

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
Dottorato di ricerca in Microbiologia e Virologia
Ciclo XX

Diversità genetica e antigenica dei rotavirus umani –
studio dei meccanismi evolutivi e implicazioni ai fini
diagnostici e vaccinali

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Carlo Chezzi

Tutore:
Chiar.ma Prof.ssa Maria Cristina Medici

Dottoranda:
Dott.ssa Laura Anna Abelli

2009

“Guardare l'alba!

La piccola luce fa svanire le immense diafane ombre,

l'aria ha un buon sapore al mio palato.”

- Walt Whitman, “Il canto di me stesso” -

A Cristian,

mamma e papà.

INDICE

CENNI STORICI	1
CLASSIFICAZIONE	3
MORFOLOGIA E STRUTTURA DEL VIRUS	5
STRUTTURA DEL GENOMA	8
ESPRESSIONE DEL GENOMA E PROTEINE VIRALI	11
Proteine strutturali	12
<i>VP1, VP2 e VP3</i>	12
<i>VP4</i>	12
<i>VP6</i>	13
<i>VP7</i>	14
Proteine non strutturali	15
<i>NSP1</i>	15
<i>NSP2</i>	15
<i>NSP3</i>	15
<i>NSP4</i>	16
<i>NSP5</i>	16
<i>NSP6</i>	16
CICLO REPLICATIVO DI ROTAVIRUS.....	18
Adsorbimento, penetrazione e scapsidamento	18
Trascrizione e replicazione	19
Incapsidamento dell'RNA e assemblaggio del virione.....	19
Liberazione del virus	20
MECCANISMI DI EVOLUZIONE GENETICA DI ROTAVIRUS.....	21
Mutazioni puntiformi	21
Infezioni miste	21

Riassortimento genomico.....	21
Trasmissione interspecie.....	22
Riassortimento tra ceppi di rotavirus umani e animali.....	23
Riarrangiamento genomico	24
EPIDEMIOLOGIA	26
Peso economico della gastroenterite da rotavirus.....	29
TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE.....	30
PATOGENESI E CARATTERISTICHE CLINICHE	32
Malassorbimento.....	34
Secrezione.....	34
IMMUNITÀ.....	38
DINAMICA DELL'ESCREZIONE VIRALE E RISPOSTA ANTICORPALE	41
I VACCINI	42
DIAGNOSI DI LABORATORIO	46
SCOPO DELLA RICERCA	48
MATERIALI E METODI.....	50
Campioni, pazienti e articolazione dello studio	50
<i>Periodo 1987-1990.....</i>	<i>50</i>
<i>Periodo 2004-2005.....</i>	<i>51</i>
<i>Periodo gennaio-marzo 2008.....</i>	<i>51</i>
Microscopia elettronica (ME).....	52
Elettroforesi in gel di poliacrilamide (PAGE) degli RNA genomici.....	52
Determinazione del genotipo (G tipo e P tipo) di rotavirus di gruppo A.....	54
Estrazione dell'RNA da liquor, plasma e siero.....	58
Estrazione dell'RNA da sangue <i>post-mortem</i>	58
Estrazione dell'RNA da campioni autoptici.....	58
Determinazione del sottogruppo (SG) del gene VP6 di rotavirus di gruppo A	58

Determinazione del genogruppo del gene NSP4 di rotavirus di gruppo A	59
Clonaggio.....	60
Identificazione di rotavirus di gruppo C (GCRV).....	60
<i>Analisi delle sequenze dei geni VP4, VP6 e VP7 di GCRV.....</i>	<i>60</i>
<i>Ricerca di GCRV.....</i>	<i>62</i>
Rivelazione dei prodotti di amplificazione.....	64
Sequenziamento ed analisi filogenetica	64
STUDIO EPIDEMIOLOGICO MOLECOLARE	65
Risultati	65
<i>Periodo 1987-1990.....</i>	<i>65</i>
<i>Periodo 2004-2005.....</i>	<i>70</i>
<i>Periodo gennaio-marzo 2008.....</i>	<i>80</i>
Discussione	84
CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI DUE CEPPI DI ROTAVIRUS DI GRUPPO C RIVELATI NEL PERIODO 2004-2005	89
Risultati	89
Discussione	93
CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN CEPPO DI ROTAVIRUS DI GRUPPO A E GENOTIPO G8P[14].....	95
Risultati	95
Discussione	100
CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI DUE CEPPI DI ROTAVIRUS DI GRUPPO A COINVOLTI IN DUE CASI FATALI DI ENTERITE NELL'ANNO 2005.	102
Risultati	102
Discussione	107
CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN CEPPO DI ROTAVIRUS DI GRUPPO A RIVELATO IN UNA BAMBINA CON GASTROENTERITE DA ROTAVIRUS ASSOCIATA A MENINGISMO	109
Risultati	109

Discussione	118
CONCLUSIONI	121
BIBLIOGRAFIA.....	122
ELENCO DEI LAVORI PUBBLICATI SU RIVISTE INTERNAZIONALI SULLA BASE DEI RISULTATI DI QUESTA RICERCA	135

CENNI STORICI

La diarrea è la seconda maggiore causa di morbilità e mortalità in tutto il mondo nei bambini al di sotto di 5 anni [Rudan et al., 2007]. Nonostante la dimensione del problema, la ricerca di agenti eziologici di diarrea infantile ha dato risultati poco gratificanti fino agli anni 1970 [Kapikian et al., 2001]. Negli anni 1940 e 1950, infatti, era stato assunto per esclusione che i virus fossero responsabili della maggior parte delle malattie diarroiche di origine sconosciuta. Dal momento che questi presunti agenti eziologici non potevano essere coltivati e propagati *in vitro*, a partire dagli anni 1940 sia negli Stati Uniti sia in Giappone sono stati condotti studi su volontari [Gordon et al., 1947; Gordon et al., 1949; Gordon et al., 1956; Fukumi et al., 1957; Jordan et al., 1953; Kojima et al., 1948; Reinmann et al., 1945; Yamamoto et al., 1948] che permisero di dimostrare che estratti fecali derivati da episodi epidemici di gastroenterite privati della componente batterica e assunti per via orale da individui sani erano in grado di riprodurre la malattia, a supporto dell'ipotesi della natura virale dell'agente eziologico. Molti di questi estratti fecali furono sottoposti senza successo ad accurate indagini di laboratorio nel tentativo di individuare l'agente eziologico. Negli anni 1970 fu intrapresa una seconda generazione di studi su volontari [Clarke et al., 1972; Dolin et al., 1971; Dolin et al., 1972; Morens et al., 1979; Wyatt et al., 1974] e, in particolare nel 1972 Kapikian e coll. nel corso delle indagini condotte per lo studio di un episodio epidemico di gastroenterite verificatosi nel 1968 in una scuola elementare di Norwalk, Ohio (USA), utilizzando la microscopia elettronica dimostrarono che il siero di pazienti convalescenti era in grado di produrre aggregati di particelle morfologicamente poco definite di 27 nm di diametro [Kapikian et al., 1972].

Un altro contributo determinante nello studio dell'eziologia virale delle enteriti è rappresentato dalle indagini condotte in Australia da Bishop e dai suoi collaboratori [1973] che osservarono mediante microscopia elettronica la presenza di particelle simili a quelle di *Orbivirus* o *Reovirus* in cellule epiteliali di una biopsia duodenale di un bambino affetto da diarrea acuta non-batterica. Nello stesso anno in Inghilterra, Australia, Canada e Stati Uniti, particelle morfologicamente indistinguibili dai reovirus di vitello sono state ritrovate nelle feci di bambini affetti da gastroenterite [Flewett et al., 1973; Bishop et al., 1974; Kapikian et al., 1974; Middleton et al., 1974]. Dei due nomi, "duovirus", proposto da Davidson nel 1975 [Davidson et al., 1975] con riferimento al doppio strato capsidico del virione, e "rotavirus", proposto dallo stesso Flewett nel 1974 [Flewett et al., 1974] con riferimento invece alla disposizione a ruota ("rota" in latino) dei capsomeri all'interno del capsido virale, fu quest'ultimo che divenne popolare e fu assunto universalmente per indicare questi nuovi virus (Figura 1). Inoltre Flewett nel 1974 dimostrò che i rotavirus umani e di vitello avevano antigeni comuni non correlabili sierologicamente a quelli dei reovirus. Per questo motivo suggerì che i rotavirus fossero inclusi in un nuovo genere nell'ambito della famiglia *Reoviridae* [Flewett et al., 1974].

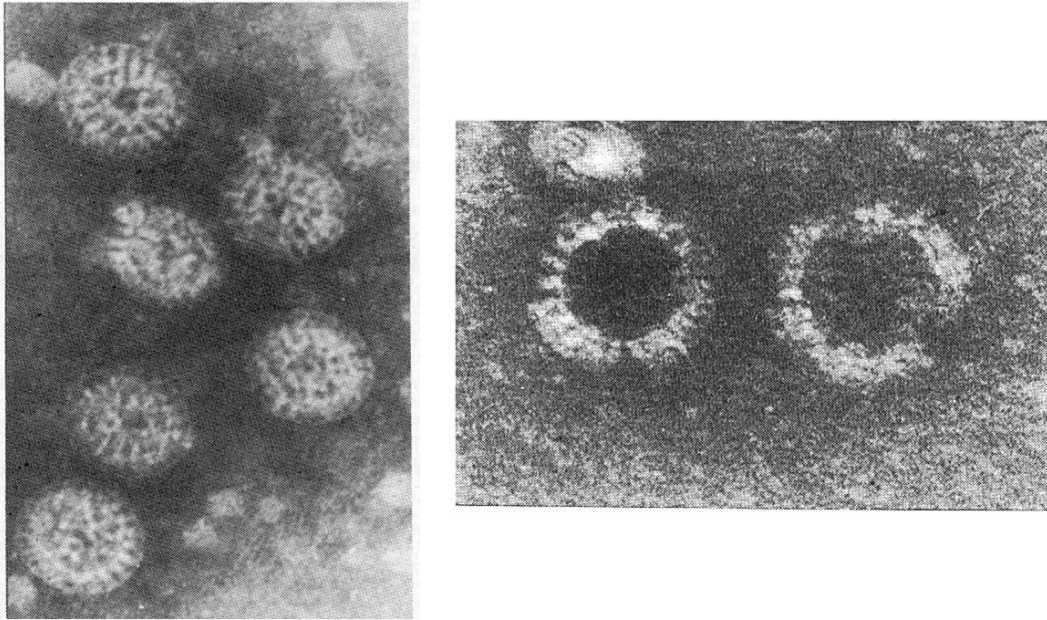


Figura 1. Osservazione elettromicroscopica dopo colorazione negativa di particelle reovirus-simili (A), e particelle che mostrano il doppio strato capsidico parzialmente invase dal colorante negativo (B). Ingrandimento 296.000X ridotto di un terzo (A) e 296.000X (B) [da Flewett et al., 1974, modificata].

Negli anni successivi gli studi condotti sull'infezione causata da questo agente virale hanno portato a riconoscere rotavirus come la causa più frequente di gastroenterite grave nei neonati e bambini al di sotto di 5 anni. Attualmente è noto che entro questa fascia d'età praticamente tutti i soggetti vanno incontro a episodi d'infezione con questo agente patogeno, che per qualche giorno può provocare diarrea, vomito e/o febbre e nei quadri più severi può determinare il ricovero specialmente a causa della conseguente disidratazione [Parashar et al., 2006; Gray et al., 2008]. In particolare nei paesi in via di sviluppo dove la mortalità è elevata, si stima che rotavirus sia responsabile del 15-21% dei decessi nei bambini al di sotto di 5 anni. [Kosek et al., 2003; Murray et al., 2001].

La natura segmentata del genoma di rotavirus è alla base del fenomeno del riassortimento genetico tra ceppi diversi in caso di coinfezione, un meccanismo che genera una estrema diversificazione e guida l'evoluzione di tali virus. I segmenti sono separabili mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide (PAGE) e il profilo di migrazione è caratteristico nei diversi gruppi (4-2-3-2 per i rotavirus di gruppo A, 4-2-2-3 per quelli di gruppo B, 4-3-2-2 per quelli di gruppo C) e, nell'ambito del gruppo A, permette la distinzione in elettroferotipi (e-tipi) lunghi e corti [Kapikian et al., 2001].

CLASSIFICAZIONE

I rotavirus sono classificati nel genere omonimo *Rotavirus* appartenente alla famiglia *Reoviridae* unitamente ai generi *Orthoreovirus*, *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Fijivirus*, *Oryzavirus*, *Orbivirus*, *Coltivirus*, *Phyteoreovirus*, *Seadornavirus*, *Idnoreovirus*, *Mycoreovirus* [Mertens et al., 2005; International Committee on Taxonomy of Viruses, 2005], ai quali appartengono agenti virali che infettano mammiferi, uccelli, rettili, pesci, molluschi, insetti, artropodi e piante.

I rotavirus sono stati suddivisi mediante antisieri e anticorpi monoclonali in gruppi (A-H) e sottogruppi (SG) I e II, non-I non II, I+II, sulla base della reattività degli antigeni di gruppo e di sottogruppo, rispettivamente, espressi sulla proteina del capsido interno VP6 e in sierotipi P (sensibile alle proteasi) e G (glicosilata) sulla base delle proteine del capsido esterno VP4 e VP7, rispettivamente, in grado di indurre risposta anticorpale [Kapikian et al., 2001].

I rotavirus dei gruppi A, B, C ed H sono noti infettare sia gli animali che l'uomo, mentre quelli dei gruppi D-G sono stati rivelati solo negli animali [Estes, 2001; Yang et al., 2004; Alam et al., 2007]. I rotavirus di gruppo A, come già anticipato, sono ritenuti essere i maggiori responsabili di enterite in tutto il mondo e in tutte le classi di età specialmente nei bambini; il gruppo B è frequente negli adulti e specialmente in Cina [Estes, 2001]; il gruppo C, molto frequente nei suini, è associato nell'uomo a focolai epidemici di enterite in adulti e bambini sia nei paesi industrializzati (Australia, Stati Uniti, Regno Unito, Giappone, Finlandia, Spagna, Ungheria e Italia) sia in quelli in via di sviluppo (India, Cina, Malesia e Argentina) [Rahman et al., 2005a].

La classificazione più recente dei rotavirus, rivista su base molecolare, prevede la distinzione in 8 gruppi (A-H) e SG I e II (comprendente anche i SG I+II e non-I, non-II) in relazione alla sequenza del gene VP6 [Iturriza-Gómara et al., 2002a] e in genotipi di specificità P e G in relazione alla sequenza dei geni VP4 e VP7, rispettivamente. Fino ad oggi si riconoscono 27 P-tipi e 19 G-tipi [Matthijnsens et al., 2008a; Matthijnsens et al., 2008b]. Inoltre nei rotavirus umani e animali è possibile distinguere almeno 6 genogruppi (A-F) del gene NSP4 [Horie et al., 1997; Matthijnsens et al., 2008a].

La distinzione in sierotipi G (su base anticorpale) coincide con quella in genotipi G (su base genetica), mentre per indicare il sierotipo e il genotipo P è stato adottato un sistema di classificazione binario [Estes and Kapikian, 2007]. Il sierotipo P (quando noto) è indicato da un numero arabo (seguito a volte da una lettera maiuscola) e il genotipo P è indicato di seguito da un numero arabo compreso in parentesi quadra. Sono stati finora rivelati nell'uomo ceppi di rotavirus appartenenti a 11 G tipi (G1-G6, G8-G12) e a 12 P tipi (P1A[8], P1B[4], P2A[6], P2C[6], P3[9], P4[10], P5A[3], P6[1], P8[11], P11[14], P12[19] e P[25]) [Matthijnsens et al., 2008a].

In relazione all'omologia complessiva dell'RNA genomico, i rotavirus umani di gruppo A sono distinguibili in almeno 3 genogruppi, AU-1 (molto raro), DS-1 e Wa [Nakagomi et al., 1989; Estes, 2001; Gentsch et al., 2005]. Nella maggior parte dei casi i

rotavirus di gruppo A appartengono al genogruppo Wa e sono G1, G3, G4, o G9 P[8], e-tipo lungo, SGII e NSP4 di genogruppo B, mentre quelli di genogruppo DS-1 comprendono quasi esclusivamente virus G2P[4], con e-tipo corto SG1 e NSP4 di genogruppo A. I virus AU-1, infine, sono G3P[9], e-tipo lungo, SGI e NSP4 di genogruppo C [Estes, 2001].

Dal momento che la classificazione dei rotavirus appare spesso complicata, lo scorso anno 2008 è stato proposto un sistema di classificazione sulla base delle sequenze di tutti gli 11 segmenti genomici virali [Matthijnssens et al., 2008b]. Secondo tale sistema sono definibili diversi genotipi per ciascun segmento genomico seguendo appropriati valori di “cut-off” percentuale di identità nucleotidica, e quindi è assegnato a ciascun ceppo virale un genotipo complessivo dato dalla codifica Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, dove “x” rappresenta il numero, dei geni VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, rispettivamente (Tabella 1). Non è stato possibile ottenere una classificazione per il gene NSP6 dal momento che l’ORF NSP6 ricade nell’ORF NSP5. Per la classificazione dei rotavirus è stato costituito un gruppo di lavoro (“Rotavirus Classification Working Group”) [Matthijnssens et al., 2008a] che include specialisti di virologia molecolare, malattie infettive, epidemiologia e salute pubblica al fine di fornire supporto per l’identificazione appropriata di eventuali nuovi genotipi e per minimizzare gli errori.

Tabella 1. Sistema di classificazione degli 11 segmenti genici di rotavirus proposto da Matthijnssens e coll. [2008a] e relativi valori di “cut-off” percentuale di identità nucleotidica che ne definiscono i genotipi.

Gene	Valori “cut-off” di identità nucleotidica (%)	N° e nome dei genotipi	Derivazione del nome dei genotipi
VP7	80	19 G	<u>G</u> licosilata
VP4	80	27 P	Sensibile alle <u>P</u> roteasi
VP6	85	11 I	Capside <u>I</u> nterno
VP1	83	4 R	RNA polimerasi <u>R</u> NA-dipendente
VP2	84	5 C	Proteina <u>C</u> ore
VP3	81	6 M	<u>M</u> etiltransferei
NSP1	79	14 A	<u>A</u> ntagonista dell’interferon
NSP2	85	5 N	<u>N</u> TPasi
NSP3	85	7 T	Avviatore della <u>T</u> raduzione
NSP4	85	11 E	<u>E</u> nterotossina
NSP5	91	6 H	“ <u>P</u> Hosphoprotein”

MORFOLOGIA E STRUTTURA DEL VIRUS

Le particelle di rotavirus mature misurano circa 70 nm di diametro e sono costituite da tre rivestimenti proteici (particelle trilaminari), rappresentati da un capsidico esterno, un capsidico interno e un core, che circondano il genoma costituito da 11 segmenti di RNA a doppio filamento [Kapikian et al., 2001]. Queste particelle integre si differenziano da quelle dei reovirus per la presenza di un margine esterno circolare ben definito.

Alla microscopia elettronica, dopo colorazione negativa, i virioni hanno un aspetto ben distinguibile e presentano un centro elettrondenso di 38 nm di diametro con profilo esagonale circondato da uno strato esterno elettronucente [Esparza et al., 1978; Palmer, 1997]. L'aspetto delle particelle intatte complete (trilaminari) ricorda una ruota con una parte centrale, corti raggi e un contorno ben definito: da qui il nome di rotavirus (Figura 2) [Flewett et al., 1974].

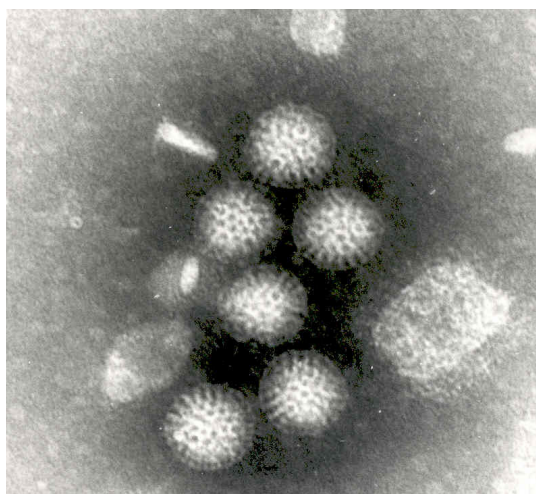


Figura 2. Particelle rotavirus-simili. Osservazione elettromicroscopica a 300.000X di ingrandimento.

Le particelle invece prive dello strato capsidico esterno (particelle bilaminari) appaiono rugose dal momento che il loro perimetro mostra le subunità trimeriche del capsidico interno che si proiettano verso l'esterno [Estes, 2001] (Figura 3). Le particelle bilaminari sono morfologicamente simili agli orbivirus e più piccole di quelle intatte approssimativamente di 10 nm. Lo strato capsidico esterno è necessario per l'infettività. Si stacca dallo strato capsidico interno quando la concentrazione di calcio nel mezzo circostante diventa inferiore a 1 mM.

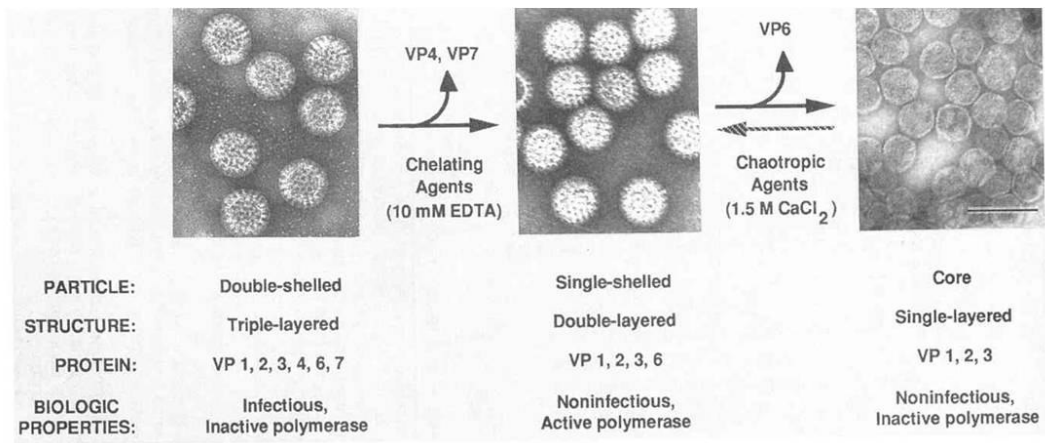


Figura 3. Proprietà strutturali e biologiche delle particelle di rotavirus. Le micrografie elettroniche mostrano le tipiche strutture delle particelle trilaminari, bilaminari e core osservate dopo colorazione con ammonio molibdato 1%. Le particelle a doppio strato e le particelle core possono essere ottenute per degradazione sequenziale di particelle infettanti a triplice strato. Bar= 100 nM [da Estes, 2001, modificato].

In vitro la perdita dello strato capsidico esterno avviene in seguito all'esposizione delle particelle virali ad agenti chelanti come l'acido etilendiamminotetracetico (EDTA), e si traduce nella perdita di infettività [Cohen et al., 1989].

Le particelle core (monolaminari) sono osservabili raramente e in genere sono prive di RNA genomico e aggregate [Estes, 2001]. Particelle di rotavirus a doppio involucro e particelle a singolo involucro presenti nelle feci sono facilmente separabili mediante centrifugazione in gradiente di densità [Newman et al., 1975; Rodger et al., 1975]. Le feci generalmente contengono entrambi i tipi di particelle.

Lo studio della struttura tridimensionale dei virioni ha definito che il capsidico è costituito da subunità capsomeriche disposte secondo una struttura icosaedrica in numero di 132 (120 esameri e 12 pentameri), distribuiti secondo Roseto e collaboratori [1979] in simmetria obliqua con numero di triangolazione $T=13$ (Figura 4). In particolare, i pentameri appaiono localizzati ai vertici dell'icosaedro e un minimo di tre esameri si trovano tra due vertici contigui, non disposti lungo lo spigolo che li unisce. Il numero dei capsomeri del capsidico esterno coincide con quello del capsidico interno.

Roseto e collaboratori [1979] hanno dimostrato che il capsidico esterno contiene 132 fori corrispondenti ad altrettanti fori presenti nel capsidico interno. Per questo motivo il rivestimento proteico nel suo complesso risulta attraversato da una serie di 132 canali che, partendo dal capsidico esterno, si estendono fino al nucleocapsidico: 120 canali lungo il centro dei capsomeri riuniti in esameri e 12 canali lungo il centro dei capsomeri riuniti in pentameri [Estes and Cohen, 1989].

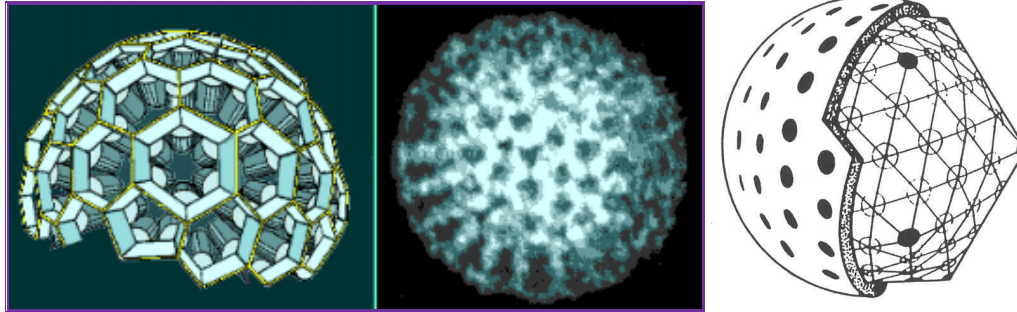


Figura 4. Modello di particella di rotavirus costituita da 132 capsomeri (120 esameri e 12 pentameri) distribuiti secondo una struttura icosaedrica con numero di triangolazione $T=13/1$ (levo) a confronto con l'osservazione elettromicroscopica di una particella virale. Rappresentazione schematica del capsido di rotavirus.

La funzione di queste strutture canaliformi (Figura 5) sembra sia collegata con l'entrata dei fattori cellulari che sono necessari per la primitiva trascrizione dell'RNA virale e con il successivo trasporto di quest'ultimo nel citoplasma [Venkataram Prasad et al., 1988].

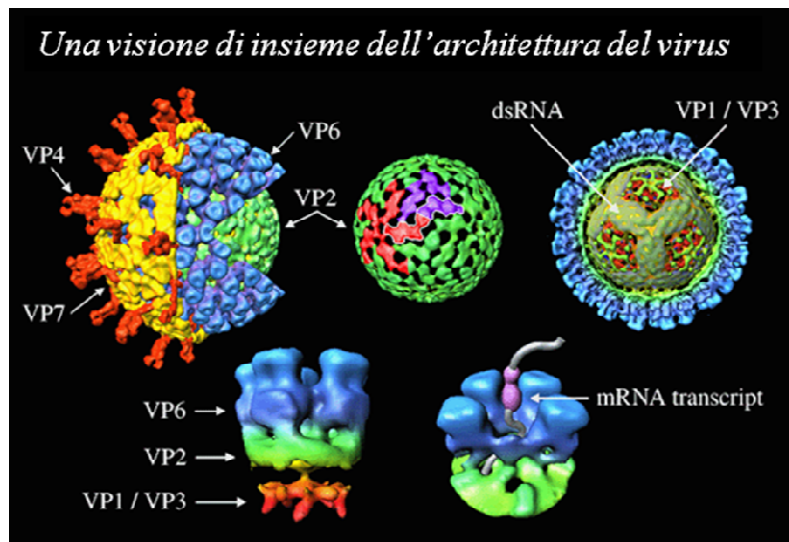


Figura 5. A sinistra è illustrata la struttura 3D di una particella completa di rotavirus schematizzata che mostra gli strati esterni, interni e intermedi del capsido. In figura sono indicate le proteine nei diversi strati e canali. La struttura di una singola sporgenza è di natura dimerica ed è la più pronunciata nella parte esterna, l'aspetto globulare della porzione interna consente alla sporgenza VP4 di prendere molteplici contatti con i trimeri della VP6 che circondano i canali di tipo II. Al centro e a destra è riportata l'immagine della struttura 3D della particella a singolo strato nella sua parte esterna dove si vedono i limiti della VP2 che rendono la struttura icosaedrica asimmetrica.

A destra uno spaccato di una struttura 19 Amstrong di una particella doppio strato, nel quale gli strati di VP2 e VP6 sono stati parzialmente rimossi, mostra una massa densa dovuta all'RNA a doppio filamento genomico e ai complessi enzimatici composti da VP1 e VP3. La parte inferiore della figura illustra un aspetto del complesso enzimatico in corrispondenza dei cinque assi di simmetria al di sotto degli strati VP2 e VP6. In particolare l'immagine in basso a destra mostra una strategia proposta per la molecola di mRNA neo-sintetizzata che fuoriesce attraverso un canale di primo tipo. Queste strutture sono state ottenute elaborando micrografie elettroniche di particelle incluse in ghiaccio vitreo [da Estes, 2001, modificato].

STRUTTURA DEL GENOMA

Il genoma virale di rotavirus è costituito da undici segmenti di RNA a doppio filamento ed è contenuto all'interno del core. Tutti gli 11 segmenti genici sono monocistronici eccezion fatta per il segmento 11 che codifica per due proteine. I doppi filamenti di RNA deprotonizzati non sono infettivi, dal momento che le particelle del virus contengono al loro interno una RNA polimerasi RNA dipendente per trascrivere i singoli segmenti di RNA in mRNA attivo. L'impacchettamento di questi segmenti di RNA nel capsido di rotavirus richiede interazioni intime RNA-proteina. Le proteine direttamente coinvolte nell'impacchettamento dei segmenti rimangono tutt'ora sconosciute; possibili candidate sono le proteine strutturali presenti nel core (VP1, VP2, VP3), ma si ipotizza che possano giocare un ruolo in tale meccanismo anche le proteine non strutturali. Il genoma è disposto ordinatamente all'interno della particella e il 25% circa forma una struttura dodecaedrica con la proteina VP2 che interagisce con l'RNA [Estes, 2001].

Attualmente sono conosciute le sequenze nucleotidiche complete degli undici segmenti di almeno 53 diversi ceppi di rotavirus [Matthijnsens et al., 2008a] (Figura 6). Il ceppo di scimmia SA11 è considerato il prototipo dei rotavirus di gruppo A ed è stato il primo ad essere sequenziato.

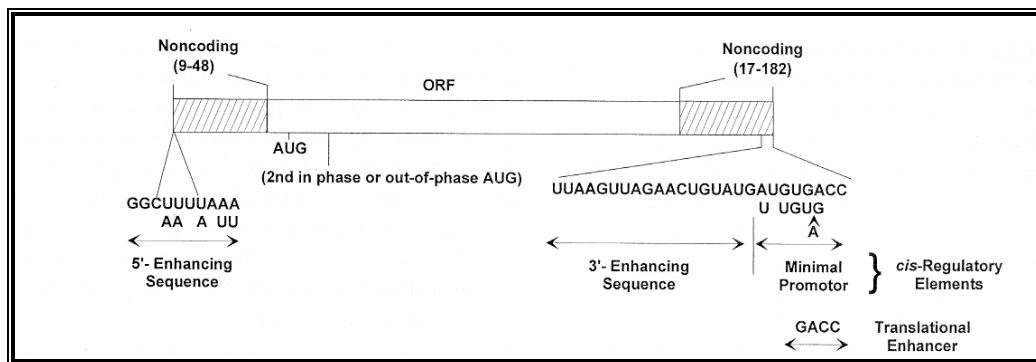


Figura 6. Caratteristiche principali della struttura del gene di rotavirus. Lo schema mostra la struttura dei geni di rotavirus nel loro complesso ricavata dalle sequenze pubblicate dei geni 1-11. Tutte le undici sequenze di rotavirus sono prive del segnale di poliadenilazione, sono ricche in A+U e possiedono delle sequenze consenso conservate alle loro estremità 5'-3' [da Estes, 2001, modificata].

I segmenti genomici di SA11 contengono da 667 (segmento 11) a 3.302 (segmento 1) paia basi. Il genoma nel complesso contiene intorno a 18.522 paia basi [Holmes et al., 1983].

Ogni segmento di RNA a polarità positiva parte da una 5'-guanina seguita da un gruppo di sequenze conservate (9-49 nucleotidi) che fanno parte di una sequenza 5'-non

codificante (UTR, untranslated region). A questo segue una “open reading frame” (ORF) che codifica per una proteina (nel caso del segmento 11 le ORF sono 2) e che termina con un codone di stop e quindi un altro gruppo di sequenze 3'UTR (17-182 nucleotidi), che a loro volta contengono un “subset” di sequenze conservate e che terminano con due citidine all'estremità 3'. Quasi tutti gli mRNA terminano con una sequenza consenso 5'-UGUGACC-3' e queste sequenze contengono importanti segnali per l'espressione genica e la replicazione virale.

La lunghezza delle sequenze non codificanti 3'-5' varia per i diversi geni e non è stato trovato alcun segnale di poliadenilazione all'estremità 3' dei geni. Tutte queste sequenze geniche possiedono almeno una lunga ORF dopo il codone di inizio, che è di solito un codone di inizio forte basato sulle norme di Kozak [Kozak, 1986]. Gli ultimi 4 nucleotidi degli mRNA possono fungere da “enancher”.

Le sequenze geniche di rotavirus sono ricche in A+U (tra il 58% e il 67%) [Estes, 2001]. I segmenti a doppio filamento di RNA sono appaiati da una estremità all'altra, e il filamento positivo contiene una sequenza 5' cap m7GpppG^(m)GPy ma all'estremità 3' non sono presenti sequenze poliadenilate. Le stesse caratteristiche delle parti terminali dell'RNA (strutture cap e sequenze conservate 5' e 3') sono state ritrovate anche nelle strutture primarie dei segmenti genomici di altri virus nella famiglia *Reoviridae* e in quelle di altri virus con genoma segmentato. Uno degli aspetti più interessanti di rotavirus, e in genere di tutti i virus che hanno un genoma a doppio filamento e segmentato, è rappresentato dal modo con cui questi virus replicano coordinatamente e impacchettano gli undici mRNA virali. Sembra che tutti gli 11 segmenti posseggano comuni segnali di “cis-acting” poiché essi replicano grazie ad un'unica polimerasi e sembra che questi segnali siano determinati da strutture secondarie piuttosto che da sequenze primarie. In aggiunta, ogni mRNA deve contenere anche un segnale unico proprio del segmento per permettere che gli undici segmenti di mRNA siano distinti durante i processi di packaging.

Generalmente le sequenze terminali conservate contengono segnali “cis-acting” utili per la trascrizione, la traduzione dell'RNA, il trasporto di RNA e la replicazione, l'assemblaggio o l'incapsidamento del genoma virale.

Gli 11 segmenti di RNA, separati attraverso elettroforesi in gel di poliacrilamide (PAGE), sono evidenziati da bande che si dispongono secondo un profilo caratteristico, costituito, nei rotavirus di gruppo A, da 4 segmenti ad alto peso molecolare (PM), seguiti da un gruppo di 2 e uno di 3 a peso molecolare intermedio e infine da 2 segmenti a basso peso molecolare. Nell'ambito di questo profilo elettroforetico degli RNA genomici, ciascun segmento può presentare variazioni minori della propria mobilità elettroforetica, generando gli elettrofetotipi. Le variazioni più significative riguardano i segmenti genici 10 e 11 che possono migrare in gel di poliacrilamide più lentamente creando un profilo “corto”, o più rapidamente, creando un profilo “lungo” [Kalica et al., 1978; Espejo et al., 1977]. Meno frequentemente la migrazione più lenta di questi segmenti genomici può determinare un profilo elettroforetico “supercorto” [Nakagomi et al., 1999; Estes, 2001].

Tra i ceppi di rotavirus esiste una grande variabilità elettroforetica dei segmenti genomici e tale diversa mobilità elettroforetica può riflettere differenze nella sequenza genica delle basi. Per studiare il problema della correlazione genica tra i vari elettroferotipi, Flores e coll. [1982] hanno utilizzato sonde di RNA a singola elica in grado di ibridizzare segmenti genici di RNA doppia elica e hanno dimostrato che segmenti genici corrispondenti con profilo di migrazione simile non mostravano necessariamente omologia dell'RNA. Al contrario segmenti genici corrispondenti, che mostravano omologia dell'RNA con le sonde impiegate, non presentavano la stessa mobilità elettroferotica.

Per questo motivo, è stato concluso che similitudini o differenze nella mobilità elettroforetica tra due segmenti genomici corrispondenti di rotavirus umani non riflettono similitudini o differenze geniche. Tuttavia è stato dimostrato che gli elettroferotipi possono essere validi indicatori della diffusione dei ceppi nell'ambito dei singoli episodi epidemici, e, in generale, possono fornire importanti e utili informazioni di carattere epidemiologico consentendo di definire la tracciabilità dell'infezione [Ruggeri et al., 1989; Chanock et al., 1983].

ESPRESSIONE DEL GENOMA E PROTEINE VIRALI

Il genoma di rotavirus codifica per 6 proteine strutturali (VP1-VP4, VP6 e VP7) presenti nelle particelle virali e 6 proteine non strutturali (NSP1-NSP6), trovate invece nelle cellule infettate ma non nelle particelle mature [Estes, 2001] (Figura 7). Ad eccezione dell'undicesimo segmento che codifica per 2 proteine (NSP5 e NSP6), il resto dei segmenti è monocistronico [Estes And Kapikian, 2007].

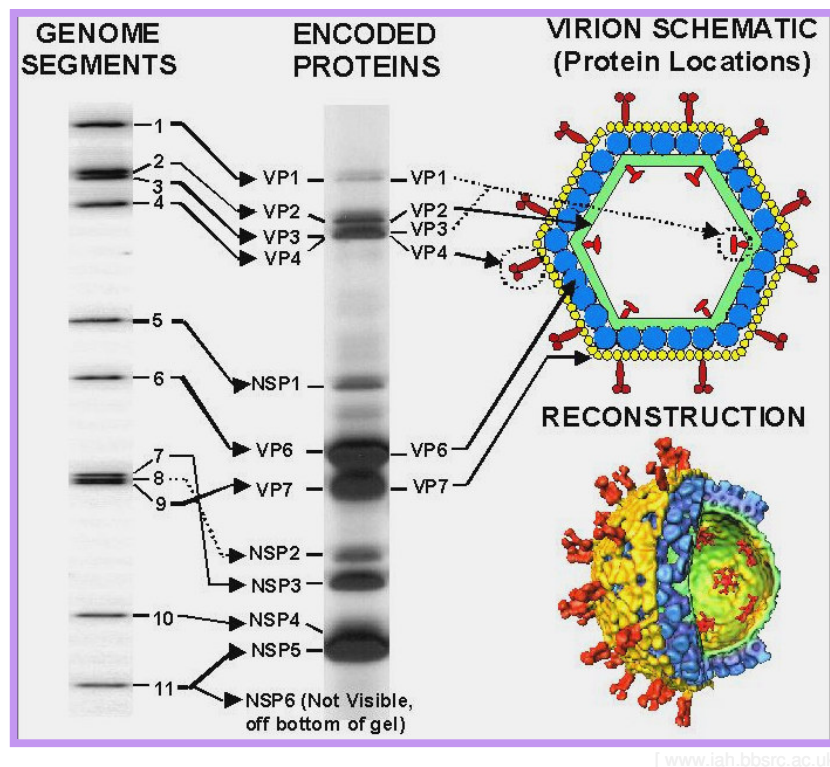


Figura 7: Schema della struttura di rotavirus che mostra la distribuzione delle proteine e degli 11 segmenti di RNA codificante (sinistra). Schema (al centro) e riproduzioni di crioelettromicroscopie di un virione (a destra) che mostra la localizzazione delle maggiori proteine strutturali. VP, proteina strutturale; NSP, proteina non strutturale [da Estes, 2001, modificato].

Proteine strutturali

VP1, VP2 e VP3

Le proteine VP1 VP2 e VP3, codificate dai segmenti genici 1, 2 e 3, rispettivamente, sono proteine strutturali che formano il core [Estes, 2001]. Ognuna di queste ha affinità per l'RNA a singolo filamento e gioca un ruolo nella trascrizione e replicazione dell'RNA. La proteina VP1 è l'RNA polimerasi RNA-dipendente virale che funziona sia come replicasi sia come trascrittasi. Insieme alla VP3, una proteina che ha attività guanilil- e metil-transferasi, la VP1 provvede al macchinario enzimatico richiesto per fornire di cap l'mRNA e forma quindi un complesso di trascrizione [Chen et al., 1999; Liu et al., 1992]. VP2 lega l'RNA in modo non sequenza-specifico; essa è la più abbondante delle tre proteine e costituisce la struttura dello strato più interno del core interagendo con la VP6, che è presente sulla superficie esterna del capsido interno.

Di tutte queste proteine, VP2 è l'unica in grado di auto-assemblarsi in una proteina icosaedrica simile a quella nativa, quando espressa in cellule di insetto. Questa osservazione indica che VP2 possiede i determinanti richiesti per dirigere l'assemblaggio di altre proteine di rotavirus ed è quindi essenziale per la formazione delle particelle virali [Chen et al., 1999; Liu et al., 1992]

E' stato suggerito che il gene VP3, e quindi la sua proteina codificata VP3, potrebbe essere un determinante della restrizione d'ospite e della virulenza di rotavirus insieme ad altri geni [Hoshino et al., 1995; Kobayashi et al., 1995]

VP4

La proteina VP4, codificata dal segmento genico 4, è presente sulla superficie esterna della particella virale. Trimeri di VP4 formano 60 brevi sporgenze lunghe circa 10-12 nm, che all'estremità distale hanno una struttura simile ad una protuberanza contenente il prodotto del taglio proteolitico, VP5* [Estes, 2001]. Infatti il taglio proteolitico della proteina VP4 ad opera della tripsina genera due subunità: VP8* e VP5*.

VP4 è una proteina non glicosilata, proteasi-sensibile di 88 kDa, codificata dal segmento 4 [Kapikian et al., 2001], e costituisce l'1.5% delle proteine virali. Sebbene sia un componente minore del capsido esterno, essa svolge numerose funzioni.

VP4 è responsabile dell'attacco e della penetrazione del virus nella cellula ed è stata identificata anche come emoagglutinina virale. Tale proteina, inoltre, produce una delle maggiori risposte anticorpali neutralizzanti in corso di infezione da rotavirus dal momento che esprime gli antigeni che determinano la specificità P [Estes, 2001]. Analisi di sequenza hanno permesso di mappare l'attività emoagglutinante di VP4 nella regione tra i residui aminoacidici 93 e 208 della subunità VP8*. Il frammento per il taglio della tripsina e il dominio di legame per l'acido sialico si trovano nella stessa regione.

Il taglio tripsinico di VP4 è necessario affinché avvenga l'infezione e inizi la penetrazione del virus attraverso la membrana cellulare. VP4 viene clivata in VP8* (28 kDa, aminoacidi 1-247) e VP5*(60 kDa, aminoacidi 248-776), facilitando l'ingresso del virus nella cellula [Kaljot et al., 1998; Fiore et al., 1991].

Il meccanismo molecolare che favorisce l'infettività, la proteolisi e il suo ruolo nella penetrazione della membrana non è ancora ben chiaro. Recenti studi hanno confrontato le caratteristiche biochimiche e strutturali di rotavirus coltivato in presenza e in assenza di tripsina e hanno dimostrato che il taglio tripsinico stabilizza l'assemblaggio delle sporgenze e conferisce la simmetria icosaedrica.

Inoltre la proteina VP4, al pari di quella VP7, contiene un tripeptide che gioca un ruolo come sito di riconoscimento per le integrine nella matrice extracellulare e risulta essere coinvolto nell'interazione con le diverse integrine nei primi stadi dell'infezione [Kapikian et al., 2001]. Sebbene la specificità antigenica P non sia stata assegnata per tutti i ceppi di rotavirus, reazioni di ibridazione RNA-RNA e/o analisi di sequenza di vari rotavirus hanno definito fino ad oggi l'esistenza di almeno 27 diversi tipi VP4.

Per quanto riguarda VP8* e VP5*, VP8* possiede il maggior sito antigenico per la specificità VP4 del sierotipo, mentre VP5* contiene siti responsabili per la reattività crociata tra le diverse VP4. Infatti, la regione di maggior variabilità genetica è localizzata tra gli aminoacidi 71 e 204 (regione ipervariabile). La subunità VP8* è stata ulteriormente studiata attraverso amplificazione, clonaggio ed espressione *in vitro* dei tre peptidi antigenici di VP8* e la loro analisi mediante saggi di immunoblot. Questi studi hanno dimostrato che il peptide B (aminoacidi 84-80) conteneva la specificità VP4 del sierotipo, mentre il peptide A (aminoacidi 1-102) e il peptide C (aminoacidi 150-246 e 247-251 a partire da VP5*) mostravano reattività crociata tra le proteine VP4.

Infine VP4 sembra giocare un ruolo importante nella virulenza e nella patogenicità di rotavirus come pure nei meccanismi che determinano la restrizione d'ospite [Burke and Desselberger, 1996].

VP6

La proteina VP6, prodotto del segmento genico 6, è una proteina idrofobica che costituisce il capsido interno del virus, ha un peso molecolare di 41 kDa e rappresenta circa il 51% delle proteine virali [Kapikian et al., 2001]. Tale proteina assume dunque un ruolo chiave nella struttura del virione interagendo sia con le proteine VP4 e VP7 del capsido esterno sia con la proteina VP2 del core [Estes, 2001]. VP6 forma spontaneamente trimeri ed è estremamente stabile.

VP6 è altamente antigenica e immunogenica giocando un ruolo fondamentale nell'induzione dell'immunità protettiva [Estes, 2001]. Essa, infatti, determina la maggiore reattività gruppo-specifica. Un dominio di VP6, in particolare, specifica la reattività del sottogruppo, mentre un secondo dominio di questa proteina contiene il maggior determinante della reattività antigenica di rotavirus di gruppo A. È stata determinata la sequenza

aminoacidica della proteina VP6 nei gruppi di rotavirus A, B, e C. I siti immunodominanti di VP6 che contengono epitopi gruppo-specifici per i rotavirus di gruppo A sono stati localizzati in quattro regioni (residui aminoacidici 32-64, 155-167, 208-294 e 380-397). VP6 presenta diversi antigeni che permettono di differenziare i rotavirus di gruppo A nei diversi sottogruppi specifici (SGI-SGII). La stabilità della proteina VP6 e il fatto che esprime epitopi altamente conservati all'interno di ciascun gruppo di rotavirus hanno reso questa proteina il principale bersaglio dei saggi diagnostici per la rivelazione della presenza del virus nelle feci.

Inoltre la proteina VP6 si è rivelata anche un bersaglio dei linfociti T citotossici (CTL) sia sierotipo-specifici sia con reattività G crociata. L'epitopo sierotipo-specifico CTL sulla VP6 è stato identificato dal residuo aminoacidico 376 a quello 384. Inoltre, è stato possibile dimostrare che la proteina VP6 esprime un epitopo che stimola la proliferazione delle cellule T helper con fenotipo L374+. Fino a pochi anni fa si riteneva che i rotavirus animali e umani presentassero determinanti antigenici in comune e che questi fossero presenti soprattutto nella proteina VP6. Per tale motivo i rotavirus che condividono lo stesso antigene di gruppo sono stati classificati come rotavirus di gruppo A, mentre i rotavirus privi di questo antigene sono classificati in rotavirus di gruppo non A. Questi ultimi non sembrano esprimere gli antigeni di sottogruppo.

VP7

La glicoproteina VP7, codificata dal segmento 9, è il maggiore antigene neutralizzante di rotavirus e permette la distinzione in G tipi [Kapikian et al., 2001]. La VP7, che ha peso molecolare di 38 kDa, è localizzata sul capsido esterno, contribuisce alla formazione della superficie liscia esterna e costituisce il 30% delle proteine virali. Contiene da uno a tre potenziali siti per l'N-glicosilazione; tuttavia le catene laterali dei carboidrati non sembrano essenziali per l'infettività in quanto è già stato descritto un mutante infettante di rotavirus di scimmia SA11 che manca di un sito per la glicosilazione.

La sequenza aminoacidica di VP7 dei ceppi appartenenti ad ognuno dei 19 G tipi attualmente conosciuti è stata dedotta dalla sequenza nucleotidica del gene VP7. Analisi della sequenza aminoacidica indicano la presenza di nove regioni altamente divergenti (VR), ognuna conservata nei ceppi dello stesso G tipo. Gli epitopi antigenici determinanti il G tipo sono stati mappati in 3 regioni aminoacidiche: regione A (VR5: aminoacidi 87-99), regione B (VR7: aminoacidi 145-150) e regione C (VR8: aminoacidi 211-223) [Dyall-Smith et al., 1986]. L'importanza della glicosilazione nell'antigenicità di VP7 è stata dimostrata dagli effetti della sostituzione di un singolo amminoacido alla posizione 211 del virus di scimmia SA11. Questa mutazione ha creato un nuovo sito di glicosilazione e il mutante risulta significativamente resistente alla neutralizzazione mediante antisiero iperimmune. Sulla base di queste osservazioni è stato suggerito che VR8*, che contiene l'amminoacido 211, possa costituire un sito immunodominante che è reso inaccessibile ai suoi corrispondenti anticorpi neutralizzanti dall'aggiunta di una nuova catena laterale di carboidrati. Questa regione sembra essere il sito antigenico dominante sulla VP7 del ceppo SA11. Tuttavia l'ipotesi

dell'immunodominanza di VR8* non può essere ritenuta l'unica dal momento che non è stato preso in considerazione il possibile ruolo di VP4 nella neutralizzazione.

Proteine non strutturali

NSP1

La proteina NSP1, codificata dal segmento genico 5, sembra non essere essenziale per la replicazione del virus e per il riassortimento dei segmenti genomici [Estes, 2001]. Alcuni studiosi hanno implicato il gene NSP1 come fattore di virulenza nel topo. La proteina NSP1 è quella meno conservata nei diversi ceppi di rotavirus. Tale proteina interagisce con il citoscheletro degli enterociti e sembra avere un ruolo nella soppressione della risposta dell'ospite all'infezione interferone- α -dipendente [Angel et al., 2007].

NSP2

La proteina NSP2, codificata dal segmento genico 8, è un'NTPasi oligomerica coinvolta nella formazione del viroplasma, dotata di attività destabilizzante l'elica (elicasi). Può essere coinvolta nell'incapsidamento dell'RNA e nella virulenza [Estes, 2001]. Inoltre, questa proteina lega NSP5 e VP1 e sembra essere indispensabile per la sintesi dell'RNA doppia elica [Angel et al., 2007].

NSP3

La proteina NSP3, codificata dal segmento genico 7, si lega in modo specifico all'estremità 3' dell'mRNA virale e rappresenta un prototipo di una nuova specie di proteine capaci di legare specifiche sequenze di RNA e che richiedono solo quattro nucleotidi per il riconoscimento dell'RNA. Essa funziona come proteina cellulare che lega poli(A) e inibisce la sintesi proteica cellulare come pure implementa la traduzione degli mRNA virali [Estes, 2001].

Infine, è stato dimostrato che il gene NSP3, e quindi la proteina derivata, sia un determinante per la diffusione di rotavirus a siti extra-intestinali in corso di infezione [Mossel and Ramig, 2002].

NSP4

La proteina NSP4, codificata dal segmento genico 10, è costituita da molteplici domini. Essa rappresenta il prodotto di un primo trascritto di 20 kDa che viene poi glicosilato diventando di 29 kDa. L'oligosaccaride infine è processato nella proteina matura di 28 kDa che è una proteina transmembrana del reticolo endoplasmico. NSP4 è l'unica proteina non strutturale che non si lega all'RNA [Estes, 2001].

Essa gioca un ruolo importante nella morfogenesi e nella virulenza, funzionando, da un lato, come un recettore intracellulare e, dall'altro, come enterotossina (la prima enterotossina virale dimostrata). In particolare NSP4 svolge un ruolo nell'assemblaggio del virus e il terminale carbossilico del dominio citoplasmatico funziona nella morfogenesi virale come recettore intracellulare sulla membrana del reticolo endoplasmico che lega le particelle progenie bilaminari nel citoplasma e ne media la gemmazione all'interno del lume del reticolo endoplasmico e dove vengono convertite in particelle trilaminari [Kapikian et al., 2001].

Per quanto riguarda l'attività tossinogenica è stato dimostrato che la proteina NSP4 gioca un ruolo cruciale nella secrezione di fluidi ed elettroliti durante l'infezione. E' stato ipotizzato che NSP4 interagisca con un recettore cellulare presente sull'epitelio intestinale stimolando un aumento della concentrazione di calcio intracellulare e un segnale di traduzione calcio-dipendente che aumenta la permeabilità della membrana plasmatica al cloro potenziando la secrezione di cloro e inducendo una diarrea secretoria.

Sembra che le regioni aminoacidiche 112-175 e, in particolare, 114-140 (regione enterotossinogenica) e 114-135 (peptide tossico) siano determinanti per l'attività enterotossinogenica di NSP4 [Ball et al., 1996; Zhang et al., 1998; Lee et al., 2000]. Variazioni aminoacidiche in queste regioni sono state associate ad alterazioni dell'attività tossinogenica di NSP4 e della virulenza di rotavirus [Ball et al., 1996; Zhang et al., 1998; Lee et al., 2000].

NSP5

La proteina NSP5, codificata dal segmento genico 11, è una fosfoproteina O-glicosilata che si auto-assembla in dimeri. Possiede attività autochinasica ed esiste in diversi isomeri fosforilati nelle cellule infettate. Quando è coespressa nelle cellule infettate, NSP5 è fosforilata da NSP2. Inoltre, NSP5 interagisce con NSP2 e NSP6 [Estes, 2001; Angel et al., 2007].

NSP6

La proteina NSP6, di 12 kDa, è codificata da una seconda ORF sul segmento genico 11 della maggior parte dei rotavirus. E' noto che essa interagisce con NSP5 e che si localizza nel viroplasma insieme con NSP2 e NSP5. Inoltre sembra che NSP6, unitamente a NSP2 e NSP5, intervenga nel reclutamento di altre proteine virali dal loro sito di sintesi al viroplasma

come pure faciliti l'incapsidamento dell'RNA e il movimento delle nuove particelle virali dal viroplasma alla membrana del reticolo endoplasmico [Estes, 2001].

NSP6 sembra avere un rapido "turnover" dal momento che viene completamente degradata entro 2 ore dalla sua sintesi [Rainsford and McCrae, 2007]. Tale proteina forma degli aggregati perinucleari che si ridistribuiscono nel viroplasma durante l'infezione e sembra essere in grado di legarsi in maniera aspecifica a ssRNA come pure a dsRNA.

CICLO REPLICATIVO DI ROTAVIRUS

Adsorbimento, penetrazione e scapsidamento

Gli stadi iniziali della replicazione del virus sono stati esaminati mediante procedure biochimiche e morfologiche [Estes, 2001].

L'attacco del virus alla cellula avviene mediante la proteina VP4 o il prodotto del suo clivaggio VP5*. L'entrata del virus nella cellula sembra essere un processo "multi-step" che probabilmente richiede sia VP4 che VP7 (Figura 8). Il legame iniziale è sodio-dipendente, è insensibile a valori di pH tra 5,5 e 8,0 e dipende da residui di acido sialico nella membrana. Studi di microscopia elettronica hanno suggerito che l'entrata del virus nella cellula avvenga per endocitosi mediata da recettore e che le particelle entranti siano velocemente trasportate ai lisosomi dove avviene lo scapsidamento ad opera di enzimi lisosomiali. Le modalità con cui rotavirus entra nelle cellule sono diverse e dipendono dal fatto che le particelle virali siano state trattate con tripsina o meno. Il virus infettante pretrattato con tripsina apparentemente entra nelle cellule mediante penetrazione diretta delle particelle attraverso la membrana cellulare nel citoplasma cellulare. Al contrario le particelle non trattate con tripsina sono catturate mediante fagocitosi e questi virioni sono sequestrati nei lisosomi 20 minuti dopo l'attacco del virus alla membrana cellulare. Sembra chiaro che il passaggio di rotavirus dalle vescicole endocitiche al citoplasma non avvenga attraverso un meccanismo di fusione pH-dipendente.

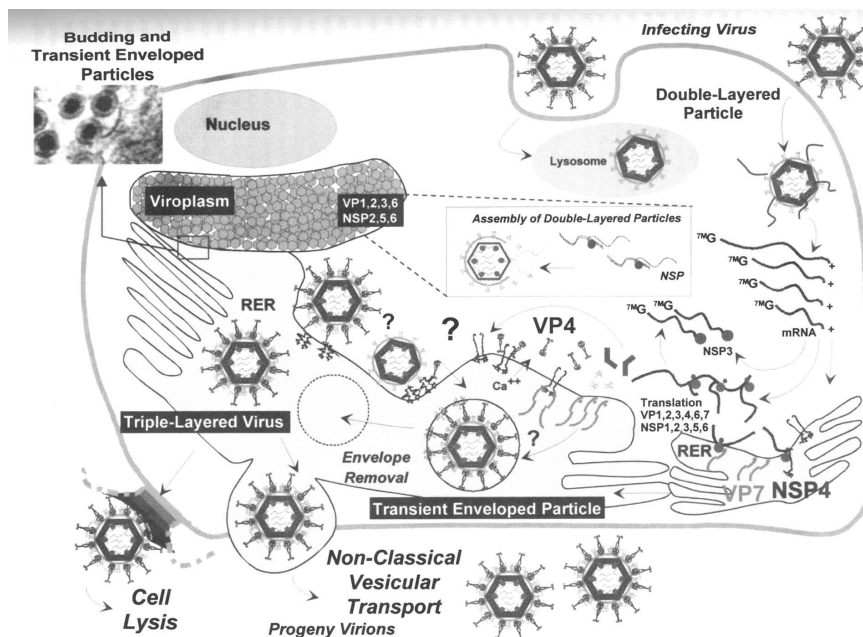


Figura 8. Schema del ciclo replicativo del virus [Estes, 2001, modificato].

Trascrizione e replicazione

La sintesi dei trascritti virali è mediata dall'RNA-polimerasi-RNA dipendente virale endogena (trascrittasi) VP1 che ha un certo numero di attività enzimatiche [Estes, 2001]. È stato dimostrato che nelle cellule infettate le particelle trilaminari sono spogliate a particelle bilaminari e si ritiene che la trascrizione avvenga in questo tipo di particelle.

La trascrizione è asimmetrica e tutti i trascritti sono filamenti positivi a tutta lunghezza derivati dal filamento negativo dell'RNA a doppio filamento. Il sito esatto della trascrizione all'interno del citoplasma non è stato localizzato in modo preciso ma si ritiene che sia nel viroplasma. L'estremità 3' dell'mRNA virale contiene informazioni che stimolano l'espressione genica nelle cellule infettate [Patton, 2001]. In particolare, gli ultimi 4 nucleotidi della sequenza "consensus" al terminale 3' (5'-GACC-3') agiscono da "enhancer" virus-specifico della traduzione attraverso un processo che verosimilmente coinvolge il riconoscimento di questa sequenza "consensus" ad opera della proteina NSP3 legata al complesso cellulare di traduzione, promuovendo una più efficiente traduzione dell'mRNA virale a discapito di quella cellulare.

L'analisi della cinetica della sintesi di RNA nelle cellule infettate mostra che i filamenti positivi e negativi di RNA sono evidenziabili tre ore dopo l'infezione. Dopo la sintesi, i doppi filamenti di RNA rimangono associati alle particelle subvirali suggerendo che non si trova dsRNA libero nelle cellule.

È stato ipotizzato un modello nel quale particelle di rotavirus bilaminari sono assemblate attraverso una sequenziale aggiunta di VP2 e VP6 ad un intermedio di replicazione, precore, che consiste di VP1, VP3, NSP2, NSP3 e NSP5. mRNA di rotavirus è dotato di "cap" ma non è poliadenilato e serve come temprato per la sintesi sia delle proteine virali che del genoma dsRNA segmentato [Patton, 2001]. La proteina VP2 del core implementa la sintesi di dsRNA *in vitro*, verosimilmente formando strutture d'appoggio per l'attività della polimerasi VP1. Ottameri di NSP2 hanno attività di NTPasi e di destabilizzazione dell'elica e, insieme a NSP5, contribuiscono all'impacchettamento dell'RNA.

Incapsidamento dell'RNA e assemblaggio del virione

Sulla base della caratterizzazione degli intermedi replicativi nelle cellule infettate da rotavirus un primo modello propone la formazione di precursori intermedi di replicazione precore costituiti dall'assemblamento di mRNA virale, RNA-polimerasi RNA-dipendente e l'enzima del cap che servirebbe come sito di nucleazione per il legame della proteina del core VP2 e l'assemblaggio con T=1 [Estes, 2001].

Sulla base della capacità delle proteine del capsido di rotavirus di auto-assemblarsi in particelle vuote virus-simili e sulla base dei dati sul dsRNA del batteriofago phi 6, un secondo modello suggerisce che in un primo momento vengano costituite particelle core vuote e che in un secondo momento vi si inseriscano gli mRNA.

Un ritrovamento distintivo della morfogenesi di rotavirus è rappresentato dal fatto che le subparticelle virali, che si assemblano nel viroplasma citoplasmatico, gemmano attraverso la membrana del reticolo endoplasmico e le particelle mature si trovano temporaneamente avvolte da una membrana. Questo è uno degli aspetti più interessanti della replicazione di rotavirus che differisce da quella dei membri di altri generi della famiglia *Reoviridae*. Sembra che l'“envelope” acquisito durante questo processo venga perso quando le particelle si muovono verso la parte interna del reticolo endoplasmico, e l'“envelope” viene sostituito da un sottile strato di proteine che alla fine costituiscono lo strato più esterno del virione maturo.

La maggior parte delle proteine strutturali e non strutturali sono sintetizzate sui ribosomi liberi. Al contrario, le glicoproteine VP7 e NSP4 sono sintetizzate sui ribosomi associati con la membrana del reticolo endoplasmico e sono inserite nella membrana del reticolo endoplasmico in corrispondenza della loro porzione amino-terminale la cui sequenza agisce da segnale specifico. I siti e i dettagli della replicazione dell'RNA rimangono ancora poco chiari.

Liberazione del virus

Studi di microscopia elettronica hanno dimostrato che il ciclo biologico di moltiplicazione termina quando la progenie virale viene liberata per lisi della cellula ospite in cellule non polarizzate [Estes, 2001]. A dispetto della lisi cellulare, la maggior parte delle particelle a doppio-strato e numerose particelle a triplo-strato rimangono associate a frammenti cellulari, suggerendo che queste particelle interagiscono con strutture all'interno delle cellule.

Rimane da determinare se il citoscheletro fornisca un mezzo di trasporto delle proteine e delle particelle virali verso determinati siti all'interno della cellula per l'assemblaggio o se esso agisca come elemento stabilizzante nel sito di assemblaggio e nei virioni appena gemmati o se semplicemente le particelle siano intrappolate dal citoscheletro stesso.

MECCANISMI DI EVOLUZIONE GENETICA DI ROTAVIRUS

Mutazioni puntiformi

Il primo meccanismo di evoluzione genetica di rotavirus è rappresentato dall'accumularsi di mutazioni puntiformi nel genoma virale che avvengono a frequenza elevata. Questo fenomeno di "drift" genetico è dovuto, come in tutti i virus con genoma a RNA, alla mancanza di attività di "correzione di bozze" della RNA polimerasi virale ed è alla base della diversità dei ceppi e dell'emergenza di ceppi/genotipi nuovi. Quando le mutazioni puntiformi si accumulano nei siti dei determinanti antigenici dei geni VP4 e VP7, può verificarsi l'emergenza di mutanti che sfuggono la protezione immunitaria ("drift" antigenico). Il "drift" antigenico può essere causato da pressioni immunitarie selettive ma sembra che i rotavirus siano in grado di ridurre parzialmente tale pressione selettiva attraverso la comparsa di diversi lignaggi e sublignaggi di uno stesso genotipo che circolano nella popolazione in modo alternato. Questo meccanismo è stato ben documentato soprattutto per la specificità G1 del gene VP7, quella maggiormente circolante in tutto il mondo [Diwakarla and Palombo, 1999; Arista et al., 2006; Phan et al., 2007].

Infezioni miste

Casi di coinfezione dello stesso ospite con due ceppi di rotavirus di diverso genotipo possono essere molto frequenti specialmente tra i bambini nei paesi in via di sviluppo. L'evidenza è fornita da numerosi studi che mostrano all'elettroforesi degli RNA estratti dalle feci la compresenza di 2 profili di RNA di rotavirus o attraverso genotipizzazione mediante RT-PCR la presenza di più di un genotipo nello stesso campione di feci [Gentsch et al., 1996; Gouvea and Brantly, 1995; Ahmed et al., 1991]. L'alta frequenza di infezioni miste di ceppi di rotavirus in bambini con gastroenterite assume un ruolo importante dal momento che è un requisito per lo scambio di materiale genetico tra due ceppi diversi, ovvero per il riassortimento.

Riassortimento genomico

Il riassortimento genomico si verifica frequentemente, sia *in vivo* che *in vitro*, a causa della natura segmentata dell'RNA genomico. La co-infezione di cellule con due diversi ceppi di rotavirus può risultare in un virus "riassortante" che presenta segmenti di RNA provenienti da ciascuno dei progenitori virali [Desselberger et al., 1996; Watanabe et al., 2001].

È ampiamente noto che il riassortimento può coinvolgere tutti gli undici segmenti genici di rotavirus, conferendo il potenziale di generare teoricamente 2^{11} diverse combinazioni geniche. Questa osservazione offre l'evidenza che il riassortimento rappresenta uno dei più importanti meccanismi di evoluzione genetica nei ceppi di rotavirus comunemente

circolanti [Kapikian et al., 2001; Manula et al., 2002; Gentsch et al., 2005]. Nonostante i geni VP4 e VP7 possano segregare in modo indipendente, in pratica, il numero di combinazioni G e P è minore del numero teorico di riassortanti possibili [Gray et al., 2008]. Sembra infatti che certe combinazioni G/P e quindi certe costellazioni genetiche siano preferite tra i rotavirus circolanti, verosimilmente grazie a fenomeni di “linkage” genetico [Heiman et al., 2008]. Globalmente i ceppi maggiormente diffusi sono quelli di specificità P[8] associata a specificità G1, G3, G4 o G9, appartenenti alla stessa costellazione genomica (genogruppo Wa). Il quinto ceppo più comunemente diffuso, G2P[4], appartiene invece ad una diversa costellazione genetica (genogruppo DS-1).

Eventi di riassortimento tra i ceppi più comuni sono stati documentati in studi di sorveglianza. L'esistenza dei genogruppi è in accordo con l'ipotesi che alcune costellazioni genetiche siano ostacolate [Heiman et al., 2008]. Il riassortimento genico in caso di coinfezione tra ceppi di rotavirus appartenenti allo stesso genogruppo (riassortimento intragenogruppo) sembra avvenire frequentemente. Al contrario, il riassortimento genico tra ceppi appartenenti a genogruppi diversi (riassortimento intergenogruppo) sembra essere un evento raro [Iturriza-Gómara et al., 2001; Ramachandran et al., 2000]. L'evidenza sembra, in parte, provenire da studi che evidenziano che i G tipi più diffusi sono solitamente associati con un singolo P tipo, sottogruppo ed elettroferotipo [Gentsch et al., 1996]. Tuttavia, alcuni studi di sorveglianza hanno documentato esempi di riassortimento intergenogruppo [Gentsch et al., 2005; Matthijnssens et al., 2008b] e singoli G tipi sono stati rivelati in associazione con una ampia varietà di P tipi. L'incidenza globale di questi riassortanti è bassa ma è evidente che essi potrebbero assumere particolare rilevanza epidemiologica in alcune aree geografiche. Comunque, il riassortimento intergenogruppo può generare virus con costellazioni genetiche miste che quindi sono difficilmente assegnabili ad un determinato genogruppo.

Lo scambio di segmenti genici tra ceppi diversi in caso di coinfezione gioca un ruolo primario nel generare la diversità genetica dei rotavirus. Si ipotizza che, come risultato del riassortimento, i rotavirus esistano come una popolazione eterogenea di riassortanti che si trova continuamente sotto pressioni selettive estrinseche (anticorpi materni, precedenti infezioni, vaccinazione) ma anche intrinseche (capacità di alcune proteine virali di interagire funzionalmente durante la replicazione) che potrebbero portare all'emergenza di nuovi genotipi [Heiman et al., 2008].

Trasmissione interspecie

Un possibile meccanismo di diversificazione genetica dei rotavirus umani riguarda eventi di trasmissione zoonosica ovvero di un intero virus animale all'uomo. È stato dimostrato che tutti gli 11 segmenti di alcuni rotavirus umani, quali ad esempio di genotipo G3P[9] e G3P[3], sono virtualmente indistinguibili da quelli di ceppi felini e canini dello stesso sierotipo, suggerendo che questi ceppi inusuali nell'uomo possano essere da frutto di una trasmissione zoonosica completa di rotavirus animali all'uomo [Nagakomi et al., 1989; Nagakomi et al., 2000; Tsugawa and Hoshino, 2008]. Più recentemente, attraverso analisi di

sequenza e filogenetica dell'intero genoma è stato dimostrato che il ceppo umano B4106 rivelato in un bambino ricoverato con gastroenterite in Belgio era di origine lapina [Matthijnsens et al., 2006a], dimostrando che un ceppo derivato da trasmissione eterologa era in grado di indurre diarrea nell'uomo. Tuttavia solo alcuni ceppi di rotavirus presentano elevata omologia genetica dell'intero genoma con ceppi animali, suggerendo che la trasmissione interspecie di ceppi animali all'uomo in grado di dare malattia sia un evento estremamente raro.

Inoltre, è verosimile che, quando ceppi di rotavirus riescono a saltare le barriere d'ospite, essi non siano in grado di replicarsi efficacemente nel nuovo ospite. Le basi molecolari dell'infettività e della capacità di rotavirus di indurre malattia in specie eterologhe non sono ad oggi conosciute, anche se alcuni segmenti genomici tra i quali VP3, VP4, VP7, NSP1, NSP2 e NSP4 sono stati implicati nella restrizione d'ospite e/o nella virulenza [Matthijnsens et al., 2006a]. Alcuni dati della letteratura sembrano suggerire che i determinanti di tali caratteristiche di rotavirus possano risiedere nelle complesse interazioni di molteplici geni ancora sotto l'influenza del contesto genetico.

Riassortimento tra ceppi di rotavirus umani e animali

L'introduzione di geni di rotavirus animale in ceppi umani avviene in seguito a trasmissione interspecie dell'intero virus animale all'uomo e successivo riassortimento tra il ceppo animale e un ceppo umano eventualmente coinfectante la stessa cellula ospite. Sono noti esempi di specificità P e G sia rare sia frequenti nell'uomo che presentano una stretta correlazione genetica ed antigenica con le stesse specificità di ceppi animali. Di particolare interesse sembra essere l'evidenza che alcuni ceppi con specificità G e P molto diffuse nell'uomo, quali G3 e G4 e P[8], presentano sequenze dei geni VP7 e VP4 quasi indistinguibili da quelle degli stessi geni di ceppi di maiale e di cane, suggerendo che anche le specificità G e P più diffuse possono avere un'origine filogenetica comune con ceppi animali [Santos et al., 1999].

E' stato dimostrato che il ceppo 69M di sierotipo G8 (G8P4[10]) caratterizzato da elettroferotipo supercorto, contiene geni riconducibili al genogruppo DS-1 umano e geni correlati a rotavirus bovini [Ohshima et al., 1990]. Inoltre il ceppo HAL1166 di specificità G8 con elettroferotipo lungo e ceppi G8P[14] rivelati in diverse parti del mondo sembrano essere strettamente correlati geneticamente a ceppi umani di genogruppo DS-1 e a ceppi bovini nel gene VP4, mentre nel gene VP4 mostrano elevata omologia con ceppi di coniglio. Le caratteristiche genetiche di questi ultimi ceppi suggeriscono che essi possano derivare da eventi di riassortimento in due specie animali diverse [Browning et al., 1992; Ohshima et al., 1990; Holmes et al., 1999; Palombo et al., 2000]. Anche l'eterogeneità genetica della specificità P[6], che rappresenta il terzo genotipo VP4 più frequente nell'uomo, sembra essersi generata nell'uomo attraverso molteplici eventi di trasmissione interspecie e successivi riassortimenti tra ceppi umani e animali [Martella et al., 2006].

Recentemente, mediante analisi di sequenza del completo genoma, è stato dimostrato che ceppi di rotavirus umano appartenenti al genogruppo Wa potrebbero avere un'origine

filogenetica comune con rotavirus suini e che i ceppi umani di genogruppo DS-1 potrebbero avere un'origine filogenetica comune con rotavirus bovini [Matthijnssens et al., 2008b].

Riarrangiamento genomico

Nel riarrangiamento genomico avviene una variazione radicale nella dimensione dei segmenti di RNA mediante concatamerizzazione o delezione all'interno di uno stesso segmento [Alam et al., 2008]. Il segmento riarrangiato è rivelato attraverso una posizione insolita nel profilo di migrazione dell'RNA durante PAGE in assenza di un segmento in posizione normale. Il tipo di riarrangiamento più frequentemente osservato è una duplicazione di sequenza "testa coda", riportata ad esempio, per i segmenti genomici codificanti le proteine NSP1-NSP5 e VP6. Si ipotizza che tali riarrangiamenti siano conseguenza del fatto che l'RNA polimerasi virale esegue "un testa coda": torna indietro o si lega a un secondo sito sul suo stampo, ripetendo parte di esso nel trascritto [Hundley et al., 1985]. Dal momento che la duplicazione di sequenza inizia per la maggior parte alla regione 3' non tradotta (3'UTR), la fase di lettura delle proteine virali non è compromessa. In alcuni casi, comunque, le duplicazioni di sequenza possono iniziare al terminale 3' dell'ORF causando alterazioni del prodotto proteico e, meno frequentemente, la delezione di una sequenza all'interno dell'ORF [Alam et al., 2008].

L'analisi di alcuni ceppi di rotavirus di gruppo A con profili di RNA atipici ha permesso di dimostrare eventi di riarrangiamento genetico di rotavirus all'interno dei segmenti genomici. In particolare, nei virus con riarrangiamenti genomici, i segmenti tipici di RNA virale possono essere perduti o essere rimpiazzati da bande aggiuntive di doppi filamenti di RNA che migrano più lentamente. Queste nuove bande rappresentano di solito forme concatameriche di dsRNA ("double-strand" RNA) che contengono sequenze specifiche dei segmenti di RNA mancanti [Estes and Cohen, 1989].

Virus con tali riarrangiamenti genomici sono stati isolati sia da bambini immunocompromessi con infezione cronica [Hundley et al., 1987] sia da bambini immunocompetenti con infezione asintomatica [Besselaar et al., 1986] e da animali. I genomi di ceppi umani con profilo "corto" (prototipo: ceppo DS-1) o "supercorto" (prototipo: ceppo 69M) in relazione al segmento 11 sono un esempio di genomi riarrangiati che possiedono una struttura parzialmente duplicata. Il profilo "supercorto" è osservato raramente nei rotavirus umani. Il ceppo A64, che è stato isolato da un bambino immunocompromesso con infezione cronica da rotavirus rappresenta un esempio di virus riarrangiato nei segmenti genomici 8, 10 e 11.

Come accennato prima, i rotavirus che contengono segmenti genomici riarrangiati non sono in genere difettivi. I segmenti riarrangiati possono riassortare e rimpiazzare strutturalmente e funzionalmente i normali segmenti di RNA senza provocare variazioni nel diametro della particella [Biryahwaho et al., 1987]. La caratterizzazione biofisica ha mostrato che all'interno di un'unica particella virale possono essere impacchettate fino a 1.800 pb aggiuntive senza causare rivelabili cambiamenti nel diametro della particella stessa o nei valori apparenti di sedimentazione. La densità delle particelle contenenti genomi riarrangiati è

comunque maggiore e il cambiamento di densità risulta direttamente proporzionale al numero delle paia basi addizionali impacchettate. Questi risultati indicano che i rotavirus hanno una considerevole capacità ad impacchettare RNA genomico addizionale [McIntyre et al., 1987].

Nella maggior parte dei casi, i profili delle proteine virus-specifiche prodotte in cellule infettate con rotavirus dotati di genomi riarrangiati sono simili a quelli osservati in cellule infettate con

rotavirus di riferimento [Biryahwaho et al., 1987; Pocok, 1987]. Questo indica che il riarrangiamento delle sequenze specifiche di un determinato segmento ha mantenuto verosimilmente inalterate le normali fasi di lettura e l'espressione di queste sequenze. Altri casi di riarrangiamento hanno invece portato apparentemente all'abolizione o all'estensione della normale fase di lettura, con la conseguenza che nessuna proteina o nuovo prodotto proteico esteso viene sintetizzato [Hundley et al., 1985].

Si ritiene che il riarrangiamento genico rappresenti un terzo meccanismo di evoluzione dei rotavirus dopo quelli di "shift" e "drift" antigenico [Desselberger, 1996].

EPIDEMIOLOGIA

In tutto il mondo, i rotavirus sono la principale causa di gastroenterite acuta severa in particolare nei bambini al di sotto di 5 anni di età. Nei paesi industrializzati sebbene la morbilità sia elevata la mortalità è bassa, mentre nei paesi in via di sviluppo la mortalità è molto elevata, soprattutto a causa della mancanza di terapie reidratanti [Glasse et al., 2005]. Globalmente ogni anno circa 600.000 bambini muoiono per enterite da rotavirus [Glass et al., 2006]. Il 99% di questi decessi avviene nei paesi in via di sviluppo e questa porzione rappresenta circa il 5% di tutti i casi di morte nei bambini al di sotto di 5 anni [Glass et al., 2006]. La mortalità è maggiore nell’Africa sub-Sahariana e in Sud Asia (Figura 9), con più di 120.000 decessi annui solamente in India [Grimwood and Lambert, 2009]. Si stima infatti che circa 1 su 200 bambini nati in queste regioni morirà a causa dell’enterite da rotavirus.

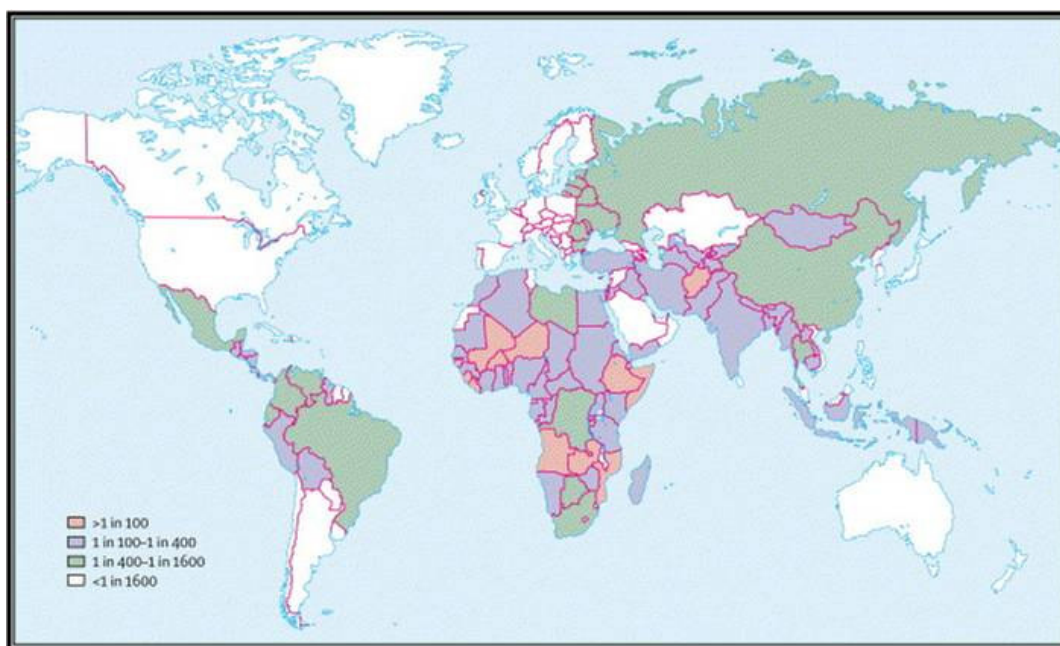


Figura 9. Distribuzione geografica della mortalità per diarrea da rotavirus nel mondo. In ombreggiato sono rappresentate le zone con rischio di mortalità per bambini con età inferiore a 5 anni [da Glass et al., 2006, modificata].

Recenti studi hanno dimostrato che ogni anno rotavirus è responsabile di circa 114 milioni di episodi di gastroenterite nei bambini al di sotto di 5 anni in tutto il mondo causando 25 milioni di visite mediche e 2,4 milioni di ricoveri e che circa il 95% dei bambini in questa fascia d’età ha presentato almeno un episodio di infezione da rotavirus con o senza sintomi di gastroenterite [Parashar et al., 2003; Parashar et al., 2006; Soriano-Gabarro et al., 2006; Estes

and Kapikian, 2007; Dennehy, 2008]. In Italia si stima che ogni anno la gastroenterite da rotavirus colpisca più di 400.000 bambini al di sotto di 60 mesi di età risultando in 400.000 visite mediche e circa 10.000 ricoveri (Figura 10) [Soriano-Gabarro et al., 2006].

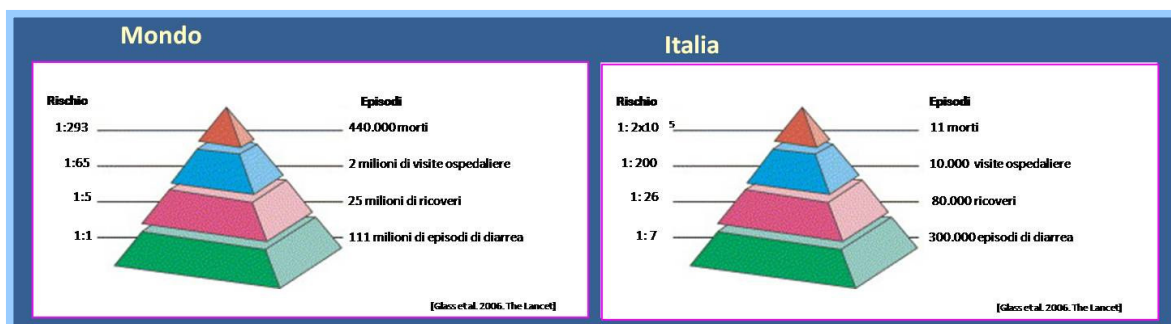


Figura 10: Diffusione annuale dell'enterite da rotavirus in bambini con età inferiore a 5 anni [da Glass et al., 2006, modificata].

Nei paesi tropicali l'infezione da tali agenti è endemica durante tutto l'anno poco più frequente nei mesi più secchi [Schoub et al., 1982; Suzuki et al., 1981]. Al contrario, nei paesi a clima temperato, come in Europa e in particolare in Italia, il picco di incidenza dell'infezione da rotavirus si verifica più frequentemente nei mesi invernali e nella prima primavera e raramente in quelli estivi. In Europa è stato riportato una distribuzione dell'incidenza della malattia da Sud verso Nord [Koopmans and Brown, 1999; Gray et al., 2008]. Negli USA, i casi di gastroenterite da rotavirus avvengono durante quasi tutto l'anno anche se i picchi calano in primavera. Tuttavia la distribuzione e la durata nel tempo dei picchi di infezione indicano che la temperatura da sola non può condizionare la stagionalità, ma verosimilmente, devono essere presenti altri fattori che coinvolgono il comportamento dell'ospite, la diffusione e la sopravvivenza del virus [Cook et al., 1990].

È stato ipotizzato che la bassa umidità relativa all'interno delle abitazioni, nelle quali più a lungo si vive nei mesi freddi, favorirebbe la trasmissione di rotavirus [Brandt et al., 1982] come pure l'affollamento. L'insieme di questi elementi faciliterebbe, da un lato, "l'aerosolizzazione" delle particelle virali, e dall'altro, contribuirebbe alla disidratazione dei piccoli pazienti infettati [Brandt et al., 1982]. In alcuni paesi l'incidenza di infezione sembra aumentare durante la stagione secca [Black et al., 1982; Hieber et al., 1978]. In Giappone invece l'umidità relativa non sembra essere importante [Konno et al., 1983].

I sierotipi più frequenti su scala globale (88% di quelli rivelati in tutto il mondo) sono G1, G3, e G4 associati a P[8], e-tipo lungo, SGII e NSP4 B (genogruppo Wa) e G2 più comunemente associato a P[4], e-tipo corto, SGI e NSP4 A (genogruppo A) [Santos and Hoshino, 2005; Dennehy, 2008]. Tra questi, il genotipo G1P[8] è quello maggiormente circolante a livello mondiale come emerge anche dalla revisione dei dati epidemiologici di

diverse parti del mondo e pubblicati dai primi anni 1990 [Gentsch et al., 2005; Santos and Hoshino, 2005]. Questo dato trova conferma anche in Italia con quanto osservato in Sicilia nell'area di Palermo nel periodo 1986-2004 [Arista et al., 2006].

Inoltre, a partire dal 1993 la specificità G9 è emersa a livello mondiale quale quinta specificità maggiormente circolante in tutto il mondo oltre a quelle G1-G4. In Italia tale specificità sembra essere stata introdotta a partire dai primi anni 1990 nelle regioni meridionali verosimilmente come conseguenza del rilevante flusso in quelle aree di immigrati da paesi limitrofi a basso livello sanitario [Arista et al., 1997; Martella et al., 2003; Martella et al., 2004].

L'epidemiologia dei rotavirus è un fenomeno complesso e in continua evoluzione. In genere, diversi G e P tipi possono co-circolare nella stessa area e la loro distribuzione relativa può subire notevoli variazioni temporali e geografiche. Infatti, alcune specificità sembrano avere rilevanza epidemiologica solo in determinate aree geografiche del mondo. La specificità G8, ad esempio, è particolarmente frequente in Africa e quella G5 è emersa recentemente in America Latina. La specificità P[6], inoltre, rappresenta attualmente il 50% di tutti i ceppi circolanti in Africa [Dennehy, 2008]. Inoltre, in Albania nel 2007 si è osservato un declino della circolazione di ceppi di genotipo G1P[8] che è stato bilanciato dall'emergenza di nuovi ceppi con "combinazioni inusuali" di G e P tipo, quali ad esempio G1P[4] e G2P[8] [Tcheremenskaia et al., 2007].

Relativamente alle variazioni temporali, oltre all'emergenza dei ceppi di specificità G9 sopra descritta, recentemente anche la specificità G12 sta acquisendo rilevanza epidemiologica in molte parti del mondo. Tale specificità è stata identificata e caratterizzata per la prima volta nel 1990 nelle Filippine [Taniguchi et al., 1990; Urasawa et al., 1990]. Da allora ceppi con specificità G12 non sono stati più identificati sino al 2002 quando sono stati osservati negli Stati Uniti [Griffin et al., 2002], in Thailandia [Pongsuwanna et al., 2002] e in misura minore anche in India [Das et al., 2003] e Messico [Shinozaki et al., 2004]. In Europa ceppi G12 sono stati rivelati nel Regno Unito nel 2002 e nel 2006 e in Belgio nel 2003 [Rahaman et al., 2007]. Tra i ceppi G12 circolanti attualmente nel mondo sembra esistere un'ampia diversità genetica, dovuta principalmente a eventi di riassortimento. Le regioni asiatiche potrebbero essere le zone di origine dei ceppi G12 che si sarebbero diffusi negli altri paesi del mondo grazie ai movimenti di persone e animali per viaggi e commercio specialmente negli ultimi anni [Rahaman et al., 2007]. E' stata ipotizzata un'origine suina per i ceppi G12 attualmente circolanti nell'uomo [Rahaman et al., 2007]. Al pari dei ceppi G9, anche i ceppi G12 sembrano esibire un'intensa attività di riassortimento, e quindi verosimilmente potrebbero rispecchiare la successione di eventi evolutivi che hanno portato all'emergenza su scala globale dei ceppi G9 tra le specificità umane più frequenti.

Le infezioni nosocomiali rappresentano un particolare problema di sanità pubblica e sembrano avvenire con una certa frequenza. Studi osservazionali condotti in Europa e in altri paesi industrializzati indicano che la percentuale di incidenza di infezione da rotavirus durante il ricovero è valutabile come 15,8/1000 giorni di ricovero tra i bambini di età inferiore ai 2 anni e 0,7-8,1/1000 giorni di ricovero per i bambini di età inferiore ai 5 anni. [Gray et al., 2008] Inoltre in una revisione sistematica di studi osservazionali sull'impatto della malattia da

rotavirus in Europa, è stato valutato che ogni 4 bambini di età inferiore a 5 anni ricoverati con gastroenterite da rotavirus almeno un caso è di origine nosocomiale. Infezioni nosocomiali sono particolarmente frequenti nei reparti di neonatologia in tutto il mondo [The Pediatric Rotavirus European committee, 2006].

Peso economico della gastroenterite da rotavirus.

Nella stima del peso economico della gastroenterite dovrebbero essere valutati sia i costi diretti (medici e non medici), sia i costi indiretti e altri costi della società come pure individuali [Rheingans et al., 2006]. I costi diretti di tipo medico includono visite (presso dottore e pronto soccorso), ricoveri e costi per la diagnosi di laboratorio, mentre i costi di tipo non medico includono quelli per un uso maggiore di pannolini e medicinali, costi di trasporto e costi per le cure prestate. I costi indiretti, invece, includono la perdita di guadagno e di tempo lavorativo da parte dei genitori che devono accudire i figli, i costi per le misure di controllo dell'infezione, la ridotta qualità della vita e lo stress familiare.

Per quanto riguarda l'Europa, il costo medio per ciascun ricovero per gastroenterite da rotavirus è stato stimato in 1216 euro. Questo costo, moltiplicato per il numero annuale di ricoveri per gastroenterite da rotavirus nei bambini di età inferiore a 5 anni, stimato in 25 paesi dell'Unione Europea dal 2000 al 2003 pari a 87.313, permette di valutare il costo totale annuale di ricoveri in Europa in più di 106 milioni di euro. Questo peso economico sulle risorse sanitarie è particolarmente significativo durante i mesi più freddi, ovvero quando il picco stagionale di infezione da rotavirus si sovrappone con i picchi di incidenza di altre infezioni quali quelle da virus influenza e virus respiratorio sinciziale [Rheingans et al., 2006; Roberts et al., 2003].

L'infezione nosocomiale da rotavirus contribuisce in modo sostanziale al peso economico sulla società a causa del maggior numero di giorni di ricovero e ai costi di chiusura dei reparti a nuovi ricoveri per favorire il contenimento dell'infezione [Gray et al., 2008]. E' stato calcolato che nel periodo 2001-2002 in Francia ogni caso di infezione nosocomiale da rotavirus ha determinato un costo aggiuntivo di tipo medico di 1930 euro rispetto al costo del ricovero senza infezione nosocomiale [Gray et al., 2008]. La distribuzione dei costi, comunque, varia nei singoli paesi e dipende dalle strutture sanitarie e dai servizi sociali.

TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE

La principale via di trasmissione dell'infezione da rotavirus è quella fecale-orale che avviene nell'ambito delle famiglie, negli asili e in genere negli ambienti chiusi, come nei reparti pediatrici e di neonatologia dove sono descritti frequenti episodi epidemici a carattere nosocomiale. Si ritiene possa avvenire anche una trasmissione per via aerea attraverso goccioline di saliva [Fragoso et al., 1986; Parashar et al., 1998; Gray et al., 2008] anche se finora non è mai stata riscontrata infezione da rotavirus del tratto respiratorio. Invece è verosimile che il virus sia inghiottito assieme al muco che lo proteggerebbe anche dall'acido gastrico [Gray et al., 2008].

Importanti veicoli di infezione sono le mani, gli utensili contaminati e in generale le superfici contaminate come pure l'acqua e i cibi. Data la rapidità con cui avviene la trasmissione dell'infezione durante le epidemie, sembra essere più probabile che in queste circostanze il veicolo dell'infezione sia la polvere che contiene frammenti di feci secche che rimanendo sospesa nell'aria, viene inalata. Trattenua poi nel muco essa verrebbe deglutita infettando di conseguenza l'intestino.

È stato dimostrato che il cibo e specialmente l'acqua contaminati possano essere veicoli di trasmissione [Hansman et al., 2008; Le Guyader et al., 2000]. I rotavirus sono stabili in acque di scolo e resistenti ai trattamenti fisico-chimici, quale la clorazione, utilizzati negli impianti di depurazione delle acque. Rotavirus, al pari di alcuni adenovirus e del virus dell'epatite E, sono riconosciuti responsabili di importanti focolai epidemici di enterite trasmessa dall'acqua nei paesi in via di sviluppo [Cliver et al., 1992]. Il ruolo degli alimenti è stato riportato in un numero limitato di epidemie, che indicano i vegetali irrigati con acqua contaminata quali veicolo di infezione, e la sua rilevanza nell'epidemiologia di tali virus è sospettata e fortemente sostenuta [Gallimore et al., 2005; van Zyl et al., 2006]. Inoltre, rotavirus di gruppo A sono stati rivelati in vongole del Giappone [Hansman et al., 2008] e recentemente è stato dimostrato che anche alcuni succhi di frutta possono essere potenziali veicoli di trasmissione di rotavirus [Leong et al., 2008].

Un'ulteriore e riconosciuta sorgente di infezione è rappresentata dagli animali (infezione zoonosica) [Müller and Johne, 2007]. Sierotipi di origine animale sono stati identificati in casi di diarrea infantile in molti paesi e sembra che come serbatoi siano bovini, suini come pure animali domestici e da compagnia, quali i cani [Coluchi et al., 2002; De Grazia et al., 2007; Martella et al., 2008; Tsugawa and Hoshino, 2008]. Inoltre, ceppi riassortanti umani-bovini e umani-suini sembrano circolare in aree ristrette dell'India e del Brasile, dove verosimilmente è maggiore il contatto tra uomini e animali.

Esistono numerosi aspetti che intervengono sulla diffusione e sui possibili veicoli di trasmissione dei rotavirus. Quelli più rilevanti sono l'elevata infettività (per dare infezione sono necessarie meno di 100 particelle virali [Ward et al., 1986; Kapikian et al., 2001]), l'elevato numero di particelle eliminate con le feci (10^{11} particelle virali per grammo di feci [Koopmans et al., 2004; Franco et al., 2006]) e la loro prolungata eliminazione (fino a 2 settimane dalla risoluzione della malattia [Pickering et al., 1988]), l'elevata frequenza di

infezioni asintomatiche (il 50% delle infezioni da rotavirus nei primi due anni di vita è asintomatica [Wilhelmi et al., 2003; Franco et al., 2006]), la stabilità del virione nell'ambiente e la relativa resistenza a pH acido e in genere ai normali disinfettanti. Rotavirus, infatti, è in grado di sopravvivere su superfici ambientali porose (carta, tessuti di cotone) come pure su quelle non porose (alluminio, porcellana e lattice). Su superfici di alluminio, per esempio, il virus sopravvive per 10 giorni a 20°-23° C in presenza di una umidità relativa media e per 60 giorni a 4°C in presenza di una umidità relativa alta [Koopmans et al., 2004]. L'infettività di rotavirus rimane stabile ad intervalli di pH tra 3.0 e 9.0 [Estes, 2001]. L'infettività e l'attività emoagglutinante possono essere distrutte mediante ripetuti congelamenti e scongelamenti.

PATOGENESI E CARATTERISTICHE CLINICHE

L'infezione da rotavirus si realizza attraverso il circuito oro-fecale.

Una volta ingerito il virus è sufficientemente resistente a pH acido da superare l'ambiente gastrico e raggiungere l'intestino tenue dove infetta gli enterociti maturi all'apice dei villi (18-36 ore dopo l'infezione) determinando allargamento ed appiattimento degli stessi, infiltrazione di cellule mononucleate a carico della lamina propria e trasformazione degli enterociti in cellule cuboidali ed irregolari [Antonelli et al., 2008]. Inoltre il rimpiazzo degli enterociti maturi infettati agli apici dei villi da parte delle cellule secretorie delle cripte determina iperplasia delle cripte stesse con conseguente aumento dello strato mucoso (Figura 11).

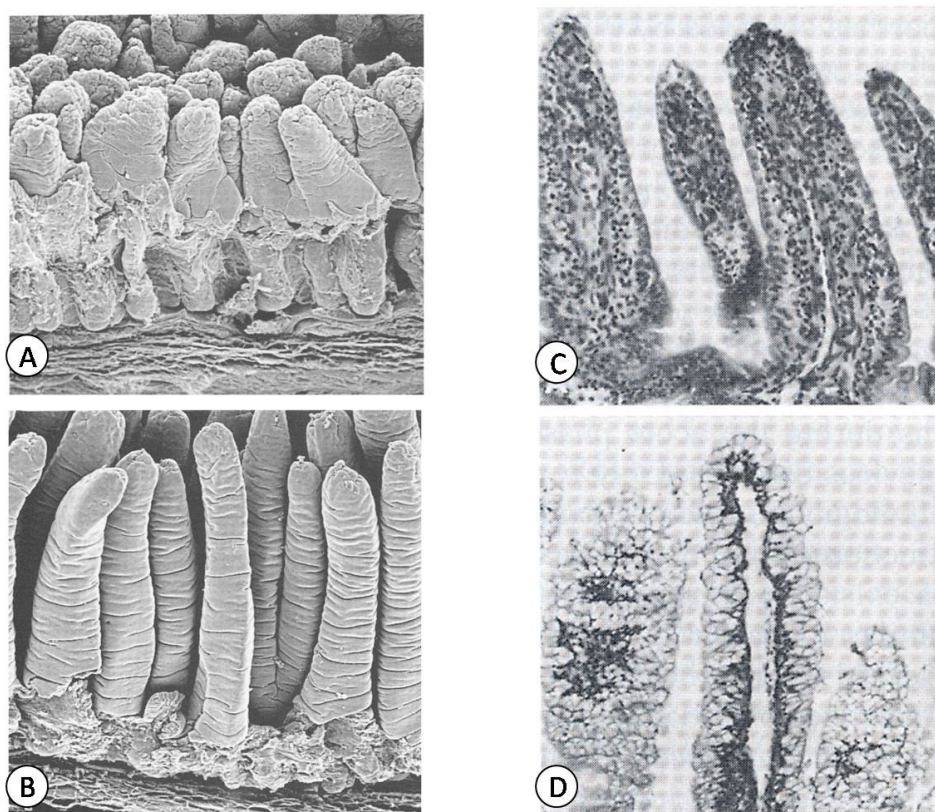


Figura 11. Superficie della mucosa della parte prossimale del piccolo intestino di un vitello sacrificato mezz'ora dopo l'esordio di diarrea sperimentalmente indotta dall'infezione con rotavirus umano, osservata alla microscopia elettronica a scansione (A) e a trasmissione (C). Le immagini in B e D mostrano tratti analoghi del piccolo intestino di vitello non infettato [da Madeley and Cosgrove, 1975 (A e B); Kapikian et al., 2001 (C e D), modificati].

La patofisiologia della diarrea da rotavirus è estremamente complessa e ancora poco conosciuta, ma è ormai dimostrato che essa è chiaramente multifattoriale e deriva da effetti diretti dell'infezione virale come pure da effetti indiretti dell'infezione stessa e della risposta dell'ospite [Ramig, 2004].

Vari meccanismi, infatti, sono stati coinvolti nell'insorgenza della diarrea, tra i quali malassorbimento, azione di un'enterotossina virale (NSP4), attivazione del sistema nervoso enterico (SNE) (Figura 12).

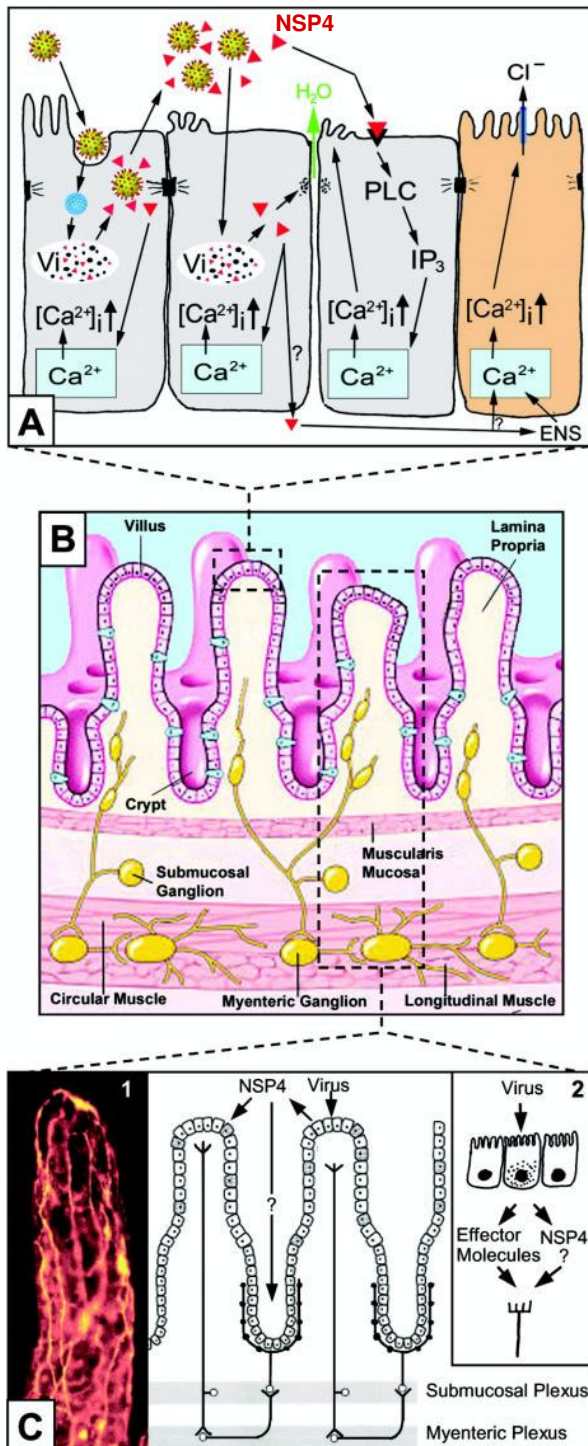


Figura 12. Modello della patogenesi della diarrea da rotavirus. (A) Schema degli eventi all'interno degli enterociti in seguito a infezione. (i) La prima cellula è infettata dal virus che entra e perde il pericapside, si forma un viroplasma (Vi) e successivamente vengono rilasciati virioni e proteine virali. NSP4 (triangoli rossi) induce il rilascio di Ca^{2+} principalmente dal reticolo endoplasmico (in azzurro) con conseguente aumento $[Ca^{2+}]_i$. (ii) La seconda cellula è infettata dopo il rilascio di rotavirus dalla prima. NSP4 distrugge le giunzioni strette tra gli enterociti causando efflusso paracellulare di acqua ed elettroliti (freccia verde). (iii) NSP4, legandosi a specifici recettori sulla cellula, induce una cascata di eventi che porta ad aumento della $[Ca^{2+}]_i$ con distruzione del citoscheletro. (iv) La cellula marrone rappresenta una cellula delle cripte la quale può essere stimolata direttamente dalla proteina NSP4 o dal sistema nervoso enterico (SNE) a sua volta stimolato da NSP4, producendo un aumento della $[Ca^{2+}]_i$ che induce secrezione di Cl^- . (B) Normale architettura del piccolo intestino (il sistema circolatorio non è mostrato) che mostra i gangli del SNE ai diversi livelli submucosali. (C) Arco riflesso del sistema nervoso enterico che può ricevere segnali dall'epitelio dei villi e attivare l'epitelio delle cripte: 1) innervazione di un villo intestinale di topo evidenziata mediante immunofluorescenza; 2) stimolazione del sistema nervoso enterico da parte della proteina NSP4 di rotavirus o altre molecole effettrici [da Ramig, 2004, modificata].

Malassorbimento.

Gli enterociti maturi infettati (cellule normalmente assorbenti) vanno incontro a necrosi. La distruzione degli enterociti avviene a causa di un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) dovuta all'azione della proteina virale NSP4 (enterotossina) che a sua volta causa una cascata di eventi che portano a lisi cellulare e pertanto ridotta capacità di assorbimento (malassorbimento) di Na^+ , acqua e disaccaridasi intestinali. Un frammento della proteina NSP4 (aminoacidi 112-175) è secreto rapidamente dopo l'infezione e sembra essere la causa dell'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

L'infezione da rotavirus porta ad un aumento della $[\text{Na}^+]_i$ e alla diminuzione di $[\text{K}^+]_i$ verosimilmente correlati ad una aumentata permeabilità della membrana plasmatica. Queste variazioni, nelle quali è verosimilmente coinvolta la proteina NSP4, potrebbero indebolire l'assorbimento elettroneutrale di NaCl e l'assorbimento Na^+ -dipendente di nutrienti, sfociando in perdita di fluidi. Inoltre, l'infezione da rotavirus riduce l'espressione e l'attività di enzimi digestivi alla superficie apicale degli enterociti infettati. Di conseguenza, mono e disaccaridi, lattosio, carboidrati, grassi e proteine maldigeriti e non assorbiti si accumulano nel lume intestinale e nel colon creando un bolo osmoticamente attivo. Dal momento che il colon non ha sufficiente capacità di assorbimento dell'acqua, il risultato è una diarrea osmotica.

Infine, l'infezione da rotavirus altera la struttura degli enterociti polarizzati attraverso un'azione sulle proteine del citoscheletro mediata dall'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e modifica le giunzioni strette tra gli enterociti attraverso l'azione della NSP4 con conseguente efflusso paracellulare di acqua ed elettroliti.

Secrezione.

Gli enterociti distrutti vengono rapidamente rimpiazzati da cellule immature secretorie delle cripte causando l'insorgenza di una diarrea secretoria con efflusso di liquidi ed elettroliti, soprattutto Cl^- [Estes, 2001; Ramig, 2004]. La componente secretoria della diarrea da rotavirus sembra comunque essere secondaria a variazioni funzionali dell'epitelio dei villi indotte dal virus e mediate principalmente dalla proteina NSP4, che agisce da enterotossina virale, e/o dalla sua azione sul SNE.

La proteina NSP4, infatti, sembra agire sull'epitelio delle cripte inducendo un aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nelle cellule delle cripte con conseguente attivazione della secrezione di Cl^- ed efflusso di acqua.

Un altro bersaglio dell'azione della proteina NSP4 sembra essere il SNE che fornisce una ricca innervazione immediatamente al di sotto dell'epitelio dei villi ed è quindi in grado di ricevere stimoli dall'epitelio danneggiato in corso di infezione da rotavirus. È stato dimostrato che la proteina NSP4 è rilasciata anche dal polo basale degli enterociti infettati [Ramig, 2004] (Figura 12 – C2). Tuttavia, non è chiaro se il SNE sia stimolato direttamente dalla proteina NSP4, da suoi peptidi derivati o da molecole rilasciate dagli enterociti infettati

(chemochine e prostaglandine). Fino ad oggi, molti meccanismi relativi al coinvolgimento del SNE nella diarrea secretoria da rotavirus rimangono sconosciuti similmente a quelli che determinano patogenicità e virulenza di questi virus.

L'infezione da rotavirus è stata considerata da sempre confinata ai due terzi superiori dei villi del piccolo intestino. Recentemente, molte osservazioni di manifestazioni non-gastroenteriche dell'infezione e studi condotti in modelli animali hanno suggerito la diffusione di rotavirus a siti extraintestinali. Antigeni (antigenemia) e RNA (viremia) di rotavirus sono stati rivelati nel siero di animali infettati sperimentalmente e di bambini affetti da diarrea come pure in molti tessuti extraintestinali, quali fegato, polmoni, milza, reni, linfonodi mesenterici, placche di Peyer e sistema nervoso centrale, tanto che alcuni autori riferiscono di infezione sistemica da rotavirus [Ramig, 2004; Blutt and Conner, 2007; Ramig, 2007; Candy, 2007]. In particolare il ritrovamento dell'acido nucleico virale nel liquido cerebrospinale di pazienti con convulsione [Kirton et al., 2005; Hongou et al., 1998; Lynch et al., 2001; Goldwater et al., 2001; Iturriza-Gómara et al., 2002b; Lynch et al., 2003] suggerisce fortemente l'infezione virale in questo sito. Wong [2001] ha osservato un'associazione statisticamente significativa ($P < 0,002$) tra encefalopatia e infezione da rotavirus rispetto a nessun agente eziologico rivelato e un maggiore rischio di encefalopatia in corso di infezione da rotavirus rispetto a quello in corso di gastroenterite batterica. In corso di infezione da rotavirus sono state osservate meningite, encefalite, convulsioni, shock emorragico ed encefalopatia [Iturriza-Gómara et al., 2002b]. Lo squilibrio elettrolitico secondario alla disidratazione o una inappropriata reidratazione potrebbero spiegare alcuni casi di complicanze neurologiche durante la gastroenterite da rotavirus. Tuttavia il ritrovamento del genoma virale nel liquor suggerisce un ruolo patogenetico di tale agente e supporta l'ipotesi che la replicazione di rotavirus possa avvenire a livello del sistema nervoso centrale (SNC) causando un danno diretto. E' stato dimostrato, infatti, che *in vitro* rotavirus può infettare le cellule della linea neuronale, sebbene per pochi passaggi [Ushijima et al., 1986]. Nonostante queste osservazioni, la patogenesi dell'encefalopatia associata a rotavirus rimane tuttora sconosciuta.

Virus infettante è stato rivelato nel fegato di topi sani [Uhnoo et al., 1990] e la replicazione di rotavirus è stata dimostrata nel fegato e nel rene di un bambino con immunodeficienza [Gilger et al., 1992]. Il segmento genomico 7, codificante per la proteina NSP3, è stato proposto come determinante genetico per la diffusione di rotavirus dall'intestino al fegato e ad altre sedi extraintestinali [Mossel and Ramig, 2002; Ramig, 2004]. I meccanismi del tropismo extraintestinale del virus rimangono ignoti. Uno studio di "follow-up" ha dimostrato che rotavirus può uscire dall'intestino attraverso la via linfatica, comparando nelle Placche di Peyer, nei linfonodi mesenterici dove sembra essere internalizzato da alcune cellule della linea linfocitaria o mieloide [Ramig, 2004] e, infine, nei tessuti periferici [Mossel and Ramig, 2003]. Questo studio ha pertanto suggerito che la diffusione extra-intestinale di rotavirus possa avvenire attraverso il sistema linfatico coinvolgendo il tessuto linfoide associato all'intestino e/o i linfonodi mesenterici. Inoltre, anche il segmento genomico 6, codificante la proteina VP6, sembra essere un determinante secondario per la diffusione del virus [Mossel and Ramig, 2003].

Antigenemia e viremia sono state ben documentate in modelli animali e in bambini con enterite da rotavirus [Ramig, 2004; Blutt and Conner, 2007]. La viremia potrebbe verosimilmente rappresentare un'altra via di diffusione di rotavirus dall'intestino ai siti extraintestinali. Molti aspetti legati alla diffusione extraintestinale di rotavirus rimangono da chiarire [Ramig, 2004]

È stato anche ipotizzato che rotavirus possa svolgere un ruolo nell'induzione di due patologie autoimmuni come il diabete di tipo I e la malattia celiachia [Gray et al., 2008].

Per quanto riguarda il diabete di tipo 1, un gruppo di ricercatori australiani ha riportato una analogia molecolare tra la proteina VP7 presente sulla superficie di rotavirus ed epitopi immunodominanti presenti su due autoanticorpi che rappresentano marcatori della distruzione delle cellule delle isole pancreatiche mediata dalle cellule T, denominati tirosin-fosfatasi IA-2 e GAD-65 [Honeyman et al., 1998; Honeyman et al., 2000]. Successivamente altri ricercatori australiani hanno trovato una associazione tra sieroconversione anti-rotavirus e aumento dei livelli anticorpali nei confronti di IA-2, insulina e GAD-65 in bambini a rischio di diabete che avevano seguito fin dalla nascita. Tuttavia uno studio finlandese non ha confermato questi ritrovamenti [Mäkelä et al., 2000; Blomqvist et al., 2002].

Analogamente, per quanto riguarda la malattia celiaca, ricercatori italiani [Zanoni et al., 2006] hanno riportato una analogia molecolare tra la proteina VP7 di rotavirus e l'autoantigene transglutaminasi tissutale. Anticorpi anti-transglutaminasi da sieri di pazienti con malattia celiaca acuta sono in grado di riconoscere la VP7 di rotavirus suggerendo un possibile coinvolgimento dell'infezione da rotavirus nella patogenesi della malattia attraverso un meccanismo di "mimica molecolare". In particolare lo studio italiano ha dimostrato omologia tra la proteina VP7 di rotavirus e un auto-antigene che viene riconosciuto dalle immunoglobuline sieriche IgA dei malati di celiachia in fase attiva, i quali non hanno eliminato il glutine dalla dieta. Queste IgA sono invece assenti nei pazienti affetti da malattia che seguono una dieta priva di glutine, nelle persone sane ed in persone affette da patologie autoimmuni diverse dalla celiachia, quali sclerosi multipla lupus eritematoso sistemico e morbo di Crohn. Lo studio ha inoltre rivelato che gli anticorpi anti-VP7 erano in grado di incrementare la permeabilità delle cellule epiteliali intestinali e di attivare i monociti, scatenando una risposta infiammatoria. Infine, sembra che un maggior fattore di rischio per la malattia celiaca autoimmune possano essere le infezioni multiple [Stene et al., 2006].

In generale le infezioni di rotavirus sono più frequenti nei bambini piccoli, ma si ritiene che infezioni ripetute, spesso asintomatiche, avvengono ad intervalli per tutta la vita [Bishop, 1996; Holmes et al., 1983]. La maggior parte delle infezioni sintomatiche avviene tra 3 mesi e 2 anni di età, con un picco di incidenza tra 6 e 18 mesi [Dennehy, 2008].

Nelle infezioni del neonato i sintomi sono relativamente modesti o addirittura assenti, osservando in questi un certo grado di immunità. Nei bambini invece di età compresa tra 6 e 18 mesi l'infezione solitamente si manifesta dopo un periodo di incubazione in media inferiore a 48 ore (1-2 giorni) [Franco et al., 2006] con una malattia severa caratterizzata da 4-7 giorni di febbre, vomito e diarrea acquosa non sanguinolenta [Kapikian et al., 2001; Gray et al., 2008]. La malattia, se non appropriatamente trattata, può portare rapidamente a

disidratazione ossia perdita di fluidi ed elettroliti con conseguenze talvolta fatali. Le infezioni successive da rotavirus sono clinicamente meno severe.

La malnutrizione è un fattore di rischio per una sintomatologia più grave. E' stato osservato che infezioni severe avvengono nei paesi in via di sviluppo ad una età leggermente inferiore (6-12 mesi) rispetto a quella in cui avvengono nei paesi industrializzati (12-18 mesi) [Bishop et al., 1986].

Gli adulti subiscono infezioni asintomatiche da rotavirus più frequentemente rispetto ai bambini. In complesso nei paesi sviluppati si stima che solo il 10% circa delle infezioni che colpiscono i bambini più grandi e gli adulti sono sintomatiche e richiedono il ricorso a cure mediche [Nakajima et al., 2001]. Tali infezioni, tuttavia, possono sfuggire all'attenzione dei pediatri e dei medici in genere, dal momento che non è pratica comune quella di considerare l'infezione da rotavirus nella diagnosi differenziale di enterite acuta nei bambini più grandi e negli adulti. Infatti è stato stimato che solo un caso su cinque si presenta dal medico curante, uno su sessantacinque necessita di cure mediche e conseguente ricovero e uno su duecentonovantatre rischia il decesso [Parashar et al., 2003; Parashar et al., 2006; Phan, et al., 2007]. Comunque, quando la sintomatologia si manifesta nell'adulto essa è caratterizzata più frequentemente da diarrea, febbre, cefalea e malessere, nausea o crampi addominali [Anderson and Weber, 2004]. Nonostante i sintomi più lievi, gli adulti eliminano comunque il virus con le feci e possono pertanto trasmettere l'infezione ai bambini suscettibili.

Malgrado la malattia da rotavirus sia solitamente auto-limitante, la combinazione di diarrea acquosa, vomito e febbre porta spesso, come già accennato, a disidratazione anche severa. La disidratazione è trattata mediante terapie reidratanti somministrate solitamente per via orale o, in casi molto gravi, per via endovenosa [Gray et al., 2008].

Dopo la risoluzione dei sintomi, rotavirus viene eliminato nelle feci per circa una settimana [Vesikari et al., 1981] anche se in soggetti immunocompromessi l'eliminazione può durare per alcuni mesi [Rayani et al., 2007].

Sebbene la severità della malattia sia variabile, le percentuali di prevalenza della gastroenterite da rotavirus nei bambini in paesi industrializzati e non sono simili, suggerendo che una miglior igiene e acqua più pulita non sono sufficienti per prevenire la trasmissione del virus e la malattia [Dennehy, 2008]. Pertanto, vaccini efficaci sono necessari con urgenza e specialmente nei paesi più poveri del mondo.

IMMUNITÀ

Nonostante le ricerche portate avanti negli ultimi 30 anni, le correlazioni della risposta immunitaria con la protezione dall'infezione da rotavirus e dalla malattia sono ancora poco note. Si ritiene che l'immunità protettiva contro l'infezione da rotavirus sia multifattoriale e dovuta all'azione combinata di anticorpi secretori e umorali e di immunità cellulo-mediata [Franco et al., 2006; Gray et al., 2008] (Figura 13). L'immunità anticorpale svolge un ruolo di primaria importanza nella protezione contro successive infezioni, mentre quella cellulo-mediata contribuisce a contenere l'infezione. Sembra che nell'immunità siano coinvolte principalmente IgG specifiche dirette contro le proteine strutturali VP4, VP6 e VP7 e IgA sieriche dirette contro la proteina strutturale VP6 come pure contro l'enterotossina NSP4 [Gray et al., 2008; Grimwood and Lambert, 2009]. In termini quantitativi, la risposta anticorpale più evidente è quella diretta contro la VP6 [Svensson et al., 1987]. Possibili correlazioni immunitarie della protezione nei confronti della malattia da rotavirus naturalmente acquisita includono anticorpi neutralizzanti contro le proteine VP7 e VP4 come pure alti livelli (media geometrica del titolo di anticorpi sierici anti-rotavirus >1/800) di anticorpi sierici IgA diretti per la maggior parte contro la VP6 [Gray et al., 2008].

La risposta anticorpale sierica appare in tempi relativamente rapidi ed è accompagnata dalla comparsa di IgA specifiche a livello di alcuni siti mucosali [Grimwood and Lambert, 2009]. L'immunità secretoria intestinale è probabilmente il meccanismo protettivo a lungo termine più importante contro l'infezione da rotavirus [Franco et al., 2006]. Esso è di per sé di breve durata. Tuttavia ripetute esposizioni al virus portano a livelli sostenuti di anticorpi mucosali e a protezione contro successive infezioni [Grimwood and Lambert, 2009]. Alti livelli sierici di IgA rotavirus-specifiche sembrano correlare meglio con la protezione dalla malattia severa e presumibilmente la produzione delle IgA sieriche riflette quella delle IgA intestinali [Franco et al., 2006; Grimwood and Lambert, 2009].

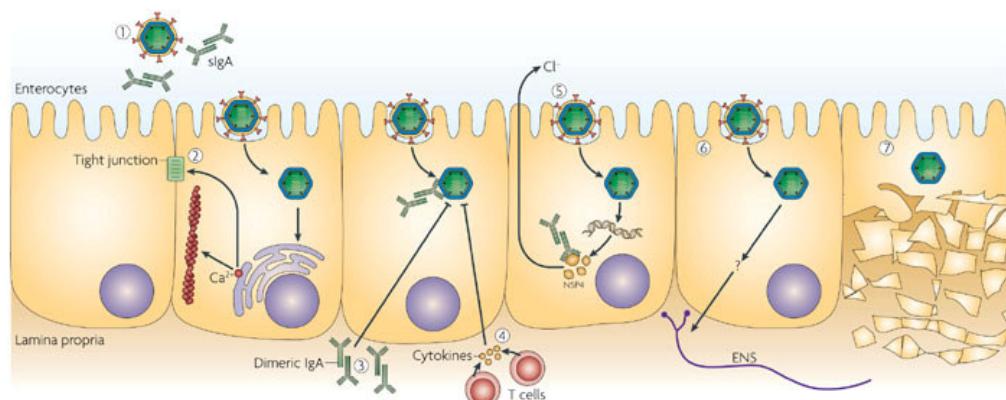


Figura 13. Meccanismo della patogenesi e dell'immunità nell'infezione da rotavirus. 1) Anticorpi neutralizzanti anti VP4 e/o VP7 possono prevenire il legame e la penetrazione della particella virale all'enterocita inducendo esclusione virale. Se tale meccanismo fallisce, come nella fase 2), la replicazione di rotavirus nell'enterocita causa alterazioni nel metabolismo delle proteine di membrana

inducendo malassorbimento o diarrea osmotica. Inoltre rotavirus induce aumento della concentrazione intracellulare di ione Ca^{2+} che causa distruzione del citoscheletro e delle giunzioni tra gli enterociti aumentando la permeabilità paracellulare. 3) La replicazione virale negli enterociti può essere inibita da IgA secretorie anti-VP6 durante la trans-citosi attraverso gli enterociti. 4) Anche cellule T secernenti citochine rotavirus-specifiche possono inibire la replicazione virale, e se questo processo non avviene, come mostrato al punto 5), rotavirus, producendo la proteina NSP4, induce diarrea secretoria. Rotavirus, verosimilmente attraverso l'azione di NSP4, può stimolare il sistema nervoso enterico (punto 6) inducendo diarrea secretoria e aumento della motilità intestinale. Infine, rotavirus induce lisi degli enterociti [da Angel et al., 2007, modificato].

Comunque, nessuna di queste risposte anticorpali, né da sola né in combinazione, è in grado di assicurare una completa protezione dalla malattia. La durata del livello protettivo degli anticorpi è limitata (meno di un anno) e ciò spiegherebbe le reinfezioni osservate anche da parte dello stesso sierotipo. La presenza di anticorpi specifici, se non sembra conferire immunità contro l'infezione da parte di altri ceppi, sembra ugualmente proteggere l'individuo dalla comparsa di sintomatologia grave [Gray et al., 2008].

La protezione immunitaria può essere omotipica o eterotipica. Nel caso dei rotavirus, la protezione omotipica previene l'infezione da parte di un virus dello stesso G tipo, mentre la protezione eterotipica protegge dall'infezione da parte di un virus di G tipo diverso. Dopo l'infezione primaria, la risposta anticorpale sierica neutralizzante nei confronti della VP7 è maggiormente omotipica, mentre la risposta nei confronti della VP4 è eterotipica [Grimwood and Lambert, 2009]. Comunque, dopo reinfezione si verifica un ampliamento delle risposte neutralizzanti nei confronti delle proteine VP7 di diversi G tipi (risposta eterotipica) senza ulteriori incrementi di reazione crociata verso le proteine VP4 [Franco et al., 2006]. In aggiunta, molti rotavirus di diverso G tipo esprimono proteine genotipicamente e sierologicamente identiche. Ciò accade a causa della relativa poca diversità tra i vari P tipi, sottogruppi e genogruppi NSP4 rispetto alla varietà di diversi G tipi circolanti nell'uomo [Gray et al., 2008; Grimwood and Lambert, 2009]. L'importanza relativa dell'immunità omotipica ed eterotipica nell'infezione da rotavirus rimane sconosciuta [Franco et al., 2006]. Sembra, tuttavia, che altre proteine virali, quali VP2, VP6 e NSP4 possano essere coinvolte nei meccanismi di protezione, spiegando parzialmente lo sviluppo in alcuni casi di immunità eterotipica in seguito ad una singola infezione. In particolare, il possibile meccanismo di espulsione di rotavirus è stato spiegato dalla capacità delle IgA polimeriche anti-VP6 di mediare un effetto antivirale legando la proteina VP6 ed "espellendola" nel lume intestinale [Franco et al., 2006]. Mentre le IgA anti-VP4 e/o -VP7 possono bloccare l'infezione degli enterociti direttamente quando presenti nel lume intestinale, gli anticorpi anti-NSP4 possono bloccare la diarrea mediante un effetto anti-enterotossina ma non possono bloccare l'infezione [Ball et al., 1996; Franco et al., 2006]. Sfortunatamente, infine, esiste una ridotta correlazione tra anticorpi sierici e protezione indotta dal vaccino, pertanto l'efficacia dei candidati vaccini deve essere verificata in estese sperimentazioni sul campo.

I linfociti T sembrano avere un ruolo importante nell'immunità anti-rotavirus come dimostrato nel topo: cellule T CD4+ sono essenziali per lo sviluppo di più del 90% delle IgA intestinali rotavirus-specifiche e pertanto la loro presenza sembra essere critica per lo stabilirsi

di una memoria immunitaria protettiva a lungo termine [Franco and Greenberg, 1999]. In aggiunta, nel topo linfociti T CD8+ rotavirus-specifici sono coinvolti nella risoluzione tempestiva dell'infezione primaria da rotavirus e possono mediare una protezione parziale a breve termine contro la reinfezione [Franco and Greenberg, 1999].

L'ubiquità dei rotavirus e la frequenza di infezioni asintomatiche è tale da rendere molto difficile distinguere se l'infezione e quindi la risposta immunitaria sia primaria, secondaria o susseguente. L'infezione naturale primaria da rotavirus avviene più frequentemente tra 9 e 24 mesi di età [Gray et al., 2008; Grimwood and Lambert, 2009] e la maggior parte dei bambini subisce almeno una infezione da rotavirus prima dell'età di 5 anni [Parashar et al., 2003]. Anche se ciascun individuo può subire infezione da rotavirus più volte nella vita, la prima infezione nell'infanzia è quella che con maggiore probabilità può causare diarrea e disidratazione severa [Dennehy, 2008], ma nello stesso tempo riduce la frequenza di infezioni successive e protegge dalla loro manifestazione in forma grave [Gray et al., 2008; Grimwood and Lambert, 2009]. La protezione immunitaria eterotipica aumenta dopo una seconda infezione, anche se causata dallo stesso sierotipo. Le infezioni asintomatiche conferiscono livelli di protezione comparabili a quelli da indotti dalle infezioni sintomatiche [Franco et al., 2006].

La maggior parte delle donne gravide possiede anticorpi anti-rotavirus che sono trasmessi al feto. Come conseguenza si verifica che la maggior parte dei neonati che si infetta sviluppa infezione asintomatica o una malattia lieve [Bishop et al., 1986; Dennehy, 2008]. Inoltre, IgA anti-rotavirus vengono emesse con il colostro. Neonati allattati al seno durante i primi giorni di vita sono significativamente meno suscettibili rispetto a quelli nutriti artificialmente. Nonostante il contenuto anticorpale nel latte in seguito decada rapidamente, l'infezione acquisita nei primi mesi di vita si risolve in modo inapparente. Inoltre sebbene l'infezione neonatale non determina protezione immunologica contro la reinfezione, questa tende ad essere clinicamente meno severa [White, 1986].

DINAMICA DELL'ESCREZIONE VIRALE E RISPOSTA ANTICORPALE

Nei pazienti con sistema immunitario normale l'infezione da rotavirus si manifesta quasi sempre in forma acuta con eliminazione nelle feci di particelle virali in alta concentrazione (più di 10^{11} particelle/grammo di feci) in genere per un periodo limitato di tempo (3-7 giorni).

Nei bambini invece con immunodeficienza primaria di diversa origine è stata osservata più frequentemente diarrea cronica con prolungata eliminazione virale. Dal momento che è improbabile, anche se non impossibile, ritrovare adulti privi di anticorpi sierici anti-rotavirus umani, di solito i neonati presentano alla nascita IgG sieriche trasmesse dalla mamma per via transplacentare agli stessi titoli di quelle materne. A causa della presenza di tali anticorpi è difficile dimostrare una sierconversione (comparsa di anticorpi sierici specifici in un soggetto precedentemente negativo) nei bambini che si infettano durante i primi tre mesi di vita. Inoltre questi bambini non producono neppure anticorpi sierici persistenti.

Nei bambini invece con più di tre mesi di età l'infezione da rotavirus, di solito sintomatica, è seguita da una sierconversione con livelli di IgG che permangono per oltre un anno. Le IgM sono riscontrabili nel siero nella fase acuta da 5 giorni fino a 1-2 settimane dopo l'infezione. Le IgA si innalzano fino a 2-4 settimane dopo l'infezione e permangono svelabili per circa 4 mesi, mai comunque più di 12 mesi [Davidson et al., 1983; Grauballe et al., 1981; Grimwood, 1986]

IgM e IgA anti-rotavirus sono state ritrovate anche nel liquido duodenale e nelle feci. In particolare nelle secrezioni duodenali le IgM sono rivelabili durante la fase acuta dell'infezione, mentre le IgA raggiungono i loro massimi valori 3-4 settimane dopo l'infezione e rimangono evidenziabili per circa quattro mesi [Grimwood, 1986].

La risposta dei coproanticorpi è simile ma di più breve durata. IgA sono riscontrabili nelle feci circa 4 giorni dopo l'infezione, si innalzano al decimo giorno e di solito non sono più rivelabili dopo 6 settimane. La loro persistenza è indice di successive infezioni sia sintomatiche che subcliniche [Grimwood, 1986].

I VACCINI

Vaccini orali per la prevenzione dell'enterite da rotavirus costituiti da ceppi "vivi-attenuati" si propongono di duplicare la protezione che segue l'infezione naturale da rotavirus prevenendo la gastroenterite severa che può determinare da una semplice visita medica al decesso. Acquisire rapidamente la protezione immunitaria durante i primi due anni di vita è particolarmente importante dal momento che questa è l'età in cui l'infezione da rotavirus può essere particolarmente severa. Sebbene le due proteine del capsido esterno, VP4 e VP7 siano quelle maggiormente considerate nello sviluppo di vaccini, le incertezze relative al loro ruolo nei meccanismi di protezione immunitaria hanno dato luogo a due diverse strategie vaccinali.

La prima strategia sfrutta ceppi di rotavirus animali naturalmente attenuati per il loro utilizzo nell'uomo (approccio Jenneriano) e si basa sul concetto di immunità omotipica per raggiungere alti livelli di protezione. Questo approccio ha portato allo sviluppo di vaccini contenenti molteplici ceppi virali. La seconda strategia si basa invece su un singolo ceppo di rotavirus di un singolo sierotipo attenuato in grado di indurre protezione immunitaria nei confronti dei più rilevanti sierotipi di rotavirus (immunità eterotipica). Questo approccio ha portato allo sviluppo di vaccini costituiti da un singolo ceppo virale. Quale tra queste strategie sia la migliore ancora non è chiaro.

Il primo vaccino per la prevenzione dell'enterite da rotavirus è stato messo a punto nel 1983 da Vesikari e collaboratori [1984]. Si trattava di un vaccino ad uso orale derivato dal ceppo RIT4237, G6P[1] di rotavirus bovino. Il vaccino RIT non ha dato risultati efficaci quando è stato provato nei paesi in via di sviluppo e venne pertanto abbandonato.

Circa quindici anni dopo, presso il National Institutes of Health, Kapikian [1993] sviluppò un nuovo vaccino derivato da riassortimento tra un ceppo di rotavirus di scimmia e ceppi umani e denominato "Rotashield" (Wyeth-Lederle, Pearl River, NY, USA) [Center for Diseases Control e Prevention, 1999]. "Rotashield" (rhesus rotavirus tetravalent vaccine, RRV-TV) era un vaccino riassortante uomo-scimmia, tetravalente, contenente 3 geni VP7 umani di tipo G1, G2, e G4 unitamente al corredo genetico di un ceppo di scimmia rhesus di tipo G3, al fine di indurre la produzione di anticorpi neutralizzanti diretti nei confronti dei quattro sierotipi VP7 più comuni nell'uomo [Kapikian, 1993].

Tale vaccino permise di migliorare l'efficacia rispetto ai vaccini monovalenti grazie all'utilizzo di un ceppo riassortante che, da un lato, possedeva la proprietà di attenuazione per l'uomo avendo un corredo genetico animale e, dall'altro, quella derivante dalla presenza di diversi geni codificanti per le proteine del capsido esterno dei ceppi umani più diffusi. "Rotashield" fu sperimentato in tre zone diverse USA, Finlandia e Venezuela portando a risultati soddisfacenti [Perez-Schael et al., 1997; Bernstein et al., 1995; Rennels et al., 1996]. Nel 1998 venne autorizzato dalla US Food and Drug Administration e subito inserito tra le vaccinazioni di routine in tutti i bambini americani e somministrato a più di 600.000 bambini nei primi nove mesi dall'immissione in commercio [Peter et al., 2002; Smith et al., 2003]. Tuttavia in luglio 1999 fu dimostrata una complicazione inaspettata costituita dalla comparsa, a due settimane dalla somministrazione della prima dose, di intussuscezione [Center for

Disease Control, 1999], ossia una invaginazione di un tratto dell'intestino all'interno di un altro tratto intestinale che ne provoca l'ostruzione. Tale condizione può progredire fino alla necrosi di un segmento dell'intestino [Anonymous, 2003; King, 2001]. Questa complicazione determinò l'immediato ritiro dal commercio del vaccino tetravalente e un lungo periodo di rivalutazione del rischio.

Attualmente, a quasi 10 anni dal ritiro di Rotashield, due nuovi vaccini orali sono stati approvati in Europa, Stati Uniti e in molte altre nazioni. Non è possibile fare un confronto diretto tra i due vaccini dal momento che i relativi studi di fase III sono stati condotti in paesi e su popolazioni diverse, utilizzando differenti definizioni di caso e sistemi di valutazione della severità clinica della gastroenterite come pure metodologie diverse per la rivelazione dei ceppi di rotavirus circolanti [Grimwood and Lambert, 2009].

Un vaccino monovalente (Rotarix™, GlaxoSmithKline Biologicals, Belgio), costituito da un ceppo di rotavirus di gruppo A umano vivo attenuato di genotipo G1P[8] è già stato introdotto in molti paesi, inclusa l'Italia a partire dal 1 novembre 2006, ed uno pentavalente (RotaTeq, Merck vaccines, Whitehouse station, Nj, USA), costituito da un ceppo riassortante umano-bovino di specificità G1, G2, G3, G4 e P[8], è in fase di approvazione (Figura 14).

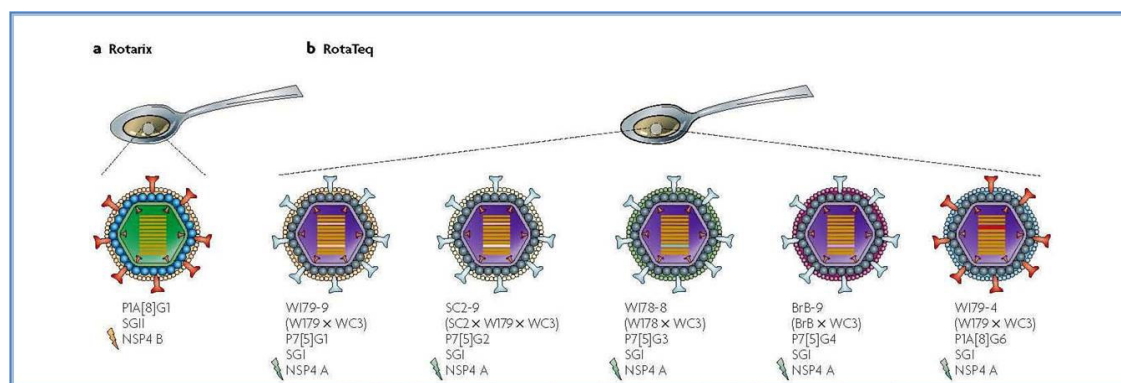


Figura 14. (a) Rotarix, un vaccino attenuato costituito da un ceppo di rotavirus umano G1P1A[8] adattato in coltura con VP6 sottogruppo II e NSP4 di genogruppo B. (b) RotaTeq, un vaccino riassortante bovino (WC3)-umano costituito dai 5 ceppi mostrati in figura, ciascuno contenente un gene di rotavirus umano codificante per la proteina neutralizzante VP7 di diverso sierotipo. Sebbene le proteine VP6 e NSP4 possano potenzialmente essere bersaglio di anticorpi protettivi, il loro ruolo nei meccanismi immunitari contro la malattia nell'uomo è sconosciuto [da Angel et al., 2007, modificata].

Il vaccino monovalente Rotarix deriva dal ceppo 89-12 isolato da un paziente a Cincinnati, Ohio, da Bernstein e collaboratori [1999], rappresentativo del sierotipo G1P[8] maggiormente diffuso nel mondo e quindi si basa sulla strategia di induzione di immunità di tipo eterologo. Rotarix è un vaccino cosiddetto “vivo-attenuato”. In particolare, il ceppo

selvaggio umano 89-12 è stato attenuato attraverso 43 passaggi in cellule Vero, clonato e nuovamente coltivato in cellule Vero e rinominato RIX 4414.

La valutazione del vaccino condotta dapprima in Finlandia, poi in Asia e America Latina ha dimostrato l'efficacia del vaccino e che il ceppo vaccinale RIX4414 era clinicamente attenuato rispetto al ceppo d'origine 89-12 [Linhares et al., 2005; Salinas et al., 2005; Ruiz-Palacios et al., 2006; Grimwood and Lambert, 2009]. In una estesa sperimentazione condotta in paesi europei industrializzati il vaccino si è dimostrato efficace nel 79% dei casi nel prevenire la gastroenterite da rotavirus e nel 90% nel prevenire la forma severa [Vesikari et al., 2006a; Grimwood and Lambert, 2009]. Inoltre in Europa è stata osservata una protezione efficace nei confronti di ceppi G9 (85%) [Linhares et al., 2005; Salinas et al., 2005; Grimwood and Lambert, 2009]. Nella sperimentazione europea, l'efficacia di Rotarix variava dal 85% per i ceppi G9P[8] al 96% per i ceppi G1P[8] nel prevenire la malattia causata dai sierotipi maggiormente diffusi.

Al contrario Rotarix si è dimostrato meno efficace contro i ceppi di tipo G2P[4] [Dennehy 2008]. L'immunità protettiva nei confronti di questi ceppi, infatti, può dipendere dalla reazione crociata con gli epitopi mostrati dalla VP4 e dalle proteine non-VP4/VP7, quali VP2, VP6 e NSP4 [Grimwood and Lambert, 2009]. Nei confronti del genotipo G2P[4], infatti, l'efficacia di questo vaccino è stata del 39% in una sperimentazione in America Latina [Ruiz-Palacios et al., 2006] e dell'86% in una in Europa [Vesikari et al., 2006a]. In accordo con queste osservazioni è verosimile che la locazione geografica delle sperimentazioni potrebbe essere un fattore importante per la prestazione del vaccino [Grimwood and Lambert, 2009].

Nonostante durante lo studio di sorveglianza si siano osservati alcuni casi di intussuscezione, non è stata dimostrata alcuna correlazione di questi casi con la vaccinazione [Ruiz-Palacios et al., 2006]. Fino a luglio 2008 Rotarix è stato approvato e introdotto in più di 100 paesi inclusa l'Italia. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha raccomandato che l'efficacia del vaccino sia dimostrata nei paesi più poveri di Africa e Asia prima di raccomandare la vaccinazione a livello mondiale. Questi studi sono tutt'ora in corso.

Come già accennato prima, un secondo candidato nella prevenzione dell'enterite da rotavirus è rappresentato da "RotaTeq", un vaccino pentavalente costituito da 5 ceppi riassortanti uomo-bovino di rotavirus, ognuno dei quali deriva da un ceppo bovino WC3 (G6P[5]) naturalmente attenuato per l'uomo isolato da un vitello in Pennsylvania. Ciascun riassorbante è stato ottenuto attraverso passaggi in cellule Vero. Ciascun dei cinque ceppi è costituito da 10 geni derivanti dal ceppo bovino WC3 e un gene VP7 derivante da ceppi umani di specificità G1, G2, G3, G4 o un gene VP4 umano di specificità P[8], rispettivamente [Vesikari et al., 2006b; Vesikari et al., 2006c; Grimwood and Lambert, 2009]. La formulazione pentavalente del vaccino è stata studiata allo scopo di fornire una più ampia protezione immunitaria dal momento che contiene le più comuni specificità umane circolanti, quali G1, G2, G3, G4 e P[8]. In sperimentazioni condotte in Europa e Stati Uniti, anche questo vaccino si è dimostrato ampiamente efficace (74%) nel prevenire la gastroenterite da rotavirus in genere e ancor di più (98%) nel prevenire gastroenterite severa [Grimwood and

Lambert, 2009]. RotaTeq, inoltre, si è dimostrato efficace nell'86% nel prevenire le visite mediche, nel 93% le visite ospedaliere e nel 96% i ricoveri [Dennehy, 2008].

Durante la sperimentazione condotta in Europa e Stati Uniti, RotaTeq ha fornito protezione nel 88%-95% dei casi nei confronti della malattia causata dai ceppi di rotavirus comunemente circolanti inclusi ceppi G9P[8] emergenti a livello mondiale (100%). Tuttavia le percentuali di protezione relative in particolare ai ceppi G2P[4] sono da ritenere meno precise a causa del piccolo numero di casi [Grimwood and Lambert, 2009].

Sebbene entrambi i vaccini “pretendano” di indurre un ampio spettro di immunità nei confronti di sierotipi eterologhi di rotavirus [Berstein 2006; Vesikari et al., 2006c; Tcheremenskaia et al., 2007] una conoscenza sulle variazioni dei ceppi predominanti e sull'eventuale emergenza di nuove combinazioni di genotipi è essenziale per stabilire la conformità della formulazione vaccinica e l'eventuale necessità di aggiornarla [Tcheremenskaia et al., 2007].

Come già accennato, Rotarix si basa sul concetto che l'infezione con un sierotipo di rotavirus sia in grado di indurre protezione eterotipica come risultato di un meccanismo di reazione crociata tra antigeni di diversi sierotipi, mentre RotaTeq si basa sul concetto di immunità omotipica e, in teoria, potrebbe contenere gli antigeni dei più comuni ceppi di rotavirus per raggiungere una protezione ottimale. Infatti, uno dei principali obiettivi del vaccino RotaTeq potrebbe essere quello di fornire una protezione efficace contro i più comuni sierotipi sia a livello globale, come G9, sia a livello territoriale, come G5 e G8 ampiamente circolanti soprattutto in India e Africa ma non inclusi nel vaccino. Sebbene col vaccino pentavalente RotaTeq si possa sperare di provvedere alla protezione nei confronti di ceppi che condividono la specificità P con quella del vaccino, quali G5P[8] e G9P[8], tale vaccino potrebbe essere poco o per niente efficace nei confronti di altri ceppi che non hanno lo stesso P tipo, quali G9P[6] e G8P[6]. Dall'altra parte anche il vaccino Rotarix potrebbe risultare efficace nei confronti di ceppi di diversi sierotipi ma dotati di molti antigeni “cross-reattivi” (ad esempio ceppi dello stesso genogruppo Wa G9P[8] e G3P[8]), ma molto meno efficace nei confronti di ceppi quali G2P[4] e G9P[6] con e-tipo corto, che presentano specificità eterologhe, appartengono al genogruppo DS-1 diverso da quello del ceppo vaccinale e hanno pochi antigeni “cross-reattivi”. Questi aspetti sono verosimilmente importanti per determinare quale dei due vaccini potrebbe fornire una maggiore immunità e protezione nei confronti dei diversi ceppi di rotavirus [Cunliffe et al., 2002].

In aggiunta ai due vaccini finora descritti, altri vaccini anti-rotavirus, per la maggior parte costituiti da ceppi riassortanti uomo-animale, sono in fase di sviluppo. Oltre a questi, sono in fase di studio anche altri approcci tra i quali antigeni di rotavirus da somministrare per via parenterale, come ad esempio particelle virus-simili preparate in baculovirus, antigeni espressi, vaccini a DNA e virus uccisi [Glass et al., 2006]. Ciascun approccio ha dimostrato efficacia negli animali ma nessuno è stato ancora avviato verso la sperimentazione clinica.

DIAGNOSI DI LABORATORIO

La diagnosi di laboratorio dell'infezione da rotavirus è condotta, al pari di quelle relative agli altri agenti responsabili di enterite, attraverso procedimenti che mirano alla dimostrazione nelle feci dell'agente virale o di antigeni o di acidi nucleici piuttosto che alla dimostrazione nell'organismo infettato di una reazione anticorpale specifica recente.

Tra i procedimenti del primo tipo, la microscopia elettronica (M.E.), impiegata fin dal 1973 per rilevare particelle virali nelle feci [Lecce et al., 1976], è ancora oggi utilizzata per la diagnosi rapida. I rotavirus si possono presentare isolati, a piccoli gruppi o, soprattutto se le feci sono state raccolte nella fase acuta della malattia, in grande quantità.

Nei casi in cui può risultare difficile l'identificazione dell'agente virale o qualora si intenda ricercare specificatamente rotavirus di un particolare gruppo o sierotipo, è possibile ricorrere alla immunoelettromicroscopia (IEM) [Zissis et al., 1978], che, attraverso l'impiego di anticorpi gruppo e/o sierotipo specifici, consente di osservare le particelle riunite in aggregati.

Alternativi in certi casi all'indagine elettromicroscopica possono essere impiegati saggi immunoenzimatici (ELISA) e di agglutinazione al lattice, oggi disponibili anche in forma commerciale. Questi saggi consentono di rivelare antigeni virali direttamente nelle feci mediante l'utilizzo di antisieri iperimmuni, anticorpi mono e/o policlonali [Yolken et al., 1994], in genere rotavirus-gruppo A specifici. Questi saggi offrono sufficiente sensibilità, specialmente in condizione di alta prevalenza di infezione.

Nonostante l'elevato numero di particelle virali che si possono riscontrare nelle feci di soggetti con enterite acuta, in genere rotavirus umani non sono coltivabili *in vitro* nelle colture cellulari convenzionali. E' stato dimostrato che la centrifugazione a basso numero di giri direttamente sul monostrato cellulare dell'estratto fecale e/o il trattamento di quest'ultimo con enzimi proteolitici, quali tripsina o pancreatina, possono aumentare l'infettività di rotavirus *in vitro* [Wyatt et al., 1983].

Nelle colture cellulari in genere i rotavirus vanno incontro ad un ciclo replicativo incompleto, non produttivo, arrestando l'infezione ad uno stadio precoce. Ciò non impedisce, tuttavia, che vengano espressi antigeni virali [Bryden et al., 1977], i quali possono essere evidenziati mediante anticorpi specifici attraverso immunofluorescenza (IF) [Medici et al., 1988].

Per la diagnosi di infezione da rotavirus possono essere utilizzati anche metodi di biologia molecolare in grado di rivelare l'acido nucleico virale direttamente nelle feci. Cronologicamente il primo di questi metodi è rappresentato dall'elettroforesi in gel di poliacrilamide (PAGE) degli RNA genomici estratti dalle feci.

Attraverso la migrazione elettroforetica degli 11 segmenti genomici di rotavirus, il metodo consente, da un lato, di identificare l'agente virale, e, in genere, il gruppo di appartenenza, e, dall'altro, di rivelare l'elettroferotipo caratteristico di ogni ceppo.

L'analisi degli elettroferotipi può essere utile per la sorveglianza della circolazione di ceppi di rotavirus in aree geografiche ristrette come pure per l'individuazione di ceppi virali con profili atipici di RNA genomici e di infezioni miste con ceppi di rotavirus diversi.

Successivamente, utilizzando sonde a RNA o DNA marcate con radioisotopi o biotina, sono stati sviluppati saggi di "dot-blot" che si basano sull'ibridazione *in situ* di RNA di rotavirus estratti da campioni di feci, denaturati al calore e immobilizzati su membrana di nitrocellulosa [Holmes, 1983; Dimitrov et al., 1985]. Il metodo si è dimostrato specifico e sensibile.

Infine, per la diagnosi diretta di laboratorio dell'infezione da rotavirus può essere impiegata l'amplificazione genica mediante reazione polimerasica a catena previa retrotrascrizione (RT-PCR) che consente di rivelare l'acido nucleico virale presente anche in scarse quantità nelle feci. Utilizzando "primers" specifici, il metodo offre la possibilità di identificare anche il gruppo e il genotipo virale come pure di ottenere quantità di DNA complementare (cDNA) sufficiente per studi di sequenziamento e clonaggio. L'RT-PCR è stata utilizzata per la prima volta nello studio molecolare di rotavirus per amplificare la sequenza del gene 6 di rotavirus di gruppo A [Patric et al., 2003]. Metodi di RT-PCR sono maggiormente utilizzati per la genotipizzazione dei geni VP4 e VP7, utilizzando "set" di primer specifici per i diversi G e P tipi maggiormente rivelati nell'uomo. Lo svantaggio è legato all'elevata variabilità genetica dei rotavirus, dal momento che l'accumularsi di mutazioni puntiformi ("drift genetico") nei siti di attacco dei primers può portare al mancato riconoscimento del cDNA bersaglio da parte dei primer stessi [Iturriza-Gómara et al., 2004a].

Per la diagnosi di infezione da rotavirus e la genotipizzazione di rotavirus di gruppo A recentemente sono stati sviluppati saggi di biologia molecolare avanzata. Tra questi, un saggio di DNA microarray in grado di identificare i G e P tipi più frequenti [Honma et al., 2007] e saggi di PCR in tempo reale [Min et al., 2006; Gutiérrez-Aguirre et al., 2008].

Per dimostrare, invece, in un soggetto una risposta anticorpale conseguente l'infezione da rotavirus e/o valutarne l'entità, possono essere impiegati diversi metodi, quali l'IEM, la reazione di fissazione del complemento (RFC), l'IF, il saggio immunoenzimatico e l'inibizione dell'emoagglutinazione [Kapikian, 1997; Shaw et al., 1992].

L'RFC prevede l'impiego come antigene di estratto fecale umano purificato e concentrato o di virus animali cresciuti efficacemente *in vitro* [Zissis et al., 1978]. L'indagine viene condotta su due campioni di siero prelevati uno in fase acuta di malattia e l'altro in fase di convalescenza. Viene considerato significativo ai fini diagnostici un aumento del titolo anticorpale di almeno quattro volte tra il primo e il secondo campione.

L'RFC si è rivelata efficace ai fini diagnostici nei bambini tra 6 e 24 mesi di età e non negli adulti e nei bambini di età inferiore a 6 mesi [Kapikian, 1997]. Per la ricerca di anticorpi in questi gruppi di età è preferibile l'impiego dell'IF o del saggio immunoenzimatico mediante i quali è possibile rivelare anticorpi delle classi G, M ed A. Le IgA in particolare possono essere ricercate, oltre che nel siero, nella saliva, nelle secrezioni duodenali e nelle feci.

SCOPO DELLA RICERCA

La diarrea è la seconda maggior causa di morbilità e mortalità infantile in tutto il mondo e ogni anno almeno 2 milioni di bambini al di sotto dei 5 anni di età muoiono in conseguenza di gastroenterite severa [Rudan et al., 2007]. I rotavirus sono la causa più importante di gastroenterite e di decessi ad essa correlati in questa fascia d'età, specialmente nei paesi in via di sviluppo [Kapikian et al. 2001]. Nei paesi industrializzati dove la mortalità è bassa e la morbilità è molto elevata, l'impatto dell'infezione da rotavirus sulla salute pubblica si ripercuote sui costi per ricoveri ospedalieri, visite ambulatoriali, cure sanitarie e giorni di lavoro persi dai genitori per l'assistenza ai figli. Si stima che in Europa su 23.600.000 bambini al di sotto dei 5 anni si verificano ogni anno 3.600.000 episodi di gastroenterite da rotavirus che causa 231 decessi, più di 87.000 ricoveri e quasi 700.000 visite ambulatoriali [Soriano-Gabarró et al. 2006]. In Italia è possibile valutare l'impatto di questa malattia nella stessa popolazione ogni anno in più di 80.000 visite mediche, 10.000 ricoveri e 11 decessi [Soriano-Gabarró et al. 2006]. In Emilia Romagna si calcola che l'impatto economico della gastroenterite da rotavirus sia pari a 400.000-700.000 Euro annui [Gabutti et al. 2007].

Numerosi aspetti intervengono sulla diffusione e sui possibili veicoli di trasmissione dei rotavirus. Quelli più rilevanti sono l'elevata infettività, l'elevato numero di particelle eliminate con le feci (10^{11} particelle virali per grammo di feci [Koopmans, 2004]) e la loro prolungata eliminazione (fino a 2 settimane dalla risoluzione della malattia [Pickering, 1988]), l'elevata frequenza di infezioni asintomatiche (il 50% delle infezioni da rotavirus nei primi due anni di vita è asintomatica [Wilhelmi, 2003]), la stabilità del virione nell'ambiente e la relativa resistenza a pH acido e in genere ai normali disinfettanti.

Un ulteriore aspetto di particolare rilevanza è l'elevata variabilità genetica dei rotavirus [Gentsch et al. 2005]. Infatti, l'accumularsi di mutazioni puntiformi nel genoma virale (drift) porta ad una diversificazione genetica graduale ma di entità notevole. Inoltre, la natura segmentata del loro genoma favorisce il riassortimento genico tra virus diversi in caso di co-infezione, un meccanismo che contribuisce a creare una estrema variabilità dei ceppi e guida l'evoluzione dei rotavirus. Tale fenomeno è molto più frequente tra virus di uno stesso genogruppo, mentre è più raro tra virus di genogruppi diversi. Come conseguenza, è possibile che varianti più resistenti riescano ad emergere e a diffondere rapidamente in una popolazione priva di anticorpi.

I rotavirus sono largamente diffusi in natura e in grado di infettare sia l'uomo sia numerose specie animali, in particolare gli animali da allevamento.

L'infezione da rotavirus si realizza principalmente attraverso il circuito fecale-orale veicolata soprattutto dal contatto con oggetti e superfici contaminate [Kapikian et al. 2001]. Inoltre esistono alcune evidenze che depongono per una trasmissione anche attraverso la via respiratoria che faciliterebbe ulteriormente la diffusione del virus. Queste caratteristiche, unitamente alla mancanza di un'immunità permanente nel soggetto infettato, rendono difficile il controllo dell'infezione ed eleggono rotavirus come causa frequente in particolare di

infezione nosocomiale nell'infanzia. In Italia si stimano infatti fino a 28 infezioni nosocomiali da rotavirus ogni 100 ricoveri [Gianino et al., 2002].

Occasionalmente la trasmissione di rotavirus può essere veicolata da acqua e alimenti contaminati [Hansman et al., 2008; Le Guyader et al., 2000]. Il ruolo degli alimenti è stato riportato in un numero limitato di epidemie, in cui sono stati identificati quali veicoli di infezione i vegetali irrigati con acqua contaminata; tuttavia, la sua rilevanza nell'epidemiologia di tali virus è sospettata e fortemente sostenuta [Gallimore et al., 2005; van Zyl et al., 2006]. Infine è ormai ampiamente documentata anche la trasmissione zoonosica dei rotavirus. Sierotipi di origine animale sono stati identificati in casi di diarrea infantile in molti paesi e sembra che come serbatoi siano coinvolti bovini, suini come pure animali domestici e da compagnia [De Grazia et al. 2007; Martella et al., 2008; Tsugawa and Hoshino, 2008].

In assenza di trattamenti farmacologici specifici, la prevenzione della morbilità e mortalità dovuta alla diarrea da rotavirus attraverso l'introduzione della vaccinazione è uno degli obiettivi prioritari dell'Organizzazione Mondiale della Sanità. La vaccinazione avrà un impatto diverso nei paesi industrializzati e in quelli in via di sviluppo, riducendo la morbilità e i costi sanitari nei primi e i casi di morte dovuti a diarrea nei secondi.

Un vaccino monovalente (RotarixTM, GlaxoSmithKline Biologicals, Belgio), costituito da un ceppo di rotavirus di gruppo A umano vivo attenuato di genotipo G1P[8], è già stato introdotto in Europa, e in particolare dal 1° novembre 2006 in Italia, ed uno pentavalente (RotaTeq, Merk Vaccines, Whitehouse Station, NJ, USA), costituito da un ceppo riassortante umano-bovino di specificità G1, G2, G3, G4 e P[8] è in fase di approvazione. Il successo di qualsiasi programma di vaccinazione può dipendere dalla diversità dei ceppi virali circolanti e dalla natura dinamica di questa diversità. La sorveglianza epidemiologica molecolare dei genotipi virali circolanti nei diversi paesi diventa pertanto essenziale al fine di monitorare l'eventuale emergenza di genotipi nuovi o rari e di rivelare, attraverso lo studio delle dinamiche evolutive del genoma di rotavirus, i possibili meccanismi di distribuzione geografica e temporale e di selezione dei ceppi virali contribuendo a garantire l'efficacia del vaccino con una formulazione adeguata per le diverse regioni del mondo.

Lo scopo di questo progetto di ricerca, inserito nell'ambito di un progetto finalizzato condotto in collaborazione con l'Università degli Studi di Bari e di un progetto ministeriale coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità, è stato quello di affrontare uno studio molecolare dei ceppi di rotavirus circolanti nell'area di Parma in periodi temporalmente distanti al fine di elaborare un quadro epidemiologico molecolare utile ai fini diagnostici e vaccinali e di approfondire i meccanismi evolutivi e il potere patogeno di questo genere di virus.

MATERIALI E METODI

Campioni, pazienti e articolazione dello studio

Grazie alla collezione di campioni di feci risultati contenere rotavirus e conservati congelati in forma di sospensione presso l'unità operativa di Virologia del dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio dell'Azienda ospedaliero-universitaria di Parma, lo studio si è rivolto alla caratterizzazione molecolare dei ceppi rivelati 1987-1990 e in periodi più recenti 2004-2005 e gennaio-marzo 2008.

Tutti i campioni di feci sono stati preparati in forma di sospensione al 10% in tampone salino fosfato (PBS, pH 7,2), parzialmente purificata mediante due centrifugazioni differenziali a 4000 rpm per 15 min a 4°C in centrifuga Beckman J6MC con rotore TYJS 5200 rpm (Beckman Coulter, USA) e conservati congelati a -20°C fino al momento dell'estrazione degli RNA genomici per la genotipizzazione e/o la determinazione dell'elettroferotipo (e-tipo). Inoltre, per migliorare il grado di purificazione, i campioni relativi al periodo gennaio-marzo 2008 sono stati sottoposti a ulteriore centrifugazione a 9000 rpm per 30 min a 4°C in centrifuga Beckman L7-55 con rotore SW41 (Beckman Coulter).

Periodo 1987-1990

Relativamente al periodo 1987-1990 sono stati sottoposti a caratterizzazione genomica, in parte presso il Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Bari, 74 ceppi di rotavirus selezionati nell'ambito di 216 rivelati mediante microscopia elettronica (ME) e identificati mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide (PAGE) degli RNA genomici nell'ambito delle indagini virologiche condotte sulle feci appartenenti a 1284 pazienti pediatrici affetti da gastroenterite ricoverati od osservati ambulatorialmente presso l'Azienda ospedaliero-universitaria di Parma. Il criterio di selezione è stata la disponibilità di sospensione fecale al 10% in PBS, conservata congelata a -20 °C presso l'unità operativa di Virologia del dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio della stessa Azienda ospedaliero-universitaria di Parma.

I 74 ceppi sono stati sottoposti a tipizzazione dei geni VP4 (P tipo) e VP7 (G tipo). I ceppi di rotavirus di gruppo A con associazioni geniche atipiche tra elettroferotipo (e-tipo) G e/o P tipo sono stati ulteriormente caratterizzati attraverso determinazione del sottogruppo (SG) del gene VP6 e del genogruppo del gene NSP4.

Parallelamente dei ceppi atipici, di cui era disponibile il materiale, sono stati sottoposti a purificazione e successivo sequenziamento i prodotti di amplificazione dei geni VP4 e/o VP7 unitamente a ceppi dotati di associazioni geniche tipiche e con e-tipo lungo o corto, circolanti nella stessa area nello stesso periodo. Le sequenze sono state allineate e confrontate con sequenze di rotavirus G1 e P[8] sia di ceppi di riferimento che di ceppi rivelati in Sicilia dal 1986 al 2004 [Arista et al., 2006], disponibili in GenBank.

Periodo 2004-2005

Relativamente al periodo 2004-2005 sono stati inclusi nello studio, in quanto positivi alla ME per particelle rotavirus-simili, 274 campioni costituiti da 273 feci selezionate nell'ambito di quelle sottoposte ad indagini virologiche a scopo diagnostico e appartenenti a bambini ricoverati presso l'Azienda ospedaliero-universitaria di Parma e un contenuto dello svuotamento intestinale, prelevato in corso di autopsia da un bambino giunto in Ospedale in arresto cardio-circolatorio in seguito ad enterite. L'età mediana dei 273 bambini positivi per particelle rotavirus-simili alla ME era 1 anno e 8 mesi (intervallo 1 mese - 10 anni e 4 mesi).

Per l'identificazione delle particelle rotavirus-simili osservate alla ME tutti i campioni, sotto forma di sospensione al 10% in PBS, erano stati sottoposti a scopo diagnostico presso l'unità operativa di Virologia, a saggio di agglutinazione al lattice (Orion Diagnostica, Finlandia) e di questi, 270, per disponibilità di materiale, sono stati sottoposti a PAGE degli RNA genomici. Gli e-tipi ottenuti sono stati classificati secondo Lourenco et al., 1981 [Lourenco et al., 1981]. Infine, tutti i ceppi di rotavirus di gruppo A sono stati sottoposti a tipizzazione dei geni VP4 e VP7.

Tra i 274 campioni inclusi nello studio, un campione di feci e il contenuto dello svuotamento intestinale appartenevano a due bambini deceduti in seguito a gastroenterite da rotavirus. Gli acidi nucleici estratti dai due campioni come pure quelli estratti da un campione di sangue periferico e da materiali di natura diversa ottenuti mediante autopsia (cuore, fegato intestino, milza, polmone, pancreas, stomaco, corteccia cerebrale, dura madre, cervelletto e tronco dell'encefalo) dal bambino giunto in ospedale in arresto cardio-circolatorio e fissati inclusi in paraffina e da un campione di siero prelevato dal secondo bambino durante il ricovero sono stati sottoposti ad amplificazione dei geni VP6, VP4, VP7 e NSP4. Gli ampliconi ottenuti sono stati sequenziati come pure quelli ottenuti per i geni VP4, VP7 e NSP4 di ceppi dello stesso genotipo ed e-tipo circolanti nella stessa area e nello stesso periodo febbraio-maggio 2005 o nell'anno immediatamente precedente (gennaio 2004 - gennaio 2005) in bambini con gastroenterite. Le sequenze di ciascun gene considerato sono state confrontate tra loro e con quelle relative a ceppi di rotavirus disponibili in banca dati genomica GenBank.

Periodo gennaio-marzo 2008

Relativamente al periodo gennaio-marzo 2008 sono stati inclusi nello studio, in quanto positivi alla ME per particelle rotavirus-simili, 67 campioni di feci appartenenti ad altrettanti bambini (età mediana 1 anno e 6 mesi; intervallo: 3 mesi - 11 anni e 8 mesi). I campioni sono stati selezionati nell'ambito di 261 feci appartenenti a 245 bambini (età mediana 1 anno e 11 mesi; intervallo: 8 giorni - 13 anni e 6 mesi) ricoverati con gastroenterite presso l'Azienda ospedaliero-universitaria di Parma e sottoposte ad indagini virologiche a scopo diagnostico presso l'unità operativa di Virologia della stessa Azienda.

Gli acidi nucleici estratti sono stati sottoposti a tipizzazione dei geni VP4 (P tipo) e VP7 (G tipo) di rotavirus di gruppo A e quelli relativi a 61 campioni, per disponibilità di materiale, sono stati sottoposti anche a determinazione dell'e-tipo mediante PAGE.

I ceppi di rotavirus di gruppo A che mostravano associazioni atipiche tra G/P tipo ed e-tipo sono stati ulteriormente caratterizzati mediante determinazione del SG del gene VP6 e del genogruppo del gene NSP4.

Dei 67 campioni complessivi di feci uno apparteneva ad una bambina giunta in Ospedale con gastroenterite associata a meningismo. Il campione di feci, un campione di liquor e uno di plasma appartenenti alla bambina e pervenuti al Laboratorio di Virologia Molecolare e Diagnostica Avanzata dell'unità operativa di Virologia per indagini virologiche, sono stati sottoposti ad amplificazione dei geni VP6, VP4 e VP7. Inoltre, il campione di feci è stato sottoposto ad amplificazione del gene NSP4. Gli ampliconi ottenuti sono stati sequenziati come pure quelli ottenuti per i geni VP4, VP7 e NSP4 di 3 ceppi dello stesso genotipo ed e-tipo circolanti nello stesso periodo gennaio-marzo 2008 e nella stessa area in bambini con solo gastroenterite. Le sequenze di ciascun gene sono state confrontate tra loro e con quelle dei geni analoghi di ceppi di rotavirus disponibili in banca dati genomica GenBank e di ceppi circolanti nel 2004-2005 nella stessa area e facenti parte della collezione dell'unità operativa di Virologia.

Microscopia elettronica (ME)

La ME è stata condotta come descritto in letteratura utilizzando metodiche standard [Whitby et al. 1980]. In breve, per le indagini diagnostiche di "routine" la sospensione fecale parzialmente purificata è stata sottoposta ad ultracentrifugazione a 25.000 rpm per 1 ora e 15 min a 4°C in centrifuga Beckman L7-55 con rotore SW41 (Beckman Coulter, USA) e il sedimento è stato risospeso in 100 µl di PBS. Una goccia della sospensione concentrata mediante ultracentrifugazione è stata incubata per 25 sec su una griglia "carbonizzata" da ME e quindi colorata per 25 sec con acido fosfotungstico al 2% (pH 6,5). La lettura è stata eseguita utilizzando il microscopio elettronico Philips EM208S (Philips, Olanda) a ingrandimento 45.000 X [Medici et al., 2004].

Elettroforesi in gel di poliacrilamide (PAGE) degli RNA genomici

I campioni, sottoforma di sospensione parzialmente purificata e successivamente concentrata mediante ultracentrifugazione, sono stati sottoposti ad estrazione degli RNA genomici secondo il metodo di Herring e collaboratori. [Herring et al. 1982; Medici et al., 2004].

In breve: l'estratto fecale, concentrato e risospeso in sodio acetato e SDS, è stato trasferito in una provetta tipo "eppendorf", addizionato di un ugual volume di una miscela di fenolo:cloroformio (3:2), agitato su vortex per 30 sec. e centrifugato a 2.000 rpm per 10 min. (centrifuga Eppendorf 5415, rotore 5402). La fase acquosa soprannatante (0,5 ml), contenente

gli RNA virali, è stata trasferita in una nuova provetta tipo “Eppendorf”, addizionata di sodio acetato 5M pH 5, in quantità pari a 1/10 del volume iniziale, e di etanolo freddo al 96%, pari a due volte il volume iniziale, e quindi incubata per 30 minuti a -80°C per la precipitazione degli RNA genomici virali.

Trascorso il periodo di incubazione, il campione è stato centrifugato per 30 min. a 12.000 rpm (centrifuga Eppendorf 5415, rotore 5402). Allontanato il soprannatante, il precipitato è stato risospeso in 75 µl di tampone Tris-EDTA pH 8,2 (T.E.) e in 25 µl di una soluzione di blu di bromofenolo (BPB), contenente 25% di saccarosio e 0,2% di BPB.

Parallelamente è stata eseguita l'estrazione degli RNA genomici dei ceppi di collezione rotavirus di scimmia rhesus SA11 e di reovirus tipo 3, utilizzati come riferimento. I campioni sono stati conservati congelati a -80°C fino al momento della corsa elettroforetica.

L'elettroforesi degli RNA virali estratti è stata eseguita utilizzando un gel di poliacrilamide al 10% sormontato da un gel di precorsa al 4% in tampone idoneo per la migrazione elettroforetica (Tris-Glicina), come descritto da Laemmli e collaboratori [1970], in presenza di SDS (Tabella 2).

Tabella 2. Schema gel di poliacrilamide

GEL DI PRECORSO AL 4%	
Acrilamide 30%	2,0 ml
Bis-acrilamide 1%	2,6 ml
Tris 1 M pH 6,8	2,5 ml
H ₂ O	8,0 ml
degasare per 15 minuti mediante pompa a vuoto	
SDS 20%	100 µl
Ammonio persolfato 10%	100 µl
Temed	10 µl

GEL DI CORSA AL 10%	
Acrilamide 30%	10,0 ml
Bis-acrilamide 1%	3,9 ml
Tris 1 M pH 6,8	7,5 ml
H ₂ O	8,0 ml
degasare per 15 minuti mediante pompa a vuoto	
SDS 20%	150 µl
Ammonio persolfato 10%	100 µl
Temed	10 µl

Sono stati sottoposti ad elettroforesi 50 µl di ciascun estratto addizionati di 10 µl di BPB. La migrazione elettroforetica è stata condotta a 80 V per 16-18 ore a temperatura ambiente.

Trascorso il periodo per la migrazione elettroforetica, il gel è stato fissato per 30 min., sotto agitazione, con metanolo al 40% e, per due volte successive per 15 min., con etanolo al 10% e quindi colorato con nitrato d'argento secondo il protocollo proposto da Merrill e collaboratori [1981] e in parte modificato.

In breve: sotto agitazione il gel è stato messo a contatto con soluzione ossidante costituita da 3,4 mM potassio bicromato e 3,2 N acido nitrico per 15 min., lavato 2 volte per 5 min. con acqua bidistillata e quindi messo a contatto con soluzione colorante costituita da 12 mM nitrato d'argento per 20 min. (i primi 5 sotto radiazione ultravioletta).

Eliminato il colorante, il gel è stato nuovamente lavato con acqua bidistillata per 1 min. e infine messo a contatto per 30 sec. con una soluzione di sviluppo (280 mM carbonato anidro di sodio e 0,25 ml formalina). Sostituita la soluzione di sviluppo con soluzione fresca, questa è stata lasciata a contatto con il gel fino alla completa apparizione delle bande di migrazione.

La reazione di sviluppo è stata arrestata mettendo il gel a contatto con una soluzione di acido acetico al 10% per 5 min. Il gel è stato, quindi, conservato immerso in una soluzione di acido acetico all'1%. Il gel, posto su transilluminatore a luce normale, è stato fotografato mediante strumento GelDoc (BioRad, California, USA) dotato di fotocamera digitale e software per l'acquisizione delle immagini.

Determinazione del genotipo (G tipo e P tipo) di rotavirus di gruppo A

Al fine di caratterizzare i rotavirus di gruppo A rivelati, gli RNA genomici sono stati estratti mediante guanidina tiocianato (GITC) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) e una preparazione commerciale di latte di silice (BIO101, Inc., California, USA) [Gentsch et al. 1992]. In breve, 500 µl di sospensione fecale sono stati chiarificati mediante centrifugazione a 13.000 rpm per 2 min in centrifuga Eppendorf 5415, rotore 5402 (Eppendorf, Germania). Al surnatante, trasferito in una nuova provetta tipo eppendorf da 1,5 ml, sono stati aggiunti 200 µl di VERTREL XF e la soluzione è stata miscelata su vortex e quindi centrifugata a 8000 rpm per 10 min in centrifuga Eppendorf 5415, rotore 5402. Ad un'aliquota di 200 µl del surnatante, trasferita in una nuova provetta tipo eppendorf da 1,5 ml, sono stati aggiunti 400 µl di GITC 6M e la soluzione è stata miscelata e incubata a 65°C per 10 min. Dopo l'incubazione, alla miscela sono stati aggiunti 7 µl di latte di silice e la soluzione è stata miscelata per inversione per 6 min e successivamente centrifugata a 3500 rpm per 1 min in centrifuga Eppendorf 5415, rotore 5402. Dopo aver rimosso il surnatante, al sedimento sono stati aggiunti 600 µl di una soluzione 4:2 di GITC 6M e Tris HCl 50mM, pH 7,5, e la miscela è stata centrifugata a 3500 rpm per 1 min in centrifuga Eppendorf 5415, rotore 5402. Dopo aver rimosso il surnatante, il sedimento è stato sottoposto a 3 lavaggi successivi attraverso l'aggiunta di 350 µl di etanolo 75% e centrifugazione a 3500 rpm per 1 min per i primi 2

lavaggi e a 10.000 rpm per 2 min per l'ultimo lavaggio (centrifuga Eppendorf 5415, rotore 5402). Dopo completa rimozione del surnatante, il sedimento è stato lasciato essiccare a temperatura ambiente per 15 min e successivamente eluito in 50 µl di acqua ultrapura, incubato a 65°C per 10 min, centrifugato a 10.000 rpm per 2 min (centrifuga Eppendorf 5415, rotore 5402). Infine, il surnatante contenente l'RNA virale è stato raccolto in una nuova provetta tipo eppendorf da 1,5 ml e conservato congelato a -80°C.

La genotipizzazione è stata condotta sottoponendo gli RNA genomici estratti a procedimenti di RT-PCR per l'amplificazione di regioni dei geni che codificano per le proteine VP4 e VP7, rispettivamente, previa denaturazione a 97°C per 5 min di un'aliquota di 2 µl di estratto in presenza 1,4 µl di dimetilsolfossido. La reazione di RT-PCR è stata condotta utilizzando il kit commerciale "SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates" (Invitrogen, California, USA) che sfrutta l'azione della miscela enzimatica RT/Platinum® Taq HiFi Mix. Tale miscela è costituita da "SuperScript II Reverse Transcriptase", che assicura ridotta attività dell'RNasi H e aumenta la stabilità termica, e "Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity", che è una miscela di Taq DNA polimerasi ricombinante ed enzima correttore di bozze polimerasi termostabile Pyrococcus specie GB-D.

In particolare, per la regione VP4 (P tipo) è stato impiegato un procedimento di eminested RT-PCR che utilizza una coppia di primer per la prima amplificazione [Gentsch et al. 1992; Martella, osservazione personale] e una miscela di 6 primer specifici per i P tipi P[4] (1 primer), P[6] (1 primer), P[8] (2 primer), P[9] (1 primer) e P[10] (1 primer) per la seconda amplificazione [Gentsch et al. 1992; Iturriza-Gómara et al., 2000].

Per la reazione "one-step" di retrotrascrizione e prima amplificazione 1 µl di RNA denaturato è stato aggiunto a 24 µl di miscela di reazione la cui composizione è riportata in Tabella 3.

Tabella 3. Miscela di reazione per retrotrascrizione e prima amplificazione del gene VP4.

Componente	Concentrazione	Riferimento
desossinucleotidi	0,2 mM ciascuno	"SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates" (Invitrogen)
MgSO4	1,2 mM	
RT/Platinum® Taq HiFi Mix	/	
Primer Con3	1 µM	Gentsch et al. 1992
Primer Con2	1 µM	Gentsch et al. 1992
Acqua ultrapura		

La dimensione attesa dell'amplificato è di circa 1200 pb.

La reazione è stata eseguita in termociclatore (Perkin Elmer 9700, Applied Biosystems, California, USA) secondo il seguente protocollo: incubazione a 50°C per 60 min,

1 ciclo a 94°C per 2 min, 40 cicli a 94°C per 1 min, 42°C per 2 min e 68°C per 2 min e 1 ciclo finale a 68°C per 10 min.

Un'aliquota di 1 µl è stata trasferita in una provetta contenente 49 µl di miscela di seconda amplificazione la cui composizione è riportata in Tabella 4.

Tabella 4. Miscela di reazione per seconda amplificazione del gene VP4.

Componente	Senso/ Specificità	Dimensioni amplicone (pb)	Concentrazione	Riferimento
desossinucleotidi			0,2 mM ciascuno	Applied Biosystems
Tris HCl, pH 9			2 mM	Buffer 10X (Applied Biosystems)
KCl			1 mM	
Acido Etilendiaminotetracetico			1 µM	
DTT			0,1 mM	
Tween 20			0,05%	
Glicerolo			5%	
MgCl ₂			2 mM	
AmpliTaq® Gold			1 U	Applied Biosystems
Primer Con3	+		0,25 µM	Gentsch et al., 1992
Primer 2T-1	- / P[4]	483	0,25 µM	
Primer 3T-1	- / P[6]	267	0,25 µM	
Primer 1T-1	- / P[8]	345	0,25 µM	
Primer P8d	- / P[8]	345	0,25 µM	Iturriza-Gómara et al., 2000
Primer 4T-1	- / P[9]	391	0,25 µM	Gentsch et al, 1992
Primer 5T-1	- / P[10]	583	0,25 µM	
Acqua ultrapura				

La reazione è stata eseguita in termociclatore (Perkin Elmer 9700, Applied Biosystems) secondo il seguente protocollo: incubazione a 94°C per 10 min, 25 cicli a 94°C per 1 min, 55°C per 2 min e 72°C per 2 min e 1 ciclo finale a 72°C per 10 min.

Per la regione VP7 (G tipo) sono stati impiegati un procedimento di nested ed uno di eminested RT-PCR che prevedono una prima amplificazione comune con una miscela di 4 primer e una seconda amplificazione con due differenti miscele di 6 primer l'una. I primer utilizzati riconoscono complessivamente i tipi G1, G2, G3, G4, G8, G9 e G12. [Gouvea et al. 1990; Gouvea et al. 1993; Martella et al. 2003b; Cunliffe et al. 1999; Das et al. 1994; Martella et al. 2004; Banerjee et al. 2007].

Per la reazione “one-step” di retrotrascrizione e prima amplificazione 1 µl di RNA denaturato è stato aggiunto a 24 µl di miscela di reazione la cui composizione è riportata in Tabella 5.

Tabella 5. Miscela di reazione per retrotrascrizione e prima amplificazione del gene VP7.

Componente	Senso	Concentrazione	Riferimento
Desossinucleotidi		0,2 mM ciascuno	“SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates” (Invitrogen)
MgSO ₄		1,2 mM	
RT/Platinum® Taq HiFi Mix		/	
Primer SBeg9	+	1 μM	Gouvea et al., 1990, modificato
Primer End9	-	0,3 μM	Gouvea et al., 1990
Primer End9deg	-	0,3 μM	Martella et al., 2003
Primer End9CRW8	-	0,3 μM	Gouvea et al., 1993
Acqua ultrapura			

La dimensione attesa dell’amplificato è di 1062 pb.

La reazione è stata eseguita in termociclatore (Perkin Elmer 9700, Applied Biosystems) secondo il seguente protocollo: incubazione a 50°C per 60 min, 1 ciclo a 94°C per 2 min, 40 cicli a 94°C per 1 min, 42°C per 2 min e 68°C per 2 min e 1 ciclo finale a 68°C per 10 min.

Un’aliquota di 1,6 μl è stata trasferita in una provetta contenente 48,4 μl di miscela di seconda amplificazione la cui composizione è riportata in Tabella 6.

Tabella 6. Miscela di reazione per seconda amplificazione del gene VP7.

Componente	Senso/ Specificità	Dimensioni amplicone (pb)	Concentrazione	Riferimento
Desossinucleotidi			0,1mM cad	“dNTPs” (Applied Biosystems)
Tris HCl, pH 9			2 mM	“Buffer 10X” (Applied Biosystems)
KCl			1 mM	
Acido Etilendiaminotetracetico			1 μM	
DTT			0,1 mM	
Tween 20			0,05%	
Glicerolo			5%	
MgCl ₂			2 mM	
AmpliTaq® Gold			1 U	Applied Biosystems
Primer Send9	-		0,1 μM	Martella V, oss. pers.
Primer aBT1	+ / G1	749	0,1μM	Gouvea et al., 1990
Primer aCT2	+ / G2	692	0,1 μM	
Primer aET3	+ / G3	374	0,1 μM	
Primer aDT4	+ / G4	583	0,1 μM	
Primer aFT9	+ / G9	306	0,1 μM	
Primer α FT9α3	+ / G9	306	0,1 μM	
Primer G12MiG	+ / G12	514	0,1 μM	Banerjee et al., 2007
Acqua ultrapura				

La reazione è stata eseguita in termociclatore (Perkin Elmer 9700, Applied Biosystems) secondo il seguente protocollo: incubazione a 94°C per 10 min, 25 cicli a 94°C per 1 min, 55°C per 2 min e 72°C per 2 min e 1 ciclo finale a 72°C per 10 min.

Come controlli positivi sono stati utilizzati ceppi di riferimento di collezione, quali Wa (ATCC No. VR-2018) e DS-1, ST-3, Yo, Va70, Wi61 e B37, gentilmente forniti da Ruth Bishop (Royal Children's Hospital, Melbourne, Australia).

Estrazione dell'RNA da liquor, plasma e siero

L'RNA è stato estratto in modo rapido da 300 µl di liquor, plasma o siero mediante "EXTRAgen Kit" (Nanogen Diagnostics, California, USA) secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice. Il metodo si basa sull'attività lisante e denaturante di idrocloruro di guanidina e successiva precipitazione dell'acido nucleico in etanolo assoluto.

Estrazione dell'RNA da sangue *post-mortem*

L'RNA è stato estratto in modo rapido da 200 µl di sangue *post-mortem* mediante "EXTRAzol Kit" (Nanogen Diagnostics) secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice. Il metodo si basa sull'attività estraente della miscela fenolo-cloroformio e successiva precipitazione dell'acido nucleico in etanolo assoluto.

Estrazione dell'RNA da campioni autoptici

L'RNA è stato estratto dai campioni autoptici inclusi in paraffina mediante "EXTRAffin Kit" (Nanogen Diagnostics) secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice. Il metodo si basa sulla digestione enzimatica della proteasi K e sull'eliminazione degli inibitori e l'attività chelante di una resina.

Determinazione del sottogruppo (SG) del gene VP6 di rotavirus di gruppo A

Il sottogruppo è stato determinato attraverso un procedimento di RT-PCR, che utilizza la coppia di primer VP6-F/VP6-R per l'amplificazione di un frammento del gene VP6 e successivo sequenziamento del frammento ottenuto.

Per la reazione "one-step" di retrotrascrizione ed amplificazione, 1 µl di RNA denaturato è stato aggiunto a 24 µl di miscela di reazione la cui composizione è riportata in Tabella 7.

Tabella 7. Miscela di reazione per retrotrascrizione ed amplificazione del gene VP6.

Componente	Concentrazione	Riferimento
desossinucleotidi	0,2 mM ciascuno	“SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates” (Invitrogen)
MgSO ₄	1,2 mM	
RT/Platinum® Taq HiFi Mix	/	
VP6F	1 µM	Iturriza-Gómara et al. 2002a
VP6R	1 µM	
Acqua ultrapura		

La dimensione attesa dell’amplificato è di 380 pb.

La reazione è stata eseguita in termociclatore (Perkin Elmer 9700, Applied Biosystems) secondo il seguente protocollo: incubazione a 50°C per 60 min, 1 ciclo a 94°C per 2 min, 35 cicli a 94°C per 1 min, 50°C per 1 min e 68°C per 1 min e 1 ciclo finale a 68°C per 10 min.

Determinazione del genogruppo del gene NSP4 di rotavirus di gruppo A

Il genogruppo NSP4 è stato determinato attraverso un procedimento di RT-PCR, che utilizza la coppia di primer 10Beg1 e 10End722 per l’amplificazione di un frammento del gene NSP4 e successivo sequenziamento del frammento ottenuto.

Per la reazione “one-step” di retrotrascrizione ed amplificazione, 1 µl di RNA denaturato è stato aggiunto a 24 µl di miscela di reazione la cui composizione è riportata in Tabella 8.

Tabella 8. Miscela di reazione per retrotrascrizione ed amplificazione del gene NSP4.

Componente	Concentrazione	Riferimento
desossinucleotidi	0,2 mM ciascuno	“SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates” (Invitrogen)
MgSO ₄	1,2 mM	
RT/Platinum® Taq HiFi Mix	/	
Primer 10Beg16	1 µM	Lee et al., 2000
Primer 10End722	1 µM	
Acqua ultrapura		

La dimensione attesa dell’amplificato è di 680 pb.

La reazione è stata eseguita in termociclatore (Perkin Elmer 9700) secondo il seguente protocollo: incubazione a 50°C per 60 min, 1 ciclo a 94°C per 2 min, 35 cicli a 94°C per 1 min, 50°C per 1 min e 68°C per 2 min e 1 ciclo finale a 68°C per 10 min.

Clonaggio

Il clonaggio è stato condotto, quando necessario, nel vettore pCRT7/NT-TOPO (Invitrogen BV, The Netherlands) presso il Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali dell'Università di Bari.

Identificazione di rotavirus di gruppo C (GCRV)

Analisi delle sequenze dei geni VP4, VP6 e VP7 di GCRV

I geni VP4 e VP7 di GCRV sono stati amplificati attraverso procedimenti dedicati di RT-PCR e il gene VP6 di GCRV è stato amplificato attraverso un procedimento di RT-PCR eminested, utilizzando per tutti primer già descritti in letteratura [Rahman et al., 2005a; Gouvea et al., 1991].

Per la reazione “one-step” di retrotrascrizione ed amplificazione del gene VP4, 1 µl di RNA denaturato è stato aggiunto a 24 µl di miscela di reazione la cui composizione è riportata in Tabella 9.

Tabella 9. Miscela di reazione per retrotrascrizione e amplificazione del gene VP4 di GCRV.

Componente	Concentrazione	Riferimento
desossinucleotidi	0,2 mM ciascuno	“SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates” (Invitrogen)
MgSO4	1,2 mM	
RT/Platinum® Taq HiFi Mix	/	
Primer GrC-VP4-41F	1 µM	Rahman et al., 2005
Primer GrC-VP4-1243R	1 µM	
Acqua ultrapura		

La dimensione attesa dell'amplificato è di 1202 pb.

Per la reazione “one-step” di retrotrascrizione ed amplificazione del gene VP7, 1 µl di RNA denaturato è stato aggiunto a 24 µl di miscela di reazione la cui composizione è riportata in Tabella 10.

Tabella 10. Miscela di reazione per retrotrascrizione e amplificazione del gene VP7 di GCRV.

Componente	Concentrazione	Riferimento
desossinucleotidi	0,2 mM ciascuno	“SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates” (Invitrogen)
MgSO ₄	1,2 mM	
RT/Platinum® Taq HiFi Mix	/	
Primer GrC-VP7-20F	1 μM	Rahman et al., 2005
Primer GrC-VP7-1062R	1 μM	
Acqua ultrapura		

La dimensione attesa dell’amplificato è di 1042 pb.

Le reazioni sono state eseguite contemporaneamente in termociclatore (Perkin Elmer 9700, Applied Biosystems) secondo il seguente protocollo: incubazione a 50°C per 60 min, 1 ciclo a 94°C per 2 min, 35 cicli a 94°C per 1 min, 55°C per 1 min e 68°C per 1 min e 1 ciclo finale a 68°C per 10 min.

Per la reazione “one-step” di retrotrascrizione e prima amplificazione del gene VP6, 1 μl di RNA denaturato è stato aggiunto a 24 μl di miscela di reazione la cui composizione è riportata in Tabella 11.

Tabella 11. Miscela di reazione per retrotrascrizione e prima amplificazione del gene VP6 di GCRV.

Componente	Concentrazione	Riferimento
desossinucleotidi	0,2 mM ciascuno	“SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates” (Invitrogen)
MgSO ₄	1,2 mM	
RT/Platinum® Taq HiFi Mix	/	
Primer C1	1 μM	Gouvea et al., 1991
Primer C4	1 μM	
Acqua ultrapura		

La dimensione attesa dell’amplificato è di 356 pb.

La reazione è stata eseguita in termociclatore (Perkin Elmer 9700, Applied Biosystems) secondo il seguente protocollo: incubazione a 50°C per 60 min, 1 ciclo a 94°C per 2 min, 35 cicli a 94°C per 1 min, 55°C per 1 min e 68°C per 1 min e 1 ciclo finale a 68°C per 10 min.

Un'aliquota di 1,6 μ l di primo amplificato diluito 1:50 in acqua ultrapura è stata trasferita in una provetta contenente 48,4 μ l di miscela di seconda amplificazione la cui composizione è riportata in Tabella 12.

Tabella 12. Miscela di reazione per seconda amplificazione del gene VP6 di GCRV.

Componente	Concentrazione	Riferimento
desossinucleotidi	0,2 mM ciascuno	Applied Biosystem
Tris HCl, pH 9	2 mM	Buffer 10X (Applied Biosystem)
KCl	1 mM	
Acido Etilendiaminotetracetico	1 μ M	
DTT	0,1 mM	
Tween 20	0,05%	
Glicerolo	5%	
MgCl ₂	2 mM	Applied Biosystem
AmpliTaq® Gold	1 U	Applied Biosystem
Primer C1	1 μ M	Gouvea et al, 1991
Primer C3	1 μ M	
Acqua ultrapura		

La dimensione attesa dell'amplificato è di 327 pb.

La reazione è stata eseguita in termociclatore (Perkin Elmer 9700, Ditta) secondo il seguente protocollo: 1 ciclo a 94°C per 10 min, 25 cicli a 94°C per 1 min, 50°C per 2 min e 72°C per 1 min e 1 ciclo finale a 72°C per 10 min.

Ricerca di GCRV

La ricerca dell'RNA di GCRV è stata condotta mediante un procedimento di eminested RT-PCR per l'amplificazione di un frammento di 340 pb del gene VP6. Per la reazione "one-step" di retrotrascrizione e prima amplificazione, 1 μ l di RNA denaturato è stato aggiunto a 24 μ l di miscela di reazione la cui composizione è riportata in Tabella 13.

Tabella 13. Miscela di reazione per retrotrascrizione e prima amplificazione del gene VP6 di GCRV.

Componente	Concentrazione	Riferimento
desossinucleotidi	0,2 mM ciascuno	“SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates” (Invitrogen)
MgSO ₄	1,2 mM	
RT/Platinum® Taq HiFi Mix	/	
Primer BMJ144	1 µM	Sanchez-Fauquier et al., 2003
BMJ145	1 µM	
Acqua ultrapura		

La reazione è stata eseguita in termociclatore (Perkin Elmer 9700, Applied Biosystems) secondo il seguente protocollo: incubazione a 50°C per 30 min, 1 ciclo a 94°C per 1 min, 40 cicli a 94°C per 30 sec, 50°C per 30 sec e 68°C per 1 min e 1 ciclo finale a 68°C per 10 min.

Un'aliquota di 1,6 µl di primo amplificato diluito 1:50 in acqua ultrapura è stata trasferita in una provetta contenente 48,4 µl di miscela di seconda amplificazione la cui composizione è riportata in Tabella 14.

Tabella 14. Miscela di reazione per seconda amplificazione del gene VP6 di GCRV.

Componente	Concentrazione	Riferimento
desossinucleotidi	0,2 mM ciascuno	Applied Biosystem
Tris HCl, pH 9	2 mM	Buffer 10X (Applied Biosystem)
KCl	1 mM	
Acido Etilendiaminotetracetico	1 µM	
DTT	0,1 mM	
Tween 20	0,05%	
Glicerolo	5%	
MgCl ₂	2 mM	
AmpliTaq® Gold	1 U	Applied Biosystem
Primer BMJ144	0,5 µM	Sanchez-Fauquier et al., 2003
Primer BMJ 43 mod	0,5 µM	Bányai et al., 2006
Acqua ultrapura		

La dimensione attesa dell'amplificato è di 277 pb.

La reazione è stata eseguita in termociclatore (Perkin Elmer 9700, Applied Biosystems) secondo il seguente protocollo: 1 ciclo a 94°C per 10 min, 25 cicli a 94°C per 30 sec, 50°C per 30 sec e 72°C per 1 min e 1 ciclo finale a 72°C per 10 min.

Rivelazione dei prodotti di amplificazione.

Tutti i prodotti di amplificazione sono stati rivelati mediante elettroforesi in gel d'agaroso al 2% e corsa in tampone tris acetato EDTA (TAE) 1% a 100V per 60 min, previa colorazione con etidio bromuro. Le bande sono state visualizzate sottoponendo il gel ai raggi UV attraverso strumento GelDoc (BioRad) dotato di fotocamera digitale e software per l'acquisizione delle immagini.

Sequenziamento ed analisi filogenetica

I prodotti di amplificazione sono stati purificati mediante kit commerciale "Qiaquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN, Germania) e sequenziati mediante sequenziatore automatico 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems), impiegando gli stessi primer utilizzati per l'amplificazione.

Le sequenze sono state analizzate impiegando il programma "Bioedit software package" [Hall, 1999] e gli strumenti di analisi ottenuti dalle banche dati National Center for Biotechnology Information (NCBI) e European Molecular Biology Laboratory (EMBL).

L'analisi filogenetica è stata condotta utilizzando il programma Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) versione 3.1 [Kumar et al., 2001] e applicando metodi di costruzione e modelli di correzione statistica appropriati (metodo "neighbour-joining", modelli "Kimura-2-parametri" e "p-distance").

STUDIO EPIDEMIOLOGICO MOLECOLARE

Risultati

Periodo 1987-1990

Nel periodo 1987-1990 la prevalenza complessiva di infezione da rotavirus in bambini con gastroenterite era stata del 16,8% (216 pazienti su 1284 esaminati), con un picco del 26,2% nel 1989 (Figura 15).

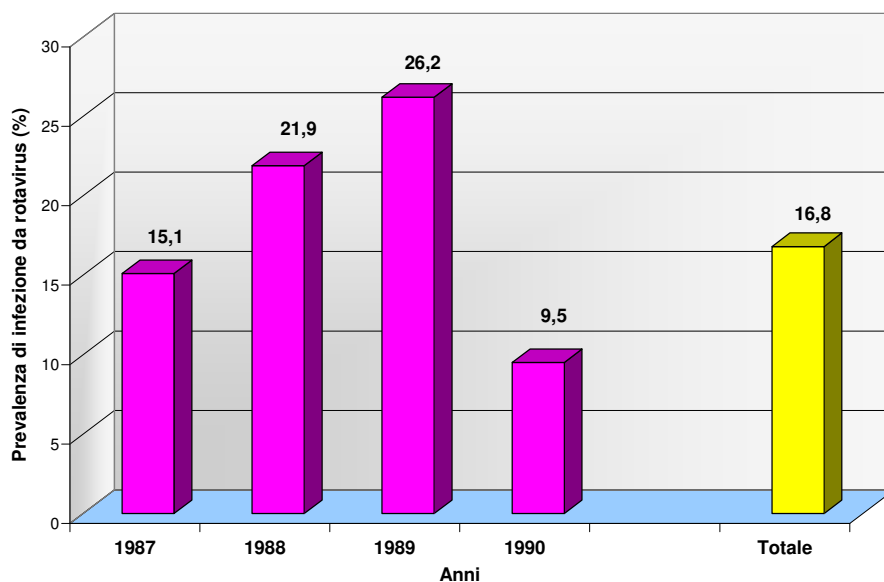


Figura 15. Distribuzione annuale della prevalenza di infezione da rotavirus nell'area di Parma in 1284 bambini ricoverati con gastroenterite nel periodo 1987-1990.

Dei 74 ceppi inclusi nello studio il 79,7% (59 ceppi) presentava e-tipo lungo e il 20,3% (15 ceppi) e-tipo corto (Tabella 15). Il 55,41% dei ceppi analizzati è stato caratterizzato come G1,P[8]. A dispetto delle associazioni geniche tra G e P tipo, e-tipo, SG e genogruppo NSP4 caratteristiche dei diversi genogruppi di rotavirus, cinque stipiti G1P[8], uno stipite G1P[4]+P[8], uno stipite G1P[6]+P[8], 2 stipiti parzialmente caratterizzati G1P? e 2 stipiti G1+G2P[4] erano inaspettatamente risultati associati ad e-tipo corto.

Tabella 15. Genotipo ed elettroferotipo di 74 ceppi di rotavirus umani di gruppo A circolanti a Parma nel periodo 1987-1990.

Genotipo	Elettroferotipo		Totale	
	lungo	corto	N°	%
G1P[8]	36	5	41	55,41
G1P[4]+P[8]	0	1	1	1,35
G1P[6]+P[8]	11	1	12	16,22
G1P?*	5	2	7	9,46
G2P[4]	0	1	1	1,35
G4P[8]	1	0	1	1,35
G1+G2P[4]	0	2	2	2,70
G?P[6]	1	0	1	1,35
G?P?	5	3	8	10,81
Totale	59 (79,7%)	15 (20,3%)	74	100

*: non caratterizzato.

Per tali ceppi l'analisi del SG e del genogruppo NSP4 ha rivelato che tutti i ceppi G1, tranne uno non caratterizzabile nel sottogruppo, erano SGII o SGI+SGII e NSP4 di genogruppo B o A+B, mentre i 2 ceppi con doppia reattività G1+G2P[4] erano SGI e NSP4 di genogruppo A (Tabella 16).

Tabella 16. Costellazione genetica di 11 ceppi di rotavirus con associazioni atipiche rivelati in bambini ricoverati con gastroenterite nel periodo 1987-1990 a confronto con le associazioni genetiche tipiche dei genogruppi Wa e DS-1 (indicate in *italico* in prima e seconda riga, rispettivamente).

N° ceppi	VP7	VP4	Elettroferotipo	VP6	NSP4
	G1	P[8]	lungo	SGII	B
	G2	P[4]	corto	SGI	A
4	G1	P[8]	corto	SGII	B
1	G1	P[8]	corto	SGI+II	B
1	G1	P[4]+P[8]	corto	SGI+II	B
1	G1	P[6]+P[8]	corto	SGII	B
1	G1	P?*	corto	SGI+II	A+B
1	G1	P?*	corto	SG?	B
2	G1+G2	P[4]	corto	SGI	A

*: non tipizzabile.

Allo scopo di indagare sull'origine dei ceppi G1P[8] atipici, sono stati sequenziati i geni VP4 e VP7 di ceppi G1P[8] con e-tipo corto e lungo, rispettivamente.

L'analisi filogenetica della sequenza del gene VP7 di 4 dei 5 ceppi atipici G1P[8] e del ceppo atipico G1P[6]+P[8] a confronto con 3 ceppi tipici G1P[8] ha rivelato che tutti i ceppi analizzati avevano identità nucleotidica (nt) >99% tra loro e si inserivano nel lignaggio G1-I insieme ad altri ceppi G1 rivelati quasi negli stessi anni (1986, 1987, 1990) in Sicilia [Arista et al., 2006] (Figura 16).

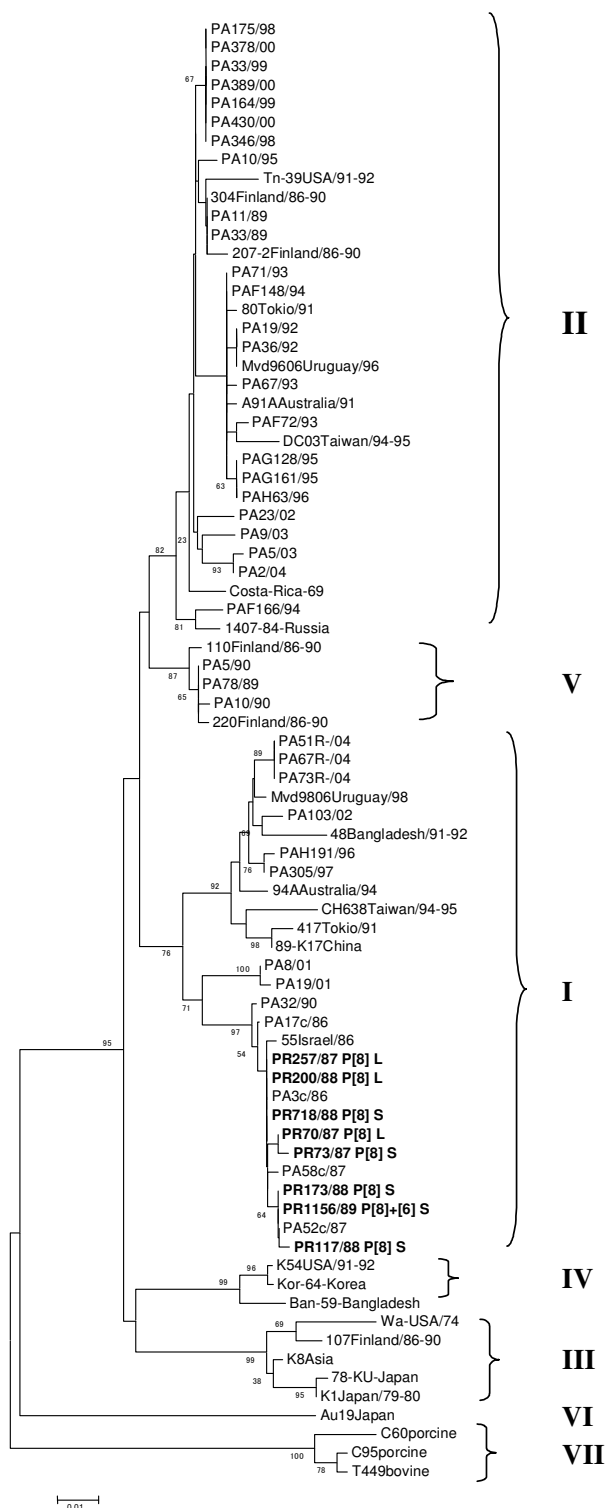


Figura 16. Albero filogenetico delle sequenze nucleotidiche del gene VP7 di ceppi di rotavirus umani e animali rappresentativi dei diversi lignaggi di G1 (indicati in numeri romani). I ceppi rivelati a Parma nel periodo 1987-1990 sono indicati in grassetto, insieme al relativo P tipo ed elettroferotipo (L = lungo, S = corto). Il dendrogramma è stato costruito con il metodo “Neighbour-joining” e il modello “kimura 2 parametri”. Sono indicati i valori di “Bootstrap” >49% (calcolato su 1000 pseudorepliche).

L'analisi filogenetica della sequenza del gene VP4 degli stessi ceppi atipici G1P[8] e dei due ceppi atipici G1+G2P[4] a confronto con 4 ceppi tipici (3 G1P[8] con e-tipo lungo e 1 G2P[4]c on e-tipo corto) ha rivelato che i ceppi G1P[8] avevano identità nt >99% tra loro e si inserivano nel lignaggio P[8]-I insieme ad altri ceppi G1 rivelati quasi negli stessi anni (1986 e 1990) in Sicilia [Arista et al., 2006] (Figura 17). I ceppi G1+G2P[4] hanno mostrato >99% di identità nt con il ceppo tipico G2P[4] circolante in ambito locale nel periodo di studio.

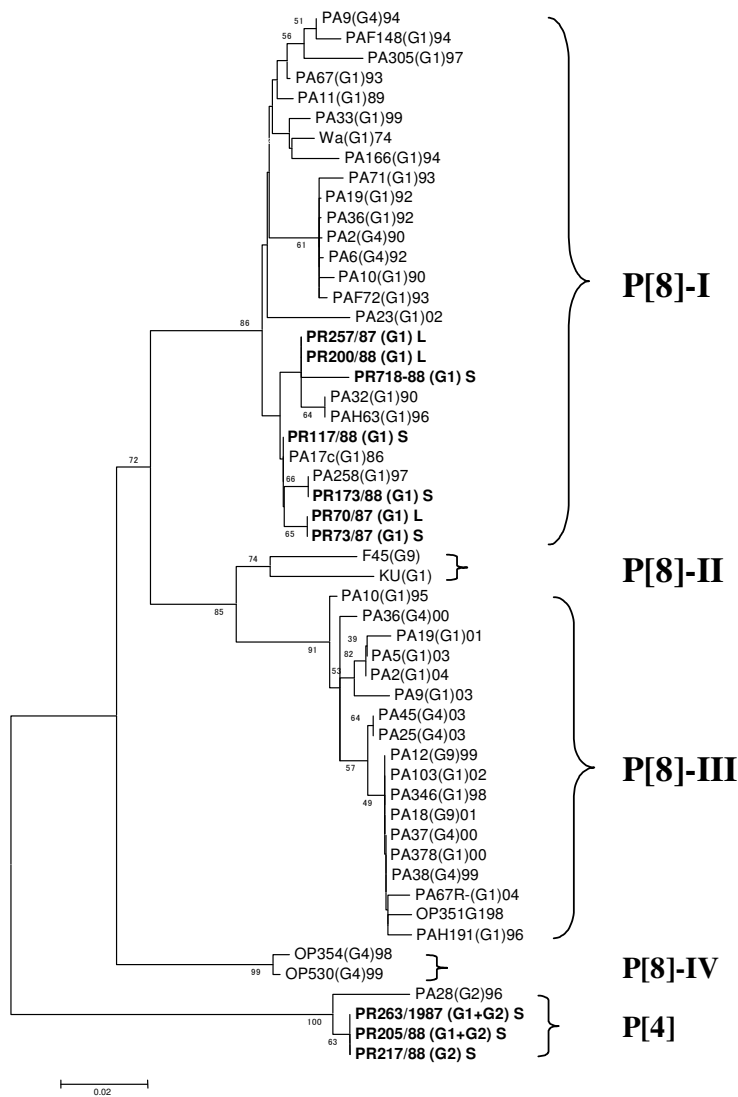
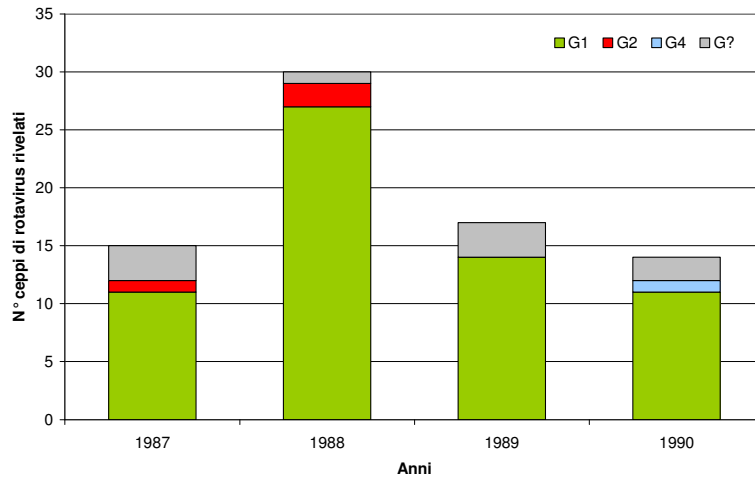


Figura 17. Albero filogenetico delle sequenze nucleotidiche del frammento VP8* del gene VP4 di ceppi di rotavirus umani e animali rappresentativi dei diversi lignaggi di P[8] (indicati in numeri romani). I ceppi rivelati a Parma nel periodo 1987-1990 sono indicati in grassetto, assieme al relativo G tipo ed elettroferotipo (L=lungo, S=corto). Il dendrogramma è stato costruito con il metodo “Neighbour-joining” e il modello “kimura 2 parametri”. Sono indicati i valori di “Bootstrap” >49% (calcolato su 1000 pseudorepliche).

La distribuzione temporale delle specificità antigeniche G e P osservate nel periodo 1987-1990 ha evidenziato che i ceppi con specificità G1 e P[8] circolavano costantemente

nel corso dei 4 anni di studio. Stipiti di rotavirus con P[6] o P[6]+P[8] sono invece comparsi nel corso del 1989 e hanno circolato almeno fino al 1990 (Figura 18).



B)

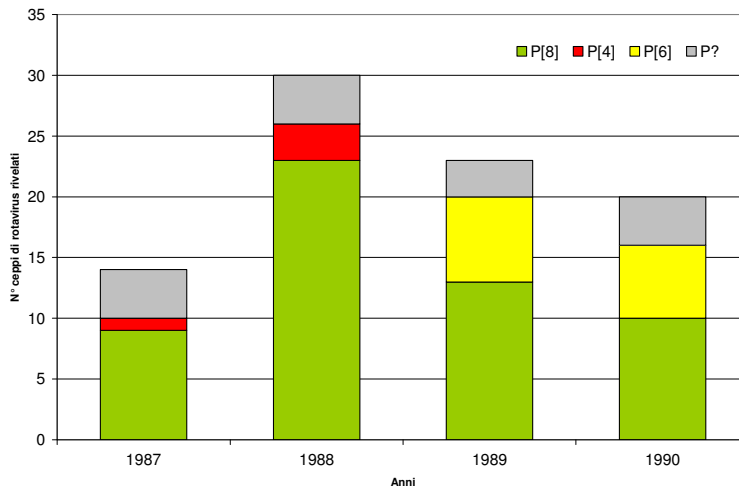


Figura 18. Distribuzione annuale delle specificità antigeniche G (A) e P (B) di 74 ceppi di rotavirus di gruppo A rivelati nell'area di Parma (1987-1990).

Periodo 2004-2005

La prevalenza di infezione da rotavirus nel periodo 2004-2005 è stata del 32% (274 su 857 bambini esaminati: 27,5%, 84 su 306, nel 2004 e 34,5%, 190 su 551, nel 2005). Assente in dicembre 2004 l'infezione ha raggiunto una prevalenza del 75% in marzo e del 65,3% in aprile 2005, quando l'enterite da rotavirus ha avuto esito fatale in due bambini di 2 anni e 13 mesi, rispettivamente (Figura 19).

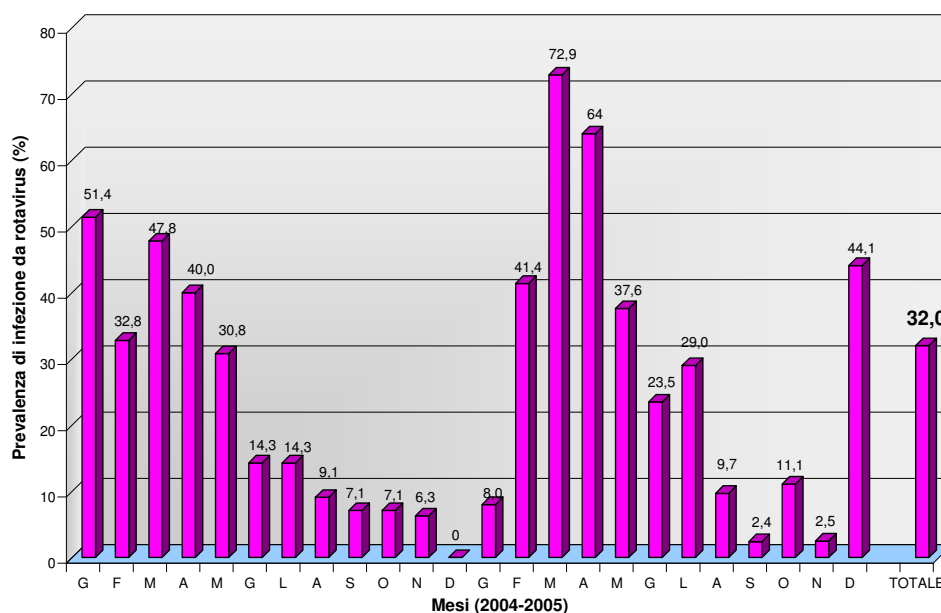


Figura 19. Distribuzione mensile di 272 casi di infezione da rotavirus di gruppo A osservati in 857 bambini ricoverati con gastroenterite a Parma nel periodo 2004-2005.

L'analisi elettroforetica di 270 campioni positivi per particelle rotavirus-simili alla ME ha rivelato trattarsi in tutti i casi di ceppi di rotavirus tranne uno con profilo elettroforetico ascrivibile a reovirus. In particolare, sono stati identificati 255 ceppi di rotavirus con e-tipo lungo e 8 con e-tipo corto, tutti con profilo 4:2:3:2 caratteristico di rotavirus di gruppo A, 4 ceppi con e-tipo lungo e segmenti genomici soprannumerari, e 2 ceppi con profilo 4:3:2:2 di ascrivibile a rotavirus di gruppo C. Dei 263 e-tipi con profilo 4:2:3:2, il 62,7% era classificabile come b-c-e-a.

La genotipizzazione condotta su 271 campioni positivi per rotavirus di gruppo A al PAGE e/o all'agglutinazione al lattice, per disponibilità di materiale, ha dimostrato che i genotipi più frequenti erano G1P[8] (42,8%) e G9P[8] (29,9%) (Tabella 17). In particolare, di 83 ceppi rivelati nel 2004 il 67,5% era di genotipo G1P[8], seguito nel 15,7% dal genotipo G4P[8]. Di 188 ceppi rivelati nel 2005 il 41,5% era di genotipo G9P[8], seguito nel 32% dal

genotipo G1P[8]. Un ceppo con e-tipo lungo è risultato di genotipo G1+G2P[8] mostrando un'associazione atipica tra e-tipo e G-tipo. Inoltre, sorprendentemente è stato identificato un ceppo con specificità G8, non tipizzabile per il gene VP4, con e-tipo lungo. L'analisi di un tratto della sequenza del gene VP4 di tale ceppo ha evidenziato che si trattava di un tipo P[14].

Tabella 17. Risultati della genotipizzazione specifica per rotavirus umano di gruppo A condotta su 270 campioni di feci e 1 contenuto dello svuotamento intestinale appartenenti a bambini con gastroenterite e positivi alla microscopia elettronica per particelle reovirus-simili (2004-2005).

Genotipo	2004					2005					Totale			
	Elettroferotipo			Totale		Elettroferotipo			Totale		N°	%		
	lungo	corto	n.e.	N°	%	lungo	corto	> 11 segmenti	reovirus	n.e.			N°	%
G1P[8]	55	0	1	56	67,5	59	0	1	0	0	60	32,0	116	42,8
G9P[8] ^	3	0	0	3	3,6	77	0	0	1	0	78	41,5	81	29,9
G3P[8]	0	0	0	0	0	28	0	0	0	2	30	16,0	30	11,0
G4P[8]	13	0	0	13	15,7	1	0	0	0	0	1	0,5	14	5,1
G2P[4]	0	3	0	3	3,6	0	5	0	0	0	5	2,7	8	2,9
G1+G9P[8]	1	0	0	1	1,2	3	0	3	0	0	6	3,2	7	2,6
G4P[6]+P[8]	3	0	0	3	3,6	0	0	0	0	0	0	0	3	1,1
G?P[8] *	1	0	0	1	1,2	1	0	0	0	0	1	0,5	2	0,7
G?P?	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	1,1	2	0,7
G1+G2P[8]	1	0	0	1	1,2	0	0	0	0	0	0	0	1	0,4
G3P[6]+P[8]	1	0	0	1	1,2	0	0	0	0	0	0	0	1	0,4
G8P[14]°	1	0	0	1	1,2	0	0	0	0	0	0	0	1	0,4
G4+G9P[8]	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,5	1	0,4
G1+G9P[6]	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,5	1	0,4
G9P[6]	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,5	1	0,4
G1P?	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,5	1	0,4
G9P[6]+P[8]	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,5	1	0,4
Totale	79	3	1	83	100	176	5	4	1	2	188	100	271	100

n.e.: indagine non eseguita per insufficiente quantità di materiale

^: in un caso si trattava di co-infezione tra un ceppo di rotavirus umano di gruppo A e uno di reovirus

*: non caratterizzato.

°: la specificità P[14] è stata identificata mediante sequenziamento del gene VP4.

La distribuzione mensile delle specificità G (Figura 19) ha rivelato che ceppi G1 erano circolanti nel corso di entrambi gli anni ,ad eccezione del periodo agosto-novembre, con un picco nel periodo gennaio-marzo 2004 e marzo-maggio 2005, rispettivamente, mentre stipiti con specificità G4, rappresentati nel 19,3% nel 2004, erano circolanti nel 2005 nell'1,1% dei G tipi osservati. Al contrario, ceppi con specificità G9, presenti nel 4,8% nel 2004 sono emersi fino al 46,8% nel 2005, quando sono diventati prevalenti. Inoltre, è stato possibile osservare un picco di infezione da rotavirus G3 in dicembre 2005, durante il quale tali ceppi hanno contato per l'86,7% delle infezioni da rotavirus in quel mese.

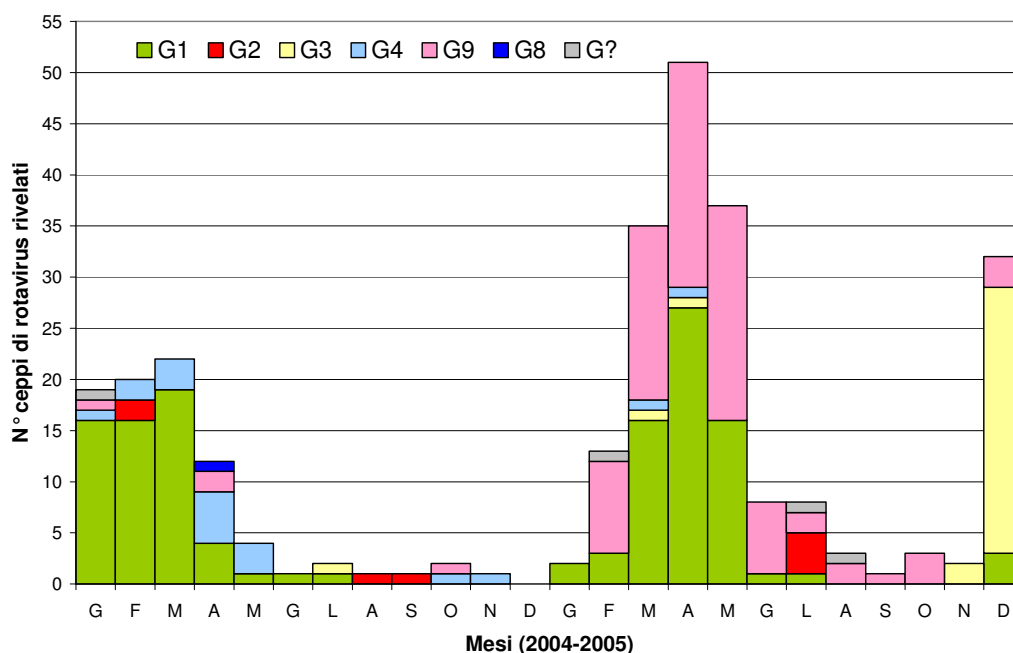


Figura 19. Distribuzione mensile delle specificità antigeniche G di ceppi di rotavirus di gruppo A rivelati nell'area di Parma (2004-2005).

La distribuzione mensile delle specificità P (Figura 20) ha rivelato la prevalenza di ceppi P[8] durante tutto il periodo di studio ad eccezione solo del mese di settembre 2004.

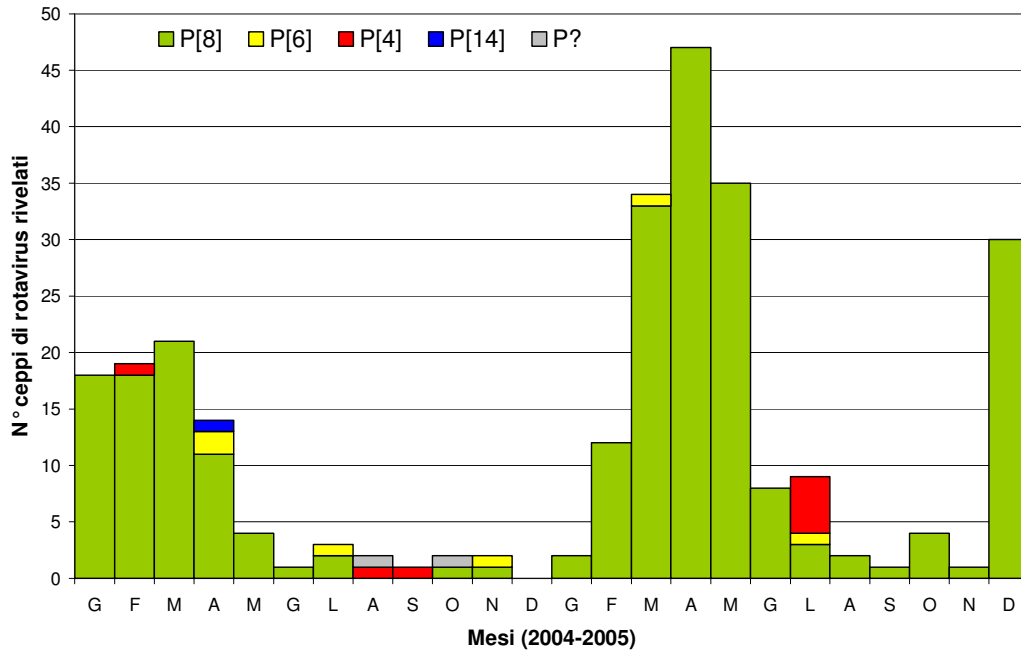


Figura 20. Distribuzione mensile delle specificità antigeniche P di ceppi di rotavirus di gruppo A rivelati nell'area di Parma (2004-2005)

Periodo gennaio-marzo 2008

Nel periodo gennaio-marzo 2008 nell'area di Parma la prevalenza complessiva di infezione da rotavirus in bambini ricoverati con gastroenterite è stata del 27,3% (67 pazienti su 245 esaminati), variando dal 18,6% in gennaio al 35,6% in febbraio (Figura 21).

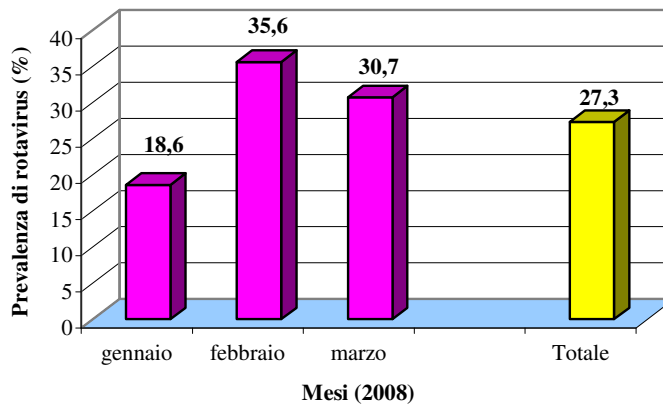


Figura 21. Distribuzione mensile della prevalenza di infezione da rotavirus nell'area di Parma in 245 bambini (età mediana 1 anno e 6 mesi) ricoverati con gastroenterite nel periodo gennaio-marzo 2008.

I risultati ottenuti dalla tipizzazione e dalla determinazione dell'e-tipo dei 67 ceppi complessivamente esaminati sono riportati in Tabella 18.

Tutti i ceppi sottoposti a PAGE (61 ceppi) hanno dimostrato il profilo elettroforetico 4:2:3:2 caratteristico di rotavirus di gruppo A, tranne 4 che hanno dato invece esito negativo. L'80,3% dei ceppi (n=49) presentava e-tipo lungo e il 13,1% (n=8) e-tipo corto. Il 65,6% dei ceppi analizzati è stato caratterizzato come G1P[8].

A dispetto delle associazioni geniche tra G e P tipo ed e-tipo caratteristiche dei diversi genogruppi di rotavirus, nell'ambito dei ceppi di cui è stato possibile disporre dell'e-tipo, 5 stipiti G1+G2P[4], 1 stipite G1+G2P[4]+P[6], 1 stipite G1+G9P[4]+P[8] e 1 stipite G1+G2+G9P[4]+P[8] erano associati ad e-tipo corto, mentre 2 stipiti G1+G2P[8] e 1 stipite G1+G2+G4P[8] erano associati ad e-tipo lungo (Tabella 19).

Tabella 19. Associazioni geniche atipiche di 11 ceppi di rotavirus rivelati in bambini ricoverati con gastroenterite (gennaio-marzo 2008) a confronto con le associazioni geniche tipiche dei genogruppi Wa e DS-1 (indicate in *italico* in prima e seconda riga, rispettivamente).

N° ceppi	VP7	VP4	Elettroferotipo
	<i>G1, G3, G4, G9</i>	<i>P[8]</i>	<i>lungo</i>
	<i>G2</i>	<i>P[4]</i>	<i>corto</i>
5	G1+G2	P[4]	corto
1	G1+G2	P[4]+P[6]	corto
1	G1+G9	P[4]+P[8]	corto
1	G1+G2+G9	P[4]+P[8]	corto
2	G1+G2	P[8]	lungo
1	G1+G2+G4	P[4]+P[8]	lungo

Allo scopo di verificare se le combinazioni inusuali di specificità G e P e/o e-tipo erano dovute a coinfezioni o a fenomeni di riassortimento, per ciascuna combinazione è stato scelto un ceppo rappresentativo del quale sono state determinate le sequenze dei geni VP6 e NSP4.

L'analisi della sequenza aminoacidica dedotta del gene VP6 a confronto con le sequenze di ceppi prototipi di SGI e II, disponibili in GenBank, ha rivelato residui caratteristici di SGI in tutti i ceppi con e-tipo corto e residui caratteristici del SGII in tutti i ceppi con e-tipo lungo (Figura 22).

Tabella 18. Genotipizzazione ed elettroferotipi relativi a 67 ceppi di rotavirus rivelati in bambini ricoverati con gastroenterite nel periodo gennaio-marzo 2008.

GENOTIPI	GENNAIO						FEBBRAIO						MARZO						TOTALE	
	elettroferotipi				totale		elettroferotipi				totale		elettroferotipi				totale		N°	%
	L	C	neg	n.e.	N°	%	L	C	neg	n.e.	N°	%	L	C	neg	n.e.	N°	%		
G1P[8]	9	0	0	2	11	61,0	15	0	0	0	15	58,0	16	0	1	1	18	78,0	44	65,6
G9P[8]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3,8	1	0	0	0	1	4,3	2	3,0	
G4P[8]	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3,8	2	0	0	0	2	8,7	3	4,5
G1+G9P[8]	1	0	1	1	3	17,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4,5
G1+G4P[8]	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3,8	0	0	0	0	0	0	1	1,5
G1+G2P[4]	0	1	0	0	1	5,6	0	3	0	1	4	15,0	0	1	0	0	1	4,3	6	8,9
G1+G2P[4]+P[6]	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3,8	0	0	0	0	0	0	1	1,5
G1+G9P[4]+P[8]	0	1	0	0	1	5,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,5
G1+G2+G9P[4]+P[8]	0	1	0	0	1	5,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,5
G1+G2P[8]	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	7,7	0	0	0	0	0	0	2	3,0
G1+G2+G4P[8]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	4,3	1	1,5
G1+G2P[4]+P[8]	0	0	1	0	1	5,6	0	0	1	0	1	3,8	0	0	0	0	0	0	2	3,0
Totale	10	3	2	3	18	100	19	4	1	2	26	100	20	1	1	1	23	100	67	100

L: lungo.

C: corto

neg: negativo

n.e.: non eseguito per quantità insufficiente di materiale.

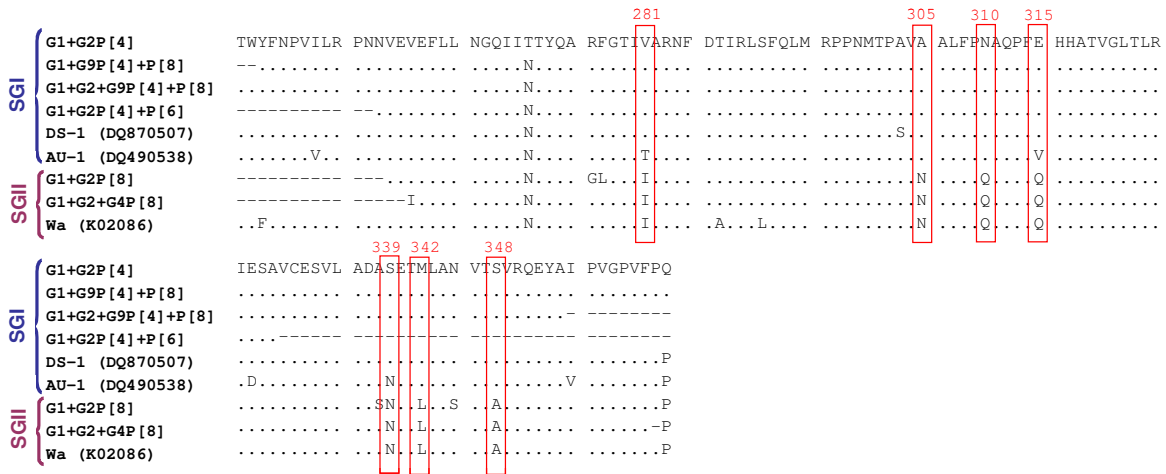


Figura 22. Allineamento delle sequenze amminoacidiche dedotte (aa 246-363) del gene VP6 di 6 ceppi di rotavirus con associazioni geniche atipiche (gennaio-marzo 2008) con quelle dei ceppi di rotavirus di riferimento DS-1, AU-1 (sottogruppo I) e Wa (sottogruppo II). In rosso sono evidenziate le posizioni amminoacidiche determinanti il sottogruppo.

L'analisi filogenetica del gene NSP4, a confronto con le sequenze dello stesso gene di genogruppo A, B, C e D di ceppi di riferimento disponibili in GenBank, ha rivelato NSP4 di tipo A in tutti i ceppi con e-tipo corto e NSP4 di tipo B in tutti i ceppi con e-tipo lungo (Figura 23).

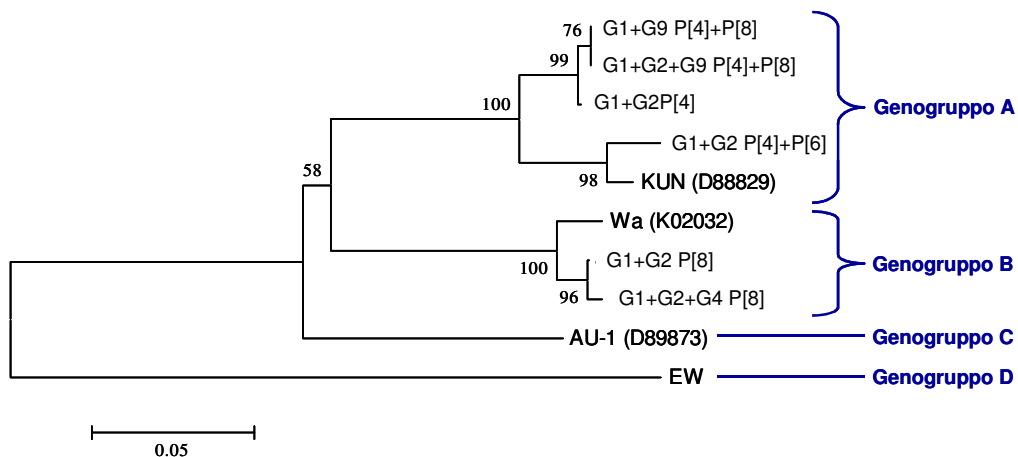


Figura 23. Albero filogenetico delle sequenze amminoacidiche dedotte del gene NSP4 di 6 ceppi di rotavirus con associazioni geniche atipiche (gennaio-marzo 2008) e di quelle di ceppi di riferimento dei genogruppi A-D di NSP4 disponibili in GenBank. Il dendrogramma è stato costruito con il metodo "Neighbour-joining" e il modello "p-distance". Sono indicati i valori di "Bootstrap" >50% (calcolato su 1000 pseudorepliche).

Complessivamente pertanto tutti i ceppi con e-tipo corto come pure il ceppo con esito negativo al PAGE possedevano VP6 di SGI e NSP4 di tipo A, mentre quelli con e-tipo lungo possedevano VP6 di SGII e NSP4 di tipo B (Tabella 19).

Tabella 19. Costellazione genica di 6 ceppi con associazioni atipiche (gennaio-marzo 2008) a confronto con le associazioni geniche tipiche dei genogruppi Wa e DS-1 (indicate in *italico* in prima e seconda riga, rispettivamente).

VP7	VP4	Elettroferotipo	VP6	NSP4
<i>G1, G3, G4, G9</i>	<i>P[8]</i>	<i>lungo</i>	<i>SGII</i>	<i>B</i>
<i>G2</i>	<i>P[4]</i>	<i>corto</i>	<i>SGI</i>	<i>A</i>
G1+G2	P[4]	corto	SGI	A
G1+G2	P[4]+P[6]	corto	SGI	A
G1+G9	P[4]+P[8]	corto	SGI	A
G1+G2+G9	P[4]+P[8]	corto	SGI	A
G1+G2	P[8]	lungo	SGII	B
G1+G2+G4	P[4]+P[8]	lungo	SGII	B

Discussione

Nei tre periodi di studio, in cui la prevalenza annuale di infezione da rotavirus in bambini ricoverati con gastroenterite ha raggiunto un picco del 34,5% nel 2005 (27,3% nel periodo gennaio-marzo 2008), il genotipo G1P[8] si è dimostrato quello maggiormente circolante, con una prevalenza del 55,41% nel 1987-1990, del 42,8% nel 2004-2005 e del 65,7% in gennaio-marzo 2008. Questi risultati sono in accordo con quelli osservati nel periodo 1986-2004 in Sicilia [Arista et al., 2006] e in genere negli ultimi decenni nel resto del mondo [Gentsch et al., 2005; Santos and Hoshino, 2005], a conferma che i rotavirus G1P[8] sono i più diffusi su scala globale. Precedenti studi hanno dimostrato che i ceppi di rotavirus G1 possono persistere per lunghi periodi di tempo nella stessa popolazione. Tale persistenza può trovare ragione nelle variazioni subtipiche (ad esempio G1a, G1b) dei rotavirus dovute a ricombinazioni intrageniche tra varianti e, in particolare, nell'alternarsi di vari lignaggi e sublignaggi sotto l'influenza dei meccanismi di pressione immunitaria [Diwakarla and Palombo, 1999; Arista et al., 2006; Phan et al., 2007; de Rougemont et al., 2008].

Il genotipo G9P[8], tuttavia, non rivelato negli anni 1987-1990 e presente in bassa percentuale (3,6%) nel 2004, è emerso fino a diventare quello prevalente (41,5%) nel 2005 tornando poi a circolare con bassa frequenza (4,4%) in gennaio-marzo 2008. Ceppi con valenza G9 sono stati osservati nel Sud Italia a partire dai primi anni 1990 [Arista et al., 1997, Martella et al., 2004]. Martella e coll. [Martella et al., 2003] hanno osservato a Bari una prevalenza di rotavirus G9 del 53,3%, ipotizzando che tale ritrovamento potesse essere una conseguenza del rilevante afflusso in quell'area a partire dagli anni 1990 di immigrati provenienti da paesi a basso livello sanitario. I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che rotavirus G9 hanno circolato anche a Parma con elevata frequenza, trovando conferma in quelli di studi condotti in altri paesi [Gentsch et al., 2005; Santos and Hoshino, 2005] che indicano i ceppi con specificità G9 come quelli maggiormente circolanti nell'ultimo decennio insieme ai ceppi di specificità G1-G4. Degna di nota è l'osservazione di un picco di infezione da rotavirus G9 (73,4%) durante la stagione 2004-2005 anche in Francia [de Rougemont et al., 2008] e la progressiva diffusione di questi virus nello stesso periodo in molti altri paesi europei [Van Damme et al., 2007].

Un dato interessante è stata l'evidenza di infezioni da rotavirus P[6] a partire dal 1989. Tali virus hanno circolato con relativa alta frequenza (17,6%) nel 1987-1990 e sporadicamente nel 2004-2005 (2,6%) e in gennaio-marzo 2008 (1,5%). Nonostante rotavirus con specificità P[6] siano al terzo posto nell'ambito di quelle maggiormente circolanti nel mondo in relazione alla specificità VP4, virus P[6] sono stati segnalati nell'uomo in modo sporadico nel nostro paese [Arista et al., 1997, Arista et al., 1999] e poco frequentemente (0,3%-1,5%) in Europa e Australia mentre rappresentano dal 3% al 4% delle infezioni da rotavirus nel continente americano, il 7% di quelle in Asia e il 29,4% di quelle in Africa [Santos and Hoshino, 2005]. Poiché questi virus sono stati quasi costantemente associati ad infezioni asintomatiche neonatali, essi sono stati considerati a lungo non virulenti. Tale ipotesi recentemente si è dimostrata non corretta in quanto i rotavirus P[6] sono stati identificati anche da soggetti con gastroenterite, come in questo studio. Inoltre esiste l'evidenza che la diversità dei rotavirus P[6] nell'uomo si sia generata attraverso eventi multipli di trasmissione interspecie [Martella et al., 2006; Martella et al., 2008].

La fluttuazione dei P e G tipi dei rotavirus di gruppo A attraverso il continuo avvicendamento dei ceppi circolanti, osservata in questo studio specialmente nel periodo 2004-2005 e in particolare per i ceppi G9 e P[6], rientra nelle caratteristiche epidemiologiche dei rotavirus e potrebbe rappresentare un meccanismo atto a ridurre la pressione immunitaria specifica. L'identificazione di un'epidemia da virus G9P[8] nel 2005, la cui valenza G9 non è inclusa in quelle vaccinali, sottolinea l'importanza del continuo monitoraggio dei genotipi circolanti.

Altrettanto interessante è stato il ritrovamento di virus (almeno 11 stipiti nel 1987-1990, 1 stipite nel 2004-2004 e 13 stipiti in gennaio-marzo 2008) con associazioni geniche atipiche suggestive di riassortimento inter-genogruppo.

Relativamente al periodo 1987-1990, i cinque ceppi con e-tipo corto inaspettatamente associato a genotipo G1P[8], SGII o SGI+II e NSP4 di genogruppo B molto probabilmente hanno avuto origine da un riassortimento intergenogruppo (Wa x DS-1), determinato

dall'introduzione dell'undicesimo oppure del sesto e dell'undicesimo segmento di RNA virale di un ceppo di genogruppo DS-1 (G2P[4], SGI, e-tipo corto, NSP4 di genogruppo A) nel corredo genetico di un ceppo Wa (G1P[8], SGII, e-tipo lungo, NSP4 di genogruppo B), entrambi co-circolanti nel periodo di studio.

L'analisi delle sequenze dei geni VP7 e VP4 dei ceppi G1P[8] circolanti a Parma nel periodo 1987-1990 ha dimostrato una stretta relazione genetica con i ceppi G1P[8] circolanti in Sicilia alla fine degli anni 1980. Questi risultati suggeriscono che stipiti di rotavirus possono diffondere rapidamente tra aree geografiche distanti anche oltre un migliaio di Km. Inoltre, dal momento che i geni VP7 e VP4 di ceppi G1P[8] con e-tipo corto sono risultati virtualmente identici a quelli di ceppi G1P[8] con e-tipo lungo, è molto probabile che i ceppi atipici G1P[8] abbiano avuto origine dal riassortimento tra ceppi circolanti localmente piuttosto che dall'introduzione di nuovi ceppi.

Al contrario, il virus P[6]+P[8]G1, con e-tipo corto, SGII e NSP4 B potrebbe più verosimilmente rappresentare un'infezione mista tra un virus P[6] e un ceppo riassortante intergenogruppo G1P[8] con e-tipo corto, dal momento che tale ceppo ha mostrato un'identità nel gene VP7 circa del 100% con ceppi G1P[8] con e-tipo corto circolanti in quegli anni con relativa alta frequenza (6,8%).

Infine, il fatto che i due stipiti con e-tipo corto, SGI, P[4] e con doppia reattività G1+G2 siano risultati possedere NSP4 di genogruppo A, e che l'analisi di sequenza del gene VP4 abbia rivelato identità nt prossima al 100% con un ceppo P[4]G2 co-circolante, sembra confermare l'ipotesi che siano anch'essi frutto di un riassortimento intergenogruppo (Wa x DS-1) di ceppi circolanti localmente, risultante in un virus DS-1-simile a carattere polialelico nel gene VP7 ossia contenente due alleli del gene VP7 (G1+G2). Virus con doppia reattività nei geni VP4 o VP7 sono stati già identificati e proposti come virus mosaico, caratterizzati da una costellazione genetica flessibile [Page and Steele, 2004]. Dal momento che all'interno della particella virale esiste spazio in abbondanza, è possibile che in caso di coinfezione della stessa cellula ospite con due ceppi di rotavirus l'uno DS1-simile e l'altro Wa-simile, durante l'assemblaggio del virione si verifichi l'acquisizione di un gene in più da parte di uno dei due virus, in questo caso il gene VP7. Un'interessante teoria proposta da Gouvea e Brantly [Gouvea and Brantly, 1995] suggerisce che ciascuno stipite di rotavirus esista come una popolazione eterogenea di riassortanti e relative varianti alleliche. Tale ipotesi, riflettendo il moderno concetto di quasispecie proposto per i virus ad RNA, spiegherebbe le complesse dinamiche evolutive dei rotavirus.

Allo stesso modo, il ceppo G1P[4]+P[8] con e-tipo corto, SGI+II e NSP4 di genogruppo B potrebbe rappresentare un virus polialelico derivato da riassortimento intergenogruppo Wa x DS-1 e contenente 2 alleli dei geni VP4 e VP6.

A dispetto della relativa alta frequenza di ceppi atipici riassortanti intergenogruppo (Wa x DS-1) riscontrata negli anni 1987-1990 (9,5%), dei 271 ceppi di rotavirus relativi al periodo 2004-2005 e sottoposti a genotipizzazione, solo 1 (0,4%) di genotipo G1+G2P[8] con e-tipo lungo ha mostrato associazione atipica tra e-tipo e G tipo suggestiva di riassortimento intergenogruppo. La relativa bassa frequenza di ceppi atipici riscontrata in questo periodo

confermerebbe la rarità del fenomeno di riassortimento intergenogruppo che potrebbe essere dovuta a bassa compatibilità genetica e/o ad impedimenti strutturali come pure alle condizioni dell'ospite.

Per quanto riguarda il periodo gennaio-marzo 2008, esso è stato caratterizzato dalla circolazione, oltre che di ceppi G1P[8], G9P[8] e G4P[8], anche di ceppi con 6 diverse associazioni atipiche. I risultati dell'analisi molecolare di questi ultimi ceppi consentono di ipotizzare con molta probabilità che il ceppo con e-tipo lungo inaspettatamente associato a G1+G2P[8], SGII e NSP4 di genogruppo B (rappresentativo di due ceppi) e il ceppo con e-tipo corto associato a genotipo G1+G2 P[4], SGI e NSP4 di genogruppo A (rappresentativo di 5 ceppi) possano essere frutto di un riassortimento inter-genogruppo Wa x DS-1, ossia tra rotavirus G1P[8], SGII, e-tipo lungo e NSP4 di tipo B (genogruppo Wa) e rotavirus G2P[4], SGI, e-tipo corto e NSP4 di tipo A (genogruppo DS-1), risultante in un virus a carattere polialelico (G1 + G2) nel gene VP7.

Inoltre, il virus G1+G2+G4P[8] con e-tipo lungo, SGII e NSP4 di genogruppo B potrebbe rappresentare un'infezione mista tra un riassortante inter-genogruppo G1+G2P[8] con e-tipo lungo, circolante in quel periodo (0,01%: 1 di 67 ceppi esaminati) e un virus G4. Analogamente, il virus G1+G2P[4]+P[6] con e-tipo corto, SGI e NSP4 di genogruppo A potrebbe rappresentare un'infezione mista tra un riassortante inter-genogruppo G1+G2P[4] con e-tipo corto, circolante in quel periodo con relativa alta frequenza (7,5%: 5 di 67 ceppi esaminati), e un virus P[6].

Nei rimanenti casi si potrebbe trattare molto verosimilmente di coinfezioni nello stesso ospite da parte di rotavirus Wa-simili e DS1-simili, dei quali il ceppo maggiormente rappresentato è quello che si è reso visibile al PAGE e/o che è stato rivelato dal sequenziamento mentre il ceppo presente in minor quantità è quello che è stato svelato solo attraverso amplificazione genica.

Complessivamente, questo studio epidemiologico molecolare ha permesso di rivelare un'insolita circolazione nell'area di Parma nei periodi 1987-1990 e gennaio-marzo 2008 di ceppi di rotavirus di gruppo A riassortanti intergenogruppo (almeno nel 9,5% dei casi, 7 su 74 ceppi e almeno nel 10,5% dei casi: 7 su 67 ceppi, rispettivamente). Questo risultato sembra assumere particolare rilievo se confrontato con i risultati ottenuti nella stessa area e relativi ai ceppi circolanti solo 3 anni prima (2004-2005), quando rotavirus riassortanti intergenogruppo erano stati osservati solo nello 0,4%. Se il riassortimento intragenogruppo è riconosciuto come un evento abbastanza frequente, quello intergenogruppo è considerato un evento estremamente raro [Nakagomi and Nakagomi, 2002]. E' stato dimostrato che esiste un'associazione favorita tra i geni di uno stesso genogruppo ("linkage genetico") dovuta verosimilmente ad una pressione selettiva intrinseca delle proteine virali durante l'assemblaggio virionico [Heiman et al., 2008] e, al contrario, una bassa compatibilità genetica tra i geni di genogruppi diversi. Tuttavia sembra che, una volta che il riassortimento intergenogruppo si verifica, i ceppi riassortanti possano diffondersi ed acquisire rilevanza epidemiologica. Uno studio sulla circolazione di rotavirus nell'area di Palermo negli ultimi 20 anni se, da un lato, ha confermato la costante prevalenza del genotipo G1P[8] nel tempo, dall'altro, ha dimostrato l'esistenza di fluttuazioni nella circolazione degli altri genotipi

[Arista et al. 2006]. In accordo con questa evidenza è verosimile ipotizzare che anche la circolazione di ceppi di rotavirus frutto di riassortimento intergenogruppo possa subire fluttuazioni negli anni, acquisendo un certo rilievo epidemiologico in alcuni periodi (come nell'area di Parma nei periodi 1987-1990 e gennaio-marzo 2008) e perdendo significatività epidemiologica in altri (come nell'area di Parma nel periodo 2004-2005).

Esiste il timore che l'introduzione del vaccino contro l'infezione da rotavirus possa alterare le dinamiche e gli equilibri che guidano l'evoluzione di tali virus, determinando la selezione e la diffusione di nuovi ceppi antigenicamente diversi da quelli inclusi nella formulazione vaccinica. Il vaccino Rotarix™ monovalente G1P[8] (GlaxoSmithKline, Belgio) se, da un lato, si è dimostrato efficace contro la maggior parte dei ceppi di rotavirus, dall'altro, sembra avere poco successo contro i ceppi G2P[4] [Salinas et al. 2005; Gurgel et al. 2007; Nakagomi et al. 2008], che sono geneticamente molto diversi dal ceppo vaccinico. Il vaccino polivalente Rotateq, invece, sembra essere più adatto a conferire protezione anche nei confronti della specificità G2 e P[4]. Entrambi i vaccini tuttavia non includono nella loro formulazione la specificità G9, emersa negli ultimi anni quale quinta specificità maggiormente circolante a livello mondiale e rivelata nell'area di Parma nel 32,9% negli anni 2004-2005 e nel 10,4% nel periodo gennaio-marzo 2008. Inoltre, in soggetti vaccinati sono state osservate differenze significative nei titoli di anticorpi diretti contro stipiti G1 dello stesso lignaggio di quello del vaccino e stipiti G1 di lignaggio diverso [Jin et al. 1996]. Infine l'elevata prevalenza di riassortanti intergenogruppo di rotavirus (10,5%) dimostrata in questo studio relativamente al periodo gennaio-marzo 2008 e già osservata 20 anni prima nella stessa area, potrebbe indurre a ipotizzare che i meccanismi genetici che regolano l'evoluzione di rotavirus possano ridurre o addirittura vanificare l'efficacia del vaccino con una frequenza più elevata di quanto è stato finora stimato.

Pertanto, in accordo con queste osservazioni, negli studi di sorveglianza dell'infezione da rotavirus sembra importante identificare non solo e-tipo, G e P tipo ma anche SG e genogruppo NSP4 dei ceppi virali circolanti, al fine di aumentare le conoscenze sulle costellazioni genetiche dei ceppi atipici e comprendere meglio le dinamiche dell'epidemiologia molecolare di questi virus. Inoltre, sebbene le fluttuazioni dei genotipi di rotavirus, basate sulla pressione immunitaria e su fattori legati al virus, rientrino nelle caratteristiche dell'epidemiologia molecolare di tali agenti, un continuo monitoraggio dei genotipi circolanti nei diversi paesi rimane necessario per documentare la distribuzione dei ceppi e/o l'eventuale emergenza di genotipi nuovi o rari con l'obiettivo, da un lato, di disporre di un quadro epidemiologico molecolare rappresentativo dei ceppi di rotavirus circolanti nell'era pre-vaccinale e, dall'altro, di contribuire eventualmente ad implementare l'efficacia del vaccino.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI DUE CEPPI DI ROTAVIRUS DI GRUPPO C RIVELATI NEL PERIODO 2004-2005

Risultati

Nell'ambito dello studio relativo al periodo 2004-2005 sono stati identificati mediante PAGE due ceppi di rotavirus con profilo elettroforetico 4:3:2:2 caratteristico di rotavirus di gruppo C (GCRV) (Figura 24).

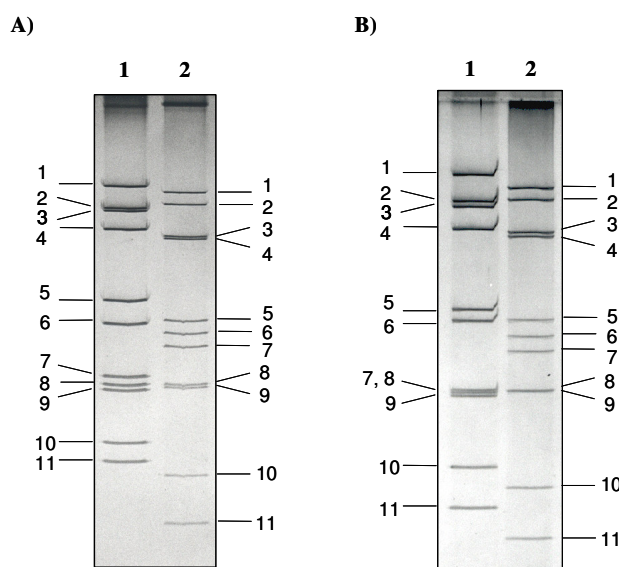


Figura 24. Profilo di migrazione di 2 ceppi di rotavirus di gruppo C (GCRV) a confronto con 2 ceppi di rotavirus di gruppo A (GARV). A) posizione 1: profilo 4:2:3:2 di un ceppo GARV con e-tipo corto; posizione 2: profilo 4:3:2:2 del ceppo GCRV PR042593. B) posizione 1: profilo 4:2:3:2 di un ceppo GARV con e-tipo lungo; posizione 2: profilo 4:3:2:2 del ceppo GCRV PR05884

L'amplificazione dei geni VP4 e VP7 e parte del gene VP6 di GCRV condotta sugli acidi nucleici estratti dai relativi campioni di feci hanno confermato la presenza di GCRV in entrambi i casi.

I due ceppi GCRV erano stati rivelati l'uno nelle feci di un bambino di 2 anni in agosto 2004 (ceppo PR042593) e l'altro nelle feci di una bambina di 4 anni in marzo 2005 (ceppo PR05884) attestando l'assenza di correlazione epidemiologica tra i due casi. Nel tentativo di rivelare infezioni da GCRV al di sotto della sensibilità della ME, un pannello di 30 campioni appartenenti a bambini ricoverati con gastroenterite nel periodo febbraio-marzo 2005 (circa un mese prima e un mese dopo il secondo rilevamento di infezione da GCRV) e negativi per particelle rotavirus-simili alla ME è stato sottoposto ad eminested RT-PCR specifica per GCRV. Il ceppo PR05884 rivelato in questo stesso periodo è stato utilizzato come controllo positivo. Tutti i 30 campioni di feci sono risultati negativi, dimostrando la natura sporadica dell'infezione sostenuta da questo gruppo di rotavirus. Mediante i metodi di laboratorio utilizzati di routine per le indagini virologiche (ME, coltura cellulare

convenzionale e nRT-PCR specifica per norovirus) non era stata rivelata nessuna coinfezione da parte di altri agenti virali.

Allo scopo di studiare l'eterogeneità genetica tra i GCRV e determinare le correlazioni genetiche tra i due ceppi italiani e ceppi circolanti in altri paesi, sono state analizzate le sequenze dei geni VP4, VP6 e VP7 dei due ceppi in studio e queste sono state confrontate tra loro e con ceppi GCRV umani e animali disponibili in GenBank, elencati in tabella 20.

Tabella 20. Ceppi di rotavirus di gruppo C umani e animali utilizzati per l'analisi di sequenza e filogenetica dei ceppi PR042593 e PR05884.

Ceppo	Origine	Paese	Periodo rivelazione/anno descrizione
Jajeri	Umana	Nigeria	1999-2000
Moduganari	Umana	Nigeria	1999-2000
208	Umana	Cina	1994-1995
A93M	Umana	Australia	1993
Belem	Umana	Brasile	1989
Bristol	Umana	Regno Unito	1990
Preston	Umana	Regno Unito	1992
Ad957	Umana	Stati Uniti	1996
Santiago	Umana	Argentina	1886
Uppsala/1004	Umana	Svezia	1997
Solano	Umana	Argentina	1996
I57	Umana	Giappone	1990
BCN6	Umana	Spagna	1997-2000
BCN9	Umana	Spagna	1997-2000
BCN21	Umana	Spagna	1997-2000
DhakaC13	Umana	Bangladesh	2003
Javeriana	Umana	Colombia	2003
T97/190	Umana	Svezia	1996
A/90L	Umana	Australia	1990
SI-716/03	Umana	Slovenia	2003
SI-1394/04	Umana	Slovenia	2004
SI-82/05	Umana	Slovenia	2005
Wu82	Umana	Cina	2007
CMH004/03	Umana	Tailandia	2003
AE53	Umana	Giappone	2004
KA4/1017	Umana	Svezia	1997
OK118	Umana	Giappone	1988
BaC11549/03	Umana	Ungheria	2003
BaC6104/03	Umana	Ungheria	2003
Cowden	Suina	Stati Uniti	1982
WH	Suina	Stati Uniti	1991
118-05-1 [^]	Suina	Italia	2005
134-04-18 [^]	Suina	Italia	2003
43-06-22 [^]	Suina	Italia	2005
HF	Suina	Stati Uniti	1991
Shintoku	Bovina	Giappone	1991
Yamagata	Bovina	Giappone	2002
WD534tc	Bovina	Stati Uniti	1999

[^]: I ceppi suini 118-05-1, 134-04-18 e 43-06-22 sono rappresentativi di 10 ceppi (GenBank EF464648-EF464657) inclusi nell'analisi genetica del gene VP7.

L'analisi delle sequenze ha dimostrato che i due ceppi PR042593 e PR05884 erano geneticamente correlati, dal momento che mostravano tra loro identità nucleotidica (nt) del 99,7% e aminoacidica (aa) del 99,6% per il gene VP7, nt del 99,7% e aa del 100% per il gene VP4 e nt del 99,6% e aa del 100% per il gene VP6. Tali risultati suggeriscono che un singolo ceppo GCRV circolava nell'area di Parma nel periodo di studio.

I ceppi PR042593 e PR05884 hanno mostrato elevata identità nucleotidica (>95,3%) e aminoacidica (>95,7%) con altri ceppi GCRV umani (Tabella 21). In particolare, le sequenze VP7 hanno mostrato maggiore correlazione con il ceppo umano giapponese AE53 (GenBank AB281655) (identità nt e aa del 99,7% per il ceppo PR042593 e nt del 99,9% e aa del 100% per il ceppo PR05884), mentre le sequenze VP4 erano maggiormente correlate a quelle del ceppo thailandese CMH004/03 (identità nt del 99,1% e aa del 100% per il ceppo PR042593 e nt del 98,9% e aa del 99,7% per il ceppo PR05884). Analogamente, le sequenze VP6 dei due ceppi italiani hanno mostrato la maggiore identità (identità nt del 98,6% e aa del 100% per il ceppo PR042593 e nt del 98,3% e aa del 100% per il ceppo PR05884) col ceppo thailandese CMH004/03 e con i ceppi slovacchi SI-1394/04 e SI-82-05.

Tabella 21. Identità nucleotidica e aminoacidica tra i ceppi di rotavirus di gruppo C (GCRV) PR042593 e PR05884 con ceppi GCRV umani e animali (suini e bovini) ottenuti in GenBank.

Origine dei ceppi	Gene	N° di ceppi	Identità (intervallo %) con PR042593 e PR05884	
			nucleotidica	aminoacidica
Umana	VP4	12	95,6-99,1	96,3-100
	VP6	15	95,9-98,6	95,7-100
	VP7	24	95,3-99,9	96,7-100
Animale	VP4	2	67,5-70,1	67,5-68,6
	VP6	4	81,9-84,3	82,1-86,3
	VP7	15	72,0-83,6	69,5-86,5

I ceppi umani e animali (suini e bovini) confrontati con i ceppi PR042593 e PR05884 sono elencati in Tabella 20.

La correlazione genetica dei due ceppi PR042593 e PR05884 con ceppi asiatici circolanti recentemente è mostrata negli alberi filogenetici in figura 25.

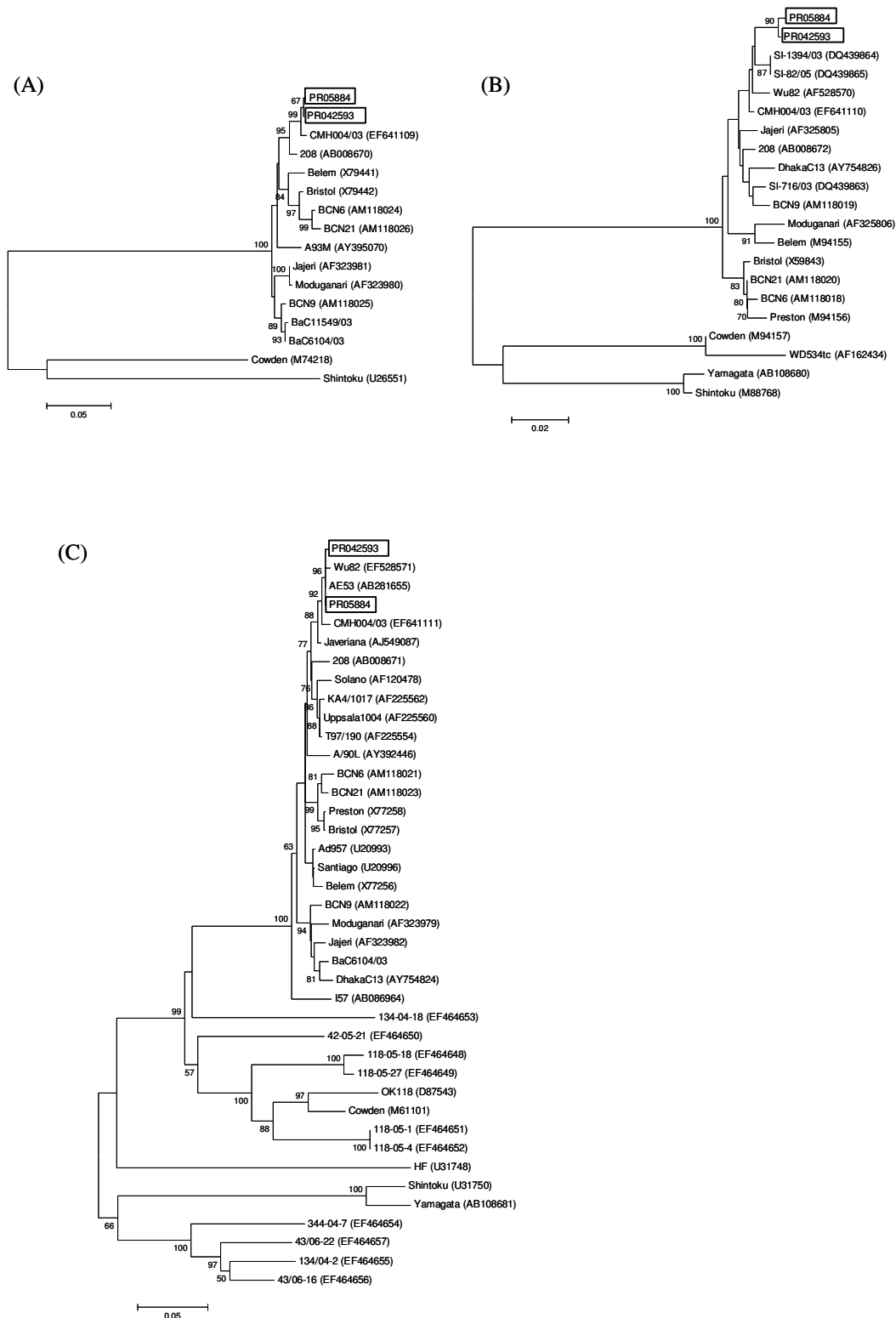


Figura 25. Alberi filogenetici delle sequenze nucleotidiche del gene VP4 (A), VP6 (B) e VP7 (C) di due ceppi di rotavirus di gruppo C (PR042593 e PR05884) rivelati a Parma nel periodo 2004-2005 a confronto con quelle di altri ceppi di rotavirus di gruppo C umani e animali disponibili in GenBank. I codici di accesso GenBank sono indicati tra parentesi. Le sequenze dei ceppi BaC11549/03 e

BaC6104/03 sono state gentilmente fornite dal Dott. Bányai K. del Regional Laboratori of Virology, Baranya County Institute of State Public Health Service, Ungheria.[Bányai et al., 2006]. I dendrogrammi sono stati costruiti con il metodo “neighbour-joining” e il modello “p-distance”. Sono indicati i valori di “bootstrap” > 50% (calcolato su 1000 pseudorepliche).

Discussione

A causa del numero limitato di studi condotti sui GCRV e della mancanza di saggi commerciali per l'identificazione di questo gruppo di rotavirus in casi di gastroenterite, le informazioni inerenti l'epidemiologia dei GCRV sono incomplete. La prevalenza di infezione da GCRV osservata nei due anni di studio nell'area di Parma in bambini ricoverati con enterite è risultata bassa, pari allo 0,23% (2 su 857 bambini esaminati) . Questo risultato potrebbe essere dovuto ad una sottostima a causa, da un lato, della bassa sensibilità della ME e, dall'altro, della popolazione di studio che escludeva le gastroenteriti lievi e le infezioni asintomatiche. Ciononostante, i risultati ottenuti confermano recenti segnalazioni sulla circolazione di questi virus in Europa [Sanchez-Fauquier et al., 2003; Bányai et al., 2006; Steyer et al., 2006; Abid et al., 2007] e dimostrano che tale patogeno enterico è presente anche in Italia. Inoltre, dalla continua sorveglianza dell'infezione da rotavirus nell'uomo condotta mediante ME e PAGE presso il laboratorio di Virologia a Parma dal 1987, non erano mai emerse infezioni da GCRV prima del periodo 2004-2005 [Medici, osservazione personale]. La percentuale di casi di infezione da GCRV rivelata in questo studio se, da un lato, si avvicina a quella dello 0,6% osservata nel 2003 in Ungheria da Bányai e Coll. [2006] in casi sporadici di gastroenterite, dall'altro, si allontana da quelle riscontrate in Giappone, >4,7% nel periodo novembre 1992- aprile 1993 [Kuzuya et al., 1998] e 10,2% nel periodo luglio 2002-giugno 2003 [Phan et al., 2004], in occasione di episodi epidemici di gastroenterite. In accordo con queste osservazioni, è verosimile ipotizzare che nell'epidemiologia dei GCRV possano avvenire marcate variazioni geografiche/temporali. Questo studio fornisce un'ulteriore evidenza che i GCRV sono una causa di diarrea infantile diffusa, sebbene sporadica.

L'analisi filogenetica dei due stipiti GCRV rivelati a Parma dimostra la loro chiara appartenenza al cluster umano per tutti i tre geni. In particolare, nei geni VP4 e VP7 i due ceppi hanno mostrato maggiore correlazione genetica con ceppi asiatici circolanti negli anni più recenti piuttosto che con ceppi europei, dimostrando eterogeneità genetica tra i GCRV circolanti in Europa. Questi risultati suggeriscono che, come osservato nell'epidemiologia di altre malattie da infezione [Romi et al., 2002; Corbett et al., 2003; Widdowson et al., 2005b; Kobasa and Kawaoka, 2005; Hui, 2006], i cambiamenti demografici (flussi migratori) e l'incremento dei viaggi e del commercio possono influenzare l'epidemiologia dei virus enterici, inclusi i GCRV.

Recenti studi molecolari sembrano supportare la possibile trasmissione zoonosica dei GCRV [Chang et al., 1999; Gabbay et al., 2006; Martella et al., 2007b]. Iturriza-Gómara e coll. [2004b] hanno dimostrato alti livelli di anticorpi anti-GCRV in popolazioni umane residenti nella campagna inglese rispetto a quelle residenti in città. Inoltre, uno studio rivolto al monitoraggio dell'epidemiologia dei GCRV nei suini nel Centro e Nord Italia, inclusa la provincia di Parma, ha rivelato circa il 30% di prevalenza da GCRV nei maialini con enterite [Martella et al., 2007a]. Pertanto, si potrebbe ipotizzare che la popolazione umana che vive in queste aree sia continuamente esposta ai GCRV suini, sebbene questa ipotesi non sia sostenuta dai dati epidemiologici e molecolari riportati in questo studio.

Al fine di indagare i fattori che influenzano l'epidemiologia dei GCRV sarebbe opportuno "monitorare" l'infezione da tali virus in casi di gastroenterite umana in un lungo arco di tempo e a livello di tutte le classi di età.

L'inclusione negli algoritmi diagnostici delle enteriti virali di saggi in grado di identificare i GCRV rispetto ai GARV con un minimo costo aggiuntivo potrebbe essere utile per controllare gli eventuali cambiamenti nell'epidemiologia di questi virus e ottenere informazioni rilevanti ai fini di una migliore comprensione dell'ecologia dei GCRV.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN CEPPLO DI ROTAVIRUS DI GRUPPO A E GENOTIPO G8P[14].

Risultati

Nell'ambito dello studio relativo al periodo 2004-2005, nelle feci di un bambino di 4 anni e 8 mesi è stato identificato un ceppo di rotavirus di gruppo A con specificità G8 (ceppo PR/1300/04), non tipizzabile per il gene VP4. Tale ceppo ha mostrato e-tipo lungo con un profilo di migrazione atipico (b-a-g-a, in base alla classificazione secondo Lourenco e collaboratori, 1981) rispetto a quello dei ceppi circolanti nello stesso periodo (profilo di migrazione b-c-e-a). L'analisi di un tratto della sequenza del gene VP4 di tale ceppo ha evidenziato che si trattava di un tipo P[14].

I geni VP4 e VP7 del ceppo G8P[14] sono stati amplificati e sequenziati. Il sequenziamento del gene VP4 è stato ripetuto dato che quello precedente aveva dato un esito parziale. Inoltre, di questo ceppo è stato determinato il sottogruppo attraverso amplificazione e sequenziamento del gene VP6. Le sequenze sono state confrontate con quelle di ceppi di rotavirus di gruppo A di riferimento e di ceppi di rotavirus di gruppo A circolanti nel mondo sia umani che animali disponibili in GenBank. Le sequenze nucleotidiche dei geni VP6, VP4 e VP7 ottenute per il ceppo PR/1300/04 sono state depositate in GenBank sotto i numeri di accesso EU835943, EU835944 e EU835945, rispettivamente.

All'analisi di sequenza, il gene VP4 del ceppo PR/1300/04 ha mostrato la maggiore identità nucleotidica (96%) e aminoacidica (99,1%) con il ceppo umano PA169, di genotipo G6P[14], e-tipo lungo e SGI rivelato a Palermo nel 1988 e caratterizzato da Gerna e collaboratori [1992] (Tabella 22).

Tabella 22. Identità nucleotidica e aminoacidica del gene VP4 del ceppo di rotavirus di gruppo A PR/1300/05 con quelle di ceppi di rotavirus di gruppo A umani ed animali con specificità P[14] disponibili in GenBank. Il ceppo K8 di specificità P[9] è stato utilizzato nell'analisi filogenetica come gruppo esterno (In carattere grassetto sono indicate le percentuali di identità maggiori e in carattere italico quelle minori).

Ceppo	Origine	Paese	N° accesso GenBank	Identità %	
				Nucleotidica	Aminoacidica
PA169	Umana	Italia	L20874	96,0	99,1
HAL1166	Umana	Finlandia	L20875	88,3	97,9
B4106	Umana	Belgio	AY740738	81,6	93,6
Hun5	Umana	Ungheria	AJ488139	95,9	98,9
Mc35	Umana	Tailandia	D14032	85,6	94,8
MG6	Umana	Australia	U22012	89,4	97,8
DG8	Umana	Australia	AF034853	89,8	96,9
EGY2295	Umana	Egitto	AF104103	86,7	97,5
EGY1850	Umana	Egitto	AF104101	85,0	96,4
30/96	Coniglio	Italia	DQ205224	81,7	93,0
ALA	Coniglio	Stati Uniti	U62149	81,5	93,0
C-11	Coniglio	Stati Uniti	U62150	81,9	93,0
<i>R2</i>	<i>Coniglio</i>	<i>Giappone</i>	<i>U62151</i>	<i>81,0</i>	<i>92,0</i>
BAP2	Coniglio	Stati Uniti	U62152	84,3	93,3
Cap455	Capra	Sud Africa	AY128709	90,1	97,1
Sun9	Bovina	Giappone	AB158430	86,2	94,5
K8	Umana	Giappone	D90260	78,1	86,3

Al contrario, il gene VP7 ha mostrato la maggiore identità nucleotidica (97,9%) con il ceppo bovino giapponese BRV_16 e aminoacidica (99,4%) con i ceppi bovini O-Agent e Niigata9801 rivelati in Sud Africa e in Giappone, rispettivamente (Tabella 23).

Tabella 23. Identità nucleotidica e aminoacidica del gene VP7 del ceppo di rotavirus di gruppo A PR/1300/05 con quelle di ceppi di rotavirus di gruppo A umani ed animali con specificità G8 disponibili in GenBank. Il ceppo NCDV di specificità G6 è stato utilizzato nell'analisi filogenetica come gruppo esterno. In carattere grassetto sono indicate le percentuali di identità maggiori e in carattere italico quelle minori.

Ceppo	Origine	Paese	N° accesso GenBank	Identità %	
				Nucleotidica	Aminoacidica
BG8.01	Umana	Australia	AF207060	88,6	98,8
mG8.01	Umana	Australia	AF207061	88,6	98,1
SI-885-06	Umana	Slovenia	DQ995179	85,3	96,6
EGY1850	Umana	Egitto	AF104102	84,7	97,5
EGY2295	Umana	Egitto	AF104104	83,9	96,9
DG8	Umana	Australia	AF034852	89,1	97,5
MP409	Umana	India	AF141918	83,4	95,4
GR570	Umana	UK	AF143688	84,0	94,7
QEH14262	Umana	UK	AF143689	85,9	96,3
UP30	Umana	Sud Africa	AF143690	83,2	93,5
HAL1166	Umana	Finlandia	L20882	87,5	98,8
HMG89	Umana	Nigeria	X98918	83,7	95,0
69M	Umana	Indonesia	Green et al., 1989	88,3	98,1
DRC88	Umana	Rep. Dem. Congo	DQ005109	83,7	95,4
DRC86	Umana	Rep. Dem. Congo	DQ005120	83,8	95,4
O-Agent	Bovina	Sud Africa	DQ838598	95,4	99,4
KAG 87	Bovina	Giappone	AB077056	94,3	94,7
KAG74	Bovina	Giappone	AB077053	95,5	95,4
KAG75	Bovina	Giappone	AB077054	96,7	98,1
C-8008	Bovina	Stati Uniti	U14998	94,6	96,3
Sun9	Bovina	Giappone	AB158431	95,5	97,8
Cody	Bovina	Stati Uniti	U14999	87,0	97,2
Niigata9801	Bovina	Giappone	AB044293	97,6	99,4
Tokushima9503	Bovina	Giappone	AB044294	97,0	98,8
678	Bovina	UK	L20883	88,4	98,1
BRV_16	Bovina	Giappone	AB077058	97,9	98,1
GRV RioNegro	Guanaco	Argentina	AF545859	97,5	98,8
GRV Chubut	Guanaco	Argentina	AF545860	97,4	97,5
NCDV	Bovina	Stati Uniti	M12394	74,9	82,7

Dall'analisi della sequenza aminoacidica dedotta del frammento del gene VP6 a confronto con le sequenze di ceppi di riferimento e non, di SGI e II disponibili in GenBank, sono emersi residui aminoacidici conservati caratteristici dei GARV di SGI, quali 305 alanina (A), 310 asparagina (N), 315 acido glutammico (E), 339 serina (S), 342 metionina (M) e 348

Tabella 24. Identità nucleotidica e aminoacidica del gene VP6 del ceppo di rotavirus di gruppo A PR/1300/05 con quello di ceppi di rotavirus di gruppo A umani ed animali di sottogruppo I e II disponibili in GenBank. Il ceppo Cowden di gruppo C è stato utilizzato nell'analisi filogenetica come gruppo esterno (In carattere grassetto sono indicate le percentuali di identità maggiori e in carattere italico quelle minori).

Ceppo	Origine	Paese	N° accesso GenBank	Identità %	
				Nucleotidica	Aminoacidica
PA169	Umano	Italia	EF554130	87,6	99,2
NCDV	Bovino	Stati Uniti	M12394	87,9	99,2
1076	Umano	Svezia	D00325	94,7	98,4
Wa	Umano	Stati Uniti	K02086	72,8	91,9
DS-1	Umano	Stati Uniti	DQ870507	85,4	97,6
AU-1	Umano	Giappone	DQ490538	76,2	94,4
FI-14	Equino	Stati Uniti	D00323	75,4	91,9
Gottfried	Suino	Stati Uniti	D00326	75,9	92,7
OSU	Suino	Stati Uniti	AF317123	73,5	91,9
SA11	di scimmia	Sud Africa	M27824	82,0	96,0
OH4	Equino	Giappone	D82975	88,3	99,2
US5139	Umano	Stati Uniti	EF426130	88,2	98,4
RF	Bovino	Francia	K02254	87,6	98,4
HP140	Suino	India	DQ003295	87,2	99,2
H-1	Equino	Inghilterra	AF242394	73,5	91,1
OVR762	Ovino	Spagna	EF554152	88,2	97,6
<i>PO-13</i>	<i>Aviario</i>	<i>Giappone</i>	<i>D16329</i>	<i>61,6</i>	<i>75,0</i>
E210	Umano	Australia	U36240	75,5	92,7
EW	Murino	Stati Uniti	U36474	73,7	95,2
Cowden (gruppo C)	Suino	Stati Uniti	M94157	25,2	24,4

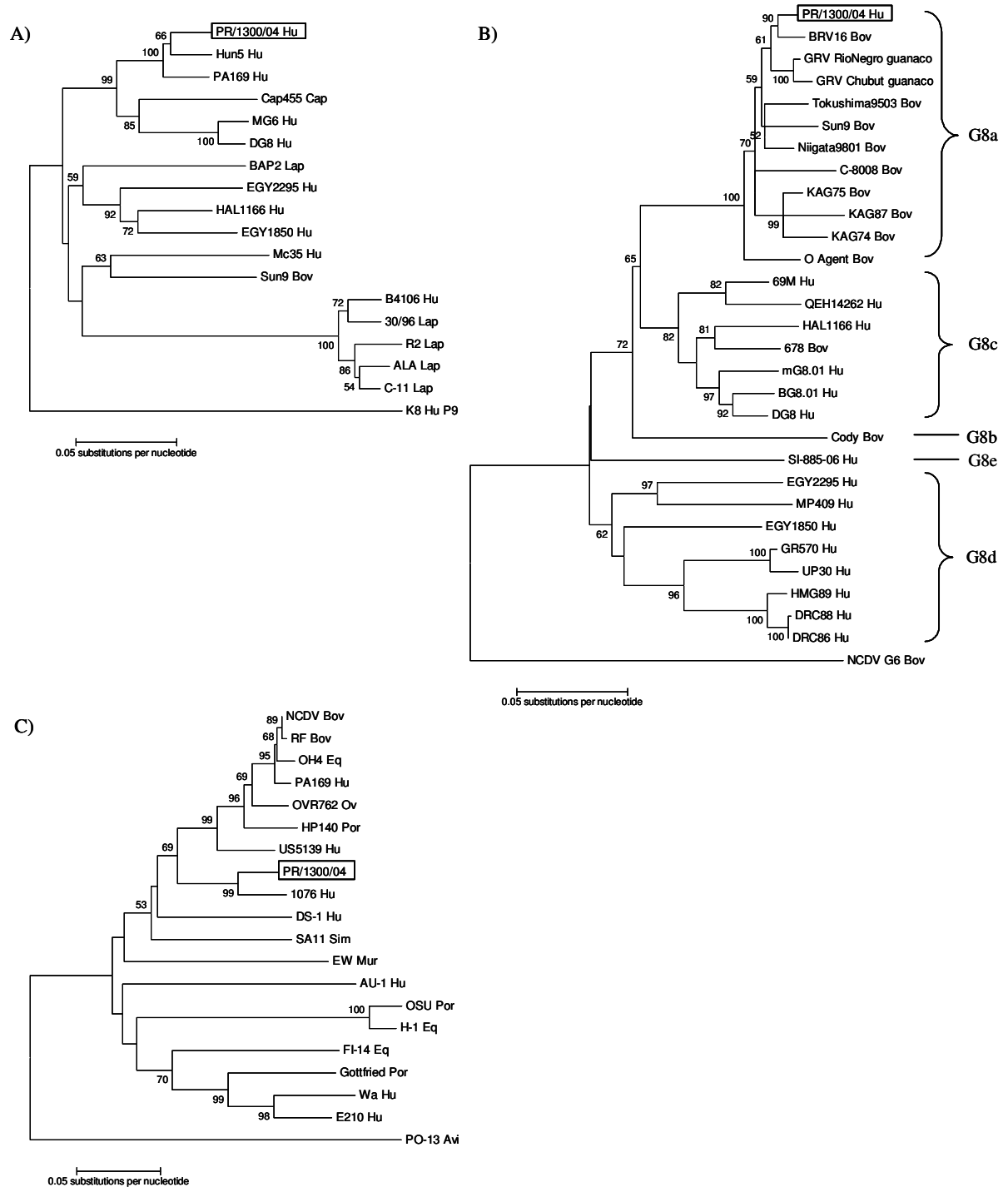


Figura 27. Alberi filogenetici delle sequenze nucleotidiche (nt) parziali dei geni (A) VP4 (nt da 64 a 1050), (B) VP7 (nt da 40 a 989) e (C) VP6 (nt da 753 a 1123) del ceppo di rotavirus PR/1300/04 a confronto con altri ceppi di rotavirus di specificità P[14] (A), G8 (B) e di sottogruppo I e II (C). I dendrogrammi sono stati costruiti con il metodo “neighbour-joining” e il modello “Rimura-2-parametri”. Sono indicati i valori di “bootstrap” > 50% (calcolato su 1000 pseudorepliche). I ceppi K8 di specificità P[9], NCDV di specificità G6 e Cowden di gruppo C sono stati utilizzati come “gruppo esterno” nell’analisi filogenetica dei geni VP4, VP7 e VP6, rispettivamente. Sono indicati i lignaggi del gene VP7 in accordo con Fukai et al., 2004. Abbreviazioni: Hu, umano; Cap, di capra; Lap, di coniglio; Bov, bovino; Eq, equino; Ov, ovino; Por, suino; Sim, di scimmia; Mur, murino; Avi, aviario.

Discussione

Il ceppo PR/1300/04 rivelato a Parma è risultato caratterizzato da specificità G8 e, in analogia con il ceppo PA169, da specificità P[14], e-tipo lungo e SGI, che costituiscono una costellazione genetica solitamente esibita dai virus animali. Dati della letteratura suggeriscono che la presenza nell'uomo di ceppi con specificità P[14] come pure di ceppi con specificità G8 possa derivare dall'esposizione a rotavirus di coniglio e bovini, rispettivamente, seguita da eventi di riassortimento genetico con ceppi umani [Ciarlet et al., 1997; Gentsch et al., 2005].

GARV con specificità G8 circolano a frequenza relativamente alta nei ruminanti [Pisanelli et al., 2005] e sono stati rivelati anche in suini, cavalli, lama e macachi [Gouvea et al., 1994; Hoshino et al., 2005; Isa et al., 1996; Parreño et al., 2004]. Nell'uomo GARV G8 sono stati rivelati per la prima volta all'inizio degli anni 1980 in Indonesia [Hasegawa et al., 1984] in associazione a P[10] e a profilo elettroforetico atipico "supercorto" (ceppo prototipo 69M). Da allora, la presenza di ceppi G8 nell'uomo nei vari paesi del mondo è stata riportata poche volte in letteratura in associazione ad e-tipi lungo e corto e a SGI e SGII [Matthijssens et al., 2006b], ad eccezione che in Africa dove tali ceppi sembrano circolare con alta frequenza [Adah et al., 2003; Fischer et al., 2003]. La maggior parte di questi ceppi umani G8 si presentano in combinazione con svariati P tipi [Santos and Hoshino, 2005].

Rotavirus con specificità P[14] sono stati descritti nei conigli, nelle capre, nei Lama Guanicoe e nell'uomo. Nell'uomo il primo ceppo GARV P[14] è stato riportato da Gerna e coll. in Italia [1992] associato a G6, e-tipo lungo e SGI. Da allora sono state riportate poche osservazioni di ceppi P[14] in varie parti del mondo [De Leener et al., 2004] associati a diversi G tipi. In Italia, un solo altro ceppo P[14] è stato identificato a Palermo da Arista e coll. [1999].

Nei tempi più recenti ceppi G8P[14] sono stati osservati anche nei lama e nelle pecore [Parreño et al., 2004; Ciarlet, osservazione personale].

I risultati ottenuti sembrano suggerire che il ceppo G8P[14] di Parma possa essere il risultato di un riassortimento tra un ceppo PA169-simile, P[14], e-tipo lungo e SGI già circolante in Italia, e un ceppo G8 animale, molto probabilmente bovino. E' riconosciuto che la trasmissione interspecie può portare a riassortimento genetico tra ceppi umani e animali di rotavirus in caso di coinfezione. Tale meccanismo è facilitato dalla natura segmentata del genoma e contribuisce in modo significativo alla diversità genetica di tali virus, dal momento che essa può generare ceppi con caratteristiche fenotipiche atipiche o nuove. Il numero sempre maggiore di segnalazioni di ceppi atipici di rotavirus nell'uomo suggerisce che trasmissioni interspecie di interi ceppi virali o scambi di segmenti genomici tra animali e uomo siano meccanismi rilevanti nell'evoluzione molecolare dei rotavirus [De Leener et al., 2004; Matthijssens et al., 2006a].

Sebbene studi epidemiologici molecolari abbiano dimostrato casi di riassortimento intergenogruppo [Ward et al., 1990; Nakagomi et al., 1992], evidenze di trasmissione interspecie di interi ceppi virali sono rare [Matthijssens et al., 2006a; Tsugawa and Hoshino, 2008], nonostante in alcune zone geografiche l'uomo sia continuamente esposto a ceppi

animali di rotavirus. E' verosimile ipotizzare che, quando ceppi di rotavirus superano le barriere specie-specifiche, essi non siano naturalmente in grado di infettare e diffondere in modo efficiente nel nuovo ospite. Al contrario, tali ceppi tendono a riassortire con ceppi specifici di quell'ospite e di conseguenza la progenie dei ceppi riassortanti può avere maggiori possibilità di infettare e diffondere in modo efficiente nella popolazione del nuovo ospite. Queste considerazioni suggeriscono uno scenario simile a quello raffigurato per i virus influenza animali, i quali sono in grado di indurre infezioni da asintomatiche a letali in ospiti eterologhi ma non possono propagarsi nella popolazione con successo fino a che non si adattano acquisendo segmenti genomici dai ceppi eterologhi mediante riassortimento.

La caratterizzazione molecolare di ceppi GARV nuovi o rari nell'uomo è determinante per fornire una più approfondita comprensione dei meccanismi naturali che guidano l'evoluzione dei rotavirus e la restrizione d'ospite.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI DUE CEPPI DI ROTAVIRUS DI GRUPPO A COINVOLTI IN DUE CASI FATALI DI ENTERITE NELL'ANNO 2005.

Risultati

Tra febbraio e maggio 2005 a Parma è stato osservato un eccezionale periodo epidemico di infezione da rotavirus di gruppo A, con una prevalenza in bambini ricoverati con gastroenterite del 53,9% (132 su 245) (Figura 28). Alla fine del mese di aprile 2 casi fatali di enterite da rotavirus di gruppo A si sono verificati nel breve arco di 4 giorni in un bambino di 2 anni (ceppo 1598-2005-F) e in uno di 13 mesi (ceppo 1609-2005-F), rispettivamente.

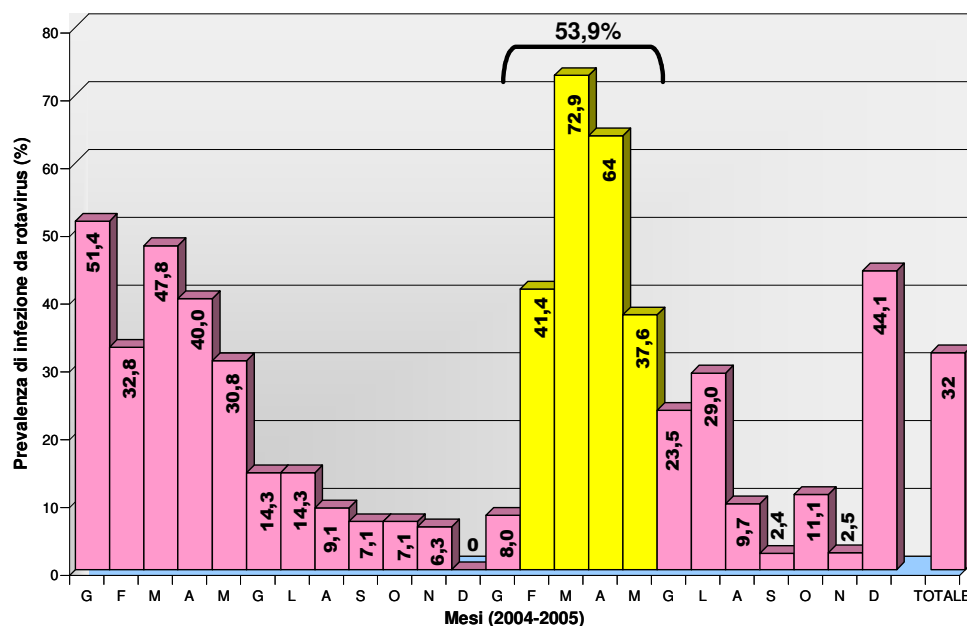


Figura 28. Distribuzione mensile di 272 casi di infezione da rotavirus di gruppo A osservati in 857 bambini ricoverati con gastroenterite nel periodo 2004-2005. in giallo sono evidenziati i mesi febbraio-maggio 2005 corrispondenti al periodo epidemico di infezione da rotavirus di gruppo A in quell'anno.

Nel primo caso (caso 1: 1598-2005-F) si trattava di un bambino giunto presso l'Astanteria pediatrica dell'Ospedale Maggiore di Parma in arresto cardio-circolatorio, con una storia di alcuni giorni di episodi di vomito e diarrea con febbre alta. Il bambino è deceduto dopo 30 minuti di tentativi di rianimazione.

Nel secondo caso (caso 2: 1609-2005-F) si trattava di un bambino ricoverato presso la stessa Astanteria per gastroenterite febbrile severa già da 24 ore e deceduto 2 giorni dopo il ricovero.

Il campione di contenuto intestinale e quello di feci prelevati dal primo e dal secondo bambino, rispettivamente, positivi alla ME per particelle rotavirus-simili e negativi alle altre indagini virologiche condotte a scopo diagnostico, hanno rivelato contenere ciascuno un ceppo di rotavirus di gruppo A di e-tipo lungo, classificabile b-c-e-a secondo Lourenco, e genotipo G1P[8] quando sottoposti a PAGE degli RNA genomici e genotipizzazione, rispettivamente (Figura 29). Gli stessi due procedimenti condotti sui campioni di sangue periferico e siero hanno dato invece esito negativo.

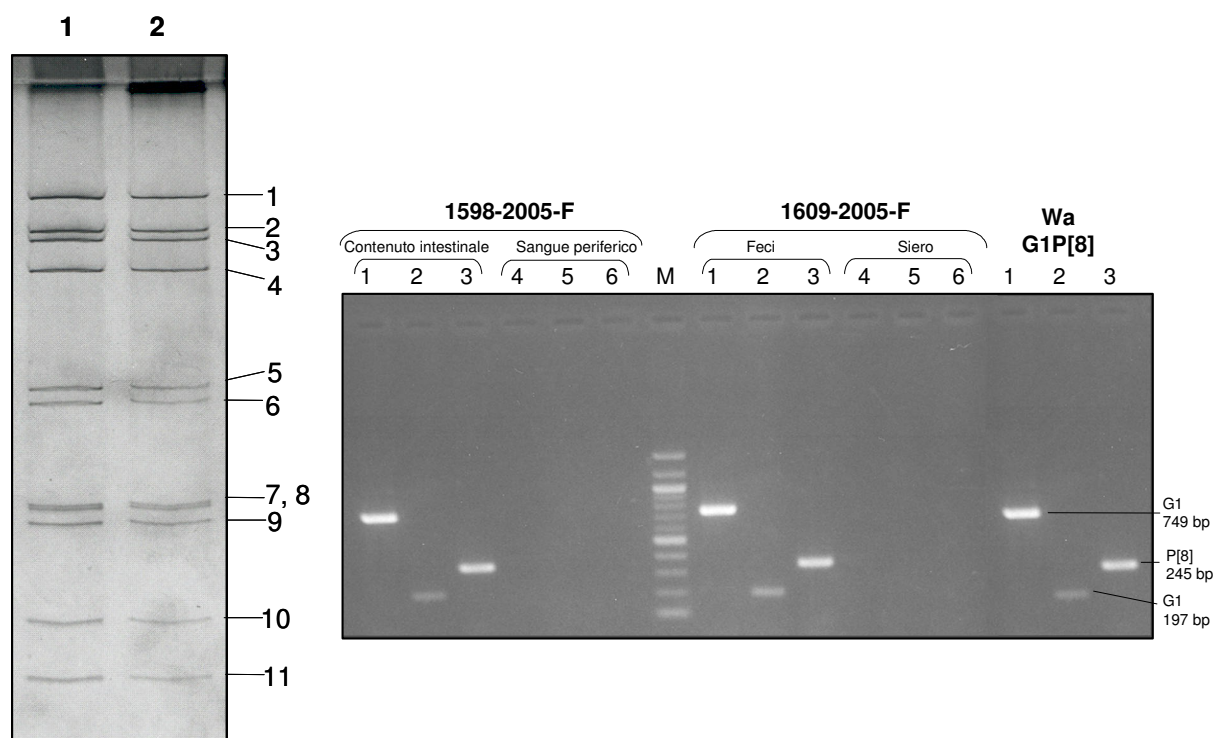


Figura 29. (A) Elettroferotipo dei ceppi di rotavirus di gruppo A (raggruppamento dei segmenti genomici 4:2:3:2) rivelati in due casi fatali di gastroenterite: 1, ceppo 1598-2005-F e 2, ceppo 1609-2005-F. I numeri a destra indicano gli undici segmenti degli RNA genomici di rotavirus. (B) Rivelazione in gel d'agaroso dei prodotti di amplificazione ottenuti attraverso RT-PCR mediante miscele di primer specifiche per regioni dei geni VP7 e VP4 di rotavirus nei due casi fatali di enterite (ceppi 1598-2005-F e 1609-2005-F) a confronto con il ceppo di rotavirus di riferimento Wa (genotipo G1P[8]) utilizzato come controllo positivo. Posizioni 1 e 4: miscela di primer specifiche per il G-tipo secondo Gouvea et al.1990; posizioni 2 e 5: miscela di primer specifici per il G-tipo secondo Das et al. 1994; posizioni 3 e 6: miscela di primer specifici per il P-tipo; M: indicatore di peso molecolare.

Le indagini anatomo-istopatologiche eseguite presso la Sezione di Anatomia e Istologia Patologica del Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio dell'Azienda ospedaliero-universitaria di Parma hanno rivelato aspetti anatomo-patologici sovrapponibili nei due casi, evidenziando in particolare a livello del tratto gastroenterico un intenso e diffuso infiltrato infiammatorio linfo-plasmacellulare della lamina propria con estesa disepitelizzazione all'apice dei villi.

Nel tentativo di verificare se rotavirus fosse presente anche in sedi extraintestinali, gli acidi nucleici estratti da campioni autoptici provenienti da 10 diverse sedi dell'organismo e appartenenti al caso 1 sono stati sottoposti a procedimenti di RT-PCR specifici per i geni VP4, VP6 e VP7 di rotavirus di gruppo A. Tutti i campioni sono risultati negativi.

Dal momento che la proteina NSP4 sembra avere un ruolo rilevante nella virulenza dei rotavirus [Ball et al., 1996; Lee et al., 2000; Zhang et al., 1998] come pure le proteine capsidiche VP4 e VP7 [Offit et al., 1986; Hoshino et al., 1995; Pager et al., 2000], nel tentativo di valutare il grado di patogenicità dei due ceppi è stata condotta l'analisi molecolare dei geni codificante per la proteina NSP4 (enterotossina) e per le proteine capsidiche VP4 e VP7 allo scopo di verificare l'eventuale presenza di variazioni aminoacidiche suggestive di un'inusuale virulenza dei ceppi. Le sequenze nucleotidiche e aminoacidiche dedotte ottenute sono state confrontate con quelle dei geni analoghi di ceppi di rotavirus di riferimento e, in particolare, le sequenze dei geni NSP4 sono state confrontate anche con quelle di ceppi rivelati in soggetti sintomatici e di ceppi rivelati in soggetti asintomatici [Lee et al., 2000], tutti disponibili in GenBank.

Inoltre, in analogia con alcuni studi che hanno rivelato specifiche sostituzioni implicate nel meccanismo di attenuazione confrontando ceppi con costellazioni genetiche uguali tra loro [Chang et al., 1999; Kirkwood et al., 1996; Pager et al., 2000; Zhang et al., 1998], le sequenze aminoacidiche delle proteine NSP4, VP4 e VP7 dei due ceppi 1598-2005-F e 1609-2005-F sono state confrontate con quelle di ceppi di rotavirus di gruppo A G1P[8] con e-tipo lungo rivelati nell'area di Parma nello stesso periodo epidemico (febbraio-maggio 2005) e nell'arco dell'anno immediatamente precedente (gennaio 2004-gennaio 2005). In particolare, sono stati analizzati 18 ceppi G1P[8] per il gene NSP4, 6 ceppi G1P[8] per il gene VP4 e 7 ceppi G1P[8] per il gene VP7.

L'albero filogenetico delle sequenze aminoacidiche del gene NSP4 ha mostrato che entrambi i ceppi appartenevano al genogruppo B di NSP4 (Wa-simile) (Figura 30).

Nel gene NSP4 i due ceppi hanno mostrato un'identità aminoacidica del 99,4% tra loro (corrispondente ad 1 sostituzione Asn->Ser al residuo 12 e pari al 99,8% di identità nt) e >96,4% (>94,7% di identità nt) e >93,9% (>92,2% di identità nt) con i ceppi di riferimento Wa (virulento) e M37 (avirulento), rispettivamente.

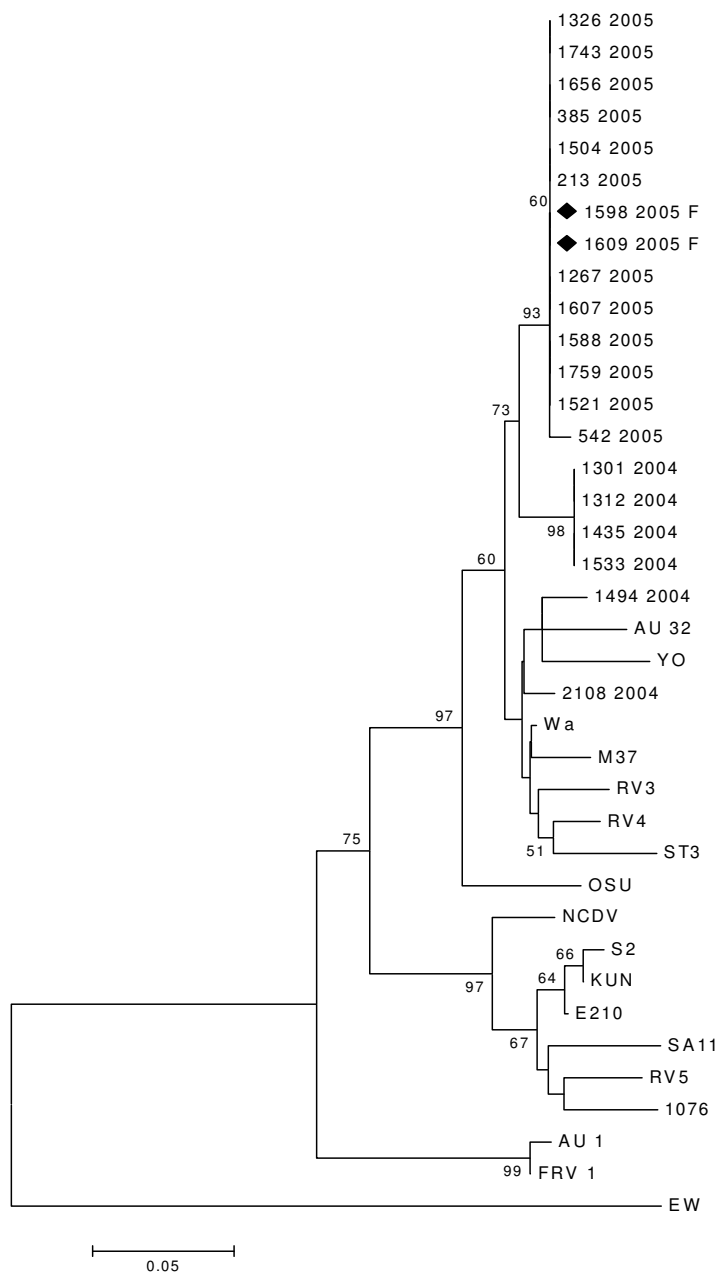


Figura 30. Albero filogenetico delle sequenze aminoacidiche dedotte del gene NSP4 di due ceppi di rotavirus G1P[8] con e-tipo lungo (1598-2005-F e 1609-2005-F, evidenziati in figura dal simbolo ◆) rivelati in due casi fatali di gastroenterite, e di altri ceppi di rotavirus disponibili in GenBank. Il dendrogramma è stato costruito con il metodo “neighbour-joining” e il modello “p-distance”. Sono indicati i valori di “bootstrap” >50% (calcolato su 1000 pseudorepliche).

Dall’allineamento della sequenza aminoacidica dedotta del gene NSP4 di entrambi i ceppi 1598-2005-F e 1609-2005-F con le sequenze di 7 ceppi rivelati in soggetti sintomatici e di 4 ceppi rivelati in soggetti asintomatici e depositate in GenBank è stata dimostrata una sostituzione aminoacidica nei due ceppi in studio rispetto ai ceppi a confronto. Tale variazione prevede l’inserimento di serina (S) al posto di asparagina/lisina (N/K) in posizione

133, all'interno della regione "enterotossinogenica" (aa 114-140) e, più specificatamente, in quella proposta come "peptide tossico" (aa 114-135) (Figura 31). La stessa sostituzione in posizione 133 è stata osservata anche in tutti i ceppi G1P[8] esaminati del 2005 (N=12) ma in nessuno di quelli del 2004 (N=6).

Nessuna variazione significativa è stata invece osservata nei due siti di glicosilazione (aa 8 e 18), nei 3 domini idrofobici (aa 7-21, 28-47 e 67-85) e nel sito di legame della particella virale allo stadio bilaminare (aa 161-175).

1598_2005_F ♦	DKLTTREIEQ VELLKRIHDS LI	
1609_2005_F ♦	
1267_2005	
1326_2005	
1504_2005	
1521_2005	
1588_2005	
1607_2005	
1656_2005	
1743_2005	
1759_2005	
213_2005	
385_2005	
542_2005	
1301_2004N ..
1312_2004N ..
1435_2004N ..
1494_2004N ..
1533_2004N ..
2108_2004N .V
WaN ..
E210Y .K ..
S2Y .K ..
KUNY .K ..
RV5Y .K .M
AU_32MN ..
RV4N ..
M37N ..
1076	.R.....	.K .M
ST3I.....N ..
RV3C .Y .N ..

Figura 31. Allineamento della sequenza aminoacidica 114-135 ("peptide tossico") dedotta del gene NSP4 dei ceppi 1598-2005-F e 1609-2005-F di rotavirus di gruppo A rivelati in due casi fatali di enterite (♦), con quella di ceppi di rotavirus di gruppo A rivelati nel periodo epidemico febbraio-maggio 2005 (evidenziati in verde) e precedentemente (gennaio 2004-gennaio 2005, evidenziati in blu) e di ceppi di rotavirus di gruppo A disponibili in GenBank rivelati in pazienti sintomatici (evidenziati in giallo) e asintomatici (evidenziati in rosa).

Analogamente, dall'analisi della sequenza aminoacidica dedotta del gene VP4 è emersa la sostituzione aminoacidica treonina (T) al posto di asparagina/serina (N/S) in posizione 79 nei ceppi 1598-2005-F e 1609-2005-F e in tutti gli altri ceppi esaminati del 2005 (N=4) mentre la stessa sostituzione non era presente nei ceppi del 2004 (N=2) e nel ceppo prototipo Wa (Figura 32). Tale sostituzione risulta compresa nella regione ipervariabile (aa 71-204) della subunità VP8* della proteina VP4.

Al contrario, non sono state osservate differenze significative nelle sequenze aminoacidiche dedotte del gene VP7 dei due ceppi 1598-2005-F e 1609-2005-F a confronto con tutti gli altri ceppi esaminati sia del 2005 che del 2004.

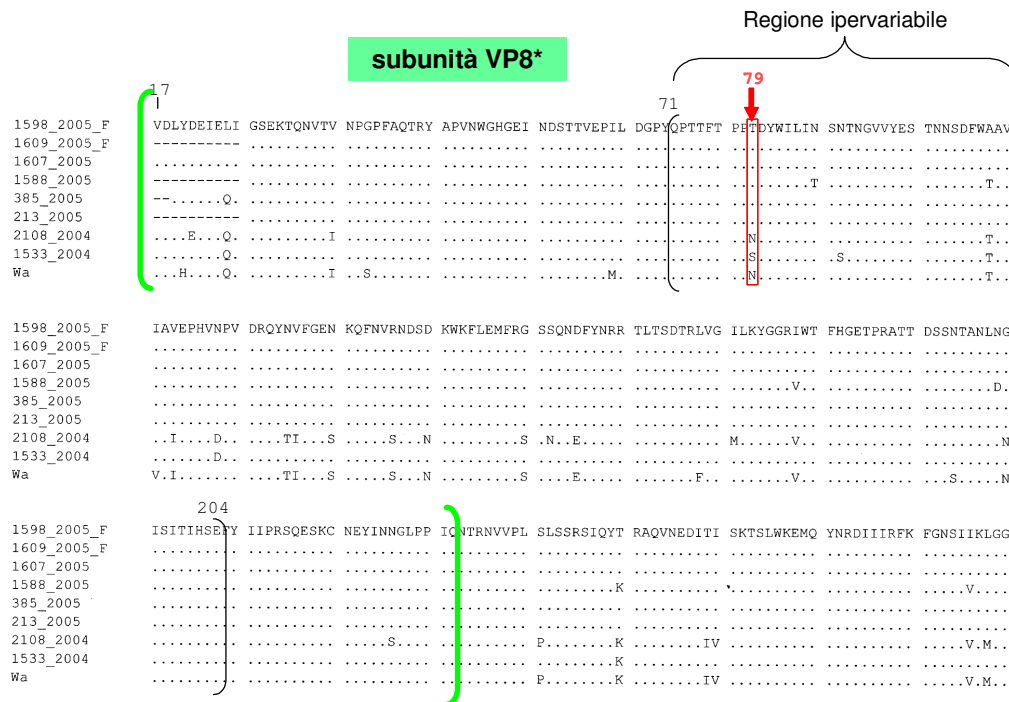


Figura 32. Allineamento della sequenza aminoacidica 17-285 dedotta del gene VP4 (comprendente la subunità VP8*) dei due ceppi di rotavirus di gruppo A rivelati in due casi fatali di enterite (F), con quella di ceppi rivelati nel periodo epidemico febbraio-maggio 2005 e precedentemente (gennaio 2004-gennaio 2005) e del ceppo di riferimento Wa.

Discussione

Nell'albero filogenetico relativo al gene NSP4 i due ceppi di rotavirus di gruppo A 1598-2005-F e 1609-2005-F di genotipo G1P[8] ed e-tipo lungo coinvolti nei due casi fatali di enterite, venuti alla nostra osservazione nel periodo epidemico nel 2005, si inseriscono nello stesso ramo degli altri ceppi G1P[8] circolanti nel 2005. Tutti i ceppi analizzati sono classificabili nel genogruppo B di NSP4, Wa-simile e pertanto appartengono al genogruppo Wa dei rotavirus.

Ceppi G1P[8] sono stati predominanti in Italia e nel mondo durante gli ultimi 20 anni [Arista et al., 2006; Gentsch et al., 2005; Santos and Hoshino, 2005]. Nell'area di Parma tale

genotipo ha rappresentato il 42,4% dei ceppi GARV rivelati nel periodo epidemico febbraio-maggio 2005.

Sulla base dell'analisi delle sequenze nucleotidiche e aminoacidiche, essi si sono dimostrati più simili al ceppo virulento Wa di riferimento piuttosto che a quello avirulento M37, sebbene in percentuale relativamente bassa (2,5% di identità aminoacidica e nucleotidica in più con il ceppo Wa rispetto al ceppo M37).

Nessuna sostituzione aminoacidica peculiare è stata riscontrata nelle proteine NSP4, VP4 e VP7 dei ceppi 1598-2005-F e 1609-2005-F rispetto ai ceppi G1P[8] circolanti localmente nel 2005, mentre una mutazione è stata osservata in posizione 133 della proteina NSP4 e una in posizione 79 della subunità VP8* della proteina VP4 di tutti i ceppi del 2005 rispetto a quelli del 2004 e ad altri ceppi ottenuti dalla banca dati genomica. La subunità VP8* della proteina VP4 è nota contenere gli epitopi antigenici. Variazioni aminoacidiche in posizione 79 sono state riportate in mutanti che sfuggono alla protezione immunitaria [Kapikian et al., 2001].

Finora, nessun singolo gene è stato associato in modo univoco alla patogenicità dei rotavirus. Sembra piuttosto che sia la costellazione genetica complessiva di un ceppo a determinare la sua capacità di riprodursi in un particolare ospite e la sua patogenicità [Burke and Desselberger, 1996; Mascarenhas et al., 2007]. Hoshino e coll. [1995] hanno dimostrato in maiali gnotobiotici che i geni VP3, VP4, VP7 e NSP4 giocano ruoli indipendenti nel determinare la virulenza di rotavirus e che tutti i 4 geni sono coinvolti in sinergia nello sviluppo della malattia. Sulla base dei risultati ottenuti in questo studio molecolare, non sembrano esserci evidenze che i due ceppi di rotavirus coinvolti nei casi fatali di enterite a Parma abbiano caratteristiche genetiche peculiari suggestive di un inusuale potere patogeno. Sembra invece verosimile ipotizzare che le mutazioni riscontrate, l'una avvenuta all'interno della regione del "peptide tossico" della proteina NSP4 e l'altra avvenuta all'interno della regione ipervariabile della subunità VP8*, possano aver influenzato la conformazione o l'attività delle proteine NSP4 e VP4, rispettivamente, aumentando la virulenza di tutti i ceppi del 2005 e permettendo loro di diffondere ampiamente in quell'anno tra la popolazione infantile priva di anticorpi. Fino ad oggi, in letteratura non sono riportati ceppi di rotavirus con caratteristiche patogenetiche differenti da una stagione epidemica all'altra e riconducibili a mutazioni nei geni NSP4 e VP4.

La mortalità da rotavirus nei bambini di età < 5 anni è comune nei paesi in via di sviluppo e stimabile in circa 0,4 milioni di decessi l'anno [Parashar et al., 2003], mentre nei paesi industrializzati la mortalità associata a rotavirus è più rara (231 morti l'anno nell'Unione Europea e 11 in Italia) [Soriano-Gabarró et al., 2006], dal momento che i pazienti ricevono prontamente le cure necessarie. Pertanto, nonostante sia ragionevole ipotizzare che nell'esito fatale dei due casi di enterite possano essere intervenuti fattori legati all'ospite come pure un'inappropriata reidratazione, in accordo con le precedenti osservazioni, l'associazione spazio/temporale dei due casi fatali avvenuti a Parma appare comunque anomala e continua a far sorgere dubbi su una possibile aumentata virulenza dei due ceppi in studio.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN CEPPLO DI ROTAVIRUS DI GRUPPO A RIVELATO IN UNA BAMBINA CON GASTROENTERITE DA ROTAVIRUS ASSOCIATA A MENINGISMO

Risultati

Nell'ambito dei rotavirus genotipizzati nel periodo gennaio-marzo 2008, uno era presente nelle feci di una bambina di poco più di 2 anni e 3 mesi di età, affetta da gastroenterite associata a meningismo. La bambina, sottoposta ad indagini diagnostiche microbiologiche e virologiche su diversi materiali biologici aveva rivelato solo rotavirus nelle feci mediante ME. Si trattava di un ceppo (267_2008_M) di genotipo G1P[8] con e-tipo lungo (Figura 33).

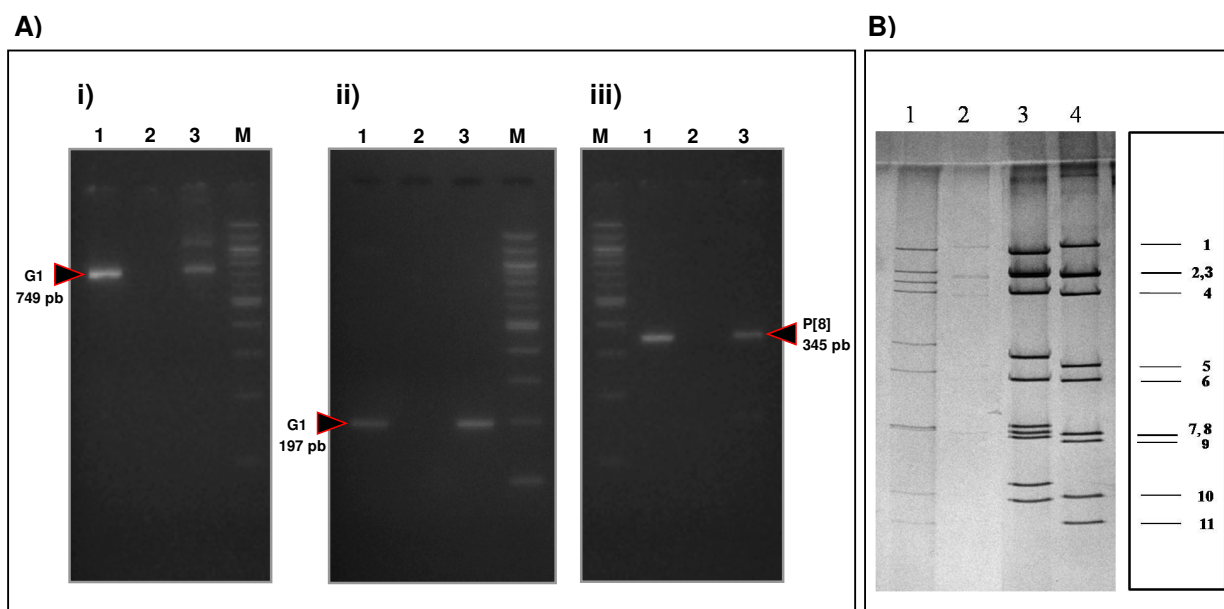


Figura 33. (A) Rivelazione in gel d'agaroso dei prodotti di amplificazione ottenuti attraverso RT-PCR mediante miscele di primer specifiche per regioni dei geni VP7 (i e ii) e VP4 (iii) di rotavirus dalle feci appartenenti ad una bambina con gastroenterite da rotavirus associata a meningismo a confronto con il controllo negativo e con il ceppo di rotavirus Wa G1P[8] di riferimento (controllo positivo). i) miscela di primer specifiche per il G-tipo secondo Gouvea et al.1990; ii) miscela di primer specifici per il G-tipo secondo Das et al. 1994; iii) miscela di primer specifici per il P-tipo. Posizioni 1: ceppo di rotavirus 267_2008_M; posizioni 2: controllo negativo; posizioni 3: controllo positivo M: indicatore di peso molecolare. (B) Elettroferotipo di rotavirus SA11 (posizione 1), di rotavirus Wa (posizione 2), di un ceppo di rotavirus con e-tipo corto rivelato a Parma nel 2008 (posizione 3) e del ceppo di rotavirus 267_2008_M (4). I numeri a destra indicano gli undici segmenti degli RNA genomici di rotavirus.

Allo scopo di verificare se rotavirus poteva essere responsabile anche dell'affezione neurologica nella piccola paziente, gli acidi nucleici estratti da liquor e plasma appartenenti alla stessa bambina sono stati sottoposti a RT-PCR specifica per il gene VP6 di rotavirus parallelamente a quelli estratti dalle feci.

L'RT-PCR specifica per il gene VP6 ha rivelato la presenza del frammento genomico di rotavirus delle dimensioni attese (380 pb) nelle feci e nel liquor mentre ha dato esito negativo al saggio condotto sul plasma. I risultati positivi sono stati confermati dalla ripetizione dell'indagine, estrazione degli acidi nucleici compresa.

Quindi, allo scopo, da un lato, di caratterizzare il ceppo rivelato nel liquor e, dall'altro, di ricercare il virus nel plasma utilizzando sequenze geniche bersaglio diverse da quella della VP6, gli acidi nucleici estratti dal liquor e dal plasma sono stati sottoposti a RT-PCR per i geni VP4 e VP7 di rotavirus. L'RT-PCR specifica per il gene VP4 ha identificato la specificità P[8] di rotavirus nel liquor, mentre sia l'RT-PCR per VP4 sia quella per VP7 hanno dato esito negativo nel plasma. Da entrambi i materiali non è stato ottenuto un segnale di amplificazione del gene VP7 neppure quando è stato sottoposto ad elettroforesi in gel d'agaroso il prodotto della prima fase della PCR al fine di escludere la possibile inefficienza dei primer di seconda amplificazione per eventuali mutazioni del genoma virale nel sito di attacco o per la presenza di un G-tipo non riconoscibile dai primer impiegati.

Gli ampliconi del gene VP6 del ceppo 267_2008_M ottenuti dalle feci e dal liquor come pure quelli ottenuti dalla prima amplificazione del gene VP7 e VP4 dalle feci e del gene VP4 dal liquor sono stati purificati e sottoposti ad analisi di sequenza e filogenetica. Il sequenziamento del gene VP4 del ceppo 267_2008_M ottenuto dal liquor ha dato esito non interpretabile.

L'analisi delle sequenze del gene VP6 (nt 759-1112) ottenute dalle feci e dal liquor ha dimostrato 100% di identità nucleotidica e aminoacidica tra loro (Figura 34) e, a confronto con quelle di ceppi prototipi di SGI e SGII disponibili in GenBank, ha evidenziato in entrambi i residui aminoacidici caratteristici del SGII (Figura 35).

Allo scopo di studiare la correlazione genetica del ceppo 267_2008_M con i ceppi circolanti, le sequenze nucleotidiche dei geni VP7 (nt 130-995) e VP4 (nt 85-1011) sono state confrontate con quelle di ceppi dello stesso genotipo ed e-tipo circolanti nella stessa area sia nello stesso periodo sia nel 2004-2005 e con ceppi disponibili in GenBank. Da quest'ultimo confronto è emerso che le sequenze VP4 e VP7 del ceppo 267_2008_M segregavano nei lignaggi G1-III (Figura 36A) e P[8]-II (Figura 36B), rispettivamente, dei dendrogrammi filogenetici. I risultati dell'analisi di sequenza dei geni VP7 e VP4 sono mostrati in tabella 25.

A)

```

VP6_feci   ACA TGG TTC TTT AAT CCA ATC ATC TTA AGA CCA AAC AAT GTA GAA GTA GAA TTT TTA CTG AAT GGA CAA ATT ATT AAT
VP6_liquor ... ..

VP6_feci   ACA TAT CAA GCT AGA TTT GGT ACT ATT GTT GCA AGA AAT TTT GAT ACA ATT CGT CTA TCA TTC CAA TTA ATG CGT CCA
VP6_liquor ... ..

VP6_feci   CCA AAC ATG ACG CCG GCT GTA AAT GCA TTA TTT CCG CAA GCA CAA CCT TTT CAA CAT CAT GCA ACC GTT GGA CTT ACG
VP6_liquor ... ..

VP6_feci   TTA CGT ATT GAG TCT GCA GTT TGT GAA TCA GTA CTT GCG GAT GCA AAT GAA ACT TTA TTG GCG AAT GTT ACC GCA GTA
VP6_liquor ... ..

VP6_feci   CGT CAA GAG TAT GCT ATA CCA GTT GGA CCA GTA TTT CCA CCA AGC
VP6_liquor ... ..

```

B)

```

VP6_feci   TWFFNPIILR PNNVEVEFLL NGQIINTYQA RFGTIVARNF DTIRLSFQLM RPPNMTPAVN ALFPQAQPFQ HHATVGLTLR
VP6_liquor .....

VP6_feci   IESAVCESVL ADANETLLAN VTAVRQEYAI PVGPFVFPSP
VP6_liquor .....

```

Figura 34. Allineamento della sequenza nucleotidica (A) 759-1112 e della relativa sequenza aminoacidica 270-388 dedotta (B) del gene VP6 ottenuta dalle feci con quella ottenuta dal liquor da appartenenti ad una bambina con gastroenterite da rotavirus associata a meningismo.

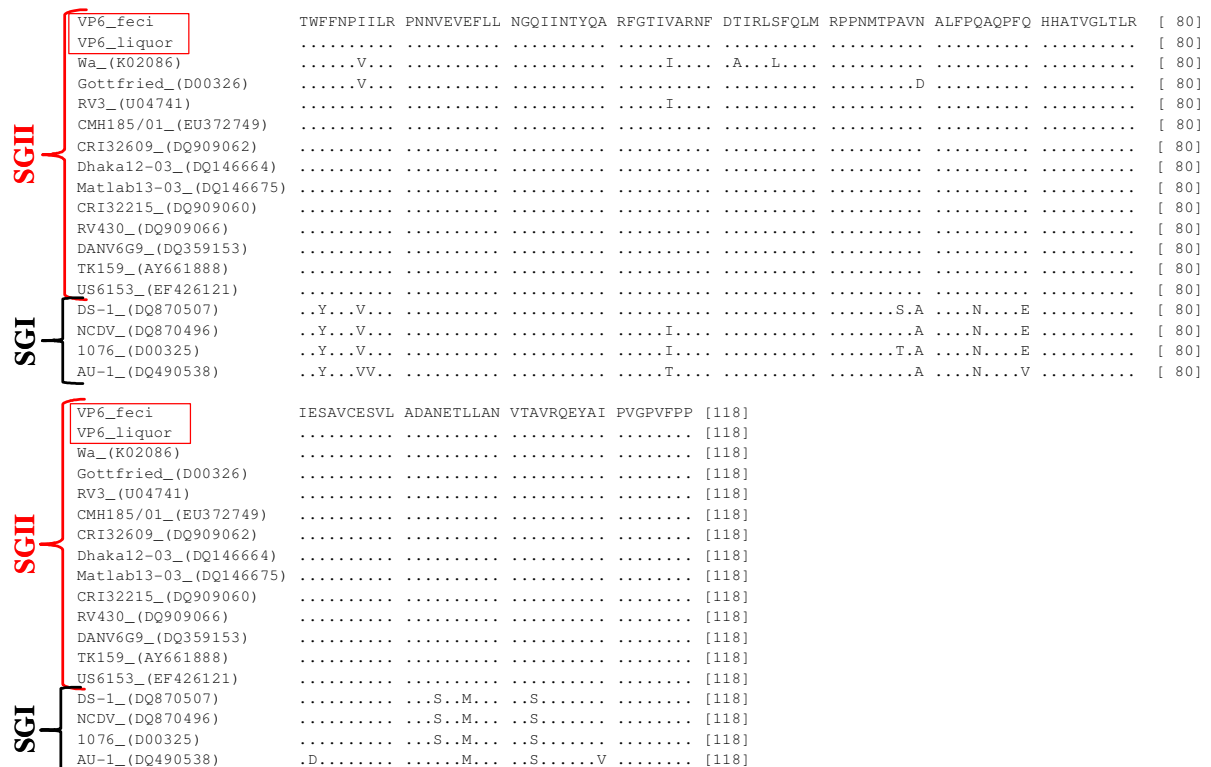


Figura 35. Allineamento della sequenza aminoacidica 270-387 dedotta del gene VP6 ottenuta dalle feci e dal liquor appartenenti ad una bambina con gastroenterite da rotavirus associata a meningismo con quella di ceppi di sottogruppo I e II disponibili in GenBank.

Tabella 25. Identità nucleotidica e aminoacidica dei geni VP4 e VP7 del ceppo di rotavirus di gruppo A 267_2008_M con quelli di rotavirus G1P[8] circolanti nella stessa area nel 2008 o nel 2004-2005 in bambini affetti soltanto da gastroenterite e di rotavirus disponibili in GenBank (tra parentesi sono riportati i numeri di accesso GenBank).

Gene	Ceppo	Paese di origine	Lignaggio filogenetico	Identità (%)	
				nucleotidica	aminoacidica
VP4					
	217_2008	Italia (Parma)	P[8]-II	95,4	97,8
	1598_2005_F	Italia (Parma)	P[8]-II	99,3	99,0
	1609_2005_F	Italia (Parma)	P[8]-II	99,3	99,0
	1607_2005	Italia (Parma)	P[8]-II	99,3	99,0
	1588_2005	Italia (Parma)	P[8]-II	96,5	97,7
	385_2005	Italia (Parma)	P[8]-II	99,3	99,0
	213_2005	Italia (Parma)	P[8]-II	99,2	99,0
	2108_2004	Italia (Parma)	P[8]-I	89,2	92,2
	1533_2004	Italia (Parma)	P[8]-II	97,7	98,0
	Dhaka25-02 (DQ146652)	Bangladesh	P[8]-II	99,5	99,6
	Wa (M96825)	Stati Uniti	P[8]-I	90,0	92,8
	KU (M21014)	Giappone	P[8]-II	93,3	94,8
VP7					
	217_2008	Italia (Parma)	G1-III	97,6	98,2
	603_2008	Italia (Parma)	G1-I	92,8	93,4
	1598_2005_F	Italia (Parma)	G1-III	97,6	98,6
	1609_2005_F	Italia (Parma)	G1-III	97,8	98,9
	1588_2005	Italia (Parma)	G1-III	97,8	98,9
	385_2005	Italia (Parma)	G1-I	93,7	94,4
	213_2005	Italia (Parma)	G1-III	97,8	98,9
	2108_2004	Italia (Parma)	G1-I	94,2	95,1
	1533_2004	Italia (Parma)	G1-III	97,6	98,6
	TE (D17722)	Giappone	G1-III	96,7	97,9
	C4 (D17720)	Giappone	G1-III	96,8	98,6
	C2 (D17718)	Giappone	G1-III	96,7	98,6
	GC06-01 (AB275386)	Giappone	G1-III	75,7	76,8
	Wa (K02033)	Stati Uniti	G1-IV	91,0	93,7
	KU (D16343)	Giappone	G1-IV	91,1	94,4
	Chi-K17 (D16320)	Cina	G1-III	96,8	98,2
	Chi-45 (U26371)	Cina	G1-III	97,0	98,2
	Chi-87-02 (DQ512998)	Cina	G1-III	96,8	98,2
	J-6219-05 (EF088833)	Giappone	G1-III	96,8	98,2
	J-6236-05 (EF088838)	Giappone	G1-III	97,0	98,2
	AU64 (AB081801)	Giappone	G1-III	97,1	97,9
	VN-355-03 (DQ512968)	Vietnam	G1-III	97,3	98,9
	Ban48 (U26364)	Bangladesh	G1-III	96,6	97,2
	Cos70 (U26370)	Costa Rica	G1-I	93,5	95,1
	421 (D16326)	Giappone	G1-II	92,2	94,4

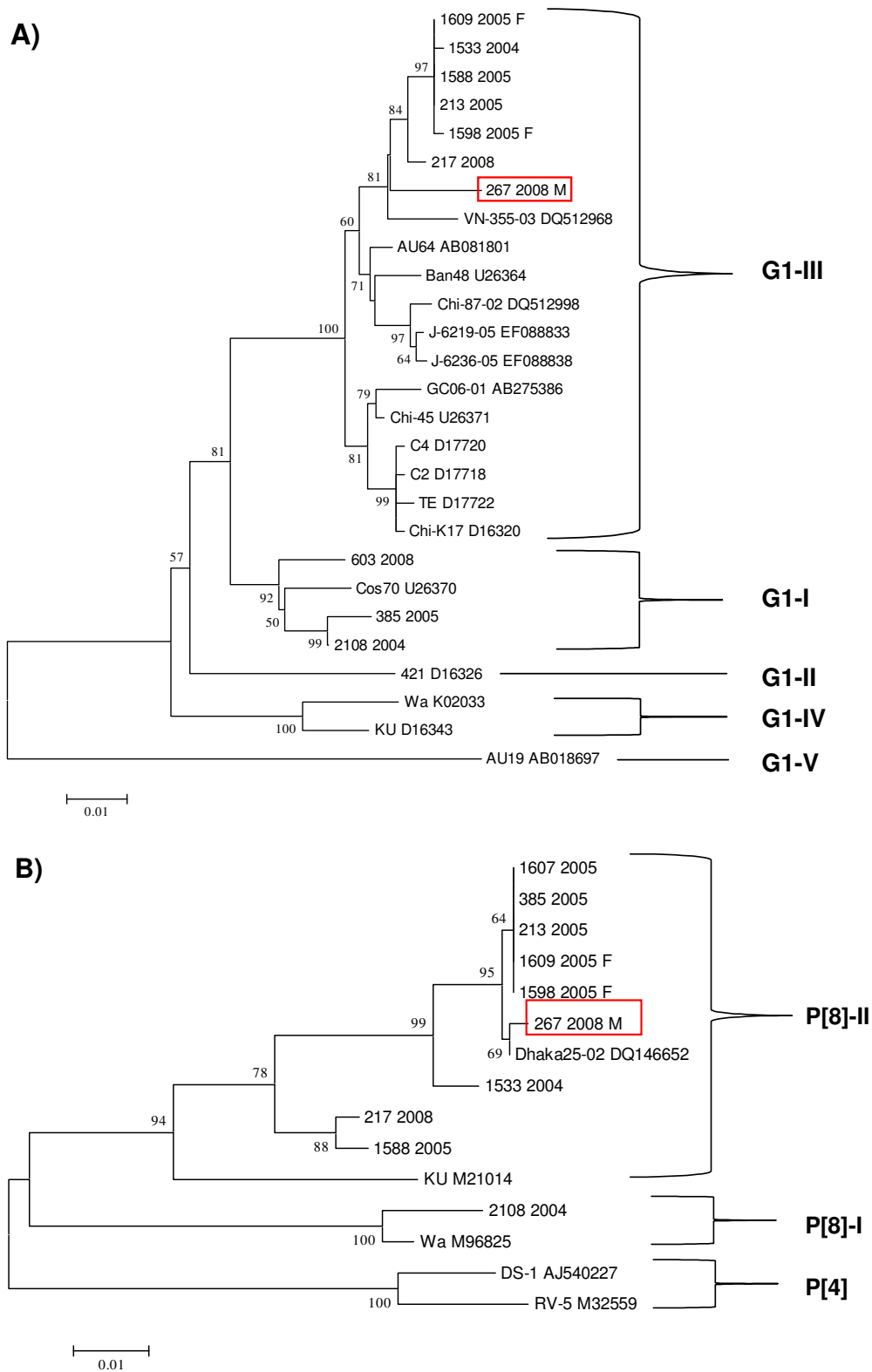


Figura 36. Alberi filogenetici delle sequenze nucleotidiche dei geni VP7 (A) (nucleotide 130-995) e VP4 (B) (nucleotide 85-1011) del ceppo 267_2008_M a confronto con quelle di ceppi di diversi lignaggi e disponibili in GenBank. Il dendrogramma è stato costruito con il metodo “Neighbour-joining” e il modello “kimura 2 parametri”. Sono indicati i valori di “Bootstrap” >50% (calcolato su 1000 pseudorepliche).

A confronto con i ceppi G1P[8] con e-tipo lungo appartenenti allo stesso lignaggio filogenetico, il ceppo 267_2008_M ha mostrato un'identità nucleotidica >92,8% (> 93,4% di identità aminoacidica) nel gene VP7 e del 95,4% (97,8% di identità aminoacidica) nel gene VP4 con i ceppi co-circolanti, mentre ha mostrato un'identità nucleotidica > 97,6% (> 98,6% di identità aminoacidica) nel gene VP7 e > 96,5% (> 97,7% di identità aminoacidica) nel gene VP4 con i ceppi circolanti localmente nel periodo 2004-2005.

Nel tentativo di valutare il grado di patogenicità del ceppo 267_2008_M è stata condotta l'analisi delle sequenze aminoacidiche dedotte dei geni codificanti per le proteine VP4, VP7 e NSP4 allo scopo di verificare l'eventuale presenza di variazioni aminoacidiche suggestive di un'inusuale virulenza.

A confronto con le sequenze aminoacidiche degli stessi geni di ceppi di rotavirus di riferimento, di ceppi rivelati in campioni di liquor e depositate in GenBank e di ceppi circolanti nella stessa area, sia nello stesso periodo sia nel periodo 2004-2005 in bambini affetti solo da gastroenterite, la sequenza del gene VP4 del ceppo 267_2008_M ha mostrato una sostituzione aminoacidica. Essa consiste nell'inserimento dell'aminoacido asparagina (N) al posto di istidina (H) in posizione 202 (H202N) all'interno della regione ipervariabile (aa 71-204) della subunità VP8* della proteina VP4, (Figura 37), nota contenere gli epitopi antigenici. Variazioni aminoacidiche in questa regione sono state riportate in mutanti che sfuggono alla protezione immunitaria [Kapikian et al., 2001]. Al contrario rispetto ai ceppi a confronto, la sequenza del gene VP7 del ceppo 267_2008_M non ha rivelato nessuna sostituzione significativa.

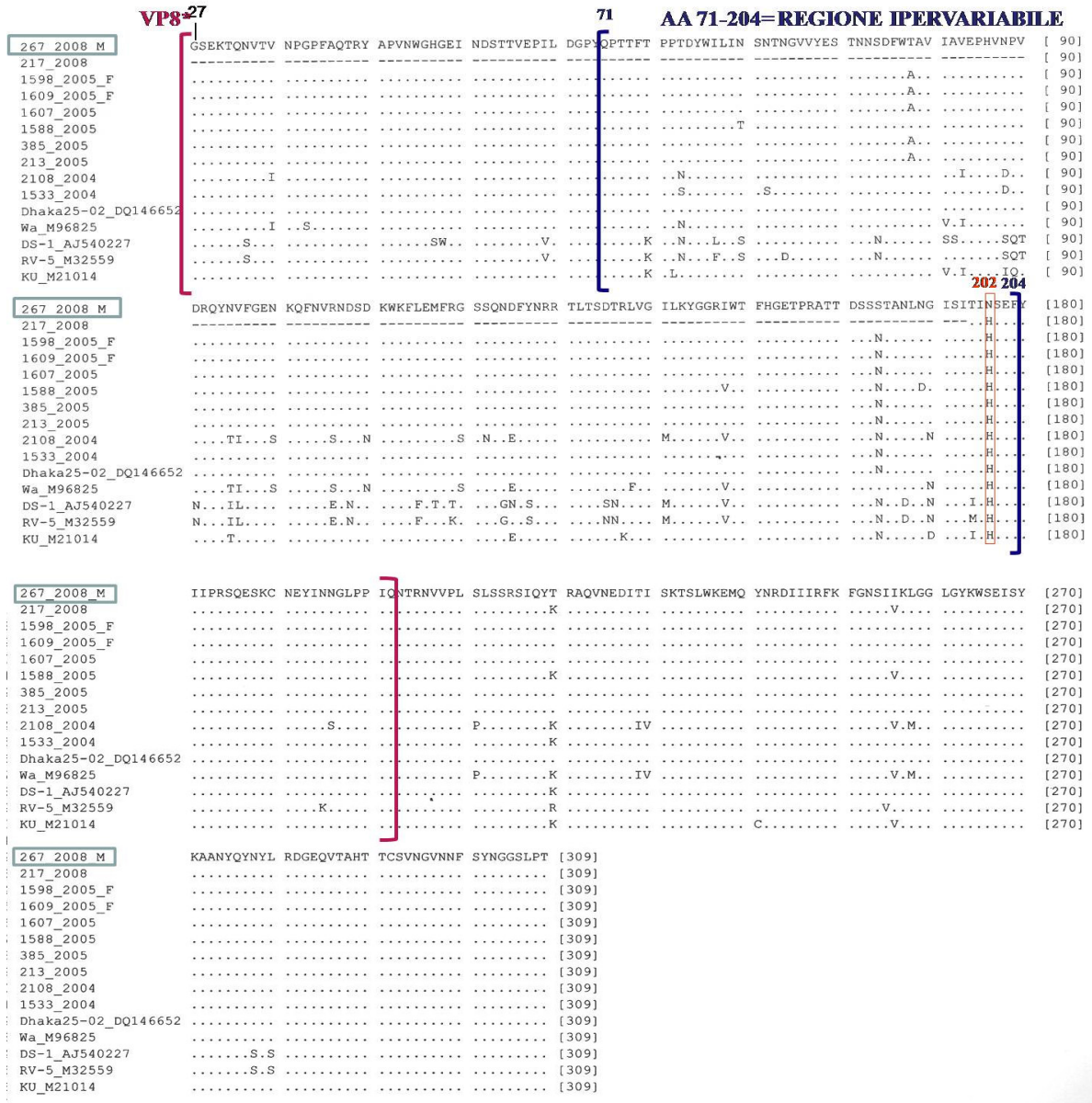


Figura 37. Allineamento della sequenza aminoacidica 27-336 dedotta del gene VP4 del ceppo di rotavirus 267_2008_M con quella di ceppi rivelati nella stessa area nello stesso anno e negli anni 2004-2005 e di ceppi disponibili in GenBank. In rosso è indicata la variazione aminoacidica riscontrata nel ceppo 267_2008_M rispetto ai ceppi a confronto.

Per quanto riguarda il gene NSP4, l'albero filogenetico della sequenza aminoacidica del gene NSP4 ha mostrato che il ceppo 267_2008_M apparteneva al genogruppo B (Wassimile) (Figura 38)

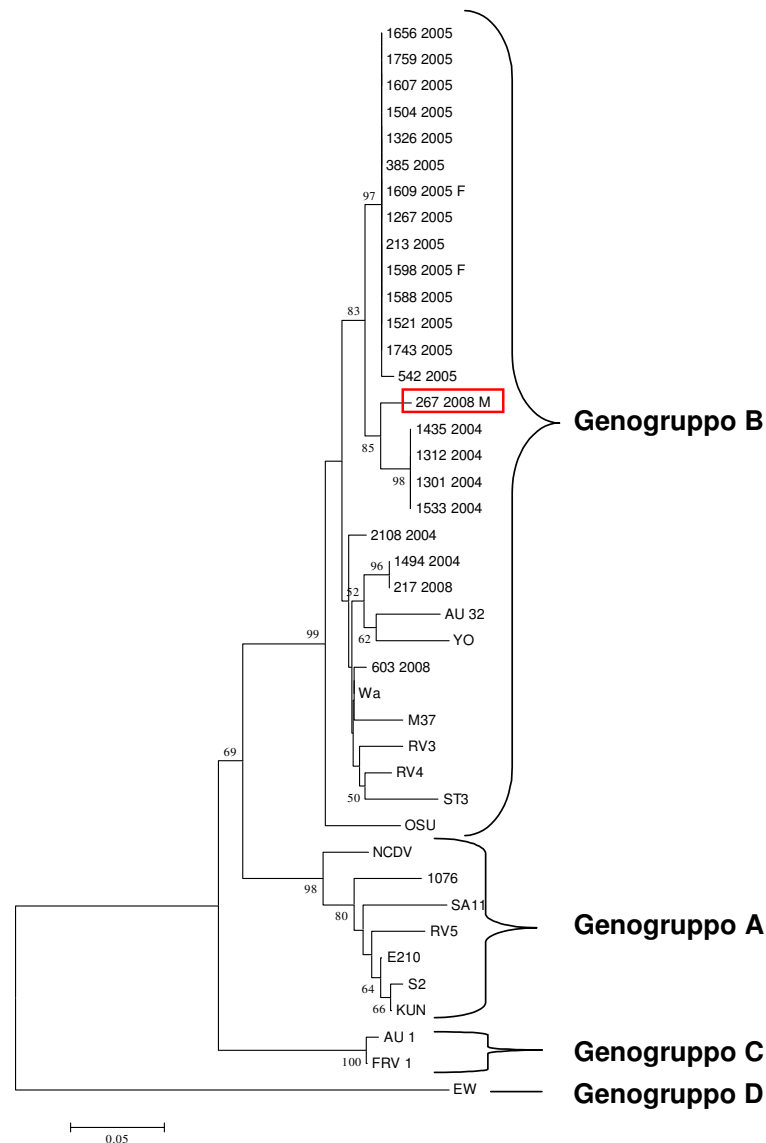


Figura 38. Albero filogenetico della sequenza aminoacidica dedotta del gene NSP4 del ceppo di rotavirus 267_2008_M a confronto con ceppi rivelati nella stessa area nello stesso anno e negli anni 2004-2005 e a ceppi disponibili in GenBank e rappresentativi dei principali genogruppi NSP4 (A, B, C e D).

L'analisi della sequenza aminoacidica del gene NSP4 del ceppo 267_2008_M ha dimostrato la presenza di variazioni non solo rispetto ai ceppi di stesso genotipo ed e-tipo,

circolanti in bambini affetti solo da gastroenterite sia nello stesso periodo che nel periodo 2004-2005, ma anche rispetto alle sequenze di ceppi di rotavirus virulenti e non, disponibili in GenBank (Figura 39).

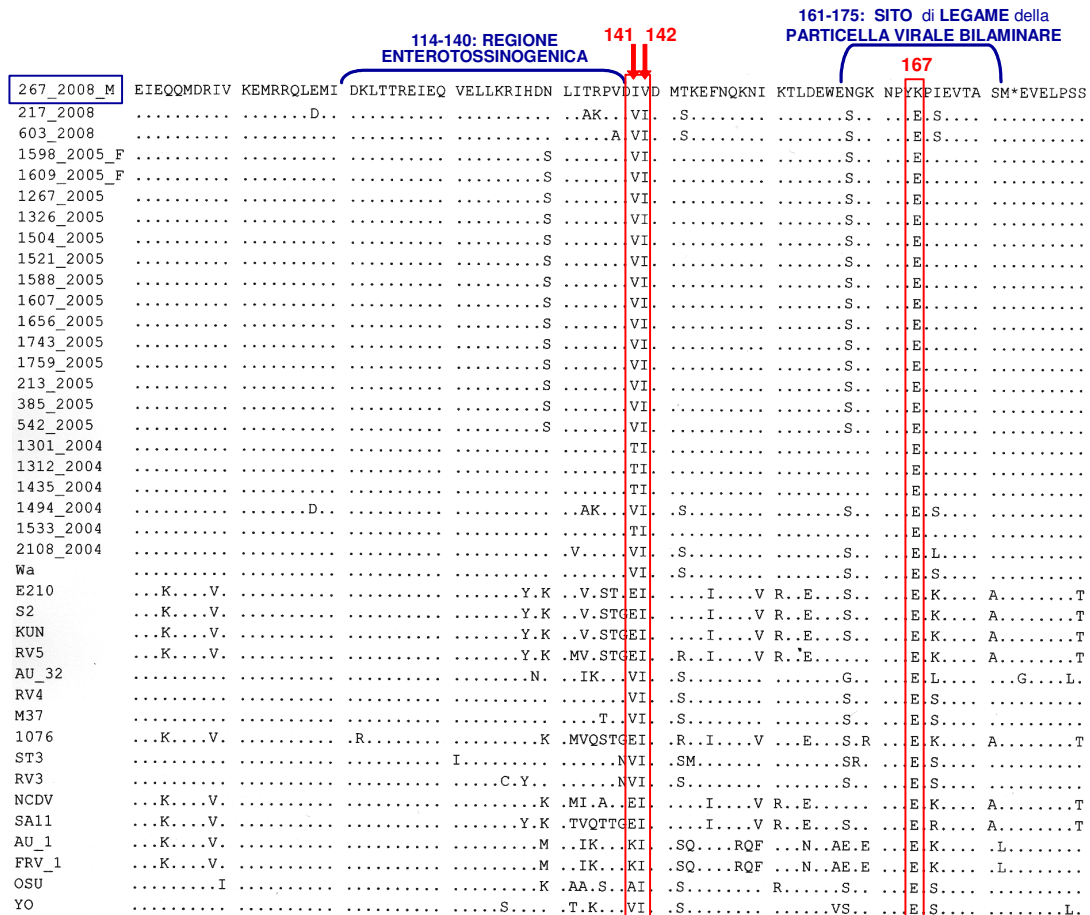


Figura 39. Allineamento della sequenza aminoacidica 94-183 dedotta del gene NSP4 del ceppo di rotavirus 267_2008_M con quella di ceppi rivelati nella stessa area, nello stesso anno e negli anni 2004-2005, e di ceppi disponibili in GenBank. In rosso sono indicate le variazioni aminoacidiche riscontrate nel ceppo 267_2008_M rispetto ai ceppi a confronto.

Tali variazioni consistono nell'inserimento dell'aminoacido isoleucina (I) al posto di valina/treonina/acido glutammico/lisina/alanina (V/T/E/K/A) in posizione 141 (V/T/E/K/A141I) e l'inserimento di valina (V) al posto di isoleucina (I) in posizione 142 (I142V) e sono comprese nel sito di legame della proteina VP4 (aminoacidi 112-146), a ridosso della zona terminale della regione 114-140 ritenuta enterotossigenica. Inoltre, è stata rivelata anche la sostituzione dell'aminoacido acido glutammico (E) con lisina (K) in posizione 167 (E167K) all'interno della regione 161-175 del sito di legame della particella virale allo stadio bilaminare nella cellula durante la sua morfogenesi.

Discussione

Esiste l'evidenza che il tropismo di rotavirus non sia limitato agli enterociti e sempre più frequentemente in letteratura internazionale si parla di infezione sistemica da rotavirus [Conner and Ramig, 1996; Ramig, 2004; Blutt and Conner, 2007; Ramig 2007]. Sembra inoltre che questi virus possano infettare le cellule neuronali sia *in vitro* [Weclewicz et al. 1998] sia *in vivo* [Shaw et al. 1989]. Wong [2001] ha osservato sia un'associazione statisticamente significativa ($P < 0,002$) tra encefalopatia e infezione da rotavirus rispetto a nessun agente eziologico rivelato sia un maggiore rischio di encefalopatia in corso di infezione da rotavirus rispetto a quello in corso di gastroenterite batterica. Lo squilibrio elettrolitico secondario alla disidratazione o una inappropriata reidratazione potrebbero spiegare alcuni casi di complicanze neurologiche durante la gastroenterite da rotavirus. Tuttavia il ritrovamento del genoma virale nel liquor [Goldwater et al., 2001; Lynch et al., 2001; Iturriza-Gomara et al., 2002b] suggerisce un ruolo patogenetico di tale agente e supporta l'ipotesi che la replicazione di rotavirus possa avvenire a livello del sistema nervoso centrale (SNC) causando un danno diretto. Nonostante queste osservazioni, la patogenesi dell'encefalopatia associata a rotavirus rimane tuttora sconosciuta.

Nel caso di meningismo riportato in questo studio in una bambina con gastroenterite da rotavirus in cui erano stati esclusi gli agenti batterici e quelli virali più frequenti di meningoccefalite, la presenza di questo virus è stata svelata anche nel liquor attraverso amplificazione dei geni VP6 e VP4. I rotavirus rivelati nelle feci e nel liquor della bambina hanno mostrato identiche sequenze nucleotidiche e aminoacidiche del gene VP6 e identica specificità P[8] del gene VP4, suggerendo che il ceppo che ha invaso il SNC era lo stesso che ha infettato l'intestino. Sebbene la presenza di antigeni o acidi nucleici di rotavirus nel sangue di bambini con gastroenterite da rotavirus associata a coinvolgimenti del SNC sia stata documentata [Ushijima et al. 1994; Nakagomi and Nakagomi, 2005], rimane ancora da chiarire se la viremia porta sempre a coinvolgimento del SNC. Nel caso della bambina in studio, nonostante il genoma di rotavirus non sia stato rivelato nel plasma, è verosimile ipotizzare che il virus abbia invaso il SNC attraverso il passaggio nel circolo ematico. I risultati complessivamente ottenuti forniscono comunque l'evidenza che rotavirus sia stato la causa della neuropatia nella piccola paziente.

Il ceppo di rotavirus rivelato nella bambina con meningismo (267_2008_M) appartiene al genotipo G1P[8] maggiormente circolante in Italia e nel mondo negli ultimi 20 anni [Arista et al. 2006; Gentsch et al. 2005; Santos and Hoshino, 2005] ed è associato ad e-tipo lungo, SGII e NSP4 di genogruppo B, che rappresentano caratteristiche molecolari tipiche del genogruppo Wa dei rotavirus umani di gruppo A. Tuttavia tale ceppo si è dimostrato geneticamente diverso dai ceppi circolanti localmente nello stesso periodo e negli anni precedenti nella popolazione pediatrica affetta solo da gastroenterite.

È degno di nota il fatto che nelle proteine NSP4 e VP4 del ceppo 267_2008_M sono state riscontrate sostituzioni aminoacidiche peculiari rispetto ai ceppi G1P[8] circolanti localmente nello stesso anno 2008, negli anni 2004 e 2005 e mai descritte in letteratura internazionale o presenti nei ceppi depositati in GenBank.

Come già accennato relativamente allo studio dei due ceppi rivelati in due casi fatali nel periodo 2004-2005, finora nessun singolo gene è stato associato in modo univoco alla patogenicità dei rotavirus. Sembra piuttosto che sia la costellazione genetica complessiva e in particolare i geni VP3, VP4, VP7 e NSP4 di un ceppo a determinarne la capacità di riproduzione in un particolare organismo ospite e la patogenicità [Burke And Desselberger, 1996; Mascarenhas et al., 2007]. Sulla base dei risultati molecolari ottenuti in questo studio, sembrano esserci evidenze che il ceppo 267_2008_M coinvolto nel caso di gastroenterite associata a meningismo a Parma abbia caratteristiche genetiche peculiari e suggestive di un inusuale potere patogeno. Sebbene sia evidente che il numero di ceppi messi a confronto con quello della bambina affetta da meningismo è stato limitato, è verosimile ipotizzare che le mutazioni aminoacidiche riscontrate (tre a ridosso della zona terminale della regione enterotossinogenica e all'interno di siti di legame della proteina NSP4 e la quarta all'interno della regione ipervariabile della subunità VP8* contenente gli epitopi antigenici) possano aver influenzato la conformazione o l'attività delle proteine NSP4 e VP4 modificando la patogenicità del ceppo 267_2008_M e permettendone la diffusione dall'intestino al SNC. Iturriza-Gómara e collaboratori [2002b] suggeriscono che la diffusione di rotavirus a siti di infezione extra-intestinali possa dipendere dalle condizioni dell'ospite piuttosto che da variazioni molecolari in geni che determinano la patogenicità virale o il tropismo cellulare. Tuttavia, i meccanismi molecolari responsabili della patogenicità e di un eventuale tropismo extra-intestinale di rotavirus sono ancora poco noti e i dati riportati in letteratura sono scarsi e spesso discordanti. La proteina NSP4 di rotavirus è un'enterotossina e mobilita il calcio intracellulare. E' stato dimostrato che la diarrea da rotavirus è mediata dal sistema nervoso enterico (SNE) dal momento che essa avviene come risultato di una aumentata secrezione di acqua da parte degli enterociti stimolata dal SNE [Lundgren et al., 2000; Lynch et al., 2003; Ramig 2004; Lorrot and Vasseur, 2007]. Tale ritrovamento spiegherebbe in modo soddisfacente come i fluidi possano muoversi anche da un compartimento isotonico ad un altro. E' verosimile che il SNE sia stimolato dalla proteina NSP4 stessa o da un suo peptide derivato la quale potrebbe agire sul SNE come un neurotrasmettitore. Tuttavia, l'ipotesi che il SNE fornisca la via di entrata per l'accesso di rotavirus al SNC necessita di ulteriori e approfonditi studi, come pure qualsiasi ipotesi sui meccanismi che hanno portato il ceppo di rotavirus rivelato in questo studio, mutato nei geni VP4 e NSP4, a diffondere dall'intestino al SNC apparirebbero speculative.

Nonostante lo sviluppo di saggi molecolari sempre più sensibili da impiegare nella diagnosi virologica, negli ultimi 10 anni la rivelazione di rotavirus mediante RT-PCR nel liquor di soggetti con disturbi neurologici associati a gastroenterite da rotavirus è stata descritta raramente in letteratura internazionale [Goldwater et al. 2001; Lynch et al. 2001; Nigrovic et al. 2002; Iturriza-Gómara M, et al. 2002b; Kehle et al. 2003; Nakagomi and Nakagomi, 2005]. Inoltre fino ad oggi, in letteratura non sono riportati ceppi di rotavirus coinvolti in patologie a carico del SNC con caratteristiche patogenetiche verosimilmente riconducibili a mutazioni, in particolare nei geni NSP4 e VP4.

L'evidenza di un possibile ruolo patogenetico di rotavirus in affezioni neurologiche nell'infanzia, specialmente in seguito a gastroenterite, come sembra emergere da questo

studio e da pochi altri in campo internazionale dovrebbe indurre considerare questi virus tra i potenziali agenti in grado di causare malattia al SNC.

CONCLUSIONI

In conclusione, lo studio di epidemiologia molecolare sull'infezione da rotavirus, condotto nell'ambito del corso di Dottorato di Ricerca prendendo in considerazione periodi temporalmente distanti (circa 20 anni), ha permesso di dimostrare che nell'area di Parma essa è complessivamente sovrapponibile a quella osservata su scala globale negli ultimi decenni con il genotipo G1P[8] prevalente e la specificità G9 emersa negli anni più recenti tra quelle maggiormente circolanti a livello globale.

In particolare, i risultati ottenuti hanno fortemente evidenziato come l'elevata variabilità genetica di rotavirus possa rivelarsi attraverso l'emergenza di riassortanti intergenogruppo in grado di diffondere rapidamente nella popolazione e potenzialmente capaci di sfuggire alla protezione immunitaria indotta dal vaccino.

I risultati ottenuti, inoltre, suggeriscono che l'epidemiologia molecolare dei rotavirus nell'uomo può risentire del recente aumento dei flussi migratori e del commercio internazionale, come farebbe supporre la dimostrazione della circolazione di ceppi di rotavirus di gruppo C nell'area di Parma, in cui, come nel resto d'Italia e in Europa, tali virus erano in precedenza assenti o perlomeno rari.

Ancora, l'analisi molecolare di due ceppi di rotavirus responsabili di due casi fatali di gastroenterite e di un ceppo responsabile di un caso di gastroenterite associata a meningismo, ha messo in luce come la variabilità genetica di questi virus possa intervenire sul potere patogeno attraverso la comparsa di mutazioni aminoacidiche in geni diversi, verosimilmente in grado di alterare la virulenza del virus attraverso meccanismi molecolari tuttora poco noti.

Infine, questo studio ha permesso di rivelare un ceppo atipico G8P[14] con una costellazione genetica chimerica uomo-animale, rafforzando l'ipotesi di una interazione dinamica tra i rotavirus umani e animali ed evidenziando come la trasmissione zoonosica e il successivo riassortimento tra ceppi umani e animali possano risultare nell'introduzione di geni animali nei rotavirus umani e rappresentare ulteriore meccanismo nell'evoluzione genetica di questi virus.

L'emergenza e il declino di certe specificità di rotavirus, in particolare di G tipi, sono note in campo internazionale e caratterizzate specialmente da ceppi G1 che si alternano con uno degli altri 4 G-tipi prevalenti (G2, G3, G4 e G9). Il continuo monitoraggio dei P e G tipi di rotavirus circolanti nei diversi paesi appare necessario per documentare la distribuzione dei ceppi ed è la chiave fondamentale per comprendere i meccanismi con cui ceppi atipici/riassortanti possono emergere, rischiando di ridurre se non addirittura vanificare l'efficacia del vaccino.

BIBLIOGRAFIA.

- Abid I., Guix S., Aouni M., et al. 2007.** Detection and characterization of human group C rotavirus in the pediatric population of Barcelona, Spain. *J. Clin. Virol.* 38:78-82.
- Adah M, Nagashima S, Wakuda M, et al., 2003.** Close relationship between G8-serotype bovine and human rotavirus isolated in Nigeria. *J. Clin Microbiol* 41:3945-3950.
- Ahmed MU, Urasawa S, Taniguchi K, et al., 1991.** Analysis of human rotavirus strain prevailing in Bangladesh in relation to nationwide floods brought by the 1988 monsoon. *J Clin Microbiol* 25:1635-40.
- Alam MM, Kobayashi N, Ishino M, et al. 2007.** Genetic analysis of an ADRV-N-like novel rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. *Arch Virol.*;152(1):199-208.
- Alam MM, Kobayashi N, Ishino M, et al. 2008.** Identical rearrangement of NSP3 genes found in three independently isolated virus clones derived from mixed infection and multiple passages of rotaviruses. *Arch Virol*;153:555-559.
- Anderson E.J., Weber S.G. 2004.** Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis*;4:91-99.
- Angel J, Franco MA, Greenberg HB. 2007.** Rotavirus Vaccines recent developments and future consideration. *Nature reviews microbiology* 5:529-39.
- Anonymous. 2003.** Intussusception. Cincinnati Children's Hospital Medical center Website available at: <http://www.cincinnatichildren.org/health/info/abdomen/diagnose/intussusceptions>.
- Antonelli G, Clementi M. 2008.** Principi di virologia medica. *Casa editrice Abrosiana*.
- Arista S, Vizzi E, Ferraro D, et al., 1997.** Distribution of VP7 serotypes and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from Italian children with diarrhea. *Arch Virol* 142(10):2065-2071
- Arista S., Vizzi E., Alaimo C., et al. 1999.** Identification of human rotavirus strains with the P[14] genotype by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37(8):2706-2708.
- Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, et al., 2006.** Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population. *J. Virol.* 80(21):10724-10733.
- Ball JM, Tian P, Zeng CQ, et al., 1996.** Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral non structural glycoprotein. *Science*; 1747-87.
- Banerjee I, Ramani S, Primrose B, et al., 2007.** Modification of rotavirus multiplex RT-PCR for the detection of G12 strains based on characterization of emerging G12 rotavirus strains from South India. *J Med Virol*; 79(9):1413-1421.
- Bányai K., Jiang B., Bogdán Á., et al. 2006.** Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J. Clin. Virol.* 37:317-22.
- Bernstein DI, Glass RI, Rodgers G, et al., 1995.** Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccine in US children. *JAMA* 273:1191-96.
- Bernstein DI, Sack DA, Rothstein E, et al., 1999.** Efficacy of live, attenuated, human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 354:287-90.
- Bernstein DI. 2006.** Live attenuated human rotavirus vaccine. Rotarix. *Seminar pediatric infection infect dis* 17:188-94.
- Besselaar TG, Rosenblatt A, Kidd AH. 1986.** Atypical rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 8: 1695-1703.
- Biryahwaho B, Hundley F, Desselberger U. 1987.** Bovine rotavirus with rearranged genome reassorts with human rotavirus. *Arch. Virol.* 96: 257-264.
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. 1973.** Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*; 2:1281-1283.
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. 1974.** Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* I: 149-151.

- Bishop RF. 1986.** Epidemiology of diarrhoeal diseases caused by rotavirus pp: 158-170. In J. Holmgren, A. Lindberg, and R. Mollby (ed), *development of vaccine and drugs against diarrhoea. Nobel conference 11. Studenlitteratur, Lund. Sweden.*
- Bishop R.F. 1996.** Natural history of human rotavirus infection. *Arch. Virol.*; 12 Suppl.; 119-128.
- Black RE, Greenberg HM, Kapikian MZ, et al., 1982.** Acquisition of serum antibody to Norwalk virus and rotavirus and relation to diarrhea in a longitudinal study of young children in rural Bangladesh. *J. Infect. Dis* 145:483-489.
- Blomqvist M, Juhela S, Erkkila S, et al., 2002.** Rotavirus infection and development of diabetes-associated autoantibodies during the first 2 years of life. *Clinical Exp Immunol* 128:511-5.
- Blutt SE, Conner ME. 2007.** Rotavirus: to the gut and beyond! *Curr. Opin. Gastroenterol.*;23(1):39-43.
- Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, et al., 1982.** Rotavirus gastroenteritis and weather. *J. Clin Microbiol* 16:478-482.
- Browning GF, Snodgrass DR, Nagakomi O, et al., 1992.** Human and bovine serotype G8 rotaviruses may be derived by reassortment. *Arh Virol* 125:121-8.
- Bryden AS, Davies HA, Thouless ME, et al., 1977.** Diagnosis of rotavirus infection by cell culture. *J. Med. Microbiol.* 10: 121-125.
- Burke B, Desselberger U. 1996.** Rotavirus pathogenicity. *Virology* 218:299-305.
- Candy DC. 2007.** Rotavirus infection: a systemic illness? *PLoS Med.*;4(4):e117.
- Centers for Diseases Control and Prevention. 1999.** Rotavirus vaccine for the prevention of rotavirus gastroenteritis among children. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 48:1-20.
- Chang K.O., Kim Y.J., Saif L.J. 1999.** Comparisons of nucleotide and deduced amino acid sequences of NSP4 genes of virulent and attenuated pairs of group A and C rotaviruses. *Virus Genes.* 18(3):229-233.
- Chanock SJ, Wenske EA, Fields BN. 1983.** Human rotavirus and genomic RNA. *J Infect Dis*;148(1):49-50.
- Chen D, Luongo CL, Nibert ML, et al., 1999.** Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology* 26:120-130.
- Choen J, Charpilienne A, Chilmonczyk S, et al., 1989.** Nucleotide sequences of bovine rotaviruses gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology* 131-140.
- Ciarlet M., Estes M.K., Conner M.E. 1997.** Comparative amino acid sequence analysis of the outer capsid protein VP4 from four lapine rotavirus strains reveals identity with genotype P[14] human rotaviruses. *Arch. Virol.* 142:1059-1069.
- Clarke SK, Cook GT, Egglestone SI, et al., 1972.** A virus from endemic vomiting disease. *Br Med J* 3:86-9.
- Cliver DO, Ellender RD, Fout GS, et al., 1992.** Foodborne viruses. In: *Vanderzant C, Splitstoeser DF, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* Washington (DC): American Public Health Association.
- Coluchi N, Munford V, Manzur J et al., 2002.** Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strain in children with acute diarrhea in Paraguay. *J clin microbiol*; 40:1709-1714
- Conner M, Ramig R. 1996.** Viral enteric diseases. In: *Nathanson N, et al., eds. Viral pathogenesis.* Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa:713-743.
- Cook SM, Glass RJ, Le Baron, et al., 1990.** Global seasonality of rotavirus infections. *Who Bulletin OMs* 68:172-173.
- Corbett E.L., Watt C.J., Walker N., et al. 2003.** The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch. Intern. Med.* 163(9):1009-21.
- Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, et al., 1999.** Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: predominance of novel P[6]G8 strains. *J. Med. Virol.* 57:308-312.
- Cunliffe N, Bresee J, Gentsch J, et al., 2002.** The expanding diversity of rotavirus. *Lancet* 359:640-2.
- Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, et al., 1994.** Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J. Clin. Microbiol.* 32(7): 1820-1822.

- Das S, Varghese S, Chaudhury P, et al., 2003.** Emergence of a novel human group A rotavirus G12 strain in India. *J Clin Microbiol* 41:2760-2762.
- Davidson GP, Townley RRW, Bishop RF, et al., 1975.** Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet I*: 242-246.
- Davidson GP, Hogg RJ, Kirubakaran CP. 1983.** Serum and intestinal immune response to rotavirus enteritis in children. *Infect. Immun* 40: 447-452.
- De Grazia S, Martella V, Giammanco GM, et al., 2007** Canine-origin G3P[3] rotavirus strain in child with acute gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.*;13(7):1091-3.
- De Leener K., Rahman M., Matthijnsens J., et al. 2004.** Human infection with a P[14], G3 lapine rotavirus. *Virology* 325:11-17.
- de Rougemont A., Kaplon J., Lebon P., et al. 2008.** Unexpected substitution of dominant rotavirus G genotypes in French hospitalized children over five consecutive seasons. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. DOI* 10.1007/s10096-008-0640-1.
- Dennhey PH. 2008.** Rotavirus vaccine: an overview. *Clin microbiol reviews* 21:198-208.
- Desselberger U. 1996.** Genome rearrangements of rotaviruses. *Arch. Virol. Suppl.*; 12: 37-51.
- Dimitrov DH, Graham DY, Estes MK. 1985.** Detection of rotaviruses by nucleic acid hybridization with cloned DNA of simian rotavirus SA11 genes. *J. Infect. Dis.*; 152:293-300.
- Diwakarla C.S., Palombo E.A. 1999.** Genetic and antigenic variation of capsid protein VP7 of serotype G1 human rotavirus isolates. *J. Gen Virol.* 80(P2):341-344.
- Dolin R, Blaclow NR, DuPont H, et al., 1971.** Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates *J Infect Dis* 123:307-12.
- Dolin R, Blaclow NR, DuPont H, et al., 1972.** Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Pro Soc Exp Biol Med* 140:578-83.
- Dyall-Smith ML, Lazdins IT, Tregear GW, et al. 1986.** Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83(10):3465-3468.
- Esparza J, Gil F. 1978.** A study on the ultrastructure of human rotavirus. *Virology* 91:141-150.
- Espejo RT, Calderon, Gonzales N. 1977.** Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol* 6:502-506.
- Estes MK, Cohen J. 1989.** Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53: 410-449.
- Estes MK. 2001.** Rotaviruses and their replication. In: Knipe DM., Howley PM, Griffin DE, et al. Eds. *Fields virology, 4th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.*; 2: 1747-1785.
- Estes MK, Kapikian A. 2007.** Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds) *Fields virology, 5th edn.* Kluwer Health\Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia pp:1917-1974.
- Fiore L, Greenberg HB, Mackow ER. 1991.** The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* 181, pp: 553-563.
- Fischer TK, Page NA, Griffin DD, et al. 2003.** Characterization of incompletely typed rotavirus strains from Guinea-Bissau: identification of G8 and G9 types and a high frequency of mixed infections. *Virology*; 311(1):125-33.
- Flewett TH, Bryden AS, Davies H. 1973.** Virus particles in gastroenteritis. *Lancet II*: 1497.
- Flewett TH, Bryden AS, Davies H, et al., 1974.** Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet II*: 61-63.
- Flores J, Perez L, White M, et al., 1982.** Genetic relatedness among human rotavirus as determinate by RNA hybridization. *Infect Immun* 37:648-655.
- Fragoso M, Kumar A, Murray DL. 1986.** Rotavirus in nasopharyngeal secretions of a children with upper respiratory tract infections. *Diagn Microbiol Dis* 4:87-8.

- Franco MA, Angel J, Greenberg HB. 2006.** Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* 24:2718-2731.
- Franco MA, Greenberg HB. 1999.** Immunity to rotavirus infection in mice. *J Infect Dis* 179(Suppl 3):S466-S469.
- Fukai K., Onoda H., Itou T., et al. 2004.** Genetic and serological characterization of novel serotype G8 bovine rotavirus strains isolated in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*66:1413-1416.
- Fukumi H, Nakaya R, Hatta S, et al., 1957.** An indication as to identity between the infectious diarrhea in Japan and the afebrile infectious nonbacterial gastroenteritis by human volunteer experiment. *Jpn J Med Sci Biol* 10:1-17.
- Gabbay Y.B, Borges A.A., Barardi C.R.M., et al. 2006.** Excretion profiles of porcine and human group C rotaviruses in children from Belem, Para, Brazil: evidence for interspecies transmission and sequential infections. *Proceedings of the 9th Double Stranded RNA Viruses Meeting, Cape Town, South Africa, 2006; p. 109.*
- Gabutti G, Lazzara C, Marsella M, et al., 2007.** Burden of hospitalizations due to Rotavirus infection in Emilia Romagna, Italy. *Acta Biomed.*, 78(3):176-81.
- Gallimore I., Pipkin C., Shrimpton H., et al. 2005.** Detection of multiple enteric virus strains within a foodborne outbreak of gastroenteritis: an indication of the source of contamination. *Epidemiology and Infection* 133:41-47.
- Gentsch JR, Glass RI, Woods P, et al., 1992.** Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30(6): 1365-1373.
- Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, et al., 1996.** Review of G and P typing result from a global collection of strain: implication for vaccine development. *J Infect Dis* 174:S30-6.
- Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, et al., 2005.** Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implication for rotavirus vaccine programs. *J. Infect. Dis.* 192(Suppl 1): S146-S159.
- Gerna G., Sarasini A., Parca M., et al., 1992.** Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. *J. Clin Microbiol.* 30:9-16.
- Gianino P., Mastretta E., Longo P., et al. 2002.** Incidence of nosocomial rotavirus infections, symptomatic and asymptomatic, in breast-fed and non-breast-fed infants. *J Hosp Infect.* 50:13-17.
- Gilger MA, Matson DO, Conner ME, et al. 1992.** Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J. Pediatr.*;120:912-917.
- Glass R.I., Bresee J.S., Turcios R., et al. Rotavirus Vaccines: targeting the developing world. 2005. J. Infect. Dis, 192(Suppl1): S160-S166.**
- Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, et al., 2006.** rotavirus vaccines: current prospect and future challenges. *Lancet* 368:323-32
- Goldwater PN, Rowland K, Power R, et al., 2001.** Rotavirus encephalopathy: pathogenesis reviewed. *J Paediatr Child Health*; 37:206-9.
- Gordon I, Inghraham HS, Korn RF, et al., 1947.** Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J exp med* 86:409-22.
- Gordon I, Inghraham HS, Korn RF, et al., 1949.** Gastroenteritis in man due to a filtrable agent. *N Y States J med* 49:1918-20.
- Gordon I, Patterson PR, Whitney E. 1956.** Immunity in volunteers recovered from nonbacterial gastroenteritis, *J Clin Invest* 35:200-5.
- Gouvea V, Glass RI, Woods P, et al., 1990.** Polymerase Chain Reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28(2): 276-282.
- Gouvea V., Allen J.R., Glass R.I., et al. 1991.** Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 29(3): 519-523.
- Gouvea V, Ramirez C, Li B, et al., 1993.** Restriction endonuclease analysis of the VP7 genes of human and animal rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 31(4): 917-923.

- Gouvea V., Santos N, and Timenetsky M.C. 1994.** Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32:1338-1340.
- Gouvea V, Brantly M. 1995.** Is rotavirus a population of reassortants? *Trends in Microbiol.* 3:159-62.
- Grauballe PC, Hjelt K, Krasilnikoff PA, et al., 1981.** ELISA for rotavirus-specific secretory IgA in Human sera. *Lancet II*:588-589.
- Gray J, Vesikari T, Van Damme P, et al., 2008.** Rotavirus. *J pediatr Gastroenterol and nutrition* 46:S(2)25-31.
- Green K.Y., Hoshino Y., Ikegami N. 1989.** Sequence analysis of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein (VP7) of two new human rotavirus serotypes. *Virology*, 168:429-433.
- Griffin DD, Nakagomi T, Hoshino Y, et al., 2002.** Characterization of nontypeable rotavirus strain from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6],G12) and rare P3[9] strain related to bovine rotaviruses. *Virology* 294:256-269.
- Grimwood K. 1986.** Serum and mucosal responses to rotavirus infections in infants and young children. *M.D. thesis, University of Melbourne, Melbourne Australia.*
- Grimwood K., Lambert S.B. 2009.** Rotavirus vaccines. *Human Vaccines*,5(1):1-13.
- Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SC, et al., 2007.** Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis*; 13(10):1571-1573.
- Gutiérrez-Aguirre I, Steyer A, Boben J, et al. 2008.** Sensitive detection of multiple rotavirus genotypes with a single reverse transcription-real-time quantitative PCR assay. *J Clin Microbiol.*;46(8):2547-54.
- Hall TA. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser*41:95-98.
- Hansman GS, Oka T, Li TC, et al. 2008.** Detection of human enteric viruses in Japanese clams. *J Food Prot*;71(8):1689-1695.
- Hasegawa A., Inouye S., Matsuno S., et al. 1984.** Isolation of human rotaviruses with a distinct RNA electrophoretic pattern from Indonesia. *Microbiol. Immunol.* 28:719-722.
- Heiman E.M., McDonald S.M., Barro M., Tarapolewafa Z.F., Bar-Magen T., Patton J.T. 2008.** Group A Human Rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *Journal of Virology*, DOI:10.1128/JVI.01402-08.
- Herring AJ, Inglis, NF, Ojeh CK, et al., 1982.** Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 16: 473-7.
- Hieber JP, Shelton S, Nelson JD, et al., 1978.** Comparison of human rotavirus disease in tropica and temperate setting. *Am. J. Dis Child* 132:853-858.
- Ho MS, Glass RI, Monroe SS, et al., 1989.** Viral gastroenteritis aboard a cruise ship. *Lancet II*:961-5.
- Holmes IH. 1983.** The Rotaviruses. In: W.K. Joklik, ed. *The Rotaviridae. Plenum Press, New York*, pp: 359-423.
- Holmes JK, Kirkwood CD, Gerna G, et al., 1999.** Characterization of unusual G8 rotavirus strain isolated from Egyptian children. *Arch Virol* 144:1381-96.
- Honeyman MC, Stone NL, Harrison LC. 1998.** T-cell epitopes in type I diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agent. *Mol med* 4:231-9.
- Honeyman MC, Coulson BS, Stone NL, et al., 2000.** Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type I diabetes. *Diabetes* 49:1319-24.
- Hongou K, Konishi, Yagi S, et al., 1998.** Rotavirus encephalitis mimicking afebrile benign convulsion in infant. *Pediatr Neurol* 18(4):354-357.
- Honma S, Chizhikov V, Santos N, et al. 2007.** Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. : *J Clin Microbiol.*;45(8):2641-2648.
- Horie Y, Masamune O, Nakagomi O. 1997.** Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins identified by sequence analysis. *J. Gen. Virol.* 78:2341-2346.

- Hoshino Y**, Saif LJ, Kang SY, et al., **1995**. Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of a human rotavirus in the gnotobiotic piglet model. *Virology* 209:274-280.
- Hoshino Y.**, Honma S., Jones R.W. et al. **2005**. A rotavirus strain isolated from pig-tailed macaque (*Macaca nemestrina*) with diarrhea bears a P6[1]:G8 specificity. *Virology* 345:1-12.
- Hui EK.** **2006**. Reasons for the increase in emerging and re-emerging viral infectious diseases. *Microbes. Infect.* 8:905-16.
- Hundley F**, Biryahwaho B, Gow M, et al., **1985**. Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology* 143: 88-103.
- Hundley F**, McIntyre M, Clark B, et al., **1987**. Heterogeneity of genome rearrangements in rotaviruses isolated from a chronically infected immunodeficient child. *J. Virol.* 61: 3365-3372.
- International Committee on Taxonomy of Viruses.** **2005**. In: Virus Taxonomy. *Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. H.V. Van Regenmortel, D.H.L. Bishop, M. H. Van Regenmortel, Claude M. Fauquet (Eds). Elsevier, Oxford, UK.
- Isa P.**, Wood A.R., Netherwood T., et al. **1996**. Survey of equine rotaviruses shows conservation of one genotype in background of two G genotypes. *Arch Virol*; 141:1601-1612.
- Iturriza-Gómara M**, Green J, Brown DWG, et al., **2000**. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse-transcription-PCR genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 38(2): 898-901.
- Iturriza-Gómara M**, Isherwood B, Desselberg U, et al., **2001**. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strain isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol* 75:3696-705.
- Iturriza-Gómara M**, Wong C, Blome S, et al., **2002a**. Rotavirus Subgroup characterization by restriction endonuclease digestion of a cDNA fragment of the VP6 gene. *J. Virol. Meth.* 105:99-103.
- Iturriza-Gómara M**, Auchterlonie IA, Zaw W, et al., **2002b**. Rotavirus gastroenteritis and central nervous system (CNS) infection: characterization of the VP7 and VP4 genes of rotavirus strains isolated from paired fecal and cerebrospinal fluid samples from a child with CNS disease. *J Clin Microbiol*; 40(12):4797-99.
- Iturriza-Gómara M.**, Kang G., and Gray J. **2004a**. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J. Clin. Virol.*, 31:259-265.
- Iturriza-Gómara M.**, Clarke I., Desselberger U., et al. **2004b**. Seroepidemiology of group C rotavirus in England and Wales. *Eur. J. Epidemiol.*, 19:589-595.
- Jin Q**, Ward RL, Knowlton DR, et al., **1996**. Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses. *Arch. Virol.* 141:2057-2076.
- Jordan WS Jr**, Gordon I. **1953**. A study of illness in a group of Cleveland families. VII. Transmission of acute nonbacterial gastroenteritis to volunteers: Evidence for two different etiological agents. *J Exp Med* 98:461-75.
- Kalica AR**, Sereno MM, Wyatt RG, et al., **1978**. Comparison of human and animal rotavirus strain by gel electrophoresis of viral RNA. *Virology* 87:247-255.
- Kaljot KT**, Shaw RD, Rubin DH. **1988**. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virology* 62, pp 1136-1144.
- Kapikian AZ**, Wyatt RG, Dolin R, et al. **1972**. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.*;10(5):1075-1081.
- Kapikian AZ**, Kim HW, Wyatt RG, et al., **1974**. Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science* 185:1056-1061.
- Kapikian AZ**, Kim HW, Wyatt RG, et al., **1976**. Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infant and young children. *N. Engl J Med* 294: 965-972.
- Kapikian AZ.** **1993**. Rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine and observation on selected non Jennerian approaches to rotavirus vaccination. In *Kapikian AZ, ed viral infections of the gastrointestinal tract. 2nd ed. New York: Marcel Dekker 443-70.*
- Kapikian AZ.** **1997**. Viral gastroenteritis. In: *Evans A., R. Kaslow, eds. Viral infections of humans. New York. Plenum Press, pp: 293-340.*

- Kapikian** AZ, Hoshino Y, Chanock RM. **2001**. Rotaviruses. In: *Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al., Eds. Fields virology, 4th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.; 2: 1787-1833.*
- Kehle** J, Metzger-Boddien C, Tewald F, et al., **2003**. First case of confirmed rotavirus meningoencephalitis in Germany. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:468-70.
- King** L. **2001**. Pediatrics, Intussusception. eMedicine web site available at <http://www.emedicine.com/EMERG/topic385.htm>.
- Kirkwood** C.D., Coulson B.S., Bishop R.F. **1996**. G3P2 rotaviruses causing diarrhoeal disease in neonates differ in VP4, VP7 and NSP4 sequence from G3P2 strains causing asymptomatic neonatal infection. *Arch. of Virol.* 141:1661-1676.
- Kirton** A, Brusche K, Ross C, et al., **2005**. Acute necrotizing encephalopathy in Caucasian children: two cases and review of the literature. *J Child Neurol* 20(6):527-532.
- Kobayashi** N, Kojima K, Taniguchi K, et al. **1995**. Non-random selection of gene segment 3 and random selection of gene segment 5 observed in reassortants generated in vitro between rotavirus SA11 and RRV. *Res Virol*;146:53-59.
- Kobasa** D., **Kawaoka** Y. **2005**. Emerging Influenza Viruses: past and present. *Curr. Mol. Med.* 8:791-803.
- Kojima** S, Fukumi H, Kusama H, et al., **1948**. Studies on the causative agent of the infectious diarrhea: Records of the experiment on human volunteers. *Jpn Med J* 1:467-76.
- Konno** T, Suzuki H, Katsushima N, et al., **1983**. Influence of temperature and relative humidity on human rotavirus infection in Japan. *J infect Dis* 147:125-128.
- Koopmans** M., **Brown** D. **1999**. Seasonality and diversity of group A rotaviruses in Europe. *Acta Paediatr. Suppl*; 88:14-19.
- Koopmans** M, **Duizer** E. **2004**. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol*; 90(1):23-41.
- Kosek** M, Bern C, Guerrant RL. **2003**. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin of the World Health Organization*, 81:197-204.
- Kozak** M. **1986**. Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. *Cell*; 47:481-483.
- Kumar** S, Tamura K, Jakobsen IB, et al., **2001**. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*. 17:1244-1245.
- Kuzuya** M., Fujii R., Hamano M., et al. **1998**. Survey of human group C rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993. *J. Clin. Microbiol.* 36(1):6-10.
- Laemmli** UK. **1970**. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680-685.
- Le Guyader** F., Haugarreau L., Miossec L., et al. **2000**. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl. Envir. Microbiol.* 66:3241-3248.
- Lecce** JG, King MW, Mock R. **1976**. Reovirus-like agent associated with fatal diarrhoea in neonatal pigs. *Infect. Imm.* 14: 816-825.
- Lee** CN, Wang YL, Kao CL, et al., **2000**. NSP4 gene analysis of rotaviruses recovered from infected children with and without diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 38:4471-4477.
- Leong** YK, Xui OC, Chia OK. **2008**. Survival of SA11 rotavirus in fresh fruit juices of pineapple, papaya and honeydew melon. *J Food Prot*;71(5):1035-1037.
- Linhares** AC, Ruiz-Palacios GM, Guerrero MI et al., **2005**. A short report on highlight of world-wide development of RIX4414: a Latin American experience. *Vaccine* doi:10.1016/vaccines.2005.07.027.
- Liu** M, Mattion NM, Estes MK. **1992**. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology* 188, pp:77-84.
- Lopez** S., Espinosa R., Greenberg H.B., et al. **1994**. Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6. *Virology* 204:153-162.

- Lorrot M., Vasseur M. 2007.** How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Virology Journal*; 4:31 (doi:10.1186/1743-422X-4-31)
- Lourenco M.H., Nicolas J.C., Cohen J., et al. 1981.** Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 132E:161-173.
- Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, et al., 2000.** Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*; 287:491-5.
- Lynch M, Lee B, Azimi P, et al., 2001.** Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. *Clin Infect Dis*; 33:932-8.
- Lynch M., Shieh W-J., Tatti K., et al. 2003.** The pathology of rotavirus-associated deaths, using new molecular diagnostics. *Clin. Infect. Dis.*; 37: 1327-1333.
- Madeley CR, Cosgrove BP. 1975.** 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet*; 2: 451-452.
- Mäkelä M, Vaarala O, Hermann R, et al., 2006.** Enteral virus infections in early childhood and an enhanced type I diabetes-associated antibody response to dietary insulin. *J autoimmune* 27:54-61.
- Manula L, Von Bonsdorff CH. 2002.** Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses; analysis of Finnish rotavirus strain. *J Virol* 76:11793-800.
- Martella V., Terio V., Del Gaudio G., et al. 2003.** Detection of the emerging rotavirus G9 serotype at high frequency in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 41(8):3960-3963.
- Martella V, Terio V, Arista S, et al., 2004.** Nucleotide variation in the VP7 gene affects PCR genotyping of G9 rotaviruses identified in Italy. *J. Med. Virol.* 72: 143-148.
- Martella V, Banyai, Ciarlet M, et al., 2006.** Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6]lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology* 344:509-519.
- Martella V., Bányai K., Lorusso E., et al. 2007a.** Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. *Vet. Microbiol.* 123:26-33.
- Martella V., Bányai K., Lorusso E., et al. 2007b.** Genetic heterogeneity in the VP7 of group C rotaviruses. *Virology* 367(2):358-66.
- Martella V, Colombrita D, Lorusso E, et al. 2008.** Detection of a porcine-like rotavirus in a child with enteritis in Italy. *J Clin Microbiol*;46(10):3501-7.
- Mascarenhas JD, Linhares AC, Gabbay YB, et al., 2007.** Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. *Virus. Res.* 126:149-158.
- Matthijnsens J., Rahman M., Martella V., et al., 2006a.** Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J. Virol.* 80(8):3801-3810.
- Matthijnsens J., Rahman M., Yang X., et al. 2006b.** G8 rotavirus strains isolated in the Democratic Republic of Congo belong to the DS-1-like genogroup. *J. Clin. Microbiol.* 44(5):1801-1809.
- Matthijnsens J, Ciarlet M, et al., 2008a.** Recommendations for declassification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* DOI 10.1007/s0075-008-0155-1
- Matthijnsens J, Ciarlet M, Heiman et al., 2008b.** Full genome-based classification of rotaviruses reveals common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strain and human DS-1 like and bovine rotavirus strain. *J Virol* 82:3204-3219
- McIntyre M, Rosenbaum V, Rappold W, et al., 1987.** Biophysical characterization of rotavirus particle containing rearranged genomes. *J. Gen. Virol.* 68: 2961-2966.
- Medici MC, Natali A, Terragno M, et al., 1988.** Identificazione differenziale di virus della famiglia reoviridae in estratti fecali umani. In: "Microbiologia Clinica delle infezioni del sistema nervoso centrale" (ed. G.C. Schito, G. Picerno, A. Visconti), Atti del XVI Congresso Nazionale S.I.M., p: 63.
- Medici M.C., Martinelli M., Arcangeletti M.C. 2004.** Epidemiological aspects of human rotavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in an area of northern Italy. *Acta Biomed. Ateneo Parmense.* 75(2): 100-106.

- Merril CR, Goldman D, Sedman SA, et al., 1981.** Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid protein. *Science*; 211: 1437-1438.
- Mertens PPC, Duncan R, Attoui H, et al., 2005.** Reoviridae. In: Fauquet C, Mayo MA, Maniloff J, Desselberg U, Ball LA (eds) *Virus taxonomy: eight report of the International Committee on Taxonomy of viruses*. Elsevier, Amsterdam pp: 447-560.
- Middleton PJ, Szymanski MT, Abbot GD, et al., 1974.** Orbivirus of acute gastroenteritis of infancy. *Lancet I*: 1241-1244.
- Min BS, Noh YJ, Shin JH, et al. 2006.** Assessment of the quantitative real-time polymerase chain reaction using a cDNA standard for human group A rotavirus. *J Virol Methods*.;137(2):280-286.
- Morens DM, Zweighaft RM, Vernon TM, et al., 1979.** A waterborne outbreak of gastroenteritis with secondary person-to-person spread. Association with a viral agent. *Lancet I*: 964-6.
- Mossel EC, Ramig RF. 2002.** Rotavirus genome segment 7 (NSP3) is a determinant of extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J. Virol.*;76(13):6502-6509.
- Mossel EC, Ramig RF. 2003.** A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J.Virol.*;77:12352-12356.
- Müller H, Johne R. 2007.** Rotaviruses: diversity and zoonotic potential--a brief review. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.*;120(3-4):108-12.
- Murray C, et al., 2001.** The global burden of disease 2000 project: Aims Methods, and Data Sources. Geneva: *World Health Organization*.
- Nagakomi O, Nagakomi T, Akatani K, et al., 1989.** Identification of rotavirus genogroup by RNA-RNA hybridization. *Mol Cell Probes* 3:251-61.
- Nakagomi O, Kaga E, Nakagomi T. 1992.** Human rotavirus strain with unique VP4 neutralization epitopes as a result of natural reassortment between members of the AU-1 and Wa genogroups. *Arch Virol.*;127(1-4):365-371.
- Nakagomi T, Horie Y, Koshimura Y, et al., 1999.** Isolation of a human rotavirus strain with a super-short RNA pattern and a new P2 subtype. *J. Clin Microbiol* 37:1213-1216.
- Nakagomi T, Cuevas LE, Gurgel RG, et al., 2008.** Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. *Arch Virol*; 153(3):591-593.
- Nakagomi T, Nakagomi O. 1989.** RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. *J Virol* 63:1431-4.
- Nakagomi T, Nakagomi O. 2000.** Human rotavirusHCR3 possesses a genomic RNA constellation indistinguishable from that of feline and canine rotaviruses. *Arch virol* 145:2403-9.
- Nakagomi O, Nakagomi T. 2002.** Genomic relationship among rotaviruses recovered from various animal species as revealed by RNA-RNA hybridization assays. *Res. Vet. Sci.* 73:207-214.
- Nakagomi T, Nakagomi O. 2005** Rotavirus antigenemia in children with encephalopathy accompanied by rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol*; 150:1927-31.
- Nakajima H, Nakagomi T, Kamisawa T, et al., 2001.** Winter seasonality and rotavirus diarrhoea in adults. *Lancet*; 357: 1950.
- Newman JFF, Brown F, Bridger JC, et al., 1975.** Characterization of rotavirus. *Nature* 258:631-633.
- Nigrovic LE, Lumeng C, Landrigan C, Chiang VW. 2002.** Rotavirus cerebellitis? *Clin Infect Dis*; 34:130.
- Offit PA, Blavat G, Greenberg HB, et al. 1986.** Molecular basis for rotavirus virulence: role of rotavirus gene segment 4. *J Virol* 57:46-49.
- Ohshima A, Takagi T, Nagakomi T, et al., 1990.** Molecular characterization by RNA-RNA hybridization of a serotype 8 human rotavirus with super-short RNA electropherotype. *J Med Virol* 30:107-12.
- Page NA, Steele AD. 2004.** Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains from South Africa from 1984 to 1998. *J Med Virol.*;72(2):320-7.
- Pager C.T., Alexander J.J., Steele A.D. 2000.** South African G4P[6] asymptomatic and symptomatic neonatal rotavirus strains differ in their NSP4, VP8*, and VP7 genes. *J. Med. Virol.* 62:208-216.

- Palmer EL, Martin ML, Murphy FA. 1997.** Morphology and stability of infantile gastroenteritis virus: comparison with reovirus and bluetongue virus. *J. Gen. Virol* 35:403-414.
- Palombo EZ, Clark R, Bishop RF. 2000.** Characterization of a “Europeanlike” serotype G8 human rotavirus isolated in Australia. *J. Med Virol* 60:56-62.
- Parashar UD, Bresee JS, Gentesch JR, et al., 1998.** Rotavirus *Emerg Infect Dis* 4:561-70.
- Parashar UD, Hummelman EG, Bresse JS, et al., 2003.** Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 9: 565-572.
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, et al., 2006.** Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12:304-306.
- Parreño V., Bok K., Fernandez F., et al. 2004.** Molecular characterization of the first isolation of rotavirus in guanacos (*Lama guanicoe*). *Arch. Virol.* 149:2465-2471.
- Patric M, Tellier R. 2003.** Rotavirus, calicivirus, astrovirus and other diarrhea viruses. In: Murray P, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of clinical microbiology*, pp. 1439-1451.
- Patton JT. 2001.** Rotavirus RNA replication and gene expression. *Novartis Found Symp*; 238:64-77.
- Perez-Schael I, Guntinas MJ, Perez M, et al. 1997.** Efficacy of the rhesus rotavirus –based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N. Engl J med* 337:1181-1209.
- Peter G, Myers MG. 2002.** Intussusception, rotavirus and oral vaccine, summary of a workshop. *Pediatrics* 97:7-13.
- Phan T.G., Nishimura S., Okame M., et al. 2004.** Virus diversity and an outbreak of group C rotavirus among infants and children with diarrhea in Maizuru city, Japan during 2002-2003. *J. Med. Virol.* 74(1):173-9.
- Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, et al., 2007.** Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes. *J virol* 81:10188-10194.
- Pickering LK, Bartlett AV 3rd, Reves RR, et al., 1988.** Asymptomatic excretion of rotavirus before and after rotavirus diarrhea in children in day care centers *J Pediatr*; 112(3): 361-5.
- Pisanelli G., Martella V., Pagnini U., et al. 2005.** Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes in buffalo group A rotaviruses isolated in Southern Italy. *Vet. Microbiol.* 110(1-2):1-6.
- Pocok DH. 1987.** Isolation and characterization of two group A rotaviruses with unusual genome profiles. *J. Gen. Virol.* 68: 653-660.
- Pongsuwanna Y, Guntapong M, Chiwakul R, et al. 2002.** Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. *J. Clin Microbiol* 40:1390-1394.
- Rahman M, Banik S, Faruque ASG, et al., 2005.** Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J Clin Microbiol*;43(9):4460-4465.
- Rahaman M, Matthijssens J, Xuelei Yang. 2007.** Evolutionary History and Global Spread of the Emerging G12 Human Rotavirus. *J. Virol* 81(5):2382-2390.
- Rainsford EW, McCrae MA. 2007.** Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. *Virus Res*; 130(1-2):193-201.
- Ramachandran M, Kirkwood CD, Unicomb L, et al., 2000.** Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strain from a global collection. *Virology* 278:436-444.
- Ramig R.F. 2004.** Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J. Virol.*; 78(19): 10213-10220.
- Ramig R.F. 2007.** Systemic rotavirus infection. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*; 5(4): 591-612.
- Rayani A, Bode U, Habas E, et al. 2007.** Rotavirus infection in paediatric oncology patients: a matched-pairs analysis. *Scand. J. Gastroenterol.*;42:81-87.
- Reinmann HA, Price AH, Hodges JH. 1945.** The cause of epidemic diarrhea, nausea and vomiting (viral dysentery?). *Pro Soc Exp Biol Med* 59:8-9.
- Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH, et al., 1996.** Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines report of the national multicenter trial. *Pediatric* 97:7-13.

- Rheingans RD, Heylen J, Giaquinto C. 2006.** Economics of rotavirus gastroenteritis and vaccination in Europe: what makes sense? *Pediatr Infect Dis J*;25(1 Suppl):S48-55.
- Roberts J.A., Cumberland P., Sockett P.N., et al., 2003.** The study of infectious intestinal disease in England: socio-economic impact. *Epidemiol. Infect*; 130:1-11.
- Rodger SM, Schhagl RD, Holmes HI. 1975.** Biochemical and biophysical characteristics of diarrhea viruses of human and calf origin. *J. Virol* 16:1229-1235.
- Romi R., Boccolini D., Majori G. 2002.** Epidemiological trends of imported malaria in Italy in 2000-2002. *Giornale Italiano di Medicina tropicale*;7:67-70.
- Roseto A, Esgaig J, Delain E. 1979.** Structure of rotaviruses as studied by the freeze-drying technique. *Virol* 98:471-475.
- Rudan I, el Arifeen S., Black R.E., et al. 2007.** Childhood pneumonia and diarrhoea: setting our priorities right. *Lancet. Infect. Dis.* 7:56-61.
- Ruggeri FM, Marziano ML, Tinari E, et al., 1989.** Four-year study of rotavirus electropherotypes from cases of infantile diarrhea in Rome. *J. Clin Microbiol* 27:1522-1526.
- Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR et al, 2006.** Safety and efficacy of a fan attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 354:11-22
- Salinas B, Perez Schael I, Linhares AC, et al., 2005.** Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24(9):807-816.
- Sanchez-Fauquier A., Roman E., Colomina J., et al. 2003.** First detection of group C rotavirus in children with acute diarrhea in Spain. *Arch. Virol.* 148:399-404.
- Santos N, Lima RC, Nozawa CM, et al., 1999.** Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of type G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment. *J clin Microbiol* 37:2743-6.
- Santos N, Hoshino Y. 2005.** Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 15(1):29-56.
- Schoub BD, Cohen F, Thompson D, et al., 1982.** Variance in rotavirus infection rates in different urban population groups in South Africa. *J. Med. Virol.*; 10: 171-179.
- Shaw DP, Morehouse LG, Solorzano RF. 1989** Rotavirus replication in colostrum-fed and colostrum-deprived pigs. *Am J Vet Res*; 50:1966-70.
- Shaw RD, Groene WS, et al., 1992.** Recombinant baculovirus-expressed rotavirus protein (VP4) in an ELISPOT assay of antibody secretion. *Viral. Immunol.*; 5: 51-59.
- Shinozaki K, Okada M, Nagashima S, et al., 2004.** Characterization of human rotavirus strain with G12 and P[9] detected in Japan. *J Med Virol* 73:612-616.
- Smith PJ, Schwartz B, Mokdad A, et al., 2003.** The first oral rotavirus vaccine, 1988-1999: estimates of uptake from the National Immunization Survey. *Public Health Rep* 118:134-43.
- Soriano-Gabarró M, Mrukowicz J, Vesikari T, et al., 2006.** Burden of rotavirus disease in European Union countries. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25(Suppl 1):S7-S11.
- Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, et al., 2006.** Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J gastroenterol* 101:2333-40.
- Steyer A., Poljšak-Prijatelj M., Bufon T., et al. 2006.** First detection of group C rotavirus in patients with gastroenteritis in Slovenia. *J Med Virol.* 78:1250-5.
- Suzuki HY, Amano H, Kinebuchi, et al., 1981.** Rotavirus infection in children with acute gastroenteritis in Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 30: 293-294.
- Svennson L, Sheshberadaran H, Vesikari T, et al. 1987.** Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT 4237, RRV-1). *J Gen Virol*; 68:1993-1999.

- Tange B.**, Gilbert J.M., Matsui S.M., et al. 1997. Comparison of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup specific epitopes using site-directed mutagenesis. *Virology*, 237:89-96.
- Taniguchi K**, Urasawa T, Kobayashi N, et al., **1990**. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new genotype specificity. *J Virol* 64:5640-5644.
- Tcheremenskaia O**, Marucci G, De Petris S, et al., **2007**. Molecular Epidemiology of Rotavirus in central and Southeastern Europe. *J. Clinical Microbiol* pp:2197-2004.
- The pediatric rotavirus european committee**. 2006. The pediatric burden of rotavirus diseases in Europe. *Epidemiol Infect* 134:1-9.
- Tsugawa T**, **Hoshino Y**. **2008**. 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*;380(2):344-53.
- Uhnoo I**, Riepenhoff-Talty M, Dharakul P, et al. **1990**. Extramucosal spread and development of hepatitis in immunodeficient and normal mice infected with rhesus rotavirus. *J. Virol.*; 68:361-368.
- Urasawa S**, Urasawa F, Wakasugu N, et al., **1990**. Presumptive seventh serotype of human rotavirus. *Arch Virol* 113:279-282.
- Ushijima H**, Bosu K, Abe T, et al. **1986**. Suspected rotavirus encephalitis. *Arch Dis Child*;61:692-694.
- Ushijima H**, Xin KQ, Nishimura S, et al., **1994**. Detection and sequencing of rotavirus VP7 gene from human materials (stools, sera, cerebrospinal fluids, and throat swabs) by reverse transcription and PCR. *J Clin Microbiol*; 32(12):2893-7.
- Van Damme P.**, Giaquinto C., Maxwell M., et al. **2007**. Distribution of rotavirus genotypes in Europe, 2004-2005: the REVEAL Study. *J. Infect. Dis.* 195(Suppl 1):S17-S25.
- van Zyl W.B.**, Page N.A., Grabow W.O., et al. **2006**. Molecular epidemiology of group A rotaviruses in water sources and selected raw vegetables in southern Africa. *Applied and Environmental Microbiology* 72:4554-4560.
- Venkataram Prasad BV**, Wang GJ, Clerx JPM, et al., **1988**. Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol Biol* 199:269-275.
- Vesikari T**, Sarkkinen HK, Maki M. **1981**. Quantitative aspects of rotavirus excretion in childhood diarrhea. *Acta Paediatr Scand*;70:717-721.
- Vesikari T**, Isolauri E, D'Hondt E, et al., **1984**. Protection of infants against rotavirus diarrhea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet* I:977-81.
- Vesikari T**, Karvonen A, Prymula R, et al., **2006a**. Human rotavirus vaccine Rotarix TM (RIX4414) is highly efficacious in Europe. Presented at *24th Annual meeting of the European Society for Pediatric infectious diseases (ESPID) Basel, Switzerland*.
- Vesikari T** et al., **2006b**. Effect of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in health infant. *Vaccine* 24: 4821-4829.
- Vesikari T** Matson DO, Dennehy PH. **2006c**. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N.Engl J Med* 354:23-33.
- Ward R.L.**, Bernstein D.I., Young E.C. et al. **1986**. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J. Infect. Dis.*, 154:871-880.
- Ward RL**, Nakagomi O, Knowlton DR, et al. **1990**. Evidence for natural reassortants of human rotaviruses belonging to different genogroups. *J Virol.*;64(7):3219-3225.
- Watanabe M**, Nagakomi T, Koshimura Y, et al., **2001**. Direct evidence for genome segment reassortment between concurrently-circulating human rotavirus strains. *Arch. Virol.*; 146: 557-570.
- Weclawicz K**, Svensson L, Kristensson K. **1998**. Targeting of endoplasmic reticulum-associated proteins to axons and dendrites in rotavirus-infected neurons. *Brain Res Bull*; 46:353-60.

- Whitby HJ, Rodgers FG. 1980.** Detection of virus particles by electron microscopy with polyacrylamide hydrogel. *J Clin Pathol*; 33: 484-7.
- White DO, Fenner FJ. 1986.** Medical virology, 3^o ed. *Academic Press Inc. London*: 575-584.
- Widdowson MA, Bresse JS, Gentsch JR, et al., 2005a.** Rotavirus disease and its prevention. *Curr Opin Gastroenterol* 21:26-31.
- Widdowson M-A., Monroe S.S., Glass R.I. 2005b.** Are noroviruses emerging?. *Emerg. Infect. Dis.* 11(5):735-7.
- Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. 2003.** Virus causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*, 9: 247-62.
- Wong V. 2001.** Acute gastroenteritis-related encephalopathy. *J Child Neurol* 2001; 16:906-10.
- Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, et al., 1974.** Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect dis* 129:709-14.
- Wyatt RG, James HD, Pittman AL, et al., 1983.** Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 18: 310-317.
- Yamamoto A, Zennyogi H, Yanagit K, et al., 1948.** Research into the causative agent of epidemic gastroenteritis which prevailed in Japan in 1948. *Jpn med* 1:379-84.
- Yang H, Makeyev EV, Kang Z et al. 2004.** Cloning and sequence analysis of dsRNA segments 5, 6 and 7 of a novel non-group A, B, C adult rotavirus that caused an outbreak of gastroenteritis in China. *Virus Res*, 106 (1):15-26.
- Yolken R, Wilde J. 1994.** Assays for detecting human rotavirus. In: Kapikian A.Z., ed. *Viral infections of the gastrointestinal tract. New York, Marcel Dekker*, pp: 251-278.
- Zanoni G, Navone R, Lunardi C, et al., 2006.** In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS med* 3(9):1637-1653
- Zhang M.-D., Zeng C.Q.-Y., Dong Y., et al. 1998.** Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *J. Virol.* 72:3666-3672.
- Zissis G, Lambert JP, Deicegel D. 1978.** Routine diagnosis of human rotavirus in stools. *J. Clin Pathol* 31:175-178

**ELENCO DEI LAVORI PUBBLICATI SU RIVISTE INTERNAZIONALI SULLA
BASE DEI RISULTATI DI QUESTA RICERCA**

Medici M.C., Abelli L.A., Martella V., Martinelli M., Lorusso E., Buonavoglia C., Dettori G., Chezzi C.

Characterization of inter-genogroup reassortant rotavirus strains detected in hospitalized children in Italy.

Journal of Medical Virology, 2007; Sep;79(9):1406-1412.

DOI: 10.1002/jmv.20878

Medici M.C., Abelli L.A., Martinelli M., Dettori G., Chezzi C.

Molecular characterization of VP4, VP6 and VP7 genes of a rare G8P[14] rotavirus strain detected in an infant with gastroenteritis in Italy.

Virus Research, 2008; Oct;137(1):163-167.

DOI: 10.1016/j.virusres.2008.07.005

Medici M.C., Abelli L.A., Martinelli M., Martella V., Dettori G., Chezzi C.

Molecular characterization of group C rotaviruses detected in children in Italy.

Journal of Clinical Virology, 2009; Jan;44(1): 62-65.

DOI: 10.1016/j.jcv.2008.10.006

GRAZIE A...

Al mio tutore, Prof.ssa Maria Cristina Medici, che con la sua infinita energia mi ha accolto, allevato ed educato scientificamente e ha creduto in me infondendomi tanta fiducia in me stessa.

Al Prof. Carlo Chezzi e al Prof. Giuseppe Dettori, per avermi dato questa e tante altre opportunità.

A Monica, è stata ed è per me maestra, certezza e supporto non solo in laboratorio...

A tutta la Sezione di Malattie Infettive del Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali dell'Università di Bari che mi ha ospitato con grande disponibilità e specialmente al Prof. Vito Martella che mi ha insegnato e seguito nel corso del dottorato, aiutandomi e consigliandomi con infinita gentilezza.

Ai miei compagni/e dottorandi, specializzandi, frequentatori e laureandi che nel corso degli anni hanno condiviso lo stress e condito con allegria e affetto le mie giornate aiutandomi a superare i momenti difficili e non facendomi mai sentire sola.

A Mirko, collega d'avventura, chiacchiere, viaggi in treno e fredde attese interminabili alla pensilina dell'autobus... per la preziosa compagnia, il supporto e l'affetto.

Ai momenti filosofici e "super-stupidi" della pausa pranzo e a chi li ha fatti nascere e li ha vissuti con me.

Alle Amiche che ho incontrato qui, veri e rari tesori che mi accompagneranno lungo la mia strada.

A tutti i tecnici della "Viro" ma specialmente ai "BMTECNICI"... mi avete circondata di un'allegria e di un affetto preziosissimi e indimenticabili!

A chiunque qui mi abbia regalato sorrisi e mi abbia sostenuto.

Ai miei genitori, perché sono loro, ci sono nonostante tutto e mi amano incondizionatamente come solo un genitore può fare ...

Ai miei familiari e ad una in particolare che da lontano, con un filo invisibile e robusto di infinito affetto, riesce sempre ad essermi vicina.

Infine, e per questo, prima di tutti....

A te, Cri, mio mondo e mia stella polare... quando il mare è un olio e il sole splende, tu ci sei... quando la tempesta imperversa, tu ci sei... un semplice "grazie" non è abbastanza.