

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PARMA
Dottorato di ricerca in Microbiologia e Virologia
Ciclo XXIV

**Epidemiologia molecolare di rotavirus: studio della variabilità genetica
e dei meccanismi evolutivi**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Luciano Polonelli

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Cristina Medici

Dottoranda: Dott.ssa Paola Guerra

INDICE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| INTRODUZIONE | 5 |
| <i>Cenni storici</i> | 8 |
| <i>Classificazione</i> | 11 |
| <i>Morfologia del virus</i> | 14 |
| <i>Struttura del genoma</i> | 14 |
| <i>Struttura primaria dei segmenti genomici</i> | 15 |
| <i>Struttura secondaria dei segmenti genomici di rotavirus o trascritti virali</i> | 17 |
| <i>Espressione del genoma di rotavirus e proteine virali</i> | 18 |
| <i>Struttura e funzione delle proteine di rotavirus</i> | 19 |
| Core e capside interno | 19 |
| VP1 | 19 |
| VP2 | 20 |
| VP3 | 20 |
| VP6 | 20 |
| Proteine del capside esterno | 21 |
| VP4 | 21 |
| VP7 | 21 |
| <i>Struttura e funzione delle proteine non strutturali di rotavirus</i> | 24 |
| NSP1 | 24 |
| NSP2 | 24 |
| NSP3 | 24 |
| NSP4 | 25 |
| NSP5 | 25 |
| NSP6 | 26 |
| <i>Ciclo replicativo di rotavirus</i> | 26 |
| <i>Meccanismi di evoluzione genetica di rotavirus</i> | 28 |
| Mutazioni puntiformi | 28 |
| Infezioni miste | 29 |
| Riassortimento genomico | 29 |
| Trasmissione interspecie | 31 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Riassortimento tra ceppi rotavirus animali e umani | 31 |
| <i>Riarrangiamento genomico</i> | 32 |
| <i>Trasmissione e patogenesi</i> | 34 |
| <i>I vaccini</i> | 40 |
| <i>Epidemiologia</i> | 45 |
| <i>Immunità</i> | 48 |
| <i>Dinamica dell'escrezione virale e risposta anticorpale</i> | 51 |
| <i>Diagnosi di laboratorio</i> | 52 |
| | |
| SCOPO DELLA RICERCA | 55 |
| | |
| MATERIALI E METODI | 58 |
| | |
| <i>Campioni e pazienti</i> | 58 |
| <i>Preparazione dei campioni di feci</i> | 58 |
| <i>Microscopia elettronica</i> | 59 |
| <i>Determinazione dell'e-tipo</i> | 59 |
| <i>Determinazione del genotipo (G tipo e P tipo) di rotavirus</i> | 61 |
| <i>Determinazione del sottogruppo (SG) del gene VP6 di rotavirus di gruppo A</i> | 67 |
| <i>Determinazione del genogruppo del gene NSP4 di rotavirus</i> | 67 |
| <i>Analisi filogenetica di ceppi G1P[8]</i> | 68 |
| <i>Analisi filogenetica di ceppi G4P[8]</i> | 68 |
| <i>Analisi filodinamica del gene VP4 di ceppi di specificità P[8]</i> | 69 |
| <i>Purificazione</i> | 69 |
| <i>Quantificazione degli ampliconi purificati da gel</i> | 70 |
| <i>Sequenziamento ed analisi filogenetica</i> | 70 |
| <i>Analisi della struttura secondaria e terziaria di VP4</i> | 71 |
| | |
| RISULTATI | 72 |
| | |
| <i>Studio epidemiologico-molecolare</i> | 72 |
| <i>Analisi filogenetica di ceppi di rotavirus con specificità G1P[8]</i> | 80 |
| <i>Analisi filogenetica di ceppi G4P[8] circolanti nell'area di Parma</i> | 83 |
| <i>Analisi filodinamica del gene VP4 di ceppi di specificità P[8]</i> | 88 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>Caratterizzazione molecolare di un ceppo di rotavirus di gruppo A rivelato in una bambina con gastroenterite da rotavirus associata a meningismo</i> | <i>91</i> |
| DISCUSSIONE | 97 |
| <i>Filogenesi di ceppi di rotavirus con specificità G1P[8]</i> | <i>100</i> |
| <i>Analisi di sequenza e filogenetica di ceppi G4P[8]</i> | <i>101</i> |
| <i>Analisi filodinamica di ceppi di specificità P[8]</i> | <i>102</i> |
| <i>Caratterizzazione molecolare di un ceppo di rotavirus di gruppo A rivelato in una bambina con gastroenterite da rotavirus associata a meningismo</i> | <i>103</i> |
| CONCLUSIONI | 104 |
| BIBLIOGRAFIA | 105 |
| PRODUZIONE SCIENTIFICA | 126 |

INTRODUZIONE

Cenni storici

Le scoperte batteriologiche e parassitologiche compiute nel secolo scorso hanno identificato l'eziologia solo di una minima parte delle malattie diarroiche, lasciandone la maggior parte non associata ad alcun agente causale [Ho MS et al., 1989]. Negli anni 1940 e 1950 era stato assunto, per esclusione, che i virus fossero i 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 [Fukumi H et al., 1957; Gordon I et al., 1949; Gordon I et al., 1956; Jordan WS et al., 1953; Kojima S et al., 1948; Reinmann HA et al., 1945; Yamamoto A et al., 1948]. Questi studi dimostrarono che estratti fecali derivati da episodi epidemici di gastroenterite privati della componente batterica erano in grado di riprodurre la malattia, a supporto dell'ipotesi sull'origine virale dell'agente eziologico coinvolto. Molti di questi campioni furono sottoposti senza successo ad indagini accurate di laboratorio nel tentativo di individuare l'agente eziologico. Negli anni 1970 fu intrapresa una seconda generazione di studi in volontari e campioni raccolti durante un episodio epidemico di gastroenterite verificatosi a Norwalk, Ohio (USA), si rivelarono fondamentali [Clarke SH et al., 1972; Dolin R et al., 1971; Dolin R et al., 1972; Morens DM et al., 1979; Wyatt RG et al., 1974]. In particolare nel 1972 Kapikian e coll. utilizzando la microscopia elettronica nel corso delle indagini condotte per lo studio dell'episodio epidemico di vomito e diarrea verificatosi in una scuola elementare a Norwalk durante il 1968, dimostrarono che il siero di pazienti convalescenti era in grado di produrre aggregati di particelle, morfologicamente poco definite di 27 nm di diametro. Un altro contributo determinante nello studio dell'eziologia virale delle enteriti è rappresentato dalle indagini condotte in Australia da Routh F. Bishop che osservò mediante microscopia elettronica la presenza di particelle virali simili a *Orbovirus* o *reovirus* nelle cellule epiteliali di una biopsia duodenale, appartenente ad un neonato affetto da diarrea acuta non-batterica. Nello stesso anno in Inghilterra, Canada, Australia e Stati Uniti, particelle morfologicamente indistinguibili dai reovirus di vitello sono state ritrovate nelle feci di bambini affetti da gastroenterite [Flewett TH et al., 1973; Bishop RF et al., 1974; Kapikian AZ et al., 1974; Middleton PJ et al., 1974]. Dei due nomi,

“duovirus”, proposto da Davidson nel 1975 [Davidson GP et al., 1975] con riferimento al doppio strato capsidico del virione, e “rotavirus”, proposto da Flewett nel 1974 [Flewett TH et al., 1974] con riferimento invece alla disposizione a ruota (“rota” in latino) dei capsomeri all’interno del capside 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 (RV) umani e di vitello avevano antigeni comuni non correlabili sierologicamente a quelli dei reovirus. Per questo motivo suggerì che i RV fossero inclusi in un nuovo genere nell’ambito della famiglia *Reoviridae* [Flewett TH et al., 1974].

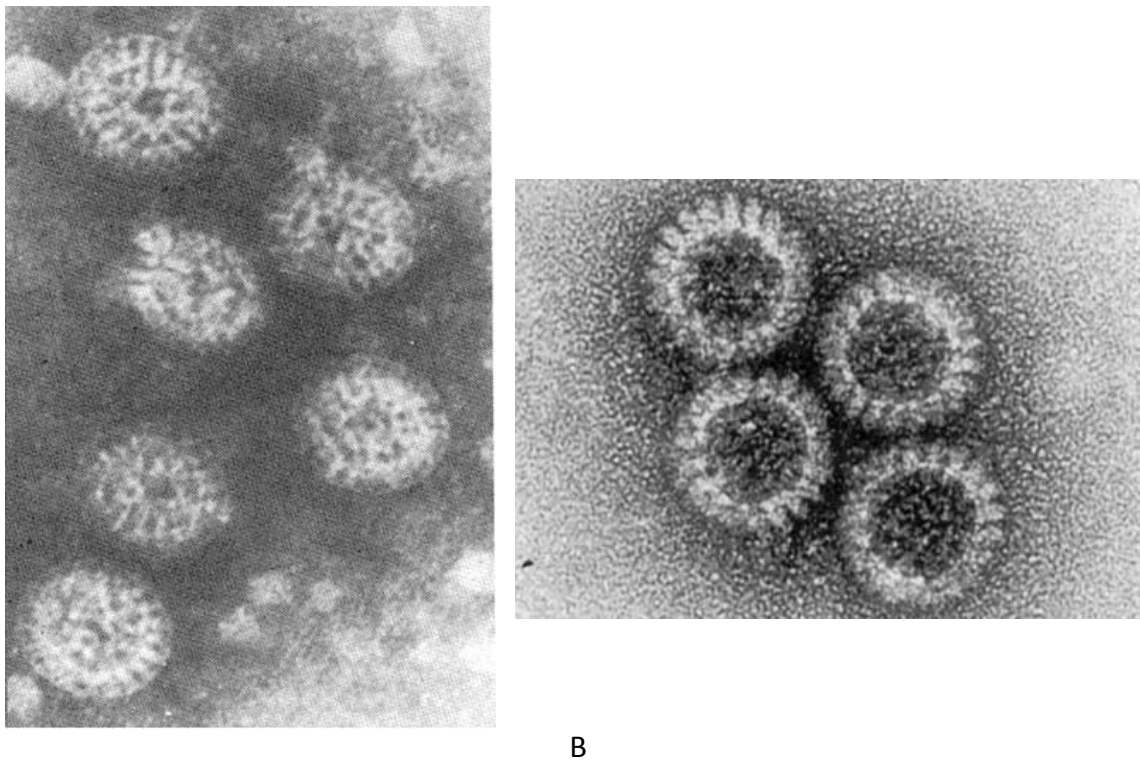


Figura 1. Osservazione elettromicroscopica dopo colorazione negativa di particelle reovirus-simili (A), e particelle che mostrano il doppio strato capsidico parzialmente invase dal colorante negativo (B). Ingrandimento 296.000X ridotto di un terzo (A) e 296.000X (B) [da Flewett TH, et al. 1974, modificata].

Negli anni successivi gli studi condotti sull’infezione causata da questo agente virale hanno portato a riconoscere RV come la causa più frequente di gastroenterite grave nei neonati e bambini al di sotto dei 5 anni [Parashar U et al., 2006]. Attualmente è noto che entro questa fascia d’età praticamente tutti i soggetti, con un’incidenza massima tra i 6 e i 24 mesi, vanno incontro a episodi d’infezione con questo agente patogeno, che per

qualche giorno provoca diarrea, vomito e/o febbre e nei quadri più severi determinare il ricovero specialmente a causa della conseguente disidratazione [Matthijensses J et al., 2008]. Nei paesi in via di sviluppo invece dove la mortalità è elevata, si stima che RV sia responsabile del 15-21% dei decessi nei bambini al di sotto dei 5 anni. [Kosek M et al., 2003; Murray C et al., 2001]. La particella capace di infettare la cellula ospite inizialmente si riteneva fosse costituita da due strati ma studi strutturali hanno dimostrato che è trilaminare (Figura 2) [Estes MK, 2001]. Il core che sembra essere esagonale, in alcune colorazioni negative, ha un diametro di circa 37-38 nm. Nelle particelle di RV il core centrale è ricoperto da un rivestimento proteico pluristratificato. Le particelle invece prive dello strato capsidico esterno appaiono a singolo involucro o rugose, morfologicamente simili agli orbivirus, approssimativamente 10 nm più piccole di quelle intatte.

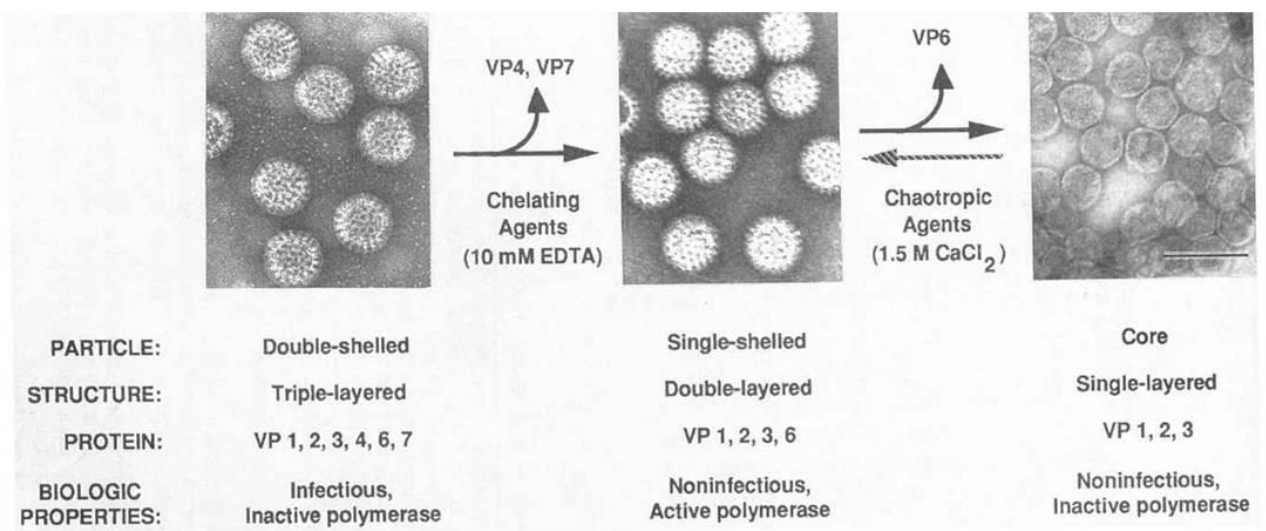


Figura 2. Proprietà strutturali e biologiche delle particelle di rotavirus. Le micrografie mostrano le tipiche strutture delle particelle trilaminari, bilaminari e core osservate dopo colorazione con 1% di ammonio molibdato. Le particelle a doppio strato e le particelle core possono essere prodotte per degradazione sequenziale di particelle infettanti a triplice strato. Bar= 100 nM [da Estes MK, 2001, modificato].

All'interno del core è contenuto il genoma virale costituito da 11 segmenti di RNA bicatenario.

La natura segmentata del genoma di RV è alla base del fenomeno del riassortimento genetico tra virus 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, 4-3-2-2 per quelli di gruppo C) e permette la distinzione in elettroferotipi (e-tipi) lunghi e corti [Kapikian AZ et al., 2001].

Classificazione

I RV sono classificati nel genere omonimo *Rotavirus* appartenente alla famiglia *Reoviridae* unitamente ai generi *Orthoreovirus*, *Acquaareovirus*, *Cypovirus*, *Fijivirus*, *Oryzavirus*, *Coltivirus*, *Phyteoreovirus* [Mertens PPC et al., 2005] ai quali appartengono agenti virali che infettano mammiferi, uccelli, rettili, pesci molluschi, artropodi e piante. Sulla base della reattività dell'antigene espresso sulla proteina del capsido intero VP6 da cui dipende la suddivisione in 5 specie sierologiche (A-E) e due tentativi di specie (F-G) in accordo con il Comitato Internazionale della Tassonomia dei Virus (ICTV) [Ball LA, 2005; Raming RF et al., 2005].

Queste "RV specie" sono comunemente riferite come "RV gruppi". RV appartenenti alle specie/gruppi A, B, C (RVA, RVB e RVC, rispettivamente) sono conosciuti infettare soprattutto l'uomo e alcuni animali, mentre D, E, F, G (RVD, RVE, RVF e RVG rispettivamente) sono noti infettare gli animali, specialmente gli uccelli [Ball LA, 2005; Matthijenssens J et al., 2010]. In particolare, gli RV A sono classificati sulla base delle proprietà antigeniche delle proteine virali (VP) VP6, VP7 e VP4 (che definiscono il sottogruppo, SG e i sierotipi G e P, rispettivamente), sulla base del profilo di migrazione dell'RNA virale (elettroferotipo lungo, corto, supercorto o atipico), quando sottoposto a migrazione elettroforetica in gel di poliacrilammide, mediante il profilo di ibridazione (genogruppo) e attraverso analisi di sequenza nucleotidica (con la quale viene definito il genotipo). La distinzione in sierotipi G (su base anticorpale) coincide con quella in genotipi (su base genetica), mentre per indicare il sierotipo e genotipo P è stato utilizzato un sistema di classificazione binario [Estes MK and Kapikian AZ, 2007]. Il sierotipo P, quando noto, è indicato da un numero arabo (seguito a volte da una lettera maiuscola), mentre il genotipo P è indicato di seguito da un numero arabo compreso tra parentesi quadra. Nella maggior parte gli RVA appartengono al genogruppo Wa, sono G1, G3, G4 o G9 P[8], e-tipo lungo, SG II e NSP4 di genogruppo B, mentre in minor parte al genogruppo DS-1, sono quasi esclusivamente virus G2P[4], e-tipo corto, SG-I e NSP4 di genogruppo A. I rari virus AU-1, infine, sono G3P[9], e-tipo lungo, SGI e

NSP4 di genogruppo C [Estes MK, 2001].

Nell'aprile 2008 è stato sviluppato un sistema di classificazione per gli RVA, sulla base della sequenza nucleotidica, di tutto il genoma [Matthijenssens J et al, 2011]. Questo sistema assegna uno specifico genotipo a ciascuno degli 11 segmenti, secondo appropriati valori limite di percentuale di identità nucleotidica, e quindi un genotipo complessivo rappresentato dalla codifica G_x-P[x], I_x, R_x, C_x, M_x, A_x, N_x, T_x, E_x, H_x, dove "x" rappresenta il numero, dei geni VP7, VP4, VP6, VP1,VP3, NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 rispettivamente. Tale sistema di classificazione è stato elaborato da un gruppo di ricercatori, Rotavirus Classification Working Group (RCWG), comprendente specialisti in virologia molecolare, malattie infettive, epidemiologia e salute pubblica, fine con lo scopo di fornire supporto per l'identificazione appropriata di eventuali nuovi genotipi e per ridurre al minimo i possibili errori di classificazione (Tabella I).

Tabella I. Sistema di classificazione degli 11 segmenti genici di rotavirus proposto da Matthijnsens e coll. (2008 modificata) e le relative percentuali limite di identità nucleotidica che definiscono i genotipi.

| Gene | Valori limite di identità nucleotidica (%) | Genotipo | Derivazione della lettera che definisce il genotipo |
|-------------|---------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------|
| VP7 | 80 | G | <u>G</u> licosilata |
| VP4 | 80 | P | Sensibile alle <u>P</u> roteasi |
| VP6 | 85 | I | Capside <u>I</u> nterno |
| VP1 | 83 | R | RNA polimerasi <u>R</u> NA-dipendente |
| VP2 | 84 | C | Proteina <u>C</u> ore |
| VP3 | 81 | M | <u>M</u> etiltransferasi |
| NSP1 | 79 | A | <u>A</u> ntagonista dell'interferone |
| NSP2 | 85 | N | <u>N</u> TPasi |
| NSP3 | 85 | T | Avviatore della <u>T</u> raduzione |
| NSP4 | 85 | E | <u>E</u> nterotossina |
| NSP5 | 91 | H | “ <u>P</u> Hosphotrotein” |

In relazione all'omologia complessiva dell'RNA genomico i RV umani sono distinguibili in almeno tre genogruppi AU-1 (molto raro), DS-1 e Wa [Nagakomi T et al., 1989; Estes MK, 2001; Gentsh JR et al., 2005]. Nella maggior parte gli RVA appartengono al genogruppo Wa e sono G1, G3, G4 o G9 P[8], e-tipo lungo, SG-II e NSP4 di genogruppo B. Quelli di genogruppo DS-1 comprendono quasi esclusivamente virus G2P[4], con e-tipo corto SGI e NSP4 di genogruppo A. Sulla base del confronto della completa sequenza genomica due principali costellazioni di geni, esclusi quelli G e P, sono state dimostrate nei ceppi che circolano nella popolazione mondiale: I1-R1-C1-M1- A1-N1-T1-E1-H1 (Wa-like) e I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 [Matthijnsens J et al., 2008; Heiman EM et al., 2008; McDonald SM et al., 2009].

Si ritiene che i ceppi umani Wa-like abbiano un ceppo porcino ancestrale comune mentre i ceppi umani DS-1 like abbiano segmenti genomici in comune con ceppi di RV di gruppo A bovini [Matthijnsens J et al., 2008]. Una terza costellazione genetica umana chiamata AU-1 like, I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3, sembra avere origine dal gatto o dal cane [Nagakomi O et al., 1990].

Morfologia del virus

La morfologia delle particelle di RV è particolare. L'aspetto delle particelle virali intatte, osservate alla microscopia elettronica (ME) dopo colorazione negativa, ricorda quello di una ruota con corti raggi e un contorno ben definito [Flewett TH et al., 1974]. La particella matura ha una struttura icosaedrica con un involucro trilaminare (TLP) che contiene il genoma virale, che è costituito da 11 segmenti di RNA a doppio filamento che codificano per 6 proteine strutturali (VP1-VP4 e VP6, VP7) e 6 non strutturali (NSP1-NSP6).

Colorati negativamente, i virioni presentano alla M.E. [Esparza J et al., 1977] un centro elettron-denso di 37-38 nm di diametro con profilo esagonale circondato da uno strato esterno elettrone-lucente [Palmer EL, 1997] (Figura 3).

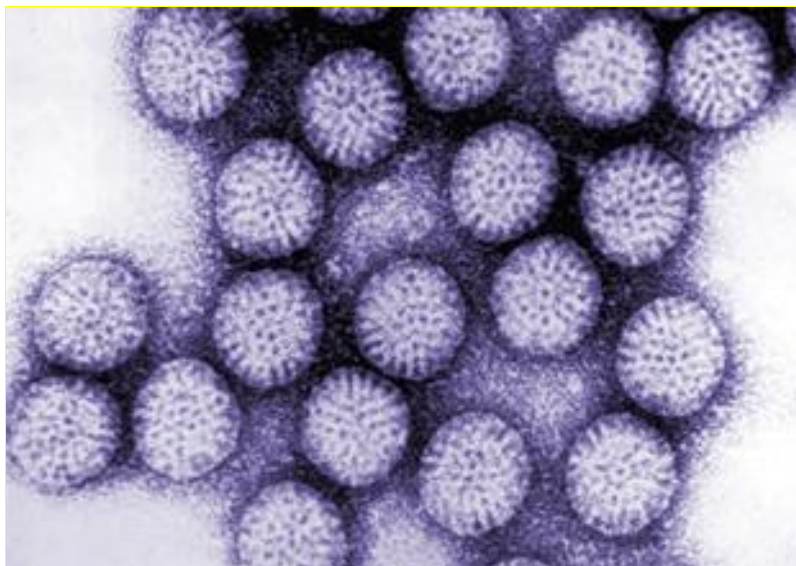


Figura 3. Osservazione elettromicroscopica di particelle di rotavirus [Loughlin J et al., 2012 immagine del dott. Erksine Palmer, CDC].

Le particelle di RV mature sono formate da un nucleo centrale, il core, ricoperto da un rivestimento proteico pluristratificato. Le particelle invece prive dello strato capsidico esterno appaiono a singolo involucro o rugose, morfologicamente simili agli orbivirus, approssimativamente 10 nm più piccole di quelle intatte. Lo strato capsidico esterno è necessario per l'infettività. Esso si stacca dallo strato capsidico interno quando la concentrazione di calcio nel mezzo circostante diventa inferiore a 1 Nm. Le feci infettate generalmente hanno entrambi i tipi di particelle. I primi studi sulla struttura

delle particelle di RV avevano dimostrato che esse avevano una simmetria icosaedrica. Lo studio della struttura tridimensionale ha definito che il capside è costituito da subunità capsomeriche disposte in una struttura icosaedrica in numero di 132 capsomeri, comprendenti 120 esameri e 12 pentameri, distribuite secondo Roseto e coll. [Roseto A et al., 1979] in simmetria obliqua con un numero di triangolazione $T=13$. 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. Questa struttura è stata successivamente confermata per il capside più interno da Ludert e coll. [Ludert JE et al., 1986] utilizzando la stessa tecnica e particelle distrutte chimicamente.

Una caratteristica delle particelle di RV è la presenza di 132 canali che partendo dal capside esterno si estendono fino al nucleocapside: si tratta di 120 canali che passano attraverso il centro dei capsomeri riuniti in esameri e 12 canali che passano attraverso il centro dei capsomeri riuniti in pentameri [Estes MK and Cohen J, 1989].

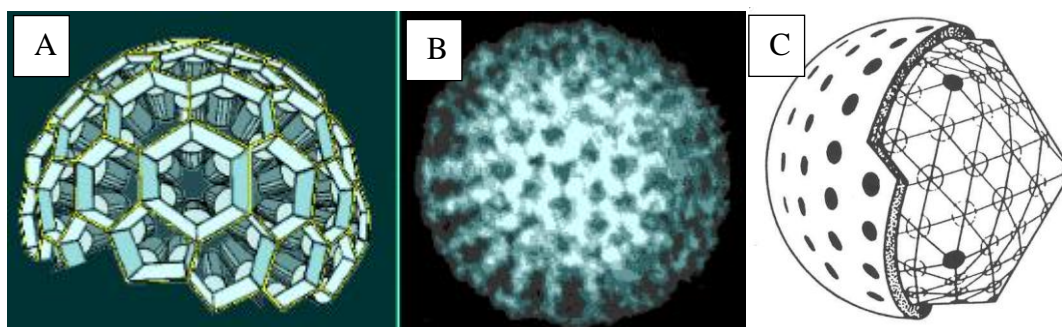


Figura 4. (A) Modello di particella di rotavirus costituita da 132 capsomeri (120 esameri e 12 pentameri) distribuiti secondo una struttura icosaedrica con numero di triangolazione $T=13$ (levo) a confronto con (B) una particella virale osservata alla microscopia elettronica. (C) Rappresentazione schematica del capside di rotavirus.

In particolare, sono distinguibili tre tipi di canali sulla base della loro posizione e dimensione. I canali di tipo I sono quelli che si estendono lungo l'asse pentamerico dell'icosaedro, i canali di tipo II sono quelli che circondano gli esameri posizionati sull'asse dell'icosaedro e i canali di tipo III sono quelli sull'asse delle coordinate intorno ai triplici assi dell'icosaedro. Essi sono profondi 14 nm e larghi circa 5,5 nm sulla superficie del virus. Nella particella questi canali si contraggono e poi si allargano e la loro larghezza è localizzata alla superficie del capside interno. Le stesse caratteristiche sono state osservate anche per gli altri due tipi di canali, eccetto il tipo I che ha

un'apertura più stretta, circa 4 nm, sulla superficie esterna del virus [Estes MK e Cohen J, 1989].

Il ruolo biologico di questi canali non è del tutto chiaro, ma sembra che siano coinvolti nell'importare all'interno della particella i metaboliti richiesti per la trascrizione dell'RNA e nell'esportazione degli RNA trascritti nel citoplasma per il successivo processo di replicazione.

Infine dalla superficie del capsido esterno si estendono sessanta punte di 4,5-6 nm di lunghezza, che portano sull'estremità una protuberanza [Estes MK e Cohen J, 1989]. Queste punte proteiche sono situate al margine dei canali che circondano gli assi quinari dell'icosaedro e sembrano essere composte da dimeri di emagglutinina (VP4) [Prasad BVV et al, 1990].

Struttura del genoma

Il genoma virale di RV è costituito da 11 segmenti di RNA a doppio filamento ed è contenuto all'interno del core. I segmenti hanno dimensioni variabili da 667 (segmento 11) a 3302 (segmento 1) paia basi. Il genoma completo contiene circa 18.522 paia basi [Holmes IH et al., 1983].

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. L'impacchettamento di questi segmenti di RNA nel capsido richiede interazioni intime RNA-proteina. Le proteine coinvolte in questo processo rimangono tutt'ora sconosciute. Possibili candidate sono le proteine contenute nel core (VP1, VP2 e VP3); tuttavia sembra che giochino un ruolo in tale processo anche le proteine non strutturali.

Lo strato più interno del capsido, formato dall'autoassemblaggio della proteina VP2, include proteine minori (VP1 e VP3) e racchiude il genoma.

Lo strato intermedio costituito da VP6 organizzato in 260 trimeri. Lo strato più esterno, contiene due proteine, VP4 e VP7, le quali sono coinvolte nell'interazione con i putativi recettori presenti sulla membrana plasmatica della cellula ospite e nella penetrazione della cellula. Questo strato consiste anch'esso di 260 trimeri della glicoproteina VP7, che è il maggior costituente dello strato, e delle 60 punte che protudono dallo strato di VP7 [Shaw AL et al., 1996, Dormitzer PR et al., 2004]. Ciascuna punta è composta, come è stato detto prima, da un dimero di VP4, e probabilmente una terza molecola flessibile di VP4 è inserita alla sua base.[Li Z et al., 2009, Dormitzer PR et al., 2004, Yoder JD et al., 2006].

Struttura primaria dei segmenti genomici

Il sequenziamento del genoma di RV ha dimostrato caratteristiche peculiari per ciascun segmento e sequenze comuni a tutti i segmenti genomici [Estes MK and Cohen J, 1989].

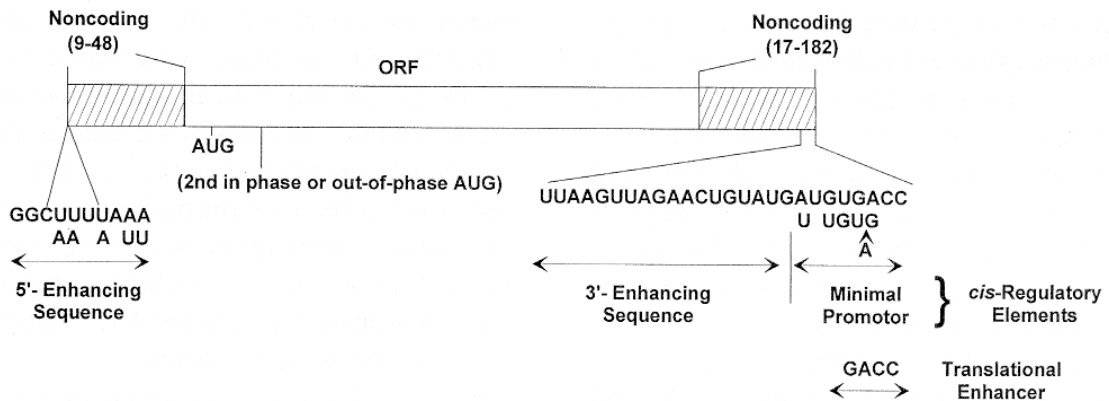


Figura 5. Caratteristiche principali della struttura di un segmento genomico di rotavirus. Il segmento è privo del segnale di poliadenilazione, è ricco in A+U e possiede sequenze consensoconservate alle estremità 5' e 3' [da Estes MK, 2001, modificata].

Ogni segmento di RNA a polarità positiva parte da una 5'-guanidina seguita da un gruppo di sequenze non conservate che appartengono ad una sequenza 5'-non codificante, segue una “Open Reading Frame” (ORF) che codifica per una proteina e che termina con un codone di stop e quindi un altro gruppo di sequenze non codificanti, che a loro volta contengono un “subset” di sequenze che terminano con due citidine all'estremità 3' dopo il codone di stop (Figura 5).

La sequenza consenso 5'-GGC(A/U)(A/U)A(A/U)(A/U) è stata trovata, oltre che al termine delle altre sequenze note, solo una volta (segmento 4) in una posizione diversa. La sequenza complementare al 3' terminale (UGUGACC-3') è stata trovata anche nel segmento 5. Le lunghezze delle sequenze 3' e 5' non codificanti variano nei diversi segmenti/geni. Tuttavia queste lunghezze sono conservate tra i ceppi per un determinato gene con l'eccezione del 3' terminale del segmento 7 e del segmento 10. Non ci sono codoni di stop preferenziali; nessun segnale di poliadenilazione è stato trovato all'estremità 3' dei geni. La maggior parte dei segmenti sequenziati con l'eccezione del gene 11 possiedono solo una lunga ORF dopo il codone di inizio. Il primo codone di

inizio è un codone forte (in tutti i geni tranne 7, 9 e 11) forte basato sulle norme di Kozak [Kozak M, 1986]. Tutti i geni sono monocistronici eccezion fatta per il gene 11. Tutte le sequenze di RV sono ricche in A+T (tra il 58% e 67%). I segmenti a doppio filamento di RNA sono appaiati da una estremità all'altra e il filamento positivo contiene una sequenza 5' cap m⁷ GgpppG^(m) Gpy [Imai M et al., 1983; McCrae M et al., 1983]. Le stesse caratteristiche delle parti terminali dell'RNA (strutture cap e sequenze terminali 5' e 3') sono state trovate nelle strutture primarie dei segmenti genomici di altri virus nella famiglia *Reoviridae* [Furuichi Y et al., 1975; Kuchino M et al., 1982; Mertens P et al., 1985] e nelle famiglie di virus a genoma segmentato appartenenti ad altre famiglie (*Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae* e *Bunyaviridae*). In queste sequenze terminali sono contenute segnali importanti per la trascrizione, replicazione e l'assemblaggio dei segmenti del genoma virale.

Uno degli aspetti più interessanti di RV, e in genere di tutti i virus che hanno un genoma a doppio filamento segmentato, è rappresentato dal modo con cui questi virus replicano coordinatamente e impacchettano gli 11 mRNA virali. Sembra che tutti gli 11 segmenti posseggano comuni segnali di “cis-acting” poiché essi replicano grazie ad una unica polimerasi e sembra che questi segnali siano determinati da strutture secondarie piuttosto che da sequenze primarie.

In aggiunta, ogni mRNA deve contenere un segnale unico proprio del relativo segmento per permettere che gli undici segmenti di RNA siano distinti durante i processi di “packaging”. Generalmente le sequenze terminali conservate contengono segnali “cis-acting” utili per la trascrizione, la traduzione del RNA, replicazione assemblaggio o incapsidamento del genoma virale.

Nella maggior parte dei casi il genoma dei RV di gruppo A è composto da quattro segmenti ad alto peso molecolare (1-4), seguito da un gruppo di 2 e uno di tre segmenti a peso molecolare intermedio (5-9) e infine da due segmenti a più basso peso molecolare (10-11). Nell'ambito di questo profilo elettroforetico degli RNA genomici ciascuno segmento può presentare variazioni minori della propria mobilità elettroforetica. È pertanto comprensibile il fatto che la migrazione elettroforetica degli stessi geni in diversi ceppi virali mostri spesso eterogeneità. Al contrario le sequenze geniche dei diversi ceppi virali sembrano contenere lo stesso numero di nucleotidi. Questo suggerisce che l'eterogeneità della mobilità elettroforetica osservata nei segmenti di RNA affini dipende dalla differenza di sequenza e di struttura secondaria dell'RNA

Le variazioni più significative riguardano i segmenti genomici 10 e 11 che possono

migrare più velocemente, creando un profilo elettroforetico lungo, o più lentamente, creando un profilo elettroforetico corto [Kalica AR et al., 1978; Espeio RT et al, 1977]. Meno frequentemente la migrazione più lenta di questi segmenti può determinare un profilo elettroforetico “supercorto”.

Data la grande variabilità elettroforetica dei segmenti genomici di RV è raro trovare ceppi diversi con uguale elettroferotipo. Questa diversa mobilità elettroforetica riflette apparentemente differenze nella sequenza genica delle basi. Tuttavia è stato dimostrato che gli elettroferotipi possono essere validi indicatori della diffusione virale nell’ambito dei singoli episodi epidemici e in generale possono fornire importanti e utili informazioni di carattere epidemiologico [Ruggeri FM et al., 1989; Chanock SJ et al., 1983]. Sembra ormai certo che i geni di RV codificano almeno per 11 proteine delle quali 6 partecipano alla costituzione della struttura del virus.

Struttura secondaria dei segmenti genomici di rotavirus o trascritti virali.

Per i segmenti 4, 10 e 11 del genoma di RV sono state descritte potenziali regioni intramolecolari appaiate nelle regioni terminali [Estes MK and Cohen J, 1989]. E’ stato ipotizzato che queste strutture possano influenzare l’espressione genica durante la replicazione o la traduzione dell’RNA e causano difficoltà nell’ottenimento del cDNA completo complementare. L’analisi delle sequenze terminali di ciascun gene mostra che la fine di diversi segmenti contiene regioni con similarità statisticamente significative. Queste regioni potrebbero rappresentare eventi di duplicazioni geniche e trascrizioni aberranti di entrambi i filamenti del genoma. Tuttavia la distribuzione di questi “pattern” non porta ad un processo di associazione selettiva che potrebbe spiegare il riassortimento genico, un ritrovamento anche descritto per i reovirus. Pertanto è stato ipotizzato che il riassorbimento degli 11 segmenti probabilmente coinvolge interazioni RNA-proteine.

Espressione del genoma di rotavirus e proteine virali

I geni di RV codificano per proteine strutturali nelle particelle virali, e per proteine non strutturali presenti nelle cellule infettate ma non nelle particelle mature [Estes MK and Cohen J, 1989]. Ad eccezione dell'undicesimo segmento che codifica per due proteine (NSP5 e NSP6) il resto dei segmenti è monocistonico [Estes MK, 2007].

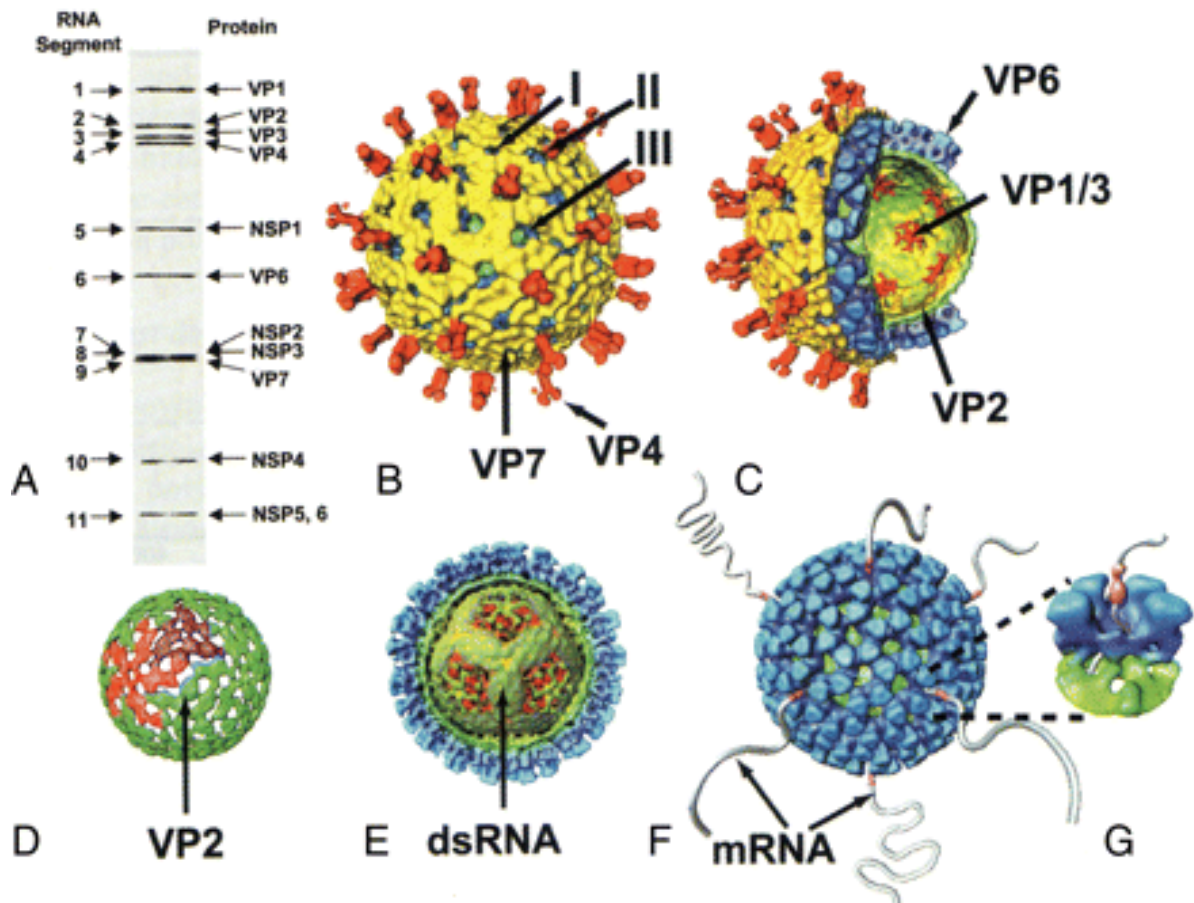


Figura 6. Organizzazione strutturale di rotavirus: A) sulla sinistra gel di poliacrilammide che mostra gli 11 segmenti di RNA con le proteine assegnate. B) rappresentazione della superficie di rotavirus: sono indicati i canali I-III e in rosso le punte VP4 e in giallo VP7. C) Sezione di rotavirus mostra lo strato intermedio (VP6, in blu), il core (VP2, in verde) e a forma di fiore il complesso VP1/VP3 all'interno di VP2 in opposizione ai canali di tipo I (in rosso). D) Organizzazione strutturale di VP2 (alcuni dei 60 trimeri sono indicati in rosso e porpora). E) RNA genomico nella struttura di VP6 e VP2 è parzialmente tagliato per mostrare RNA a singolo filamento che al lato esterno mostra una struttura dodecaedrica. F) struttura di trascrizione attiva DLP con nascente mRNA a singolo filamento (in grigio) in uscita dai canali di tipo I. G) spaccato del percorso di uscita in uno dei canali. La densità a forma di birillo in uscita di DLP attivi (rosa) si è visto trascrivere attivamente i DLP. Pannelli (B-G) sono delineati da ricostruzione di immagini al crio-microscopio [da Desselberger U et al., 2009, modificata].

Struttura e funzione delle proteine di rotavirus

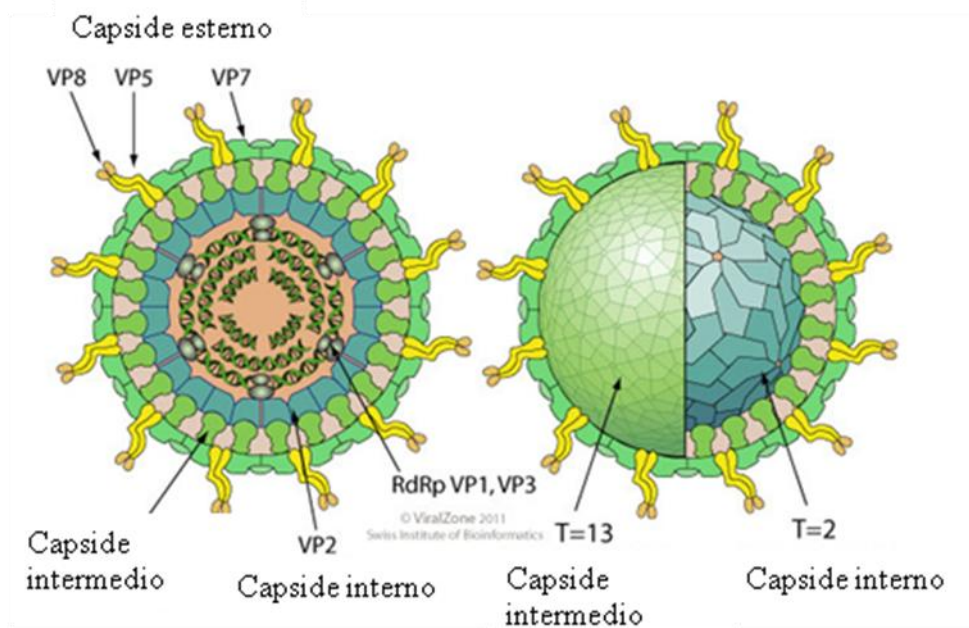


Figura 7. Organizzazione delle proteine virali nel capside a triplice strato di rotavirus [Viralzone.expasy.org].

Core e capside interno

Le proteine virali VP1, VP2 e VP3 hanno affinità per RNA a singolo filamento e giocano un ruolo nella trascrizione e replicazione dell'RNA.

VP1

La VP1 è codificata dal segmento 1 del genoma ed è una delle tre proteine (VP1, VP2, VP3) coinvolte nel “make-up” del core delle particelle di RV [Estes MK and Cohen J., 1989].

Un piccolo numero di VP1 sono presenti nel virione, suggerendo che questa proteina non ha importanza enzimatica, ma piuttosto è parte del complesso enzimatico. VP1 è stata identificata come una proteasi virale con funzione di replicasi e trascrittasi. Insieme alla VP3 una proteina con attività metil – guanilil transferasi, la VP1 provvede al macchinario enzimatico richiesto per fornire di cap-1'mRNA [Chen D et al., 1999; Liu M et al., 1992].

VP2

La VP2 è codificata dal segmento 2 ed è una proteina strutturale che si trova nel core. Questa è l'unica proteina strutturale che possiede capacità di legare acidi nucleici in modo non specifico. Costituisce lo strato più interno e interagisce con la VP6 che è presente sulla superficie esterna del capsido interno.

VP3

La VP3, codificata dal segmento genomico 3, è una proteina strutturale minore. Delle tre proteine, VP1, VP2 e VP3 solo VP2 è in grado di autoassemblarsi in una proteina icosaedrica simile alla nativa quando espressa in cellule di insetto. Questa osservazione indica che VP2 possiede determinanti richiesti per dirigere l'assemblaggio di altre proteine del virus [Chen D et al., 1999; Liu M, 1992].

VP6

La VP6 è codificata dal segmento 6 del genoma ed è la maggior proteina strutturale localizzata sulla superficie esterna della particella a singolo strato. VP6 potrebbe essere importante come componente strutturale capace di mantenere le proprietà conformazionali e di organizzazione del core virale e del complesso trascrizionale composto da una o più proteine del core. VP6 è miristilata e questa caratteristica potrebbe essere determinante per la formazione delle particelle virali o per il "targeting" delle proteine a singolo strato al reticolo endoplasmatico (RE) per l'inglobazione [Clark B and Desselberger U, 1988]. Essa è altamente immunogena e antigenica ed è bersaglio di saggi diagnostici per il rilevamento del virus. Sebbene altre proteine strutturali possano mostrare reattività di gruppo in certe condizioni, VP6 determina la maggiore reattività gruppo-specifica. In particolare, un dominio del prodotto VP6 del sesto gene VP6 specifica la reattività del sottogruppo mentre un dominio separato di questa proteina contiene il maggior determinante della reattività antigenica di RV di gruppo A. La sequenza aminoacidica della proteina VP6 è stata determinata nei diversi gruppi di RV A, B, e C. I siti immunodominanti di VP6 che contengono epitopi gruppo-specifici per i RV di gruppo A sono stati localizzati in quattro regioni di VP6 (residui aminoacidici 32-64, 155-167, 208-294 e 380-397). VP6 presenta diversi antigeni che permettono di differenziare gli RV di gruppo A nei diversi sottogruppi specifici (SGI-SGII). Inoltre la proteina VP6 si è rivelata anche un bersaglio sia dei linfociti T citotossici (CTL) sierotipo-specifico sia con reattività G crociata. L'epitopo sierotipo CTL sulla VP6 è stato identificato dal residuo aminoacidico 376 a quello 384. Si è

potuto pure dimostrare che la proteina VP6 porta un epitopo che stimola la proliferazione delle cellule T helper con fenotipo L374⁺.

Fino a pochi anni fa si riteneva che i RV animali e umani presentassero determinanti antigenici in comune e che questi fossero presenti soprattutto nella proteina VP6. Per questo motivo i RV che condividono questo stesso gruppo di antigeni sono stati classificati nel gruppo A, mentre i RV privi di questo antigene sono stati classificati come RV di gruppo non A. Questi ultimi non hanno neppure gli antigeni di sottogruppo. I virus non di gruppo A sono stati diversamente denominati come pararotavirus, RV-simili, novelli rotavirus, RV distinti e RV della diarrea dell'adulto.

Proteine del capsido esterno

VP4

VP4 è una proteina prodotta dal segmento 4, non è glicosilata, ma risulta avere attività di emoagglutinina in molti ceppi virali [Kalica AR et al, 1981; Mason BB, 1985]. La proteina VP4 è presente sulla superficie esterna delle particelle virale come una sorta di 60 brevi sporgenze approssimativamente di 10-12 nm che all'estremità distale presentano una struttura simile ad una protuberanza che contiene il prodotto del taglio proteolitico, VP5 [Estes MK, 2001]. infatti, in presenza di tripsina, VP4 è tagliata in VP5*(60 kDa, aminoacidi 248-776) e VP8* (28 kDa, aminoacidi 1-247) e il suo taglio aumenta l'infezione virale [Espejo RT et al., 1982 Estes MK et al., 1981] favorendo la penetrazione (ma non il legame) del virus alla cellula. Contrariamente all'opinione diffusa secondo cui solo la proteina VP7 gioca un ruolo importante nella neutralizzazione anticorpale è stato anche dimostrato che anticorpi monoclonali diretti contro VP4 di RV di scimmia erano in grado di neutralizzare l'infettività virale [Estes MK, 2001].

In particolare studi su ceppi riassortanti prodotti durante una doppia infezione con un ceppo che aveva attività emoagglutinante e uno che ne era privo hanno permesso di attribuire tale proprietà alla proteina VP4. Questa proprietà è stata mappata nella regione tra i residui 93 e 208 di VP8*, la subunità in cui viene clivata la proteina del taglio proteolitico della tripsina. Il frammento per il taglio della tripsina e il dominio di legame per l'acido sialico si trovano nella stessa regione. Per quanto riguarda in particolare VP8* e VP5*, VP8* possiede il maggior sito antigenico per la specificità VP4 del sierotipo, mentre VP5* contiene siti responsabili della reattività crociata tra le

diverse VP4. La subunità VP8* è stata ulteriormente studiata attraverso l'espressione di tre peptidi e la loro analisi mediante saggi di immunoblot. Questi studi hanno dimostrato che il peptide B (aminoacidi 84-80) contiene la specificità VP4 del sierotipo del sottotipo, 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.

Confronti tra le sequenze dei segmenti 4 in diversi sierotipi per rivelare se le regioni diverse mostravano omologie ugualmente disposte su VP4.

Le principali regioni variabili sembrano essere tra l'aa 71 e il 204 nella subunità VP8*, che contiene i quattro (da 8-1 a 8-4) epitopi antigenici esposti sulla superficie [Larralde G et al., 1991; Larralde G et al., 1992; Collins PJ et al., 2010 Dormitzer PR et al., 2002]. È possibile ipotizzare che VP8* sia sulla superficie esterna del virus dato che contiene i siti di maggiore variabilità e di legame con i ceppi di anticorpi monoclonali (MAbs) ceppo specifici e dato che è stato supposto che VP8* sia globulare [Estes MK and Cohen J, 1989].

VP7

VP7 è la seconda più abbondante proteine del capsido, con un peso molecolare di 38 kDa. Essa, è localizzata sul capsido esterno, contribuisce alla formazione della superficie liscia esterna e costituisce il 30% delle proteine virali. Contiene uno dei 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 RV di scimmia SA11 che manca di un sito per la glicosilazione. Mediante immunoelettroscopia è stato scoperto che il sito di attacco degli anticorpi monoclonali anti-VP7 è rappresentato dal capsido esterno del virus. Pertanto, utilizzando sieri iperimmuni in saggi di neutralizzazione i RV di gruppo A sono stati classificati in 27 sierotipi. Inoltre è stato anche proposto che VP7 interviene nell'attacco del virus alla cellula ospite mentre la maggior parte degli studi attribuiscono tale capacità alla proteina VP4.

La sequenza aminoacidica di VP7 dei ceppi appartenenti ad ognuno dei 27 sierotipi è stato dedotta dalla sequenza nucleotidica del gene VP7. Una comparazione degli aminoacidi dedotti per i tutti i 27 sierotipi indica che ci sono nove regioni della sequenza lineare del gene VP7 e che queste regioni sono altamente divergenti. Ognuna di queste regioni è altamente conservata nei ceppi di RV all'interno dello stesso sierotipo. Sulla base delle differenze della sequenza dell'acido nucleico tra i virus con

diverso sierotipo si evidenziano sei regioni. Solo 5 regioni sono apparentemente presenti sulla proteina VP7 e solo tre (A, B, C) di queste localizzate tra gli aa 87 e 101, tra gli aa.142 e 152 e tra gli aa. 208 e 221 sono state confermate essere coinvolte nella neutralizzazione sulla base della mappatura dei mutanti neutralizzanti [Dyall-Smith ML et al., 1986; Makov ER et al., 1988; Taniguchi K, 1988]. Sono stati anche determinati i siti di cross-reazione (regione A) e ceppo-specifici (regione A e C). La regione C sembra essere la più importante dal momento che è stato dimostrato che un mutante che possiede una sostituzione aminoacidica in questa regione presenta una maggiore resistenza agli antisieri iperimmuni [Dyall-Smith ML et al 1986]. Sulla base di questi risultati è stato supposto che la regione sia il sito antigenico immunodominante. Nell'ambito di queste regioni, quattro (regioni A, B, C e F) sono considerate i maggiori siti antigenici [Dyall-Smith et al., 1986; Ciarlet et al., 1997]. I siti di mutazione in VP7, che permettono di evadere i vari anticorpi monoclonali neutralizzanti, contengono 2 strutture definite epitopi antigenici, 7-1, immunodominante, e 7-2. L'epitopo 7-1 è ulteriormente suddiviso in 7-1a e 7-1b. Le regioni 7-1 e 7-2 ricoprono la maggior parte della superficie esterna di VP7.

Nei ceppi umani di RV le sequenze sono sufficientemente conservate all'interno di un sierotipo rendendo possibile identificare il sierotipo di un ceppo attraverso l'analisi delle sequenze di due di queste regioni variabili (VP5 o A, VP8 o C). Lo studio di virus con diversi siti di glicosilazione (da zero a due) su VP7 è iniziato per dimostrare che la glicosilazione può modulare le proprietà biologiche e antigeniche di VP7. L'osservazione che in una variante di SA11 con VP7 non glicosilata è infettiva e possiede le proprietà di emagglutinazione e sierotipo specifica indica che la glicosilazione non è essenziale per queste funzioni [Petrie BL et al., 1982; Estes MK, unpublished]. 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 dai suoi corrispondenti anticorpi neutralizzanti attraverso l'aggiunta di una nuova catena laterale di carboidrati. Questa regione sembra essere il sito antigenico dominante sulla VP7 del ceppo SA11. Tuttavia una generalizzazione di questa dominanza non è fattibile perché non è stato preso in considerazione il possibile ruolo di VP4 nella neutralizzazione [Kapikian AZ et al., 2001].

Struttura e funzione delle proteine non strutturali di rotavirus

NSP1

La proteina NSP1 sembra non essere essenziale per la replicazione del virus e per il riassortimento dei segmenti genomici [Estes MK, 2001]. Alcuni studiosi hanno implicato il gene NSP1 come fattore di virulenza nel topo. La proteina NSP1 è quella meno conservata del virus dal momento che mostra ancora più sequenze modificate rispetto a VP4 e VP7.

NSP2

La proteina NSP2 è una NTPase oligomerica localizzata nel viroplasma e possiede attività destabilizzante l'elica [Estes MK, 2001]. È stato stabilito che essa svolge un ruolo fondamentale nella formazione del viroplasma, associata a NSP5 [Fabbretti E et al., 1999], e nella replicazione/incapsidamento del genoma.

NSP2 sembra interagire direttamente o indirettamente con altre proteine virali, come VP2 [Patton JT et al, 2006] con la quale forma lo strato più interno del capsido [Prasad BV et al., 1996] e la polimerasi virale VP1 [Valenzuela S et al., 1991]. NSP2 è un enzima multifunzionale grazie al legame con ssRNA [Taraporewala ZF et al., 2001]. Oltre l'attività destabilizzante l'elica dell'acido nucleico, essa mostra anche attività Mg^{2+} tri-fostato nucleoside dipendente (NTPase), RNA-trifosfatasi (RTPase) [Taraporewala ZF et al, 1999] e di chinasi nucleoside-difosfato [Kumar M et al., 2007]. Il legame con ssRNA e l'attività destabilizzante l'elica non dipendono dalla attività NTPase di NSP2 e sono probabilmente coinvolte nel rilascio del template di mRNA in preparazione per la sintesi del dsRNA [Taraporewala ZF et al., 2001].

NSP3

NSP3 è una proteina basica di 36,4 kDa che è codificata dal segmento 7 del genoma di RV. Essa è in grado di facilitare la traduzione dei trascritti mRNA di RV e sopprimere la sintesi proteica dell'ospite mediante il legame con poliA [Poncet D et al., 1993; Piron M et al., 1998; Vende P et al., 2000; Karyer-Bibens C et al., 2009; Chung KT et al., 2011.] RV si serve del meccanismo di traduzione dell'ospite per produrre le proteine virali che codificano per il loro genoma. Nella cellula ospite solo gli mRNA capped e poliadenilati sono tradotti.

NSP4

NSP4 è codificata dal gene 10 ed è organizzata in tre domini N-terminali e un singola, estesa regione C-terminale. Il prodotto di traduzione primario costituito da 175 aa (20 kDa) viene glicosilato durante la traduzione in una proteina di 29 kDa. La molecola infine è processata nella proteina matura di 28 kDa che è una proteina transmembrana del RE. NSP4 è l'unica proteina non strutturale che non si lega all'RNA [Estes MK, 2001].

NSP4 consiste di tre domini idrofobici (H1-H3) con 2 siti di glicosilazione legati all'azoto con alta affinità per il mannosio orientati verso il lato luminale del RE nel dominio H1 [Bergmann CC et al., 1989; Chan WK et al., 1988]. Il dominio transmembranario H2 attraversa il doppio strato del RE e serve come sequenza segnale non clivata, mentre il dominio viroporina H3 è formato da un gruppo di residui carichi positivamente e da un' α -elica anfipatica [Hyser JM et al., 2010] seguito da un esteso dominio citoplasmatico contenente una regione coiled-coil e da una C-terminale flessibile [Estes MK and Greenberg HB, 2012]. Relativamente poco è conosciuto riguardo la porzione N-terminale, probabilmente a causa dell'idrofobicità e delle proprietà associate alla membrana di questa regione. NSP4 svolge un ruolo importante nell'assemblaggio del virus e il carbonio terminale del dominio citoplasmatico funziona nella morfogenesi virale come recettore intracellulare sulla membrana del RE [Kapikian AZ et al. 2001]. NSP4 lega le particelle progenie a doppio strato e media la gemmazione di queste particelle all'interno del lume del RE. Questo ruolo è supportato dalla osservazione che NSP4 funziona come un recettore intracellulare delle particelle a doppio strato lipidico (DPLs) per favorire la formazione dello strato trilaminare del capsido (VP7) nel RE e probabilmente anche delle protuberanze (VP4). Inoltre è stato riconosciuto a NSP4 un ruolo di enterotossina ed è stato dimostrato che il residuo di tirosina presente in posizione 131 è fondamentale per questa attività.

E' stato ipotizzato che NSP4 interagisca con un putativo recettore cellulare presente sull'epitelio intestinale stimolando un segnale di traduzione calcio-dipendente che aumenta la permeabilità della membrana plasmatica al cloro e potenzia la secrezione di cloro inducendo una diarrea secretoria.

NSP5

NSP5 è una proteina fosfodimerica, ricca di Ser e Thr, che subisce O-glicosilazione [Poncet D et al., 1997; Afrokanova I et al., 1996; Blackhall J et al 1998; Welch SK et al 1989]. Essa ha attività autochinasica ed esiste in diversi isomeri fosforilati nelle cellule

infettate. Quando è coespressa nelle cellule infettate, NSP2 induce la fosforilazione di NSP5 che è stato dimostrato interagire con NSP2 [Estes MK, 2001].

NSP6

La proteina NSP6 è codificata da una ORF alternativa sul segmento genico 11 della maggior parte dei RV. E' riconosciuto che essa interagisce con NSP5 e si accumula nel viroplasma insieme con NSP2 e con 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 RE [Estes MK, 2001].

Ciclo replicativo di rotavirus

La replicazione di RV avviene nel citoplasma e si conclude con la morfogenesi che avviene nel RE [Ruiz MC et al 2008]. La replicazione potrebbe essere riassunta in tre fasi: (1) traduzione e sintesi delle proteine virali; (2) replicazione del dsRNA, "packaging" genomico e assemblaggio delle particelle a doppio strato lipidico (DLP); (3) le DLP sono inglobate nel RE dove acquistano lo strato più esterno.

Il sito primario dell'infezione da RV è il piccolo intestino, dove il virus replica nel citoplasma degli enterociti maturi [Estes MK and Kapikian AZ, 2007]. La tripsin-proteasi del tratto gastrointestinale taglia la VP4 in VP5* e VP8*, un evento che precede l'entrata dei RV nella cellula [Pesavento JB et al 2006; Baker M and Prasad BV 2010]. Durante l'internalizzazione lo strato esterno viene perso della trascrizione [McDonald SM, 2011]. Infatti la perdita dello strato esterno avvicina i generando delle DLP costituite da un dimero di VP2 e VP6, con conseguente attivazione il complesso polimerasico (VP1+VP3) alle DLP che diventano trascrizionalmente attive producendo numerose copie di RNA a polarità positiva usando come templati i relativi filamenti negativi [Patton JT et al., 2004., Lawton JA et al.,2002].

I nuovi filamenti di RNA acquisiscono successivamente un 5' cap (m7GpppG). Gli RNA neosintetizzati svolgono un doppio ruolo durante il ciclo di replicazione: simulano l'mRNA per la sintesi della proteina e fungono da template per la replicazione del genoma. Gli mRNA di RV non possiedono la coda polyA; hanno invece una sequenza consenso in 3' che lega NSP3 e funziona in modo omologo della proteina di legame polyA. NSP3 interagisce anche con fattore cellulare di inizio eIF4GI. È ragionevole

ipotizzare che tale trascrizione di mRNA virali possa ledere quelle degli mRNA cellulari e danneggiare allo stesso tempo la traduzione di mRNA [Vende P et al., 2000; Piron M et al., 1999; Piron M et al., 1998].

Una volta che un consistente numero di mRNA e proteine virali è sintetizzato, essi si accumulano nel viroplasma e queste strutture corrispondono ad una discreta larga e inclusione elettron densa.

In queste strutture è probabile avvenga l'assemblaggio, il "packaging" del genoma virale, la replicazione e la formazione di DLP [Fabbretti E et al., 1999; Silvestri LS et al., 2004]. Qui sono accumulate, anche, le proteine strutturali e non strutturali [Patton JT, 1995; Estes MK e Cohen J, 1989].

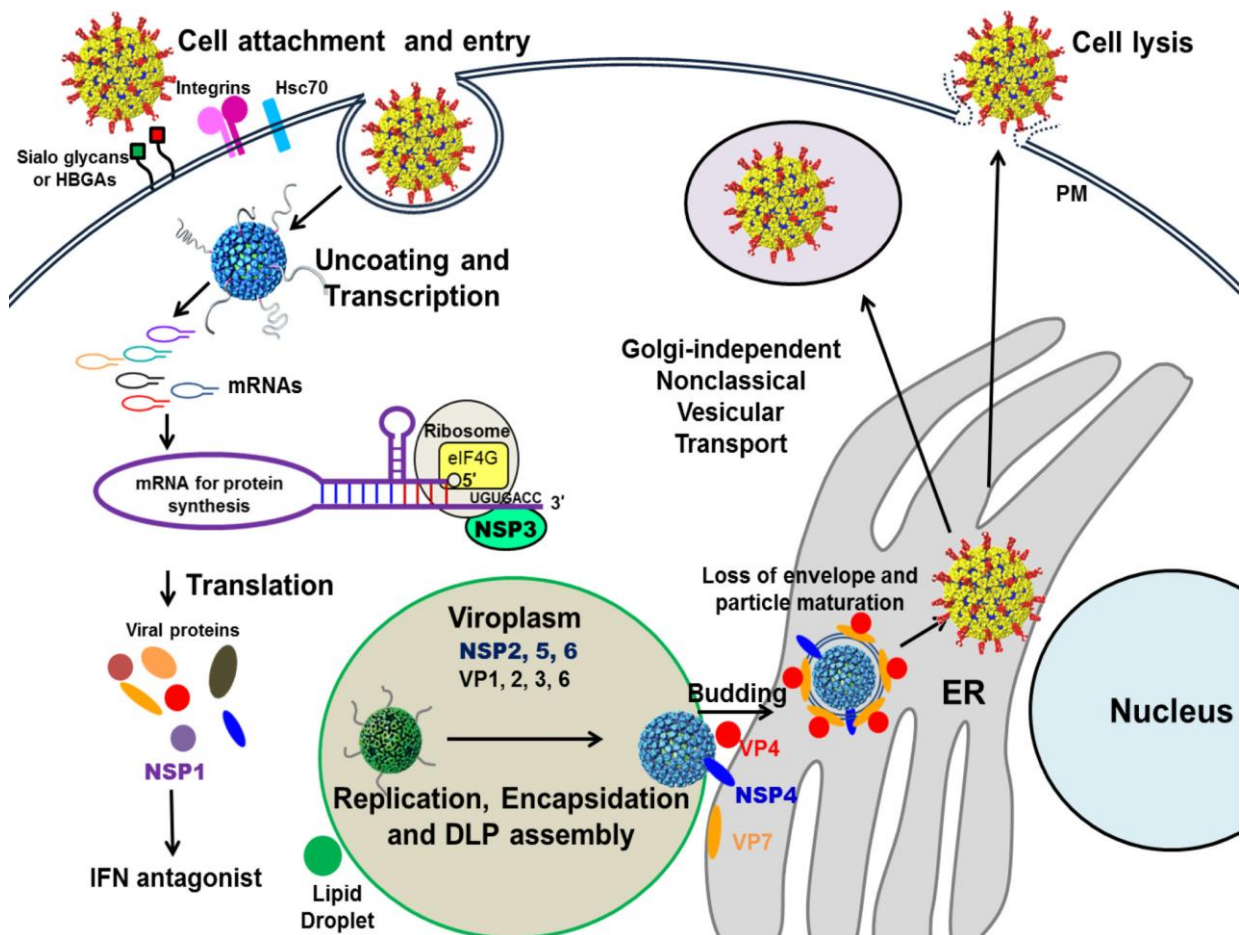


Figura 8. Ciclo replicativo di rotavirus [da Desselberger U et al., 2009, modificata].

I viroplasmii sono strutture dinamiche, topograficamente eterogenee. All'interno contengono VP1 e VP2 e le proteine non strutturali NSP2 e NSP5. Quest'area è anche il sito di sintesi di RNA (+), di formazione del "core" della progenie e del "packaging"

nelle particelle a singolo strato [Patton JT et al., 2006]. Il dominio esterno è ricco di proteine VP6, molto probabilmente non assemblate dal momento che come osservato al microscopio elettronico la quantità delle DLP (dimero VP2 e VP6) in periferia del viroplasma è piuttosto scarso. Il dominio esterno è costituito anche da NSP4, che svolge un ruolo nel reclutamento di VP6 per la morfogenesi del core delle particelle DLP [Patton JT et al., 2006; Lopez T et al., 2005; Gonzales RA et al., 1989].

Durante o in seguito, l'incapsidamento degli undici segmenti di RNA e il complesso proteico core associato produce RNA (-) generando RNA a doppio filamento nelle particelle pre-virali [Patton JT et al., 2007].

Diversamente dalla trascrizione virale che si verifica numerose volte in ciascun segmento, la replicazione genomica è equimolare e produce 11 dsRNA per virione [Patton JT, 1990]. La tempistica dell'assemblaggio e la replicazione sono regolate da interazioni tra la proteina virale VP1 e la proteina del core VP2 [McDonald SM and Patton JT, 2009; Guglielmi KM et al., 2010].

Il reclutamento di VP1 da parte di VP2 attiva cambiamenti conformazionali nell'enzima che facilitano l'inizio della sintesi di RNA [Patton JT et al., 2007; Tortorici MA et al., 2003; Lu X et al., 2008]. La presenza dello strato di VP 2 assicura che la polimerasi non effettui replicazioni abberanti del genoma di RV all'esterno delle particelle. In seguito alla replicazione, la progenie del core acquisisce lo strato VP6, permettendo alle DLP di sostenere il ciclo replicativo con una di una seconda fase di trascrizione. Le particelle DLP gemmano nel lume dell'RE. Durante questo processo acquisiscono VP4 e VP7 formando l'involucro esterno [Gonzales RA et al., 2000]. Le particelle trilaminari mature sono rilasciate principalmente dalle cellule non polarizzate per lisi e secondariamente dalle cellule polarizzate mediante un processo litico e non-litico [Jourdan N et al., 1997].

Meccanismi di evoluzione genetica di rotavirus

Mutazioni puntiformi

Il primo meccanismo di evoluzione genetica di RV 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 RV 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 LS and Palombo EA, 1999; Arista S et al., 2006; Phan TG et al., 2007].

Infezioni miste

Casi di coinfezione dello stesso ospite con due ceppi di RV di diverso genotipo possono essere molto frequenti specialmente nei bambini nei paesi in via di sviluppo. L'evidenza è fornita da numerosi studi che mostrano all'elettroforesi degli RNA estratti dalle feci la co-presenza di 2 profili di RNA di RV o attraverso genotipizzazione mediante RT-PCR la presenza di più di un genotipo nello stesso campione di feci [Gentsch JR et al., 1996; Gouvea V and Brantly M, 1995; Ahmed MU et al., 1991]. L'alta frequenza di infezioni miste di ceppi di RV 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 riassorbimento genomico.

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 RV può risultare in un virus "riassortante" che presenta segmenti di RNA provenienti da ciascuno dei progenitori virali [Desselberger U et al., 1996; Watanabe M et al., 2001].

Konno T. e collaboratori (Konno T et al., 1984) sono stati i primi a ipotizzare che si possa verificare un riassortimento tra ceppi circolanti contemporaneamente, basandosi sull'osservazione che all'inizio di una epidemia stagionale era presente un elettroferotipo dominante mentre alla fine dell'epidemia erano presenti varietà di elettroferotipi minori.

Partendo dalla supposizione che un riassortante possa derivare da due ceppi parentali durante una stagione epidemica, Watanabe M. e collaboratori (Watanabe M et al., 2001) hanno eseguito una co-elettroforesi di RNA estratti da ceppi di RV umani (HRV)

raccolti in Giappone durante un periodo di 6 anni, utilizzando gel di poliacrilamide a 3 differenti concentrazioni. Questo procedimento ha permesso di individuare i 2 ceppi parentali e la loro progenie riassortante. Degli uni e degli altri ceppi sono stati sequenziati alcuni segmenti genomici “chiave”, fornendo l’evidenza che i riassortanti erano stati generati da ceppi di HRV circolanti contemporaneamente.

È ampiamente noto che il riassortimento può coinvolgere tutti gli undici segmenti genomici di RV, conferendo il potenziale di generare teoricamente 211 diverse combinazioni geniche. Questa osservazione offre l’evidenza che il riassortimento rappresenta uno dei più importanti meccanismi di evoluzione genetica nei ceppi di RV comunemente circolanti [Kapikian AZ et al., 2001; Manula L et al., 2002; Gentsch JR 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 geniche siano preferite nei RV circolanti, verosimilmente a causa di fenomeni di “linkage” genetico [Heiman EM 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 EM et al., 2008]. Il riassortimento genico in caso di coinfezione tra ceppi di RV 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 M et al., 2001; Ramachandran M 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 JR et al., 1996]. Tuttavia alcuni studi di sorveglianza hanno documentato numerosi esempi di riassortimento intergenogruppo [Medici MC et al., 2007; Gentsch JR et al., 2005; Matthijenssens J et al., 2008] e singoli G-tipi sono stati rivelati in associazione con una ampia varietà di P-tipi. L’ncidenza globale di questi riassortanti è bassa ma è evidente che essi possano assumere particolare rilevanza epidemiologica in alcune aree geografiche [Medici MC et al., 2007].

Lo scambio di segmenti genici tra ceppi diversi in caso di coinfezione gioca un ruolo primario nel generare la diversità genetica dei RV. Si ipotizza che, come risultato del riassortimento, i RV 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 EM et al., 2008].

Trasmissione interspecie

Un ulteriore meccanismo di diversificazione genetica dei RV umani riguarda l'introduzione di geni di RV animali sia attraverso la trasmissione dell'intero virus animale all'uomo sia attraverso riassortimento tra ceppi umani ed animali. Tuttavia solo alcuni ceppi di RV 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. È stato dimostrato che tutti gli 11 segmenti di alcuni RV 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 RV animali all'uomo [Nagakomi T and Nagakomi O, 1989; Nagakomi T and Nagakomi O, 2000; Tsugawa T and Hoshino Y, 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 J et al., 2006a], dimostrando che un ceppo derivato da trasmissione eterologa era in grado di indurre diarrea nell'uomo. Inoltre, è verosimile che, quando ceppi di RV riescono a saltare la barriera d'ospite, essi non siano in grado di replicarsi efficacemente nel nuovo ospite. Le basi molecolari dell'infettività e della capacità di RV 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 J et al., 2006a].

Riassortimento tra ceppi rotavirus animali e umani

L'introduzione di geni di RV animali in ceppi umani avviene in seguito a trasmissione interspecie dell'intero genoma 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 rari sia frequenti nell'uomo che presentano una stretta correlazione genetica e antigenetica 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 più diffuse possono avere una origine filogeneticamente comune con ceppi animali [Santos N, et al., 1999].

Il ceppo 69M di sierotipo G8 (G8P4[10]), ad esempio, caratterizzato da elettroferotipo supercorto contiene geni riconducibili al genogruppo DS-1 umano ed altri correlati a RV bovini [Ohshima A et al., 1990]. Inoltre il ceppo G8P[14] con elettroferotipo lungo, quali HAL1166 ed altri G8P[14] rivelati in diverse parti del mondo, sembrano essere strettamente correlati geneticamente a ceppi umani di genogruppo DS-1 e a ceppi bovini mostrando elevata omologia genetica con il gene VP4 di ceppi di coniglio P[14]. Tali ceppi G8P[14] suggeriscono che essi potrebbero derivare da due eventi di riassortimento in 2 specie animali diverse [Browning GF, et al., 1992; Ohshima A et al., 1990; Holmes JL et al., 1999; Palombo EZ, et al., 2000].

Anche l'eterogeneità genetica della specificità P[6], che rappresenta il terzo genotipo più frequente nell'uomo, sembra essersi generato nell'uomo mediante molteplici eventi di trasmissione interspecie e successivi riassortimenti tra ceppi umani e animali [Martella V et al., 2006].

Inoltre, mediante analisi di sequenza dell'intero genoma è stato dimostrato che ceppi di RV umano appartenenti al genogruppo Wa potrebbero avere una origine filogenetica comune con RV suini e che i ceppi umani di genogruppo DS-1 potrebbero avere una origine filogeneticamente comune con RV bovini [Matthijenssens J et al., 2008].

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 [Alaham MM et al., 2008]. In particolare, nei virus con riarrangiamenti genomici i segmenti tipici di RNA virale possono essere perduti o essere rimpiazzati da doppi filamenti aggiuntivi di RNA che migrano più lentamente. Queste nuove bande all'analisi elettroforetica rappresentano di solito forme concatamERICHE di dsRNA ("double-strand" RNA) che contengono sequenze specifiche dei segmenti di RNA mancanti [Estes MK and Cohen J, 1989]. Il segmento riarrangiato è visibile attraverso una posizione insolita nel profilo di migrazione dell'RNA durante PAGE in assenza di

un segmento in posizione normale. Virus con tali riarrangiamenti genomici sono stati isolati da bambini immunocompromessi con infezione cronica [Hundley F et al., 1987], da bambini immunocompetenti con infezione asintomatica [Besselaar TG 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 RV umani. Il ceppo A64, che è stato isolato da un bambino immunocompromesso con infezione cronica da RV, rappresenta un esempio di virus riarrangiato nei segmenti genomici 8, 10 e 11.

In altri casi ancora sono state rilevate in un segmento riarrangiato parziali duplicazioni e delezioni [Gorziglia M et al., 1989]. Si ipotizza che tali riarrangiamenti siano conseguenza del fatto che l'RNA polimerasi associata al virione esegue un “testa-coda”: torna indietro e si lega a un secondo sito col suo filamento stampo, ripetendo parte di esso nel trascritto [Hundley F et al., 1985].

I RV 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 B 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 aggiuntive impacchettate. Questi risultati indicano che i RV hanno una considerevole capacità ad impacchettare RNA genomico addizionale [McIntyre M et al., 1987]. Nella maggior parte dei casi i profili delle proteine virus-specifiche prodotte in cellule infettate con RV dotati di genomi riarrangiati sono simili a quelli osservati in cellule infettate con RV di riferimento [Biryahwaho B et al., 1987; Pock MD 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 F et al., 1985]. Si ritiene che il riarrangiamento genico rappresenti un terzo

meccanismo di evoluzione dei RV dopo quelli di “shift” e “drift” antigenico [Desselberger U, 1996].

Trasmissione e patogenesi

Si ritiene che RV sia trasmesso attraverso la via fecale-orale, a stretto contatto tra le persone e con ambienti contaminati. Importanti veicoli di infezione sono le mani e gli utensili contaminati, in generale superfici contaminate, ma anche l’acqua e i cibi contaminati. 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 possa essere la polvere che contiene frammenti di feci secche che, rimanendo sospesa nell’aria, viene inalata. Trattenuta poi nel muco essa verrebbe deglutita infettando di conseguenza l’intestino. I RV sono stabili in acque di scolo e resistenti ai trattamenti fisico-chimici, quale la clorazione, utilizzati negli impianti di depurazione delle acque. RV, al pari di alcuni adenovirus e del virus dell’epatite E, sono riconosciuti responsabili di importanti focolai epidemici di enterite trasmessa dall’acqua specialmente nei paesi in via di sviluppo [Cliver DO 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. Tuttavia la sua rilevanza nell’epidemiologia di tali virus è sospettata e fortemente sostenuta [Gallimore I et al., 2005; van Zyl WB et al., 2006]. Inoltre, RV di gruppo A sono stati rivelati in vongole in Giappone [Hansman GS et al., 2008] ed è stato dimostrato che anche alcuni succhi di frutta possono essere potenziali veicoli di trasmissione di RV [Leong YK et al., 2008].

Esistono numerosi aspetti che intervengono sulla diffusione e sui possibili veicoli di trasmissione dei RV. 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 M et al., 2004]) e la loro prolungata eliminazione (fino a 2 settimane dalla risoluzione della malattia [Pickerin LK et al 1988]), l’elevata frequenza di infezioni asintomatiche (il 50% delle infezioni da RV è nei primi due anni di vita è asintomatica) [Wilhelmi I et al. 2003], la stabilità del virione nell’ambiente e la relativa resistenza a pH acido e in genere ai normali disinfettanti. RV è anche capace di sopravvivere sulle superfici di alluminio per 10 giorni a 20° -23° C in presenza di una umidità relativa media e per un mese a 4°C in presenza di una umidità relativa alta [Koopmans M et al. 2004].

Un'ulteriore e riconosciuta sorgente di infezione è rappresentata, come è stato detto prima, dagli animali (infezione zoonosica) [Müller M and Johne R 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 N et al., 2002; De Grazia S et al., 2007; Martella V et al., 2008; Tsugawa T and Hoshino Y, 2008]. Inoltre, ceppi riassortanti umani-bovini e umani-suini sembrano circolare specialmente in aree ristrette dell'India e del Brasile, dove verosimilmente è maggiore il contatto tra uomini e animali.

È stato dimostrato che l'infezione da RV può iniziare con sintomi del tratto respiratorio superiore, con o senza apparenti disturbi gastrointestinali [Zheng BJ et al., 1991]. Le goccioline respiratorie possono essere un'importante veicolo di infezione [de Wit MA et al. 2003; Santosham M et al. 1983]. Dopo l'introduzione del virus attraverso la via orale, il principale bersaglio è l'epitelio che riveste l'intestino [Greenberg HB and Estes MK, 2009] dove il virus infetta gli enterociti maturi all'apice dei villi (18-36 ore dopo l'infezione) determinando l'allargamento ed appiattimento degli stessi, infiltrazione di cellule mononucleate a carico della lamina propria e trasformazione degli enterociti in cellule cuboidali ed irregolari [Madeley CR, 1995; Medici MC et., al 2011] (Figure 9 e 10). Inoltre il rimpiazzo degli enterociti maturi infettati agli apici dei villi da parte delle cellule secretorie delle cripte conduce a iperplasia delle cripte stesse con conseguente aumento dello strato mucoso. Vari meccanismi sono stati coinvolti nella insorgenza della diarrea. La necrosi degli enterociti maturi infettati e la loro desquamazione concorrono alla sintomatologia della diarrea riducendo la digestione e l'assorbimento di nutrienti.

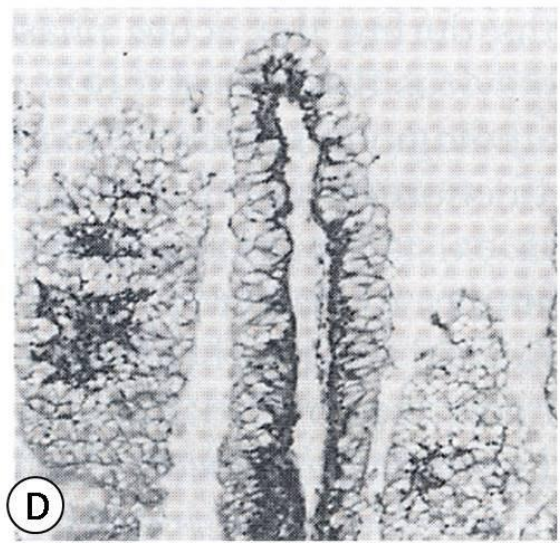
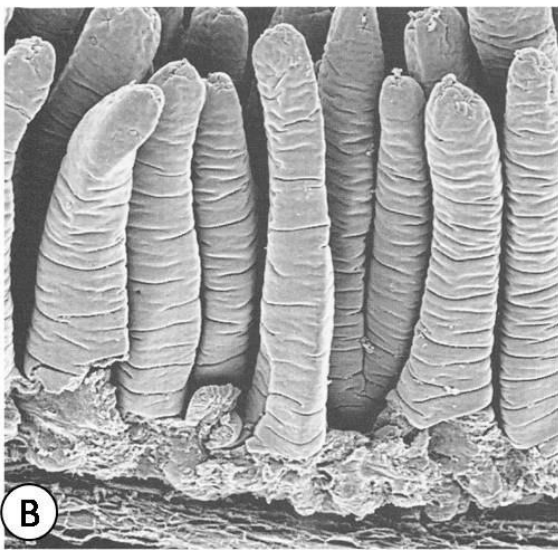
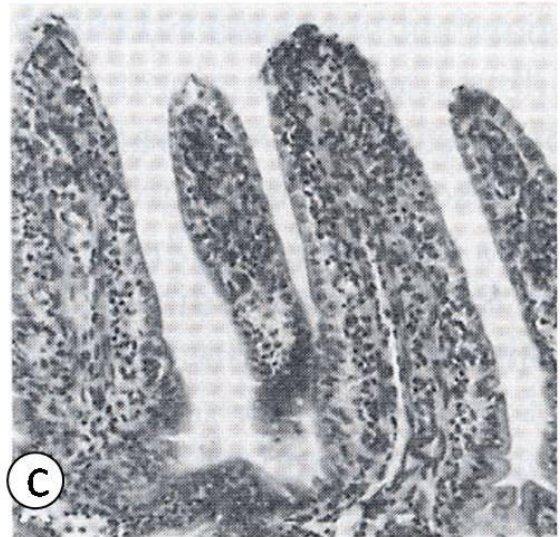
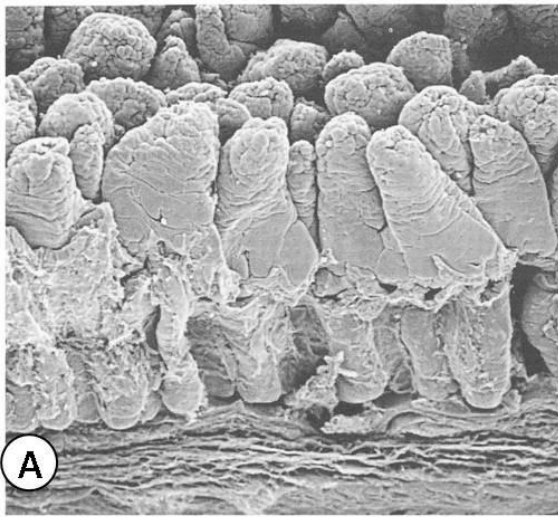


Figura 9. Superficie della mucosa della parte prossimale del piccolo intestino di un vitello sacrificato mezz'ora dopo l'esordio di diarrea sperimentalmente indotta dall'infezione con rotavirus umano, osservata alla microscopia elettronica a scansione (A) e a trasmissione (C). Le immagini in B e D mostrano tratti analoghi del piccolo intestino di vitello non infettato [da Madeley CR and Cosgrove IL, 1975 (A e B); Kapikian AZ et al., 2001 (C e D), modificati].



A



B

Figura 10. A) Normale aspetto istologico di ileo di un maiale di 8 giorni. Cellule assorbenti vacuolate mature normali coprono i villi. Colorazione ematossilina- eosina (H&E). B) Ileo da suino di 8 giorni dopo inoculo con rotavirus umano virulenti (ceppo Wa). Sono evidenti grave atrofia dei villi e precoce iperplasia delle cripte (Ward RI and Bernstein DI: Rotavirus, module 21, da “The Immunological Basis for Immunisation Series” printed by Who Document Production Service, Geneva,2011).

Ciò determina un accumulo di lattosio e di altri disaccaridi nel lume intestinale e un aumento della pressione osmotica con richiamo di acqua. La successiva ripopolazione dei villi ad opera di cellule immature secretorie delle cripte causa l’insorgenza di una diarrea secretoria con perdita di liquidi ed elettroliti [Estes MK, 2001; Ball JM et al.,1996]. La virulenza di RV è correlata soltanto ad alcune delle proteine codificate dal genoma virale. In particolare, essa è stata associata all’attività delle proteine codificate dai geni 3, 4, 5, 9 e 10, sebbene i meccanismi alla base del loro coinvolgimento nella virulenza sono solo parzialmente compresi. Il gene 3 codifica per l’enzima che lega l’RNA modulandone l’espressione durante la replicazione. I geni 4 e 9 producono le

proteine del capsid esterni richiesti per iniziare l'infezione e il gene 5, che codifica per la NSP1, che funziona come antagonista dell'interferone e infine, il più importante è l'enterotossina NSP4 la quale altera la permeabilità della mucosa e indebolisce le giunzioni tra le cellule, distrugge il citoscheletro delle cellule infettate, aumenta la secrezione degli ioni cloro e stimola la mobilità intestinale attraverso il sistema nervoso enterico [Ramig RF, 2004]. Questi eventi causano una incontrollata fuoriuscita di acqua nel lume intestinale portando a una profusa diarrea.

La permeabilità della mucosa viene modulata dall'NSP4 mediante il controllo dell'omeostasi del calcio. In particolare, l'azione di un frammento della proteina NSP4 (aminoacidi 112-175) causa un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) che provoca di conseguenza ridotta capacità di assorbimento (malassorbimento) di Na^+ , acqua e disaccaridasi intestinali determinando la distruzione degli enterociti. L'infezione da RV porta ad un aumento della $[Na^+]_i$ e alla diminuzione di $[K^+]_i$ verosimilmente correlati ad una aumentata permeabilità della membrana plasmatica. Queste variazioni, nelle quali è verosimilmente coinvolta, come è stato detto prima, 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 RV 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 RV altera la struttura degli enterociti polarizzati attraverso un'azione sulle proteine del citoscheletro mediata dall'aumento della $[Ca^{2+}]_i$ e modifica le giunzioni strette tra gli enterociti attraverso l'azione della NSP4 con conseguente efflusso paracellulare di acqua ed elettroliti.

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 MK, 2001; Ramig RF, 2004]. La componente secretoria della diarrea da RV 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 sistema nervoso enterico (SNE).

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 RV. E' stato dimostrato che la proteina NSP4 è rilasciata anche dal polo basale degli enterociti infettati [Ramig RF, 2004] 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 RV rimangono sconosciuti similmente a quelli che determinano patogenicità e virulenza di questi virus.

Rimangono sconosciuti i meccanismi con i quali il virus provoca il vomito.

Il periodo di incubazione di RV è di circa 1-3 giorni [Bernstein DI e Ward LR, 2004]. Per i bambini con sintomi, l'inizio è spesso brusco con febbre e vomito seguite da una esplosiva diarrea acquosa.

Il vomito potrebbe precedere la diarrea approssimativamente nella metà dei casi [Haffejee IE, 1991]. Nelle feci non c'è sangue, macano leucociti, mentre potrebbe essere presente muco nel 20% dei casi [Pickering UK et al., 1977; Huicho L et al., 1993]. La febbre spesso si verifica durante la malattia, stimata tra il 45% e 84% dei pazienti [Rodriouez WJ et al., 1977; Steinhoff MC, 1980; Unhoo I et al., 1986; Kovacs A et al., 1987]. La malattia spesso si autorisolve tra queattro e otto giorni, sebbene il decorso dei sintomi varia da 2 a 22 giorni [Wyatt RG et al., 1979].

Inizialmente si riteneva che la replicazione di RV fosse possibile solo nel tratto intestinale dei pazienti affetti da gastroenterite. Ora invece si ipotizza che altre sedi possano essere coinvolte in quanto RV è stato associato a complicazione dell'enterite caratterizzate da segni e sintomi dovuti a infezioni sistemiche, come iperpiressia, elevati livelli di transaminasi [St Geme JW et al., 1988; Teitelbaum JE et al., 2007], crisi convulsive [Contino MF et al., 1994; Kawano G et al., 2007; Chung B et al., 2007] ed encefalopatie. Antigeni e acidi nucleici di RV sono stati rivelati nel siero di bambini con infezione come pure l'acido nucleico virale è stato rivelato nel liquido cerebrospinale di pazienti con convulsione [Kirton A et al., 2005; Hongou K et al., 1998]. Wong [Wong V., 2001] ha osservato un'associazione statisticamente significativa ($P>0,002$) tra encefalopatia e infezione da RV rispetto a nessun agente eziologico rivelato e un maggiore rischio di encefalopatia in corso di infezione da RV 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 RV. Tuttavia il ritrovamento del genoma virale nel liquor suggerisce un ruolo patogenetico di tale agente e supporta l'ipotesi che la replicazione di RV possa avvenire a livello del sistema nervoso centrale (SNC) causando un danno

diretto. Nonostante queste osservazioni, la patogenesi dell'encefalopatia associata a RV rimane tuttora sconosciuta.

Le basi per la restrizione dell'ospite sono ancora incomprese, ma l'analisi dei fattori di crescita e virulenza ha identificato diverse proteine che potrebbero essere coinvolte. Le proteine esterne del capsido VP4 e VP7 sono state coinvolte nella crescita specie-specifica per il loro ruolo nel legame ed entrata del virus [Broome RI et al., 1993; Ciarlet M et al., 1998; Hoshino Y et al., 1995]. Studi di riassortimento indicano che NSP4, l'inibitore delle traduzioni dell'ospite NSP3, e la VP3 influenzano la crescita e la virulenza di RV nelle diverse specie umani [Estes MK et al., 2001; Mossel RC and Raming RF, 2002; Mossel RC and Raming RF, 2003; Hoshino Y et al., 1995]. Uno studio che ha valutato i geni virali di RV murini responsabili della virulenza in un modello murino ha ottenuto una forte evidenza che NSP1 ha un ruolo nella patogenesi virale [Broome RL et al., 1993]. Da notare che ognuna delle proteine VP3, VP4, VP7, NSP1 e NSP4 mostra un grado di variazione specie-specifico, supportando l'idea che l'attività di queste proteine possa dipendere dalla cellula ospite e così provvedere in modo parziale per la restrizione della cellula ospite [Arnold MM and Patton JT, 2009].

I vaccini

I vaccini sono ritenuti essere l'unica cura possibile contro l'infezione da RV per diverse ragioni. Sebbene RV infetti un gran numero di bambini prevedere la progressione della malattia e la disidratazione non è possibile. Comunque il miglioramento della pulizia delle mani e dell'igiene contribuisce a limitare le complicanze della malattia che potrebbero essere problematiche [Vesikari T et al., 2008]. Altre misure di prevenzione, come l'immunizzazione passiva e l'uso di probiotici non sono adatti su larga scala [Mruklovez et al., 2008]. La vaccinazione dei bambini, è pertanto una valida misura per prevenire l'infezione severa da RV [Vesikari T et al., 2008].

Le ricerche sullo sviluppo dei vaccini sono iniziate già nella prima metà degli anni '70 quando venne riconosciuto che le infezioni con ceppi di RV animali proteggevano animali da laboratorio dall'infezione di RV umani [Zissis G et al., 1983]. Ricerche condotte utilizzando ceppi animali, attenuati per l'uomo, dimostrarono che questi, somministrati per via orale erano in grado di indurre una risposta immunitaria all'infezione e proteggevano i bambini dall'infezione. Lo scopo del vaccino di RV è

umentare il grado di protezione nei confronti dell'infezione naturale [Denney PH, 2008] e un efficace programma di vaccinazione ha l'obiettivo di ridurre il numero di ricoveri per disidratazione, le visite specialistiche ai reparti pediatrici di urgenza e le visite mediche in genere.

Il risultato più interessante raggiunto con l'introduzione del vaccino è stato la riduzione della mortalità. In Messico nel 2008 è stata osservata nella popolazione vaccinata (<1 anno) una riduzione della mortalità del 35% rispetto agli anni precedenti 2003-2006 [Richardson V et al 2010]. Successivamente l'estensione della vaccinazione ad una popolazione di bambini di età compresa tra 1 e 4 anni ha confermato la diminuzione di mortalità nella popolazione idonea al vaccino [Richardson V et al 2011]. Risultati analoghi sono stati ottenuti in Brasile dove sono state osservate riduzione della mortalità del 41% [Lanzieri TM et al., 2011] e del 22% [do Carmo GM et al., 2011]. Negli Stati Uniti, dove il vaccino è stato introdotto nel 2006, è stata raggiunta nel 2008 una diminuzione del 46% delle infezioni da RV nei bambini di età inferiore a 5 anni, corrispondente a 40000-60000 ricoveri in meno [Curns AT et al., 2010]. Inoltre l'introduzione della vaccinazione sembra aver influenzato anche l'epidemiologia di RV intervenendo sulla dinamica di trasmissione nel naturale processo di infezione.

Un primo beneficio indiretto della vaccinazione è la riduzione della possibilità di contrarre l'infezione in una popolazione parzialmente vaccinata. Di ciò ne beneficiano soprattutto i bambini più grandi e gli adulti nei quali l'impatto dell'infezione da RV non è completamente noto [Buttery JP et al., 2011; Lopman BA et al., 2011].

Negli USA inoltre e in altri paesi a clima temperato in cui è stata introdotta la vaccinazione è stata riscontrata non solo una diminuzione ma anche un ritardo del picco di stagionalità [Paulke-Korlnek M et al., 2010; Pitzer VE et al., 2009; Tate JE et al., 2009; Hanquet G et al., 2011]. E' noto che la circolazione dei diversi genotipi di RV mostra una considerevole variazione temporale e/o geografica, mentre non è ancora chiaro l'impatto del vaccino sui vari sierotipi, sulla emergenza di alcuni genotipi piuttosto che altri e se sia esso stesso responsabile o possa influire sulla normale variabilità dei ceppi.

Il primo vaccino vivo attenuato multivalente, tra quelli di derivazione animale, è stato il RotaShield (rhesus RV tetravalent vaccine, RRV-TV). Rotashield 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 AZ, 1993] E' stato introdotto in commercio negli

USA nel 1998.

Dimostrata sperimentalmente l'efficacia del vaccino, esso fu introdotto e utilizzato in diversi paesi. Tuttavia, ben presto dopo l'introduzione del vaccino vennero riportati casi di intususcezione ossia di una invaginazione intestinale che può provocare ostruzione seguita da possibile necrosi di un segmento dell'intestino [Anonymous, 2003; King L, 2001]. Questa complicanza causò l'immediato ritiro dal commercio del vaccino tetravalente nel 1999.

Mentre il primo vaccino sviluppato comprendeva solo la proteina VP7, perché era ritenuto il più importante antigene nell'induzione della protezione, i vaccini sviluppati successivamente hanno incluso oltre a VP7 anche il gene VP4 la cui espressione è stata riconosciuta svolgere un ruolo importante nella risposta immunitaria [Denney PH, 2008].

In particolare, dopo diversi anni dal ritiro dal commercio del primo vaccino anti-RV, sono stati sviluppati e approvati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità due nuovi vaccini. In Europa il 21 febbraio 2006 è stato autorizzato al commercio un vaccino monovalente (RV1, Rotarix®, GlaxoSmithKline biological) e il 27 Giugno 2006 uno pentavalente (RV5, RotaTeq®, Merck Vaccine). I due vaccini differiscono per composizione antigenica, programma di vaccinazione e dosaggi raccomandati [Loopman BA et al., 2012].

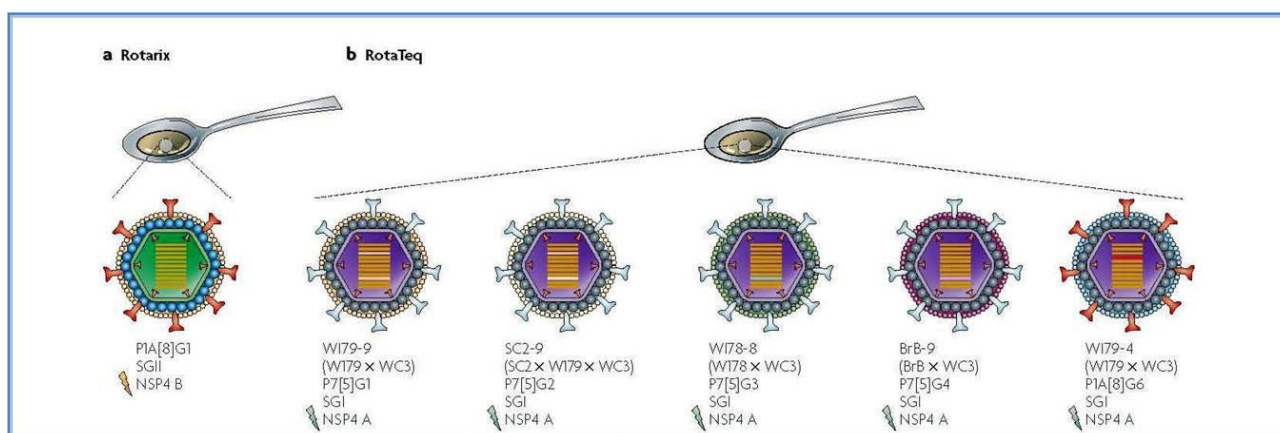


Figura 12. (a) Rotarix, vaccino attenuato costituito da un ceppo di rotavirus umano G1P1A[8] adattato in coltura con VP6 sottogruppo II e NSP4 di genogruppo B. (b) RotaTeq, vaccino riassortante bovino (WC3)-umano costituito dai 5 ceppi mostrati in figura, ciascuno contenente un gene di rotavirus umano 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 J et al., 2007, modificata].

Sono stati introdotti in 48 paesi e nel 2006 anche in Italia dove dal 2008 al 2010 solo 5 regioni hanno incluso il vaccino antiRV nel programma di vaccinazione ma non è stata attivata alcuna strategia vaccinale.

RotaTeq è un vaccino orale, vivo-attenuato, pentavalente umano-bovino (WC3). Il vaccino è costituito da 5 ceppi riassortanti uomo-bovino di RV, ognuno dei quali deriva da un ceppo bovino WC3 (G6P[5]) naturalmente attenuato per l'uomo isolato da un vitello in Pennsylvania. Ciascun riassortante 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 T et al., 2006b; Vesikari T et al., 2006c; Grimwood K and Lambert SB, 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].

Rotarix è un vaccino vivo attenuato, sviluppato a Cincinnati, OH, mediante passaggi in coltura di un ceppo selvaggio di RV umano trovato da Bernestein [Bernestein DI et al 1999]. Questo vaccino deriva dal ceppo 89-12 rivelato in un paziente di Cincinnati, identificato come P1A[8]G1, e presenta gli antigeni VP4 e VP7 più comuni nei RV umani. 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.

L'obiettivo di questo vaccino è di indurre immunità sierotipo-specifica contro il più comune dei G e il più comune dei P tipi di RV che infettano l'uomo. Si ritiene che il vaccino sia sicuro in quanto è assolutamente improbabile che un ceppo umano possa causare intossicazione [Chang HGH et al., 2001]. Il ceppo RIX4414 adattato in coltura cellulare è attenuato rispetto al ceppo selvatico G1.

Come atteso, Rotarix ha dimostrato indurre una elevata protezione nel primo anno dalla sua introduzione e leggermente minore nel secondo anno. Uno studio europeo sulla efficacia del vaccino nei confronti di alcuni tipi di RV in due stagioni successive è giunto a conclusioni evidenti sulla protezione siero-tipo specifica del vaccino "monovalente". Complessivamente, la protezione dalla gastroenterite da RV è risultata simile per i G-tipi, mentre sono state osservate alcune differenze tra i ceppi con diversa combinazione G e P combinazioni: la protezione più alta (90%) è stata osservata nei confronti dei ceppi G1P[8] e quella più bassa (58%) nei confronti dei ceppi G2P[4] [Vesikari T et al., 2007]. Queste osservazioni suggeriscono che l'immunità specifica G1 indotta dal

vaccino gioca un ruolo seppure minimo nella protezione totale [Vesikari T, 2012].

In seguito all'introduzione del vaccino Rotarix, l'apparente comparsa di G2P[4] in Brasile e Australia e un nuovo genotipo G9P[4] in Messico ha portato a ipotizzare che il vaccino potrebbe avere una minore efficacia con ceppi eterotipici [Kirkwood CD et al., 2011]. In Australia, dove metà degli stati usa Rotarix e metà degli stati usa RotaTeq, l'emergenza di G2P[4] è stata osservata solo negli stati che usano Rotarix [Kirkwood CD et al., 2011]. Tuttavia studi condotti in Brasile confermano che Rotarix ha la stessa efficacia nei confronti di G2P[4] [Justino MC et al., 2011; Correia JB et al., 2011]. Uno studio condotto in Messico ha documentato che Rotarix è altamente efficace nel ridurre i ricoveri per enterite da RV causati dai ceppi G9P[4], ciò indica che l'emergenza di alcuni genotipi è dovuta alla mancata vaccinazione piuttosto che a una pressione selettiva del vaccino [Yen C et al., 2011].

Negli USA e in Australia ceppi G3 sono emersi in seguito all'introduzione del vaccino RotaTeq [Kirkwood CD et al., 2011; Boom JA et al., 2010; Desai SN et al., 2010]. Questa circostanza apre l'ipotesi che la risposta neutralizzante indotta nei confronti di G3 dal vaccino RotaTeq® sia meno elevata rispetto a quella nei confronti degli altri ceppi vaccinali [Vesikari T et al., 2006; Chang CC et al., 2009].

L'efficacia del vaccino RotaTeq contro la gastroenterite severa da RV associata a diversi sierotipi è stata riportata tra il 95% nei confronti di G1 e l'82% nei confronti di G2P[4]. Inoltre esso ha una efficacia elevata contro i ceppi G9P[8] anche se la specificità G9 non è compresa nel ceppo vaccinale [Vesikari T et al., 2010]. Sebbene entrambi i vaccini Rotarix e RotaTeq abbiano dimostrato una significativa protezione dalla gastroenterite severa [Vesikari T et al., 2006; Ruiz-Palacios GM et al., 2006], il meccanismo con il quale essi conferiscono protezione è diverso. Rotarix, basato su un ceppo monovalente G1P[8], replica bene nell'intestino e fornisce protezione simile a quella indotta dall'infezione naturale [Velasquez FR et al., 1999].

Epidemiologia

RV rimane ancora oggi la più importante causa di gastroenterite nei bambini nel mondo molto più di altri virus, batteri e parassiti, ed è la causa di circa 450.000 morti l'anno. Su 110 milioni di casi di gastroenterite all'anno due milioni necessitano di ricovero in bambini al di sotto dei 5 anni [Tate JE et al., 2011; Parashar UD et al., 2006]. A partire dai 5 anni di età 1 bambino su 50 richiede il ricovero e 1 su 205 muore per cause associate all'infezione da RV [Tanaka G et al., 2007]. Sebbene i casi fatali siano limitati specialmente nei paesi in via di sviluppo, l'impatto dell'infezione nei paesi industrializzati è elevato: prima della vaccinazione di massa, introdotta nel 2006 negli USA, RV causava ogni anno in questo paese 410.000 visite, 70.000 ricoveri e 272.000 visite ai reparti d'emergenza, con una spesa sociale e sanitaria considerevole [Parashar UD et al., 2006].

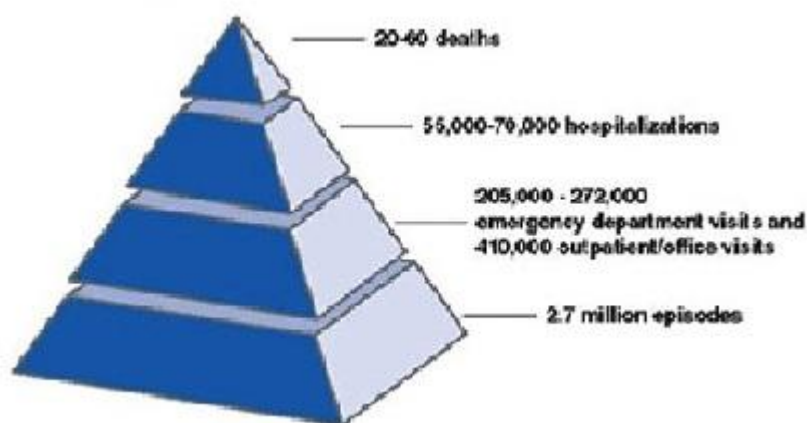


Figura 13: Stima annuale di casi fatali, ricoveri, visite ai reparti d'emergenza ed episodi di gastroenterite negli Stati Uniti.

L'impatto dell'infezione da RV, come è stato detto prima, non è limitato ai paesi più poveri. Studi effettuati nell'Europa dell'est alla metà degli anni 2000 hanno rivelato che il 50% di casi gastroenterite pervenuti ai reparti d'emergenza è causato da RV e che l'infezione è responsabile di 230 morti l'anno [Soriano-Gabarro M 2006; Van Damme P et al., 2007]. Negli USA studi condotti negli stessi anni hanno riportato che il 50% dei bambini di età inferiore a 3 anni trattati o ricoverati nei reparti d'emergenza è affetto gastroenterite, 1 su 150 richiede il ricovero e 1 su 11 è visitato al reparto d'emergenza.

All'anno sono state stimate 20-60 casi fatali, 55 mila-70 mila ricoveri e 410 mila visite mediche [Fisher TK et al 2007; Parashar UD et al., 2003]. Inoltre, considerando anche il fatto che RV rappresenta una frequente causa d'infezione nosocomiale, è stato stimato che l'infezione negli USA costa alla società 1 miliardo di dollari l'anno [Greenberg HB and Estes MK, 2009]. In alcuni paesi l'incidenza di infezione sembra aumentare durante la stagione secca [Black RE et al., 1982; Hieber JP et al., 1978]. In Giappone invece l'umidità relativa non sembra essere importante [Konno T et al., 1983]. Lo studio dell'influenza delle variabili climatiche come temperature, umidità e alluvioni ha portato a risultati conflittuali; pertanto sembra che l'effetto di tali variabili sia specifico di ciascun contesto.

Un importante parametro delle dinamiche dell'infezione da RV negli USA e specialmente nei paesi in via di sviluppo è considerato il tasso di nascite. Le nascite in Asia e Africa sub-sariana è molto più alto, 45-50 nascite ogni mille persone, a confronto con 8-20 nascite nei paesi sviluppati. In genere l'affollamento e le cattive condizioni igieniche possono condizionare e aumentare il numero di casi di infezione. Naturali condizioni risultanti dalla ricostituzione dei soggetti suscettibili attraverso nuove nascite e/o calo di immunità con un fenomeno noto come dinamica di risonanza possono essere un fattore chiave per spiegare la stagionalità dell'enterite da RV come in altre malattie [Pizter VE et al., 2011].

La trasmissione dell'infezione è associata principalmente ai contatti ravvicinati delle persone. Tuttavia RV può diffondere nell'ambiente: sia l'uomo che gli animali possono contaminare acqua, cibi e mangimi [Estes MK. and Kapikian MZ, 2007; Sattar SA et al., 1984].

L'infezione da RV, come è stato accenato prima, ha un andamento stagionale, con un picco nei mesi più freddi e umidi, soprattutto nei paesi con clima temperato [Atchisoo C, et al., 2010], dove le condizioni climatiche potrebbero favorire una maggiore circolazione del virus. Al contrario ci sono paesi dove l'incidenza di infezione è prevalentemente nei periodi secchi, mentre in Giappone l'umidità sembra non influenzare l'infezione. Tuttavia la distribuzione e la durata nel tempo dei picchi di infezione indicano che la temperatura da sola non può condizionare la circolazione del virus nella popolazione, ma altri fattori possono essere importanti come il tasso di natalità, le dinamiche di trasmissione e il comportamento dell'ospite. Sebbene la gravità della malattia sia variabile, il tasso di infezione da RV nei paesi industrializzati e nei paesi poveri è simile, indicando che l'acqua e le condizioni igieniche condizionano relativamente la trasmissione del virus e la comparsa di malattia.

Sebbene episodi epidemici possano verificarsi prevalentemente nei bambini più piccoli nei periodi con temperature miti, RV può essere causa di piccole epidemie anche in comunità quali scuole, ambienti lavorativi e ospizi. con elevati costi per la sanità pubblica a causa dell'alto numero di ricoveri necessari, soprattutto per i neonati e persone con sistema immunitario compromesso [Ruggeri FM and Fiore L, 2012].

Malgrado esistano restrizioni per la replicazione e la diffusione del virus, oltre alla trasmissione interumana e tra le diverse specie, animali è ampiamente dimostrata la trasmissione umano-animale e il verificarsi di episodi di zoonosi. Questo evento può favorire la formazione di ceppi riassortanti uomo-animale.

Ad oggi 27 G-tipi e 37 P-tipi sono stati identificati nell'uomo e negli animali [Matthijssens J, et al., 2011; Trojnar E et al., 2013], ma solo 6 combinazioni di genotipi G/P contribuiscono in modo considerevole all'infezione da RV nel mondo G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] G12P[8] [Matthijssens et al., 2008; Matthijssens J and Van Rast M, 2012]. In particolare G1P[8] è stato dimostrato costantemente e spesso predominante in numerose località, rappresentando il 70% dei ceppi circolanti, negli USA, in Gran Bretagna e Australia e spesso solamente il 25-50% nei paesi meno sviluppati, come in sud America e Africa [Gentsh JR, et al., 2005; Ward RL, 1996].

Ceppi con specificità G2, G3 e G4 rappresentano sono cause minori di gastroenterite, con andamenti epidemici a intervalli di 2-5 anni in numerose regioni. È stato documentato negli ultimi 10 anni l'emergenza di alcuni genotipi VP7 rari o inusuali che causano diarrea nei bambini. Programmi di sorveglianza in Australia [Diwakarla S et al., 2002; Kirkwood CD et al., 2006], Bangladesh [Unicomb LE et al., 1999], Brasile [Santos N et al., 1998], Cameroon [Esona MD et al., 2004], Ungheria [Banyai K et al., 2003], India [Ramani S et al., 2007], Malawi [Cunliffe NA et al., 2001], Nigeria [Steele AD et al., 2002], Tailandia [Ponguswana Y et al., 2002] e USA [Griffin DD et al., 2002] hanno identificato come causa di severa gastroenterite ceppi con specificità G5, G6, G8, G10, G12. Sebbene questi genotipi siano una minoranza, la loro circolazione in alcune regioni dell'India, Africa e Brasile può rappresentare un problema importante. Ceppi con specificità G6, G8 e G10 sono prevalentemente di origine bovina e sono stati identificati in bambini in molte parti del mondo. Ceppi G8 sono stati identificati in numerosi casi di gastroenterite in Africa [Cunliffe NA et al., 2001; Nielsen NM et al., 2005], mentre ceppi G10 sono stati identificati frequentemente in India [Banerjee I et al., 2006]. Genotipi porcini G5 e G11 sono stati riscontrati sporadicamente in bambini con gastroenterite acuta [Kirkwood CD, 2010]. Insieme a genotipi bovini anche genotipi

porcini possono circolare sporadicamente nell'uomo. Eccezione fa la circolazione endemica di ceppi G5 porcini in Brasile [Gouvea V and Sanos N, 1999]. Oltre alla fluttuazione della prevalenza dei "sierotipi emergenti", è ampiamente riconosciuta la capacità di RV di subire riassortimento genico con produzione di ceppi atipici o nuovi, nei quali singoli o molteplici geni possono essere scambiati tra ceppi umani e ceppi animali, o essere oggetto di una trasmissione interspecie con possibile successivo scambio di segmenti di ceppi animali a ceppi umani [Kirkwood CD, 2010]. Questo fenomeno è stato riportato soprattutto nei paesi in via di sviluppo dove i bambini sono infettati da più ceppi contemporaneamente.

La probabilità che genotipi non comuni possano acquisire importanza a livello locale o addirittura su scala globale è il maggior problema che potrebbe presentare la vaccinazione [Kirkwood CD, 2010].

L'esempio più evidente che si è verificato è stata l'emergenza del genotipo G9, trovato per la prima volta nel 1980. A partire dal 1990 è stata riconosciuta la sua distribuzione globale essendo stato identificato in tutti i continenti e in più di 17 paesi inclusi USA, Giappone, India, Bangladesh, Francia, Malawi, Nigeria, Australia, Cina, Tailandia, Sud Africa, Paraguay, Ghana, Brasile e Gran Bretagna [Unicomb LE et al 1999; Zhou Y et al 2003; Cunliffe NA et al., 1999; Arnah GE et al., 2003; Steele AD and Ivanoff B, 2003; Iturriza-Gómara M et al., 2000; Kirkwood C et al., 2003; Ramachandran M et al., 1998]. In genere il genotipo G9 rappresenta un minore componente della popolazione dei RV circolanti, con un tasso di prevalenza del 1-10%. Il tasso più alto è stato riportato in Australia (74,7%), Bangladesh (39%) e Ghana (26,9%) [Unicomb LE et al., 1999; Arnah GE et al., 2003; Kirkwood C et al., 2003].

Immunità'

Il meccanismo dell'immunità di RV non è stato completamente chiarito ma sembra essere multifattoriale e includere sia la risposta innata che adattativa dell'ospite [Franco MA, et al., 2006]. L'immunità umorale è di primaria importanza per la successiva infezione da RV, mentre l'immunità cellulo-mediata aiuta a superare l'infezione.

Successivamente all'infezione da RV, IgA e IgG diretti contro le proteine strutturali VP7, VP4 e VP6 e la proteina non strutturale NSP4 appaiono rapidamente nel sangue, associate ad anticorpi IgA specifici secreti nei siti mucosali [Chibo S et al., 1986;

Grimwood K et al., 1988; Richardson SC et al., 1993; Vizzi E et al., 2005]. In termini quantitativi la risposta anticorpale più evidente è quella diretta contro la VP6 [Svensson L et al., 1987]. L'immunità intestinale è probabilmente il più importante meccanismo protettivo, ma è spesso di breve durata a meno che la continua esposizione a RV non porti al costante livello di anticorpi nella mucosa e alla protezione da infezione e malattia [Coulson BS et al 1992; Matson DO et al., 1993]. Possibili meccanismi immunitari alla base della protezione nei confronti della malattia da RV naturalmente acquisita includono anticorpi neutralizzanti diretti contro VP7 e VP4 come pure alti livelli (media geometrica del titolo di anticorpi sierici anti-RV $>1/800$) di anticorpi sierici IgA diretti specialmente contro la VP6 [Gray J et al., 2008]. Le concentrazioni di anticorpi neutralizzanti del siero nella risposta omotipica (diretta nei confronti di un sierotipo) ed eterotipica (diretta nei confronti di diversi sierotipi) sembrano correlare meglio con la protezione rispetto ad alti livelli sierici di IgA RV-specifici nella malattia grave [Franco MA et al., 2006; Chibo S et al 1986; Velasquez FR et al., 2000].

La presenza di IgA sieriche riflette presubilmente la produzione di anticorpi intestinali. Dopo l'infezione primaria, la risposta anticorpale sierica neutralizzante nei confronti della VP7 è per lo più omotipica, mentre la risposta nei confronti di VP4 è eterotipica [Richardson SC et al 1993; Gorrel RJ et al 1999]. Dopo reinfezione si verifica un ampliamento della risposta neutralizzante nei confronti delle proteine VP7 dei diversi G tipi (risposta eterotipica) senza incremento di reazione crociata verso le proteine VP4 [Gorrel RJ et al 1999]. Molti RV di diverso G tipo esprimono altre proteine diverse da VP7 sierologicamente e genotipicamente identiche. Questo è dato dalla poca diversità tra i P-tipi, sottogruppi e genogruppi NSP4 rispetto ai diversi G-tipi circolanti nella popolazione [Gray J., et al., 2008]. L'importanza relativa della immunità omotipica ed eterotipica rimane sconosciuta, ma altre proteine virali, come VP2, VP6 e NSP4, potrebbero essere coinvolte nell'immunità e nella protezione, le quali potrebbero spiegare lo sviluppo in alcuni casi di immunità eterotipica in seguito a una singola infezione [Grimwood K and Lambert B., 2009].

In particolare, il possibile meccanismo di eliminazione di RV dall'organismo 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 MA et al., 2006]. È possibile che anticorpi anti-VP6 rappresentino una comune risposta alle caratteristiche altamente antigeniche delle particelle virali degradate o ai detriti cellulari delle cellule infettate e non contribuiscano alla immunità contro RV, anche se recenti studi su modelli animali suggeriscono che anticorpi VP6-specifici possano giocare un

ruolo nella immunità [Aiyegbo MS et al., 2013].

Se da un lato le IgA anti-VP4 e/o -VP7 possono bloccare l'infezione degli enterociti 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 JM et al., 1996 Franco MA et al., 2006]. Sfortunatamente esiste una povera correlazione tra anticorpi sierici e protezione indotta dal vaccino pertanto l'efficacia dei vaccini candidati deve essere verificata in estese sperimentazioni sul campo.

L'ubiquità dei RV e la frequenza di infezioni asintomatiche nei giovani animali è tale che è molto difficile distinguere se l'infezione e quindi la risposta immune sia primaria, secondaria o susseguente. La risposta immune degli anticorpi neutralizzanti nell'uomo e negli animali è presente sia a livello sierico che intestinale e sembra essere "sierospecifica" [Gaul SK et al., 1982; Snodgrass DR et al., 1984]. Tuttavia la durata del livello protettivo degli anticorpi è limitata (minore di un anno). Ciò darebbe spiegazione le reinfezioni osservate anche con lo 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.

Le infezioni sintomatiche avvengono tra tre mesi e due anni di età con un picco di incidenza tra il 7° e il 15° mese. Sebbene i bambini possano essere infettati più volte durante la loro vita, l'infezione dopo i primi tre mesi di vita è molto probabile causa di diarrea e disidratazione. Molte donne possiedono anticorpi anti-RV che passano per via trans-placentare al feto, proteggendo il neonato dall'infezione, ad eccezione dei nati pretermine, i quali hanno un rischio maggiore di contrarre la malattia, l'esposizione dei neonati a RV è associata a diminuita probabilità di sviluppare malattia durante l'infanzia. La maggior parte degli individui possiede anticorpi anti-RV dall'età dei tre anni [Kapikian AZ, 1974].

Le immunoglobuline G (IgG), trasferite dalla madre al feto attraverso la placenta, non sono protettive al contrario delle IgA che 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 DO, 1986].

Molti studi hanno riportato che l'immunità naturale produce una incompleta protezione ed esiste il dubbio che una precedente protezione non possa proteggere da una

reinfezione [Mata L et al., 1980; Bishop RF et al., 1983; Chiba S et al., 1986; Friedman MG et al., 1988; Reves RR et al., 1989; Clemens JD et al., 1992; Velasquez FR et al., 2000]. Un precedente studio che ha riportato la comparsa di malattia in seguito a reinfezione con lo stesso sierotipo, ha dimostrato che la protezione dall'infezione dura sei mesi e declina dopo un anno, in associazione con il declino del titolo anticorpale sierotipo-specifico [Chiba S et al., 1986]. Sebbene la reinfezione da RV sembra avvenire frequentemente, in un altro studio è stato dimostrato che la protezione di fronte all'infezione dura almeno un anno [Bishop RF et al., 1983; Bernstein DI et al., 1991; Ward and Bernstein, 1994]. E' stato anche dimostrato che neonati infettati nelle prime due settimane di vita sono protetti da malattia ma non da reinfezione [Bishop RF et al., 1983]. In altri studi ancora bambini che sviluppano infezione da RV nel primo anno risultano tutelati per l'anno successivo [Bernstein DI et al., 1991; Ward RL and Bernstein DI, 1994].

Dinamica dell'escrezione virale e risposta anticorpale

Nei pazienti con sistema immunitario normale l'infezione da RV si manifesta quasi sempre in forma acuta con eliminazione nelle feci di particelle virali in alta concentrazione 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-RV 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 che ne è precedentemente privo) 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 RV, 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 GP et al., 1983; Grauballe PC et al., 1981; Grinwood K, 1986].

IgM e IgA anti-RV 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 [Grinwood K, 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 si trovano più dopo 6 settimane. La loro persistenza è indice di successive infezioni sia sintomatiche che subcliniche [Grinwood K, 1986].

Diagnosi di laboratorio

La diagnosi di laboratorio dell'infezione da RV 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 (ME), impiegata fin dal 1973 per rilevare particelle virali nelle feci [Lecce JG et al., 1976], è ancora oggi utilizzata per la diagnosi rapida. I RV 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 RV di un particolare gruppo o sierotipo, è possibile ricorrere alla immunoelettromicroscopia (IEM) [Zissis G 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 saggi 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 monoclonali e/o policlonali [Yolken R et al., 1994], in genere RV di 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 RV 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 RV *in vitro* [Wyatt RG et al., 1983].

Nelle colture cellulari in genere i RV 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 V et al., 1977], i quali possono essere evidenziati mediante anticorpi specifici attraverso immunofluorescenza (IF) [Medici MC et al., 1988].

Per la diagnosi di infezione da RV 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 RV, 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 RV 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 RV 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 RV estratti da campioni di feci, denaturati al calore e immobilizzati su membrana di nitrocellulosa [Holmes IH 1983; Dimitrov DH et al., 1985]. Il metodo si è dimostrato specifico e sensibile.

Infine, per la diagnosi diretta di laboratorio dell'infezione da RV 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. Per la rivelazione di RV nelle feci l'RT-PCR è stata utilizzata per la prima volta utilizzando come bersagli di amplificazione un frammento della sequenza del gene 6 di RV di gruppo A [Patric M et al., 2003]. Metodi di RT-PCR sono maggiormente utilizzati per la genotipizzazione dei geni VP4 e VP7 mediante "set" di primer specifici per i diversi G e P tipi che più frequentemente infettano l'uomo. Lo svantaggio del metodo è legato

all'elevata variabilità genetica dei RV, 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 RV e la genotipizzazione dei RV 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 S et al., 2007] e saggi di PCR in tempo reale [Min BS et al., 2006; Gutiérrez-Aguirre I et al., 2008].

Per la dimostrazione di una risposta anticorpale conseguente l'infezione da RV e/o valutarne l'entità in un soggetto infettato possono essere impiegati l'IEM, la reazione di fissazione del complemento (RFC), l'IF, il saggio immunoenzimatico e l'inibizione dell'emoagglutinazione [Kapikian AZ, 1997; Shaw RD 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 G 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 AZ, 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

I rotavirus (RV) furono scoperti nei primi anni '70 da Ruth Bishop, che ossevò le particelle virali per la prima volta alla microscopia elettronica condotta su biopsia del duodeno di un bambino affetto da gastroenterite [Bishop RF et al., 1973] e vennero presto identificati come la maggior causa di gastroenterite nell'infanzia. Il virus fu chiamato RV per il suo aspetto a forma di ruota. Oggi i RV rimangono la sola causa più importante di gastroenterite nei pazienti pediatrici in tutto il mondo, più di tutti gli altri organismi virali, batterici e parassitari, ed è stimato che causano approssimativamente 450.000 morti annue, soprattutto nei paesi in via di sviluppo [Tate JB et al., 2008]. Si ritiene che ciascun bambino abbia contratto almeno una volta l'infezione da RV nei primi due anni e mezzo di vita nei paesi sviluppati sebbene un numero inferiore di soggetti manifesti diarrea tale da richiedere il ricovero in ospedale e intervento medico, incluse terapie di reidratazione [Ruggeri FM and Fiore L, 2012].

L'infezione da RV è ubiquitaria, causa gastroenterite nella maggior parte dei casi in forma moderata, ma può diventare anche severa con disidratazione, shock e morte.

La trasmissione di RV avviene per via fecale-orale ed è associata a passaggio interumano. Inoltre i RV possono essere veicolati da acqua, alimenti e concimi [Estes MK and Kapikian AZ, 2007; Sattar SA et al., 1984]. Il fatto che tutti i bambini vengano infettati nei primi anni di vita, in modo indifferente indipendente dall'area geografica e dalle condizioni socio-economiche indica che il miglioramento della qualità dell'acqua e del cibo, delle condizioni di igiene e comportamentali non limitano la diffusione del virus. Infine è ormai ampiamente documentata anche la trasmissione zoonotica dei RV. 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 S et al., 2007; Martella V et al., 2008; Tsugawa T and Hoshino Y, 2008].

I casi pediatrici di RV mostrano un andamento stagionale con un picco nei mesi più freddi e umidi nei paesi con clima temperato [Atchison C et al., 2010] che potrebbero causare una maggiore persistenza del virus nell'ambiente in particolari condizioni. RV è identificato nel 35-50% dei campioni di feci in bambini al di sotto dei 5 anni ricoverati con diarrea e ha una marcata stagionalità invernale. Il picco dei ricoveri per enterite da RV è tra 6 mesi e 2 anni di età, con il 40% dei casi in bambini di età inferiore a 1 anno.

I RV appartengono all'omonimo genere della famiglia *Reoviridae*. Essi sono di circa 70 nm con un capsido costituito da 3 strati che contiene un genoma a RNA segmentato a

doppio filamento comprendente 11 segmenti che codificano per 12 proteine. Il triplostrato è costituito sulla superficie esterna da due proteine (VP7 e VP4), lo strato intermedio da VP6, mentre VP2 forma il rivestimento interno che comprende anche le proteine VP1 e VP3. Sulla base della sequenza di VP6 il virus è classificato in 7 maggiori genogruppi, mentre sulla base delle sequenze di VP7 e VP4 i RV di gruppo A sono stati classificati secondo un sistema-binario che riconosce le specificità G e P, rispettivamente. Sono stati finora identificati 27 G-tipi e 37 P-tipi nell'uomo e negli animali [Matthjienssens J et al., 2008; Matthjienssens J et al., 2011; Trojnar E et al., 2013].

Globalmente G1P[8] è quello più diffuso ma circolano in prevalenza diversa anche 4 altri genotipi, G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] e oltre 50 combinazioni sono state riscontrate in diverse aree. Un aspetto di particolare rilevanza è l'elevata variabilità genetica dei RV [Gentsch JR et al., 2005]. Infatti, l'accumularsi di mutazioni puntiformi nel genoma (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 RV. 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.

Nonostante alcuni vincoli nella replicazione e diffusione di RV tra le diverse specie animali o tra gli esseri umani, trasmissioni interspecie e più specificatamente trasmissioni zoonosiche avvengono frequentemente, spesso associate a malattia nella specie eterologa [Martella V et al., 2010; Cook N et al., 2004]. Con il perfezionamento del sequenziamento e la genotipizzazione dell'intero genoma di RV è possibile identificare ceppi emergenti di origine animale, che possono diffondere rapidamente in tutto il mondo [Glass RI, 2006]. Ci sono prove che alcune specie animali possano giocare un ruolo fondamentale come serbatoio di ceppi di RV che infettano l'uomo.

Questi processi di "umanizzazione" in seguito a trasmissione zoonosica potrebbero portare a generare nuovi virus riassortanti.

E' noto che la replicazione di RV può non limitarsi al intestino. La gastroenterite da RV è talvolta complicata da febbre alta, elevati livelli di transaminasi [St Geme and Hyman D, 1988; Teitelbaum JE and Daghistani R, 2007], convulsioni [Contino MF et al., 1994; Kawano G, et al., 2007; Chung B, et al., 2007] ed encefaliti [Kirton A et al., 2005;

Hongou K et al., 1998] che possono essere causate di infezioni sistemiche. RNA di RV è stato rivelato nel liquido cerebrospinale di pazienti con convulsioni [Nishimura S et al., 1993]. Tuttavia non è chiaro se l'RNA sia presente nel sistema nervoso centrale. Inoltre diversi ricercatori hanno dimostrato l'antigene di RV non solo nel siero ma anche in molteplici organi, inclusi stomaco, intestino, fegato, milza, rene, pancreas, timo e vescica di animali infettati da RV [Crawford SE et al., 2006]. Questi ritrovamenti dimostrano che RV diffonda oltre l'intestino in bambini affetti da gastroenterite da RV, risultando in un'infezione virale sistemica.

A causa dell'elevato tasso di mortalità e dell'impatto economico nel mondo, strategie vaccinali per il controllo della malattia enterica e delle sue possibili complicanze sono state sviluppate attraverso lo sforzo congiunto di scienziati, industriali e autorità della salute pubblica già nei primi anni '90 [Desselberg U et al., 2006; Glass RI et al., 2006]. Due vaccini vivi attenuati (RotaTeq®, ditta Merck; Rotarix®, ditta GlaxoSmithKline) sono stati introdotti con successo in un numero crescente di paesi dal 2006, sono parte del programma vaccinale di routine in più di 47 paesi e raccomandati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità [Patel MM et al., 2012; Patel MM et al., 2011]. Sebbene siano uno monovalente (Rotarix®) e l'altro pentavalente (RotaTeq®), entrambi sembrano conferire protezione nei confronti dei principali genotipi cocircolanti nella popolazione umana [Jiang V et al., 2010]. Tuttavia è riconosciuto da molti ricercatori il pericolo che la somministrazione di tali vaccini su larga scala possa favorire l'emergenza di genotipi poco frequenti o rari, non inclusi nella formulazione del vaccino.

Lo scopo della ricerca, inserita nell'ambito di un progetto nazionale coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità, è stato quello di caratterizzare geneticamente i ceppi di RV circolanti nell'area di Parma nel periodo gennaio 2008-dicembre 2012 e nell'ambito di questi approfondire l'analisi genetica dei genotipi più frequenti come pure di quelli rari o atipici con lo scopo di indagare sulla loro origine e sui meccanismi che regolano la loro evoluzione anche attraverso il confronto con i ceppi vaccinali. Altro obiettivo della ricerca è stato quello di indagare sul potere patogeno di un ceppo rivelato in un caso di enterite infantile associata a manifestazioni neurologiche attraverso l'analisi genetica del ceppo.

MATERIALE E METODI

Campioni e pazienti

Nel periodo gennaio 2008 - dicembre 2012 3045 campioni di feci, appartenenti ad altrettanti bambini con gastroenterite ricoverati od osservati ambulatorialmente presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, sono stati sottoposti ad indagini virologiche a scopo diagnostico presso l'unità operativa di Virologia della stessa Azienda. . Le indagini virologiche sono state condotte mediante microscopia elettronica (ME), agglutinazione al lattice per la ricerca di adenovirus e RV (RV) di gruppo A (Orion Diagnostica, Finland), RT-nPCR per la ricerca di norovirus (NoV Oligomix Alert Kit, Nanogen Advanced Diagnostics) e coltura cellulare convenzionale per l'isolamento degli agenti virali citopatogeni [Medici MC et al., 2006]. Particelle reovirus-simili osservate alla ME sono state identificate mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide (PAGE) degli RNA genomici estratti dalle feci. Gli agenti citopatogeni sono stati identificati mediante ME, saggio di neutralizzazione dell'infettività virale, mediante pool di antisieri secondo Lim Benyesh-Melnick [Melnik JL et al., 1979, Melnik JL and Wimberly IL, 1985] o ME associata a elettroforesi in gel di poliacrilamide (PAGE) degli RNA genomici [Medici MC et al., 2004; Argangeletti MC et al., 2005]. I campioni di feci risultati positivi per particelle reovirus-simili alla ME e/o per RV di gruppo A all'agglutinazione al lattice sono stati sottoposti ad elettroforesi degli RNA genomici mediante PAGE per la determinazione dell'elettroferotipo (e-tipo) e a tipizzazione dei geni VP4 (P tipo) e VP7 (G-tipo). Dei ceppi di RV di particolare interesse sono stati analizzati oltre che i geni VP7 e VP4 anche i geni VP6, NSP3 e NSP4 e, quando necessario, di questi ceppi è stata condotta l'analisi della struttura secondaria e terziaria della proteina VP4.

Preparazione dei campioni di feci

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 minuti a 4°C in centrifuga Beckman J6MC (rotore TYJS 5200 rpm) (Beckman Coulter, USA) e a 9000 rpm per 30 min a 4°C in centrifuga Beckman L7-55 con rotore SW41 (Beckman Coulter). Della sospensione fecale

chiarificata un'aliquota è stata utilizzata per la ME, un'aliquota per l'agglutinazione al lattice, un'aliquota per l'estrazione degli acidi nucleici per la ricerca di norovirus mediante RT-PCR, un'aliquota per l'inoculazione in coltura cellulare convenzionale e un'aliquota infine è stata utilizzata subito per la determinazione dell'e-tipo e del P- e G-tipo oppure è stata conservata congelata a -20° C.

Microscopia elettronica

La ME è stata condotta come descritto in letteratura utilizzando metodiche standard [Whitby HJ et al., 1980]. In breve, la sospensione fecale (1,5 ml) parzialmente purificata è stata sottoposta ad ultracentrifugazione a 25000 rpm per 1 ora e 15 min a 4°C in centrifuga Beckman L7-55 con rotore SW41 (Beckman Coulter) e il sedimento è stato risospeso in 100 µl di PBS. Una goccia della sospensione del sedimento 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 effettuata utilizzando il microscopio elettronico Philips EM208S (Philips, Olanda) a ingrandimento 45000X [Medici MC et al., 2004].

Determinazione dell'e-tipo

Tre ml di sospensione fecale parzialmente purificata sono stati sottoposti a ultracentrifugazione, come descritto per la ME, e il sedimento, sospeso in 100 µl di PBS è stato sottoposto ad estrazione degli RNA genomici secondo il metodo di Herring e collaboratori [Herring AJ et al., 1982; Medici MC et al., 2004]. In breve: l'estratto fecale, concentrato e risospeso in 500 µl di una miscela di sodio acetato (10 µl), SDS al 20% (25 µl) e acqua (465 µl) 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 sopranatante, 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 di ceppi di collezione di RV 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 [Laemmli LK, 1970], in presenza di SDS (Tabella II). Per la corsa elettroforetica sono stati utilizzati vetri di dimensione 18,3 cm x 20 cm per il vetro grande e 16 cm x 20 cm per il vetro piccolo e l'apparecchio Protean II Xi2DCell (Bio-Rad, California, USA).

Tabella II. Composizione del gel di poliacrilamide

| GEL DI PRECORSA AL 4% | |
|---------------------------------------------|---------|
| Acrilamide 30% | 2,0 ml |
| Bis-acrilamide 1% | 2,6 ml |
| Tris 1,5 M pH 8,7 | 2,5 ml |
| H ₂ O | 8,0 ml |
| Degassare per 15 min 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 |
| Degassare per 15 min 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 Blu di Bromofenolo (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 Merril e collaboratori [Merril CR, 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 10 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

Per la determinazione del G- e P-tipo gli RNA genomici di RV sono stati estratti mediante guanidina tiocianato (GITC) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) e una preparazione commerciale di latte di silice (BIO101, Inc., California, USA) [Gentsch JR et al. 1992].

In breve, 500 µl di sospensione fecale parzialmente purificata sono stati ulteriormente 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. L'amplificazione è preceduta da una fase di 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 RT-PCR emineded che utilizza una coppia di primer per la prima amplificazione [Gentsch JR et al. 1992; Martella V, 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 JR et al., 1992; Iturriza-Gómara M et al., 2000].

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 III.

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

| 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® <i>Taq</i> HiFi Mix | | | |
| Con3 | + | 1 μ M | Gentsch JR et al., 1992 |
| Con2 | - | 1 μ M | |
| Acqua ultrapura | | | Roche Diagnostic |

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 μ l è stata trasferita in una provetta contenente 49 μ l di miscela di seconda amplificazione la cui composizione è riportata in Tabella IV.

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

| Componente | Senso/specificità | Dimensione amplicone (pb) | Concentrazione | Riferimento |
|--------------------------------|-------------------|---------------------------|-----------------|---------------------------------|
| desossinucleotidi | | | 0,2 mM ciascuno | Applied Biosystems |
| Tris HCl, pH 9 | | | 2 mM | |
| KCl | | | 1 mM | |
| Acido Etilendiaminotetracetico | | | 1 µM | Buffer 10X (Applied Biosystems) |
| DTT | | | 0,1 mM | |
| Tween 20 | | | 0,05% | |
| Glicerolo | | | 5% | |
| MgCl ₂ | | | 2 mM | Applied Biosystems |
| AmpliTaq®Gold | | | 1 U | |
| Primer Con3 | + | | 0,25 µM | |
| 2T-1 | -/P4 | 483 | 0,25 µM | Gentch JR et al 1992 |
| 3T-1 | -/P6 | 267 | 0,25 µM | |
| 1T-1 | -/P8 | 345 | 0,25 µM | |
| P8d | -/P8 | 345 | 0,25 µM | Iturriza-Gomara M 2000 |
| 4T-1 | -/P9 | 391 | 0,25 µM | Gentch JR et al 1992 |
| 5T-1 | -/P10 | 583 | 0,25 µM | |
| Acqua ultrapura | | | | Roche Diagnostic |

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 V et al., 1990; Gouvea V et al., 1993; Martella V et al., 2003b; Cunliffe NA et al., 1999; Das BK et al., 1994; Martella V et al., 2004; Banerjee I 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 V.

Tabella V. 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 | Gentsch JR et al., 1992 |
| End9 | - | 0,3 µM | Gouvea V et al., 1990 |
| End9deg | - | 0,3 µM | Martella V et al., 2003 |
| End9CRW8 | - | 0,3 µM | Gouvea V et al., 1990 |
| Acqua ultrapura | | | Roche Diagnostic |

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 VI.

Tabella VI. 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 | | | | |
| KCl | | | 1 Mm | |
| Acido Etilendiaminotetracetico | | | 1 μ M | “Buffer 10X” (Applied Biosystems) |
| DTT | | | 0,1 mM | |
| Tween 20 | | | 0,05% | |
| Glicerolo | | | 5% | |
| MgCl ₂ | | | 2 mM | Applied Biosystems |
| AmpliTaq®Gold | | | 1 U | |
| Primer Send9 | - | | 0,1 μ M | Martella V, oss. pers |
| Primer aBT1 | + / G1 | 749 | 0,1 μ M | |
| Primer aCT2 | + / G2 | 692 | 0,1 μ M | |
| Primer aDT4 | + / G3 | 374 | 0,1 μ M | Gouvea V et al., 1990 |
| Primer aDT4 | + / G4 | 583 | 0,1 μ M | |
| Primer aFT9 | + / G9 | 306 | 0,1 μ M | |
| Primer α FT9 α 3 | + / G9 | 306 | 0,1 μ M | Martella V et al., 2004 |
| Primer G12MiG | + / G12 | 514 | 0,1 μ M | Banerjee I et al., 2007 |
| Acqua ultrapura | | | | Roche diagnostic |

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).

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 VII.

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

| Componente | Senso | Concentrazione | Riferimento |
|---------------------------|--------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------|
| desossinucleotidi | | 0,2 mM ciascuno | "SuperScript™ One-Step RTPCR for Long Templates" (Invitrogen) |
| MgSO ₄ | | 1,2 mM | |
| RT/Platinum® Taq HiFi Mix | | | |
| VP6F | + | 1 µM | Iturriza-Gómara M et al. 2002 |
| VP6R | - | 1 µM | |
| Acqua ultrapura | | | Roche Diagnostic |

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

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 VIII.

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

| 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 10Beg16 | + | 1 µM | Lee CN et al., 2000 |
| Primer 10End722 | - | 1 µM | |
| Acqua ultrapura | | | Roche Diagnostic |

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.

Analisi filogenetica di ceppi G1P[8]

Ceppi di RV di genotipo G1P[8] selezionati in modo random tra quelli identificati nel periodo 2008-2011 sono stati sottoposti ad analisi dei geni VP7 e VP4 unitamente a ceppi G1P[8] di collezione identificati nel periodo 2004-2005 e analogamente selezionati in modo random dei quali erano disponibili le relative sequenze. Per l'analisi filogenetica i prodotti di amplificazione sono stati sequenziati e confrontati con ceppi disponibili in GenBank.

Analisi filogenetica di ceppi G4P[8]

Ceppi di RV G4P[8] identificati nel periodo 2008-2012 sono stati sottoposti ad analisi di sequenze nucleotidiche dei geni VP7 e VP4 unitamente a ceppi G4P[8] di collezione identificati nel periodo 2004-2005 dei quali erano disponibili le relative sequenze. L'analisi è stata condotta a confronto con ceppi di riferimento disponibili in GenBank.

Analisi filodinamica del gene VP4 di ceppi di specificità P[8]

Sono stati selezionati campioni di feci contenenti RV di specificità P[8] associata a diverse specificità G. La selezione è stata fatta in base al numero di ceppi P[8] rivelati ogni anno nell'ambito dei periodi 1987-90, 2004-05 (già genotipizzati in precedenti studi e le sospensioni fecali conservate congelate a -20°C presso l'unità operativa di virologia) e gennaio 2008-settembre 2012 (779 ceppi) genotipizzati durante il periodo di studio e appartenenti alla collezione dell'unità operativa di Parma e nel periodo 2006-2007 (40 ceppi), in cui la sorveglianza della circolazione dei RV non era stata condotta ma ne erano state conservate le sospensioni fecali. Gli acidi nucleici estratti dai campioni sono stati sottoposti all'amplificazione di una sequenza di 1200 pb del gene VP4 di RV. Sulla base della qualità della sequenza VP4 sono stati scelti i ceppi rappresentativi che sono stati sottoposti ad analisi filodinamica mediante ricostruzione filogenetica Bayesiana che è stata condotta utilizzando il metodo di Markov Chain Monte Carlo con il software BEAST.

Purificazione

I prodotti di amplificazione sono stati purificati utilizzando il kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN, Hilden, Germany) secondo le condizioni fornite dal produttore. In breve, il frammento di DNA visualizzato sotto forma di banda è stato ritagliato dal gel di agarosio e la porzione del gel ritagliata è stata raccolta in una provetta da 1,5 ml, pesata e addizionata di 3 parti di tampone contenente guanidina tiocianato (QG) per ogni parte di gel ritagliato (100 mg di gel corrispondenti a ~100 µl). Il campione è stato quindi incubato per 10 minuti a 50°C per agevolare lo scioglimento del gel, agitando la provetta su "vortex mixer" ogni 2-3 minuti e successivamente è stato addizionato di 1 volume di isopropanolo e centrifugato per 1 minuto a 12.000-14.000 rpm.

Posizionata una colonnina QIAquick in una provetta da 2 ml, il campione è stato trasferito nella colonnina e centrifugato per 1 minuto a 12.000-14.000 rpm. Scartato il liquido dal fondo della provetta e riposizionata la colonnina nella provetta da 2ml, al campione sono stati aggiunti 0,3 ml di tampone QG e il campione è stato centrifugato di nuovo per 1 minuto a 12.000-14.000 rpm. Terminata la centrifugazione, il campione è stato lavato aggiungendo 0,7 ml di tampone contenente etanolo, che favorisce

l'allontanamento dei sali contaminanti, e dopo 5 minuti lo stesso è stato centrifugato di nuovo per 1 minuto alla stessa velocità. Il liquido sul fondo della provetta è stato scartato e il campione centrifugato per altri 5 minuti ancora alla stessa velocità. Infine, posizionata la colonnina in una nuova provetta da 1,5 ml, il DNA è stato eluito con l'aggiunta di 30 μ l di tampone contenente Tris-Cl 10mM, pH 8,3.

Quantificazione degli ampliconi purificati da gel

Per la quantificazione del cDNA amplificato 8 μ l di acido nucleico purificato è stato fatto migrare su gel d'agarosio al 2%. La corsa elettroforetica è stata condotta in tampone TAE 1% per 120 V per 35 min. Come indicatore di pesi molecolari sono stati caricati sullo stesso gel, in un pozzetto dedicato, 4 μ l Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Foster City, CA), costituito da una miscela equimolare di sei frammenti quantificati di 2.000, 1.200, 800, 400, 200 e 100 pb.

La quantificazione è stata condotta confrontando l'intensità della banda elettroforetica del prodotto di amplificazione purificato con quelle dell'indicatore di peso molecolare delle quali sono fornite dalla ditta produttrice le relative quantità espresse in ng (200, 120, 80, 40, 20 e 10 ng di DNA, rispettivamente). Sulla base del peso dell'amplificato di interesse calcolato per confronto è stato valutato il numero di μ l contenenti 9 ng di prodotto per ogni 100 pb di amplificato. Al volume di amplificato calcolato è stato aggiunto 1 μ l di primer alla concentrazione di 9 pMoli e acqua ultrapura fino a raggiungere il volume di 15 μ l come richiesto per il successivo sequenziamento.

Sequenziamento ed analisi filogenetica

Gli ampliconi quantificati sono stati sequenziati in entrambe le direzioni secondo la chimica dei "dye-terminator" in sequenziatore automatico "ABI PRISM 3700 DNA Sequencer" (Applied Biosystems, Foster City, CA), impiegando gli stessi primer utilizzati nell'amplificazione. Il sequenziamento è stato commissionato alla ditta Ylichron, Roma, Italia. L'analisi di sequenza e filogenetica dei geni VP4, VP6, VP7 e NSP4 è stata condotta mediante allineamento multiplo mediante il programma MEGA versione 5 [Tamura K et al., 2011]. La distanza genetica è stata calcolata usando il

metodo Kimura2 parameter a livello nucleotidico e l'albero filogenetico è stato costruito usando il metodo neighbor-joining con 1000 bootstrap repliche.

Analisi della struttura secondaria e terziaria di VP4

L'analisi della struttura secondaria e terziaria della proteina VP4 è stata condotta mediante i software GenThreader e memsat2 del programma bioinformatico PSIPRED SERVER sulla sequenza aminoacidica dedotta dal gene VP4. La proteina VP4 di riferimento (struttura secondaria) è stata scaricata dal file Protein data bank PDB in PSIPRED SERVER. Il "modelling" della proteina è stato eseguito con il programma SWISSpdbViewer v3.7. La predizione della struttura secondaria per VP4 è stata ottenuta utilizzando Secondary Structure Prediction Method (SOPM) sul sito Pole Bio-Informatique Lyonnais (Network Protein Sequence @nalysis).

RISULTATI

Studio epidemiologico-molecolare

Nel periodo gennaio 2008-dicembre 2012 nell'area di Parma la prevalenza complessiva di infezione da rotavirus (RV) in bambini con enterite è stata del 14,61% (445 casi su 3045 esaminati) variando dal 15,84 % (96/606) nel 2010/606 all'11,63% (82/705) nel 2012 (Tabella IX).

In questi soggetti RV è stato rivelato da solo in 379 casi (85,16%, pari all'12,44% dei casi complessivamente esaminati) e in associazione con norovirus in 57 casi (12%, pari a 1,8% dei casi complessivamente esaminati), con adenovirus in 8 casi (1,79%, pari a 0,26% dei casi complessivamente esaminati) e con enterovirus in 1 caso (0,2%, pari a 0,03% dei casi complessivamente esaminati). Inoltre nei soggetti esaminati sono stati rivelati norovirus in 368 casi (12,08%), adenovirus in 143 casi (4,6%), enterovirus in 35 casi (1,1%), calicivirus in 1 caso (0,03%), come pure norovirus in associazione ad adenovirus in 14 casi (0,26%), a enterovirus in 6 casi (0,19%) e a reovirus in 1 caso (0,03%).

Tabella IX. Distribuzione dei virus rivelati in bambini con enterite nel periodo gennaio 2008-dicembre 2012

| Anno | N° bambini saggianti | N° bambini positivi per | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | RV | NoV | AdV | EV | ReoV | HCaV | RV+ NoV | NoV+ AdV | RV+ AdV | NoV+ EV | RV+ EV | ReoV+N oV |
| 2008 | 586 | 75 (12.8%) | 101 (17.2%) | 14 (2.4%) | 5 (0.9%) | 1 (0.2%) | 0 | 19 (3.2%) | 4 (0.7%) | 2 (0.3%) | 1 (0.2%) | 0 | 0 |
| 2009 | 551 | 78 (14.2%) | 74 (13.4%) | 28 (5%) | 8 (1.5%) | 0 | 0 | 10 (1.8%) | 3 (0.6%) | 0 | 1 (0.2%) | 0 | 0 |
| 2010 | 606 | 83 (13.7%) | 79 (13%) | 33 (5.4%) | 6 (1%) | 0 | 0 | 13 (2.1%) | 1 (0.2%) | 1 (0.2%) | 2 (0.3%) | 0 | 0 |
| 2011 | 597 | 76 (12.7%) | 59 (9.8%) | 23 (3.9%) | 2 (0.3%) | 0 | 1 (0.2%) | 4 (0.7%) | 1 (0.2%) | 2 (0.3%) | 0 | 0 | 0 |
| 2012 | 705 | 67 (9.5%) | 55 (7.3%) | 45 (6.38%) | 14 (1.9%) | 7 (1%) | 0 | 11 (1.56%) | 5 (0.7%) | 3 (0.42%) | 2 (0.28%) | 1 (0.14%) | 1 (0.14%) |
| Totale | 3045 | 379 (12.44%) | 368 (12.08%) | 143 (4.6%) | 35 (1.1%) | 8 (0.26%) | 1 (0.03%) | 57 (1.8%) | 14 (0.45%) | 8 (0.26%) | 6 (0.19%) | 1 (0.03%) | 1 (0.03%) |

NoV: norovirus; RV: rotavirus; AdV: adenovirus; EV: enterovirus; ReoV: reovirus, HCaV: calicivirus osservato alla ME

La distribuzione mensile dell'infezione da RV nei bambini con enterite (Figura XIV) ha mostrato che il virus ha raggiunto ogni anno il picco di infezione nei mesi invernali (39%: febbraio 2008; 37,3%: marzo 2010; 41,4%: gennaio 2011; 34,32%: febbraio

2012), eccetto nel 2009 (aprile: 2009, 30,88%).

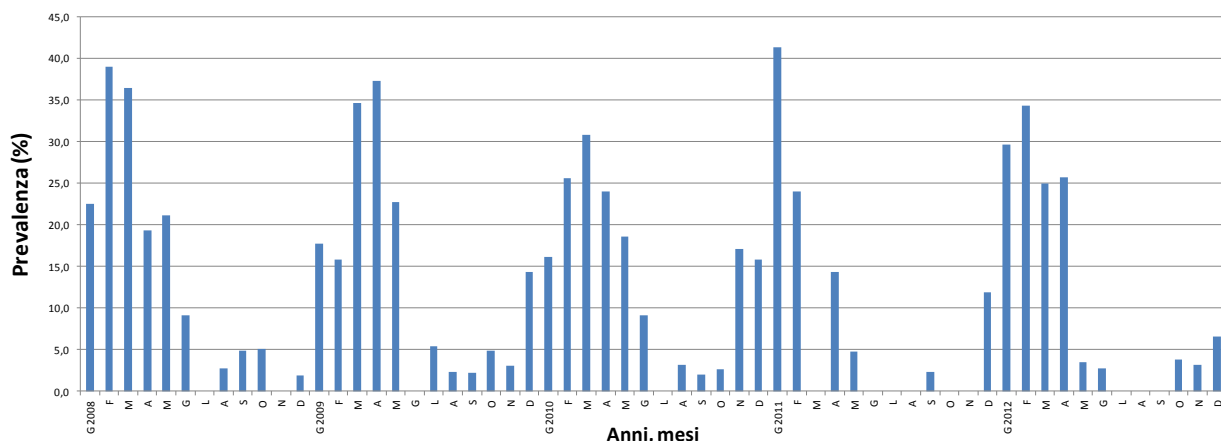


Figura XIV. Distribuzione mensile delle prevalenze di infezione da rotavirus rivelate in bambini con enterite, gennaio 2008-dicembre 2012.

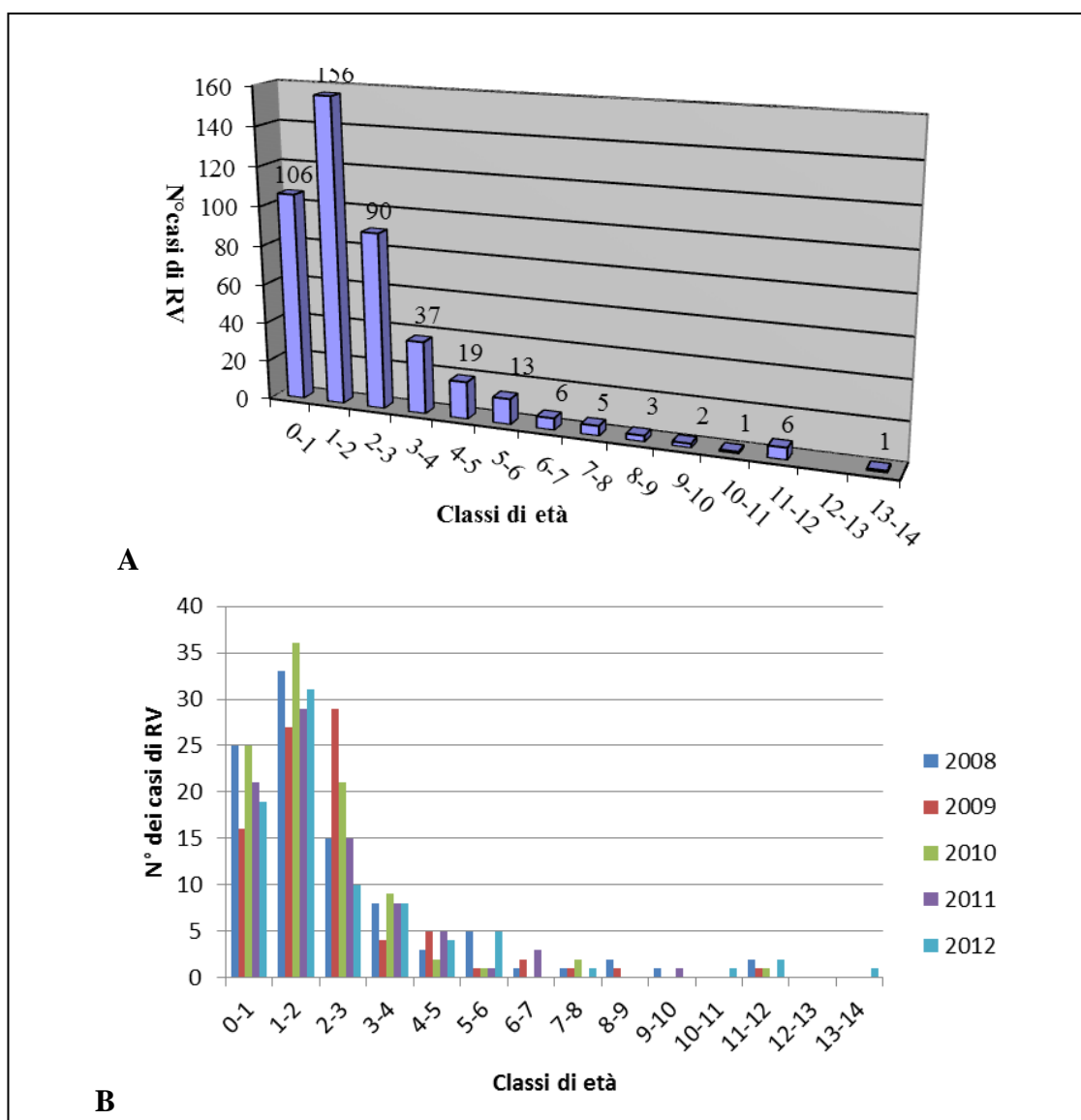


Figura XV. Distribuzione per classi di età dei bambini affetti da gastroenterite da rotavirus nell'area di Parma nel periodo gennaio 2008-dicembre 2012 (A) e in ciascuno degli anni della sorveglianza (B).

La distribuzione per classi di età dei bambini affetti da gastroenterite da RV ha dimostrato che il maggior numero di casi si è verificato nei bambini di età compresa tra 1-2 anni (156 casi, 35,05%) seguito dalla classe di età 0-1 anni (106 casi, 23,82%) (Figura XV-A).

La distribuzione annuale dei bambini con enterite da RV per classi di età ha confermato che la classe di età più colpita dall'infezione è stata 1-2 anni in tutti gli anni tranne il 2009, quando la maggiore frequenza di bambini con enterite è stata riscontrata nella classe di età 2-3 anni. Nessun caso è stato osservato nei bambini di età compresa tra 12 e 13 anni in nessuno degli anni della sorveglianza (Figura XV-B).

L'elettroforesi degli RNA genomici estratti dai 445 campioni di feci positivi per RV ha dato un profilo elettroforetico interpretabile in 428 casi (96,17%, 428/445). Da 17 campioni (3,14%, 17/445) infatti non è stato possibile ottenere un profilo elettroforetico analizzabile. Tutti i 428 profili elettroforetici ottenuti sono risultati appartenere a RV di gruppo A., dei quali il 88,55% (379/428) era lungo, il 10,98% (47/428) era corto; inoltre, in un caso (0,23%, 1/428) è stato osservato un profilo superlungo e in un caso (0,23%, 1/428) un profilo con bande sovrannumerarie (Tabella XVI e Figura XVI).

Tabella XVI. Profilo elettroforetico relativo ai 445 ceppi di rotavirus umano di gruppo A in bambini afferenti ai reparti di pediatria dell'ospedale di Parma nel periodo gennaio 2008-dicembre 2012.

| Profilo elettroforetico | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | Totale |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| Lungo | 67 | 69 | 94 | 82 | 67 | 379 |
| Corto | 15 | 18 | 2 | 1 | 11 | 47 |
| Superlungo | | | | | 1 | 1 |
| > 11 bande | | | | | 1 | 1 |
| Negativo | 14 | | 1 | | 2 | 6 |
| Totale | 96 | 87 | 97 | 83 | 82 | 445 |

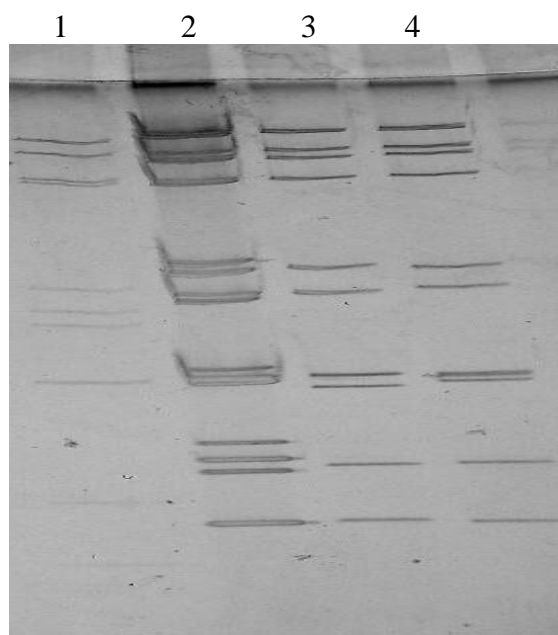


Figura XVI. Profili elettroforetici in gel di poliacrilamide di rotavirus rivelati da feci di bambini con enterite. Profilo 1: profilo superlungo; profilo 2: profilo con bande sovrannumerarie; profili 3-4: profili lunghi.

La genotipizzazione condotta sui 445 campioni positivi per RV ha rivelato nel 65,61% ceppi G1P[8] (292 ceppi), nell'8,76%, ceppi G4P[8] (39 ceppi), nel 4,26%, ceppi G3P[8] (19 ceppi), nel 4,04% ceppi G2P[4] (18 ceppi), nel 2,47% ceppi G9P[8] (11 ceppi) e nello 0,22% ceppi G1P[4] (Tabella XVII). Inoltre sono stati rivelati ceppi G3P[4], G3P[6], G6P[9], G8P[14] e G10P[14] in 1 caso (0,22%) ciascuno. Infine 59 (13,25%) ceppi erano riconducibili a combinazioni G/P-tipo multiple (Tabella XVIII).

Tabella XVII. Distribuzione annuale dei genotipi di rotavirus rivelati in bambini con gastroenteriti nel periodo gennaio 2008-dicembre 2012 nell'area di Parma

| G tipo/P tipo | 2008 | | 2009 | | 2010 | | 2011 | | 2012 | | Totale | |
|--------------------------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|---------------|------|
| | No | % | No | % | No | % | No | % | No | % | No | % |
| G1P[4] | | | | | | | | | 2 | 2,43 | 2 | 0,44 |
| G1P[8] | 65 | 67,7 | 37 | 42 | 69 | 71,1 | 80 | 96,4 | 41 | 50,6 | 292 | 65,6 |
| G2P[4] | 1 | 1 | 10 | 11,4 | 1 | 1,03 | 1 | 1,2 | 5 | 6,1 | 18 | 4,04 |
| G3P[4] | | | | | 1 | 1,03 | | | | | 1 | 0,22 |
| G3P[6] | | | | | 1 | 1,03 | | | | | 1 | 0,22 |
| G3P[8] | | | 6 | 6,81 | 4 | 4,12 | | | 9 | 10,8 | 19 | 4,26 |
| G6P[9] | | | | | | | | | 1 | 1,21 | 1 | 0,22 |
| G4P[8] | 2 | 2,1 | 9 | 10,2 | 19 | 19,6 | | | 9 | 10,8 | 39 | 8,76 |
| G9P[8] | 6 | 6,3 | 5 | 5,68 | | | | | | | 11 | 2,47 |
| G8P[14] | 1 | 1,13 | | | | | | | | | 1 | 0,22 |
| G10P[14] | 1 | 1,13 | | | | | | | | | 1 | 0,22 |
| G\P tipi multipli | 22 | 22,9 | 19 | 21,6 | 2 | 2,06 | 2 | 2,38 | 14 | 17,1 | 59 | 13,3 |
| Totale | 96 | | 88 | | 97 | | 83 | | 81 | | 445 | |

Tabella XVIII. Distribuzione dei rotavirus con specificità G e/o P multipla identificati in bambini con gastroenteriten nell'area di Parma nel periodo gennaio 2008-dicembre 2012

| Genotipi | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | Totale |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| G1G2G3P[8] | | | 1 | | | 1 |
| G1G2G4P[8] | 1 | | | | | 1 |
| G1G2G9P[4] | 1 | | | | | 1 |
| G1G3G4P[8] | | | | | 1 | 1 |
| G1G2G9P[8][4] | 1 | | | | | 1 |
| G1G2P[4] | 8 | 4 | 1 | | 1 | 14 |
| G1G2P[4]P[6] | 1 | 1 | | | | 2 |
| G1G2P[4]P[8] | 2 | | | | | 2 |
| G1G4P[8] | 1 | 1 | | | 3 | 5 |
| G1G9P[4]P[8] | 1 | 1 | | | | 2 |
| G1G9P[8] | 3 | | | | | 3 |
| G1P[8][4] | | | | 1 | 1 | 2 |
| G1P[8]P[6] | | 1 | | | | 1 |
| G2G1P[8] | 2 | | | 1 | | 3 |
| G2G3P[4] | | 2 | | | | 2 |
| G2G4P[4] | | | | | 1 | 1 |
| G2G4P[8] | | | | | 1 | 1 |
| G2G4P[8]P[6] | | 1 | | | | 1 |
| G2G9P[4] | | 1 | | | | 1 |
| G2G9P[4]P[6] | | 1 | | | | 1 |
| G2P[4]P[6] | | 2 | | | | 2 |
| G2P[8]P[6] | | 1 | | | | 1 |
| G3G4P[8][4] | | | | | 1 | 1 |
| G3G9P[8] | | | | | 2 | 2 |
| G3P[4][6] | | 1 | | | | 1 |
| G3P[8][4] | | | | | 2 | 2 |
| G3P[8][6] | | | | | 1 | 1 |
| G4G9P[8] | 1 | 1 | | | | 2 |
| G9P[6][8] | | 1 | | | | 1 |
| Totale | 22 | 19 | 2 | 2 | 14 | 59 |

Sulla base delle associazione genetiche tra G/P tipo e/o e-tipo nel 2008 erano state osservati 22 ceppi riconducibili a 11 combinazioni inusuali/multiple: G1G2G4P[8] e-tipo lungo, G1G2G9P[4]P[8] e-tipo corto, G1G2P[4] e-tipo corto, G1G2P[4]P[6] e-tipo corto, G1G2P[4]P[8] e-tipo non identificabile, G1G2P[8] e-tipo lungo, G1G2G9P[4] e-tipo lungo e G1G9P[8]P[4] e-tipo corto, G1G4P[8] e-tipo lungo, G1G9P[8] con e-tipo lungo (Tabella XIX), oltre a due ceppi G1P[8] con e-tipo corto (ceppi non mostrati in tabella).

Tabella XIX. Distribuzione di 41 rotavirus rivelati nel periodo gennaio 2008-dicembre 2009 riconducibili a combinazioni di G/P tipo e/o e-tipo inusuali o atipiche

| Genotipi | 2008 | | | 2009 | | |
|---------------|-----------------|-----------|----------|-----------------|----------|---|
| | elettroferotipo | | | elettroferotipo | | |
| | L | C | N | L | C | N |
| G1G2G3P[8] | | | | | | |
| G1G2G4P[8] | | | 2 | | | |
| G1G2G9P[4] | | 1 | | | | |
| G1G3G4P[8] | | | | | | |
| G1G2G9P[8][4] | | 1 | | | | |
| G1G2P[4] | | 8 | | 1 | 3 | |
| G1G2P[4]P[6] | | 1 | | | 1 | |
| G1G2P[4]P[8] | | | 2 | | | |
| G1G4P[8] | | 1 | | 1 | | |
| G1G9P[4]P[8] | | 1 | | 1 | | |
| G1G9P[8] | 2 | | | | | |
| G1P[8][4] | | | | | | |
| G1P[8]P[6] | | | | 1 | | |
| G2G1P[8] | 2 | | | | | |
| G2G3P[4] | | | | | 2 | |
| G2G4P[4] | | | | | | |
| G2G4P[8] | | | | | | |
| G2G4P[8]P[6] | | | | 1 | | |
| G2G9P[4] | | | | | 1 | |
| G2G9P[4]P[6] | | | | 1 | | |
| G2P[4]P[6] | | | | | 2 | |
| G2P[8]P[6] | | | | 1 | | |
| G3G4P[8][4] | | | | | | |
| G3G9P[8] | | | | | | |
| G3P[4][6] | | | | 1 | | |
| G3P[8][4] | | | | | | |
| G3P[8][6] | | | | | | |
| G4G9P[8] | 1 | | | 1 | | |
| G9P[6][8] | | | | 1 | | |
| Totale | 5 | 13 | 4 | 10 | 9 | |

L: lungo; C: corto; N: negativo

Allo stesso modo nel 2009, 19 ceppi erano riconducibili a 14 combinazioni inusuali: G1G2P[4] e-tipo corto, G1G2P[4] e-tipo lungo, G1G2P[4][6] e-tipo corto, G1G4P[8] e-tipo lungo, G1P[6][8] e-tipo lungo, G2G3P[4] e-tipo corto, G2G9P[4] e-tipo corto, G2P[4]P[6] e-tipo corto, G2G4P[6]P[8] e-tipo lungo, G3P[4]P[6] e-tipo lungo, G4G9P[8] e-tipo lungo, G9P[6]P[8] e-tipo lungo, G2G9P[4]P[6] e-tipo lungo e G2P[8][6] e-tipo lungo e G1G9P[4]P[8] e-tipo lungo (Tabella XIX), oltre a 2 ceppi G1P[8] con e-tipo corto (non mostrati in tabella).

Data l'elevata frequenza di associazioni genetiche inusuali G/P-tipo e/o e-tipo circolanti nel periodo 2008-2009, per ognuna delle combinazioni identificate è stato selezionato

un ceppo rappresentativo e sono state analizzate le relative sequenze di VP6 e NSP4, per verificare se questi ceppi potessero essere il risultato di un fenomeno di riassortimento oppure potessero essere riconducibili ad una duplice infezione.

L'analisi delle sequenze nucleotidiche di VP6 a confronto con quelle di ceppi prototipi SGI e SGII, ha rivelato che i ceppi del 2008 e del 2009 con e-tipo corto, escludendo il ceppo G1P[8] selezionato dei due rivelati nel 2009, erano ascrivibili al SGI e tutti i ceppi e-tipo lungo erano SGII.

L'analisi della sequenza nucleotidica di NSP4 a confronto con le sequenze dei ceppi prototipi di NSP4 di tipo A, B, C e D ha rivelato il genogruppo A in tutti i ceppi con e-tipo corto, tranne che nel ceppo G1P[8] con e-tipo corto selezionato tra i due circolanti nel 2008 che è risultato di genogruppo B. Inoltre la stessa analisi ha rivelato il genogruppo B in tutti i ceppi con e-tipo lungo. Infine è risultato anche che il ceppo G1G2P[4] analizzato presentava 100% di identità nucleotidica con i ceppi bovini RUBV81 e R4/HARYANA.

Analisi filogenetica di ceppi di rotavirus con specificità G1P[8]

Allo scopo di approfondire la caratterizzazione dei ceppi di RV G1P[8], che hanno rappresentato il genotipo maggiormente circolante nel periodo di sorveglianza (2008-2012), è stata condotta l'analisi filogenetica dei geni VP7 e VP4 di questi ceppi con l'intento anche di indagare sulla loro origine e rendere ragione della loro elevata prevalenza.

A tale scopo una selezione di ceppi (6 ceppi per l'analisi del gene VP7, 8 per l'analisi del gene VP4) è stata sottoposta a sequenziamento genico e le sequenze sono state analizzate mediante allineamento multiplo e analisi filogenetica a confronto con ceppi G1P[8] rivelati nella stessa area durante un periodo di sorveglianza precedente relativo agli anni 2004 e 2005 (2 ceppi per VP7, 2 per VP4) e dei quali erano disponibili le sequenze geniche.

Da tale analisi è emerso che per il gene VP7 tutti i ceppi appartenevano a lignaggio I (Figura XVII). In particolare i ceppi rivelati nel 2010 e 2011 appartenevano al sublignaggio Ia, mentre di 2 ceppi relativi al 2008 uno apparteneva al sublignaggio Ic e uno al sublignaggio Id. L'analisi delle sequenze aminoacidiche dedotte del gene VP7 condotta confrontando i ceppi del 2010-2011 con quelli rivelati negli altri periodi ha evidenziato 3 sostituzioni a livello della regione antigenica A: 86-Phe→Ser; 88-Arg→Gln; 90-Glu→Gly.

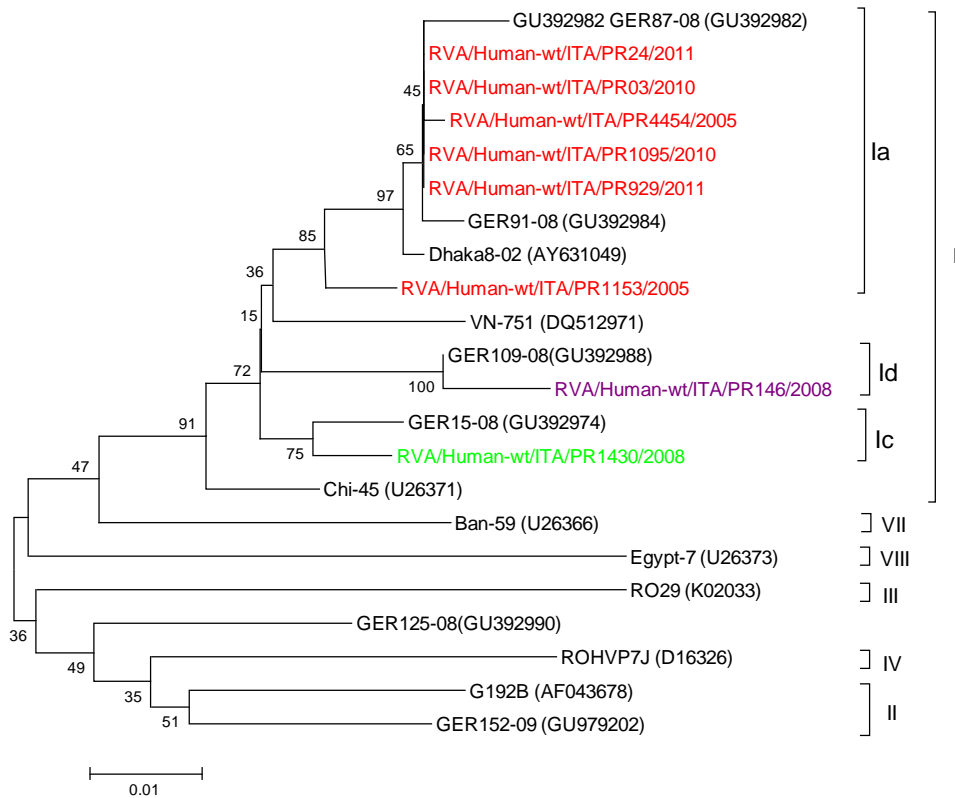


Figura XVII. Albero filogenetico del gene VP7 di rotavirus con specificità G1P[8] dei ceppi circolanti a Parma nel periodo 2004-2005 e 2008-2011 a confronto con ceppi disponibili in GenBank. I codici GenBank sono riportati tra parentesi.

L'analisi del gene VP4 ha rivelato che tutti i ceppi appartenevano al lignaggio P[8]-III distinti in diversi cluster genetici (Figura XVIII). Non sono state riscontrate sostituzioni aminoacidiche significative.

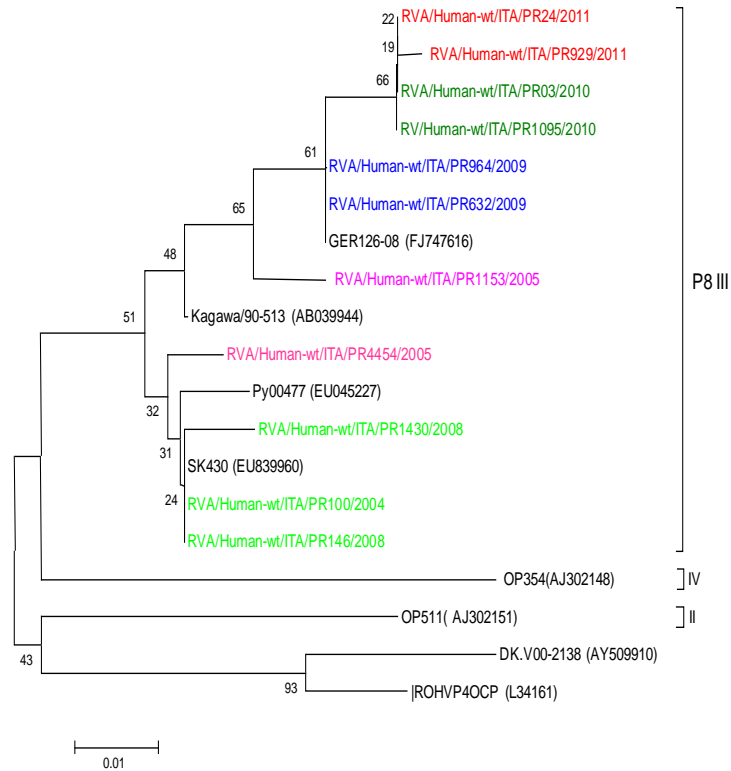


Figura XVIII. Albero filogenetico del gene VP4 di rotavirus con specificità G1P[8] rivelati a Parma nel periodo 2004-2005 e 2010- 2011 a confronto con ceppi della stessa specificità disponibili in GenBank. I codici GenBank sono riportati tra parentesi.

Di particolare interesse è stata l'osservazione che il ceppo RVA/human-wt/ITA/PR1153/2005/G1P[8] segregava in un nodo separato sia all'analisi del gene VP7, nell'ambito del sublignaggio Ia, sia all'analisi del gene VP4, nell'ambito del lignaggio P[8]-III.

Analisi filogenetica di ceppi G4P[8] circolanti nell'area di Parma

La sorveglianza della circolazione dei genotipi di RV in casi di enterite pediatrica nell'area di Parma durante gli anni 2008-2012 ha mostrato oltre ad una significativa predominanza di ceppi G1P[8], marcate fluttuazioni della prevalenza di altri genotipi, specialmente G4P[8]. In particolare, la prevalenza di infezione di questi ceppi è oscillata dal 2,7% nel 2008 al 19,79% nel 2010, confermando quanto già osservato negli anni 2004 (13/83, 15,66%) e 2005 (2/188, 1,06%) nella stessa area. Per comprendere se variazioni genetiche potevano avere influenzato la circolazione di questi ceppi, 26 (48,14%) ceppi di RV G4P[8] rappresentativi dei 54 complessivi che sono stati identificati nei periodi 2004-2005 e 2008-2012, sono stati sottoposti all'analisi dei geni VP4 e VP7. Nell'albero filogenetico sono stati inseriti a confronto oltre alla sequenze dei ceppi prototipi anche quelle dei ceppi vaccinali.

L'analisi filogenetica della sequenza VP7 di 24 ceppi di cui è stato possibile generare una sequenza di sufficiente qualità, ha dimostrato che essi segregavano nel lignaggio Ic con profili di segregazione diversi per ogni anno (Figura XIX).

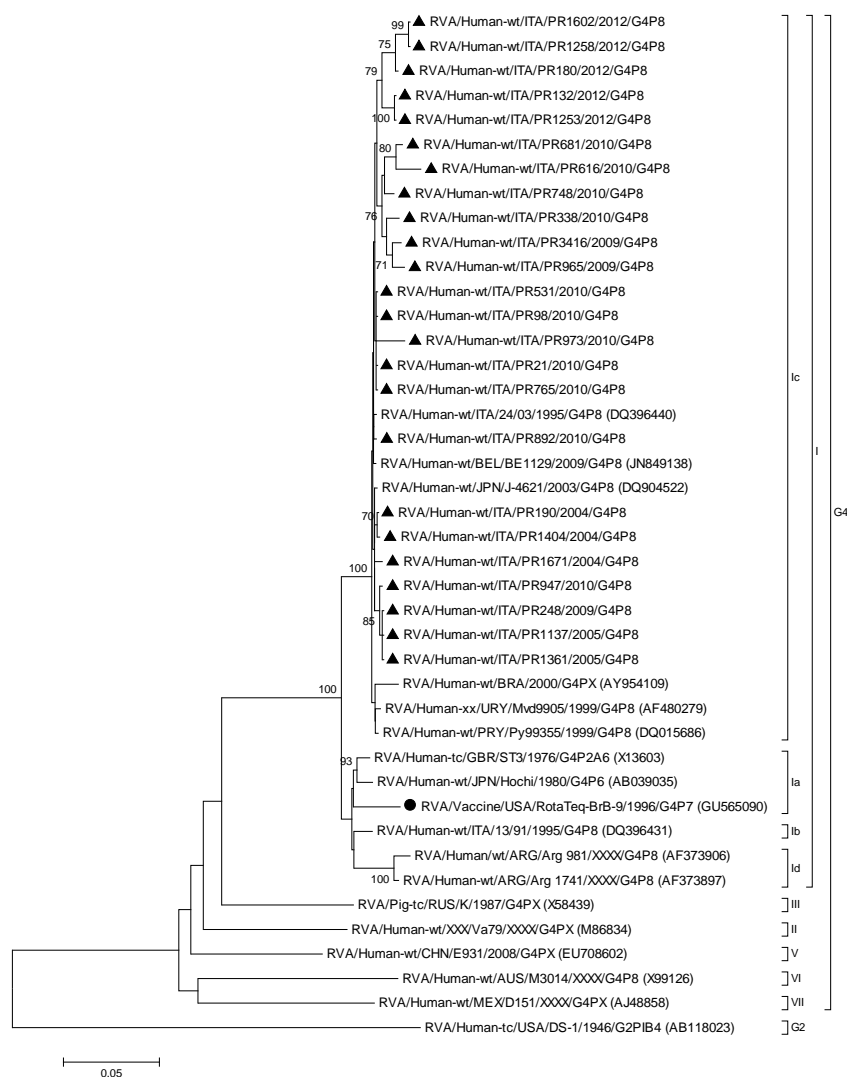


Figura XIX. Analisi filogenetica della sequenza nucleotidica del gene VP7 dei ceppi G4P[8] di rotavirus circolanti nei periodi 2004-2005 e 2008-2012 nell'area di Parma indicati con un triangolo a confronto con ceppi della stessa specificità disponibili in GenBank. . La sequenza VP7 presente nel vaccino RotaTeq è indicata da un cerchio. I codici d'accesso GenBank sono riportati in parentesi.

Dall'analisi filogenetica del gene VP4 è emerso che tutti i 26 ceppi considerati appartenevano al lignaggio P[8]-III con profili di segregazione simili a quelli osservati all'analisi del gene VP7 (Figura XX).

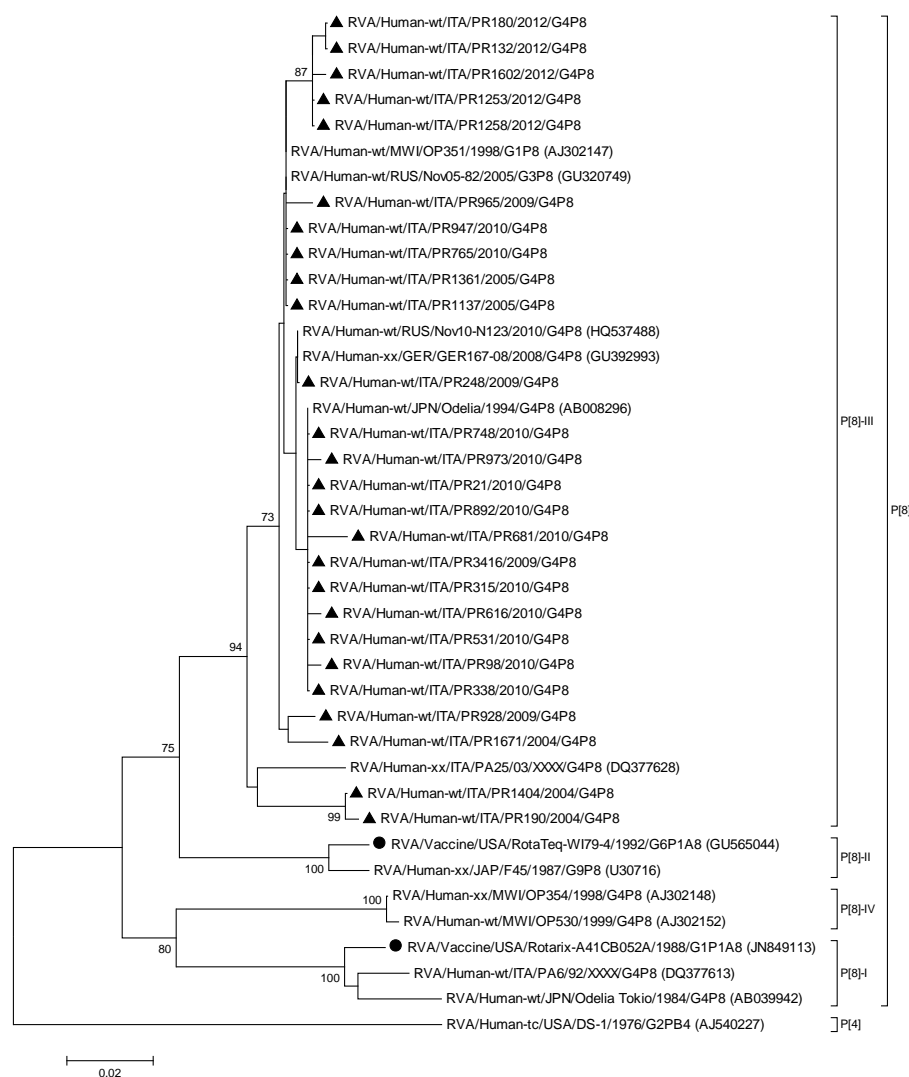


Figura XX. Analisi filogenetica della sequenza nucleotidica del gene VP4 di ceppi G4P[8] di rotavirus circolanti nei periodi 2004-2005 e 2008-2012 nell'area di Parma indicati con un triangolo a confronto con ceppi della stessa specificità disponibili in GenBank. Le sequenze VP4 presenti nei vaccini di Rotarix e RotaTeq sono indicati da un cerchio. I codici GenBank sono riportati in parentesi.

Di 3 ceppi relativi al 2004, 2 apparivano raggruppati in un cluster distinto da quello dai rimanenti ceppi analizzati (1 relativo allo stesso anno e 23 relativi agli anni 2005, 2008-2012) con 4-5% di differenza nucleotidica.

Inoltre tutti i ceppi segregavano in un lignaggio diverso da quello del vaccino pentavalente RotaTeq all'analisi del gene VP7 e da quello dei vaccini RotaTeq e Rotarix all'analisi del gene VP4.

L'analisi delle sequenze aminoacidiche dedotte di 24 dei 26 ceppi G4P[8] selezionati per l'analisi genetica, condotta a confronto con il ceppo prototipo ST3 (X13603), ha dimostrato una inserzione (76-Asn) e diverse sostituzioni aminoacidiche (131-

Asp→Glu, 143-Arg→Lys, 145-Val→Lys, 238Asn→Asp e 239-Ile→Val) (Figura XXI).

| | VR4 (aa 65-76) | VR6 (aa 120-133) | VR7 (aa 141-150) | | VR9 (aa 235-242) | |
|-------------------------------------------|----------------|------------------|------------------|-----|------------------|-----|
| | 76 | 131 | 143 | 145 | 238 | 239 |
| RVA/Human-tc/GBR/ST3/1976/G4P2A6 (X13603) | - | D | R | V | N | I |
| RVA/Human-wt/ITA/2004/G4P[8] | N | E | K | T | D | V |
| RVA/Human-wt/ITA/2005/G4P[8] | N | E | K | T | D | V |
| RVA/Human-wt/ITA/2009/G4P[8] | N | E | K | T | D | V |
| RVA/Human-wt/ITA/2010/G4P[8] | N | E | K | T | D | V |
| RVA/Human-wt/ITA/2012/G4P[8] | N | E | K | T | D | V |

Figura XXI. Sostituzioni aminoacidiche delle regioni variabili della proteina VP7 (VR 4, 6, 7 e 9) di 5 ceppi di rotavirus rappresentativi di quelli circolanti nell'area di Parma nei vari anni di studio, a confronto con il ceppo prototipo ST3 (X13603). L'inserzione è indicata da (-).

Le sequenze aminoacidiche dedotte del gene VP4, a confronto con quella del ceppo prototipo OP351 (AJ302147) ha rivelato numerose sostituzioni aminoacidiche nella subunità VP8*, come mostrato in Figura XXII.

| | VP4 gene (VP8* subunit aa 71-204) | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------------|-----------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 86 | 96 | 114 | 136 | 137 | 143 | 145 | 148 | 155 | 160 | 173 | 174 | 178 | 179 | 195 |
| RVA/Human-xx/MWI/OP351/1998/G4P8 (AJ302147) | T | S | N | D | K | M | R | S | R | S | R | V | H | G | D |
| RVA/Human-wt/ITA/PR190/2004 | N | C | D | Y | N | . | . | . | . | . | . | I | . | . | N |
| RVA/Human-wt/ITA/PR1404/2004 | N | C | D | . | . | . | . | . | . | . | . | I | . | . | N |
| RVA/Human-wt/ITA/PR1671/2004 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR1361/2005 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR1137/2005 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR248/2009 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR928/2009 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR3416/2009 | . | . | . | H | . | . | I | T | . | P | T | P | P | A | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR965/2009 | . | . | . | H | . | . | I | T | . | P | T | P | P | A | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR21/2010 | . | . | . | H | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR98/2010 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR315/2010 | . | . | . | H | N | L | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR338/2010 | . | . | . | H | N | L | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR765/2010 | . | . | . | H | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR531/2010 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR616/2010 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR681/2010 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR748/2010 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR892/2010 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR947/2010 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR973/2010 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR132/2012 | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR180/2012 | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR1253/2012 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR1258/2012 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| RVA/Human-wt/ITA/PR1602/2012 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |

Figura XXII. Sostituzioni aminoacidiche della proteina VP4 (residui aa 86-195 della subunità VP8*) di 26 rotavirus di genotipo G4P[8] circolanti nell'area di Parma. Sono indicate le sostituzioni aminoacidiche a confronto con il ceppo prototipo OP351 (AJ302147); gli aminoacidi conservati sono indicati da un punto.

Il confronto della sequenza aminoacidica dedotta del gene VP7 dei ceppi G4 circolanti nell'area di Parma con quella del ceppo G4 (BrB-9) contenuto nel vaccino RotaTeq, ha dimostrato che essi presentavano 4 sostituzioni aminoacidiche a livello degli epitopi neutralizzanti 7-1a (130-Asp→Asn), 7-1b (211-Asp→Asn) e 7-2 (143-Arg→Lys; 145-Ala→Thr). Sette sostituzioni sono state invece trovate sulle sequenze aminoacidiche dedotte del gene VP4 dei ceppi P[8]-III circolanti nell' area di Parma, quando confrontate con il ceppo vaccinale Rotarix (codice GenBank: JN849113) nella epitopo neutralizzante 8-1 (146-Ser→Gly; 190-Ser→Asn; 195-Asn→Asp; 196-Asn→Gly) e 8-2 (125-Ser→Asn; 131-Ser→Arg; 135-Asn→Asp). A confronto con il ceppo vaccinale RotaTeq (codice GenBank: GU585044) le stesse hanno mostrato 5 sostituzioni aminoacidiche a livello degli epitopi neutralizzanti 8-1 (146-Ser→Gly; 195-Asn→Asp; 196-Asn→Gly) e 8-2 (131-Ser→Arg; 135-Asn→Asp).

Analisi filodinamica del gene VP4 di ceppi di specificità P[8]

La sorveglianza dei genotipi di RV nell'area di Parma nel periodo gennaio 2008-dicembre 2012 ha messo in evidenza la continua predominanza della circolazione dei ceppi di specificità P[8] in combinazione con diversi G-tipi circolanti con diverse prevalenze negli anni, confermando l'osservazione già avanzata in relazione ai periodi di sorveglianza precedenti condotti nella stessa area e relativi ai periodi gennaio 1987-dicembre 1990 (57,74%, 41/71) e gennaio 2004-dicembre 2005 (91,98%, 249/271)

Per indagare se le fluttuazioni delle prevalenze osservate nel corso degli anni e la continua predominanza dei RV con specificità P[8] potessero dipendere da possibili variazioni genetiche, 81 ceppi, selezionati in base alla qualità della sequenza VP4 generata e rappresentativi di quelli circolanti nei vari anni, sono stati sottoposti ad analisi filodinamica.

L'analisi filodinamica di una sequenza di 780 nucleotidi del gene VP4 di ceppi P[8] associati a diversi G tipi, quali G1, G3, G4 e G9, ha dimostrato che essi appartenevano tutti al lignaggio P[8]-III, nell'ambito del quale erano suddivisi in due raggruppamenti maggiori organizzati in molteplici sublignaggi, ognuno comprendente sequenze di ceppi circolanti in un anno diverso (Figura XXIII).

La ricostruzione del percorso evolutivo dei ceppi P[8]-III ha rivelato, inoltre, l'origine comune dei vari sublignaggi in un comune ceppo ancestrale comparso nei primi anni 1970 e ha permesso di calcolare un tasso di mutazione di $3,04 \times 10^3$ ($2,15-3,94 \times 10^3$) riferito agli ultimi 25 anni (1987-2012).

In particolare, nel dendrogramma si distinguevano sublignaggi comprendenti sequenze con discreta variabilità genetica appartenenti a ceppi circolanti negli anni contraddistinti da una maggior prevalenza (sublignaggi A, B, C, H, I, J associati a G1 negli anni 2004, con prevalenza 67,5%, 2008, con prevalenza 67,7%, 2010, con prevalenza 71,1%, 2011 con prevalenza 96,3%; sublignaggio a associato a G3 nell'anno 2005, con prevalenza 16%; sublignaggi V, W, Y associati a G4 negli anni 2004, con prevalenza 15,7%, 2009, con prevalenza 10,3%, 2010, con prevalenza 19,6% e 2012, con prevalenza 6%; sublignaggi v, w, x associati a G9 nell'anno 2005, con prevalenza 41,48%) e sublignaggi comprendenti sequenze con una più alta omologia nucleotidica, appartenenti a ceppi circolanti negli anni contraddistinti da una minor prevalenza (sublignaggi D, E, F, I associati a G1 negli anni 2005, con prevalenza 32% e 2009, con prevalenza 42%; sublignaggi b-e associati a G3 negli anni 2009, con prevalenza 6,8%, e 2010, con prevalenza 4,1%; sublignaggi X, Z associati a G4 negli anni 2005, con prevalenza 0,5%, e 2008, con prevalenza 2,1%; sublignaggio y associato a G9 nell'anno 2009, con prevalenza 2,1%).

In Figura XXIV è mostrata la distribuzione dei sublignaggi P[8]-III in relazione alla prevalenza di circolazione dei ceppi di rotavirus G1P[8], G3P[8], G4P[8] e G9P[8].

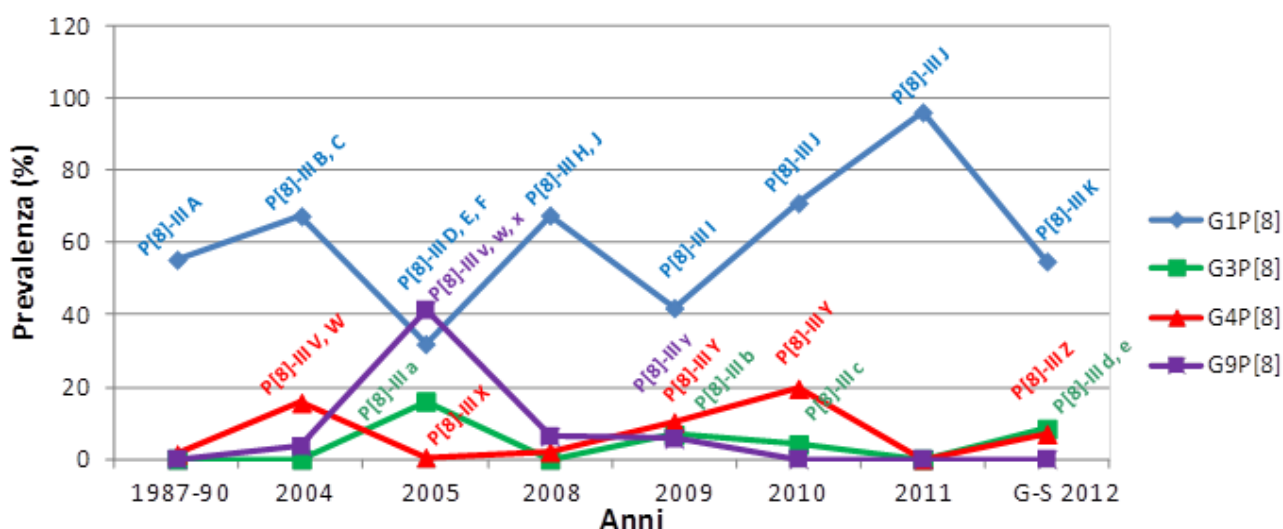


Figura XXIV. Distribuzione dei sublignaggi P[8]-III in relazione alla prevalenza di circolazione dei ceppi di rotavirus G1P[8], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] nell'area di Parma nei periodi 1987-1990, 2004- 2005 e gennaio 2008-settembre 2012. **A-K**: sublignaggi associati a G1; **a-d**: sublignaggi associati a G3; **V-Z**: sublignaggi associati a G4; **v-y**: sublignaggi associati a G9.

Caratterizzazione molecolare di un ceppo di rotavirus di gruppo A rivelato in una bambina con gastroenterite da rotavirus associata a meningismo

Nell'ambito dei ceppi genotipizzati nel 2008 è stato identificato un ceppo di RV G1P[8] con e-tipo lungo rivelato nelle feci di una bambina di poco più di 2 anni e tre mesi di età, affetta da gastroenterite associata a meningismo. La bambina sottoposta a indagini diagnostiche microbiologiche e virologiche su diversi materiali biologici aveva rivelato solo RV nelle feci attraverso l'indagine convenzionale di ME e mediante PAGE degli RNA genomici.

Il ceppo, denominato PR267/08/M, è stato analizzato nei geni NSP3, NSP4 oltre che nei geni VP4 e VP7 a confronto con le sequenze di 6 ceppi con lo stesso genotipo ed e-tipo di bambini affetti da sola gastroenterite rivelati localmente nello stesso periodo e di 2 ceppi di riferimento disponibili in GenBank. L'analisi delle sequenze aminoacidi che dedotte dei geni VP4, VP7, NSP3 e NSP4 del ceppo PR267/08/M a confronto con gli altri ceppi ha dimostrato: 1) nella sequenza NSP4 la sostituzione dell'aminoacido glutammico (E) con lisina (K) in posizione 167 (E167K) all'interno della regione 161-175 del sito di legame della particella virale allo stato bilaminare della cellula durante la sua morfogenesi (Figura XXV) e 2) nella sequenza VP4 la sostituzione dell'aminoacido istidina (H) con asparagina (N) in posizione 202 (H202N) all'interno della regione ipervariabile (aa 71-204) della sub unità VP8* della proteina VP4, nota contenere gli epitopi antigenici (Figura XXVI).

Nessuna sostituzione è stata invece osservata nella sequenza aminoacidica dedotta del gene VP7 del ceppo PR267/08/M.

Per quanto riguarda l'analisi del gene NSP3, escludendo 2 ceppi con 100% di identità, il ceppo PR267/08/M rispetto ai rimanenti 4 dei ceppi rivelati in bambini con gastroenterite utilizzati nel confronto ha mostrato 2 sostituzioni aminoacidiche non conservative, una a livello del dominio di dimerizzazione (aa 150-206) in posizione 186 e consistente nell'inserimento dell'aminoacido leucina (L) al posto di glutamina (Q) (L186Q) e l'altra in posizione 305 a livello del dominio di legame del fattore eucariotico di inizio della traduzione eIF4G1 (aa 206-315) e consistente nella sostituzione di arginina (R) con glutamina (Q) (Figura XXVII).

| | | | | | | | | | |
|------------|------|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| PR267/08/M | [11] | LADLNYT ¹⁶⁷ LSV | ITLMNDTLHS | IIQDPGMAYF | PYIASVLTVL | FTLHKASIPT | MKIALKTSKC | SYKVIKYCIV | TIINTLLKLA |
| PR2/08 | |N. | | | | | | | |
| PR91/08 | | | | | | | | | |
| PR146/08 | | | | | | | | | |
| PR217/08 | | | | | | | | | |
| PR245/08 | | | | | | | | | |
| PR427/08 | | | | | | | | | |
| PR561/08 | | | | | | | | |V..... |
| PR603/08 | | | | | | | | | |

| | | REGIONE DI INDUZIONE DELLA DIARREA | | | | ISVD | | | |
|------------|--|---------------------------------------|------------|-------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------------|
| PR267/08/M | | GYKEQVTTKD | EIEQQMDRIV | KEMRRQLEMI | DKLTTREIEQ | VELLKRIHDN | LITRPVDIVD | MTKEFNQKNI | KTLDWENGK |
| PR2/08 | | | | |S..... | | |M..... |S..... |
| PR91/08 | |I..... | |D..... | |VK...VI.. | ..S..... |S..... |S..... |
| PR146/08 | | | | | |A.VI.. | ..S..... |S..... |S..... |
| PR217/08 | | | |D..... | |AK...VI.. | ..S..... |S..... |S..... |
| PR245/08 | | | | | | | | | |
| PR427/08 | | | | | | | | | |
| PR561/08 | | | | | |TI..... | | | |
| PR603/08 | | | | | |A.VI.. | ..S..... |S..... |S..... |

| | | 167 | DLPBS | |
|------------|--|-------------|-------|-------|
| PR267/08/M | | NPYKPIEVTA | SM | [175] |
| PR2/08 | | ...E..... | .. | |
| PR91/08 | | ...E.S..... | .. | |
| PR146/08 | | ...E.S..... | .. | |
| PR217/08 | | ...E.S..... | .. | |
| PR245/08 | | | .. | |
| PR427/08 | | | .. | |
| PR561/08 | | ...E..... | .. | |
| PR603/08 | | ...E.S..... | .. | |

Figura XXV: Allineamento della sequenza aminoacidica dedotta del gene NSP4 di un rotavirus (PR267/08/M) rivelato in una bambina affetta da gastroenterite e meningismo con quella di rotavirus circolanti localmente in bambini affetti solo da gastroenterite. Le sostituzioni aminoacidiche non conservative osservate e le relative posizioni sono evidenziate in rosa. Le linee al di sopra degli allineamenti indicano i domini funzionali della proteina NSP4: regione di induzione della diarrea (aa 114-135), dominio variabile interspecie (interspecies variable domain, ISVD, aa 135-146), sito di legame della particella virale bilaminare (double-layered particle-binding site, DLPBS, aa 161-175).

| | | | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| PR267/08/M | GSEKTQNVTV | NPGPFAQTRY | APVNWGHGEI | NDSTTVEPIL | DGPYQPTTFT | PPTDYWILIN | SNTNGVVYES | TNNSDFWTAV |
| PR217/08 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| PR245/08 | | | | | | | | |
| PR427/08 | | | | | | | | |
| PR561/08 | | | | |S..... | | | |
| | | | | | | | | |
| PR267/08/M | IAVEPHVNPV | DRQYNVFGEN | KQFNVRNDS | KWKFLEMFRG | SSQNDFYNRR | TLTSDTRLVG | ILKYGGRIWT | FHGETPRATT |
| PR217/08 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| PR245/08 | | | | | | | | |
| PR427/08 | | | | | | | | |
| PR561/08 |D..... | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| PR267/08/M | DSSSTANLNG | ISITINSEFY | IIPRSQESKC | NEYINNGLPP | IQNTRNVVPL | SLSSRSIQYT | RAQVNEDITI | SKTSLWKEMQ |
| PR217/08 | ----- | ---H--- | | | |K | | |
| PR245/08 | | | | | | | | |
| PR427/08 | | | | | | | | |
| PR561/08 | ...N..... | ...H--- | | | |K | | |
| | | | | | | | | |
| PR267/08/M | YNRDIIRFK | FGNSIIKLG | LGWKWSEISY | KAANYQYNYL | RDGEQVTAHT | TCSVNGVNNF | SYNGGSLPT | |
| PR217/08 | | ...V... | | | | | | |
| PR245/08 | | | | | | | | |
| PR427/08 | | | | | | | | |
| PR561/08 | | | | | | | | |

202



FiguraXXVI: Allineamento della sequenza aminoacidica dedotta del gene VP4 di un rotavirus (PR267/08/M) rivelato in una bambina affetta da gastroenterite e meningismo con quella di rotavirus circolanti localmente in bambini affetti solo da gastroenterite. Le sostituzioni aminoacidiche non conservative osservate e le relative posizioni sono evidenziate in rosa.

```

PR267/08/M      SIINTSFEAA VVAATSTLEL MGIQYDYNEI FTRVKSFDY VMDDSGVKNN LLGKAITIDQ ALNGKFGSAI RNRNWMTDSK TVAKLDEDVN
PR146/08      .....
PR217/08      .....V.....
PR245/08      .....
PR427/08      .....
PR561/08      .....V.....
PR603/08      .....V.....
-----
                                DOMINIO DI DIMERIZZAZIONE                                186
-----
PR267/08/M      KLRMTLSSKG IDQKMRVINA CFSVKRIPGK SSSIICKTRL MKDKIERGEV EVDDSYVDEK MEIDTIDWKS RYDQLEKRFE SLKLRVTEKY
PR146/08      .....
PR217/08      .....
PR245/08      .....
PR427/08      .....
PR561/08      .....
PR603/08      .....
-----
                                DOMINIO DI LEGAME DEL eIF4G1
-----
PR267/08/M      NTWVQKAKKV NENMYSLQNV ISQQQNQIAD LQQYCNKLEA DLQGKFSSLV SSVEWYLRSM ELPDDVKNDI EQQLNSIDLI NPINAIDDIE
PR146/08      .....
PR217/08      .....
PR245/08      .....
PR427/08      .....
PR561/08      .....
PR603/08      .....S.....
-----
                                305
-----
PR267/08/M      SLIRNLIQDY DRTFLMLKGL LKRCNYEYAC
PR146/08      .....
PR217/08      .....VY.....
PR245/08      .....
PR427/08      .....
PR561/08      .....
PR603/08      .....Y.....

```

Figura XXVII. Allineamento della sequenza aminoacidica dedotta del gene NSP3 di un rotavirus (PR267/08/M) rivelato in una bambina affetta da gastroenterite e meningismo con quelle di rotavirus circolanti localmente in bambini affetti da sola gastroenterite. Le sostituzioni aminoacidiche non conservative osservate e le relative posizioni sono evidenziate in rosa. Le linee al di sopra degli allineamenti indicano i domini strutturali e funzionali della proteina NSP3: linea continua (aa 150-206), dominio di dimerizzazione; linea tratteggiata (aa 206-315), dominio di legame del fattore eucariotico di inizio della traduzione eIF4G1.

Inoltre il ceppo PR267/08/M ha mostrato l'83,3% di identità nucleotidica e l'89,3% di similarità aminoacidica con un ceppo di RV di scimmia rhesus (RRV, N° accesso GenBank: AY065842) e 78,3% di identità e 85,7% di similarità aminoacidica con il ceppo di RV di scimmia SA11-C14 (N° di accesso GenBank: AY065843).

Allo scopo di verificare se la sostituzione aminoacidica in posizione 202 poteva avere ripercussioni sulla struttura secondaria e terziaria della proteina e quindi sulla conformazione della parte più esposta del capsido virale coinvolta nel legame con il recettore cellulare è stata realizzata la struttura secondaria e terziaria della VP4. La struttura secondaria della proteina VP4 del ceppo PR267/08/M, ottenuta attraverso i programmi bioinformatici PSIPRED e SOPM, è apparsa costituita da random coil seguiti da extended strand e α -eliche. Mediante il programma bioinformatico GenThreading è stata identificata la struttura terziaria di riferimento di VP4, ossia quella che aveva maggior omologia nella sequenza amminoacidica e nella struttura secondaria con quelle dedotte dalla sequenza nucleotidica del gene VP4 del ceppo PR267/08/M. La struttura di riferimento della VP4 è risultata sovrapponibile con quella del ceppo Wa di RV (codice di accesso Protein data Bank: *2dwr*) che aveva un'identità aminoacidica del 91,2% con la VP4 del ceppo PR267/08/M nella regione aminoacidica 71-204 in cui cadeva la sostituzione di interesse. La ricostruzione mediante programma bioinformatico SwissPdbViewer, della struttura terziaria della proteina VP4 del ceppo Wa *2dwr* di RV, assunto come modello, e nel quale è stata inserita la la sostituzione aminoacidica osservata nella sequenza 39-198 del ceppo PR267/08/M non ha dimostrato alcun cambiamento significativo nella configurazione della proteina (Figura XXVIII).

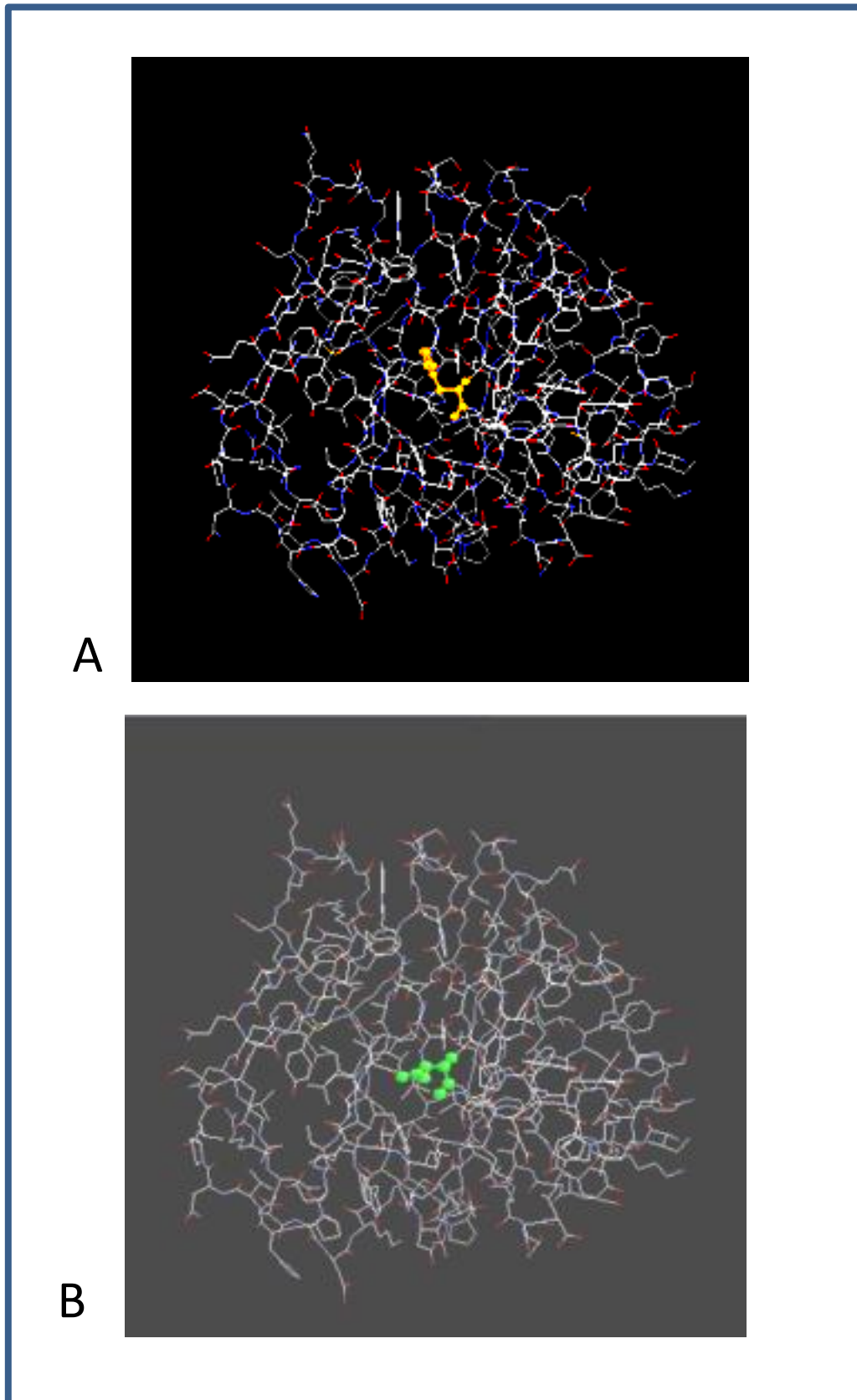


Figura XXVIII. Struttura terziaria della proteina VP4 del ceppo WA assunto come modello contenente la sostituzione aminacidica 202-H→N osservata nel ceppo di rotavirus iPR267/08/M rivelato in una bambina affetta da gastroenterite e meningismo (A) e quella originale del ceppo di riferimento Wa (B). Il residuo aminoacidico in posizione 202 evidenziato in b) è mutato in a).

DISCUSSIONE

Nel periodo gennaio 2008-dicembre 2012 la prevalenza annuale di infezione da rotavirus (RV) in bambini con enterite ricoverati od osservati ambulatorialmente presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma è variata dal 15,84% nel 2010 (96/606 bambini) al 11,63% (82/705 bambini) nel 2012.

Solitamente ogni anno numerosi ceppi circolano in una determinata area e di anno in anno alcuni ceppi prevalgono su altri [Banyai K et al., 2011]. Tra questi G1P[8] è riportato nella letteratura internazionale essere quello maggiormente diffuso sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo [Arora R et al., 2011]. Anche a Parma nel periodo di sorveglianza il genotipo maggiormente frequente è stato G1P[8] con una prevalenza complessiva del 65,61% (292 ceppisu 445 ceppi identificati) confermando quanto già osservato negli anni 1986-2004 in Sicilia [Arista S et al., 2006], nella stessa area di Parma nel 1987-1990 (55,41%) [Medici MC et al., 2007a] e nel 2004-2005 (42,8%) [Medici MC et al., 2007b] e negli ultimi decenni a livello mondiale [Gentsch JR et al 2005; Santos N et al., 2005, Arora R and Chitambar SD, 2011].

Oltre G1P[8] i genotipi di RV maggiormente circolanti nell'area di Parma nel periodo 2008-2012 sono stati G4P[8] nel 8,74% (39 casi), G3P[8] nel 4,26% (19 casi), G2P[4] nel 4,04% (18 casi) e G9P[8] nel 2,47% (11 casi). Inoltre sporadicamente hanno circolato ceppi con combinazioni rare: G1P[4] nel 0,44% (2 casi) e nello 0,22% ciascuno (1 caso) ceppi G3P[4]; G3P[6]; G6P[9]; G8P[14] e G10P[14].

La fluttuazione dei genotipi tipi di RV osservate negli anni in questo periodo di studio (G1P[8]: prevalenza compresa tra 42-96%, G2P[4]: 2,1-11,4%, G3P[8]: 4,2-10,8%, G4P[8]: 2,1-19,2%) potrebbe rappresentare un meccanismo atto a ridurre la pressione immunitaria specifica e rientra nelle caratteristiche peculiari di RV sottolineando l'importanza del continuo monitoraggio dei genotipi circolanti.

Infine in relativa alta frequenza (13,3%) hanno circolato anche ceppi con combinazioni di specificità G e/o P multiple e/o inusuali (29 combinazioni rivelate in 59 ceppi). È ragionevole ipotizzare che gli stipiti G1G2P[4] e-tipo corto, SGI NSP4 A, G1G2P[4] e-tipo lungo SGII NSP4 B, G1G2P[8] e-tipo lungo SGII NSP4 B, G2G3P[4] e-tipo corto SGI NSP4 A, G4G9P[8] e-tipo lungo SGII NSP4 B, dei quali è stata condotta anche la caratterizzazione di VP6 e di NSP4 (dati non mostrati) possano essere considerati frutto di un riassortimento tra ceppi appartenenti a genogruppi diversi a carattere poliallelico nel gene VP7, mentre il ceppo G3P[4]P[6] e-tipo lungo SGII NSP4 B possa invece

rappresentare un riassortante intergenogruppo a carattere polialelico per il gene VP4. Virus con doppia reattività nei geni VP7 e VP4 sono già stati identificati e proposti come virus mosaico [Page NA et al, 2004] generati in caso di coinfezione della stessa cellula da parte di due ceppi l'uno DS-1-simile e l'altro Wa-simile, durante l'assemblaggio del virione progenie che acquisisce in questa fase un gene in più. Su questo argomento, un'interessante teoria proposta da Gouvea e Brantly [Gouvea V and Brantly M, 1995] suggerisce che ciascuno stivato di RV esista nel soggetto infettato come una popolazione eterogenea di riassortanti e relative varianti alleliche. Tale ipotesi, riflettendo il moderno concetto di quasi specie proposto per i virus ad RNA, spiegherebbe le complesse dinamiche evolutive dei RV. McDonald e collaboratori [McDonald SM et al., 2009] hanno messo in discussione il significato dei ceppi riassortanti intergenogruppo ritenendo, sulla base di evidenze emergenti, che alcune costellazioni genomiche potrebbero diminuire lo stato di "benessere" del virus. In particolare essi ipotizzano che i virus riassortanti siano incapaci di competere con i ceppi parentali. La selezione naturale dei ceppi contenenti geni che operano meglio se tenuti insieme potrebbe limitare la rivelazione degli "shift" genetici che avvengono durante l'evoluzione di RV. In altre parole, i RV devono bilanciare i vantaggi derivati dal riassortimento genico con gli svantaggi derivati dalla presenza di combinazioni di geni/proteine sfavorite.

Questa osservazione è in contrasto con quella generalmente riportata per il virus dell'influenza A per il quale è evidente un riassortimento continuo con limitate evidenze di linkage genetico tra i segmenti genici per quei virus che infettano specie animali comuni.

In campo internazionale il riassortimento intergenogruppo è riconosciuto come un evento raro anche per il fatto che esiste un'associazione favorita tra i geni di uno stesso genogruppo ovvero un "linkage genetico" dovuto alla pressione selettiva intrinseca delle proteine virali durante l'assemblaggio virionico [Heiman EM et al., 2008]. Inoltre il ceppo G1P[8] e-tipo corto SGII NSP4 B potrebbe rappresentare un ceppo Wa riassortante intergenogruppo che ha acquisito il gene 11 da un ceppo DS-1. Sembra pertanto che i risultati di questo studio possano assumere particolare rilievo specialmente se si considera che, una volta che il riassortimento intergenogruppo si verifica, possano diffondere ed acquisire una certa importanza epidemiologica con fluttuazioni nel tempo, come si è verificato nei ceppi circolanti nell'area di Parma in periodi distanti. La prevalenza dei RV con specificità multipla rivelata nel 2012

(17,07%, 14/82) è paragonabile a quella dei genotipi con specificità multiple rivelati nel 2008 (22,91%, 22/96) e nel -2009 (21,59%). Questo ritrovamento suggerisce che il fenomeno di riassortimento genico possa avvenire ad intervalli di 2 anni e che possa durare per due anni successivi. L'ipotesi sembrerebbe trovare conferma anche analizzando le prevalenze dei genotipi con specificità multiple rivelati nel 2004 (8,43%, 7/83) e 2005 (6,91%, 13/188) a confronto con quelle osservate nel 2010 (2,08%, 2/96) e nel 2011 (2,43%, 2/82).

Degno di nota è stato il ritrovamento di un ceppo G8P[14] e di un ceppo G10P[14] circolanti nell'area di Parma nel 2009 che sono riportati in letteratura essere ceppi di origine animale in particolare bovina. Lo confermerebbe anche il ritrovamento di un ceppo G8P[14] durante la sorveglianza condotta nella stessa area di Parma nel periodo 2004-2005 che all'analisi di alcuni geni è stato dimostrato di origine bovina [Medici MC et al., 2008]. Questi ritrovamenti inducono a pensare che la popolazione di Parma possa venire a contatto con ceppi animali e in particolare bovini ma solo l'analisi dell'intero genoma può confermare l'origine del ceppo. Evidenze di trasmissione intraspecie e riassortimenti genetici tra ceppi umani e animali sono segnalate in letteratura con relativa frequenza. Questi fenomeni sembrano contribuire alle variazioni genetiche/antigenetiche ritrovate nei RV rivelati nell'uomo specialmente quando coinvolti virus di alcune specie animali come le vacche, maiali, gatti e cani presubilmente a causa di strette interazioni tra queste specie e l'uomo dettate da forze culturali ed economiche [Martella V et al., 2009]. Degno di nota è anche il ritrovamento nel 2012 della combinazione atipica G1P[4], raramente riscontrata in altri paesi [Iturriza-Gomara M et al., 2011].

Un quadro epidemiologico-molecolare così complesso può essere attribuibile alla presenza nell'area di Parma di bambini suscettibili all'infezione in quanto privi di anticorpi come pure alla circolazione di ceppi con caratteristiche genetiche diverse almeno da quelle circolanti negli anni immediatamente precedenti.

Numerosi studi longitudinali sulle variazioni genetiche che possono verificarsi in RV si sono focalizzati su mutazioni nella proteina esterna del capsido VP7. Analisi di comparazione della sequenza aminoacidica dedotta del gene VP7 di diversi sierotipi G di RV hanno rivelato distinte regioni divergenti delle quali quattro, regione A (aa 87-101), B (aa 145-152), C (208-221) e F (aa 235-242), contengono epitopi neutralizzanti o cross-reattivi e sierotipo specifici [Estes MK 2001; Coulson BS et al., 1991; Taniguchi K et al., 1988]. Diversi studi forniscono evidenze sulla diversità genetica di VP7 di RV

suggerisce che induce a ritenere che esiste una variabilità all'interno dei G tipi. Palombo e collaboratori [Palombo EA et al., 1993] suggeriscono che all'interno di ciascun dei maggiori sierotipi VP7 che causano infezione nell'uomo (G1-G4), ceppi geneticamente distinti emergono da ceppi di campo circolanti nelle comunità piuttosto che ceppi predominanti precedenti.

Esiste il timore che l'introduzione del vaccino contro l'infezione da RV 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 RotarixTM monovalente (GlaxoSmithKline) se, da un lato, si è dimostrato efficace contro la maggior parte dei ceppi di RV, dall'altro sembra avere poco successo contro i ceppi G2P[4] [Salinas B et al., 2005; Gurgel RQ et al., 2007; Nagakomi T et al., 2008], che sono geneticamente molto diversi da G1P[8]. Il vaccino polivalente RotaTeq invece sembra più adatto a conferire protezione anche nei confronti dei ceppi G2P[4].

Filogenesi di ceppi di rotavirus con specificità G1P[8]

Il ritrovamento di ceppi di RV di specificità G1P[8] nell'area di Parma ha evidenziato che tale genotipo è quello maggiormente circolante. Questa osservazione, già riportata da Medici e collaboratori [Medici et al., 2010] è stata confermata anche a livello nazionale nel periodo 2007-2008 [Ruggeri FM, et al., 2009] e in genere negli ultimi decenni nel resto del mondo [Gentsch JR et al., 2005; Santos N and Hoshino Y, 2005].

Nel periodo settembre 2010-dicembre 2011 si è verificato un eccezionale prevalenza di infezione da RV causata da ceppi G1P[8], riscontrati in un'elevata percentuale di casi (82,77%, 149/180: 71,1%, 69/97 nel 2010 e 96,4%, 80/83 nel 2011), che ha indotto ad approfondire la loro caratterizzazione attraverso analisi di sequenza e filogenetica. All'analisi del gene VP7, questi ceppi si sono dimostrati appartenere a quattro distinti lignaggi [Jin Q et al., 1996]. Tuttavia, all'analisi delle sequenze aminoacidiche dedotte degli stessi, a confronto con quelli circolanti gli anni precedenti, sono emerse 3 sostituzioni nella regione antigenica A di VP7 esclusivamente nei ceppi circolanti nel periodo 2010-2011, quando si è verificata la maggiore circolazione dei ceppi G1P[8]. Specifici cambiamenti genetici nelle regioni antigeniche di VP7 sono state associate a periodi epidemici di gastroenterite. Questa osservazione porterebbe a ipotizzare che

mutazioni a livello delle proteine siano il meccanismo che RV utilizza per evadere la risposta immunitaria.

Analisi di sequenza e filogenetica di ceppi G4P[8]

La sorveglianza dei genotipi di RV circolanti nell'area di Parma ha dimostrato che il genotipo G4P[8] (8,76%), sebbene subisca marcate fluttuazioni di prevalenza nel corso degli anni, è tra i più frequenti insieme a G1P[8] (62,6%) e G3P[8] (4,26%). Diversi studi hanno riportato la co-circolazione di molteplici lineaggi intra-genotipici di G4P[8] che sembrano mantenersi nel tempo e in diversi contesti geografici. L'analisi filogenetica condotta sui geni VP7 e VP4 di ceppi G4P[8] di RV rivelati in 2 periodi distinti di sorveglianza (2004-2005 e 2008-2012), ha dimostrato che, nonostante i numerosi lignaggi fin ora descritti, i ceppi G4P[8] circolanti nella popolazione geograficamente definita dell'area di Parma hanno mantenuto per quasi un decennio l'assetto G4-Ic e P[8]-III. Inoltre nei relativi dendrogrammi le sequenze segregavano in massima parte con un profilo temporale di evoluzione.

La variazione nucleotidica tra le sequenze analizzate è stata del 1-4% per entrambi i lignaggi Ic (VP7) e P[8]-III (VP4), dimostrando che anche il lignaggio Ic presenta una discreta eterogeneità genetica, non riconosciuta prima [Arista S et al., 2005, Bok K et al., 2002]. Messe a confronto con il ceppo prototipo G4 (ST3, X13603) le sequenze aminoacidiche dedotte del gene VP7 dei ceppi G4P[8] di Parma hanno mostrato la presenza di una inserzione (76-Asn) e diverse sostituzioni (131-Asp→Glu, 143-Arg→Lys, 145-Val→Lys, 238-Asn→Asp, e 239-Ile→Val), ritrovate anche in ceppi circolanti in Argentina, Finlandia, Nicaragua, sud Italia e Uruguay [Bok K et al., 2002; Arista S et al., 2005; O'Halloran F et al., 2000; Berois M et al., 2003; Bucardo F et al., 2007]. Anche il confronto delle sequenze aminoacidiche nella regione ipervariabile VP8* di VP4 con quella del ceppo di riferimento P[8]-III (OP351, AJ302147) ha dimostrato diverse sostituzioni. La progressiva variazione nei geni VP7 e VP4 dei ceppi analizzati è in accordo con il potere evolutivo di RV basato sull'accumulo di mutazioni puntiformi.

Infine il confronto delle sequenze aminoacidiche dei ceppi G4P[8] con quelle dei ceppi vaccinali (vaccini Rotarix e Rotateq) ha dimostrato che essi differiscono sostanzialmente da queste negli epitopi neutralizzanti.. Infatti sono state trovate 4 sostituzioni negli epitopi di VP7 e 5-7 sostituzioni negli epitopi di VP4. Non è da escludere che tali

sostituzioni possano inficiare in qualche modo l'efficacia dei vaccini e che tali mutazioni possano creare nel tempo dei ceppi vaccino-resistenti. Pertanto soltanto la continua sorveglianza dei genotipi di RV permetterà di valutare l'efficacia dei vaccini e monitorare la comparsa di nuovi ceppi e/o lignaggi genetici.

Analisi filodinamica di ceppi di specificità P[8]

La sorveglianza della circolazione dei genotipi di RV nell'area di Parma nel periodo gennaio 2008-dicembre 2012 ha confermato la predominanza dei ceppi di specificità P[8] sui ceppi circolanti, con marcate fluttuazioni in combinazione con diversi G tipi (G1, G3, G4, G9).

Alla luce delle limitate informazioni sulla variabilità genetica di VP4, in questo studio è stato anche indagato se la continua predominanza dei RV con specificità P[8] e se le fluttuazioni osservate nel corso degli anni delle prevalenze dei ceppi con questa specificità in combinazione con diverse specificità G (G1, G3, G4, G9) potessero dipendere da possibili variazioni sul gene VP4.

L'analisi filodinamica condotta su 81 ceppi selezionati con specificità P[8] circolanti nell'area di Parma sembra dimostrare, in primo luogo, che la circolazione di questi ceppi correla con cambiamenti della sequenza VP4 di lignaggio P[8]-III, evidenziando la significativa variabilità di questo gene rispetto al gene VP7 e, in secondo luogo, che tali cambiamenti evolvono in progressione. Inoltre i risultati dell'analisi suggeriscono che rapidi eventi di riassortimento abbiano prodotto negli anni nuove combinazioni di G tipo (G1, G3, G4, e G9) con diversi sub-lignaggi P[8]-III e che tali combinazioni siano state responsabili di epidemie come pure della riduzione della circolazione e/o della emergenza/riemergenza di taluni genotipi.

È evidente che la variabilità del gene VP4 dei ceppi di RV di specificità P[8] dovrebbe essere tenuta in giusta considerazione nella valutazione dell'efficacia dei vaccini o piuttosto ceppi con VP4 mutata nei siti antigenici potrebbero essere considerati per un aggiornamento dei vaccini stessi.

Il ritrovamento in bassa percentuale di sequenze P[8]-III in associazione a G1 in ceppi circolanti dal 1987 al 2005, riunite in un nodo separato da quello da cui si sono generati gli altri sublignaggi, induce a ritenere che per almeno 19 anni abbiano circolato, sebbene sporadicamente, anche ceppi con sequenze altamente conservate.

Infine, il ritrovamento di un tasso di mutazione di $3,04 \times 10^3$ (mutazioni/sito/anno) sottolinea l'elevata variabilità genetica di questo virus al pari di altri virus a RNA, quali poliovirus ($7,4 \times 10^3$), virus dell'epatite C ($9,6 \times 10^3$), virus influenza A ($1,4 \times 10^3$), virus dell'immunodeficienza acquisita ($9,4 \times 10^3$), per i quali è ampiamente documentata l'associazione di questi tassi con un'elevata frequenza di mutazione.

Caratterizzazione molecolare di un ceppo di rotavirus di gruppo A rivelato in una bambina con gastroenterite da rotavirus associata a meningismo

Esiste l'evidenza che il tropismo di RV non sia limitato agli enterociti e sempre più frequentemente in letteratura internazionale è riconosciuta la possibilità di infezione sistemica [Conner M and Ramig R, 1996; Ramig RF, 2004; Blutt SE and Conner ME, 2007; Ramig RF, 2007]. Il caso di meningismo riportato in questo studio in una bambina con gastroenterite da RV in cui erano stati esclusi gli agenti batterici e quelli virali più frequenti di meningoencefalite ed era stato svelato RV anche nel liquor mette in luce il potere patogeno che può avere questo virus [Goldwater RV et al., 2001; Lynch M et al., 2001; Iturriza-Gomara M et al., 2002b] e supporta l'ipotesi che la replicazione di RV possa avvenire a livello del sistema nervoso centrale (SNC) causando un danno diretto. Nonostante queste osservazioni, la patogenesi dell'encefalopatia associata a RV rimane tuttora sconosciuta.

Il ceppo di RV svelato nella bambina con meningismo (267/2008/M) era riconducibile al genotipo G1P[8], che come già osservato è il genotipo maggiormente circolante in Italia e nel mondo negli ultimi 20 anni [Arista S et al., 2006; Gentsch JR et al., 2005; Santos N and Hoshino Y, 2005], associato ad e-tipo lungo, SGII e NSP4 di genogruppo B, che rappresentano caratteristiche molecolari tipiche del genogruppo Wa. 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 da RV.

Infatti sono state identificate mutazioni aminoacidiche non conservative in geni noti essere coinvolti nella diffusione extra-intestinale (gene NSP3), nella patogenicità (gene NSP4) e nell'immunogenicità (gene VP4). Inoltre la composizione aminoacidica del gene NSP3 è risultata più simile a quella di un ceppo di RV di scimmia Rhesus competente per la diffusione extra-intestinale [Mossel EC et al., 2002] piuttosto che a quello del ceppo SA11-C14 non competente per la diffusione extra-intestinale.

È verosimile ipotizzare che le mutazioni aminoacidiche riscontrate all'interno dei

domini funzionali della proteina NSP3, dei siti di legame della proteina NSP4 e all'interno della regione ipervariabile della proteina VP4, nota contenere gli epitopi antigenici, possano aver influenzato la conformazione e/o l'attività di tali proteine modificando la patogenicità del ceppo e permettendone la diffusione dall'intestino al SNC, tale da giustificare la neuropatia nella piccola bambina. D'altra parte non può nemmeno essere escluso l'intervento di fattori legati all'ospite, data l'identità di sequenza di questo particolare ceppo con due ceppi circolanti nella stessa area e nello stesso periodo.

Gli studi condotti sulla proteina VP4 del ceppo 267/2008/M utilizzando programmi bioinformatici non hanno dimostrato cambiamenti significativi della configurazione terziaria di questa proteina, che rappresenta il sito d'attacco del virus con l'enterocita, tali da giustificare una variazione dell'attività della proteina stessa e/o del tropismo cellulare del virus.

CONCLUSIONI

La realizzazione di questo studio ha permesso di ottenere un quadro epidemiologico-molecolare completo e aggiornato dei ceppi di RV circolanti nell'area di Parma in un periodo relativamente lungo. Sebbene in Italia i dati di copertura del vaccino non siano ancora disponibili, la continua sorveglianza delle infezioni da RV ha permesso di dimostrare nell'area di Parma una significativa diminuzione (circa del 30%) della prevalenza di infezione da RV, dopo l'introduzione in commercio dei vaccini nel 2006. Infatti tale valore è passato da 34,5% nel 2005 all'11,6% nel 2012. Soltanto la continua sorveglianza dei genotipi di RV permetterà di valutare l'efficacia dei vaccini e monitorare la comparsa di nuovi ceppi e/o lignaggi genetici. Inoltre questo studio ha messo in luce che le conoscenze dell'aspetto genetico dei RV sono indispensabili per comprendere i meccanismi evolutivi responsabili dei vantaggi selettivi che taluni genotipi possono acquisire.

BIBLIOGRAFIA

- **Afrikanova I**, Miozzo MC, Giambiagi S, et al., **1996**. Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *Journal of General Virology* 77(Pt9):2059-2065.
- **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.
- **Aiyegbo MS**, Sapparapu G, Spiller BW, et al., **2013**. Human-rotavirus VP6-Specific Antibodies Mediate Intracellular Neutralization by Binding to a Quaternary Structure in the Transcriptional Pore. *PLoS* vol 8 issue 5 e61101.
- **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
- **Angel J**, Franco MA, Greenberg HB. **2007**. Rotavirus Vaccines recent developments and future consideration. *Nature reviews microbiology* 5:529-39.
- **Anonymus**. **2003**. Intussuception. Cincinnati Children's Hospital Medical center. Website available at <http://cincinnatichildren.org/health/info/abdomen/diagnose/intussuceptions>.
- **Antczak JB**, Chmelo R, Pickup DJ, et al., **1982**. Sequence at both termini of the 10 genes of the reovirus serotype 3 (strain Dearing). *Virology* 121:307-319.
- **Antonelli G**, Clementi M. **2008**. *Principi di virologia medica*. Casa editrice Abrosiana.
- **Arcangeletti MC**, De Conto F, Pinaridi F, et al., **2005**. Electron microscopy as reliable tool for rapid and conventional detection of enteric viral agent: a five year experience report. *Acta Biomed* 76(3): 165-170.
- **Arista S**, Giammanco GM, de Grazia et al., **2005** Genetic variability among G4 Italian human rotaviruses. *J Clin, Microbiol* 43:1420-1425
- **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.
- **Armah GE**, Steele AD, Binka FN, et al., **2003**. Changing patterns of rotavirus genotypes in Ghana: emergence of human G9 as a major cause of diarrhea in children. *J Clin Microbiol* 41:2317-2322.
- **Arnold MM**, Patton JT. **2009**. Rotavirus Antagonism of Innate Immune response. *Viruses*. 1:1035-1056.
- **Arora R**, Chitambar SD et al: **2011**. Full genomic analysis of Indian G1P[8] rotavirus strains. *Infection, Genetics and evolution* (11) 504-511;
- **Atchison C**, Lopman B, Edmonds WJ, et al., **2010**. Modelling the seasonality of rotavirus disease and the impact of vaccination in England and Wales. *Vaccine* 28(18):3118-26.
- **Atchisoo C**, Iturriza-Gómara M, Tam C, et al., **2010**. Spatiotemporal dynamics of rotavirus diseases in Europe: can climate or demographic variability explain the patterned observed. *Pediatr Infect Dis J*.29(6)567-568.
- **Baker M**, Prasad BV, **2010**. Rotavirus cell entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 343, 121-248.
- **Ball JM**, Tian P, Zeng CQ, et al., **1996**. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral non structural glycoprotein. *Science*; 1747-87.

- **Ball LA. 2005.** The universal taxonomy of viruses in theory and in practice. In : Fauquet CM.,; Mayo MA, Mainloff J, Desselberg U, Ball LA, editors. Virus Taxonomy: Eight report of the International Committee on taxonomy of viruses. Elsevier. Academic Pres, Amsterdam Holland 2005. P 3-8.
- **Banerjee I, Ramani S, Primrose B, et al., 2006.** Comparative study of the epidemiology of rotavirus in children from a community based birth cohort and a hospital in South India. *J Clin Microbiol* 44:2468-2474.
- **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
- **Banyai K, Gentsch JR, Griffin DD, et al., 2003.** Genetic variability among serotype G6 human rotaviruses: identification of a novel lineage isolated in Hungary. *J Med Virol* 71:123-134.
- **Bergmann CC, Maass D, Poruchynsky MS, et al., 1989.** Topology of the non-structural protein receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *EMBO Journal*. 8:1695-1703.
- **Bernstein DI et al. 1991.** Protection from rotavirus reinfection: 2-year prospective study. *The Journal of Infectious Diseases*, 164:277–283.
- **Bernstein DI Ward LR, 2004.** Rotaviruses. In: Fergein RD, Cherry JD, Demler GJ, Kaplan SE, eds. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 5th ed. Philadelphia, Saunders, Elsevier Science.20: 2110-2113.
- **Berois M, Libersou S, Russi J, et al., 2003.** Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus isolated in Montevideo- Uruguay from 1996-1999. *J Med Virol*. 71(3):456-62.
- **Besselaar TG, Rosenblatt A, Kidd AH. 1986.** Atypical rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *EMBO J*. 8: 1695-1703.
- **Bican P, Cohen J, Charpilienne A, et al., 1982.** Purification and characterization of bovine rotavirus core. *J. Virol*. 43:1113-1117.
- **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. 1974.** Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* I: 149-151.
- **Bishop RF et al. 1983.** Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *The New England Journal of Medicine*, 309:72–76.
- **Blackhall J, Munoz M, Fuentes A, et al., 1998.** Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. *Journal of virology*. 63:3974-3982.
- **Blutt SE, Kirkwood CD, Parreno RV, et al., 2003.** Rotavirus antigenemia and viraemia a common event? *Lancet* 362(9394):1445-1449.
- **Blutt SE, Conner ME. 2007.** Rotavirus: to the gut and beyond! *Curr. Opin. Gastroenterol.*;23(1):39-43.
- **Bok K.D, Matson DO, Gomez JA. 2002.** Genetic variation of capsid protein VP7 in genotype G4 human rotavirus strains: simultaneous emergence and spread of different lineages in Argentina. *J Clin Microbiol.*. 40:2016–22.
- **Boom JA, Tate JE, Sahni LC, et al., 2010.** Effectiveness of pentavalent rotavirus vaccine in a large urban population in the United States. *Pediatrics*. 125:e199-e207.
- **Boyle JF, Holmes KV, 1986.** RNA-binding protein of bovine rotavirus. *J. Virol*. 58:561-568.

- **Broome RI, Vo PT, Ward RL, et al., 1993.** Murine rotavirus gene encoding outer capsid protein VP4 and VP7 are not the major determinants of host range restriction and virulence. *J. Virol.* 67:2448-2455.
- **Browning GF, Snodgrass DR, Nagakomi O, et al., 1992.** Human and bovine serotype G8 rotaviruses may be derived by reassortment. *Arch 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.
- **Bucardo F, Karlsson B, Nordgren J et al., 2007.** Mutated G4P[8] rotavirus associated with a nationwide outbreak of gastroenteritis in Nicaragua in 2005. *J Clin Microbiol.* 45:990-7.
- **Buttery JP, Lambert SB, Grinwood K, et al., 2011.** Reduction in rotavirus-associated acute gastroenteritis following introduction of rotavirus vaccine into Australia's National Childhood vaccine schedule. *Pediatric Infectious Disease Journal.* 30-S25-S29.
- **Chan WK, Au KS, Estes MK. 1988.** Topography of the simian rotavirus nonstructural glycoprotein (NS28) in the endoplasmic reticulum membrane. *Virology.* 164:435-442.
- **Chandran A, Heinzen RR, Santosham M, et al. 2006.** Nosocomial rotavirus infections: a systematic review. *J Pediatr* 149:441-447.
- **Chang CC, Chang MH, Lin T, et al., 2009.** Experience of pentavalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine among healthy infant in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association .* 108:280-285.
- **Chang HGH, Smith PF, Ackelsberg DK, et al., 2001.** Intussusception, rotavirus diarrhea, and rotavirus vaccine use among children in New York State. *Pediatrics.* 108:54-60.
- **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
- **Chiba S et al. 1986.** Protective effect of naturally acquired homotypic and 43. heterotypic rotavirus antibodies. *Lancet,* 2:417-421.
- **Chibo S, Yokoyama T, Nakara S, et al., 1986.** Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *Lancet.* 2:417-21.
- **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.
- **Chung B, Wong B. 2007.** Relationships between five common viruses and febrile seizures in children. *Arch. Dis. Child.* 92(7):589-593.
- **Chung KT, McCrae MA, 2011.** Regulation of gene expression by the NSP1 and NSP3 non-structural proteins of rotavirus. *Archives of Virology.* 156:2197-2203.
- **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.
- **Ciarlet M, Estes MK, Barone C, et al., 1998.** Analysis of host range restriction determinants in rabbit model: comparison of homologous and heterologous rotavirus infections. *J. Virol.* 72:2341-2351
- **Clark B, Desselberg U, 1988.** Myristylation of rotavirus protein. *J. Gen. Virol.* 69:2681-2689.

- **Clarke SK**, Cook GT, Egglestone SI, et al. **1972**. A virus from endemic vomiting disease. *Br Med J* 3:86-9.
- **Clemens JD** et al. **1992**. Seroepidemiologic evaluation of antibodies to rotavirus as correlates of the risk of clinically significant rotavirus diarrhoea in rural Bangladesh. *The Journal of Infectious Diseases*, 165:161–165.
- **Cliver DO**, Ellender RD, Fout GS, et al., **1992**. Foodborne viruses. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington (DC): American Public Health Association.
- **Collins PJ**, Martella V et al., **2010**: identification of a G2-like porcine rotavirus bearing a novel VP4type, P[32]. *Vet. Res* 41:73;
- **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. pp 713-743.
- **Contino MF**, Leiby T, Arcinue EL. **1994**. Rotaviral gastrointestinal infection causing afebrile seizures in infancy and childhood. *Am. Emerg. J. Med.* 12(1)94-95.
- **Cook N**, Bridger J, Kendall K, et al., **2004**. The zoonotic potential of rotavirus. *J infect* 48(4)289-302.
- **Correia JB**, Patel MM, Nagakomi O, et al., **2011**. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotopically unrelated G2P[4] strain in Brazil. *Journal of Infectious Diseases* 201:363-369.
- **Coulson BS**, Kirkwood C, **1991**. Relation of VP7 aminoacid sequence to monoclonal antibody neutralization of rotavirus and rotavirus monotype. *J Virol* 65(11):5968-74.
- **Coulson BS**, Grinwood K, Hudson IL, et al., **1992**. role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol.* 30:1678-84
- **Crawford SE**, Patel DG, Cheng E, et al., **2006**. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. *J Virol* 80(10):4820-4832.
- **Cunliffe NA**, Gondwe JS, Broadhead RL, et al., **1999**. Rotavirus G and P type in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: predominance of novel P[6]G8 strain. *J Med Virol.* 57:308-312.
- **Cunliffe NA**, Gondwe JS, Graham SM, et al., **2001**. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997-1999. *J Clin Microbiol* 39:836-843.
- **Curns AT**, Steiner CA, Barret M, et al., **2010**. Reduction in acute gastroenteritis hospitalizations among US children after introduction of rotavirus vaccine: analysis of hospital discharge data from 18 US states. *Journal of Infectious Diseases.* 201:1617-1624.
- **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.
- **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 Wit MA**, Koopmans MP, van Duynhoven RT. **2003**. Risk factor for norovirus, Sapporo-like virus, and group A rotavirus gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 9:1563-1570.
- **Dennehy PH**, **2008**. Rotavirus vaccines: an overview. *Clinical Microbiology reviews.* P 198-208.
- **Desai SN**, Esposito DB, Shapiro ED, et al., **2010**. Effectiveness of rotavirus vaccine in preventing hospitalization due to rotavirus gastroenteritis in young children in Connecticut, USA. *Vaccine.* 28:7501-7506.
- **Desselberger U**. **1996**. Genome rearrangements of rotaviruses. *Arch. Virol. Suppl.*; 12: 37-51.
- **Desselberg U**, Wolleswinkel-van den Bososch J, Mrukowicz J, et al. **2006**. Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination . *Pediatr Infect Dis J* 25:S30-41.
- **Desselberg U**, Manktelow E, Li W, et al., **2009**. Rotavirus and rotavirus vaccines: *Br. Med. Bull.* 90:37-51.
- **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.
- **Diwakarla S**, Clark R, Palombo EA. **2002**. Expanding distribution of human serotype G6 rotaviruses in Australia. *Microbiol Immunol.* 46:499-502.
- **doCarmo G**, Yen C, Cortes J, et al., 2011. Decline in diarrhea mortality and admission after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Medicine* 8:e1001024.
- **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.
- **Dormitzer PR**, Sun ZY, Wagner G, Harrison SC. **2002**. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J.* 21:885– 97.
- **Dormitzer PR**, Nason EB, Prasad BV. **2004**. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non- enveloped virus. *Nature.* 430, 1053-1058.
- **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.
- **Esona MD**, Armah GE, Geyer A, et al., **2004**. Detection of an unusual human rotavirus strain with G5P[8] specificity in cameroonian child with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 42:441-444.
- **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
- **Espejo RT**, Lopez S, Arias CF. **1981**. Structural non polypeptides of simian rotavirus SA11 and effect of trypsin. *J Virol* 37:156-160.
- **Espejo RT**, Puerto F, Soler C et al., **1984**. Characterization of human pararotavirus. *Infect. Immun.* 44:112-116.
- **Estes MK**, Graham DY, Mason BB, **1981**. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity : molecular mechanism. *J Virol.* 39:879-888.
- **Estes MK**, Cohen J. **1989**. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53: 410-449.
- **Estes MK.** **2001**. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds) *Fields virology*, 5th edn. Kluwer Health\Lippincott,
- **Estes MK**, Kang G, Zeng CQ, et al., **2001**. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. *Novartis Found. Symp.* 238.82-96 discussion 96-100 Williams and Wilkins, Philadelphia pp:1917-1974.
- **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.
- **Estes MK**, Greenberg HB. **2012** Rotaviruses. In *Fields Virology*, edn 6. Edited by Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Staus SE. Lippincott Williams & Wilkins
- **Fabbretti E**, Afrikanova I, Vascotto F, et al., **1999**. Two non-structural rotavirus protein, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structure in vivo. *J. Gen. Virol.* 80(Pt2), 333-339
- **Fischer TK**, Ashley D, Kerin T, et al., **2005**. Rotavirus antigenemia in patient with acute gastroenteritis. *J Infect Dis* 192(5):913-19.
- **Fisher TK**, Viboud C, Parashar U, et al., **2007**. Hospitalizations and deaths from diarrhea and rotavirus among children <5 years of age in the United States, 1993-2003. *J Infect Dis* 195:1117-1125.
- **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.
- **Franco MA**, Angel J, Greenberg HB. **2006**. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* 24:2718-2731.
- **Friedman MG** et al. **1988**. Two sequential outbreaks of rotavirus gastroenteritis: evidence for symptomatic and asymptomatic reinfections. *The Journal of Infectious Diseases*, 158:814–822.
- **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.
- **Furuichi Y**, Morgan M, Muthukrishanan S, et al. **1975**. Reovirus messenger RNA contains a methylated blocked 5' terminal structure: m⁷g(5')ppp(5')G^mpCp-. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:362-366.

- **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
- **Gaul SK**, Simpson TF, Woode GN, et al., 1982. Antigenic relationship among some animal rotaviruses: virus neutralization *in vitro* and cross protection in piglets. *J. Clin Microbiol* . 16:459-503.
- **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.
- **Glass RI**, Parashar UD, Bresee JS, et al., **2006**. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet* 36(9532)323-32.
- **Glass RI**, Parashar U, Patel M, et al., **2013**. Rotavirus vaccines: Successes and challenges. *Journal of infection.* xx: 1-10.
- **Goldwater PN**, Rowland K, Power R, et al., **2001**. Rotavirus encephalopathy: pathogenesis reviewed. *J PaediatrChild Health; 37:206-9.*
- **Gonzales RA**, Espinosa R, Romero P, et al., **2000**. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch. Virol.*145, 1963-1973.
- **Gonzales RA**, et al., **2000**. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Arch. Virol.* 145, 1963-1973.
- **Gordon I**, Inghraham HS, Kornis 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.
- **Gorrel RJ**, Bishop RF. **1999**. Homotypic and heterotypic serum neutralizing antibody response to rotavirus protein following natural primary infection and reinfection in children *J Med Virol* 57:204-11.
- **Gorziglia M**, Nishiwawa K, Fukuhara N. **1989**. Evidence of duplication and deletion in super short segment 11 of rabbit rotavirus Alabama strain. *Virology* 170:587-590.
- **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**, 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**, Brantly M. **1995**. Is rotavirus a population of reassortants? *Trends in Microbiol.* 3:159-62.
- **Gouvea V**, Santos N. **1999**. Rotavirus serotype G5: an emerging cause of epidemic childhood diarrhea. *Vaccine.* 17:1291-1292.
- **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 Nutr* 46:24-31.

- **Greenberg HB**, Estes MK. **2009**. Rotaviruses from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*. 136:1939-1951.
- **Griffin DD**, Nagakomi T, Hoshino Y, et al., **2002**. National Rotavirus Surveillance System. Characterization of nontypeable rotavirus strain from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6], G12) and rare P3[9] strains 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.
- **Grinwood K**, Lund JCS, Coulson BS, et al., **1988**. Comparison of serum and mucosal antibody responses following severe acute rotavirus gastroenteritis in young children. *J Clin Microbiol* 26:732-8.
- **Grimwood K**, Lambert SB. **2009**. Rotavirus vaccine. *Human Vaccine* 5:1 1-13.
- **Guegel 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.
- **Guglielmi KM**, et al., **2010**. Mechanism of intra-particle synthesis of the rotavirus double-stranded RNA genome. *J Biol Chem*. 24, 18123-18128.
- **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.
- **Haffejeen IE**, et al., **1991**. The pathophysiology, clinical features and management of rotavirus diarrhoea. *The Quarterly Journal of Medicine*, 79:289–299.
- **Hanquet G**, Ducofree G, Vergison A, et al., **2011**. Impact of rotavirus vaccination on laboratory confirmed cases in Belgium. *Vaccine*. 29:4698-4703.
- **Hansman GS**, Oka T, Li TC, et al. **2008**. Detection of human enteric viruses in Japanese clams. *J Food Prot*;71(8):1689-1695.
- **Heiman EM**, McDonald SM, Barro M, et al. **2008**. Group A human rotavirus genomics evidence that constellations are influenced by viral protein interactions. *J Virol*. 82: 11106-11116.
- **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.
- **Ho MS**, Glass RI, Monroe SS, et al. **1989**. Viral Gastroenteritis aboard a cruise ship. *Lancet* 11:961-5.
- **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.
- **Hongou K**, Konischi T, Yagi S, et al., **1998**. Rotavirus encephalitis mimicking afebrile benign convulsion in infants. *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.
- **Hoshino Y**, Saif LJ, Kang SI, et al., **1995**. Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of human rotavirus in gnotobiotic piglet model. *Virology* 209:274-280.

- **Huicho L** et al. **1993**. Occult blood and faecal leukocytes as screening tests in childhood infectious diarrhoea: an old problem revisited. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 12:474–477.
- **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.
- **Hyser JM**, Collinsons- Pautz MR, Utama B, et al., **2010**. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *MBio* 1 pii: e00265-10.
- **Imai M**, Richardson MA, Ikegami N, et al., **1982**. Cloning and nucleotide sequencing of Reoviridae genomes. p 15-26. In R.W. Compans and DHL Bishop (ed), *Double-stranded RNA viruses*. Elsevier Biomedical Press, New York.
- **Imai M**, Akatani K, Ikegami N. et al., **1983**. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J. Virol.* 47: 125-136.
- **Iturriza-Gómara M**, Green J, Brown DW, et al., **2000**. Molecular epidemiology of human group A rotavirus infections in the United Kingdom between 1995 and 1998. *J Clin Microbiol.* 38:4394-4401.
- **Iturriza-Gómara M**, Green J, Brown DW, 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**, Dallman, Banyai. et al. **2011**. Rotaviruses genotype s co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain. *Epidemiology and infection* 895-909.
- **Jin Q**, Ward RL, Knowlton DR, et al., **1996**. Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rehus rotaviruses. *Arch Virol* 141(11):2057-76.
- **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.
- **Jourdan N**, et al., **1997**. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J. Virol.* 71,8268-8278.
- **Justino MC**, Linhares AC, Lanzieri TM, et al., **2011**. Effectiveness of the Monovalent G1P[8] Human Rotavirus Vaccine Against Hospitalization for Severe G2P[4] strain in Belem, Brazil. *Pediatric Infectious Diseases Journal* 30:396-401.

- **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.
- **Kalica AR**, Flores J, Greenberg HB, **1983**: Identification of the rotaviral gene that code for the hemagglutinin and protease-enhanced plaque formation. *Virology*. 125:194-205.
- **Kantharidis P**, Dyall-Smith L, Tregear GW, et al. **1988**. Nucleotide sequences of UK bovine rotavirus segment 4: possible host restriction of VP3 genes. *Virology*. 166:308-315.
- **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**. **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.
- **Kawano G**, Oshige K, Syutou S, et al., **2007**. Benign infantile convulsion associated with mild gastroenteritis: a retrospective study of 39 cases including virological tests and efficacy convulsant. *Brain Dev.* 29(10):617-622.
- **Keryer-Bibens C**, Legagneux V, Namanda-Vanderbeken A, et al., **2009**. The rotaviral NSP3 protein stimulates translation of polyadenylated target mRNAs independently of its RNA-binding domain. *Biochemical and Biophysical research Communications*. 390:302-306.
- **King L**. **2001**. Pediatrics, Intussusception. eMedicine web site available at <http://emedicine.com/EMERG/topic385.htm>.
- **Kirkwood C**, Bogdanovic-Sakran N, Palombo E, et al., **2003**. Genetic and antigenetic characterization of rotavirus serotype G9 strains isolated in Australia between 1997-2001. *J Clin Microbiol* 41:3649-3654
- **Kirkwood CD**, Cannan D, Bogdanovic-Sakran N, et al., **2006**. National Rotavirus Surveillance Program annual report 2005-06. *Commun Dis Intell* 30:434-438.
- **Kirkwood CD**. **2010**. Genetic and Antigenetic Diversity of Human Rotaviruses: Potential Impact on Vaccination Programs. *JID* 202(Suppl 1) S43-S48.
- **Kirkwood CD**, Boniface K, Barnes GL, et al., **2011**. Distribution of rotavirus genotype after introduction of rotavirus vaccines. Rotarix(R) and RotaTeq(R), into the National immunization Program of Australia. *Pediatric Infectious Diseases Journal*. 30S48-S53.
- **Kirton A**, Busche K, Ross C, et al., **2005**. Acute necrotizing encephalopathy in Caucasian children: two cases and review literature. *J. Child. Neurol.* 20(6):527-532.
- **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**, 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.
- **Kovacs A**, et al., **1987**. Rotavirus gastroenteritis. *American journal of diseases of children*. (1960). 141:161-166.
- **Kozak M**. **1986**. Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. *Cell*; 47:481-483.
- **Kuchino Y**, Nishimuura S, Smith E. **1982**. Homologous terminal sequences in the double-stranded RNA genome segments of cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm *Bpmbyx mori*. *J. Virol.* 44: 538-543
- **Kumar M**, Jayaram H, Carpio RV, et al., **2007**. Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleotides reveals an NDP kinase like activity. *Journal of Virology*. 81:12272-12284.
- **Laemmli UK**. **1970**. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680-685.
- **Lanzieri TM**, Linhares AC, Costa I, et al., **2011**. Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*. 15:e206-e210.
- **Larralde G**, Li B., et al., **1991**. Serotype-Specific Epitope(s) Present on the VP8 subunit of Rotavirus VP4 Protein. *Journal of virology* p 3213-3218;
- **Larralde G**, Gorziglia M. **1992**. Distribution of Conserved and Specific Epitopes on the VP8 Subunit of Rotavirus VP4. *Journal of virology* p7438-7443;
- **Lawton JA**, et al. **2000**. Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv Virus Res.*; 55:185–229.
- **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.
- **Li Z**, Baker ML, Jang W, et al. **2009**. Rotavirus architecture at subnanometer resolution. *J. Virol.* 83, 1754-1766.
- **Liu M**, Offit PA, Estes MK. **1988**. Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* 163:26-32
- **Liu M**, Mattion NM, Estes MK. **1992**. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology* 188, pp:77-84.
- **Loopman BA**, Curns AT, Yen C, et al., **2011**. Infant rotavirus vaccination may provide indirect protection to older children and adults in the United States. *Journal of infectious Diseases*. 204:980-986.
- **Lopman BA**, Payne DC, Tate JE, et al., **2012**. Post-licensure experience with rotavirus vaccination in high and middle income countries; 2006-2011. *Current Opinion in Virology*. 2:434-442.
- **Lopez T**, Camacho M, Zayas M, et al., **2005**. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J. Virol.* 79, 184-192.

- **Lopez S**, Arisa CF, **2006**. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309, 39-66.
- **Loughlin J**, Mast TC, Doherty MC et al., **2012**. Post Marketing Evaluation of the Short-term safety of the Pentavalent Rotavirus Vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 31:292-296.
- **Lu X**, et al., **2008**. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure* 16, 1678-1688.
- **Ludert JE**, Gil F, Liprandi F. **1986**. The structure of rotavirus inner capsid studied by electron microscopy of chemical disrupted particles. *J Gen Virol* 67:1721-1725.
- **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.
- **McCrae MA**, McCorquodale. **1983**. Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology* 126:204-212.
- **Mackov ER**, Shaw RD, Matsui SM, et al., **1988**. Characterization of homotypic and heterotypic VP7 neutralization sites of rhesus rotavirus. *Virology*. 165:511-517
- **Madeley CR**. **1995**. Da AJ Zucherman, JE Banatlava and JR Patison Editori. Principles and practice of clinical virology. 1995. pp 190-227.
- **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**, Banyai K, Matthijnssens J, et al., **2010**. Zoonotic aspect of rotaviruses. *Vet Microbiol* 140(34):246-55.
- **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**, Ciarlet M, Pratelli A, et al., **2003**. Molecular analysis of the VP7, VP4, VP6, NSP4, NSP5/6 gene of a buffalo rotavirus strain: identification of the rare P[3], RRV-like VP4 gene allele. *J Clin Microbiol.* 41:5665-5675.
- **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**, 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**, 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.
- **Mason BB**, Graham DY, Estes MK, **1983**. Biochemical mapping of the simian rotavirus SA11 genome. *J. Virol.* 46: 413-423.
- **Mata L** et al. **1980**. Epidemiology of rotavirus in a cohort of 45 Guatemalan Mayan Indian children observed from birth to the age of three years. *The Journal of Infectious Diseases*, 148:452-461.
- **Matson DO**, O’Ryan ML, Herrera RI, et al., **1993**. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J Infect Dis* 167:577-89.
- **Matthijnssens 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.

- **Matthijssens J**, Ciarlet M, et al. **2008a**. Recommendations for classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* DOI 10.1007/s0075-008-0155-1
- **Matthijssens 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
- **Matthijssens J**, Martella V , Van Rast M. **2010**. Priority Paper Evaluation: Genomic Evolution, host-species barrier, reassortment and classification of rotaviruses. *Future Virology* 5:385-390.
- **Matthijssens J**, Ciarlet M, McDonalds SM, et al., **2011**. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group ((RCWG). *Arch. Virol.* 156:1397-1413.
- **Matthijssens J** and Van Rast M, **2012**. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* 2:426-433
- **McDonald SM**, Matthijssens J, McAllen JK, et al. **2009**. Evolutionary dynamics of human rotaviruses : balancing reassortment with preferred genome costellation. *PLoS Pathog.* 5:e1000634.
- **McDonald SM** and Patton JT, **2009**. Core-associated genome replication mechanisms of dsRNA viruses. In *Viral Genome Replication* pp 201-224, Springer Science/Business Media
- **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.
- **Medici MC**, Abelli LA, Martella V, et al. **2007a**. Characterization of intergenogroup reassortant rotavirus strains detected in hospitalised children in Italy. *J Med Virol*, 79: 1406-1412.
- **Medici MC**, Abelli LA, Martinelli M, et al. **2007b**. HRV genotypes in the pre-vaccine era in Northern Italy. Third European Congress of Virology, Nurnberg, Germany, September 1-5, p: 113.
- **Medici MC**, Abelli LA, Martinelli M, et al., **2008**. Molecular characterization of VP4, VP6 and VP7 genes of rare G8P[14] rotavirus strain detected in infant with gastroenteritis in Italy. *Virus Res.* 137(1): 163-167.
- **Medici MC**, Abelli LA, Martinelli M, et al., **2011**. Clinical and molecular findings in two fatal cases of rotavirus –associated enteritis in children. *Journal of Clinical Microbiology.* 48: 2733-29.
- **Melnick JL**, et al. **1979**. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: Preparation and test procedure for identification of field strains of enterovirus. *Bulletin of the World Health Organization.* 48: 263–268.
- **Melnick JL** and Wimberly IL. **1985**. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: new LBM pools prepared from reserves of antisera stored frozen for two decades. *Bulletin of the World Health Organization.* 63: 543-50.

- **Merril CR**, Goldman D, Sedman SA, et al., **1981**. Ultrasensitive stain for protein in polyacrilamide gel shows regional variation in celerospinal fluid protein. *Science*. 211:1437-1438.
- **Mertens PPC** and Sangar DV. **1985**. Analysis of the terminal sequences of the genome segments of four orbiviruses. 371-387. In T.L. Barber and MM Jochim (ed), *Bluetongue and related orbiviruses*. Alan R. Lis, Inc., New York.
- **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.
- **Mosel RC**, 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**, Ohshima A, Aboudy Y, et al. **1990**. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to feline and canine origin. *J Clin Microbiol* 28:1198-1203.
- **Nagakomi T**, Nakagomi O. **1989**. RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. *J Virol* 63:1431-4.
- **Nagakomi T**, Nakagomi O. **2000**. Human rotavirus HCR3 possesses a genomic RNA constellation indistinguishable from that of feline and canine rotaviruses. *Arch virol* 145:2403-9.
- **Nagakomi 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
- **Nielsen NM**, Eugen-Olsen J, Aaby P, et al., **2005**. Characterisation of rotavirus strains among hospitalised and non-hospitalised children in Guinea-Bissau, 2002: a high frequency of mixed infections with serotype G8. *J Clin Virol*, 34:13-21.
- **Nishimura S**, Ushijima H, Nishimura S, et al., **1993**. Detection of rotavirus in cerebrospinal fluid and blood of patients with convulsion and gastroenteritis by means of the reverse transcription polymerase chain reaction. *Brain Dev* 15(6) 457-459.
- **O'Halloran F**, Lynch M, Cryan B, et al., **2000**. Molecular characterization of rotaviruses in Ireland: detection of novel strains circulating in the population. *J Clin Microbiol*. 38:3370-3374

- **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.
- **Okada Y**, Richardson MS, Ikegami N, et al., **1984** Nucleotide sequence of human rotavirus genome 10, an RNA encoding a glycosylated virus protein. *J. Virol.* 51: 856-859.
- **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
- **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 EA**, Bishop RF, Cotton RG. **1993**. Intra- and inter-season genetic variability in the VP7 gene serotype 1 (monotype 1 a) rotavirus clinical isolates. *Arch Virol.* 130:57-69.
- **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, Gentsh JR., et al., **1998**. Rotavirus. *Emerg Infect Dis* 4:561-70.
- **Parashar UD**, Hummelman EG, Bresee JS, et al., **2003**. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 9:565-572.
- **Parashar UD**, Gibson CJ, Bresee JS, et al., **2006**. Rotavirus and childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12:304-306.
- **Patel MM**, Steele D, Gentsh JR, et al., **2011**. Real-world impact of rotavirus vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 30(Suppl 1):S1-S5.
- **Patel MM**, Glass R, Desai R, et al., **2012**. Fulfilling the promise of rotavirus vaccines: how far have we come since licensure? *Lancet Infect Dis.* 12(7):561-70.
- **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**. **1990**. Evidence for equimolar synthesis of double-stranded RNA and minus strand RNA in rotavirus-infected cells. *Virus Res.* 17, 199-208.
- **Patton JT**. **1995**. Structure and function of the rotavirus RNA-binding protein. *J. Gen. Virol.* 76, 2633-2644.
- **Patton JT**, et al., **1997**. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J. Virol.* 71, 9618-9626.
- **Patton JT** et al. **2004**, Replication and transcription of the rotavirus genome. *Curr Pharm Des.*; 10:3769–3777.
- **Patton JT**, Silvestri LS, Tortorici MA, et al., **2006**. Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309, 169-197.
- **Patton JT** et al., **2007**. Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. *Adv. Virus Res.* 69,167-201.
- **Paulke-Korinek**, Rendi-Wagner P, Kundi M, et al., **2010**. Universal mass vaccination against rotavirus gastroenteritis: impact on hospitalization rates in austrian children. *Pediatric Infectious Disease Journal* 29:319-323
- **Pesavento JB**, et al., **2006**. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309, 189-219.

- **Petrie BL**, Graham DY, Hansenn H. **1982**. Localization of rotavirus antigens in infected cell by ultrastructural immunocytochemistry. *J. Gen. Virol.* 43:457-467.
- **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** et al. **1977**. Faecal leukocytes in enteric infections. *American Journal of Clinical Pathology*, 68:562–565.
- **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.
- **Pickering LK**, et al., **2007**. Faecal leukocytes in enteric infections. *American Journal of Clinical Pathology*. 68:562-565.
- **Piron M**, Vende P, Cohen J, et al. **1998**. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interact with eIF4GI and evict the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* 17, 5811-5821.
- **Piron M**, Delaunay T., Grosclaude J, et al., **1999**. Identification of the RNA-binding dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus non structural protein NSP3. *J. Virol.* 73, 5411-5421.
- **Pitzer VE**, Viboud C, Simonsen L, et al., **2009**. Demographic variability, vaccination and spatiotemporal dynamics of rotavirus epidemics. *Science*325:290-294.
- **Pitzer VE**, Viboud C, Lopman BA, et al., **2011**. Influence of birth rates transmission rates on the global seasonality of rotavirus incidence. *J R Soc Interface.* 8(64):1584-93.
- **Pocok DH.** **1987**. Isolation and characterization of two group A rotaviruses with unusual genome profiles. *J. Gen. Virol.* 68: 653-660.
- **Poncet D**, Aponte C, Cohen J, **1993**. Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *Journal of Virology.* 67:3159-3165.
- **Poncet D**, Lindenbaum P. L'Haridon R, et al., **1997**. In vivo and in vitro phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasm. *Journal of virology.* 71:34-41.
- **Pongsuwanna Y**, Guntapong R, Chiwakul M, et al., **2002**. Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. *J Clin Microbiol* 40:1393-1394.
- **Prasad BV**, Rothnangel R, Zeng CQ, et al., **1996**. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature.* 382:471-473.
- **Prasad BVV**, Burns JW, Marietta E, et al., **1988**. Three dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199:269-275-
- **Prasad BVV**, Burns JW, Marietta E, et al., **1990**. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryoelectron microscopy. *Nature.* 343(6257):476-9.
- **Ramachandran M**, Gentsch JR, Parashar UD, et al., **1998**. Detection and characterization of a novel rotavirus strain in United States. *J Clin Microbiol.* 36:3223-3229.
- **Ramachandran M**, Kirkwood CD, Unicomb L, et al., **2000**. Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strain from a global collection. *Virology* 278:436-444.
- **Ramani S**, Banerjee I, Gladstone BP, et al., **2007**. Geographic information system and genotyping in identification of rotavirus G12 infections in residents

- of an urban slum with subsequent detection in hospitalized children: emergence of G12 genotype in Hungary. *J Med Virol* 71:124-134.
- **Ramig RF. 2004.** Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J. Virol.* 78:10213-10220
 - **Ramig RF, Ciarlet M, Mertens PPC, et al., 2005.** Rotavirus. In Faquet CM, Mayo MA, Mainloff J, Desselberg U, Ball LA, editors. *Virus Taxonomy: Eight report of the International Committee on taxonomy of viruses.* Elsevier. Academic Pres, Amsterdam Holland 2005. p.484-496.
 - **Ramig R.F. 2007.** Systemic rotavirus infection. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.;* 5(4): 591-612
 - **Ray P, Fenaux M, Sharma S, et al., 2006.** Quantitative evaluation of rotaviral antigenemia in children with acute rotaviral diarrhea. *J Infect Dis* 194(5):588-593.
 - **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.
 - **Reves RR et al. 1989.** An observational study of naturally acquired immunity to rotaviral diarrhoea in a cohort of 363 Egyptian children. Calculation of risk for second episodes using age-specific person-years of observation. *American Journal of Epidemiology*, 130:981-988
 - **Richardson SC, Grimwood K, Bishop RF. 1993.** Analysis of homotypic and heterotypic serum immune responses to rotavirus protein following primary rotavirus infection by using radioimmunoprecipitation technique. *J Clin Microbiol.* 31:377-85.
 - **Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M, et al., 2010.** Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *New England Journal of Medicine.* 362:299-305.
 - **Richardson V, Parashar U, Patel M., 2011.** Childhood diarrhea deaths after rotavirus vaccination in Mexico. *New England Journal of Medicine.* 365:772-773.
 - **Rodriquez WJ, et al., 1977.** Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infant and young children. *The Journal of Pediatrics.* 91:188-193.
 - **Roseto A, Esgaig J, Delain E. 1979.** Structure of rotaviruses as studied by the freeze-drying technique. *Virol* 98:471-475.
 - **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.
 - **Ruggeri FM, Petouchoff T, Delogu R, et al. 2009.** Molecular epidemiology of rotavirus in Italy, 2007-2008. Second report of the Italian RotaNet surveillance program. In: *Proceeding of the 10th International Symposium on double-stranded RNA viruses.* Hamilton Island, QLD, Australia, 21-25 June 2009, p. abs#093;
 - **Ruggeri FM, Fiore L., 2012.** Vaccine preventable viral diseases and risks associated with waterborne transmission. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 48: 460-472.
 - **Ruiz MC, Leon T, Diaz Y et al., 2009.** Molecular Biology of Rotavirus Entry and Replication. *TheScientificWorldJournal.* 9:476-1497.
 - **Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael, Velasquez FR, et al., 2006.** Safety and efficacy of an 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 America infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24(9):807-816.
- **Santos N**, Lima RRC, Perreia CFA, et al., **1998**. Detection of rotavirus type G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 36:2727-2729.
- **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
- **Santosham M**, Yolken RH, Quiroz E et al., **1983**. Detection of rotavirus in respiratory secretions of children with pneumonia. *J. Pediatr.* 103:583-585.
- **Sattar SA**, Raphael RA, Springhorpe VS. **1984**. Rotavirus survival in conventionally treated drinking water. *Can J Microbiol.* 30(5):653-6.
- **Shaw AL**, Rothnangel R, Zeng CQ , et al. **1996**. Rotavirus structure: interactions between the structural protein. *Arch. Virol. Suppl.* 12, 21-27.
- **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.
- **Silvestri LS**, Taraporewala ZF, Patton JT., **2004**. Rotavirus replication plus-sense templates for double-stranded RNA syntesis are made in viroplasm. *J. Virol* 78, 7763-7774.
- **Snodgrass DR**, Ojeh CK, Cambell I, et al.,**1984**. Bovine rotavirus serotype and their significance for immunization. *J Clin Microbiol* 20:342-346.
- **Soriano-Gabarro M**, Mrukovicz J, Vesikari T, et al., **2006**. Burden of rotavirus disease in European union countries. *Pediatr. Infect Dis J.*25:S7-S11.
- **St Geme JW 3rd**, Hyman D, **1988**. Hepatic injury durin rotavirus infection. *J Pediatr.* 113(3):952-953.
- **Steele AD**, Ivanoff B. Rotavirus strain circulating in Africa during 1996-1999: emergence of G9 strains and P[6] strains. *Vaccine.* 21:361-367.
- **Steele AD**, Nimzing L, Peenze I, et al., **2002**. Circulation of the novel G9 and G8 rotavirus strain in Nigeriain 1998/1999. *J Med Virol* 67:608-12.
- **Steinoff MC.** **1980**. Rotavirus: the first five years. *The Journal of Pediatrics.* 96: 611-622.
- **Svensson L**, Sheshberadaran H, Vesikari T, et al., **1987**. Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologus rotavirus vaccines (RIT 4237. RRV-1). *J. Gen. Virol.* 68:1993-9.
- **Tamura K**, Peterson D, Peterson N, et al., **2011**. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28:2731–9.
- **Tanaka G**, Faruque AS, Luby SP, et al., **2007**. Death from rotavirus diseases in Bangladeshi children: estimated from hospital based surveilance. *Pediatr Infect Dis.* 134:908-916.
- **Taniguchi K**, Hoshino K, Nishikawa K, et al., **1988**. Cross-reactive and serotype-specific neutralization epitopes on VP7 of human rotavirus:niucleotide

- sequence analysis of antigenic mutants selected with monoclonal antibodies. *J. Virol* 62:1870-1874.
- **Taraporewala ZF**, Patton JT. **2001**. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *Journal of virology* 73: 9934-9943.
 - **Tate JE**, Panozzo CA, Payne DC, **2009**, Decline and change in seasonality of US rotavirus activity after the introduction of rotavirus vaccine. *Pediatrics* 124:465-471
 - **Tate JE**, Davidson GP, Holmes HI, et al., **2011**. 2008 estimate of worldwide rotavirus associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70253-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70253-5).
 - **Teitelbaum JE**, Daghistani R. **2007**. Rotavirus causes hepatic transaminase elevation. *Dig. Dis. Sci.* 52(12):3396-3398.
 - **Tortorici MA**, et al., **2003**. Template recognition and formation of initiation complexes by the replicase of a segmented double-stranded RNA virus. *J. Biol. Chem.* 278,32673-32682.
 - **Trojnar E**, Sachsenroder J, Twardziok S, et al., **2013**. Identification of avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 94:136-142.
 - **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**, Olding-Stenkvisit E, Kreuger A. **1986**. Clinical features of acute gastroenteritis associated with rotavirus, enteric adenoviruses and bacteria. *Archives on Childhood.* 61:732-738.
 - **Unicomb LE**, Podder G, Gentsch JR, et al., **1999**. Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strain in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995. *J Clin Microbiol* .37:1885-1891.
 - **Valenzuela S**, Pizarro J, Sandino AM, et al., **1991**. Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *Journal of Virology.* 65: 3964-3967.
 - **Van Damme P**, Giaquinto C, Huet F, et al., **2007**. Multicenter prospective study of the burden acute gastroenteritis in Europe.2004-2005 the REVEAL study. *J Infect Dis* 195: (Suppl 1)S4-S16.
 - **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.
 - **Velasquez FR**, Matson DO, Calva JJ, et al., **1996**. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infection. *N Engl J Med.* 335:1022-1028.
 - **Velazquez FR**, Matson DO, Guerrero ML, et al., **2000**. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis* 182:1602-9.
 - **Vende P**, Piron M, Castagne N, et al., **2000**. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and mRNA 3' end. *J. Virol.* 74, 7064-7071.

- **Vesikari T**, Matson DO, Denney P, et al., **2006**. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *New England Journal of Medicine* 354:23-33.
- **Vesikari T**, Karvonen A, Prymula R, et al., **2007**. Efficacy of human rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. *Lancet*. 370:1757-1763.
- **Vesikari T**, Karvonen A, Ferrante SA, et al., **2010**. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine RotaTeq® , in Finnish infants up to 3 years of age: the Finnish Extension Study. *Eur J Pediatr*. 169:1379-1386
- **Vesikari T**. **2012**. Rotavirus vaccination: a concise review. *Clinical Microbiology and Infections*. 18 (Suppl 5):57-63.
- **Vizzi E**, Calvino E, Gonzales R, et al., **2005**. Evaluation of serum antibody responses against rotavirus non-structural protein NSP4 in children after rhesus rotavirus tetravalent vaccination or natural infection. *Clin Diag Lab immunol*. 12:1157-63.
- **Ward RL**, Bernstein DI **1994**. Protection against rotavirus disease after natural rotavirus infection. US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *The Journal of Infectious Diseases*, 169:900–904.
- **Ward RL**. **1996**. Mechanism of protection against rotavirus in humans and mice. *J Infect Dis*. 174 (Suppl 1): S51-8.
- **Ward RL**, Bernstein DI. **2009**. Rotarix: a rotavirus vaccine for the world. *Vaccines*. 48:222-228.
- **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.
- **Welch SK**, Crawford SE, Estes MK., **1989**. Rotavirus SA11 genome segment 11 protein is a nonstructural phosphoprotein. *Journal of Virology* 63: 3974-3982.
- **Whitby HJ**, Rodgers FG. **1980**. Detection of virus particles by electron microscopy with polyacrylamide hydrogel. *J Clin Pathol*; 33: 484-7.
- **Whithe DO**, Fenner FJ. **1986**. *Medical virology*. 3^o ed Academic Press Inc. London: 575-584.
- **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*. 16:906-910.
- **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**, et al., **1979**. Diarrhoea associated with rotavirus in rural Guatemala: a longitudinal study of 24 infants and young children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 28:325-328.
- **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.

- **Yen C**, Figueroa JR, Uribe ES, et al., **2011**. Monovalent rotavirus vaccine provides protection against an emerging fully heterotypic G9P[4] rotavirus strain in Mexico. *Journal of Infectious Diseases*. 204:783-786.
- **Yoder JD**, Domrmitzer PR. **2006**. Alternative intermolecular contacts underlie the rotavirus VP5* two-to three fold rearrangement. *EMBO J*. 25 1559-1568.
- **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.
- **Zheng BJ**, Chang RX, Ma GZ, et al., **1991**. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. *J. Med. Virol*. 34:29-37.
- **Zhou Y**, Li L, Okitsu S, et al., **2003**. Distribution of human rotaviruses, especially G9 strains, in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol Immunol* 47:591-597.
- **Zissis G**, Lambert JP, Deicegel D. **1978**. Routine diagnosis of human rotavirus in stools. *J. Clin Pathol* 31:175-178.
- **Zissis G**, Lambert JP, Marbehant P, et al., **1983**. Protection studies in colostrum-deprived piglets of a bovine vaccine candidate using a rotavirus human strains for challenge. *J. Infect. Dis*. 148:1061-1068.
- **Zuccotti G**, Meneghin F, Dilillo D, et al., **2010**. Epidemiological and clinical features of rotavirus among children younger than 5 years of age hospitalized with acute gastroenteritis in Northern Italy. *BMC Infect Dis*. 10:218.
- **Zucherman AJ**, Banatlava JE and JR Patison Editori, **1995**. Principles and practice of clinical virology Pp 190-227.

PRODUZIONE SCIENTIFICA

Lavori scientifici pubblicati su riviste internazionali

MC Medici, LA Abelli, **P Guerra**, I Dodi, G Dettori, C Chezzi. 2011. *Case report: detection of rotavirus RNA in the cerebrospinal fluid of a child with rotavirus gastroenteritis and meningism.* Journal of Medical Virology, 83:1637-1640. IF 2.821

MC Medici, F Tummolo, **P Guerra**, MC Arcangeletti, C Chezzi, F De Conto, A Calderaro. 2013. *Evidence of VP7 and VP4 intra-lineage diversification in G4P[8] Italian human rotaviruses.* Virus Genes [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s11262-013-1026-8 IF 1.769

Lavori scientifici pubblicati sotto forma di riassunto e presentati a congressi internazionali

M.C. Medici, L.A. Abelli, **P. Guerra**, G. Dettori, C. Chezzi. *Rotavirus RNA in cerebrospinal fluid of a child with meningism and rotavirus gastroenteritis : molecular analysis of NSP3, NSP4 VP4, VP6 and VP7 genes reveals amino acid mutation.* The Third European Rotavirus Biology Meeting, Loch Lomond, Scotland, 13-16 September 2009, p. 26.

Maria Cristina Medici, Fabio Tummolo, **Paola Guerra**, Francesco Corpus and Carlo Chezzi. *Temporal fluctuation of G4P[8]rotaviruses do not correlate with changes in the VP7 antigenic regions.* Fourth European Rotavirus Biology Meeting, S. Trada di Cannitello, Villa San Giovanni, 2-5 ottobre 2011. Abstract book pag. 48.

Medici MC, Tummolo F, **Guerra P**, Giammanco GM, Arcangeletti MC, De Conto F, Chezzi C, and Calderaro A. *Phylogenetic analysis of the VP4 gene evolution of P[8] rotaviruses circulating since 1987 in the area of Parma, Italy.* 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlino, Germania, 27-30 aprile 2013, abstract 2706;

Lavori scientifici pubblicati sottoforma di riassunto e presentati a congressi e convegni nazionali

MC Medici, LA Abelli, **P Guerra**, G Dettori, C Chezzi. *Analisi molecolare dei geni NSP3, NSP4, VP4, VP6 e VP7 di un ceppo di rotavirus rivelato nel liquor di una bambina con gastroenterite e meningismo.* In: CD dei riassunti. 37° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Torino, 11-14 ottobre 2009, p. 219.

Medici Maria Cristina, **Guerra Paola**, Tummolo Fabio, Albonetti Valeria, Dettori Giuseppe, Chezzi Carlo. *Variazioni genetiche dei ceppi di rotavirus G2P[4] circolanti nel nord Italia: risultati preliminari*. 38° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Riccione 17-20 ottobre 2010, CD “Riassunti”, pag 132.

Medici Maria Cristina, **Guerra Paola**, Allbonetti Valeria, Tummolo Fabio, Dettori Giuseppe, Chezzi Carlo. *Caratterizzazione molecolare dei geni VP4 e VP7 di due rari rotavirus di genotipo G8P[14] e G10P[14] rivelati in bambini con gastroenterite*. 38° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Riccione, 17-20 ottobre 2010, CD “Riassunti” pag 130.

Medici Maria Cristina, Tummolo Fabio, **Guerra Paola**, Corpus Francesco e Chezzi Carlo. *Diversità genetica ed evoluzione dei ceppi G4P[8] di rotavirus circolanti nell'area di Parma nel periodo 2004-2010*. 39° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Riccione. 03-06 ottobre 2011, CD “riassunti” pag 160.

Medici MC, Tummolo F, **Guerra P**, Arcangeletti MC, De Conto F, Giammanco GM, Chezzi C, Calderaro A. *Analisi filodinamica di rotavirus di specificità P[8] circolanti nell'area di Parma*. 40° Congresso Nazionale -della Società Italiana di Microbiologia, Riccione, 7-10 ottobre 2012. Bollettino della SIM Anno XIV N. 1 pag. 165.

Medici MC, Tummolo F, **Guerra P**, Chezzi C, De Conto F, Arcangeletti MC, Calderaro A. *Diversificazione intralignaggio in ceppi G4P[8] di rotavirus*. 41° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Riccione 13-16 ottobre 2013. Bollettino della SIM, ottobre 2013.

Partecipazione a progetti di ricerca

Progetto PRIN 2008 prot. 2008F4P7X_004 Finanziato dal Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca, coordinatore nazionale Prof Vito Martella; Responsabile scientifico di unità di ricerca Prof.ssa Maria Cristina Medici.