostrano quindi una enorme diversità: i geni che codificano le proteine Vp4 e Vp7 possono segregare indipendentemente, dando luogo a ceppi diversi con almeno 42 possibili combinazioni sierotipiche P-G. Tuttavia, solo alcune combinazioni sono presenti nel mondo, e cioè quelle costituite dai sierotipi G1, G2, G3, G4, G9, combinati con i genotipi P1B[4], P2A[6] e P1A[8]. In un recente studio, è risultato che i quattro tipi G1, G2, G3, e G4 in combinazione con P1A[8] o P1B[4] rappresentano oltre l'88% dei ceppi isolati, mentre le combinazioni tra il sierotipo emergente G9 e i genotipi P1A[8] o P2A[6] rappresentano circa il 4% dei ceppi isolati a livello mondiale (fig.3) (Dennehy PH 2008).



**Figura 3.** Distribuzione dei sierotipi dei RV nel mondo e negli Stati Uniti.



- (A) Distribuzione globale dal 1989 al 2004. I sierotipi G1, G2, G3 e G4 rappresentano oltre l'88% dei RV isolati in tutto il mondo. Il sierotipo P1A[8] rappresenta oltre l'80% dei RV isolati in tutto il mondo.
- (B) Distribuzione negli Stati Uniti dal 1973 al 2003. I sierotipi G1, G2, G3 e G4 rappresentano oltre il 97% dei RV isolati negli Stati Uniti. Il sierotipo P1A[8] rappresenta oltre l'80% dei RV isolati negli Stati Uniti.

La distribuzione dei sierotipi G e P differisce geograficamente. Il P1A[8]-G1 è il ceppo predominante a livello mondiale, con oltre il 70% delle infezioni in America del Nord (fig. 3B), Europa e Australia, ma con solo il 30% delle infezioni in Sud America e Asia e il 23% in Africa. Il G9 costituisce il ceppo predominante in alcune parti dell'Asia, dell'Africa e dell'America del Sud dove è stato isolato anche il ceppo G5 in bambini con diarrea, mentre il ceppo G8 è stato più frequentemente isolato in Africa. Per quanto riguarda la distribuzione dei genotipi P, il ceppo P2A[6] costituisce oltre il 50% dei ceppi circolanti in Africa, mentre P1A[8] è associato con la maggior parte dei ceppi isolati nel resto del mondo.

### 3. MODALITÀ DI TRASMISSIONE

La trasmissione avviene generalmente per via feco-orale, ma è stata osservata la presenza dei RV anche nelle secrezioni respiratorie e in altri fluidi fisiologici se pur in quantità ridotte. La trasmissione feco-orale, cioè quella che gli anglosassoni chiamano delle “quattro F” (food, finger, feces, flies), è quella più frequente nei bambini proverbialmente avvezzi a toccare qualsiasi oggetto con le mani e poi a portarle alla bocca. E' possibile anche la trasmissione per via respiratoria o per contatto. IgA specifiche sono state ritrovate nelle secrezioni faringee di pazienti con diarrea, e gli antigeni sono stati evidenziati nelle secrezioni respiratorie di bambini affetti da polmonite, suggerendo la possibilità di una trasmissione per via aerea o da ingestione di virus aerosolizzato (Sorice F, Ortona L 2000).

Il tempo di incubazione è di 24-72 ore. Il virus viene rilasciato nelle feci ad elevate concentrazioni già nei giorni precedenti le manifestazioni cliniche della malattia ( $10^{12}$  particelle infettanti per millilitro di feci; la dose infettante per un bambino è di solo 10 particelle) e successivamente anche per più di 5 giorni dopo l'arresto della diarrea. Dal momento che il virus è stabile nell'ambiente, la trasmissione, oltre che per contatto diretto, può avvenire anche per ingestione di acqua o di alimenti contaminati.

### 4. DIAGNOSI

Poiché nella fase acuta della malattia vengono eliminate grandi quantità di virioni (fino a  $10^{12}$ /ml) l'identificazione delle particelle nel materiale fecale risulta agevole. I metodi diagnostici più semplici consistono nell'osservazione al microscopio elettronico dei campioni e nell'impiego di test immunoenzimatici che consentono di identificare l'antigene virale

nelle feci. Si possono altresì impiegare la coltivazione del virus su colture primarie di rene di scimmia (es. AGMK, African Green Monkey Kidney) o in linee cellulari di scimmia quali la MA10 (cellule di rene fetale di scimmia *Macaca mulatta*), l'elettroforesi su gel di acrilammide e varie tecniche di biologia molecolare. In particolare la ricerca dell'RNA virale mediante RT-PCR (retro trascrizione-reazione a catena della polimerasi) viene effettuata come test di conferma nei casi dubbi e per la caratterizzazione dei ceppi in studi epidemiologici (Sorice F, Ortona L 2000). I ceppi P sono difficilmente identificati con i normali metodi di neutralizzazione: per identificarli sono più utilizzati i metodi molecolari che passano attraverso l'analisi e lo studio dei siti di variabilità lungo la sequenza del gene Vp4 (Greenberg HB, Estes MK. 2009). Inoltre, l'RNA virale è stato localizzato con la RT-PCR *in situ* nelle cellule mucose del piccolo e grande intestino ed in molti altri tessuti, compreso il cuore ed il sistema nervoso centrale, in due casi di infezione fatale (Morrison C et al. 2001).

#### 5. QUADRO CLINICO E TERAPIA

Gli individui di tutte le età sono suscettibili alle infezioni da RV essendo molto numerosi i sierotipi con i quali si può venire a contatto. Tipicamente le forme clinicamente manifeste sono più gravi in seguito al primo contatto. Quindi, sebbene le infezioni più gravi da RV siano primariamente confinate ai bambini piccoli, esse possono essere associate a diarrea anche negli adulti (specialmente nei membri di famiglie di neonati infetti), nei pazienti geriatrici e negli immunocompromessi. Le infezioni con manifestazioni cliniche sono frequenti soprattutto tra 6 mesi e due anni (nei primi mesi di vita è infatti possibile un'immunità passiva

da anticorpi materni), mentre più frequente è l'infezione asintomatica nell'età adulta.

Le manifestazioni cliniche variano dall'infezione subclinica a forme di diarrea media o grave, occasionalmente fatale. Il quadro clinico delle gastroenteriti da RV non è specifico. Gli episodi acuti sono caratterizzati da febbre moderata, disturbi gastrici, vomito non biliare e diarrea acquosa che si protrae per 3-8 giorni (Harrison 1999). La terapia è sintomatica e consiste nella somministrazione sostitutiva di liquidi ed elettroliti, a preferenza per via orale.

## EPIDEMIOLOGIA DEI RV E PROFILASSI VACCINALE ANTI-RV

I RV sono gli agenti patogeni isolati con maggior frequenza: tentativi di isolamento di questi virus sono iniziati sin dalla metà degli anni '50 ma solo nel 1973 sono stati osservati per la prima volta al microscopio elettronico in cellule della mucosa duodenale di un bambino affetto da diarrea (Bishop RF et al. 1973). Lo stesso tipo di particella virale è stato osservato successivamente nelle feci di bambini diarroici in vari Paesi. L'infezione è diffusa in tutto il mondo; nei Paesi a clima temperato le epidemie tendono a prediligere i mesi invernali, tra novembre e marzo, mentre nei Paesi tropicali, sebbene si possano verificare picchi di incidenza, il virus è presente tutto l'anno.

I RV sono la causa più importante di diarrea grave disidratante nei bambini sotto i cinque anni di età, sia nei Paesi sviluppati che in quelli in via di sviluppo, e sono responsabili del 40% di tutti i casi di diarrea che richiedono ospedalizzazione. Il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie ha comportato un declino della letalità, ma non dell'incidenza della patologia e nei Paesi in via di sviluppo, dove non si hanno i mezzi per accedere alla terapia di reidratazione e alle altre cure mediche e dove anche l'acqua potabile è una rarità, la gastroenterite da RV continua a rappresentare un'importante causa di morte.

Ogni anno nel mondo i RV sono responsabili di circa 114 milioni di episodi di diarrea, 2,4 milioni di ospedalizzazioni e più di 600.000 decessi nei bambini di età inferiore ai 5 anni (Greenberg HB, Estes MK 2009) (WHO). Questo significa che entro i 5 anni di età quasi tutti i bambini avranno un episodio di gastroenterite da RV e uno su 285 morirà. L'onere

della malattia non è limitato ai soli Paesi in via di sviluppo: si stima che negli Stati Uniti i RV causino in un anno 20-60 morti, 55.000-70.000 ospedalizzazioni e 410.000 visite mediche (Fischer TK et al. 2007). In Europa, adattando il modello sviluppato dai Centri per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (CDC) per valutare l'impatto globale della malattia, si stima che ogni anno avvengono 3,6 milioni di casi tra i bambini con età inferiore ai 5 anni, con 231 morti, quasi 87.000 ricoveri, 700.000 visite ambulatoriali e 2,8 milioni di casi gestiti a domicilio (questo modello non include le infezioni nosocomiali) (Soriano-Gabarrò M 2006). In Italia si effettuano ogni anno circa 40.000 ricoveri per gastroenterite con pazienti di età <5 anni, con una degenza media di 4,7 giorni e un costo di circa 60 milioni di euro ogni anno per il Servizio Sanitario Nazionale (SSN) ([www.epicentro.iss.it](http://www.epicentro.iss.it)).

Non esistono misure efficaci per eliminare l'infezione da RV o la sua diffusione. Lavarsi le mani con il sapone o con altri detergenti non uccide il virus, ma può limitarne la diffusione come pure fondamentale è mantenere buone condizioni igieniche sia a casa che negli asili nidi e in tutti gli ambienti collettivi dove vivono persone soggette a maggior rischio. In assenza di efficaci mezzi di prevenzione ambientale, la vaccinazione rappresenta l'unico strumento, oggi disponibile, in grado di ridurre l'impatto sanitario ed economico delle malattie da RV.

L'aver contratto i RV una volta non dà immunità sufficiente, anche se le infezioni che si contraggono negli anni successivi e in età adulta tendono a presentarsi in forma più leggera. Studi eseguiti sui topi suggeriscono che sia l'immunità cellula-mediata che umorale sono importanti nella risoluzione della prima e successive infezioni (Dennehy PH 2008). Inoltre

l'esame dei dati presenti in letteratura suggeriscono che gli anticorpi, se presenti a livelli critici, sono protettivi contro la malattia (Jiang B et al. 2002).

Sono stati elaborati diversi vaccini anti-RV tramite attenuazione di ceppi isolati. Il primo vaccino orale, sperimentato in Finlandia all'inizio degli anni '80, basato su un ceppo bovino, ha posto le basi per tutti i successivi vaccini. Nel 1998 è stato immesso in commercio negli Stati Uniti il RotaShield®, vaccino tetravalente basato su un ceppo di scimmia Rhesus, che però, meno di un anno dopo, è stato ritirato a seguito di una possibile associazione con casi di invaginazione intestinale. La breve esperienza con questo vaccino ha comunque dimostrato l'efficacia dell'intervento preventivo e stimolato la prosecuzione della ricerca per ottenere altri vaccini da ceppi virali umani o animali attenuati o riassortiti.

Nel 2006 sono stati brevettati altri due vaccini (tabella 1) nettamente diversi come composizioni e schemi di somministrazione. Entrambi i vaccini sono per uso orale ma il primo, il Rotarix® (prodotto dalla GlaxoSmithKleine), è derivato da un singolo ceppo umano, mentre il RotaTeq® (prodotto dalla Merck) è pentavalente, nasce da un complesso processo di combinazione tra un ceppo bovino (P1[8]) e quattro ceppi umani (G1, G2, G3, G4) ognuno portatore di un diverso antigene. Entrambi i vaccini hanno mostrato profili di efficacia e sicurezza molto buoni in trial clinici effettuati in Paesi industrializzati occidentali e in America Latina. I due vaccini, considerati ugualmente efficaci e sicuri, prevengono circa il 75% dei casi di infezione ed il 93-98% dei casi gravi.

**Tabella 1.** I due vaccini anti-RV.

	<b>ROTATEQ</b>	<b>ROTARIX</b>
PRODUTTORE	Merck Vaccine Division	GlaxoSmithKline
CEPPO DI ORIGINE	Ceppo bovino RV-WC3	Ceppo umano RV-89-12
COMPOSIZIONE	Virus riassortito da quattro ceppi umani e uno bovino	Un singolo ceppo umano
GENOTIPI	G1, 2, 3, 4, and P[8]	G1 P[8]
DOSI	3 dosi a 2, 4, and 6 mesi	2 dosi a 2 e 4 mesi
SOMMINISTRAZIONE	Orale	Orale
PRESENTAZIONE	Liquido	Liofilizzato
PROTEZIONE CONTRO FORME SEVERE <sup>a</sup>	85% (72-92)	95% (91-97)
INTUSSUSCEZIONE	No	No

<sup>a</sup>I due risultati non sono direttamente confrontabili.  
(Greenberg HB, Estes MK.2009)

Oltre che contro la diarrea causata dal sierotipo G1, il Rotarix risulta efficace anche contro quella da altri sierotipi compreso il G9, ceppo umano riconosciuto più recentemente come responsabile di forme severe. Anche per il RotaTeq studi preliminari condotti negli Stati Uniti hanno dimostrato la sua efficacia nel ridurre l'impatto della patologia da diversi sierotipi di RV. Per entrambi i vaccini la protezione contro le infezioni gravi si estende al secondo anno di follow up e un'attenta sorveglianza non ha rivelato alcun aumento del rischio di invaginazione intestinale nei gruppi vaccinati (Vesikari T et al. 2006) (Lepage P, Vergison A. 2007). Per i RV è importante che la vaccinazione venga effettuata nelle prime settimane di vita (a partire dalla sesta settimana) affinché la protezione sia



il più precoce possibile. I neonati nel primo anno di vita sono infatti i più vulnerabili alla gastroenterite severa da RV. Il vaccino Rotarix™ richiede la somministrazione per via orale di due dosi, approssimativamente all'età di 2 e 4 mesi. La prima dose può essere somministrata a partire dalla sesta settimana di vita, e non oltre le 12 settimane di età. L'intervallo fra le due dosi deve essere di almeno 4 settimane. La seconda dose dovrebbe essere somministrata entro le 16 settimane di età, e in ogni caso non oltre le 24 settimane. Per il vaccino RotaTeq™, la schedula vaccinale raccomandata consta di 3 dosi per via orale all'età di 2, 4 e 6 mesi. La prima dose va somministrata fra le 6 e le 12 settimane di età, e le dosi successive ad intervalli di 4-10 settimane. Il ciclo vaccinale non deve essere iniziato in bambini di età superiore alle 12 settimane. Tutte e tre le dosi devono essere somministrate entro le 32 settimane di età.

Il rischio di invaginazione intestinale è potenzialmente più alto quando la prima dose di questi vaccini viene somministrata a bambini di oltre 12 settimane. Di conseguenza, gli attuali vaccini contro i RV non devono essere impiegati in campagne vaccinali di recupero, nell'ambito delle quali potrebbe essere difficile accertare l'età esatta dei bambini da vaccinare ([www.epicentro.iss.it](http://www.epicentro.iss.it)). La vaccinazione può essere praticata anche assieme alle altre vaccinazioni previste per i primissimi mesi di vita, tutte costituite o da virus inattivati o da frazioni antigeniche dei vari virus o batteri.

In Italia, quindi, è ormai possibile praticare la vaccinazione anti-RV anche se non è obbligatoria e anche se, da regione a regione, potrebbe variare la modalità di pagamento o meno del vaccino. Il RotaTeq ha un costo al pubblico di € 54.70 per ciascuna somministrazione. A Roma e

provincia la vaccinazione con Rotarix ® è offerta solo in compartecipazione di spesa a condizione che il ciclo (2 dosi) sia completato entro la 24<sup>o</sup> settimana di vita (aggiornamento del Piano Regionale Vaccini con DGR n. 133 del 29-02-2008)([www.fimproma.it/vaccinazioni.doc](http://www.fimproma.it/vaccinazioni.doc)).

## MATERIALI E METODI

### 1. PROGETTAZIONE DEL PIANO DI RICERCA E CAMPIONAMENTO

Nello studio sono state coinvolte diverse strutture ospedaliere localizzate in Italia e in Albania: l'ospedale Sandro Pertini e il Forlanini di Roma, sette ospedali dislocati nella provincia di Lecce (Casarano, Copertino, Galatina, Gallipoli, Lecce, Scorrano, Tricase) e il Policlinico Universitario Madre Teresa di Tirana. Quest'ultimo è centro di riferimento nazionale e raccoglie i casi più gravi di tutto il paese, inclusi ovviamente quelli della città di Tirana; il campione può considerarsi quindi rappresentativo delle forme di diarrea gravi che colpiscono la popolazione pediatrica in Albania.

I campioni di feci sono stati selezionati da bambini con età inferiore a 5 anni ricoverati nei reparti di degenza (441 campioni) o recatisi al pronto soccorso (151 campioni) per un numero complessivo di 592 campioni. Il campionamento è avvenuto da maggio 2001 a maggio 2002 a Tirana, da gennaio 2004 a dicembre 2005 a Lecce, e da settembre 2006 a settembre 2007 a Roma (tabella 2).

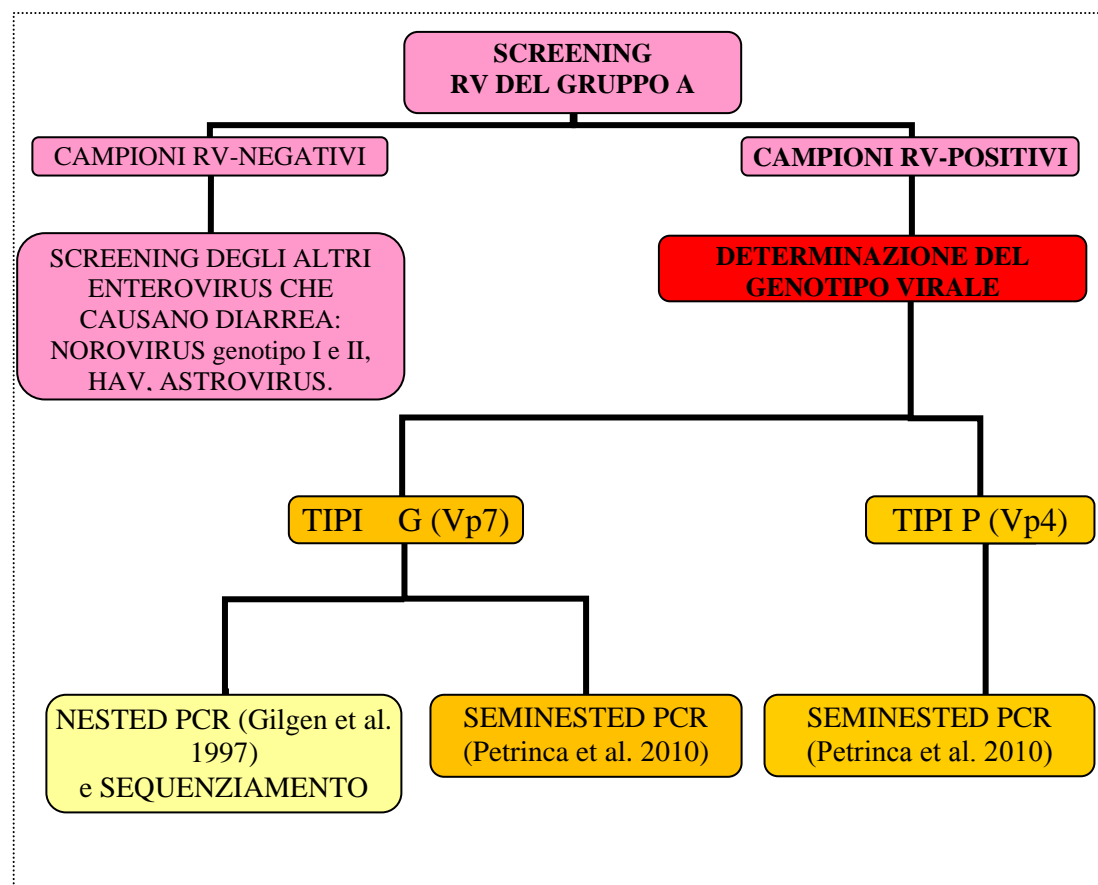
**Tabella 2:** Dati relativi al campionamento.

Area di raccolta	Periodo campionamento	Numero di campioni
<b>Albania – Tirana</b>	2001- 2002	313
<b>Italia – Lecce</b>	2004-2005	217
<b>Italia – Roma</b>	2006-2007	62
<b>TOTALE</b>		<b>592</b>

I campioni sono stati conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; quelli albanesi sono stati trasportati periodicamente mantenendo la catena del freddo. Presso il Dipartimento di Igiene e Sanità Pubblica dell'Università Tor Vergata ciascun campione è stato riportato a temperatura ambiente, pesato e diluito al 10% con PBS (Phosphate Buffered Solution), agitato vigorosamente per 10-15 minuti e centrifugato a 4.600 giri per 15 minuti. L'estratto fecale al 10% così ottenuto è stato congelato a  $-80^{\circ}\text{C}$  in aliquote da 250 microlitri.

La parte sperimentale ha previsto diverse fasi (fig.4).

**Figura 4:** Fasi della parte sperimentale riguardante l'allestimento ed esecuzione dei test molecolari.



## 2. SCREENING DEI CAMPIONI RV-POSITIVI

Lo screening sulla presenza dei RV del gruppo A nei campioni raccolti è stato effettuato tramite RT-PCR (retro trascrizione dell'RNA virale in DNA complementare-reazione a catena della polimerasi) sul gene Vp6. La metodica ha previsto le seguenti fasi:

- (a) *Estrazione del genoma virale.* L'estrazione del genoma ad RNA dei RV è stata effettuata utilizzando il Trizol LS Reagent (Invitrogen), una miscela di fenolo e guanidina isotiocianato che mantiene integro l'RNA mentre distrugge le cellule e dissolve i componenti cellulari (Chomczynski P, Sacchi N. 1987). Il protocollo di estrazione ha previsto: (1) lisi del virione e liberazione del genoma; (2) precipitazione dell'RNA con isopropanolo; (3) lavaggio in etanolo e dissoluzione dell'RNA in 40µl di acqua RNase free. Dieci microlitri di eluato sono stati utilizzati per la retro trascrizione, e i 30µl rimanenti conservati come scorta a -80°C.
- (b) *RT-PCR sul gene Vp6.* Completata l'estrazione, i doppi filamenti di RNA sono stati denaturati tramite riscaldamento a 95°C per 5 minuti. Al campione è stato aggiunto quindi un mix (tabella 3) contenente 4 unità di AMV Reverse Transcriptasi (DNA polimerasi RNA-dipendente della Promega), 1 µM dei primers specifici Vp6-3 e Vp6-4 (dNTPs) (Villena C et al. 2003) (tabella 10) e 0.2 mM di nucleotidi trifosfato. La reazione di retro trascrizione è stata eseguita a 42°C per 30 minuti, a cui sono seguiti 5 minuti a 95°C necessari per inattivare la DNA polimerasi RNA-dipendente.

**Tabella 3:** Reagenti della RT-Vp6.

<i>Reagente</i>	<i>Concentrazione Soluzione master</i>	<i>Volume per 1 campione</i>	<i>Concentrazione Soluzione finale</i>
Buffer	5X	3 µl	1X
Primer VP6-3	100 µM	0.15 µl	1 µM
Primer VP6-4	100 µM	0.15 µl	1 µM
dNTPs	25 mM	0.12 µl	0,2 mM
AMV Reverse Transcriptase	10 U/ µl	0.4 µl	4 U/reazione
H <sub>2</sub> O ultrapura		1.18 µl	
Volume mix		5 µl	
<b>RNA virale</b>		10 µl	

Il DNA complementare (cDNA) ottenuto è stato sottoposto a PCR. Ai 15 µl di cDNA sono stati aggiunti buffer di reazione 1X, 0.2 mM di MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM di dNTPs, 0.5 µM dei primers Vp6-3 e Vp6-4, 2 unità di GoTaq Flexi DNA Polymerase (DNA polimerasi DNA-dipendente della Promega) e H<sub>2</sub>O ultrapura (tabella 4) (Petrinca AR et al. 2010). La tabella 5 riporta il protocollo termico della reazione.

**Tabella 4:** Reagenti della PCR-Vp6.

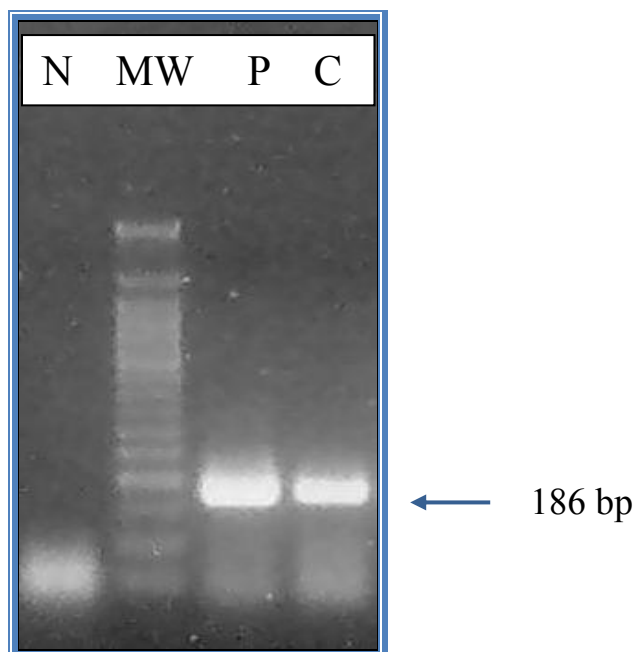
<i>Reagente</i>	<i>Concentrazione Soluzione master</i>	<i>Volume per 1 campione</i>	<i>Concentrazione Soluzione finale</i>
Buffer	5X	20 µl	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	8 µl	0.2 mM
Primer VP6-3	100 µM	0.5 µl	0.5 µM
Primer VP6-4	100 µM	0.5 µl	0.5 µM
dNTPs	25 mM	0.8 µl	0.2 mM
GoTaq polymerase	5 U/ µl	0.4 µl	2 U/reazione
H <sub>2</sub> O ultrapura	54.8 µl		
Volume mix	85 µl		
<b>cDNA</b>	15 µl		

**Tabella 5 :** Protocollo termico della PCR-Vp6.

<i>Ciclo</i>	<i>Fase</i>	<i>Descrizione</i>	<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>
1 (1X)		Attivazione iniziale	9 min	95°C
2 (40X)	1	Denaturazione	1 min	94°C
	2	Annealing	1 min	50°C
	3	Estensione	1 min	72°C
3 (1X)			7 min	70°C
4 (1X)			∞	15°C

(c) *Elettroforesi*. Dieci microlitri dell'amplificato sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% in TAE buffer 10X contenente bromuro di etidio. Oltre al campione da saggiare sono stati sottoposti ad elettroforesi un controllo negativo, un controllo positivo ed un marcatore di peso molecolare (MW). Il risultato è una banda specifica visibile al transilluminatore UV ( $\lambda = 302\text{nm}$ ) relativa alla sequenza amplificata lunga 186 coppie di basi (bp) (fig.5).

**Figura 5:** Corsa elettroforetica su gel d'agarosio 2%.



N = controllo negativo; MW = Molecular Weight 50 bp; P = controllo positivo; C = campione positivo per RV del gruppo A.



### 3. GENOTIPIZZAZIONE DEI RV ISOLATI

I campioni risultati RV-positivi sono stati sottoposti ad una RT-seminested PCR sui geni 4 (genotipo P) e 9 (genotipo G) per determinare il genotipo virale (fig.4).

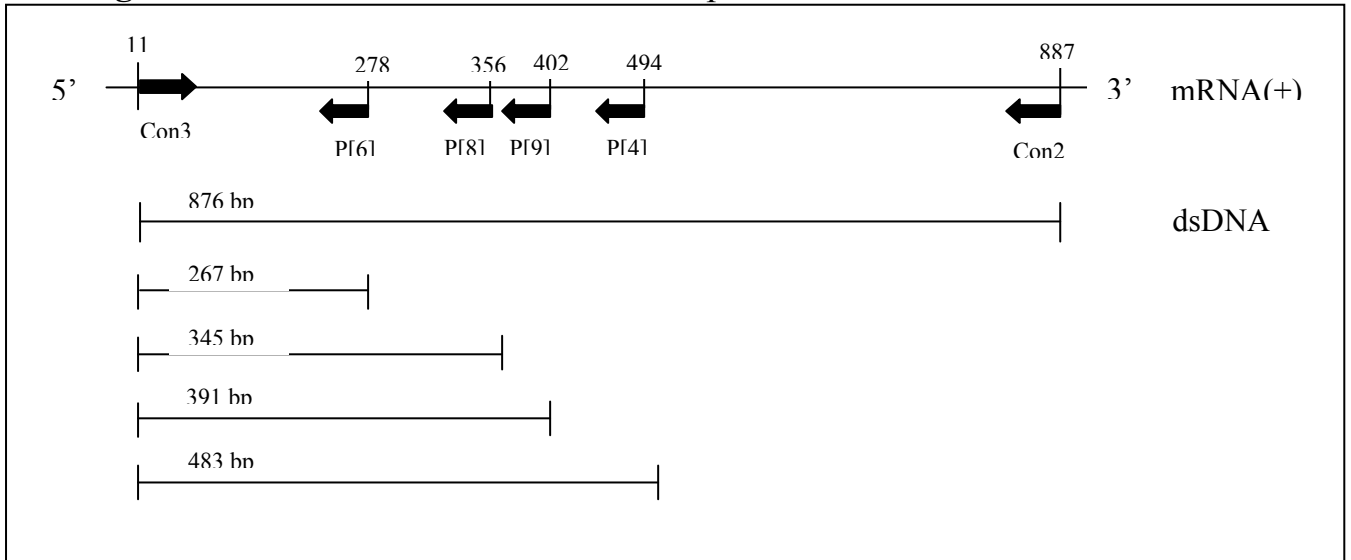
La nested PCR è una variante della tecnica di PCR che consiste nell'utilizzo di due coppie di primers, una esterna che genera un normale prodotto di PCR ed una interna al prodotto amplificato: se il prodotto di amplificazione fosse aspecifico la seconda PCR non andrebbe a buon fine. Nella seminested PCR uno dei primer usato nella seconda PCR è lo stesso utilizzato nella prima.

Nel caso specifico la coppia di primers utilizzati nella prima reazione sono serviti per amplificare circa l'intera sequenza dei geni 4 (o Vp4) e 9 (o Vp7), mentre nella seconda reazione è stato inserito un pool di primers specifici per tratti interni, aventi diversa sequenza in base ai diversi genotipi.

Per il genotipo P (fig.6) il gene Vp4 è stato retro trascritto e amplificato ottenendo un dsDNA di 876 bp; nella seconda PCR sono stati utilizzati primers specifici (Gentsch JR et al. 1992) per la ricerca dei genotipi P[4] (lunghezza dell'amplificato 484 bp), P[6] (268 bp), P[8] (346 bp) e P[9] (392 bp) (tabella 10).

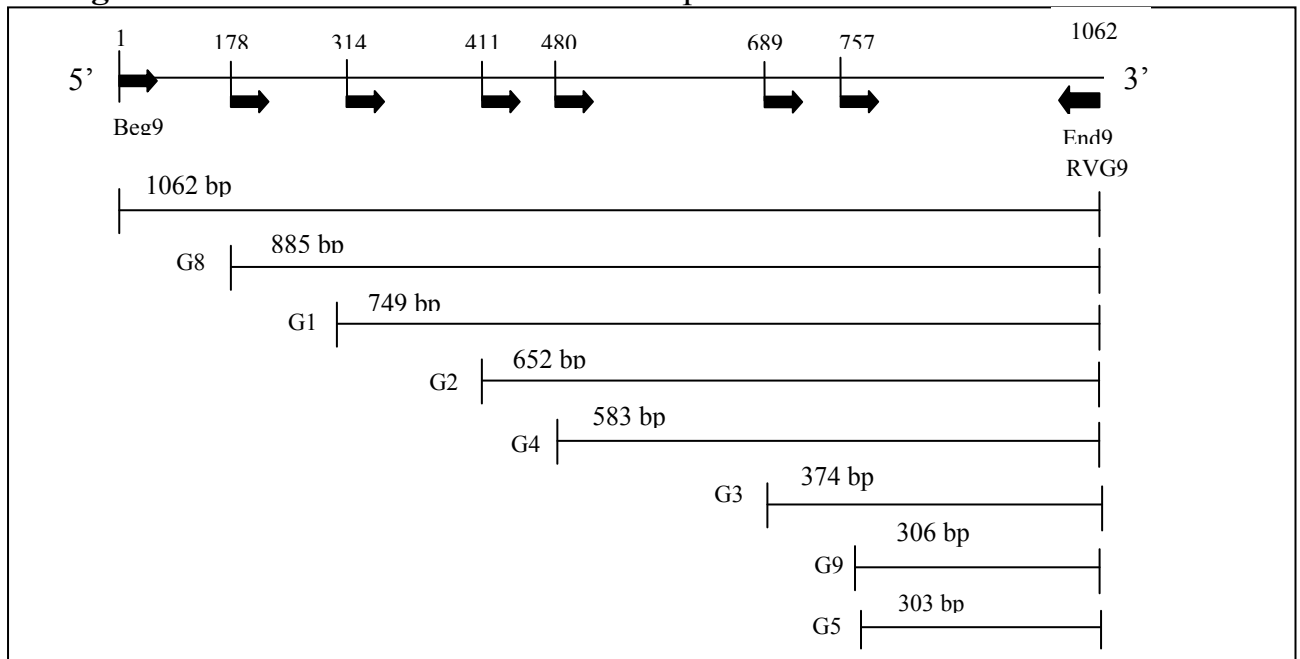
Per il genotipo G (fig.7) il gene Vp7 è stato retro trascritto e amplificato ottenendo un dsDNA di 1062 bp; nella seconda PCR sono stati utilizzati primers specifici (Gouvea V et al. 1990) per la ricerca dei genotipi G1 (749 bp), G2 (652 bp), G3 (374 bp), G4 (583 bp), G5 (303 bp), G8 (885 bp), G9 (306 bp) (tabella 10).

**Figura 6:** Schema RT-seminested PCR Vp4.



Lo schema mostra la posizione e la direzione di amplificazione con i primers Con2 e Con3 (prima reazione) e con Con3, P[4], P[6], P[8], P[9] (seconda reazione).

**Figura 7:** Schema RT-seminested PCR Vp7.



Lo schema mostra la posizione e la direzione di amplificazione con i primers Beg9 ed End9 (prima reazione) e con RVG9 e G1, G2, G3, G4, G5, G8, G9 (seconda reazione).

Le tabelle seguenti riportano i reagenti del mix di reazione delle RT-seminested PCR allestite per il gene 4 (Vp4) e 9 (Vp7) (tabelle 6-7-8), mentre la tabella 9 ne riporta i protocolli termici (Petrinca AR et al. 2010).

**Tabella 6:** Reagenti della RT-Vp4(Vp7).

<i>Reagente</i>	<i>Concentrazione Soluzione master</i>	<i>Volume per 1 campione</i>	<i>Concentrazione Soluzione finale</i>
Buffer	5X	2 µl	1X
Primer Con2 (Beg9)	100 µM	0.1 µl	1 µM
Primer Con3 (End9)	100 µM	0.1 µl	1 µM
dNTPs	25 mM	0.1 µl	0.2 mM
AMV Reverse Transcr.	10 U/ µl	0.4 µl	4 U/reazione
H <sub>2</sub> O ultrapura		2.3 µl	
Volume mix		5 µl	
<b>RNA virale</b>		10 µl	

**Tabella 7:** Reagenti della I PCR-Vp4(Vp7).

<i>Reagente</i>	<i>Concentrazione Soluzione master</i>	<i>Volume per 1 campione</i>	<i>Concentrazione Soluzione finale</i>
Buffer	5X	10 µl	1X
Primer Con2 (Beg9)	100 µM	0.5 µl	1 µM
Primer Con3 (End9)	100 µM	0.5 µl	1 µM
dNTPs	25 mM	0.4 µl	0.2 mM
GoTaq Polymerase	5 U/ µl	0.4 µl	2 U/reazione
H <sub>2</sub> O ultrapura		29.2 µl	
Volume mix		45 µl	
<b>cDNA</b>		5 µl	

**Tabella 8:** Reagenti della II PCR-Vp4(♣) e Vp7(●).

<i>Reagente</i>	<i>Concentrazione Soluzione master</i>	<i>Volume per 1 campione</i>	<i>Concentrazione Soluzione finale</i>
Buffer	5X	10 µl	1X
Mix primers ♣●	♣●	1.75 µl	♣●
dNTPs	25 mM	0.2 µl	0.1 mM
GoTaq Polymerase	5 U/ µl	0.4 µl	2 U/reazione
H <sub>2</sub> O ultrapura		31.65 µl	
Volume mix		48 µl	
<b>DNA amplificato</b>		2 µl	

♣Mix primers Vp4: Con3 alla concentrazione finale di 1 µM, P[4], P[6], P[8] e P[9] alla concentrazione finale di 0.25 µM.

●Mix primers Vp7: RVG9 alla concentrazione finale di 1 µM, G1, G2, G3, G4, G5, G8 e G9 alla concentrazione finale di 0.25 µM.

**Tabella 9:** Protocolli termici della reazione RT-nested PCR allestita per la genotipizzazione.

	<i>Ciclo</i>	<i>Fase</i>	<i>Descrizione</i>	<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>
<b>RT</b>	1 (1X)		Denaturazione	5 min	95°C
	2 (1X)		Retrotrascrizione	60 min	42°C
<b>I PCR</b>	1 (1X)		Attivazione iniziale	5 min	95°C
	2 (25X)	1	Denaturazione	30 sec	94°C
		2	Annealing	30 sec	55°C
		3	Estensione	1 min	72°C
	3 (1X)			7 min	70°C
	4 (1X)			∞	15°C
<b>II PCR</b>	1 (1X)		Attivazione iniziale	5 min	95°C
	2 (40X)	1	Denaturazione	30 sec	94°C
		2	Annealing	30 sec	55°C
		3	Estensione	1 min	72°C
	3 (1X)			7 min	70°C
	4 (1X)			∞	15°C

Per genotipizzare i G-tipi è stata eseguita una nested-PCR aggiuntiva, eseguita in parallelo alla reazione prima descritta, secondo il protocollo allestito da Gilgen e collaboratori (Gilgen M et al. 1997): in questa reazione sono stati usati dei primers (tabella 10) che non permettono la determinazione diretta del genotipo in base alla lunghezza del tratto amplificato, ma richiedono un successivo step di sequenziamento del tratto amplificato e il confronto con sequenze depositate in banca dati per determinare il genotipo virale.

La tabella 10 mostra le sequenze dei primers utilizzati con le rispettive posizioni target sul genoma virale.

**Tabella 10:** Primers usati nelle RT-PCR allestite.

Primer	Sequenza (5'-3')	Posizione	Frammento (bp)	Bibliografia
<b>Rotavirus primers usati per PCR-VP6</b>				
VP6-3	GCT TTA AAA CGA AGT CTT CAA C	2-23 <sup>a</sup>	186	Villena et al.
VP6-4	GGT AAA TTA CCA ATT CCT CCA G	187-166 <sup>a</sup>		Villena et al.
<b>Rotavirus primers usati per seminested PCR-Vp7</b>				
1st round				
Beg9	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT	1-28 <sup>a</sup>	1062	Gouvea et al.
End9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	1062-		Gouvea et al.
2nt round				
G1	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	314-335 <sup>a</sup>	749	Gouvea et al.
G2	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G	411-435 <sup>c</sup>	652	Gouvea et al.
G3	CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG	689-709 <sup>d</sup>	374	Gouvea et al.
G4	CGT TTC TGG TGA GGA GTT G	480-498 <sup>e</sup>	583	Gouvea et al.
G5	GAC CTA ACA ACG AGT ACA TG		303	Gouvea et al.
G8	GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG	178-198 <sup>f</sup>	885	Gouvea et al.
G9	CTA GAT GTA ACT ACA ACT AC	757-776 <sup>g</sup>	306	Gouvea et al.
RVG-9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC T	1062-	1062	Gouvea et al.
<b>Rotavirus primers usati per seminested PCR-Vp4</b>				
1st round				
Con-3	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11-32 <sup>h</sup>		Gentsch et al.
Con-2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	868-887 <sup>h</sup>	887	Gentsch et al.
2nt round				
P[4]	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	474-494 <sup>i</sup>	484	Gentsch et al.
P[6]	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	259-278 <sup>l</sup>	268	Gentsch et al.
P[8]	TCT ACT TGG ATA ACG TGC	339-356 <sup>h</sup>	346	Gentsch et al.
P[9]	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	385-402 <sup>m</sup>	392	Gentsch et al.
Con-3	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11-32 <sup>h</sup>		Gentsch et al.
<b>Rotavirus primer usati per nested PCR-VP7</b>				
RV1	GTC ACA TCA TAC AAT TCT AAT CTA AG	1061-		Gilgen et al.
RV2	CTT TAA AAG AGA GAA TTT CCG TCT	3-27 <sup>a</sup>	1059	Gilgen et al.
RV3	TGT ATG GTA TTG AAT ATA CCA C	50-71 <sup>a</sup>		Gilgen et al.
RV4 <sup>n</sup>	ACT GAT CCT GTT GGC CAW CC	395-376 <sup>a</sup>	346	Gilgen et al.

Ceppi di riferimento: <sup>a</sup>HRV human strain Wa (serotype 1) [accession number K02033]; <sup>b</sup>HRV strain SA11 (serotype 3); <sup>c</sup>HRV strain DS1 (serotype 2); <sup>d</sup>HRV strain P (serotype 3); <sup>e</sup>HRV strain ST3 (serotype 4); <sup>f</sup>HRV strain 69M (serotype 8); <sup>g</sup>HRV strain WI61 (serotype 9); <sup>h</sup>HRV strain KU gene 4 sequence [accession number M21014]; <sup>i</sup>HRV strain RV5 [accession number M32559]; <sup>l</sup>HRV strain 1076; <sup>m</sup>HRV strain K8; <sup>n</sup>W= A or T.

### 3. STUDIO E ANALISI DELLE SEQUENZE GENOMICHE VIRALI

Una volta riscontrata su gel la presenza di una banda specifica relativa al frammento di genoma virale oggetto della ricerca, il DNA amplificato è stato purificato usando il QIAquick column purification kit (Qiagen), seguendo le istruzioni del produttore. La purificazione permette di allontanare primers, sali ed enzimi contenuti nella miscela di reazione di PCR. Un'aliquota del DNA purificato è stata inviata ad un laboratorio esterno per il sequenziamento: il risultato è una sequenza delle 4 basi azotate, univoca per ogni virus, che è stata utilizzata per il confronto delle sequenze degli isolati, per la classificazione dei diversi genotipi e per l'analisi filogenetica. Tali analisi non possono essere eseguite manualmente ma richiedono l'impiego di sofisticati algoritmi codificati in programmi commerciali o disponibili in rete. Per la determinazione del genotipo virale la sequenza nucleotidica ottenuta è stata confrontata con tutte quelle depositate fino ad oggi in banca dati (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>); l'allineamento è stato effettuato utilizzando il software on line ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)), mentre gli alberi filogenetici sono stati costruiti usando il software Mega versione 4 (Tamura K et al. 2007).

## RISULTATI

### SCREENING DEI CAMPIONI RV-POSITIVI

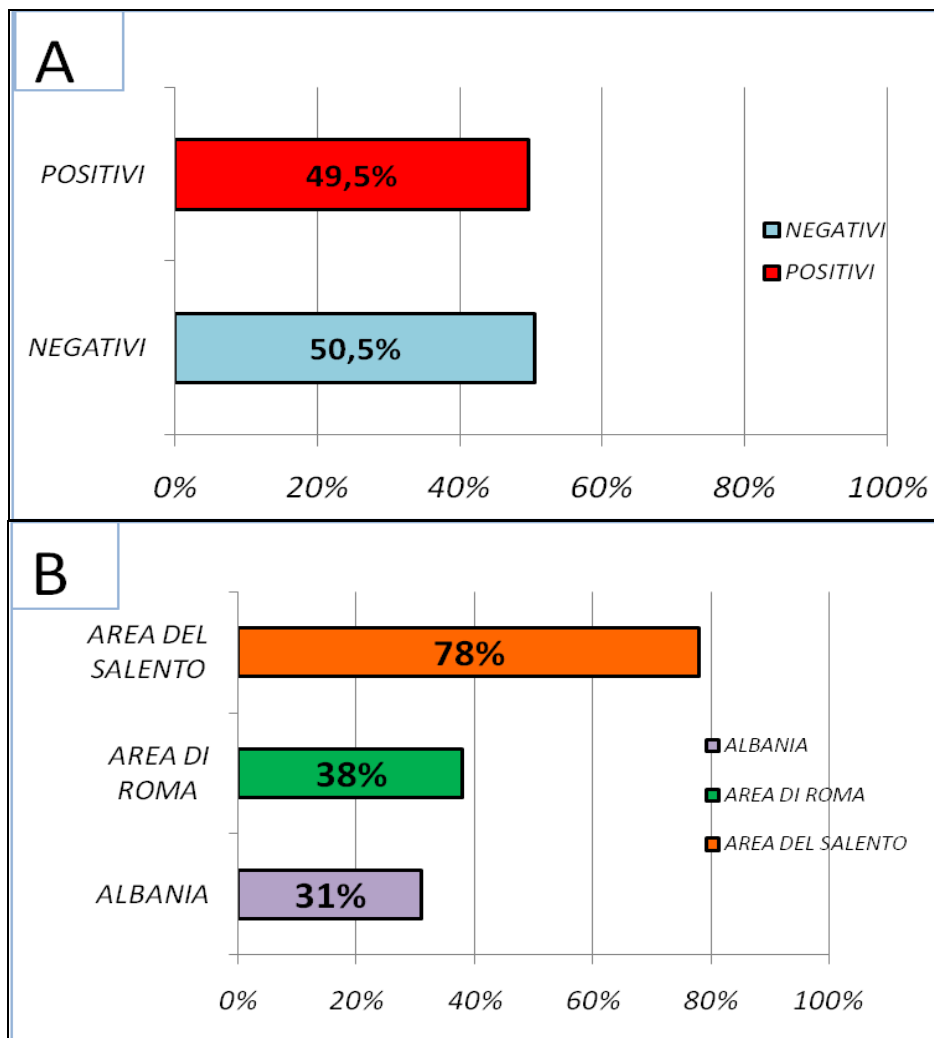
Sono stati analizzati un totale di 592 campioni fecali corrispondenti a casi di gastroenterite in bambini da 0 a 5 anni ricoverati o visitati al pronto soccorso: i campioni raccolti in Albania sono stati 313, mentre 279 sono stati i casi italiani (tabella 11). Complessivamente il 49,5% dei campioni è risultato positivo ai RV del gruppo A (fig.8A). La percentuale di positivi trovati è stata del 31% per l'Albania (98/313 campioni) e del 70% per i casi italiani (195/279 campioni), con il 78% dei campioni raccolti nell'area del Salento (170/217) e il 38% (25/62) raccolti nei due ospedali romani Sandro Pertini e Forlanini (fig.8B).

**Tabella 11:** Risultati dello screening dei campioni RV-positivi.

<i>AREE</i>	<i>CENTRI DI RACCOLTA</i>	<i>NR DI CAMPIONI</i>	<i>NR CAMPIONI RV-POSITIVI</i>	<i>RV-POSITIVI (%)</i>
<i>ALBANIA</i>	Policlinico universitario Madre Teresa	313	98	<b>31%</b>
<i>AREA DEL SALENTO (ITALIA)</i>	Ospedali di: Casarano, Copertino, Galatina, Gallipoli, Lecce, Scorrano, Tricase	217	170	<b>78%</b>
<i>AREA DI ROMA (ITALIA)</i>	Ospedale Sandro Pertini, Azienda ospedaliera S.Camillo- Forlanini	62	25	<b>38%</b>



**Figura 8:** Risultato dello screening dei campioni RV-positivi.

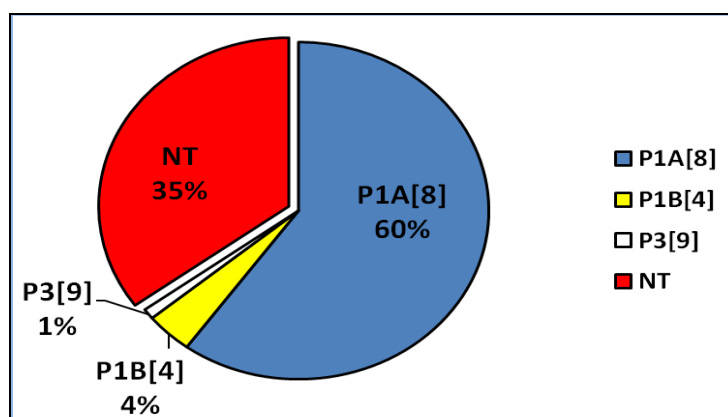


DETERMINAZIONE DEL GENOTIPO VIRALE

**Genotipo P (gene Vp4) con seminested PCR**

I ceppi isolati in Albania e nei due ospedali romani sono stati esaminati per determinare il genotipo P. Dei 123 campioni sottoposti ad analisi, 74 sono risultati appartenere al genotipo P1A[8], 6 campioni al P1B[4] ed uno solo al P3[9]. Nessun genotipo P[6] è stato trovato (fig.9). Un campione albanese è risultato positivo ad una doppia infezione P1A[8]-P1B[4]. La specificità del metodo è stata del 65% (tabella 12).

**Figura 9:** Genotipi P isolati.



**Tabella 12:** Risultati della P-genotipizzazione con seminested-PCR.

	ALBANIA	ROMA	TIPIZZATI	% TIPIZZATI
<b>P1A[8]</b>	56	18	74	<b>60</b>
<b>P1B[4]</b>	4	2	6	<b>4</b>
<b>P3[9]</b>	/	1	1	<b>1</b>
<b>NT</b>	39	4	43	<b>35</b>
	<b>99*</b>	<b>25</b>	<b>123</b>	<b>100</b>

NT = Non Tipizzati

\*incluso un caso di doppia infezione P1A[8]-P1B[4]

### **Genotipo G (gene Vp7)**

Per la determinazione del G-tipo, i 123 ceppi isolati in Albania e nell'area di Roma sono stati sottoposti ad una seminested PCR in cui è stato utilizzato un pool di primers specifici per la diretta determinazione dei genotipi G1, G2, G3, G4, G5, G8 e G9. Il genotipo più frequentemente ritrovato è stato il G9 (13%), a cui sono seguiti il G1 e il G4 (11%), e il G2 (3%). Nessun G3, G5 e G8 è stato rilevato. La specificità del metodo è stata solo del 38%, con 76 ceppi non genotipizzati (tabella 13).

**Tabella 13:** Risultati della G-genotipizzazione con seminested PCR.

	ALBANIA	ROMA	TIPIZZATI	% TIPIZZATI
<b>G1</b>	6	8	14	<b>11</b>
<b>G2</b>	1	3	4	<b>3</b>
<b>G4</b>	4	<b>9</b>	13	<b>11</b>
<b>G9</b>	<b>14</b>	2	16	<b>13</b>
<b>NT</b>	73	3	76	<b>62</b>
	<b>98</b>	<b>25</b>	<b>123</b>	<b>100</b>

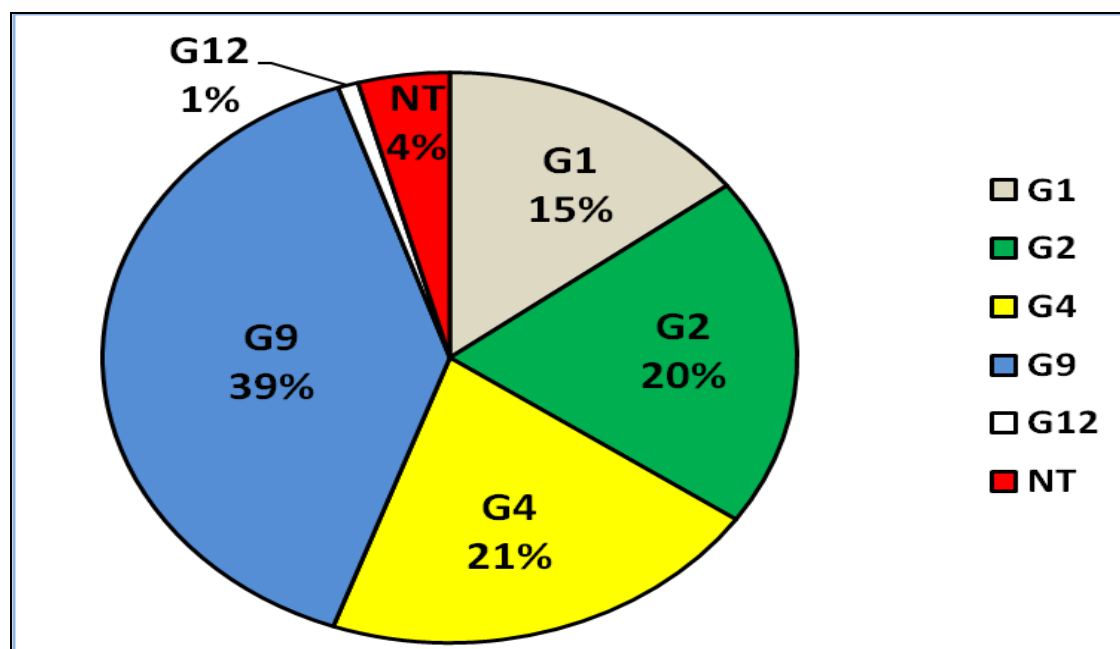
NT = Non Tipizzati.

I campioni sono stati sottoposti ad un'altra procedura che ha previsto l'esecuzione di una nested-PCR (Gilgen M et al. 1997) con successivo sequenziamento del tratto amplificato e confronto con sequenze depositate in banca dati. I campioni analizzati sono stati 211, così ripartiti:

- 98 campioni albanesi,
- 88 campioni dell'area del Salento,
- 25 campioni dell'area di Roma.

Il genotipo più frequentemente ritrovato è stato il G9 (39%), a cui sono seguiti il G4 (21%), il G2 (20%), il G1 (15%) e il G12 (1%). Nessun G3, G5 e G8 è stato rilevato. Nove sono stati i campioni non tipizzati con questa procedura, che ha avuto una specificità del 96% (fig.10).

**Figura 10:** Risultati della G-genotipizzazione con nested PCR e sequenziamento.



	ALBANIA	AREA DEL SALENTO	ROMA	TIPIZZATI E NT	%
<b>G1</b>	9	14	8	31	<b>15</b>
<b>G2</b>	3	<b>36</b>	3	42	<b>20</b>
<b>G4</b>	15	20	<b>12</b>	47	<b>21</b>
<b>G9</b>	<b>65</b>	16	2	83	<b>39</b>
<b>G12</b>	/	2	/	2	<b>1</b>
<b>NT</b>	6	/	/	6	<b>4</b>
	<b>98</b>	<b>88</b>	<b>25</b>	<b>211</b>	<b>100</b>

NT = Non Tipizzati.

La tabella 14 mostra i risultati ottenuti con le due diverse metodiche usate, relativi ai 123 ceppi isolati in Albania e nell'area di Roma.

**Tabella 14:** Confronto tra i risultati della G-tipizzazione ottenuti con metodo diretto e con sequenziamento.

	<i>Seminested PCR</i>		<i>Nested-PCR-sequenziamento</i>	
<b>G1</b>	14	<b>11%</b>	17	<b>14%</b>
<b>G2</b>	4	<b>3%</b>	6	<b>5%</b>
<b>G4</b>	13	<b>11%</b>	27	<b>22%</b>
<b>G9</b>	16	<b>13%</b>	67	<b>54%</b>
<b>NT</b>	76	<b>62%</b>	6	<b>5%</b>
<b>TOTALE</b>	123 campioni (100%)		123 campioni (100%)	

### ***Combinazioni G-P***

Per quanto riguarda le combinazioni G-P trovate, nell'area di Roma la combinazione più frequentemente trovata è stata G4-P1A[8] con il 48% dei casi, a cui seguono la G1-P1A[8] con il 28%, la G2-P1B[4] e G9-P1A[8] con il 9% ed infine la combinazione insolita G2-P3[9] con un solo caso trovato. In Albania la combinazione più frequente è stata la G9-P1A[8] con il 77% dei casi, a cui seguono la G4-P1A[8] con il 9%, la G1-P1[8] con il 7%, la G4-P1B[4] con il 3%, e G2-P1B[4] e G9-P1B[4] con un solo caso ciascuno.

#### ANALISI FILOGENETICA

L'analisi filogenetica è stata eseguita per i genotipi G, sulla parziale sequenza nucleotidica del gene Vp7 (346 paia di basi).

L'albero dei ceppi appartenenti al genotipo G1 può essere diviso in due subclusters (fig.11). Il primo subcluster comprende ceppi isolati dalle tre diverse aree geografiche studiate, con un'omologia tra ceppi diversi compresa tra il 97% e il 99%; i ceppi F10 (area di Roma), 151A (Albania) e 77S (area del Salento) hanno il 98%-99% di omologia con il ceppo a.n.DQ377594 (a.n.= accession number) isolato a Palermo da un bambino ricoverato per gastroenterite. Il secondo subcluster non comprende ceppi provenienti dall'Albania; la massima omologia (98%-99%) è con i ceppi a.n.EU839916 e a.n.DQ236054 per i ceppi isolati nell'area di Roma, e con a.n.EU029175-DQ207389 e a.n.EU839916 per i ceppi dell'area di Salento.

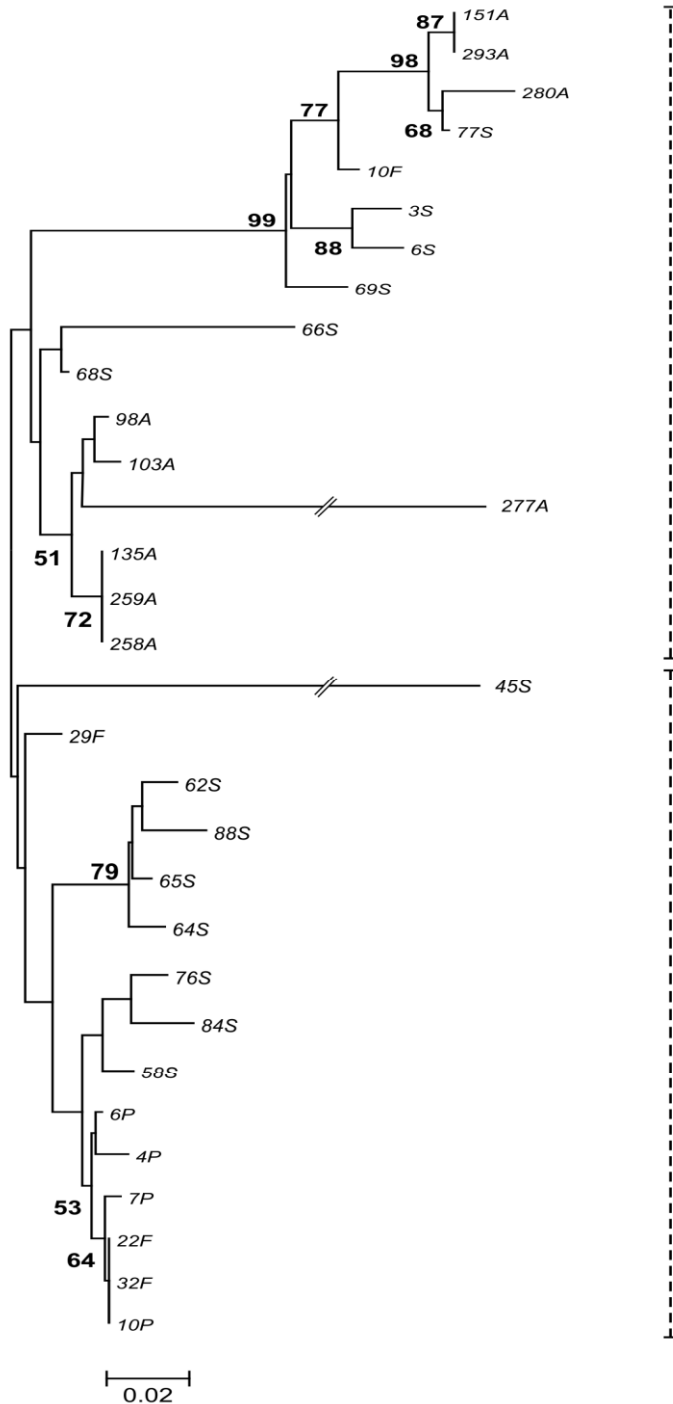
L'albero dei genotipi G2 sembra avere maggiore variabilità e può essere suddiviso in due subclusters (fig.12): il primo comprende tutti i ceppi del Salento e due provenienti dall'Albania (138A e 284A) che hanno un'omologia del 98% con il ceppo a.n.DQ904511 come tre dei ceppi del Salento (18S, 28S, 26S). Il secondo sub cluster comprende solo i ceppi dell'area di Roma.

L'albero dei G4 (fig.13) mostra un cluster di grandi dimensioni comprendente i ceppi dell'Albania e del Salento, un secondo cluster con soli ceppi italiani (Salento e Roma), ed un terzo con solo i ceppi albanesi. I ceppi G4 hanno un omologia tra il 93% e il 99%, e quelli dei subclusters 2 e 3 mostrano un'associazione massima con il ceppo a.n.FJ598041.

Infine, il genotipo G9 è stato isolato più frequentemente in Albania con 51 ceppi su 98 campioni RV positivi ed è stato identificato anche nel

Salento, ma non nell'area di Roma. Nell'albero filogenetico (fig.14) sono identificabili quattro clusters di cui il quarto comprendente solo ceppi albanesi. Il cluster 2 mostra nel sottogruppo 2.1 una mutazione aminoacidica in posizione 8 del gene VP7 (sostituzione T=treonina → K=lisina). I ceppi G9 mostrano un elevato grado di somiglianza tra loro ( $\geq 95\%$ ) e con ceppi precedentemente isolati in Italia (a.n.EF150338 e a.n.EF150330 isolati nel Centro Italia). Anche il cluster 3 può essere suddiviso in sub cluster 3.1, che include solo i ceppi albanesi, e in sub cluster 3.2 con campioni dell'Albania e del Salento con un'omologia del 100%.

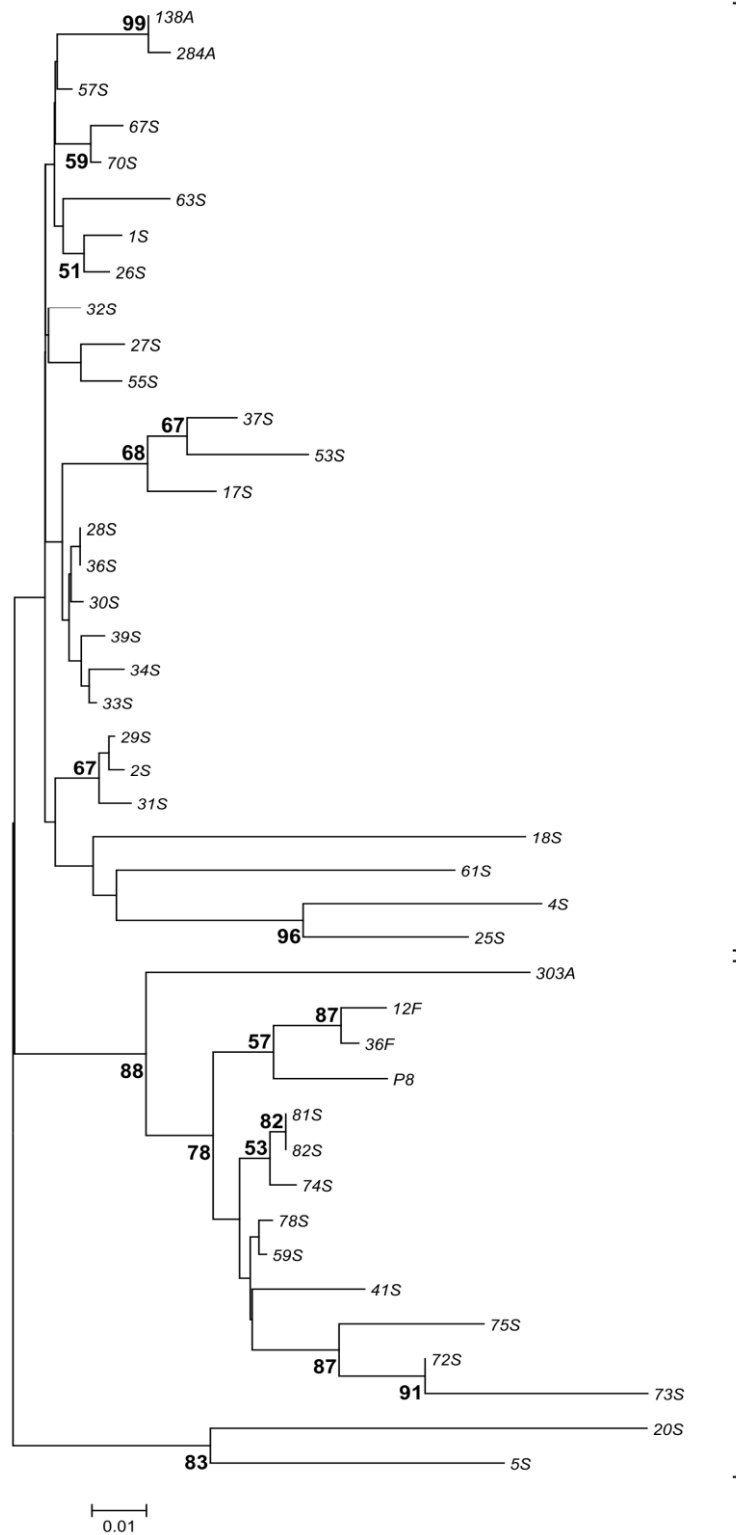
**Figura 11:** Albero filogenetico di RV genotipo G1.



I numeri adiacenti ai nodi rappresentano la percentuale del sostegno di bootstrap (di 500 repliche) per i cluster a destra del nodo. Valori percentuali di Bootstrap al di sopra del 50% sono mostrati nei nodi ramo. L'albero comprende i ceppi isolati in diverse aree (F = ospedale Forlanini di Roma e P = Ospedale Sandro Pertini di Roma, 8 sequenze; S = Salento, 14 sequenze e A = Albania, 9 sequenze).

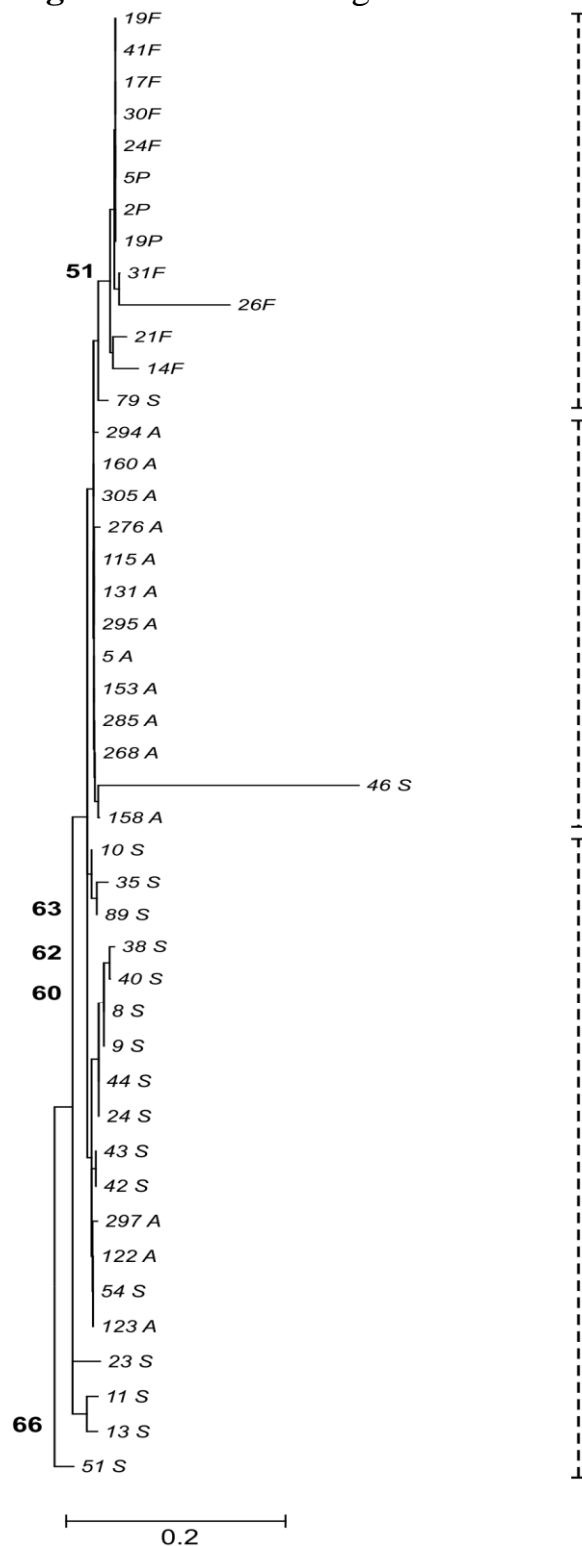


**Figura 12:** Albero filogenetico di RV genotipo G2.



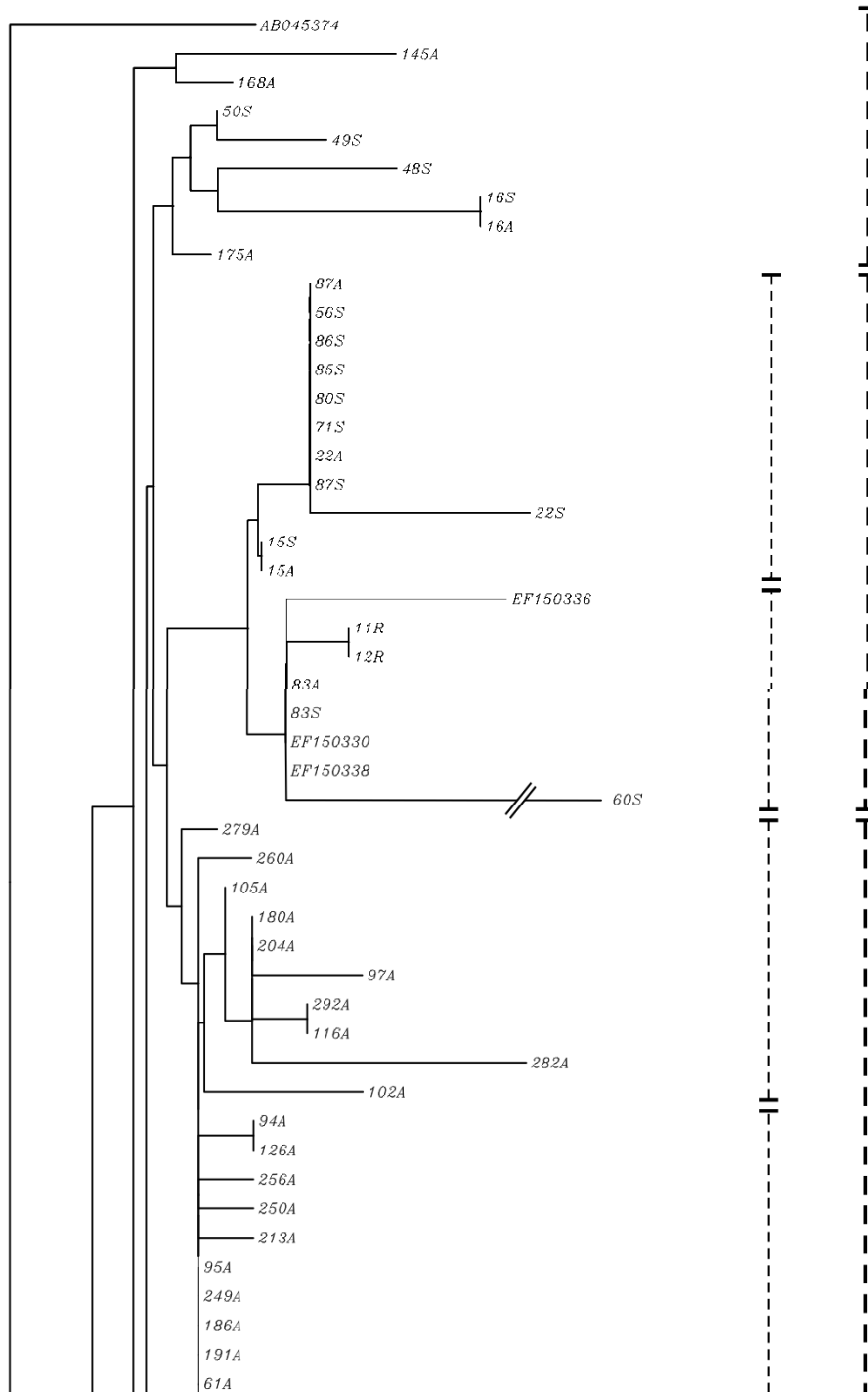
F= Ospedale Forlanini di Roma e P= Ospedale Sandro Pertini di Roma, 3 sequenze;  
S= Salento, 36 sequenze and A=Albania, 3 sequenze.

**Figura 13:** Albero filogenetico di RV genotipo G4.



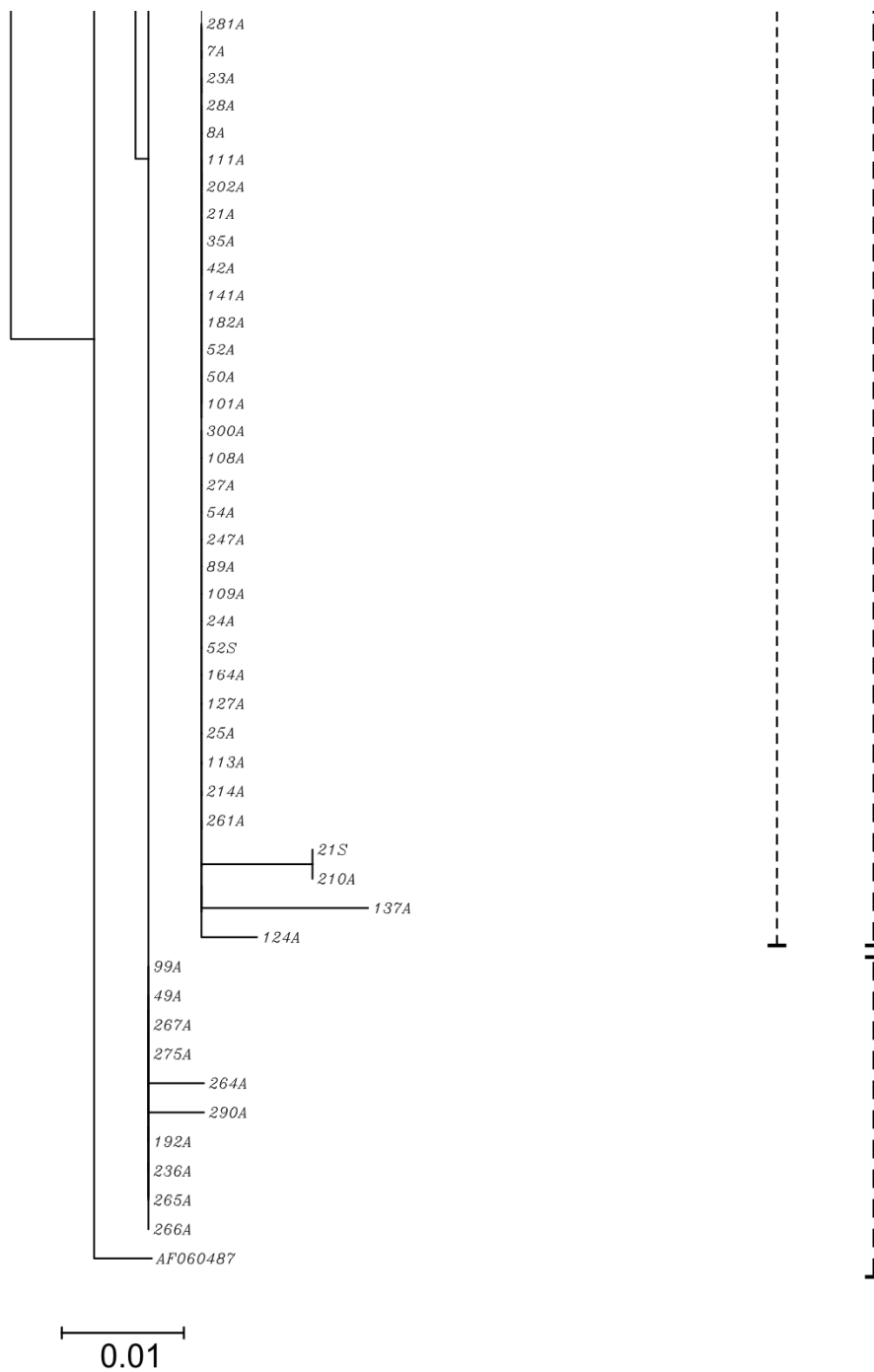
F= Ospedale Forlanini di Roma e P= Ospedale Sandro Pertini di Roma, 12 sequenze;  
S= Salento, 18 sequenze and A=Albania, 15 sequenze).

**Figura 14:** Albero filogenetico di RV genotipo G9.



STUDIO E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI ROTAVIRUS CIRCOLANTI IN  
ALBANIA ED IN DIFFERENTI AREE ITALIANE

PETRINCA ANNA RITA



F= Ospedale Forlanini di Roma e P= Ospedale Sandro Pertini di Roma, 2 sequenze;  
S= Salento, 16 sequenze and A=Albania, 70 sequenze).

## CONCLUSIONI

Scopo principale di questo studio è stato quello di valutare l'impatto delle gastroenteriti da RV nei bambini con età inferiore ai 5 anni attraverso siti sentinella di sorveglianza territoriale localizzati in Albania e in due aree di raccolta italiane (Roma e Lecce). Il presente studio ha previsto anche l'osservazione e l'analisi della diversità genotipica dei RV, necessarie per meglio comprenderne la circolazione e per caratterizzare lo shift antigenico che rende inefficace la vaccinazione. Sono stati analizzati un totale di 592 campioni fecali corrispondenti a casi di gastroenterite in bambini da 0 a 5 anni ricoverati o visitati al pronto soccorso. Complessivamente il 49% dei campioni (293/592) è risultato positivo ai RV del gruppo A. L'area che ha avuto la maggiore incidenza è stata quella del Salento con il 78% dei casi di gastroenterite da infezione di RV (170/217 campioni).

Dei ceppi isolati nello studio è stato determinato il genotipo P per 123 di essi, distribuiti tra l'Albania (98 campioni) e l'Italia centrale (25 campioni): il genotipo principale trovato è stato il P1A[8] (60%) (tabella 12), ossia quello predominante a livello mondiale (Dennehy PH 2008). Infezioni miste sono state trovate in Albania in un solo caso (doppia infezione P1A[8]-P1B[4]) in accordo con quanto ottenuto anche nel Regno Unito (Iturriza-Gomara M et al. 2000) ed in Spagna (Sanchez-Fauquier A et al. 2006). I ceppi isolati nell'area del Salento non sono stati P-tipizzati considerando l'assenza di genotipi P insoliti nell'area di Roma, così come nel resto del mondo, e la bassa specificità della metodica in uso (solo il 65% con il 35% dei ceppi non tipizzati).

Per quanto riguarda la determinazione dei genotipi G, rispetto alla genotipizzazione con nested PCR e successivo sequenziamento del pezzo amplificato, il metodo diretto con seminested PCR con pool di primers è risultato meno specifico e non adatto in maggior misura alla rilevazione dei genotipi G9 (51 campioni con il genotipo G9 non sono stati tipizzati) e G4 (14 sono i campioni non tipizzati). Nello studio condotto, il genotipo più frequentemente trovato è stato il tipo emergente G9 con il 39% di tutti i campioni positivi (fig.10). Ad esso seguono in ordine decrescente il G4 e il G2 con il 21% e il 20%, il G1 con il 15% e il G12 con solo 2 casi isolati entrambi nell'area del Salento. Sei sono stati i non tipizzati, tutti di origine albanese. Da un punto di vista territoriale, il G9 è il più diffuso in Albania, mentre nell'area del Salento predomina il genotipo G2 e a Roma il G4. Di conseguenza le combinazioni più diffuse sono state la G9-P1A[8] per l'Albania e la G4-P1A[8] per l'area di Roma.

Il sequenziamento nucleotidico e l'analisi filogenetica dei ceppi virali di identico tipo G isolati in zone geografiche differenti è stata condotta per valutarne la diversità genomica e una possibile co-circolazione dovuta al continuo movimento della popolazione soprattutto tra l'Albania e l'Italia. Infatti, in un passato studio (Gabrieli R et al. 2004) è stata dimostrata la co-presenza in questi due Paesi di uno ceppo del virus dell'epatite A con un'identica mutazione amminoacidica in una delle proteine del capside. In questo studio, allo stesso modo, l'analisi filogenetica dei genotipi G9 ha rilevato la co-presenza di un ceppo G9 in Albania e in Italia (area del Salento) con un'identica sostituzione amminoacidica nel gene VP7 (sostituzione della treonina con la lisina in posizione 8) (subcluster 2.1, fig.14). A rafforzare questi dati vi è l'omologia del 100% trovata tra i

ceppo G9 isolati in Albania con uno isolato in Italia (subcluster 3.2, figura 14). Anche per i genotipi G1 e G2 l'analisi filogenetica ha mostrato un'omologia compresa tra il 97-99% tra i ceppi isolati in Albania e l'area del Salento; in particolare, dei 3 ceppi G2 isolati in Albania, due (138A e 284A) mostrano un omologia del 98% con il ceppo a.n.DQ904511 come tre dei ceppi del Salento (18S, 26S, 28S). I G2 isolati a Roma discostano sia dai ceppi albanesi che da quelli del Salento. Per quanto riguarda il genotipo G4 l'analisi ha riscontrato una certa variabilità tra l'Italia e l'Albania, e la massima omologia si ha sempre tra i ceppi albanesi e quelli dell'area del Salento.

Questo studio basato sulla combinazione di sorveglianza epidemiologica tramite siti sentinella e di sorveglianza virologica (con diagnosi di laboratorio dei tipi virali) ha permesso di conoscere l'incidenza della gastroenterite da RV e di definire le caratteristiche dei ceppi circolanti nelle aree geografiche considerate. Questi dati aiutano a caratterizzare la situazione epidemiologica dell'Italia e possono contribuire a costituire il background per un futuro sistema di sorveglianza necessario per capire il meccanismo di protezione immunitaria ed i livelli di protezione conferita dai vaccini in uso.

## BIBLIGRAFIA

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973; 1:1281-3.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.

Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Jan; 21(1):198-208.

Desselberger U, Wolleswinkel-van den Bosch J, Mrukowicz J, Rodrigo C, Giaquinto C, Vesikari T. Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25(1 Suppl): S30-41.

Fischer TK, Viboud C, Parashar U, Malek M, Steiner C, Glass R, Simonsen L. Hospitalizations and deaths from diarrhea and rotavirus among children <5 years of age in the United States, 1993-2003. *J Infect Dis.* 2007;195: 1117–1125.

Gabrieli R, Sanchez G, Macaluso A, Cenko F, Bino S, Palombi L, Buonomo E, Pinto RM, Bosch A, Divizia M. Hepatitis in Albanian children: Molecular analysis of hepatitis A virus isolates. *J Med Virol.* 2004; 72:533–537.



Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992 Jun;30(6):1365-73.

Gilgen M, Germann D, Lüthy J, Hübner P. Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *Int J Food Microbiol.* 1997 Jul 22; 37(2-3):189-99.

Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1990 Feb; 28(2): 276-82.

Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology.* 2009 May; 136(6):1939-51. Epub 2009 May 7. Review.

Harrison. Principi di medicina interna. 1999; 282, 918

Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DW, Ramsay M, Desselberger U, Gray JJ. Molecular epidemiology of group A rotavirus infections in United Kingdom between 1995 and 1998. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:4394–4401.

Jiang B, Gentsch JR, and Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 34:1351–1361.

Lepage P. Rotavirus infection in Europe. Time for Effective Prevention? *J Ped Infect Dis.* 2006; 25:S5-S6.

Lepage P, Vergison A. Prevention of childhood rotavirus disease through the use of Rotarix and RotaTeq vaccines. *Expert Opin Biol Ther.* 2007 Dec; 7(12):1881-92. Review. PMID: 18034653.

Morrison C, Gilson T, Nuovo GJ. Histologic distribution of fatal rotaviral infection: an immunohistochemical and reverse transcriptase in situ polymerase chain reaction analysis. *Hum Pathol.* 2001 Feb; 32(2):216-21.

Petrinca A.R., Grassi T., Donia D., De Donno A., Idolo A., Cristaldi A., Alessandri C., M. Divizia. Detection and molecular characterization of human rotavirus isolated in Italy and Albania. *J Med Virology* 2010; 82:510–518.

Sanchez-Fauquier A, Montero V, Moreno S, Sole M, Colomina J, Iturriza-Gomara M, Revilla A, Wilhelmi I, Gray J. Human rotavirus G9 and G3 as major cause of diarrhea in hospitalized children, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12:1536–1541.

Soriano-Gabarrò M, Mzrukowic J, Vesikari T et al. Burden of RV disease in European Union Countries. *J Ped Infect Dis.* 2006; 25(1): S7-S11.

Sorice F, Ortona L. Malattie infettive. *UTET* 2000; pp.478-482.

Surendran S. Rotavirus infection: molecular changes and pathophysiology. *EXCLI Journal* 2008; 7:154-162 – ISSN 1611-2156.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007; 24:1596-1599.

Tsugawa T, Hoshino Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology* 2008; 380:344–353.

Vesikari T, Itzler R, Matson DO, Santosham M, Christie CD, Coia M, Cook JR, Koch G, Heaton P. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354:23–33.

Villena C, El-Senousy WM, Abad FX, Pintó RM, Bosch A. Group A Rotavirus in Sewage Samples from Barcelona and Cairo: Emergence of Unusual Genotypes. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jul; 69(7):3919-23.

WHO, *Weekly Epidemiological Record.* Vol.82 (32): 285-296; 10<sup>th</sup> August 2007.