

Università degli Studi di Napoli Federico II

Facoltà di Medicina Veterinaria

Tesi di Dottorato di Ricerca in:

Biologia, Patologia ed Igiene Ambientale in Medicina
Veterinaria XIX ciclo A. A. 2003-2004 / 2005-2006

Indirizzo: Morfopatologia Macroscopica, Microscopica,
Ultrastrutturale e Diagnostica Molecolare

Caratterizzazione molecolare, distribuzione e relativa
frequenza del P-tipo (Vp4) e del G-tipo (Vp7) di rotavirus di
gruppo A evidenziati in bambini affetti da gastroenterite

Coordinatore:

Chiar.mo

Prof. Giuseppe Paino

Dottorando:

Dott. Giuseppe Pisanelli

Tutor:

Chiar.mo

Prof. Ugo Pagnini

Indice

| | |
|--|---------|
| Introduzione..... | pag. 4 |
| Caratteri fisico-biologici..... | pag. 6 |
| Spettro d'ospite in vivo ed in vitro..... | pag. 7 |
| Struttura del genoma e delle proteine virali..... | pag. 8 |
| Struttura antigene..... | pag. 13 |
| Epidemiologia..... | pag. 15 |
| Patogenesi..... | pag. 16 |
| Sintomatologia..... | pag. 20 |
| Lesioni anatomopatologiche..... | pag. 22 |
| Elementi diagnostici..... | pag. 23 |
| Immunità..... | pag. 25 |
| Profilassi..... | pag. 28 |
| Obiettivi del lavoro..... | pag. 31 |
| Materiali e metodi..... | pag. 32 |
| Test rapido rotascreen bioproducts M580..... | pag. 33 |
| Estrazione dell'RNA bicatenario con la metodica di Wilde..... | pag. 35 |
| Retrotrascrizione prima amplificazione del gene della VP7 e Determinazione del G-tipo mediante PCR..... | pag. 36 |
| Retrotrascrizione prima amplificazione del gene della VP4 e Determinazione del P-tipo mediante PCR..... | pag. 40 |

| | |
|---|---------|
| Retrotascrizione ed amplificazione del gene codificante la VP6 mediante RT-PCR..... | pag. 42 |
| Caratterizzazione dei subgruppi di rotavirus I e II mediante digestione con enzimi di restrizione Aci I..... | pag. 44 |
| Risultati..... | pag. 46 |
| Discussioni..... | pag. 47 |
| Bibliografia..... | pag. 52 |

Introduzione

I Rotavirus, genere della famiglia Reoviridae, sono responsabili di diarree neonatali in numerose specie animali, uomo compreso. Nell'uomo sono causa, annualmente, di circa 111 milioni di episodi di gastroenteriti neonatali o infantili, di questi, 25 milioni richiedono una visita clinica, 2 milioni necessitano di ospedalizzazioni e circa 600 mila sono i decessi. Si è calcolato che quasi ogni bambino al di sotto dei 5 anni di età avrà un episodio di gastroenterite da rotavirus, 1 su 5 sarà sottoposto ad una visita clinica, 1 su 65 sarà ospedalizzato e circa 1 su 293 morirà. Di queste morti l'82% avvengono nei paesi in via di sviluppo (U. D. Parashar et al 2003). I Rotavirus sono privi di envelope, possiedono 11 segmenti di RNA bicatenario, racchiuso nel core. Quest'ultimo è ricoperto da un capsido interno costituito dalla proteina Vp6 che esprime l'antigene di gruppo grazie al quale è stato possibile classificare i rotavirus in 7 gruppi antigenici (da A a G). Il capsido esterno è costituito da due proteine, la Vp4 e la Vp7, le quali indipendentemente producono anticorpi protettivi neutralizzanti. La proteina Vp4 identifica il P-tipo (Proteasi-sensibile), mentre la VP7 identifica il G-tipo (Glicoproteina). In base ad analisi antigeniche/genetiche delle proteine Vp4 e Vp7 è stato possibile sino ad ora identificare 14 G sierotipi (determinati mediante

sieroneutralizzazione) 14 genotipi identici 27 P genotipi. (Hoshino et al., 2002; Liprandi et al., 2003; Martella V, et al., 2003; Martella V, et al in press; Martella V, et al 2006 Kapikian et al., 2001; McNeal et al., 2005). I principali sierotipi identificati nell'uomo sono G1, G2, G3, G4, G6, G8, G9, G10 e G12 in genere associati al P-tipo [8]. Negli ultimi anni sta emergendo, in tutto il mondo, il sierotipo G9. Per quanto riguarda i P sierotipi ed i P genotipi è utilizzata una diversa numerazione, in ragione del fatto che non sempre esiste una corrispondenza tra genotipo e sierotipo. Infatti i P sierotipi sono indicati con la lettera P seguita da un numero progressivo, mentre per identificare i P genotipi la lettera P è seguita da un numero in parentesi quadra. Sino ad ora sono stati identificati 14 P sierotipi 9 dei quali sono stati riscontrati nell'uomo (P1, P2, P3, P4, P5, P7, P8, P11 e P12). I genotipi identificati sono 27 di questi 10 sono stati identificati nell'uomo (P[3], P[4], P[5], P[6], P[8], P[9], P[10], P[11], P[14], P[19]).

Caratteri fisico-biologici

La particella virale completa ha un coefficiente di sedimentazione di 520 530 S ed una densità in CsCl di 1,36 g/ml. Essa, previo trattamento con tripsina, è la sola provvista di attività infettante.

In mancanza del capsido esterno, il coefficiente di sedimentazione si riduce 380-400 S e la densità diventa 1,38 g/ml, mentre il solo core ha un coefficiente di sedimentazione di 280 S e una densità pari a 1,44 g/ml. I Rotavirus, soprattutto quelli d'origine ovina, hanno la proprietà di agglutinare a diverse temperature i globuli rossi di varie specie animali (bovino, equino, capra, suino, oca, pollo, pecora, coniglio, cavia e uomo). L'infettività è favorita dalle basse temperature e da condizioni di umidità elevata, aumentando la temperatura diminuisce la capacità infettante anche in presenza di ioni magnesio.

Sono stabili a pH 3 e, in quanto privi di envelope, resistono ai comuni disinfettanti quali etere, cloroformio e acidi. Questo permette di capire la loro notevole persistenza nell'ambiente esterno (7- 9 mesi).

Spettro d'ospite in vivo ed in vitro

L'isolamento dei Rotavirus è ottenibile, oltre che dall'uomo, in numerose specie animali, sia domestiche sia selvatiche: bovini, bufali, equini, suini, ovini, cani, gatti, conigli, topi, cavie, antilopi, daini, cervi, orsi, canguri e diverse specie di volatili.

Caratteristica interessante dei Rotavirus, dimostrata fino a poco fa solo sperimentalmente, è che essi non sembrano specie-specifici; ciò riguarda sia stipiti d'origine umana, che si sono rivelati in grado di infettare vitelli gnotobiotici, agnelli, scimmie, e cuccioli di cane, sia stipiti provenienti da bovini ed equini in grado di riprodurre la malattia nei suinetti.

L'identificazione occasionale o ripetuta nell'uomo di stipiti virali correlati antigenicamente a rotavirus animali (Kapikian et al., 2001) dimostra che in condizioni naturali può realizzarsi una trasmissione interspecifica animali-uomo con introduzione stabile di geni di origine animale nel pool di alleli genici dei rotavirus umani. Per quanto riguarda la replicazione in vitro è utilizzata la linea cellulare MA-104 proveniente da rene fetale di scimmia (macaca mulatta.) Condizione essenziale per lo sviluppo del virus e per la comparsa Dell'effetto citopatico è l'aggiunta d'enzimi proteolitici (tripsina), sia nel materiale fecale sia nel liquido colturale la quale determina il clivaggio della VP4.

L'effetto citopatico si manifesta nel giro di 24-72 h, ed è caratterizzato dalla comparsa di cellule rifrangenti che si distaccano dal monostrato e vanno incontro a lisi. Con opportune colorazioni si mettono in evidenza inclusioni citoplasmatiche eosinofile in posizione paranucleare.

Struttura del genoma e delle proteine virali

I Rotavirus possiedono 11 segmenti di RNA bicatenario, racchiuso nel core, di dimensioni comprese tra 667 a 3302 paia di basi (in totale, circa 18600 pb). Generalmente si distinguono 4 segmenti (1-4) ad alto peso molecolare, 5 segmenti (5-9) a medio peso molecolare e due segmenti (10-11) a basso peso molecolare (Estes M.K. e Cohen J. 1989).

Le molecole di dsRNA purificate non sono infettanti: è necessaria l'RNA polimerasiRNA dipendente presente nelle particelle virali, per trascrivere i segmenti di RNA in mRNA attivi.

Le sequenze di singoli segmenti genomici, di diversi Rotavirus del gruppo A, confrontate, hanno evidenziato modificazioni di tipo shift (riassortimento genomico) o drift (cambi di sequenze nell'ambito dei segmenti).

Ogni segmento di RNA codifica per una proteina, tranne l'ultimo segmento che possiede due ORF, quindi avremo 6 proteine strutturali evidenziabili nelle particelle virali mature e 6 proteine non strutturali riscontrabili nelle cellule infette, ma non nei virioni maturi. Le proteine strutturali sono indicate dalle lettere VP seguite da un numero (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) quelle non strutturali sono invece denominate NSP, seguite anch'esse da un numero (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 ed NSP6).

La proteina VP1 è codificata dal segmento genomico 1. Costituisce, insieme con la VP2 e VP3, il core virale. Ha caratteristiche idrofobiche e basiche. Nel virione rappresenta il 2% della massa, e si pensa faccia parte del complesso enzimatico RNA-polimerasi. La VP1 ha attività antigenica ed immunogena, ma nelle infezioni naturali non sempre stimola la produzione di anticorpi, forse perché poco accessibile.

La VP2 è codificata dal segmento 2. Costituisce il 15% del virione; esprime l'antigene minore di sottogruppo ed è fortemente immunogena.

La presenza di anticorpi specifici indica un'infezione pregressa.

La VP3 è codificata dal segmento 3. Presenta omologie con l'RNA-polimerasi di altri virus e sembra coinvolta nella replicazione dell'RNA.

La VP6 è codificata dal segmento 6. Corrisponde al 51% del virione e rappresenta la principale proteina strutturale. Il capside interno è costituito da 780 molecole di VP6, organizzate in forma trimerica a

formare dei canali di diverso tipo. Si è visto che la rimozione della VP6 dalle particelle virali decapsidate determina la perdita dell'attività trascrizionale virale. La VP6 è quindi richiesta per l'attività polimerasica anche se non se ne conosce l'esatto ruolo. Rappresenta inoltre l'antigene di gruppo, sulla base del quale si identificano 7 gruppi virali (A>G) ed è fortemente immunogena. Spesso è usata come target nelle prove diagnostiche. Non è chiaro se gli anticorpi verso la VP6 siano neutralizzanti. Contiene infine due antigeni di sottogruppo, S1 ed S2, riconosciuti mediante anticorpi monoclonali.

La VP4 è prodotta dal segmento 4. Insieme con la VP7 costituisce lo strato capsidico esterno, che è formato da 780 molecole di VP7 e 120 molecole di VP4. Quest'ultima è organizzata in dimeri a formare 60 proiezioni esterne, lunghe circa 10 nm, con i margini arrotondati.

La VP4 è responsabile del fenomeno della restrizione della crescita virale in vitro ed in vivo. Possiede due siti di clivaggio proteasi sensibili, che in presenza di tripsina, determinano la scissione in VP5 (p.m. 60000 d) e VP8 (p.m. 28000 d), aumentando l'infettività virale. In alcuni ceppi umani si è osservato un terzo sito di clivaggio, forse correlato con il potere patogeno (secondo alcuni la patogenicità è correlata più a fattori dell'ospite che del virus).

Si ritiene che il clivaggio della VP4, attivi una precoce fase di replicazione, che può essere innescata da una o entrambe le regioni

terminali, generate dal clivaggio e dal cambiamento conformazionale nella VP4 clivata.

Gli aminoacidi adiacenti al punto di clivaggio sono dei peptici che costituiscono una regione che induce la produzione di anticorpi neutralizzanti. Infine presenta un'attività emoagglutinante.

La VP7 è prodotta dal segmento 7, 8 o 9. Rappresenta il 30% del virione ed è il costituente principale dello strato capsidico esterno. E' definita come proteina recettore, in quanto regola l'adsorbimento del virus alle cellule ed esprime l'antigene maggiore di neutralizzazione.

La NSP1 è codificata dal segmento 5. Si riscontra nelle prime fasi dell'infezione ed è la proteina virale soggetta a maggiore variazione genetica.

La NSP2 è codificata dal segmento 7, 8 o 9 in base al ceppo. E' coinvolta nella replicazione dell'RNA o nell'impacchettamento di mRNA nelle particelle sub virali.

LA NSP3 è codificata dal segmento 7, 8 o 9, a seconda dello stipite virale. Potrebbe essere una parte della replicasi virale.

La NSP4 è codificata dal segmento 10. Questa proteina viene glicosilata ed integrata nella membrana del RER (Reticolo Endoplasmatico Rugoso), dove si lega alla VP6, fungendo da recettore per le particelle virali immature prive dello strato capsidico esterno. La NSP4 modula così la gemmazione dei virioni immaturi che acquisiscono lo strato capsidico

esterno proprio a livello del RER. Questa è una caratteristica sconosciuta agli altri membri della famiglia dei Reoviridae.

La NSP5 è codificata dal segmento 11. La sua funzione è poco nota.

La NSP6 è codificata dal segmento 11. La sua funzione è poco nota.

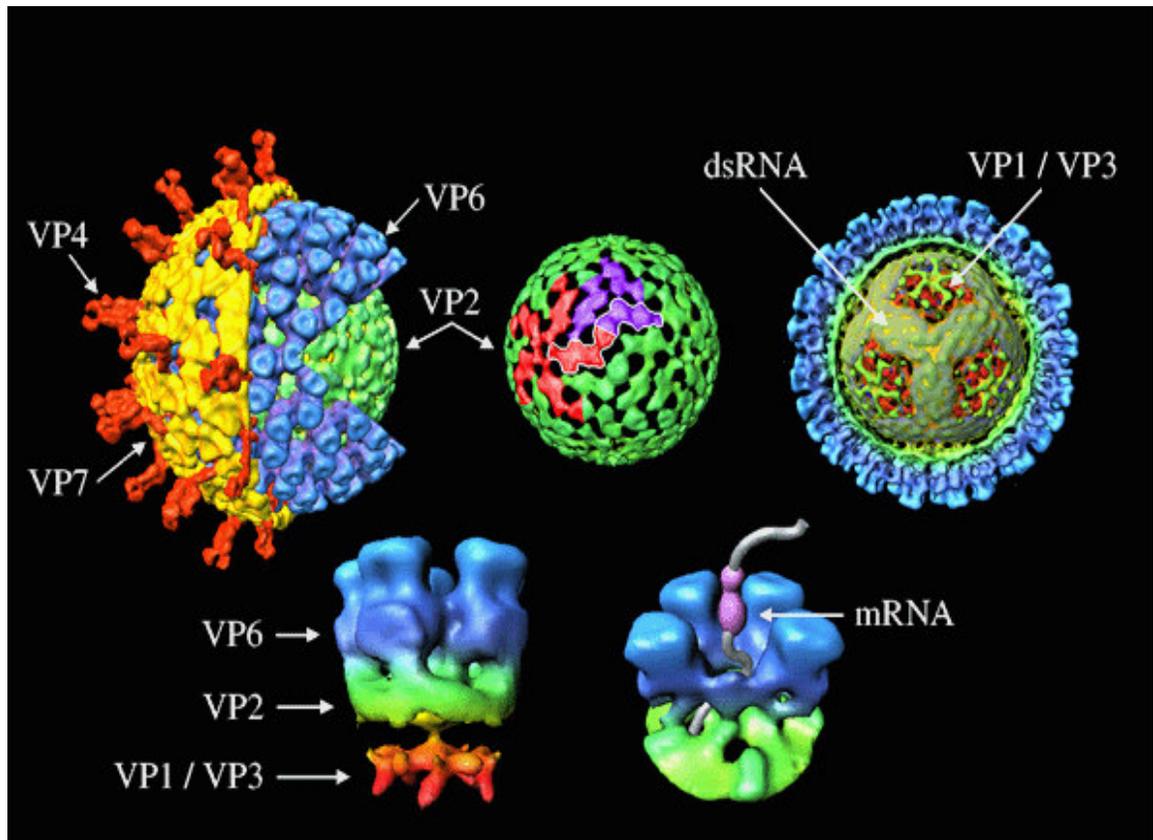


Figura 1: visione dell'architettura dei rotavirus

Struttura antigene

Nel genere Rotavirus sono stati identificati 7 sierogruppi, indicati con le lettere da A a G. I sierogruppi sono antigenicamente distinguibili mediante diverse tecniche, quali immunoelettromicroscopia, immunofluorescenza ed ELISA, in base ad un antigene di gruppo comune localizzato sulla proteina VP6. Il gruppo A è stato il primo ad essere identificato ed è il più diffuso.

Il profilo elettroforetico degli 11 segmenti genomici dei Rotavirus, ottenuto in gel di poliacrilammide (PAGE) permette di distinguere i sierogruppi di appartenenza del virus. Le bande di migrazione si distribuiscono in 4 classi. I Rotavirus di gruppo A dei mammiferi hanno un profilo elettroforetico tipo 4:2:3:2 quelli di gruppo B ed E hanno un profilo 4:2:2:3 quelli di gruppo C hanno un profilo 4:3:2:2.

I Rotavirus nell'ambito di un sierogruppo sono divisi in sottogruppi, in base alla presenza di due antigeni di sottogruppo, detti SI e SII, presenti sulle proteine VP6 e VP2.

I Rotavirus di gruppo A, i più studiati, sono ulteriormente classificati in sierotipi in base alle caratteristiche della VP4 e della VP7. La VP4 identifica il P-tipo (Protease-sensible), mentre la VP7 identifica il G-tipo (Glicoproteina). Sino ad oggi sono noti 15 G-tipo e 27 P-tipo (Kapikian et

al., 2001; Martella et al 2003; Martella et al 2006; Martella et al in press
Liprandi et al. 2003).

Nei bovini i tipi più diffusi sono P1, P11, P5, G6 e G10; negli equini P7,
P12, P17, G4 e G5; nei suini P6, P7, G4 e G5; mentre nell'uomo sono P8,
P4, P6, G1, G2, G3 e G4.

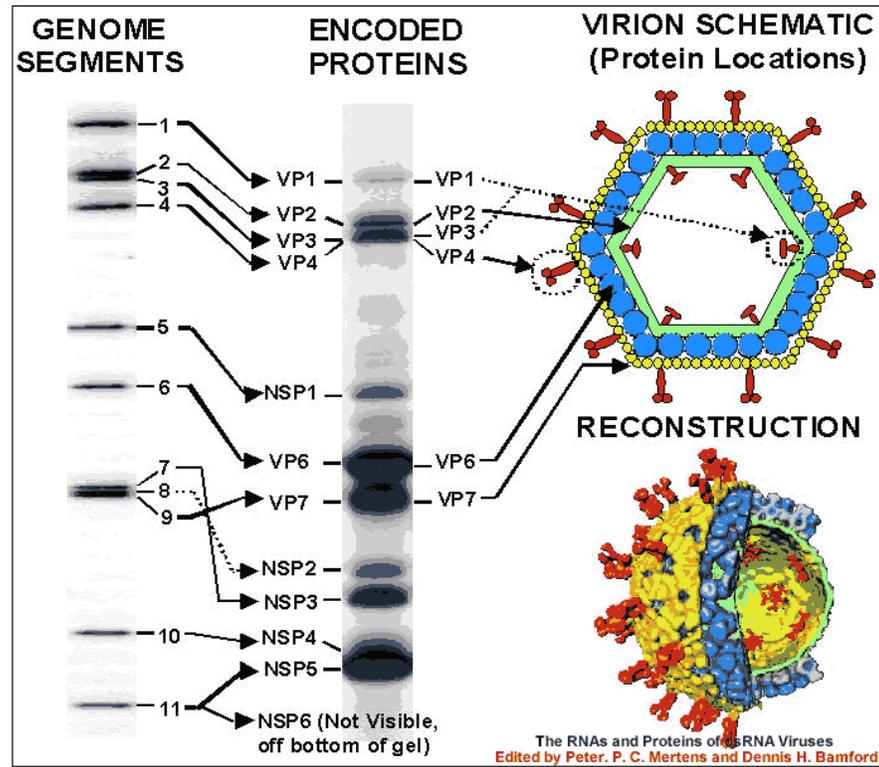


Figura 2: RNA virale segmentato; Proteine virali; Visione schematica del virus

Epidemiologia

La via di trasmissione principale è di tipo orizzontale, attraverso il ciclo oro fecale. I maggiori diffusori del virus sono i soggetti con una sintomatologia manifesta e quelli convalescenti. Questi ultimi rimangono a lungo escretori assumendo, in tal modo, un ruolo fondamentale nella persistenza e nei ritorni ciclici del virus.

E' possibile anche una trasmissione indiretta attraverso utensili, ed acque inquinati da feci infette. La trasmissione attraverso la via transplacentare e quella attraverso gli insetti ematofagi è da escludere in quanto la malattia non presenta fasi viremiche.

Esiste secondo alcuni autori anche la possibilità di una trasmissione attraverso la via respiratoria, a confermare questa ipotesi sono 1) la rapida acquisizione di anticorpi anti rotavirus nel primo anno di vita, in tutti gli ambienti anche quelli con standard sanitari elevati 2) alcune imponenti epidemie nelle quali non è stato possibile documentare la trasmissione oro- fecale 3) la presenza di una sintomatologia respiratoria in un numero proporzionalmente rilevante di pazienti affetti da gastroenterite 4) diversi isolamenti di rotavirus dal tratto respiratorio superiore. (Kapikian A. et al Fields Virology) Tuttavia la maggior parte degli studi mostra che la principale modalità di trasmissione è quella oro fecale. La rotavirosi si

manifesta soprattutto durante la stagione invernale e con umidità relativa molto elevata (80%).

Patogenesi

Per quanto riguarda la patogenesi, il virus, assunto per ingestione, si localizza nel duodeno e nel tratto superiore del digiuno, aderendo elettivamente alle cellule epiteliali dei villi intestinali con preferenza per le cellule situate all'apice ed ai lati dei villi colpiti.

L'adesione avviene ad opera di specifici recettori, si tratta di enzimi pancreatici, rinvenuti nei microvilli. Gli enzimi pancreatici agiscono attivando la proteina VP4, sui suoi siti di clivaggio, scindendola nelle 2 frazioni VP5 e VP8 aumentando così la capacità di penetrazione nella cellula. La penetrazione dei Rotavirus nella cellula è diretta, vale a dire, non mediata da endocitosi. Segue lo svestimento delle particelle, inteso come rimozione del capsido esterno, che porta alla formazione di particelle subvirali intermedie "ISPVs". Queste ultime possono formarsi, nell'intestino, anche in sede extracellulare, in quanto il capsido esterno è facilmente rimosso dall'azione enzimatica della chimotripsina.

Queste particelle incomplete conservano la loro capacità infettante in quanto il sito di adsorbimento è situato sugli spikes del capsido.

Lo svestimento del virione non è mai completo, infatti il core virale si ritrova nel citoplasma. La degradazione del capsido esterno comporta contemporaneamente l'attivazione dell'RNA-polimerasi e degli altri enzimi per il capping e la metilazione degli RNAm in via di formazione: sono trascritti tanti RNAm quanti sono i segmenti del genoma parentale, senza mai che il genoma parentale esca dal core. I diversi RNAm sembrano uscire dalle particelle attraverso i canali esistenti in corrispondenza degli spikes.

Questi RNAm sono prodotti, con un meccanismo di trascrizione conservativo unico nel mondo dei virus, sullo stampo del filamento (-). Parte dei filamenti di RNA (+) neoformati sono utilizzati come RNA progenie invece che come RNAm. Piuttosto precocemente si formano delle particelle progenie immature, vale a dire si osserva l'assemblaggio delle proteine più interne del core attorno ai filamenti (+) neoformati.

Probabilmente esiste una RNA binding protein che convoglia gli 11 singoli filamenti (+) "giusti" all'interno delle particelle immature. Solo all'interno del core stesso saranno poi sintetizzati i filamenti complementari di RNA (-). All'interno delle particelle incomplete si può avere un ulteriore ciclo di trascrizione e sintesi di proteine tardive, tra le quali ci sono quelle che costituiscono il capsido esterno: la glicosilazione delle proteine avviene ad opera del reticolo endoplasmatico rugoso.

Inoltre, le particelle progenie immature gemmano attraverso il reticolo endoplasmatico e acquisiscono momentaneamente un envelope.

Dopo che la glicoproteina maggiore del capsido esterno, la VP7, è stata prodotta e secreta, sempre attraverso il RER, l'envelope momentaneo è distrutto e la VP7 si assembla per completare lo strato capsidico esterno.

E' interessante notare che il dsRNA è sempre avvolto da proteine, ciò spiega come mai questi virus siano dei pessimi induttori di interferone, nonostante la doppia catena di RNA farebbe supporre il contrario. Le cellule cilindriche, così infettate, sono distrutte e rimpiazzate da cellule cuboidi delle cripte ghiandolari (Mebus et al.,1971).

Le lesioni che ne derivano possono raggiungere una notevole gravità, con la quasi totale distruzione dei villi in vari tratti della mucosa intestinale; esse iniziano all'altezza del duodeno e progrediscono in senso caudale.

La presenza di queste cellule cuboidali rappresenta una risposta dell'organismo per proteggere la lamina propria dei villi. Questa risposta permette l'acquisizione di uno stato di resistenza al proseguimento dell'infezione. Queste nuove cellule, infatti, sono apparentemente refrattarie all'infezione, essendo prive di recettori specifici per il virus (Mebus et al., 1971).

Le cellule cuboidali quindi sono cellule immature le quali sostituiscono, in corso di diarrea, quelle altamente differenziate accelerando la loro migrazione verso l'apice dei villi queste cellule sono infatti carenti di

enzimi specifici quali la disaccaridasi, Na^+ -ATPasi e K^+ -ATPasi. Tutto ciò determina difetti di trasporto ionico, una scarsa capacità di assorbimento di glucosio e galattosio (Halpin e Caple, 1976; Barnet et al, 1979) ed una diminuita capacità ad utilizzare il lattosio per deficienza di lattasi. A questo consegue la persistenza di questi zuccheri non digeriti nel lume intestinale che sono metabolizzati, da parte di batteri intestinali, e trasformati in acidi grassi a corta catena, con conseguente continuo richiamo osmotico di plasma e di altri liquidi organici che portano ad aumento della pressione osmotica nel lume intestinale cui segue diarrea e disidratazione. In ultima analisi, le alterazioni della mucosa intestinale indotte dai rotavirus ne modificano le attività specifiche e favoriscono l'assorbimento di metaboliti tossici derivati dalla fermentazione degli idrati di carbonio, alla quale spesso concorrono anche patogeni secondari quali E. coli, salmonelle ed altri, spiegando così l'alta mortalità nei paesi sottosviluppati. La diarrea è legata sostanzialmente a quest'eccesso di liquido in situ. È sufficiente, infatti, sospendere la somministrazione di latte e di altre fonti di disaccaridi per assistere, nei bambini e nei giovani animali colpiti, alla cessazione della diarrea.

Per questo motivo dovrebbe essere sempre adottato il criterio di sospendere la somministrazione di latte, latti artificiali ed altre fonti di lattosio e di saccarosio ai soggetti colpiti, somministrando, invece, soluzioni di elettroliti a volontà. I monosaccaridi (glucosio e destrosio)

dovrebbero essere sospesi per via orale e impiegati solo per via parenterale. Consigliabile è, invece, l'impiego di miscele proteiche ed aminoacidiche, per via orale. Così facendo nelle forme non complicate il ripristino dell'epitelio dei villi intestinali è più rapido con conseguenti brevi convalescenze.

Sintomatologia

Negli adulti il virus è in grado di moltiplicarsi senza provocare una sintomatologia manifesta, questo consente loro di comportarsi da efficienti escretori e diffusori di contagio. I neonati, sprovvisti di immunità mucosale a livello intestinale, invece manifestano la sintomatologia clinica.

Nell'uomo l'infezione da rotavirus può produrre una varietà di manifestazioni che possono andare da un'infezione sub clinica ad una diarrea moderata o ad una diarrea grave e talvolta a casi di morte. Il periodo di incubazione è di 2-4 giorni. La sintomatologia più frequente nei bambini è rappresentata dalla comparsa di un vomito imponente che persiste in genere 2 giorni, seguito da una forte disidratazione ed infine dalla comparsa di diarrea. Il vomito compare prima della diarrea, tuttavia quest'ultima permane per molti giorni (fino a nove giorni). La

temperatura media riscontrata in bambini con infezione da rotavirus è di 39,7°C. (Kpikian a. et al Fields Virology)

In tutte le specie domestiche il quadro sintomatologico è simile ed è sovrapponibile alle altre enteriti. La forma clinicamente manifesta compare, nelle varie specie, dopo un periodo di incubazione di 1-4 giorni e persiste circa 3-7 giorni. Gli animali colpiti dall'infezione mostrano i segni di un enterite acuta, che si manifesta con diarrea, talvolta muco-emorragica. Le feci in un primo tempo pastose, poi acquose, hanno colorito bianco-grigiastro, giallastro o verdastro in relazione alla dieta. La febbre si manifesta ad intermittenza o può essere assente. Gli animali giovani colpiti dalla diarrea possono sviluppare rapidamente una grave disidratazione, accompagnata da acidosi.

Il decorso varia da 4 a 8 giorni e benché la mortalità imputabile alla sola infezione da Rotavirus sia relativamente bassa, le conseguenze dell'infezione, che provocano disidratazione ed acidosi metabolica, sono spesso abbastanza gravi da determinare la morte del soggetto.

L'estensione delle alterazioni, la compromissione dello stato generale e l'eventuale partecipazione di E.coli o di altri germi di irruzione secondaria, possono spiegare la mortalità non indifferente, oltre il 50%.

Lesioni anatomopatologiche

Le lesioni anatomopatologiche più frequenti sono caratterizzate da uno stato scadente di nutrizione, grave disidratazione, enterite catarrale acuta linfadenomegalia mesenterica, ipertrofia delle placche del Peyer e lieve splenomegalia. L'esame istologico mette in evidenza un'infiltrazione nella mucosa di cellule linfomonocitarie ed un aumento di volume dei follicoli linfatici. I villi intestinali possono apparire accorciati ed atrofici, le cellule cilindriche dell'apice e della parete laterale di questi ultimi sono sostituite da cellule cuboidi e nei casi più gravi da cellule pavimentose, a ciò si associa iperplasia delle cripte. Una notevole desquamazione cellulare è messa in evidenza nel lume intestinale, nei linfonodi mesenterici si nota un grave edema con distacco delle cellule che rivestono i seni. Al microscopio elettronico i virus sono evidenziabili solo nelle cellule cilindriche della mucosa e non in quelle cubiche, inoltre le particelle virali si riscontrano più frequentemente nelle cisterne dilatate del reticolo endoplasmatico rugoso. Le cellule infette presentano notevoli modificazioni: distruzione dei microvilli, perdita della densità citoplasmatica e depositi di goccioline di grasso e quindi vanno incontro a desquamazione.

Elementi diagnostici

Per quanto riguarda la diagnosi di rotavirus si può affermare che è abbastanza difficile emettere un giudizio sulla sola base sintomatologica, dato che quest'ultima è simile a tante altre affezioni intestinali, infatti, il quadro anatomopatologico è spesso complicato da numerose infezioni batteriche secondarie le quali non permettono una differenziazione con altre enteropatie. Per una conferma definitiva, quindi, occorrono esami di laboratorio. Quelli più usati sono indirizzati ad evidenziare il virus nelle feci eseguiti con diverse tecniche quali:

colture cellulari: il materiale di partenza è rappresentato da feci, queste opportunamente trattate con antibiotici ed enzimi proteolitici sono fatte adsorbire su un adatto substrato cellulare, rappresentato dalla linea cellulare continua MA-104 (derivata da rene fetale di macaca mulatta). L'effetto citopatico, in caso di presenza di Rotavirus, compare dopo 24-48 ore ed è caratterizzato da cellule rifrangenti che si distaccano dal substrato;

microscopia elettronica: il materiale d'indagine è costituito da feci, contenuto intestinale o colture cellulari che, dopo centrifugazione e colorazione negativa del sedimento, è osservato al microscopio

elettronico. È certamente uno dei sistemi migliori e forse il meno indaginoso, ma occorre una strumentazione complessa e molto costosa;

immunofluorescenza: è un metodo molto semplice che può essere applicato a sezioni istologiche d'intestino o colture cellulari. Si può fare ricorso al metodo diretto o indiretto;

ELISA: può essere applicato direttamente sulle feci; per l'elevata sensibilità e la possibilità di automazione sta diventando di uso corrente;

PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis): è una tecnica relativamente recente che svela l'acido nucleico dei Rotavirus eventualmente presenti nelle feci. Queste dopo opportuno trattamento con una miscela a base di fenolo cloroformio, sono sottoposte ad elettroforesi in gel di poliacrilamide. In caso di positività si nota nel gel il profilo elettroforetico del genoma costituito da 11 bande; questa metodica permette anche la differenziazione dei Rotavirus tipici da quelli atipici;

PCR (polimerase chain reaction) quest'ultima consente non solo una diagnosi rapida ma anche l'identificazione del sierotipo in causa;

gli esami sierologici sono poco attendibili e per ciò scarsamente impiegati (Farina, Scatozza 1998).

Immunità

I meccanismi responsabili dell'immunità in seguito all'infezione ed alla malattia sostenute dai rotavirus non sono completamente chiariti soprattutto nell'uomo, dove, studi sull'importanza degli anticorpi serici stanno producendo risultati contrastanti. I modelli animali, tuttavia, sono stati particolarmente istruttivi nel chiarire il ruolo degli anticorpi e nell'analizzare la relativa importanza dell'immunità locale e sistemica. (Kapikian A. et al: Fields of Virology).

Le madri guarite da rotaviroosi o immunizzate contro Rotavirus sono in possesso di anticorpi specifici che trasmettono alla prole per vie diverse, secondo la specie. I bambini nascono con un bagaglio anticorpi della classe IgG circolanti pari a quello materno (Blacklow et al., 1976; Elias, 1977) ed acquisiscono IgA con il colostro e il latte (Dei et al., 1980). I bovini, gli ovini, i suini, invece, nascono senza anticorpi circolanti, ma ne acquisiscono in quantità notevole soprattutto con il colostro e in parte con il latte. Essi sono assorbiti per via digerente e si ritrovano in circolo in concentrazioni ottimali (Mebus et al, 1973; Bridger e Woode, 1975). Da

tutto ciò consegue che per gli animali neonati l'assunzione di colostro è indispensabile ed il privarli di esso significa renderli senza difesa. Infatti, se è somministrato in modo adeguato a garantire la presenza di anticorpi nel lume intestinale protegge i neonati dalla malattia e dall'infezione (Mebus et al, 1973). In circolo gli anticorpi di origine colostrale non sono in grado di proteggere dall'infezione, mentre è opinione discordante se protegga dalla malattia o ne attenui la gravità (Woode et al, 1975; McNulty et al, 1976).

Per quanto riguarda l'immunità attiva c'è da sottolineare che l'intensa replicazione virale durante l'infezione acuta della malattia provoca un notevole stimolo antigenico a carico dei linfociti della parete intestinale, perciò si ha un'infiltrazione linfo-monocitaria con iperplasia del tessuto intestinale. Dopo l'infezione, i primi anticorpi a comparire sono quelli della classe IgM, successivamente le IgG. Questi anticorpi nei primi anni di vita si presentano con tassi elevati (Elias, 1977) e dopo aver raggiunto la punta massima decrescono ma persistono a lungo. Tuttavia questa presenza se da un lato indica che l'organismo è venuto in contatto con il virus, dall'altro non sembra svolgere un'azione protettiva contro l'infezione che è ad esclusiva localizzazione enterica, al massimo sembra attenuarne la sintomatologia. Infatti, sia gli adulti sia cuccioli con un buon tasso di anticorpi circolanti, possono reinfettarsi. È noto che un sierotipo

immunizza contro l'omologo e non l'eterologo. In considerazione di ciò, molte reinfezioni possono essere dovute ad un sierotipo diverso.

Di maggior rilievo, invece, hanno in questa infezione gli anticorpi della classe IgA che risultano più avidi e che sono in grado di bloccare la sintesi virale. Per quanto riguarda la produzione locale di anticorpi è stato dimostrato che Rotavirus, anticorpi e immunocomplessi possono rinvenirsi contemporaneamente nelle feci e che gli anticorpi sono svelati prima degli immunocomplessi e pi in forma libera ma la loro produzione è transitoria, perdurando solo da 4 a 10 giorni dopo l'infezione, come è noto anche per altre virosi. Cosa interessante da sottolineare è la classe di appartenenza di questi anticorpi mucosali, infatti, nell'uomo ed in molte specie animali sono stati isolati da feci anticorpi non solo della classe IgA ma anche quelli di classe IgG ed IgM. Nei suinetti, invece non sono stati trovati anticorpi IgG (Corning et al 1978), il che potrebbe essere dovuto alla loro alta sensibilità all'azione di enzimi proteolitici presenti in detti animali. Questi anticorpi, di origine mucosale, sono evidenziabili nell'ultima fase della diarrea ma non è stato dimostrato se siano responsabili della guarigione. Tali anticorpi potrebbero limitare la persistenza dei Rotavirus o essere responsabili dell'eliminazione intermittente del virus (Lecce, et al 1978).

Profilassi

Nell'uomo un elevato standard igienico-sanitario è in grado di ridurre in maniera drastica la diffusione della malattia, infatti la maggiore incidenza della rotavirusi la riscontriamo nei paesi in via di sviluppo dove gli standard igienici non sono in grado di garantire una riduzione della carica infettante. Altro punto che gioca a favore della diffusione del virus è un'alimentazione carente, infatti, bambini denutriti sviluppano la malattia in maniera più rapida e grave rispetto ad un bambino correttamente alimentato (Kpikian A. et al; Fields Virology 2001).

Negli animali, la profilassi sanitaria è in grado di realizzare una riduzione della carica infettante negli ambienti di allevamento. Ciò può essere ottenuto garantendo, sul piano dell'igiene generale, una temperatura ed areazione ottimale degli animali in allevamento, una pulizia e disinfezione dei locali con disinfettanti a base di formalina ed un elevato standard sanitario locale. Infatti, è stato dimostrato che la malattia ha una maggiore incidenza quando aumenta il tasso virale ambientale (a causa dell'affollamento, della minore ventilazione durante l'inverno dell'uso continuo dei locali) ed infine quando il neonato, svezzato precocemente, non può più usufruire degli anticorpi contenuti nel latte.

Tuttavia a causa del numero imponente di particelle virali contenute nelle feci e a causa della resistenza del virus nell'ambiente, le misure sanitarie non sono sufficienti al controllo di questa malattia.

L'immunizzazione rappresenta il metodo più efficace per il controllo della malattia.

I bambini nascono con un bagaglio anticorpi della classe IgG circolanti pari a quello materno (Blacklow et al., 1976; Elias, 1977) ed acquisiscono IgA con il colostro e il latte (Dei et al., 1980). Tuttavia totalità dei bambini nel primo anno di vita, verrà a contatto con il virus, possedendo così una certa quantità di anticorpi sierici. I titoli anticorpali variano da soggetto a soggetto e sono in rapporto con il contatto antigenico avuto.

I bovini, gli ovini, i suini, invece, nascono senza anticorpi circolanti, ma ne acquisiscono in quantità notevole soprattutto con il colostro e in parte con il latte. Essi sono assorbiti per via digerente e si ritrovano in circolo in concentrazioni ottimali (Mebus et al, 1973; Bridger e Woode, 1975). Da tutto ciò consegue che per gli animali neonati l'assunzione di colostro è indispensabile ed il privarli di esso significa renderli senza difesa. Infatti, se è somministrato in modo adeguato a garantire la presenza di anticorpi nel lume intestinale protegge i neonati dalla malattia e dall'infezione.

Da ciò si evince che le strategie profilattiche sono diverse nell'uomo e nell'animale.

Siccome il periodo di massima recettività all'infezione da rotavirus corrisponde ai primi 15 giorni di vita, lo stato immunitario del neonato è decisivo per la comparsa della malattia, quindi è proprio durante questo periodo che occorre adottare una strategia profilattica contro questa infezione. I primi vaccini utilizzati sono stati vaccini, in genere attenuati, somministrati per via orale ai vitellini privati di colostro subito dopo la nascita. L'immunità si stabiliva dopo 48-72 ore, lasso di tempo che, tuttavia, non sempre riusciva a proteggere gli animali contro un'infezione precoce (Mebus et al, 1972). È stato fatto presente, inoltre, che gli anticorpi di origine colostrale possono interferire col virus vaccinale. Per queste considerazioni si è pensato, negli animali, di vaccinare le madri e fare affidamento solo sull'immunità passiva di origine materna e, più in particolare, sulla presenza di IgA nel colostro e nel latte. Queste resistono agli enzimi proteolitici e pertanto possono agire direttamente sul virus presente nel lume intestinale. Infatti, oggi i vaccini utilizzati, per gli animali, sono esclusivamente di questo tipo che sono praticati su animali gravidi nell'ultimo terzo della gestazione.

Per quanto riguarda l'uomo i principali vaccini, che sono ormai in una fase terminale di sperimentazione, sono vaccini attenuati che vengono somministrati ad i bambini. Come abbiamo visto precedentemente la sierotipizzazione dei virus isolati ha messo in luce che nelle varie specie esiste una diversa frequenza dei vari G-tipo e P-tipo. Inoltre,

considerando ormai un dato acquisito che la protezione immunitaria è sostanzialmente omologa, in altre parole è in grado di proteggere solo nei confronti del sierotipo vaccinale, è risultato chiaro che una profilassi vaccinale dove necessariamente tenere conto di quelli che sono i sierotipi più diffusi nella specie umana. Infatti, i vaccini oggi maggiormente utilizzati sono prodotti con i sierotipi G1-G4 P[1] P[8] che rappresentano oltre 90% dei sierotipi diffusi nella popolazione umana.

Le ricerche in tal senso stanno perseguendo due obiettivi ben precisi:
Identificare un sierotipo in grado di conferire una sufficiente protezione anche crociata, diretta cioè contro il maggior numero di sierotipi;
Tipizzare gli stipti di rotavirus isolati e allestire una mappa della loro distribuzione geografica, per poter attuare una vaccinazione mirata.

Obiettivi del lavoro

Lo scopo del lavoro è stato quello di accertare la presenza di rotavirus di gruppo A provenienti da campioni di feci di bambini, ricoverati presso l'ospedale Ruggi d'Aragona di Salerno, affetti da una sintomatologia diarroica, nonché quello di caratterizzare I ceppi di rotavirus isolati determinandone il P-tipo ed il G-tipo valutandone la distribuzione e la relativa frequenza.

Materiali e metodi

Ospedale e pazienti

Lo studio è stato condotto in un periodo di tempo compreso tra Marzo del 2005 ed Aprile 2006 ed ha incluso bambini al di sotto dei 5 anni di età ricoverati presso l'ospedale l'ospedale Ruggi d'Aragona di Salerno, affetti da gastroenterite acuta dai quali sono stati ottenuti i campioni di feci.

Tutti i campioni sono stati raccolti e trasportati immediatamente nei laboratori e congelati a -80 C° prima di essere processati.

Test rapido rotascreen dipstick M580

Il test si basa su un principio immunocromatografico, in breve: su un bastoncino sono presenti una linea di cattura anticorpale ed una linea di controllo anticorpale. Il tampone, legato all'estremità della striscia, contiene particelle di oro colloidale rivestite con anticorpi specifici per Rotavirus.

Quando il bastoncino è bagnato nel campione fecale diluito, le particelle di Rotavirus, eventualmente presenti, si legano agli anticorpi che rivestono le particelle di oro colloidale e migrano sul bastoncino finché sono immobilizzati dalla linea di cattura anticorpale. Le particelle di oro colloidale che non hanno legato i Rotavirus migrano oltre fino ad incontrare la linea di controllo anticorpale e confermare così che l'analisi è terminata. Le linee normalmente compaiono sul bastoncino in un intervallo di tempo compreso tra i cinque e dieci minuti. Fig 3 e 4

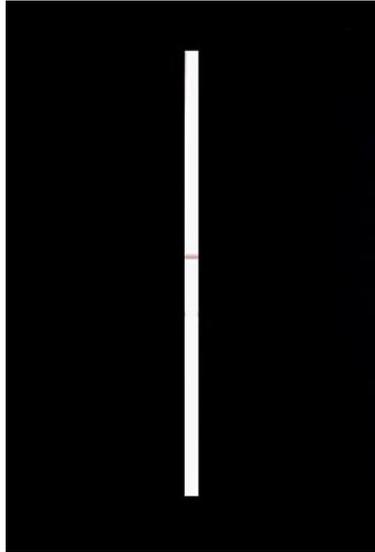


Figura 3: test rapido immunocromatografico rotascrin dipstick 580. Test negativo.

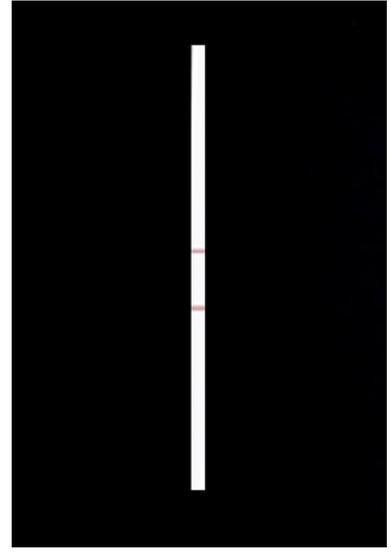


Figura 4: test rapido immunocromatografico rotascreen dipstick 580. Test positivo.

Materiali e metodi Estrazione dell'RNA bicatenario con metodica di Wilde

L'RNA bicatenario virale è stato estratto mediante la metodica di Wilde et al. (1990) per rimuovere gli inibenti fecali. Brevemente, 100 µl delle feci, previa diluizione 1:10 in soluzione salina (PBS), sono stati aggiunti a 200 µl di buffer di estrazione (0.2 M glicina, 0.1 M Na₂HPO₄, 0.6 M NaCl, 1% sodio-duodecilsolfato). La miscela è estratta con un eguale volume di fenolo e quindi con fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (24:24:1). Alla fase acquosa è stato aggiunto etanolo fino ad una concentrazione del 15 % (vol/vol) e 30 mg di cellulosa CF11. La miscela è stata tenuta in agitazione, per 90 min. a 4°C per far adsorbire il dsRNA alla cellulosa. Dopo tre lavaggi con STE (0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA, 0.05 M Tris, pH7) contenente etanolo 15% (vol/vol), l'RNA è stato eluito mediante lavaggio finale con STE senza etanolo. L'RNA virale è stato quindi precipitato con sodio acetato 0.3 M e risospeso in 50 µl di buff. e TE (pH 8.0).

Denaturazione

L'RNA virale estratto è stato denaturato mediante DMSO (dimetilsolfossido) a 97° C per 5 minuti e quindi raffreddato in ghiaccio.

Retrotrascrizione, prima amplificazione del gene codificante la VP7 e determinazione del G-tipo mediante RT-PCR.

La G-tipizzazione è stata effettuata mediante una strategia basata sulla polimerase chain reaction (PCR) articolata in tre fasi, come descritto da Gouvea et al. (1990, 1994), apportando alcune modifiche. La retrotrascrizione (RT) e la prima amplificazione PCR sono state effettuate usando il kit Gene Amp RNA PCR Core (Applied biosystem. Monza). Brevemente, 2 µl di RNA virale è stato denaturato con 1.4 µl di dimetilsolfossido (97°C for 5 min) ed immediatamente raffreddato in

ghiaccio. L'RNA denaturato (2 µl) è stato aggiunto a 18 µl della miscela di RT contenente PCR buffer II 1X (KCl 50 mM, Tris-Hcl 10 mM, pH 8.3), MgCl₂ 2.5 mM, dNTP 700 µM, 1 U di Rnasi-inibitore, 2.5 U di MuLV-retrotrascrittasi e 50 nM di ciascuno dei primer utilizzati (Beg9 e End9). Dopo la sintesi del cDNA (42°C per 45 min, 99°C per 5 min), la miscela è stata portata a volume di 100 µl, mediante aggiunta di reagenti per PCR e H₂O distillata, in modo da ottenere la seguente mix: PCR buffer II 1X (KCl 50 mM, Tris-Hcl 10 mM, pH 8.3), MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 150 µM, 50 nM di ciascuno dei primer utilizzati (Beg9 e End9) e 2.5 U di DNA polimerasi. La mix PCR è stata sottoposta a 25 cicli di 94°C per 1 min, 42°C per 2 min, 72°C per 1 min. 2 µl del prodotto della prima PCR, diluito 1:100 in H₂O distillata, sono stati usati come template per la seconda amplificazione PCR in una miscela di 100 µl, contenente PCR buffer II 1X (KCl 50 mM, Tris-Hcl 10 mM, pH 8.3), MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 200 µM, 2.5 U di AmpliTaq Gold[®] DNA-polymerase (Applied Biosystem Monza) e 50 nM di ciascuno dei primer utilizzati. Due set di amplificazione PCR sono stati effettuati separatamente usando due differenti pool di primer tipo-specifici: primer sEnd9 con un pool di primer specifici per i tipi G1, G2, G3, G4, G8 e G9; primer sBeg9 con un pool di primers specifici per i tipi G5, G6, G8, G10, G11. Le miscele sono state sottoposte a 10 min di incubazione a 94°C per attivare la DNA-polimerasi e 25 cicli di 94°C per 1 min, 55°C

per 2 min, 72°C per 1 min. I prodotti PCR sono stati analizzati in gel di agarosio 1.5% in TAE (Tris-Acetato-EDTA, pH 8), previa colorazione con etidio bromuro, e i G tipi sono stati determinati sulla base delle dimensioni degli amplificati, come descritto da Gouvea et al. (1990,1994). La prima amplificazione è riportata nella figura 5. La strategia di tipizzazione schematizzata nella figura 6.

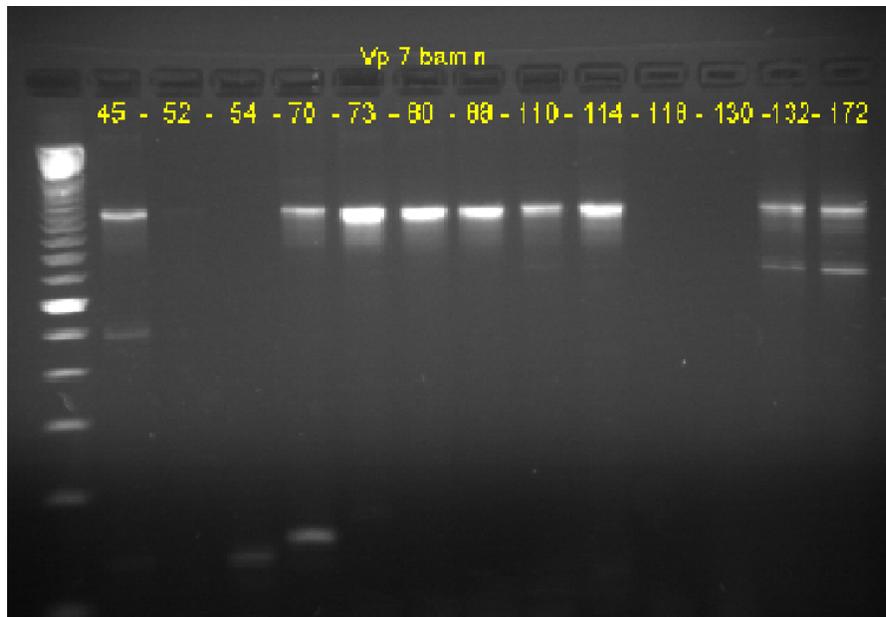


Figura 5: RT-PCR con i primers Beg9-End9. Amplificazione del gene VP7 (1060 bp).

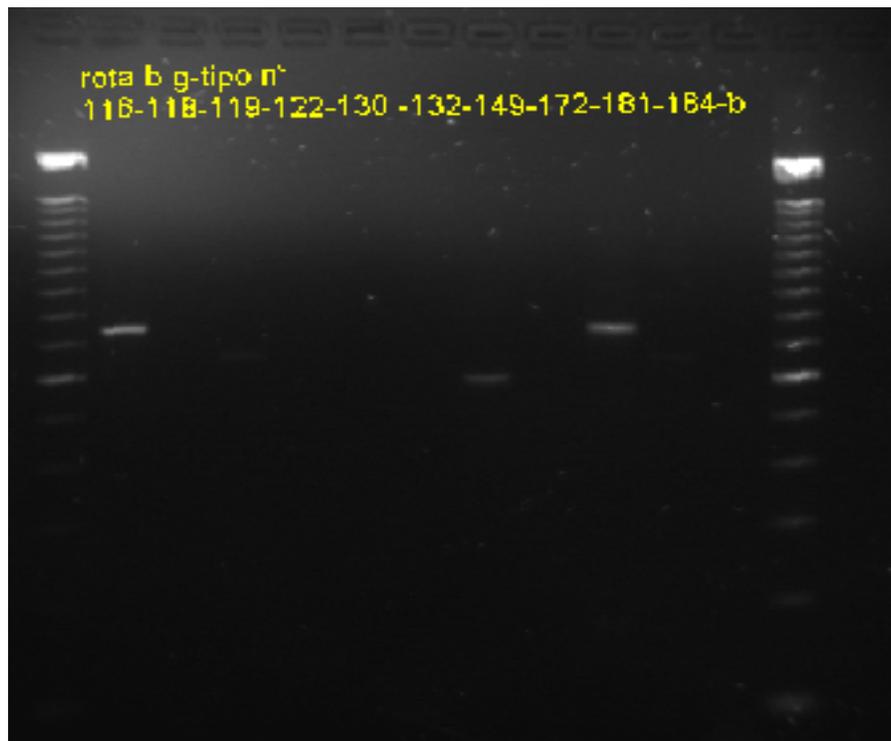


Figura 6 : caratterizzazione del G-tipo mediante hemi-nested PCR. Pozzetto 1° 9°: ladder; n°116: G1 (749bp); n°119: G2 (652bp); n° 149 G4 (583 bp)

Retrotrascrizione, prima amplificazione della regione ipervariabile del gene codificante la VP4 e determinazione del P-tipo mediante RT-PCR

La caratterizzazione della proteina VP4 è stata effettuata seguendo la metodica originariamente descritta da Gentsch et al. (1992) e Gouvea et al. (1994). Un protocollo analogo a quello impiegato per la caratterizzazione della proteina VP7, con alcune piccole variazioni, è stato seguito. La retrotrascrizione (42°C per 45 min, 99°C per 5 min) e la prima amplificazione PCR (94°C per 1 min, 42°C per 2 min, 72°C per 1 min, 25 cicli) sono state effettuate con la coppia di primer Con2-Con3. La seconda amplificazione PCR (94°C per 1 min, 55°C per 2 min, 72°C per 1 min, 25 cicli) è stata effettuata con il primer Con3 ed un pool di primer specifici per il P genotipo P[4], P[6], P[8], P[9] P[10] e P[11]. La prima amplificazione è riportata nella figura 7. La strategia di tipizzazione è schematizzata nella figura 8

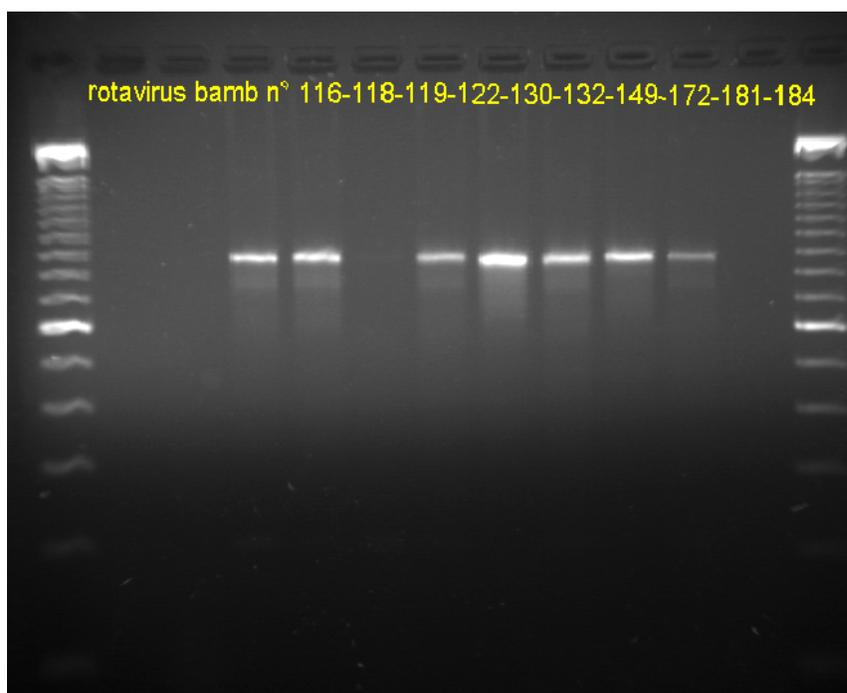


Figura 7: RT-PCR con i primers Con2-Con3. Amplificazione di frammenti di 876 bp del gene della proteina VP4

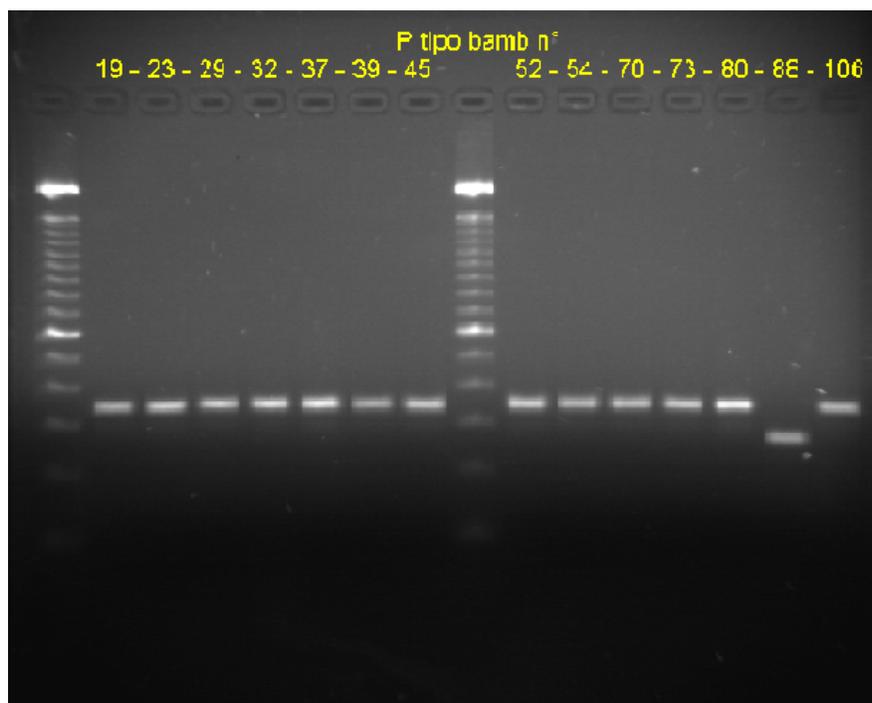


Figura 8: caratterizzazione del P-tipo mediante PCR. 1° pozzetto: Ladder 100 bp; n° 19-80 + 106 P[8] (350 bp); n°88 P[6] (272bp)

Retrotascrizione ed amplificazione di un frammento del gene codificante la VP6 mediante RT-PCR

L'amplificazione del gene della VP6 è stata effettuata mediante una strategia basata sulla polimerase chain reaction (PCR), secondo la metodica descritta da M. Iturriza-Gomarra (2002), apportando alcune modifiche. La retrotrascrizione (RT) e l'amplificazione PCR sono state effettuate usando il kit SuperSript™ One Step RT-PCR with platinum taq (Invitrogen Milano). Brevemente, 2 µl di RNA virale è stato denaturato con 1.4 µl di dimetilsolfossido (97°C for 5 min) ed immediatamente raffreddato in ghiaccio. L'RNA denaturato (2 µl) è stato aggiunto a 24 µl della mistura di RT-PCR contenente PCR 2x buffer mix, H₂O distillata, ciascuno dei primers utilizzati (VP6F e VP6R) ed Platinum Taq. La mix RT-PCR è stata sottoposta ad un programma termico di 50°C per 60 min 94° per 1 minuto, 35 cicli di 94°C per 1 min, 50°C per 1 min, 68°C per 1 min, ed infine 68°C per 10 min. I prodotti PCR sono stati analizzati in gel di agarosio 1,5% in TBE (Tris-Borato-EDTA, pH 8), previa colorazione con etidio bromuro.

L'amplificazione del frammento del gene della VP6 è visualizzata nella figura 9.

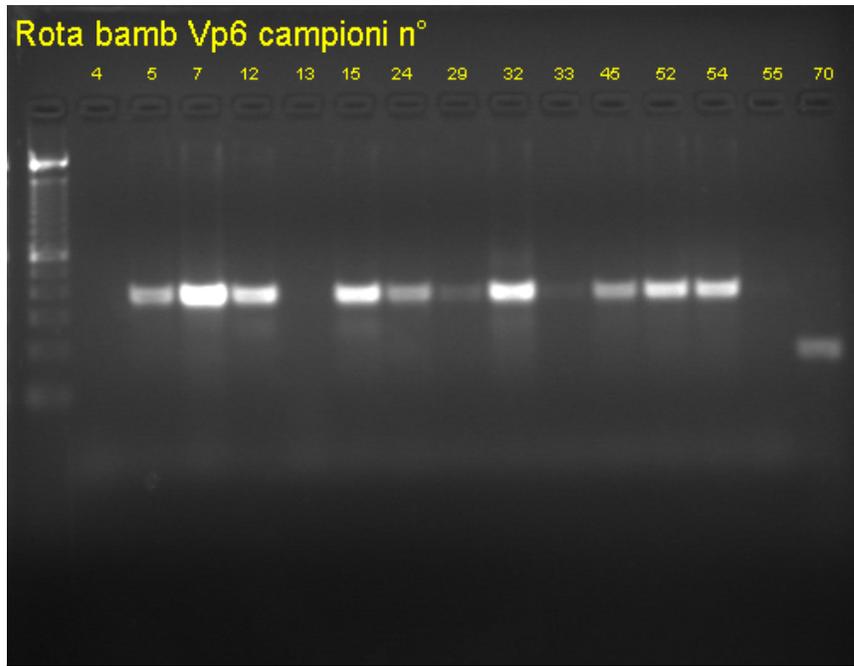


Figura 9: RT-PCR con i primers VP6R –VP6F. Amplificazione di frammenti di 379 bp del gene della proteina VP6

Caratterizzazione dei subgruppi di rotavirus I e II mediante digestione con enzimi di restrizione Aci I

Gli amplificati di 379 bp del gene VP6 sono stati testati per RFLP utilizzando gli enzimi di restrizione Aci I (5' C ↓ CGC 3' / 3' GGC ↑ 5' New England BioLabs). 15 µl di DNA sono stati aggiunti ad una mix contenente H₂O distillata 6 µl NE buffer 2,5 µl e 100 U I di Aci I raggiungendo un volume finale di 25 µl. La mix è stata sottoposta ad un programma termico 37°C per 3 ore e 65° C per 20 minuti. I prodotti della digestione sono stati analizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio al 2 % in TBE buffer previa colorazione con etidio bromuro. I differenti subgruppi sono stati determinati sulla base dei differenti patterns di digestione degli amplificati, come descritto da Miren Iturriza-Gomarra et al (2002). I tagli ottenuti sono visualizzati nella figura 10.

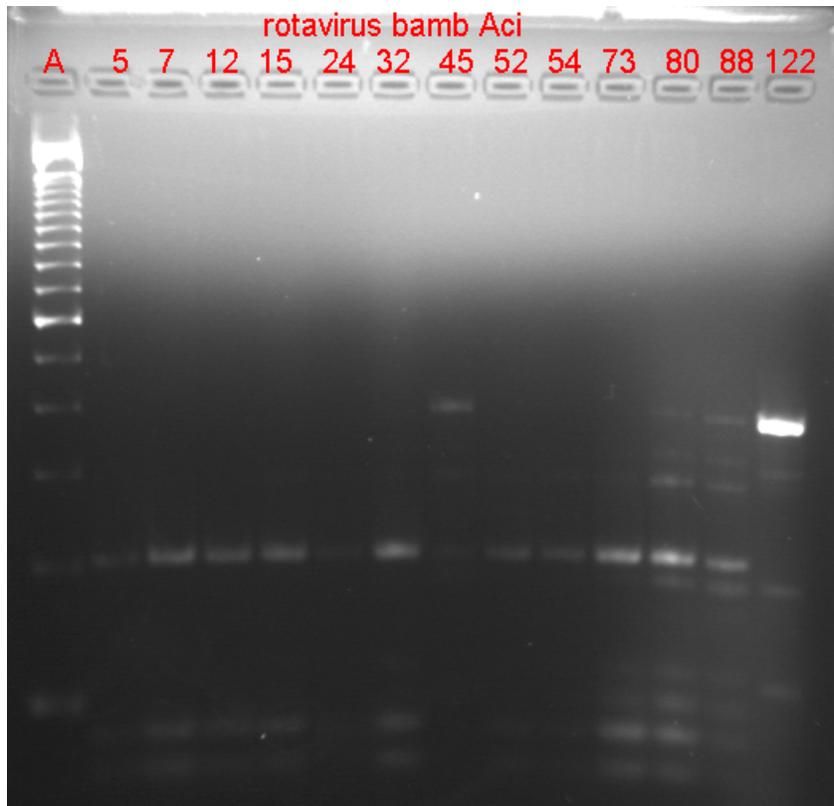


Figura 10: digestione con enzimi ACI I A: ladder Camp n° 5-7-12-15-24-32-52-54-73-80-88- pattern 3 subgruppo II; 45-122 pattern 0 subgruppo I

Risultati

Dei 188 campioni di feci analizzati, provenienti da bambini con sintomatologia diarroica ricoverati presso l'ospedale Ruggi d'Aragona di Salerno, sono risultati positivi ai Rotavirus di gruppo A n° 43 con una percentuale di positività del 22,87%. Di tutti i 43 ceppi evidenziati è stato determinato il G- tipo ed il P- tipo seguendo diverse strategie di tipizzazione ed i differenti subgruppi mediante RFLP.

| Genotipi | P[4] | | P[6] | | P[8] | | totale | |
|---------------|-----------|--------------|----------|-------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| G1 | | | | | 16 | 37,2% | 16 | 37,2% |
| G2 | 11 | 11,5 % | | | | | 11 | 25,5% |
| G3 | | | | | 7 | 16,2 % | 7 | 16,2% |
| G4 | | | | | 1 | 2,3% | 1 | 2,3% |
| G8 | | | | | 1 | 2,3% | 1 | 2,3% |
| G9 | | | 2 | 4,6% | 5 | 11,6% | 7 | 16,2% |
| totale | 11 | 25,5% | 2 | 4,6% | 30 | 69,7% | 43 | 100 % |

Discussioni

Nell'uomo circolano ceppi di rotavirus di gruppo A che sono geneticamente ed antigenicamente diversi con una prevalenza dei vari genotipi / sierotipi che è variabile in funzione del tempo e dell'area geografica considerata. I più comuni sierotipi / genotipi circolanti nel mondo sono G1P[8], G2P[4], G3P[8], e G4P[8]. Tuttavia alcuni sierotipi meno frequenti, come G9P[8], G5P[8], and G8P[6], sono diventati predominanti in diversi paesi. (Hoshino e Santos 2004). In particolare il sierotipo G9P[8] dalla sua prima comparsa nella popolazione umana nel 1983 (Clark ed Hoshino 1987) dopo un'assenza di circa dieci anni, è ricomparso con un'incidenza del 50% nella stessa città di Philadelphia durante la stagione 1995-1996 (Clark HF et al 2004) diventando poi, nel giro di pochi anni, uno dei sierotipi più diffusi nel mondo risultando in alcuni paesi, come il Brasile, Giappone, la Thailandia e l'Australia, il principale sierotipo (Zhou Y et al 2001; Khamrin P et al 2006; Santos N et al 2006; Kirkwood C et al 2002) . In Europa dal 1973 al 2003 sono stati tipizzati 17475 di questi il 97,5% sono risultati essere G1-G4. In Italia, precedenti studi, hanno evidenziato I sierotipi G1 - G4 come i principali sierotipi circolanti nel nostro paese associati prevalentemente ai genotipi P[4] e P[8]. Tuttavia è solo negli ultimi anni che in Italia è stata

evidenziata un'alta incidenza del sierotipo G9P[8] (Arista et al 2002; Martella et al 2003).

I risultati qui presentati mostrano come il principale sierotipo riscontrato è il G1P[8] 37,2% seguito dal G2P[4] 25,5%, G3P[8]16%, G9P[6] 4,6%, G9P[6] 11,6 %, G4P[8] 2,3% e G8P[8] 2,3%.

Sebbene i sierotipi G1-G4 si confermano i più diffusi con una percentuale complessiva dell'81 %, ci sono delle significative differenze rispetto a quelle che sono le distribuzioni dei vari sierotipi riscontrati in precedenti studi condotti in Italia. La frequenza del sierotipo G1P[8] 37,3% risulta essere quasi invariata rispetto a quanto descritto nei precedenti studi (Martella et al 2001 Arista et al 2003) mentre risulta essere significativamente più bassa rispetto a quella riscontrata in Europa ed in altri paesi del mondo (Hoshino e Santos 2004). È interessante notare che il secondo sierotipo più diffuso è il G2P[4] con una percentuale del 25,5 %. Il nostro studio rileva la presenza di questo sierotipo in una percentuale significativamente alta, sia rispetto alla media Europea che a quella Mondiale (Hoshino e Santos 2004), confermando ciò che sembra emergere negli ultimi anni nel nostro paese. La prima comparsa di questo sierotipo, in Italia, è da far risalire al 1997 quando nella città di Palermo furono evidenziati due stipiti al genotipo P[4]. Nella stagione 2002-2004 è stata evidenziato un notevole aumento del numero di isolati con una percentuale del 15,7% dei campioni analizzati. Il Nostro studio conferma

un trend di aumento della frequenza del sierotipo G2P[4] circolante in Italia. Dall'analisi delle sequenze di 4 isolati, scelti casualmente, è emerso che il G2 mostra una omologia del 98,4% con il ceppo "30G2" isolato in Thailandia nel 2004 ed il ceppo K20 isolato in Giappone.

Anche la frequenza del sierotipo G3P[8] sembra essere in crescita, infatti, è stato evidenziato in una percentuale del 16% nettamente superiore a quella riscontrata in precedenti lavori (Arista S et al 2005, Arista S et al 2002) differenza del sierotipo G4P[8] riscontrato in una percentuale del 2,3%

Nel nostro paese la comparsa del sierotipo G9 è da far risalire agli anni 1990 - 94 (Arista et al 1997) con l'evidenziazione di pochi ceppi. Tuttavia nel periodo compreso tra il 1999 ed il 2000 sia in Sicilia che in Puglia è stato riscontrato un aumento considerevole della frequenza di circolazione di questo sierotipo G9 associato al P[8] (Martella V et al 2001; Arista et al 2002). Il nostri dati confermano la presenza del sierotipo G9P[8] sia pure con una percentuale di frequenza più bassa 11,2%. Interessante notare che il sierotipo G9P[6](4,6%) non era mai stato segnalato in Italia ciò è da tenere in considerazione perché il genotipo P[6] sembra essere associato a infezioni asintomatiche, quindi i bambini affetti da questo sierotipo potrebbero essere dei diffusori asintomatici. Inoltre nel nostro studio è emersa la presenza di una combinazione inusuale, vale a dire, il sierotipo G8P[8](2,3%) la cui origine sembra essere dovuta ad un

riassortimento tra un stivite umano ed uno bovino. All'attuale conoscenza questa è la quinta evidenziazione descritta nella letteratura mondiale.

Gli studi condotti negli ultimi anni sul ruolo delle proteine del capsido esterno dei rotavirus nell'induzione della protezione immunitaria hanno evidenziato che la VP7 (G-tipo) e la VP4 (P-tipo) hanno una importanza prevalente ai fini della protezione (Estes, 2001). Numerosi dati sperimentali e osservazioni epidemiologiche suggeriscono inoltre che la protezione immunitaria sia di natura sostanzialmente omotipica, ossia rivolta soprattutto verso il virus che ha sostenuto l'infezione (Hoshino e Kapikian, 2000). Sebbene il ruolo preciso delle proteine VP7 e VP4, o di altre proteine virali, ed i meccanismi della protezione immunitaria, non siano stati ancora perfettamente definiti, il concetto di protezione omotipica ha determinato nel 1998 l'adozione negli Stati Uniti di un vaccino per la prevenzione della diarrea da rotavirus nei bambini. Il vaccino quadrivalente riassortante, Rotashield, costruito sul virus di scimmia rhesus RRV MMU1088 (P5B[3],G3) e contenente i 4 G-tipi epidemiologicamente più importanti per la specie umana, è stato ritirato nel 1999 perché messo in relazione ad aumento del rischio di intussuscezione intestinale. Nel frattempo, circa 1 milione di bambini sono stati vaccinati ed il vaccino ha evidenziato un'efficacia superiore all'80% nel prevenire la forma enterica acuta da rotavirus.

Attualmente 7 vaccini vivi orali sono candidati per uso umano ed ognuna delle case produttrici ha dovuto rivalutare se il relativo vaccino può causare intussuscezione intestinale. (Glass R et al 2005) In particolare sono i fase finale di valutazione due vaccini uno prodotto dalla Glaxo Smith Kline ed uno dalla Merk. Il vaccino della GSK è stato sviluppato per essere usato in America Latina mentre quello della Merk è stato sviluppato per essere commercializzato negli Stati Uniti. Il GSK è un vaccino che deriva da un singolo ceppo di rotavirus umano (89-12;P1A[8],G1) che è stato attenuato con passaggi seriali su colture cellulari. Il principio sul quale si basa il vaccino prodotto dalla GSK è quello secondo il quale dopo una naturale infezione con rotavirus esiste una protezione che impedisce l'instaurarsi di un'infezione grave o di una reinfezione, fenomeno da attribuire alla cross - protezione che esiste tra diversi ceppi di rotavirus ampiamente documentata. Il vaccino merk, Rota Tek, è un vaccino rieassortante costruito su un ceppo parentale bovino (WC3) che contiene i più comuni tipi antigenici dei rotavirus circolanti nella specie umana (G1-G4 a P1A). La sicurezza e l'efficacia di questi due vaccini è stata valutata recentemente in due studi condotti, per ogni vaccino, su una popolazione di oltre 60 mila bambini (Vesikari T, et al 2006; Ruiz-Palacios GM, et al 2006) risultando essere efficaci nel prevenire la forma gastroenterica dell'infezione da rotavirus mostrando inoltre un rischio di intuscepto simile a quello riscontrato nei placebo. Il

nostro studio quindi ha messo in evidenza che la circolazione che i sierotipi G1 –G4 P-[8] sono quelli più frequenti rappresentando oltre 80% dei ceppi circolanti. Una profilassi immunizzante con i vaccini attualmente in uso, garantirebbe una buona protezione immunitaria nella popolazione sensibile, tuttavia è non è da sottovalutare la comparsa di nuovi stipiti come ad esempio il sierotipo G9 che, nel giro di pochi anni, è divenuto, uno dei genotipi di rotavirus più comuni nella popolazione mondiale, diventando in alcuni paesi, addirittura il sierotipo prevalente, ciò non esclude che potrebbe esserlo anche nel nostro paese. Di conseguenza, la sorveglianza delle reti Nazionali e Regionali assume un ruolo cruciale al fine di documentare la distribuzione dei ceppi di rotavirus ed impedire la comparsa di nuovi ceppi o di nuove varianti che potrebbero eludere la protezione immunitaria indotta da un vaccino antiquato.

Bibliografia

1. Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C, Martella V, Cascio A, Iturriza-Gomara M. G2 rotavirus infections in an infantile population of the South of Italy: variability of viral strains over time. *J Med Virol.* 2005 Dec;77(4):587-94
2. Arista S, Vizzi E, Migliore MC, Di Rosa E, Cascio A. High incidence of G9P[8] rotavirus infections in Italian children during the winter season 1999-2000. *Eur J Epidemiol.* 2003;18(7):711-4
3. Beards GM, King JA, Mazhar S, Landon J and Desselberger U. Homotypic and heterotypic immune responses to group A rotaviruses in parenterally immunized sheep. *Vaccine.* 1993, 11(2): 262-266.
4. Bellamy AR and Bath GW. Molecular biology of rotaviruses. *Adv. Virus Res.* 1990, 38: 1-38.
5. Chang KO, Parwani A V and Saif LJ. The characterization of VP7

- (G-type) and VP4 (p-type) genes of bovine group A rotaviruses from field samples using RTPCR and RFLP analysis. Arch. Virol. 1996,141: 1727-1739
6. Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, et al. Rotavirus isolates WI61 representing a presumptive new human serotype. J Clin Microbiol 1987; 25: 1757–1762.
 7. Clark HF, Lawley DA, Schaffer A, et al. Assessment of the epidemic potential of a new strain of rotavirus associated with the novel G9 serotype which caused an outbreak in the United States for the first time in the 1995–1996 season. J Clin Microbiol 2004; 42: 1434–1438.
 8. Estes MK and Cohen J. Rotavirus gene structure and function. Microbiol. Rev. 1989,53: 410-449.
 9. Farina, Scatozza. Trattato di Malattie infettive degli animali domestici, UTET. 1998, 812-817
 10. Feng N, Vo PT, Cheng D, Vo TVP, Hoshino Y and Greenberg HB.

Heterotypic protection following oral immunization with live heterologous rotavirus in a mouse model. *J. Infect. Dis.* 1997, 175: 330-341.

11. Glass RI, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Parashar UD, Steele AD. Rotavirus vaccines: targeting the developing world. *J Infect Dis.* 2005 Sep 1;192 Suppl1:S160-6.

12. Glass RI, Gentsch JR and Ivanoff B. New lessons for rotavirus vaccines. *Science.* 1996,272: 46-48.

13. Gorrell RJ and Palombo EA. Use of non-radioactive probes for VP4 typing of human rotaviruses. *J. Virol. Meth.* 1996,61: 59-64.

14. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B and Zhao-Yin Fang. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acids from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1990.

15. Green KY, Taniguchi K, Mackow ER and Kapikian AZ. Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccines: implications for vaccine

- development. *J. Infect. Dis.* 1990, 161 (4): 667-679.
16. Iovane G, Martella V, Pratelli A, Buonavoglia D, Tempesta M. Caratterizzazione mediante PCR di stipiti di rotavirus isolati da vitelli con enterite. *Large Animals Review*, 1998, 25-27.
17. Iovane G, Sagazio P, Martella V, Abdulkadir A. F, Buonavoglia C, Tempesta M. confronto del genoma di stipiti di rotavirus isolati da bufali e bovini mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide. *Large Animals Review*, 1998, 37-39.
18. Isegawa Y, Nagakomi O, Nagakomi T, Ishida S, Uesugi S and Ueda S. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes.* 1993, 7(4): 277-284.
19. Ishizaki H, Sakai t, Shirahata T, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S and Gota H. The distribution of G-Type and P-type within isolates of bovine rotavirus in Japan. *Vet. Microbiol.* 1996, 48(3-4): 367-372.

20. Khamrin P, Peerakome S, Wongsawasdi L, Tonusin S, Sornchai P, Maneerat V, et al. Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children admitted to hospital with diarrheain Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol.* 2006;78:273–80.
21. Kirkwood C, Bogdanovic-Sakran N, Clark R, Masendycz P, Bishop R, Barnes G. Report of the Australian Rotavirus Surveillance Program, 2001/ 2002. *Commun Dis Intell* 2002; 26: 537–540.
22. Kirkwood CD, Coulson BS and Bishop RF. G3P2 rotaviruses causing diarrhoeal disease in neonates differ in VP4, VP7, and NSP4 sequence from G3P2 strains causing asymptomatic neonatal infection. *Arch. Viral.* 1996, 141: 1661-1676.
23. Liprandi, F., Gerder, M., Bastidas, Z., Lopez, J.A., Pujol, F.H., Ludert, J.E., Joelsson, D.B., Ciarlet, M., 2003. A novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain. *Virology* 315 (2), 373–380.
24. Lu W, Duhomei GE, Benfield DA and Grotelueschen DM. Serological and genotypic characterization of group A rotavirus reassortants from diarrheic calves born to dams vaccinated against rotavirus. *Vet. Microbiol.* 1994, 42: 159-170.

25.Martella V, Ciarlet M, Banyai K, Lorusso E, Arista S, Lavazza A, Pezzotti G, Decaro N, Cavalli A, Lucente MS, Corrente M, Elia G, Camero M, Tempesta M, Buonavoglia C. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in Italian swine herds. *J Clin Microbiol.* 2006 Nov 22; [Epub ahead of print]

26.Martella V, Ciarlet M, Banyai K, Lorusso E, Cavalli A, Corrente M, Elia G, Arista S, Camero M, Desario C, Decaro N, Lavazza A, Buonavoglia C. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology.* 2006 Mar 15;346(2):301-11.

27.Martella V, Pratelli A, Greco G, Tempesta M, Ferrari M, Losio MN and Buonavoglia C. Genomic characterization of porcine

rotaviruses in Italy. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2001, 129-132.

28. Martella V., Terio V., Del Gaudio G., Gentile M., Fiorente P., Barbuti S., Buonavoglia C. Detection of the emerging rotavirus G9 serotype at high frequency in Italy. *J Clin Microbiol*, 2003, 30, 3960-3963

29. Pani PS and Lyoo VS. Immunogens of rotaviruses. *Vet. Microbiol*. 1993,37: 299-317.

30. Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med*. 2006;354:11–22.

31. S. Arista, E. Vizzi, D. Ferraro, A. Cascio, and R. Di Stefano
Distribution of VP7 serotypes and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from Italian children with diarrhea. *Arch Virol* (1997) 142: 2065-2071.

- 32.Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 2005 Jan-Feb;15(1):29-56.
- 33.Santos N, Volotao EM, Soares CC, Campos GS, Sardi SI, Hoshino Y. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4064–9
- 34.Snodgrass DR, Fitzgerald T, Campbell I, Scott FMM, Browning GF, Miller DL, Herring AJ and Greenberg HB. Rotavirus serotypes 6 and 10 predominant in cattle. *J.Cli. Microbiol.* 1990, 28: 504-507
- 35.Snodgrass DR, Fitzgerald TA, Campbell I, Browning GF, Scott FMM, Hoshino Y and Davies RC. Homotypic and heterotypic serological responses to rotavirus neutralization epitope in immunological naive and experienced animal. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29: 2668-2672.
- 36.Suzuki Y, Sanekata T, Sato M, Tajima K, Matsuda Y and

Nagakomi O. Relative Frequencies of G (VP7) and P (VP4) serotypes determined by polymerase chain reaction assays among Japanese bovine rotaviruses isolated in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31: 3046-3049

37. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med.* 2006;354:23–33.

38. Zhou Y, Supawadee J, Khamwan C, Tonusin S, Peera-akome S, Kim B, et al. Characterization of human rotavirus serotype G9 isolated in Japan and Thailand from 1995 to 1997. *J Med Virol.* 2001;65:619–28.