



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali

Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute

Corso di Dottorato di Ricerca in Sanità Pubblica  
XXVII ciclo

**SORVEGLIANZA DEL MORBILLO ED  
APPROCCI INNOVATIVI DI FILOGENETICA  
NELL'AMBITO DEL GLOBAL MEASLES  
STRATEGIC PLAN 2012-2020**

Tesi di:  
**Alberto Ranghiero**  
Matricola R09642

Tutor: Dott.ssa Antonella Amendola  
Coordinatore del dottorato: Prof.ssa Elisabetta Tanzi

A.A.  
2013 - 2014

*La vita è come andare in bicicletta,  
per mantenere l'equilibrio devi muoverti*

# Indice

## Sommario

Indice .....	2
Introduzione .....	6
<b>1. Morbillo .....</b>	<b>7</b>
1.1. Eziologia .....	7
1.2. Cenni clinici .....	8
1.3. Patogenesi .....	8
1.4. Complicanze .....	10
1.5. Epidemiologia .....	11
<b>2. Famiglia Paramyxoviridae .....</b>	<b>13</b>
2.1. Struttura del virione .....	14
2.2. Organizzazione del genoma .....	16
2.3. Ciclo replicativo .....	17
<b>3. Epidemiologia .....</b>	<b>19</b>
3.1. Origine e diffusione dell'epidemia .....	19
3.2. Cenni storici ed epidemiologi sul morbillo nell'era pre-vaccinale .....	19
3.3. Attuale situazione epidemiologica .....	20
<b>4. Vaccino antimorbillo .....</b>	<b>22</b>
4.1. Vaccino MPR .....	23
<b>5. Programma d'eradicazione del morbillo e della rosolia congenita .....</b>	<b>25</b>
5.1. Attuale situazione epidemiologica .....	26
5.2. Sorveglianza integrata del morbillo e della rosolia .....	27
<b>6. Sorveglianza del morbillo e caratterizzazione dei genotipi circolanti .....</b>	<b>28</b>
6.1. Genotipi di morbillo e relativa distribuzione geografica .....	28
6.2. Sorveglianza virologica in America .....	29
6.3. Sorveglianza virologica in Africa .....	29
6.4. Sorveglianza virologica in Asia .....	29
6.5. Sorveglianza virologica in Europa .....	30
<b>Scopo .....</b>	<b>31</b>
<b>7. Scopo .....</b>	<b>32</b>
<b>Materiali e metodi .....</b>	<b>33</b>
<b>8. Sorveglianza integrata di morbillo e rosolia .....</b>	<b>34</b>
8.2. Definizione di caso .....	34
8.3. Modalità di raccolta e conservazione dei campioni .....	34
<b>9. Casistica in studio .....</b>	<b>36</b>

<b>10. Identificazione degli acidi nucleici virali in campioni clinici.....</b>	<b>37</b>
10.1. Estrazione dell'RNA da campioni respiratori e/o da urina .....	37
10.2. Identificazione dell'RNA virale mediante real time RT-PCR.....	38
<b>11. Caratterizzazione molecolare dei morbillivirus .....</b>	<b>40</b>
11.1. Retrotrascrizione dell'RNA virale e amplificazione del gene N .....	40
11.2. Rilevamento dei prodotti di PCR.....	41
11.3. Purificazione dei prodotti di amplificazione.....	42
11.4. Sequenziamento.....	43
<b>12. Analisi dei dati di sequenzia .....</b>	<b>45</b>
12.1. <i>Editing</i> delle sequenze .....	45
12.2. Allineamento delle sequenze.....	45
<b>13. Analisi filogenetiche .....</b>	<b>54</b>
13.1. Analisi filodinamica .....	54
13.2. Analisi della pressione selettiva.....	56
<b>Risultati 58</b>	
<b>14. Profilo epidemiologico del morbillo in Lombardia nel biennio 2013-2014 .....</b>	<b>59</b>
14.1. Casi di morbillo in Lombardia da luglio 2013 a novembre 2014.....	59
14.2. Sorveglianza integrata morbillo - rosolia in Lombardia .....	61
<b>15. Profilo genetico dei ceppi di morbillivirus circolanti in Lombardia .....</b>	<b>64</b>
15.1. Prevalenza dei genotipi virali.....	64
15.2. Studio epidemiologico-molecolare dei genotipi virali circolanti in Lombardia .....	65
15.3. Genotipo D8 .....	65
15.4. Genotipo B3 .....	67
15.5. Genotipo D9 .....	68
<b>16. Analisi filodinamica delle sequenze in studio.....</b>	<b>69</b>
16.1. Genotipo D8 .....	69
16.1.1. Stima dell'evolutionary rate.....	69
16.1.2. Stima del time of the most recent commune ancestor (tMRCA) delle sequenze appartenenti al genotipo D8 .....	69
16.1.3. Dinamiche di popolazione .....	70
16.1.4. Analisi della pressione selettiva .....	70
16.2. Genotipo B3 .....	71
16.2.1. Stima dell'evolutionary rate.....	71
16.2.2. Stima del tMRCA delle sequenze appartenenti al genotipo B3 .....	71
16.2.3. Dinamiche di popolazione .....	71
16.2.4. Analisi della pressione selettiva .....	72

16.3. Genotipo D9 .....	73
16.3.1. Stima dell'evolutionary rate.....	73
16.3.2. Stima del tMRCA delle sequenze appartenenti al genotipo D9.....	73
16.3.3. Dinamiche di popolazione .....	73
16.3.4. Analisi della pressione selettiva .....	74
<b>Conclusioni</b> .....	75
<b>17. Conclusioni</b> .....	76
Elenco delle figure e delle tabelle .....	81
<b>18. Elenco delle figure:</b> .....	82
<b>19. Elenco delle tabelle:</b> .....	83
Bibliografia .....	85
<b>20. Bibliografia</b> .....	86

# Introduzione

## 1. Morbillo

Il morbillo è una malattia virale esantematica, altamente contagiosa e diffusiva. Essa è causata da un virus appartenente alla famiglia *Paramyxoviridae*, genere *Morbillivirus*. Si manifesta come malattia infettiva acuta, caratterizzata da febbre, sintomi respiratori e *rash* maculo-papulare. Colpisce principalmente, ma non esclusivamente, durante l'infanzia. Storicamente è stata una delle malattie più comuni ed importanti per le frequenti e serie complicanze. Tuttora, sebbene la vaccinazione abbia ridotto il problema, rimane una delle principali cause di malattia e di mortalità tra le popolazioni dell'infanzia.

### 1.1. Eziologia

L'agente eziologico è il virus del morbillo (*measles virus*, MeV), isolato per la prima volta nel 1954 da Enders e Peebles (1) (figura 1).

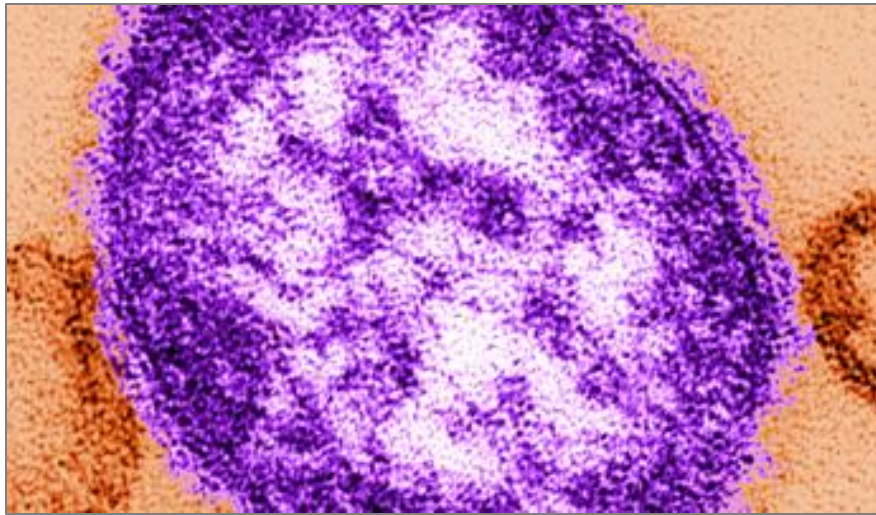


Figura 1: Virus del morbillo al microscopio elettronico.

Il virione presenta un diametro di 120 – 250 nm, contiene RNA lineare a singolo filamento a polarità negativa, a simmetria elicoidale e possiede un involucro lipoglicoproteico. Il virus è composto da 6 proteine strutturali: 3 complessate con l'RNA e 3 associate con l'involucro. Avvenuta l'infezione il virus è presente nella faringe, nella congiuntiva, nel sangue, nelle urine e in altri tessuti nel malato

Il virus del morbillo è poco resistente nell'ambiente e sopravvive in natura unicamente tramite una catena ininterrotta d'infezioni acute. L'uomo rappresenta l'unico serbatoio naturale del virus, poiché, nonostante anche le scimmie siano suscettibili all'infezione, esse, vivendo in piccoli gruppi, non sono effettivamente in grado di sostenere efficacemente la trasmissione virale e quindi la sopravvivenza del virus in natura.



## 1.2. Cenni clinici

L'infezione da virus del morbillo decorre nei soggetti suscettibili in maniera quasi sempre sintomatica. Il decorso può essere suddiviso in quattro periodi:

- periodo d'incubazione: in questo periodo (9 – 12 giorni) non vi sono modificazioni rilevanti delle condizioni generali;
- periodo d'invasione: è clinicamente caratterizzato da febbre e dall'interessamento delle mucose. Inoltre è rilevabile nel 80% dei casi l'enantema tipico, segno di Koplik: piccole chiazze irregolari, di colore rosso vivo con una zona centrale biancastra, localizzate sulla mucosa delle guance in corrispondenza dei molari. Tali chiazze si presentano in numero variabile e scompaiono nel momento in cui l'enantema raggiunge l'apice;
- periodo esantematico: al 14° giorno dal contagio compare la caratteristica eruzione cutanea. L'esantema è composto da maculo-papule che si manifestano inizialmente sul viso e che si estendono poi su tutto il corpo. Le piante dei piedi e le palme delle mani non sono, invece, interessate dall'eruzione cutanea. In questo periodo possono essere evidenti lievi alterazioni neurologiche; si presenta, inoltre, la febbre elevata;
- periodo di risoluzione: 5 -6 giorni dopo la comparsa dell'esantema la febbre diminuisce rapidamente, lo stato generale migliora ed il *rash* cutaneo si attenua fino alla completa scomparsa.

## 1.3. Patogenesi

Il corso della malattia, in assenza di complicanze, è di 15-20 giorni ed inizia con l'ingresso del virus per via aerea, tramite le goccioline respiratorie. Il virus si lega al recettore SLAM (*signaling lymphocytic activation molecule*, anche noto come CD150) delle cellule del tratto respiratorio di ospiti suscettibili (2). Dopo un'iniziale replicazione nel tratto respiratorio, il virus raggiunge i linfonodi, dove avviene una seconda ed intensa replicazione virale, e quindi raggiunge il sistema circolatorio (3) (4) (5) (figura 2).

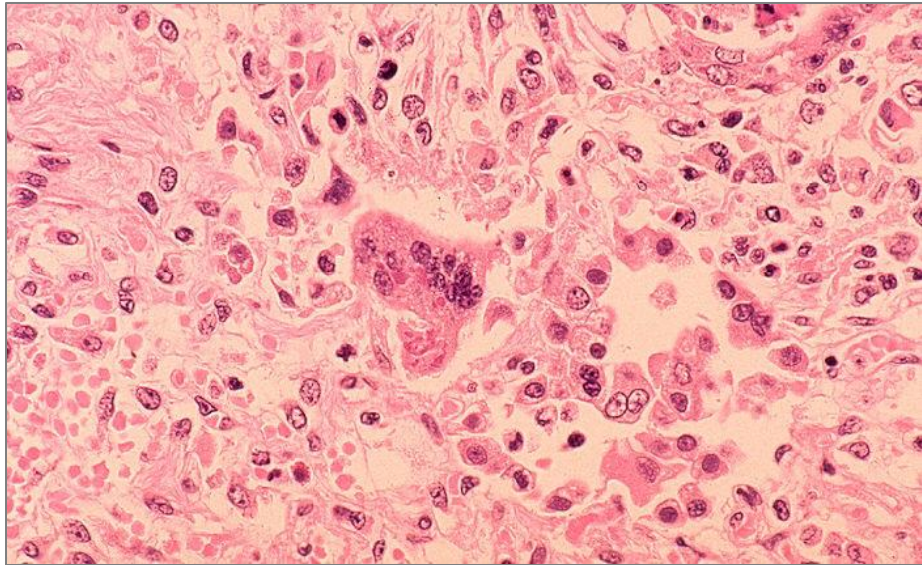


Figura 2: Foto al microscopio di cellule giganti con inclusioni intra-citoplasmatiche.

Dopo un periodo di incubazione che può variare da un minimo di 7 ad un massimo di 18 giorni (solitamente circa 10 giorni), si ha la comparsa di febbre, raffreddore, tosse secca, congiuntivite, chiazze rossastre sulla mucosa della bocca e della faringe e macchioline bianche sulle gengive, all'altezza dei molari (macchie di Koplik, in figura 3) (6).

Attraverso il circolo sanguigno, il virus del morbillo viene quindi rilasciato dal tratto



Figura 3: Macchie di Koplik.

respiratorio alle cellule epiteliali, utilizzando il recettore nectina-4 per legarsi alle cellule dell'epitelio (7) (8) (9). Questo periodo dura 4-5 giorni, al termine del quale compare un'eruzione cutanea maculo-papulosa che si presenta sul viso e che si estende poi a tutto il corpo. L'inizio dell'esantema è solitamente accompagnato da un innalzamento della febbre che diminuisce poi piuttosto rapidamente. L'esantema scompare dopo 3-4 giorni a seguito dell'attivazione di una risposta specifica immunologica contro il virus.

In figura 4 è mostrato uno schema della patogenesi della malattia, dall'infezione virale al recupero.

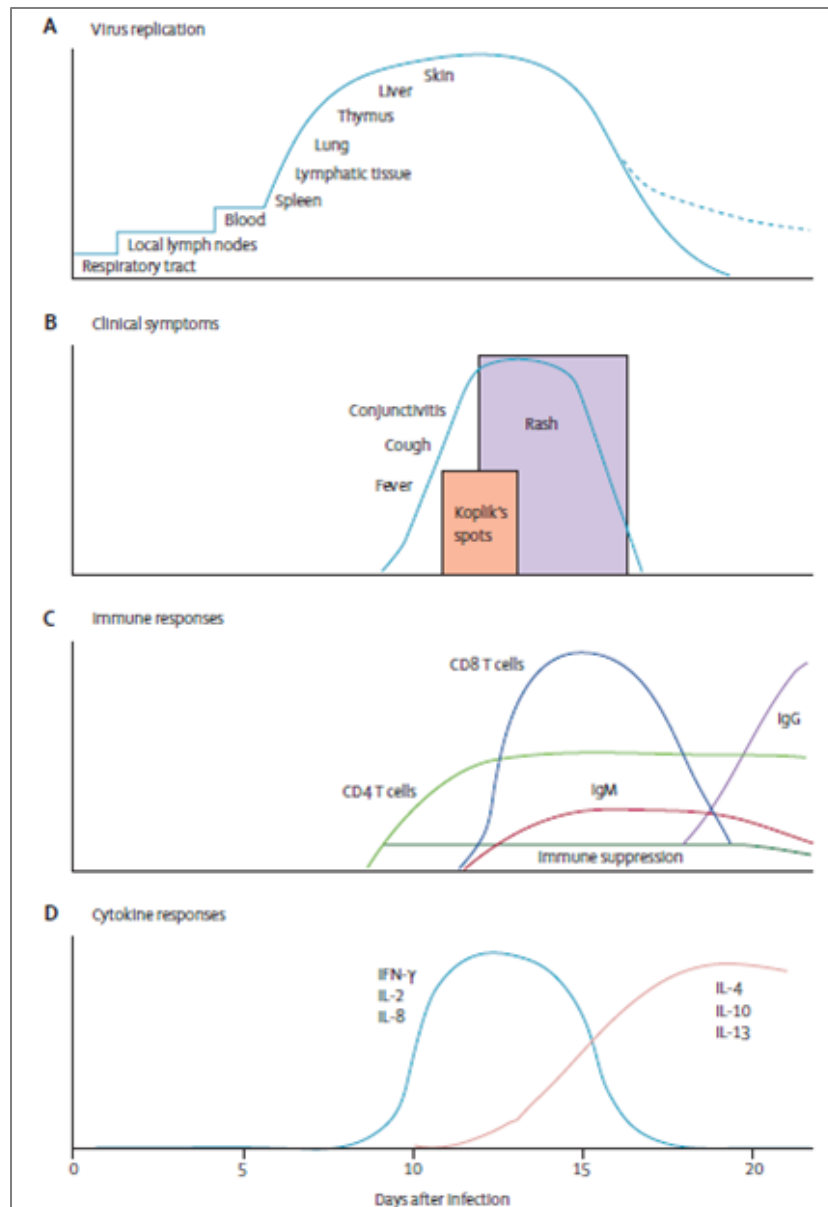


Figura 4: fasi della patogenesi del morbillo.

#### 1.4. Complicanze

Le complicanze possono verificarsi nel 40% dei casi di morbillo ed includono situazioni cliniche dovute all'agente virale stesso o a sovra infezione batterica. Possono portare a polmonite, diarrea, otiti medie, trombocitopenie, laringotracheobronchite, cheratocongiuntivite, pericardite/miocardite (10) (11) (12). Sono invece rare, ma molto gravi, le complicanze a livello del sistema nervoso centrale. L'encefalomielite post-infettiva può colpire con una frequenza di 0,1 – 0,2% dei casi, in particolare nei giovani e negli adulti. Si tratta di una forma di tipo demielinizzante, analoga ad altre neurassiti postinfettive o postvaccinali con cui ha probabilmente in comune la patogenesi immunoallergica. La complicanza è mortale nel 10 – 15% dei casi ed in un terzo dei

sopravvissuti permangono sequele neuropsichiche (13). Vi sono altre due complicanze che possono colpire il sistema nervoso centrale: la panencefalite sclerosante subacuta – PESS - e l'encefalite da corpi di inclusione - MIBE. Queste sono causate da un'infezione virale persistente, e sono causate da un'infezione virale persistente a livello del sistema nervoso centrale e possono verificarsi mesi o anni dopo l'infezione acuta (14) (15) (16) (17).

Le complicanze sono più frequenti in bambini sotto i 5 anni e nei paesi in via di sviluppo, come conseguenza della malnutrizione e della carenza di vitamina A (18).

Alcuni studi sembrano suggerire una mortalità più elevata del 5% nelle donne rispetto a quella riscontrata negli uomini (19). Tuttavia altri studi, più recenti, non sembrano evidenziare differenze di genere (18).

### 1.5. Epidemiologia

L'infezione è endemica (figura 5). Ma grazie alla vaccinazione di massa l'incidenza del morbillo è, quindi, in rapida diminuzione. Invece, in aree dove la copertura vaccinale non è elevata, le epidemie di morbillo tendono a manifestarsi ogni 2-3 anni in stretta dipendenza dal numero di soggetti suscettibili.

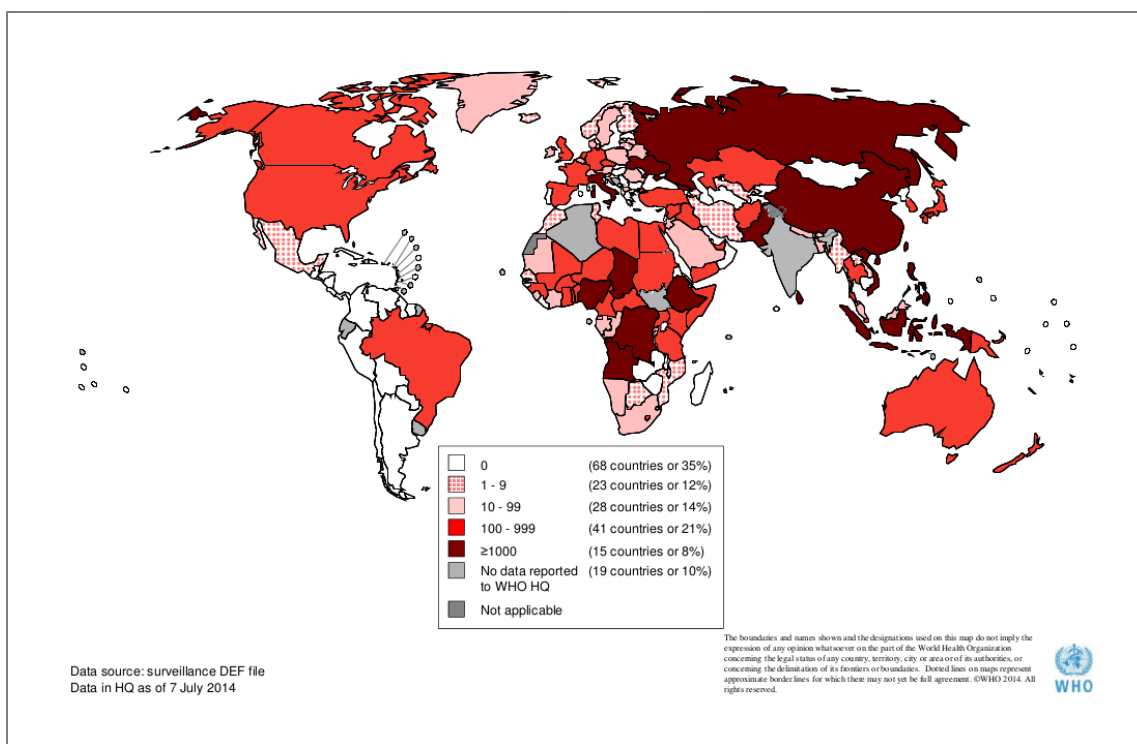


Figura 5: numero di casi di morbillo notificati nel mondo da dicembre 2013 a maggio 2014. (dati OMS)

Infatti è necessaria la presenza di individui suscettibili per mantenere la circolazione del virus.

L'infezione non ha un vero andamento stagionale, anche se le epidemie avvengono di solito nel tardo inverno e all'inizio della primavera (figura 6).

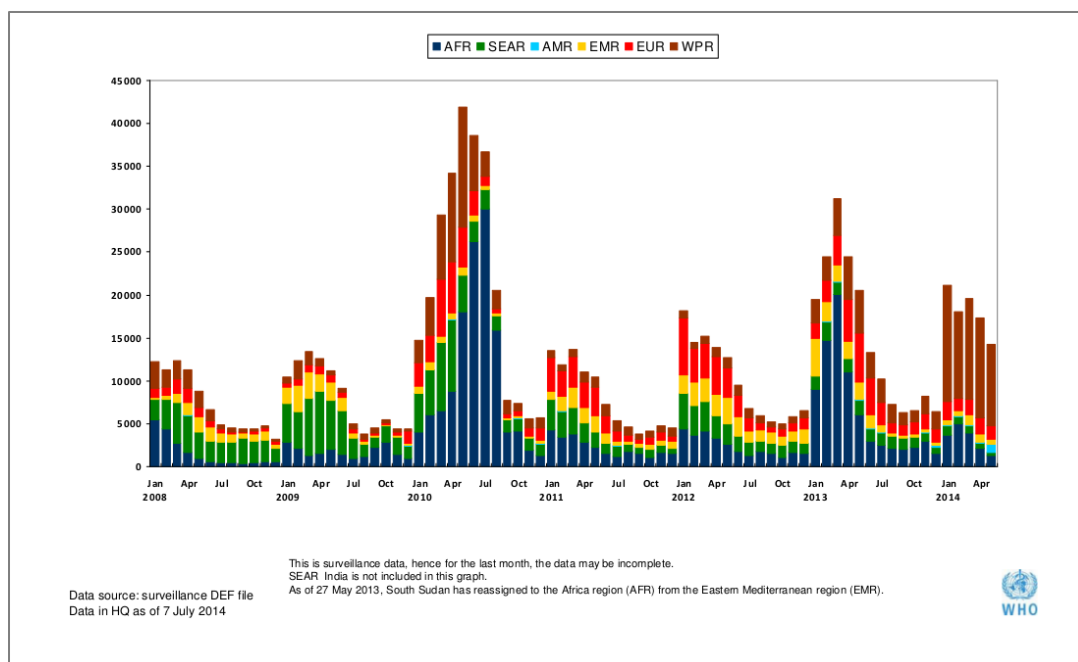


Figura 6 distribuzione temporale e geografica dei casi di morbillo (dati OMS).

Inoltre, la prevalenza e l'incidenza, per fasce d'età, dipendono dalla densità di popolazione e dalle condizioni socio-economiche.

Secondo stime dell'organizzazione mondiale della sanità (OMS), ogni anno si verificano nel mondo 45 milioni di casi di morbillo, responsabili di almeno 1 milione di morti.

Una volta superato, il morbillo conferisce un'immunità permanente.

La morbilità appare massima durante i primi due anni di vita. Nelle zone urbane la maggioranza dei bambini contrae l'infezione prima del 3° anno di vita, mentre in campagna si manifesta più frequentemente verso l'età scolare.

L'introduzione della vaccinazione di massa ha portato ad un cambiamento del quadro epidemiologico della malattia.

## 2. Famiglia *Paramyxoviridae*

E' una famiglia di virus molto grandi e particolarmente pleomorfi, appartenenti all'ordine *Mononegavirales*, in possesso di un genoma ad RNA a singolo filamento negativo di circa 15 – 16 Kb avvolto da un *envelope*.

Comprende agenti patogeni di notevole rilevanza clinica per l'uomo e viene suddivisa in due sottofamiglie. La prima, *Paramyxovirinae*, che comprende, tra gli altri, i virus parainflenzali, il virus della parotite ed il virus del morbillo. La seconda, *Pneumovirinae*, comprende al suo interno un solo virus importante per la patologia umana: il virus respiratorio sinciziale (RSV).

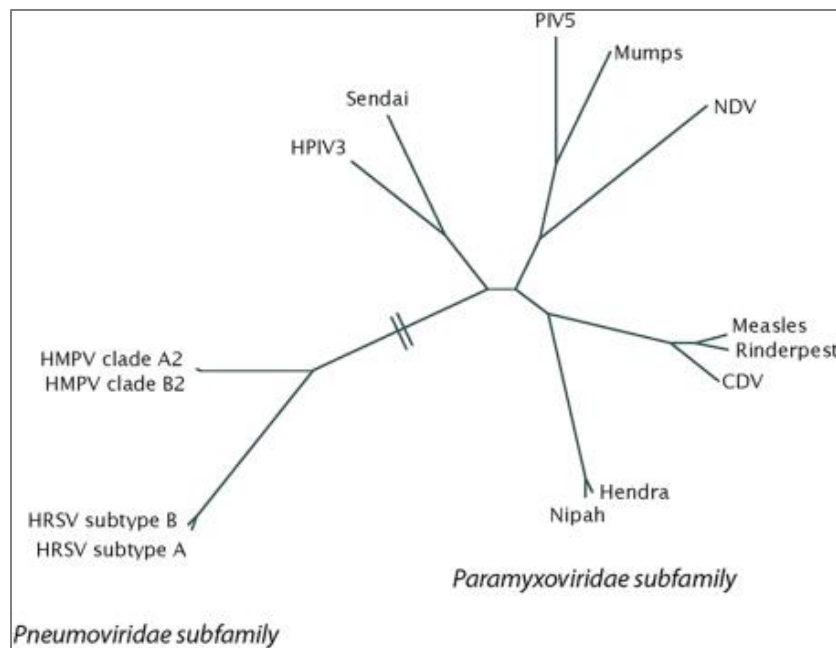


Figura 7: suddivisione filogenetica della famiglia *Paramyxoviridae*.

Oltre l'uomo, i virus appartenenti alla famiglia *paramyxoviridae* sono in grado di infettare numerosi altri animali (mammiferi e uccelli), tabella 1.

VIRUS	OSPITI	LESIONI/MALATTIE
<b>OFAMIGLIA PARAMYXOVIRINAE</b>		
<b>GENERE RESIROVIRUS</b>		
SENDAI VIRUS (SEV)	TOPO, CAVIA, RATTO, CONIGLIO, SCIMMIE	PUO' PORTARE A GRAVI MALATTIE RESPIRATORIE IN RATTI E TOPI DA LABORATORIO, A SECONDA DEI CEPPI DI ANIMALI
BOVINE PARAINFLUENZA VIRUS 3 (BPIV-3)	BOVINO, PECORA, UOMO, PRIMATI, CANE, GATTO, RODITORI	MALATTIA RESPIRATORIA IN BOVINI E PECORE
SIMIAN VIRUS 10 (SV10)	PRIMATI	
<b>GENERE RUBULAVIRUS</b>		
SIMIAN PARAINFLUENZA VIRUS 5 (SV 5)	CANE, UOMO, PRIMATI ED ALTRI MAMMIFERI	MALATTIA RESPIRATORIA NEI CANI
SIMIAN PARAINFLUENZA VIRUS 41 (SV 41)	UOMO, PRIMATI	MALATTIE RESPIRATORIE
PORCINE RUBULAVIRUS (PORV)	SUINO	ENCEFALITE NEI SUINETTI, INFERTILITÀ IN SCROFE E VERRI
MUMPS VIRUS (MUV)	UOMO	PAROTITE ENDEMICA
<b>GENERE AVULAVIRUS</b>		

NEWCASTLE DISEASE VIRUS (NDV)	VOLATILI DOMESTICI E SELVATICI	GRAVE MALATTIA GENERALIZZATA CON INTERESSAMENTO DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE
AVIAN PARAINFLUENZA VIRUS (APMV)	VOLATILI DOMESTICI E SELVATICI	MALATTIE RESPIRATORIE DEI VOLATILI
GENERE MORBILLIVIRUS		
RINDERPEST VIRUS (RPV)	BOVINO E RUMINANTI SELVATICI	PESTE BOVINA: GRAVE MALATTIA GENERALIZZATA
PESTE-DES-PETITS-RUMINANTS VIRUS (PPRV)	PECORA E CAPRA	PESTE DEI PICCOLO RUMINANTI
CANINE DISTEMPER VIRUS (CDV)	CANI, PROCIONI, MUSTELIDI	CIMURRO: GRAVE MALATTIA GENERALIZZATA CON INTERESSAMENTO DEL SISTEMA NERVOSA CENTRALE
PHOCINE DISTEMPER VIRUS (PDV)	DIVERSE SPECIE DI FOCHE	GRAVE MALATTIA GENERALIZZATA SIMILE AL CIMURRO DEL CANE
CETACEAN MORBILLI VIRUS (CEMV)	DIVERSE SPECIE DI DELFINI	GRAVE MALATTIA GENERALIZZATA SIMILE AL CIMURRO DEL CANE
MEASLES VIRUS (MEV)	UOMO	MORBILLO
GENERE HENIPAVIRUS		
HENDRAVIRUS	CAVALLO, PIPISTRELLO FRUGIVORI, GATTO, UOMO	PATOGENO EMERGENTE. GRAVE PATOLOGIA RESPIRATORIA E DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE NEL CAVALLO. CASI D'ENCEFALITE LETALE NELL'UOMO
NIPAHVIRUS	SUINI DOMESTICI E SELVAGGI, RODITORI, CAVALLO, CARNIVORI DOMESTICI, PIPISTRELLI FRUGIFERI, UOMO	PATOGENO EMERGENTE DEGLI ANIMALI E DELL'UOMO. ENCEFALITE LETALE NELL'UOMO
SOTTOFAMIGLIA PNEUMOVIRINAE		
GENERE PNEUMOVIRUS		
BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (BRSV)	BOVINO, PECORA	MALATTIA RESPIRATORIA
MURINE PNEUMONIA VIRUS (MPV)	RODITORI	INFEZIONE SUB-CLINICA. POLMONITE NEGLI IMMUNODEPRESSI
HUMAN RESOIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (HRSV)	UOMO	POLMONITI
GENERE METAPNEUMOVIRUS		
TURKEY RHINOTRACHEITIS VIRUS (TRTV)	TACCHINO	RINOTRACHEITE INFETTIVA

Tabella 1: Malattie causate dai virus della famiglia *Paramyxoviridae* nei diversi ospiti animali.

## 2.1. Struttura del virione

I virus di questa famiglia sono di forma variabile, approssimativamente sferici con un diametro che va da 150 a 300nm, anche se al microscopio elettronico possono essere facilmente osservate forme filamentose (figura 8).

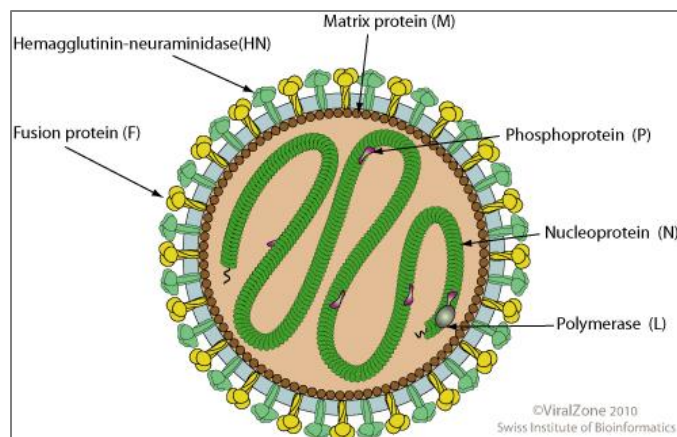


Figura 8: Struttura schematica della particella virale.

Il nucleocapside, a simmetria elicoidale, è contenuto all'interno di un *envelope* virale derivato dalla membrana cellulare. Su di esso sono inserite due proteine, diverse tra i differenti virus, che rivestono in tutti i casi un'importante funzione sia per il ciclo di replicazione, sia per lo sviluppo dell'immunità protettiva. Il nucleo capsido, che contiene al suo interno una singola molecola di RNA a polarità negativa, è costituito prevalentemente dalla nucleoproteina (queste proteine vengono nominate in modo diverso nei diversi generi – NP, NC o N) strettamente legata all'RNA virale, tanto che nell'intero ciclo vitale di questa famiglia l'acido nucleico non viene mai trovato libero all'interno della cellula infettata. Si tratta di proteine costituite da due domini: un dominio amino-terminale, che comprende i due terzi della molecola e che interagisce direttamente con l'RNA, ed uno carbossi-terminale che si colloca sulla superficie esterna del nucleocapside, rendendolo flessibile.

Altre due proteine vengono trovate associate al nucleocapside, sono la proteina L (*large*, perché composta da più di 2000 amminoacidi) e la proteina P (*phosphoprotein*). Insieme formano la RNA polimerasi-RNA dipendente che presenta l'attività enzimatica richiesta per la trascrizione e per le modifiche post-trascrizionali dell'mRNA.

La proteina più abbondante all'interno del virione è la proteina M (matrice) coinvolta nel processo di gemmazione virale della cellula infettata. Si è osservato che modificazioni di questa funzione possono essere importanti in gravi patologie a carico del sistema nervoso centrale. Ad esempio nella panencefalite subacuta sclerosante, un'infezione persistente dall'esito fatale, questa proteina può essere assente o mutata in modo tale da non essere più in grado di svolgere la propria azione.

Le glicoproteine dell'*envelope* sono le proteine di adesione, di fusione e di matrice.

Le proteine di adesione sono denominate in modo diverso nei diversi generi, in quanto possono svolgere attività complementari rispetto alla capacità di legame:

- HN nei generi *Respirovirus*, *Rubulavirus* e *Avulavirus*. Sono in grado di riconoscere le sialoglicoproteine e glicolipidi di membrana per le quali presentano un'elevata affinità di legame. Presentano sia attività agglutinante nei confronti di eritrociti di mammiferi e di uccelli e, contemporaneamente, presentano attività neuraminidasi che si attua al momento del rilascio del virus.
- H nel genere *Morbillivirus*, in cui la molecola di adsorbimento è emoagglutinante ma non ha attività neuraminidasi.
- G nei generi *Pneumovirus* e *Metapneumovirus*, in quanto la proteina ha una funzione esclusivamente di adsorbimento. E' priva di attività di agglutinazione e neuraminidasi.



La proteina di fusione F è presente in tutti i generi e garantisce la fusione dell'*envelope* con la membrana cellulare, permettendo il rilascio del nucleocapside nel citoplasma. Viene sintetizzata come precursore inattivo – F0 – ed è attivata dall'azione di un enzima cellulare tripsino-simile. Quest'enzima scinde la F0 in F1, la cui parte idrofobica si inserisce nella membrana cellulare, ed in F2, una subunità più piccola che si ancora alla F1 utilizzando dei ponti disolfuro. L'uso di un enzima cellulare per la modificazione di F0 ha due importanti conseguenze: il tropismo del virus, ristretto ai tipi cellulari che possiedono l'enzima adatto, e la maggiore o minore sensibilità delle diverse F0 all'azione enzimatica, che è direttamente collegata alla patogenicità.

## 2.2. Organizzazione del genoma

Il genoma dei *paramyxovirus* è costituito da un singolo filamento di RNA a polarità negativa (figura 9), strettamente associato alle proteine nucleocapsidiche durante tutto il ciclo replicativo virale. E' composto da circa 16000 nucleotidi e codifica per otto proteine. Due di queste, V e C (21kDa), sono proteine non strutturali e sono alternativamente tradotte tramite un *editing* dalla regione di RNA codificante per la fosfoproteina (P, 72kDa). Le funzioni delle proteine V e C non sono ancora note, ma entrambe sembrano avere una funzione regolatrice per la trascrizione genomica e la sensibilità agli effetti antivirali dell'interferone  $\alpha/\beta$  (20) (21).

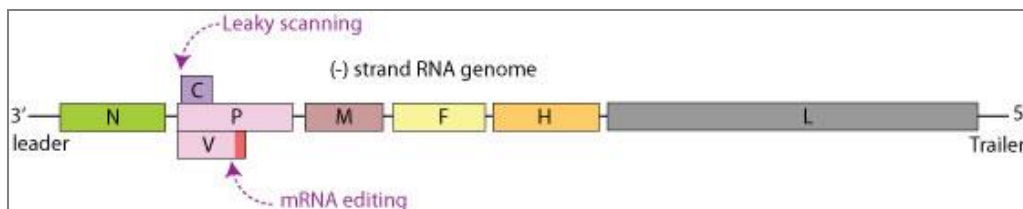


Figura 9: Schema del genoma virale

Delle sei proteine strutturali, tre formano il nucleocapside, si tratta della fosfoproteina, la grande proteina (L, 200kDa), e la nucleoproteina (N, 60kDa). Le restanti tre proteine, l'emoagglutinina (H, 78kDa), la proteina di fusione (F, 60kDa) e la proteina di matrice (M, 37kDa), insieme con i lipidi cellulari, formano l'*envelope* virale.

Le proteine NP/NC/N sono prodotte in abbondanza e si accumulano nel citoplasma a formare i corpi inclusi. Inoltre la concentrazione della proteina NP/NC/N regola lo *shift* tra la trascrizione dell'mRNA e la replicazione del genoma. Durante la replicazione si ha la produzione di filamenti a polarità positiva. Parte di essi fungono da stampo per la sintesi del genoma virale. Altri, invece, vengono trascritti dalla RNA polimerasi virale in maniera intermittente, con un meccanismo detto di *star-stop*. La RNA polimerasi trascrive un gene, si ferma e poi riparte trascrivendo un nuovo mRNA, ottenendo i singoli mRNA che codificano per le singole proteine. Attraverso questo meccanismo

replicativo esiste una regolazione della quantità di mRNA trascritto che dipende dalla posizione del gene stesso sul genoma, infatti l'efficienza della trascrizione decresce con l'aumentare della distanza del gene dall'estremità 3' del genoma. Il motivo di questa regolazione è che il virus necessita di molte copie delle proteine strutturali e solo di alcune copie delle proteine ad attività enzimatica. Il genoma virale è lineare, a singolo filamento a polarità negativa.

Il virus del morbillo è un virus ritenuto antigenicamente monofiletico, in quanto le proteine di superficie, responsabili dell'induzione d'immunità protettiva, hanno mantenuto la loro struttura antigenica nel tempo e nello spazio. Di conseguenza, il vaccino contro il morbillo, che è stato sviluppato negli anni '60 dal ceppo Edmonston B, risulta ancora protettivo nei confronti dei diversi genotipi attualmente circolanti. Tuttavia, la variabilità genetica è sufficiente a consentire un'indagine epidemiologica molecolare, infatti la variabilità nei geni H e N può essere studiata tramite analisi filogenetiche. Una delle regioni più variabili del genoma MeV è la sequenza di 450 nucleotidi della regione C-terminale della nucleoproteina (N), che presenta una variabilità del 12% tra virus circolanti.

### 2.3. Ciclo replicativo

Il ciclo replicativo (figura 10) del virus del morbillo inizia con il legame della proteina H con il recettore cellulare e con la fusione dell'*envelope* sulla membrana cellulare mediata

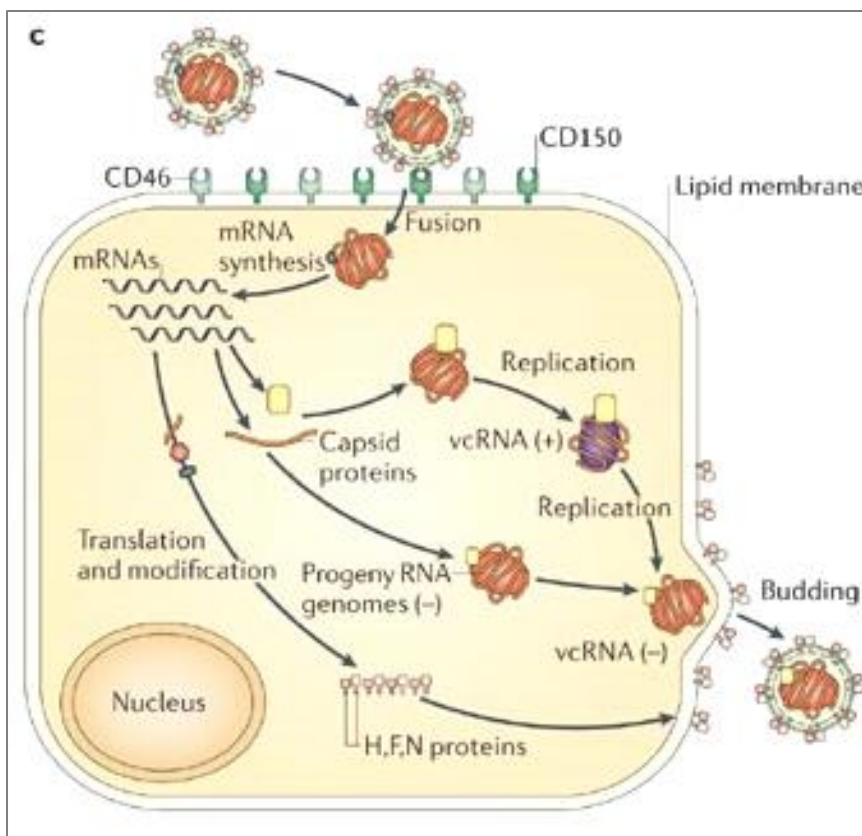


Figura 10: schema della replicazione del virus del morbillo.

dalla proteina F. A differenza degli altri membri della famiglia *Paramyxoviridae*, che utilizzano le molecole di acidi sialici presenti nelle glicoproteine e glicolipidi come recettori per l'entrata cellulare, i virus appartenenti al genere *Morbilivirus* utilizzano recettori specifici.

In particolare la proteina H di ceppi *wild-type* di MeV si può legare al recettore SLAM localizzato sulla superficie di diversi tipi di cellule - macrofagi, piastrine, linfociti T e B attivati e di cellule dendritiche mature – ed il recettore nectina-4 presente nell'epitelio cellulare delle vie respiratorie e dei polmoni.

Si è notato anche la presenza di tropismo, in quanto i virus che si sono adattati a crescere *in-vitro* sono in grado di legarsi anche al recettore CD46 presente in tutte le cellule umane nucleate (22) (23) (7) (24).

Il legame tra la proteina H ed il suo recettore fornisce il segnale per innescare la fusione della membrana cellulare, ad opera della proteina F.

Dopo la fusione con la membrana cellulare, i nucleocapsidi – formati da un singolo filamento di RNA legato con le proteine L, P e N - vengono rilasciati all'interno del citoplasma. Dove l'RNA virale viene utilizzato come modello sia per la trascrizione che per la replicazione virale (25). La trascrizione inizia da un promotore che si trova all'estremità 3' del genoma tramite le proteine L e P, che presentano attività RNA polimerasi RNA-dipendente (vRdRp). Poco prima di una giunzione intragenica la trascrittasi riconosce la fine di un gene ed interrompe la sintesi dell'mRNA, a questo punto può o riconosce il segnale d'inizio del gene a valle iniziando la trascrizione oppure si può slegare dal template. Per questo motivo i diversi geni presentano un gradiente diverso di trascrizione, che sarà maggiore per i geni che si trovano in 3' (26) (27).

A seguito dell'aumento della concentrazione della proteina N sintetizzata la vRdRp passa alla modalità replicativa sintetizzando un filamento di RNA positivo. Questo filamento viene utilizzato come copia per la sintesi di numerose copie di RNA genomico a polarità negativa. Il filamento appena formato si lega immediatamente con la proteina N, questo legame abbassa la probabilità di ricombinazione (28). Nel citoplasma la proteina M ricopre il nucleocapside, trasportandolo verso la membrana cellulare per il legame con le proteine F e H. Segue, infine, la fuoriuscita tramite gemmazione dei virioni, che possono contenere diverse copie di nucleocapside (29) (30) (31) (32).

### 3. Epidemiologia

#### 3.1. Origine e diffusione dell'epidemia

La principale via di trasmissione è rappresentata dalla via aerea come conseguenza di un contatto diretto; è inoltre, possibile la trasmissione attraverso un contatto indiretto, ma la labilità del virus del morbillo rende questo meccanismo inefficace.

Il virus è normalmente presente nelle secrezioni respiratorie durante l'ultima fase del periodo di incubazione, ovvero durante la fase di invasione e per i primi 2 – 3 giorni della fase esantematica. A livello clinico si considera infettivo il paziente all'inizio dei sintomi fino al 4° giorno del *rash* cutaneo, anche se poco prima dell'inizio dell'esantema si osserva una maggiore infettività.

Il virus sopravvive in natura unicamente tramite una catena ininterrotta di infezioni acute. L'uomo rappresenta l'unico serbatoio naturale del virus. Anche le scimmie, sono suscettibili all'infezione, ma vivendo in piccoli gruppi non sono in grado di sostenere efficientemente la trasmissione virale e quindi non permettono la sopravvivenza del virus in natura.

In aree dove la copertura vaccinale non è elevata, le epidemie di morbillo tendono a manifestarsi ogni 2-3 anni in stretta dipendenza dal numero di soggetti suscettibili. L'infezione non ha un vero andamento stagionale, anche se le epidemie avvengono di solito nel tardo inverno e all'inizio della primavera. Prevalenza ed incidenza, per fasce d'età, dipendono dalla densità di popolazione e dalle condizioni socio-economiche.

Prima dell'introduzione del vaccino nei Paesi industrializzati l'infezione colpiva prevalentemente bambini di 5 – 10 anni di età ed era raramente fatale. Nei Paesi in via di sviluppo l'incidenza è a 5 anni di età e, per malnutrizione e mancanza di cure mediche, il morbillo è una delle principali cause di morte infantile.

Poiché esiste un solo tipo antigenico del virus, alla malattia segue una immunità permanente. Inoltre gli anticorpi di origine materna permettono una protezione durante i primi 6 mesi di vita, ed a volte anche per un periodo di tempo più prolungato. Ma, mentre sono gli anticorpi a proteggere da successive infezioni, è la risposta cellulo-mediata ad essere fondamentale nella prima infezione.

#### 3.2. Cenni storici ed epidemiologi sul morbillo nell'era pre-vaccinale

Il morbillo è una malattia antica, che ha accompagnato il corso della nostra storia causando epidemie rilevanti ogni 2 o 3 anni. In epoca pre-vaccinale, secondo stime ufficiali, il morbillo era responsabile di 135 milioni di casi d'infezione e 8 milioni di morti all'anno in tutto il mondo, con una letalità stimata del 30%.

Il virus del morbillo sembra essere filogeneticamente correlato al virus della peste bovina (rinderpest), un *Morbillivirus* che colpiva il bestiame recentemente eradicato, e potrebbe essersi evoluto a partire da un virus ancestrale che provocava zoonosi in comunità nelle quali bovini e umani vivevano in stretto contatto. Si ritiene che il virus del morbillo si sia insediato nel genere umano circa 5000 - 10000 anni fa in Medio Oriente, quando la popolazione umana raggiunse una dimensione sufficiente per permettere la circolazione virale e quindi la sopravvivenza del virus (33). Si diffuse in Europa nel VIII secolo e in America nel XV secolo a seguito della scoperta del continente (34) (35). Una più moderna teoria evolutiva, basata su avanzate analisi filogenetiche, suggerisce una divisione più recente dal virus della peste bovina, databile tra il 'XI e il XII secolo (36).

In letteratura medica si fa risalire al VI secolo la prima citazione della malattia. Tuttavia è da attribuire ad Abu Becr – meglio conosciuto come Rhazes di Baghdad – nel IX secolo la distinzione del morbillo dalle altre malattie esantematiche, in particolare il vaiolo.

Nel medioevo la distinzione tra morbillo e vaiolo era ancora confusa in Europa, ma all'inizio del XVII secolo la differenza tra le due malattie era nuovamente chiara in Europa.

Le complicanze del morbillo vennero associate alla malattia da James Lucas (XVIII secolo) e James Dawson (XX secolo) (37). la natura infettiva dell'agente del morbillo venne poi provata da Francis Home nel XVIII secolo, e 150 anni più tardi Ludvig Hektoen dimostrò che si trattava di un agente virale.

Peter Panum (1820-1885), medico danese, applicò i moderni principi delle malattie infettive ad uno studio di un violento focolaio di morbillo verificatosi nel 1846 nelle Isole Faroe, situate fra la Scozia e l'Islanda. Favorito in tale attività dall'isolamento geografico e commerciale delle Isole, egli compì raffronti fra la popolazione semi-immune della Danimarca e quella delle Isole, individuando, così, elementi essenziali quali la "infettività" dell'agente e la "recettività" dell'ospite. Dedusse inoltre il periodo tipico di incubazione della malattia (stimato in 13-14 giorni).

Nel 1954 Enders e Peebles per primi isolarono il virus del morbillo da un bambino, dando inizio, quindi, l'era della crescita in vitro del virus e della successiva generazione di vaccini attenuati (38) (39) (40).

### 3.3. Attuale situazione epidemiologica

La disponibilità di un vaccino sicuro ed efficace ha determinato la riduzione della mortalità e ha incoraggiato l'avvio di un programma internazionale di eliminazione per tutte le regioni dell'OMS, con una conseguente diminuzione del 73% dei casi annuali di morbillo, – da 853.480 nel 2000 a 226.722 casi annuali al 2012 –, una riduzione del 77% dell'incidenza di morbillo – da 146 a 33 casi per 1.000.000 popolazione per anno nel 2012

– ed una diminuzione del 78% delle morti stimate causate da morbillo – da 562.400 nel 2000 a 122.000 nel 2012. La diminuzione di casi di morbillo nel 2012 è stata registrata in tutte le regione dell'OMS, ed è avvenuta dopo 3 anni in cui sono aumentati i casi.

La percentuale di stati membri che registrano un'incidenza <5 casi per milione è aumentato dal 55% (104 su 188) nel 2011 al 64% (119 su 187) nel 2012. Nel corso del 2012, focolai di morbillo di grosse dimensioni sono stati segnalati in: Repubblica Democratica del Congo (72.029 casi), India (18.668), Indonesia (15.489 casi), Ucraina (12.746 casi), Somalia (9.983 casi), Sudan (8.523 casi), Pakistan (8.046 casi), e la Romania (7.450 casi). In Cina sono stati segnalati 6.183 casi, un minimo storico a seguito di un costante diminuzione annuale partendo da 38.159 casi nel 2010 (41) (42).

#### 4. Vaccino antimorbillo

La sostanziale stabilità antigenica e l'esistenza di un solo sierotipo hanno creato le premesse per lo sviluppo di un vaccino molto efficace.

Diventato disponibile nel 1963, il vaccino per il morbillo vivo attenuato fu sviluppato attraverso l'adattamento di isolati di Enders, del ceppo *wild-tipe* isolato da David Edmonston, su culture tissutali, dopo una serie di passaggi di crescita in vitro, ed è stato, infine, adattato in due vaccini: il ceppo vaccinale Schwarz ed il ceppo vaccinale Moranten (43) (44). Nei primi anni '80 l'organizzazione mondiale per la sanità (OMS) introdusse la vaccinazione per il morbillo all'interno del programma di espansione dell'immunizzazione.

In Italia il vaccino non è obbligatorio ma fortemente raccomandato e viene somministrato al 13° - 15° mese di vita ed è seguito da una dose di richiamo in età prescolare, ovvero 5 - 6 anni. Stime della copertura vaccinale per la prima dose di vaccino mostrano un aumento a livello globale dal 73% del 2000 al 84% del 2009, valore rimasto al 84% fino al 2012 (41).

In figura 11 si può osservare la copertura vaccinale mondiale osservata nel 2004.

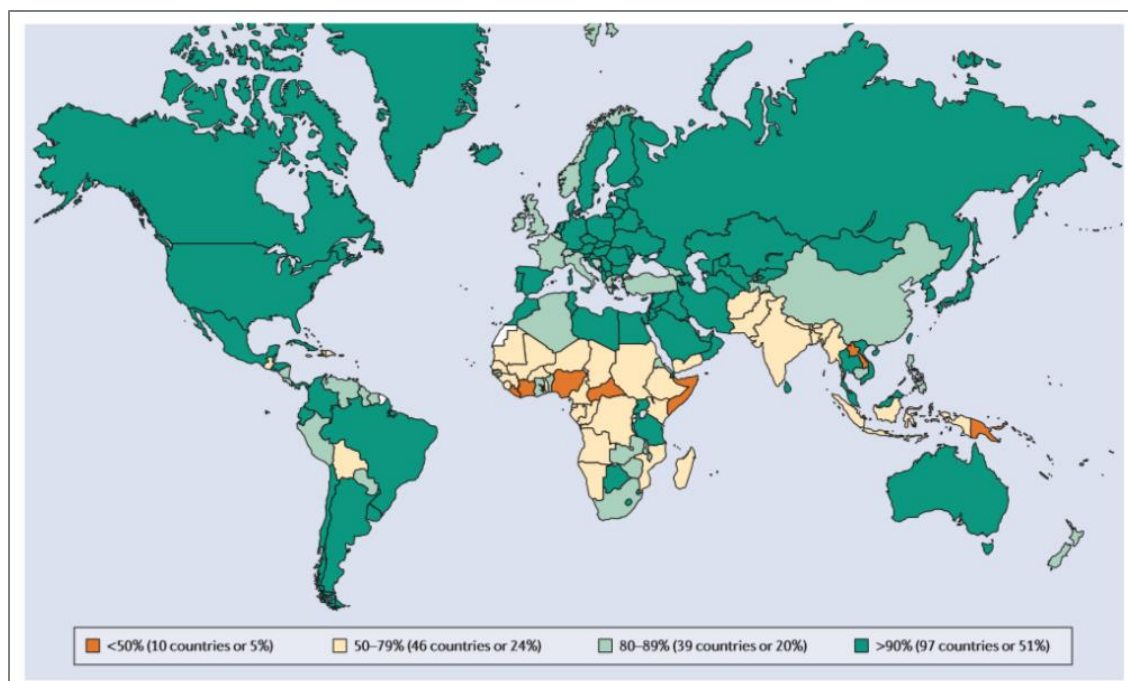


Figura 11: Copertura vaccinale per il vaccino contro il morbillo nei bambini nel 2004.

Attualmente (figura 12) nel nostro paese la copertura vaccinale, pari a 88,1%, è ancora insufficiente ed è inferiore rispetto a quanto osservato in altri paesi europei (45). Inoltre confrontando le coperture attuali con quelle degli anni precedenti, si nota una lieve flessione in quasi tutte le Regioni e Province autonome italiane (46).

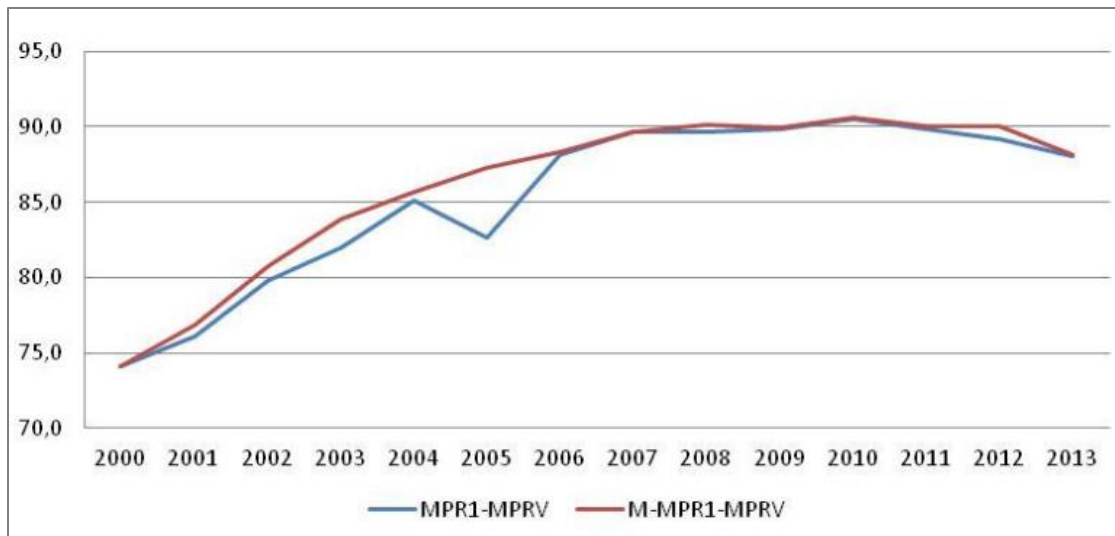


Figura 12: Coperture vaccinali per MPR1-MPRV e M-MPR1 – MPRV nei bambini di età inferiore a 24 mesi (anni 2000 - 2013), luglio 2014.

Le reazioni avverse si possono manifestare ad una settimana dalla somministrazione, nel 2 – 5% dei vaccinati si può verificare, infatti, una lieve sindrome morbilliforme con *rash* e febbre. Quasi mai si osservano convulsioni ed encefalite. Il titolo degli anticorpi sviluppato è più basso rispetto all'infezione naturale. Non vi sono controindicazioni particolari se non quelle applicate a qualsiasi vaccino attenuato.

Un recente studio sull'efficacia della vaccinazione del morbillo, prendendo in considerazione i dati disponibili dal 1960 al 2010, mostra un'efficacia media del 94% (47).

#### 4.1. Vaccino MPR

In molte parti del mondo, Italia compresa, il vaccino per il morbillo è somministrato in combinazione con il vaccino per la rosolia e parotite (MPR) (48). La somministrazione è raccomandata dal piano nazionale di prevenzione e vaccinazione (PNPV) in due dosi: la prima tra il 13° ed il 15° mese di età ed il richiamo generalmente tra il 5° ed il 6° anno di vita.

Complessivamente l'efficacia e la sicurezza dei vaccini combinati è ritenuta sovrapponibile, se non migliore, rispetto ai vaccini monovalenti.

Il possibile ruolo del vaccino per il morbillo nello sviluppo di autismo ha generato recentemente un acceso dibattito (49). Gli eventi che seguirono, e la preoccupazione dell'opinione pubblica sulla sicurezza del vaccino MPR, portarono ad una diminuzione della copertura vaccinale in Europa, causando un aumento della frequenza e delle dimensioni dei focolai di morbillo (50), fornendo lezioni importanti nella interpretazione errata delle evidenze epidemiologiche e nella comunicazione dei risultati scientifici al pubblico (51).



Al momento non ci sono evidenze scientifiche che il vaccino MPR possa causare autismo o un disturbo di tipo autistico (52) (53)

## 5. Programma d'eradicazione del morbillo e della rosolia congenita

Il morbillo è uno di quei virus che, non provocando infezioni persistenti, non mutando e non avendo altri ospiti animali, potrebbe essere eliminato con un uso esteso del vaccino.

Per questo motivo si discute sulla possibilità di eliminare ed infine eradicare il virus del morbillo da più di trent'anni, una volta evidenziata la capacità del vaccino di creare un'immunità prolungata (54) (55).

L'obiettivo dell'eliminazione del morbillo viene definito come l'assenza di trasmissione di ceppi endemici di morbillo in una determinata zona geografica per un periodo di 12 mesi, in presenza di un sistema di sorveglianza ottimale (56) (57) (58).

I tre criteri, definiti al workshop di Dahlem (59) per poter eradicare una malattia sono:

1. l'essere umano come unico serbatoio;
2. esistenza di un accurato sistema diagnostico;
3. disponibilità di un intervento efficace a costi ragionevoli.

Le regioni del OMS hanno iniziato dei programmi con l'obiettivo di eliminare il morbillo per il 2012 nelle regioni ovest del pacifico, nel 2015 per la regione europea e nel 2020 per la regione africana. Queste iniziative internazionali hanno portato all'eradicazione del morbillo nella regione americana ed in altre regioni (60) (61) (62) (63). Per poter interrompere la circolazione di MeV indigeno in una specifica area geografica servono delle alte coperture vaccinali (95 – 98%) che devono essere ottenute e mantenute attraverso delle campagne di immunizzazione (64) (65). Queste alte coperture vaccinali sono necessarie in quanto il virus del morbillo è uno degli agenti infettivi più contagiosi, il cui valore di  $R_0$  – numero di riproduzione base – è stimato attorno a 16 – 18 (66).

In linea con gli obiettivi della Regione Europea dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) di eliminare, entro l'anno 2015, il morbillo e la rosolia e di ridurre l'incidenza della rosolia congenita ( $<1/100000$  nati vivi) in Italia è stato approvato nel 2003 il piano nazionale per l'eliminazione del morbillo e della rosolia congenita (PNEMoRc) che è stato rilanciato nel 2011 con il PNEMoRc 2010 – 2015 (67).

Gli obiettivi presenti all'interno del piano nazionale sono:

- eliminare il morbillo endemico (incidenza  $<1$  caso di morbillo/1.000.000 popolazione);
- eliminare la rosolia endemica (incidenza  $<1$  caso di rosolia/1.000.000 popolazione);
- ridurre l'incidenza della rosolia congenita a meno di 1 caso per 100.000 nati vivi. Sorveglianza e diagnosi del morbillo.

## 5.1. Attuale situazione epidemiologica

A livello europeo dal 2002 tutti gli stati hanno adottato un programma di vaccinazione routinario basato sulla somministrazione di due dosi di vaccino. Questo ha portato alla riduzione dell'incidenza del morbillo da circa 400 casi per 1000000 di abitanti nel periodo 1991 – 1993 a 7,8 – 10,1 casi per 1000000 abitanti durante il periodo 2007 – 2009. Il numero di paesi con un'incidenza pari a zero, per 1000000 abitanti, sono aumentati da 17 nel 2003 a 38 nel 2009, con 21 paesi in cui non si sono registrati casi di morbillo (68).

Nel 2012 sono stati riscontrati circa 28000 casi di morbillo all'interno dei 41 stati della regione europea del OMS. Nel 2013 si sono evidenziati circa 32000 casi di morbillo in 38 stati appartenenti alla regione europea del OMS (figura 13).

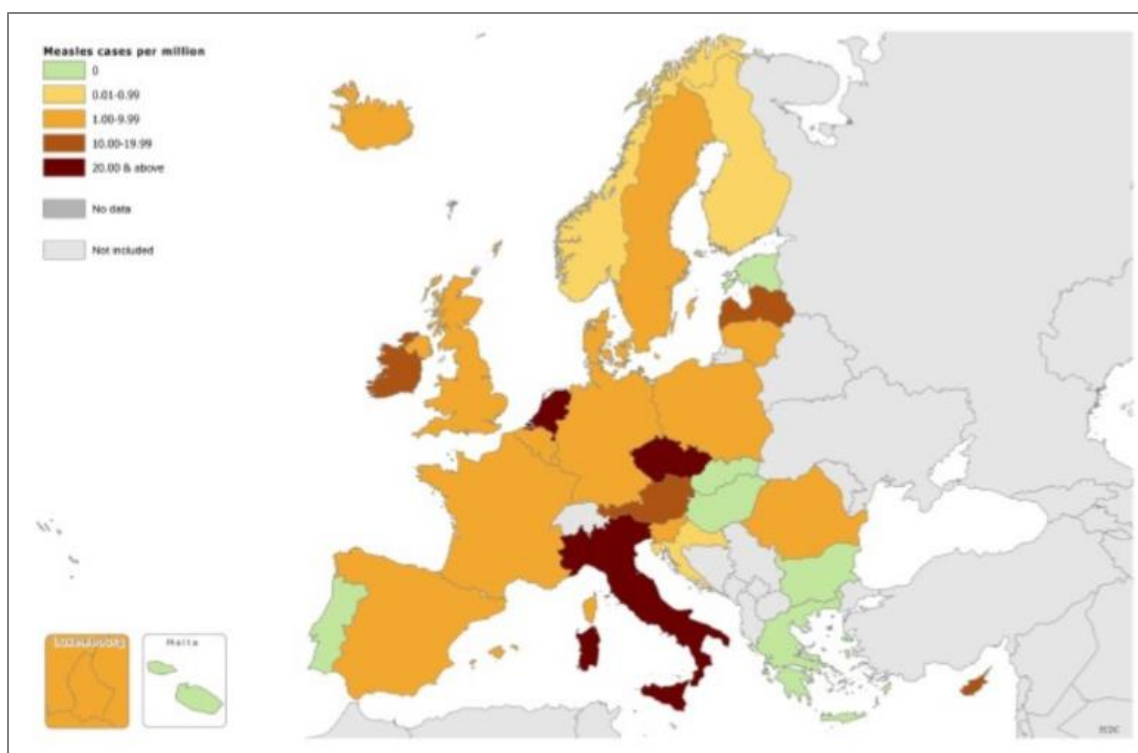


Figura 13: tasso di notifica dei casi di morbillo in Europa, ottobre 2013 – settembre 2014.

Il 96% dei casi sono stati riportati da nove paesi: Federazione Russa (7%), Georgia (25% dei casi), Germania (6%), Italia (6%), Olanda (8%), Romania (3%), Turchia (23%), Ucraina (10%) e Gran Bretagna (6%) (69).

Più recentemente nel primo trimestre del 2014 (gennaio – marzo 2014), sempre a livello della regione europea del OMS, sono stati riportati circa 6500 casi da 28 paesi. L'83% dei casi sono stati riportati da quattro paesi: Federazione Russa (41%), Georgia (15%), Italia (12%), Ucraina (15%). I genotipi identificati nella regione europea sono il B3, il D8 ed l'H1 (70).

A livello italiano dal 2001 al 2006 sono stati riportati annualmente una media di 5400 casi, con valore massimo pari a 18020 casi nel 2002 ed un valore minimo di 215 casi nel

2005. L'analisi molecolare ha evidenziato una predominante circolazione del genotipo D7 all'interno del territorio italiano negli anni 2002 – 2004. Questo genotipo è stato poi sostituito dai genotipi D4 e B3 nell'intervallo 2006 – 2007 (71). Nel 2008 si è verificata un'epidemia di morbillo in Italia, con più di 4000 casi riportati dal sistema di sorveglianza. Tale epidemia è stata causata da una predominante circolazione di un virus appartenente al genotipo D4 (72).

## 5.2. Sorveglianza integrata del morbillo e della rosolia

E' noto come nella fase di eliminazione la sorveglianza basata solamente sul riconoscimento clinico dei casi non risulti affidabile per un controllo epidemico accurato (73). In vista dell'obiettivo di eliminazione del morbillo e della rosolia nella regione europea del OMS, risulta importante un sistema di sorveglianza sensibile in grado, non solo di individuare tempestivamente tutti i nuovi casi, ma anche di valutare la circolazione dei diversi genotipi virali. Nei paesi in via di eliminazione la sorveglianza molecolare gioca dunque un ruolo fondamentale per valutare la circolazione dei ceppi endemici, identificare i casi di importazione e la loro provenienza.

All'interno del PNEMoRc 2010 – 2015, accanto a misure in grado di aumentare le coperture vaccinali, si sottolinea l'importanza della sorveglianza per il raggiungimento degli obiettivi dell'eliminazione (67).

Inoltre, poiché morbillo e rosolia colpiscono le stesse fasce di età, e presentano una sintomatologia simile si è introdotta in Italia una sorveglianza integrata del morbillo e della rosolia, come raccomandato dall'OMS. La sorveglianza integrata consiste nel ricercare la conferma di laboratorio per rosolia nei casi di sospetto morbillo risultati negativi ai test di conferma e, viceversa, testare per morbillo i casi di sospetta rosolia risultati negativi.

In questo contesto la sorveglianza ha come obiettivi principali quelli di:

- a. individuare i casi sporadici ed i focolai, confermandoli attraverso opportune analisi di laboratorio;
- b. assicurarsi una corretta gestione dei casi e dei contatti;
- c. capire i motivi per cui si sta verificando la trasmissione dell'infezione (basse coperture vaccinali, importazione di casi);
- d. identificare i gruppi di persone a rischio di trasmissione;
- e. attivare rapidamente una risposta di sanità pubblica;
- f. monitorare l'incidenza delle malattie, identificando possibili cambiamenti nella loro epidemiologia;
- g. monitorare la circolazione di genotipi virali;
- h. misurare e documentare i progressi raggiunti nell'eliminazione.

## 6. Sorveglianza del morbillo e caratterizzazione dei genotipi circolanti

### 6.1. Genotipi di morbillo e relativa distribuzione geografica

L'analisi dei 450 nucleotidi della regione C-terminale della nucleoproteina (N-450) ha permesso di classificare il virus del morbillo in 8 gruppi genetici maggiori o *clades* che raggruppano al loro interno 24 genotipi (A, B1 – B3, C1 – C2, D1 – D11, E, F, G1 – G3, H1 – H2) (74) (75) (76) (77) (78) (79).

Non tutti i genotipi riconosciuti sono attualmente in circolazione, i genotipi B1, C1, D1, E, F, G1 infatti vengono considerati inattivi in quanto, nonostante il miglioramento della sorveglianza, non sono stati individuati dagli ultimi anni del '900. Altri 5 genotipi non vengono più identificati dal 2006 (D2, D3, D10, G2, H2). Inoltre, le più recenti identificazione del genotipo A, genotipo del ceppo vaccinale, provengono da pazienti con vaccinazione recente il genotipo A *wild-type* è stato identificato per l'ultima volta in due casi sporadici del 2008. I diversi genotipi di *morbillivirus* hanno una differente distribuzione geografica (figura 14).

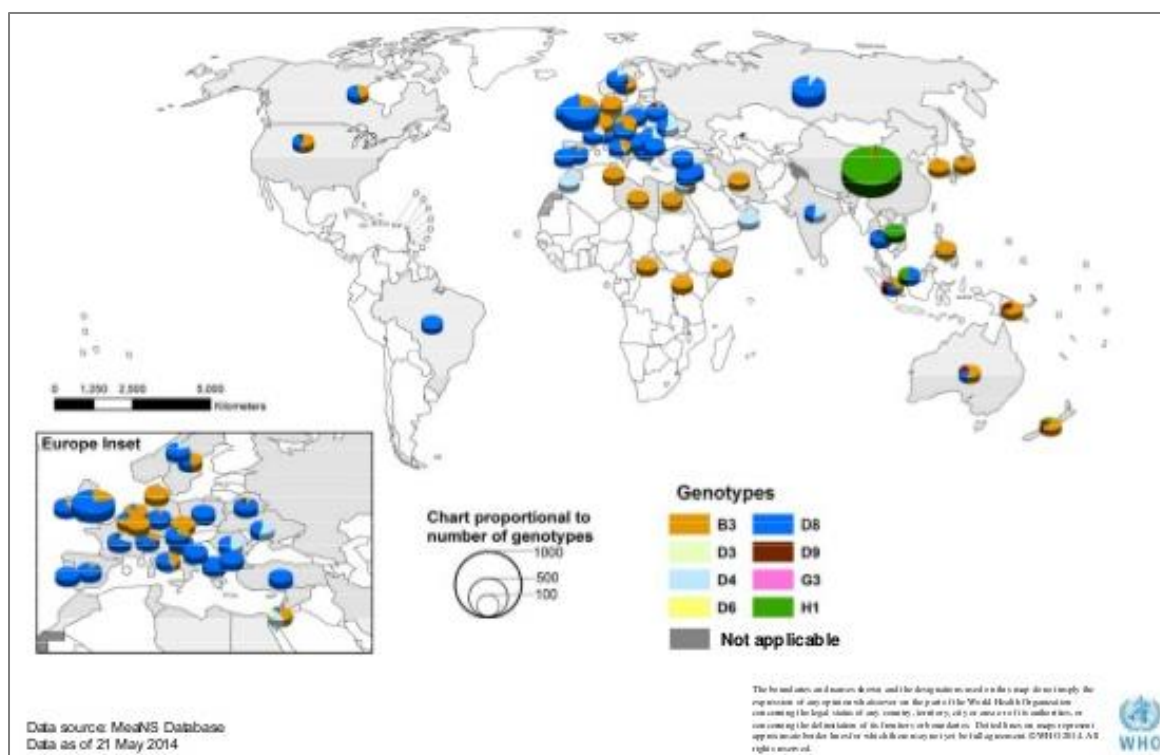


Figura 14: distribuzione geografica dei diversi genotipi di morbillo, aprile 2013 - marzo 2014. (fonte OMS)

Il fatto che questi genotipi abbiano una distribuzione geografica definita rende possibile individuare, in un Paese in cui la circolazione dei ceppi autoctoni è assente o molto limitata, l'origine del genotipo responsabile di una epidemia.

I dati della sorveglianza virologica hanno dimostrato che i programmi di vaccinazione possono ridurre il numero di genotipi co-circolanti ed eventualmente interrompere la trasmissione del morbillo. Tuttavia, i virus vengono continuamente introdotti da fonti

esterne, e se il numero dei soggetti suscettibili aumenta, è possibile la trasmissione sostenuta del genotipo virale di recente introduzione. Ciò si traduce in quello che appare come un rapido cambiamento nel genotipo endemico (80) (81).

In generale sono stati descritti tre modelli di distribuzione dei genotipi nelle diverse regioni del OMS. Nei paesi in cui esiste ancora la trasmissione di genotipi endemici di morbillo, la maggioranza dei casi di morbillo sono causati da un genotipo o alcuni genotipi endemici ben distribuiti geograficamente. Nei paesi in cui la circolazione endemica del morbillo è stata eliminata il ristretto numero di casi è causato da differenti genotipi che riflettono le diverse fonti di importazione virale e suggeriscono la mancanza di trasmissione sostenuta da genotipo o genotipi endemici. Il terzo modello si verifica nei paesi in cui, a seguito dell'incapacità di mantenere gli alti tassi di copertura vaccinali necessari per l'eliminazione virale si osserva l'introduzione del virus del morbillo in focolai causati da un singolo genotipo virale (76) (82).

#### 6.2. Sorveglianza virologica in America

Nella regione americana la trasmissione endemica del virus del morbillo è stata interrotta e attualmente vengono identificati soltanto casi d'importazione responsabili di piccoli focolai. Negli Stati Uniti, secondo i CDC dal 1° gennaio al 18 luglio 2014 si sono verificati 580 casi di morbillo (quasi tutti di importazione). Si tratta del più elevato numero di casi segnalati dal 2010, anno in cui è stata documentata l'eliminazione del morbillo endemico in questo Paese.

#### 6.3. Sorveglianza virologica in Africa

Nel biennio 2007 – 2009 il genotipo maggiormente rilevato in 21 stati africani è stato il B3. Nel 2010 il genotipo B3 è stato osservato in Malawi, Liberia e Mauritania. Il genotipo B3, endemico nell'Africa sud-sahariana, viene ulteriormente suddiviso in 2 gruppi genetici minori. Il primo circolante in Cameroon, Ghana, Kenya, Tanzania e Nigeria, mentre il secondo gruppo presenta una circolazione più limitata nell'Africa occidentale.

Sorveglianza virologica nel Nord-Africa e nel Medio Oriente:

Le sequenze geniche analizzate hanno mostrato la circolazione di più genotipi in queste due regioni: B3, D4, D5, D8 e H1. Si pensa che il genotipo endemico attualmente circolante sia il D4, collegato ad alcuni focolai epidemici in Siria, Egitto, Iran e Iraq.

#### 6.4. Sorveglianza virologica in Asia

Dal 2007 al 2009 tutte le sequenze identificate in India appartenevano ai genotipi D4 e D8. Nello stesso periodo i genotipi D5 e D9 sono stati evidenziati in Thailandia, i genotipi D4 e D8 in Nepal e il genotipo H1 in Cina e in Vietnam. Negli altri paesi della regione asiatica la circolazione endemica del morbillo è causata dai genotipi H1, D3, D9, G3 e D5.

Dati precedenti al 2007 hanno evidenziato la circolazione endemica in Indonesia dei genotipi G2, G3 e D9 e del genotipo H1 in Corea del Nord.

#### 6.5. Sorveglianza virologica in Europa

In Europa, dal 2007 al 2009 è stata osservata la circolazione dei genotipi B3, D4, D5, D6, D8, D9, H1 e A. In questo periodo, è stata dimostrata l'interruzione della circolazione dei genotipi C2 e D6, un tempo endemici, e la loro sostituzione con i genotipi D4 e D5, entrambi associati ad un grande numero di casi.

Nel 2012 circolavano nel territorio europeo sequenze appartenenti ai genotipi D8, D4, B3, D9 e H1.

# Scopo



## 7. Scopo

Un sistema di sorveglianza sensibile in grado, non solo di individuare tempestivamente tutti i nuovi casi di morbillo, ma anche di valutare la circolazione dei diversi genotipi virali, risulta importante in previsione dell'obiettivo di eliminazione di questa malattia nella regione europea dell'OMS.

Nei paesi in via di eliminazione, la sorveglianza molecolare gioca un ruolo fondamentale per valutare la circolazione dei ceppi endemici, identificare i casi di importazione e studiarne la provenienza.

Obiettivi specifici:

- Descrivere il profilo epidemiologico del morbillo in Lombardia nel biennio 2013-2014 e presentare i dati della sorveglianza virologica.
- Caratterizzare molecularmente i ceppi di *morbilivirus* al fine di genotipizzarli, analizzarli filogeneticamente e studiarne le caratteristiche evolutive.

# Materiali e metodi

## **8. Sorveglianza integrata di morbillo e rosolia, definizione di caso, raccolta, preparazione e conservazione dei campioni**

In Italia il morbillo è una malattia soggetta a notifica dal 1934 (83), nel 2007 è stato introdotto un primo sistema di sorveglianza speciale (84) e, nel marzo 2011, il Ministero della Salute ha approvato un piano di eliminazione del morbillo e della sindrome da rosolia congenita (CRS) (67). Essendo il Sistema sanitario italiano un sistema decentrato, ogni regione ha il compito di istituire un piano sanitario regionale seguendo le linee guida delle autorità nazionali. In previsione dell'obiettivo di eliminazione del morbillo e della rosolia, in Lombardia da luglio 2013 è stata istituita una nuova sorveglianza per il morbillo e la rosolia di cui il Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute è il Centro di Riferimento Regionale (CRR).

### **8.1. Definizione di caso**

In accordo con le guide linee guida europee 2002/253/EC (85) e con le linee guida dell'OMS (86) la nuova direttiva regionale segue le indicazioni della circolare ministeriale del 2013 (87) che prevede la classificazione dei casi in base a criteri clinici, epidemiologici o di laboratorio e introduce la sorveglianza integrata di morbillo e rosolia.

Risponde ai criteri clinici, qualsiasi soggetto che presenti febbre con esantema maculopapulare e almeno uno dei sintomi tra tosse, corizza (rinite) e congiuntivite. La correlazione epidemiologica mediante trasmissione interumana è necessaria per individuare i criteri epidemiologici, mentre i criteri di laboratorio devono rispondere ad almeno uno dei seguenti parametri:

- Isolamento del virus del morbillo dal campione clinico
- Identificazione dell'acido nucleico del morbillo nei campioni clinici
- Risposta anticorpale specifica per morbillo in fase acuta nel siero e nella saliva.
- Identificazione dell'antigene del virus di morbillo in un campione clinico mediante fluorescenza diretta (DFA) con anticorpi monoclonali specifici del morbillo

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

### **8.2. Modalità di raccolta e conservazione dei campioni**

Il sistema di sorveglianza richiede la segnalazione da parte dei medici di tutti i casi di morbillo, rosolia e CRS alle ASL entro 12 ore dalla comparsa dei sintomi. Le ASL sono

incaricate di svolgere le indagini epidemiologiche e la raccolta dei campioni biologici per ogni caso sospetto per l'invio ai CRR.

La raccolta dei campioni è prevista tra il IV e il X giorno dall'esordio della sintomatologia. In particolare, è previsto che venga prelevato un campione di sangue fresco e/o essiccato su *Guthrie Card* (DBS, *Dried Blood Spoot*) per la ricerca degli anticorpi specifici contro morbillo e rosolia, un campione di urine e un tampone orofaringeo per indagini dirette e per la genotipizzazione dei ceppi virali.

L'analisi per la ricerca di IgM e IgG viene solitamente eseguita da laboratori periferici, mentre l'amplificazione e il sequenziamento genico presso il CRR in cui questo lavoro di tesi è stato svolto.

Presso i laboratori del CRR, il materiale clinico raccolto viene opportunamente conservato (a +4 °C i campioni ematici e a -20°C i campioni respiratori e le urine) fino alle esecuzioni delle indagini di laboratorio.

La sorveglianza integrata consiste nel ricercare la conferma di laboratorio per rosolia nei casi sospetti di morbillo risultati negativi ai test di conferma e, viceversa, testare per morbillo i casi di sospetta rosolia risultati negativi. Infatti, il morbillo e rosolia colpiscono le stesse fasce di età, hanno una sintomatologia simile e una proporzione di casi (circa 20%) che soddisfa la definizione clinica di morbillo può essere rappresentata, in realtà, da casi di rosolia.

I risultati delle indagini vengono inviati dal CRR al Ministero della salute che provvede ad aggregare i dati Nazionali, sia per valutare l'incidenza di MV e RuV nella popolazione italiana, sia per discriminare i ceppi attualmente circolanti.

## **9. Casistica in studio**

In questo lavoro di tesi sono stati analizzati i campioni biologici di pazienti lombardi che tra luglio 2013 e settembre 2014 hanno presentato una diagnosi sospetta di morbillo e/o rosolia. Di tutti i pazienti erano disponibili i dati clinici, anagrafici ed epidemiologici.

## 10. Identificazione degli acidi nucleici virali in campioni clinici

### 10.1. Estrazione dell'RNA da campioni respiratori e/o da urina

L'RNA genomico virale è stato estratto dai campioni respiratori e/o urine utilizzando un kit commerciale (*Invisorb® Spin Virus RNA Mini Kit, STRATEC Molecular*). Il protocollo fornito dal produttore prevede 4 fasi distinte (figura 15):

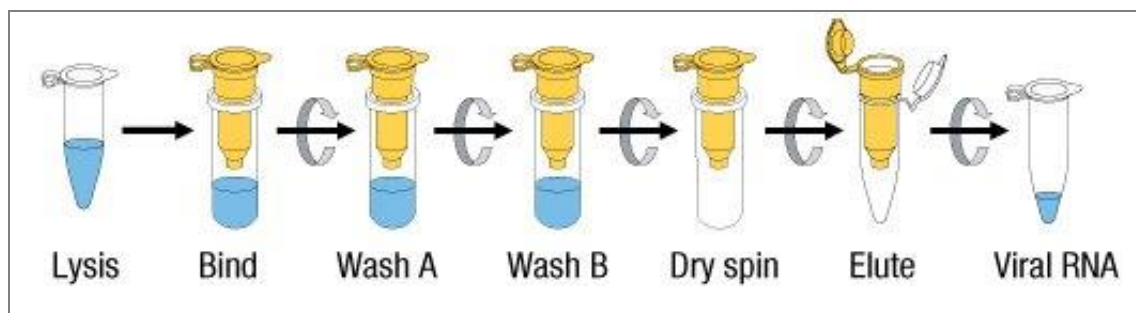


Figura 15: Schema delle fasi di estrazione dell'RNA con kit *Invisorb® Spin Virus RNA Mini Kit (STRATEC Molecular)*.

- a. lisi del campione: lo scopo di questa fase è quello di lisare l'involucro virale, e si realizza trasferendo 200  $\mu\text{l}$  di campione nell'apposito tubo di raccolta da 2 ml contenente 600  $\mu\text{l}$  di buffer di lisi RV (contenente guanidina tiocianato, un agente caotropico che denatura le proteine). Segue l'aggiunta di 20  $\mu\text{l}$  di carrier RNA e 20  $\mu\text{l}$  di proteinasi K, conservati in aliquote rispettivamente a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Successivamente, si procede vortexando brevemente e incubando per 10 minuti a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  in agitazione costante (600 rpm) nel termomixer.
- b. legame dell'RNA: questa fase prevede l'aggiunta di 400  $\mu\text{l}$  di soluzione di *binding*, che permette il legame dell'RNA alla membrana di silice. Successivamente, vengono trasferiti 650  $\mu\text{l}$  di campione in RTA *spin filter* e si incuba per 1 minuto a temperatura ambiente. Si centrifuga a 8000 rpm per 1 minuto e si elimina l'eluato. L'operazione viene ripetuta per il campione residuo. Infine, si trasferisce RTA *spin filter* in un nuovo tubo di raccolta (RTA *receiver tube*).
- c. lavaggi: il campione viene sottoposto ad una serie di lavaggi con buffer contenenti etanolo (R1 e R2). Vengono aggiunti 600  $\mu\text{l}$  di buffer di lavaggio R1 e si centrifuga a 8000 rpm per 1 minuto. Viene eliminato l'eluato e RTA *spin filter* viene posto in un nuovo RTA *receiver tube*. Successivamente, si aggiungono 600  $\mu\text{l}$  di buffer di lavaggio R2, e si centrifuga nuovamente a 8000 rpm per 1 minuto. L'operazione viene ripetuta una seconda volta e, dopo aver eliminato l'eluato, segue una centrifugazione alla massima velocità ( $> 12000\text{ rpm}$ ) per 4 minuti. Questa operazione serve per eliminare gli eventuali residui di etanolo.

- d. eluizione dell'RNA: dopo aver eliminato RTA receiver tube, RTA spin filter viene trasferito in un *elution tube* da 1,5 ml. Vengono aggiunti 100 µl di buffer di eluizione (precedentemente riscaldato nel termomixer, a 80 °C) direttamente sulla membrana di silice della colonnina. Si procede incubando per 3 minuti a temperatura ambiente e centrifugando a 8000 rpm per 1 minuto. La colonnina viene eliminata e l'RNA ottenuto viene conservato a -80 °C fino alle analisi successive.

#### 10.2. Identificazione dell'RNA virale mediante *real time* RT-PCR

Per identificare simultaneamente l'RNA del virus morbillo e del virus della rosolia da campioni respiratori e/o da urina è stata condotta una Real-Time RT-PCR utilizzando set di *primer* e sonde specifici. In particolare, per il virus del morbillo, il target è rappresentato da un frammento della regione conservata del gene M, mentre per il virus della rosolia, il target è rappresentato da un frammento della regione conservata codificante per la proteina non strutturale NSP1.

La *Real-Time RT-PCR* è stata condotta mediante la chimica *TaqMan*, utilizzando un kit commerciale (*AgPath-ID™ one step RT-PCR kit, Life Technologies*) che permette di effettuare in un unico saggio la retrotrascrizione dell'RNA in DNA complementare (cDNA) e l'amplificazione del cDNA.

Per l'identificazione dei *morbillivirus* sono stati usati i seguenti *primer* e sonda, con i quali è stato amplificato un frammento di 111 nt (nt 584 - 697) del gene M (88):

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

Per l'identificazione dei virus della rosolia sono stati usati i seguenti *primer* e sonda, con i quali è stato amplificato un frammento di 128 nt (nt 195 - 323) del gene NSP1 (88):

Rub-F	5'-TGATACCCAGACCTGTGTTACAC-3'
Rub-R	5'-GGTCGATGAGGACGTGTAGG-3'
Rub-PROBE	5'-GATCACCCAGCACTCCACGCAA-3'

Infine, viene verificato che ogni campione risulti positivo per l'RNasi P umana (RP), che rappresenta un controllo della bontà dell'estrazione dell'RNA. La presenza di questo gene endogeno indica, infatti, una quantità di RNA sufficiente all'interno del campione e dimostra, di conseguenza, l'accuratezza della procedura di estrazione. A tal proposito, si utilizzano i seguenti *primer* e sonda (89):

RP Fr	5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'
RP Rev	5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'
RP probe	5'-FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-3'

Il protocollo operativo prevede, innanzitutto, la preparazione delle mix di reazione, così composte:

REAGENTE	VOLUME (µl)
2x RT-PCR Master Mix	12,5
Primer Frw (40 µM)	0,5
Primer Rev (40 µM)	0,5
Sonda (10 µM)	0,5
25X RT-PCR Enzyme Mix (contenente la trascrittasi inversa Array Script e la DNA polimerasi AmpliTaq Gold®)	1
H <sub>2</sub> O nuclease-free	5

In ogni pozzetto vengono inoculati 20 µl di master mix, a cui vengono aggiunti 5 µl di RNA estratto. Vengono inclusi, inoltre, almeno un controllo negativo (*No Template Control*, NTC), rappresentato da acqua *nuclease-free*, e un controllo positivo (*Positive Template Control*, PTC), rappresentato da campioni risultati positivi in precedenza per il target ricercato. La reazione è stata condotta utilizzando lo strumento *ABI Prism® 7300* (*Applied Biosystems*), alle seguenti condizioni:

39

NUMERO CICLI	RETROTRASCRIZIONE	DENATURAZIONE	AMPLIFICAZIONE
1	50 °C per 20'		
1		95 °C per 10'	
50		95 °C per 15'	58 °C per 60''*

\*in questa fase viene captato il segnale di fluorescenza

Al termine della reazione di amplificazione, lo strumento fornisce una rappresentazione grafica dei risultati, in cui vengono messi in relazione il numero dei cicli con l'emissione della fluorescenza. Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione con andamento sigmoide. Sono considerati positivi i campioni la cui curva di reazione interseca la linea soglia (*threshold*) prima dei 40 cicli.

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

- la curva di amplificazione del NTC deve sempre fornire un risultato negativo (assenza di sequenze target a cui possano legarsi le sonde), al fine di escludere la presenza di falsi positivi;
- la curva di amplificazione del PTC deve sempre fornire un risultato positivo e intersecare il *threshold* prima del quarantesimo ciclo;
- tutti i campioni clinici di origine umana devono presentare curve di RP che intersecano il *threshold* prima del trentesimo ciclo.

In caso contrario, la seduta non è valida e l'intera procedura deve essere ripetuta.



## 11. Caratterizzazione molecolare dei morbillivirus

### 11.1. Retrotrascrizione dell'RNA virale e amplificazione del gene N

L'RNA virale estratto dai campioni biologici, come descritto precedentemente, deve essere retrotrascritto in DNA complementare (cDNA) per poter essere poi amplificato.

La retrotrascrizione e l'amplificazione tramite nested-PCR della regione ipervariabile della regione C-terminale del gene N è stata eseguita utilizzando il *SuperScript™ III One-Step RT-PCR con Taq Platinum® High Fidelity* [Life Technologies].

La reazione di amplificazione di frammenti genici del dominio C-terminale del gene della nucleoproteina (N), finalizzata al successivo sequenziamento genico, consiste in una nested-PCR.

Nel primo ciclo di amplificazione si utilizza una singola coppia di *primers* più esterni (MN-PV-F1 MN-PV-R1).

MN-PV-F1                    5'-CCTGCTCTTGACTGCATGAA-3'

MN-PV-R1                    5'-CCGCCTTCAGTTGATCCAATTGCTG-3'

Questa prima amplificazione permette di ottenere un lungo frammento di circa 1.077 bp (dal nt 951 al nt 2027), in cui 5 µl di RNA, vengono inoculati in 45 µl di una miscela di reazione composta da:

REAGENTE	VOLUME (µl)
5X Reaction Mix	25
MN-PV-F1 (10 µM)	2
MN-PV-R1 (10 µM)	2
SuperScript III RT/Platinum Taq mix	2
H <sub>2</sub> O	14

40

La reazione di amplificazione è stata condotta in un termociclatore *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*) alle seguenti condizioni:

NUMERO CICLI	RETROTRASCRIZIONE	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	42°C per 40'			
1		95°C per 2'		
45		94°C per 30''	58°C per 30''	68°C per 1' 20''
1				68°C per 7'

Il secondo ciclo di amplificazione prevede l'uso di una coppia di *primers* interni (MN-PV-F2/MN-PV-R2) al frammento già amplificato, di circa 769 bp.

MN-PV-F2            5'-AAGGTCAGTTCCACATTGGCA-3'  
 MN-PV-R2            5'-GCATGRTTTGCTGAGACCCGAA-3'

10  $\mu$ l di amplificato di primo *step* sono stati inoculati in 40  $\mu$ l di mix di reazione, composte da:

REAGENTE	VOLUME ( $\mu$ l)
5X Green GoTaq® Reaction Buffer 150 mM Tris-HCl, pH 8.0 a 25 °C, 500 mM KCl (Promega)	10
dNTP Mix 10 mM (Promega)	2
MN-PV-F2 (10 $\mu$ M)	1
MN-PV-R2 (10 $\mu$ M)	1
GoTaq® DNA Polymerase 5 U/ $\mu$ l (Promega)	0,5
H <sub>2</sub> O	25,5

La reazione di amplificazione è stata condotta in un termociclatore *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)* alle seguenti condizioni:

NUMERO CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	95°C per 10"		
30	95°C per 30"	58°C per 30"	72°C per 1'
1			72°C per 7'

## 11.2. Rilevamento dei prodotti di PCR

I prodotti di amplificazione sono stati rilevati mediante la tecnica dell'elettroforesi su gel di agarosio al 2%. Il gel viene preparato pesando 2 g di agarosio e portando a volume con 100 ml di tampone TBE 1x (Tris-borato-EDTA, pH 8.3, a temperatura ambiente). Successivamente, si porta ad ebollizione servendosi di un forno a microonde. Prima che il gel raffreddi, si aggiungono 5 $\mu$ l di colorante *Atlas ClearSight*, un intercalante non tossico degli acidi nucleici, che permette la visualizzazione delle bande, in quanto emette fluorescenza arancio-rossa quando illuminato con luce ultravioletta. La miscela viene colata su un supporto e si inseriscono i pettini per la formazione dei pozzetti all'interno del gel. Quando il gel si è solidificato (ovvero quando l'agarosio ha raggiunto il corretto grado di polimerizzazione), viene inserito nella cella elettroforetica, in cui è stato preventivamente aggiunto il tampone TBE 0,5x. A questo punto vengono caricati i campioni, in quantità pari a 1/10 del volume finale dei prodotti di PCR, e la corsa elettroforetica viene condotta a 120 Volt per circa 30 minuti. La dimensione dei frammenti

di DNA viene valutata per confronto con un *marker* di dimensione nota (*BenchTop 100bp DNA Ladder, Promega*), che viene caricato sullo stesso gel. Infine, il prodotto di amplificazione viene visualizzato mediante lampada UV.

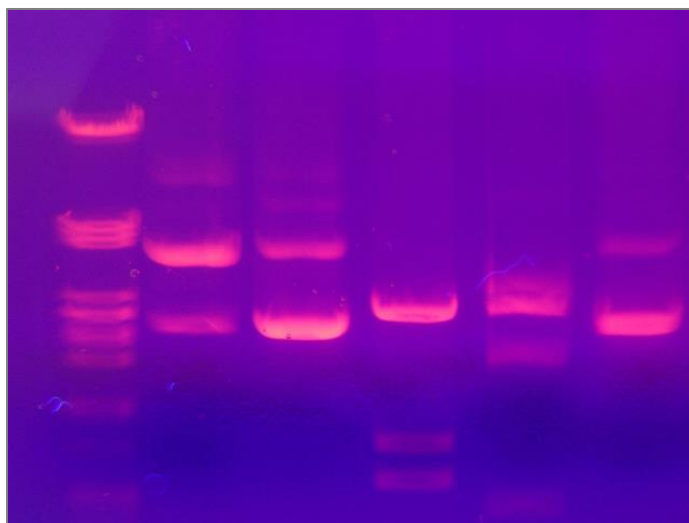


Figura 16: Frammenti di DNA separati tramite elettroforesi su gel, colorati con *Atlas ClearSight* ed esposti a luce ultravioletta.

### 11.3. Purificazione dei prodotti di amplificazione

Gli amplificati che presentavano bande aspecifiche sono stati opportunamente purificati e concentrati attraverso l'uso di un kit commerciale (*NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Machery-Nagel*). I prodotti di amplificazione sono stati, innanzitutto, sottoposti ad una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%, preparato pesando 1,5 g di agarosio, portando a volume con 150 ml di TBE 1x e aggiungendo 15  $\mu$ l di bromuro di etidio (0,01  $\mu$ g/ $\mu$ l). Il gel è stato exciso in corrispondenza delle bande di interesse, che sono state poste in provette da 1,5 ml e pesate, servendosi di una bilancia di precisione.

- La prima fase prevede l'aggiunta del binding buffer NTI. Per ogni 100 mg di gel sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di buffer NTI. Questo buffer contiene un indicatore di pH: il pH ottimale del campione, che garantisce una resa ottimale del kit, ha un valore intorno a 5-6 (l'indicatore appare di colore giallo). Se il pH del campione è 6-7 (indicatore di colore verde) o  $> 7$  (indicatore di colore blu), è necessario ristabilire il valore ideale, aggiungendo altro buffer NTI, oppure 4 M di sodio acetato (NaAc, pH 5.0), o ancora una piccola quantità di acido cloridrico (HCl), finché il colore dell'indicatore ritorna giallo. Successivamente, i campioni sono stati incubati nel termoblocco a 50 °C per 5-10 minuti, vortexando ogni 2-3 minuti, fino ad ottenere la completa dissoluzione del gel.

- A questo punto, il campione disciolto, fino ad un volume di 700  $\mu$ l, è stato caricato in una colonnina posta all'interno di un tubo di raccolta da 2 ml, e sono stati centrifugati per 30 secondi a 11.000 x g. L'operazione è stata ripetuta con il campione rimanente.
- Dopo aver svuotato il tubo di raccolta, i campioni sono stati sottoposti a due lavaggi consecutivi con il wash *buffer* NT3, preparato aggiungendo 80 ml di etanolo 96-100%. I due lavaggi sono stati entrambi eseguiti aggiungendo 700  $\mu$ l di NT3 e centrifugando per 30 secondi a 11,000 x g, per ridurre al minimo le contaminazioni.
- Per rimuovere completamente il *buffer* NT3, è stata effettuata una centrifugazione a 11,000 x g per 1 minuto.
- Per assicurarsi di rimuovere ogni traccia di etanolo residua, le colonnine sono state incubate nel termoblocco a 70 °C per 2-5 minuti.
- Successivamente, la colonna è stata inserita in una nuova provetta da 1,5 ml, e vengono aggiunti 30  $\mu$ l di *elution buffer* NE. Le provette sono state, quindi, incubate a temperatura ambiente per 1 minuto e, infine, centrifugate a 11,000 x g per 5 minuti.
- Il DNA così purificato e concentrato è stato conservato a 4 °C fino al momento del sequenziamento.

#### 11.4. Sequenziamento

Il sequenziamento degli amplificati è stato condotto grazie alla collaborazione di un laboratorio esterno al Dipartimento, mediante un sequenziatore automatico a tecnologia capillare *ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems)*. Il metodo utilizzato è il metodo Sanger, basato sulla tecnologia dell'elettroforesi capillare. Viene utilizzato un kit commerciale (*ABI PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing, Applied Biosystems*), contenente una soluzione composta di ddNTPs (dideossinucleotidi terminatori) marcati con 4 fluorocromi diversi (dTTP 15,79 mM, Tris-HCl 48,42 mM pH 9,1, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,21 mM e l'enzima termostabile *Ampli Taq® FS DNA-polymerase* (0,42 U/ml).

I frammenti vengono separati sulla base delle loro dimensioni mediante elettroforesi capillare dotata di un detector laser a fluorescenza e vengono individuati grazie allo specifico segnale di fluorescenza che emettono (figura 17). La sequenza è mostrata in forma di picchi colorati (elettroferogramma), dove ogni picco corrisponde alla posizione di ciascun

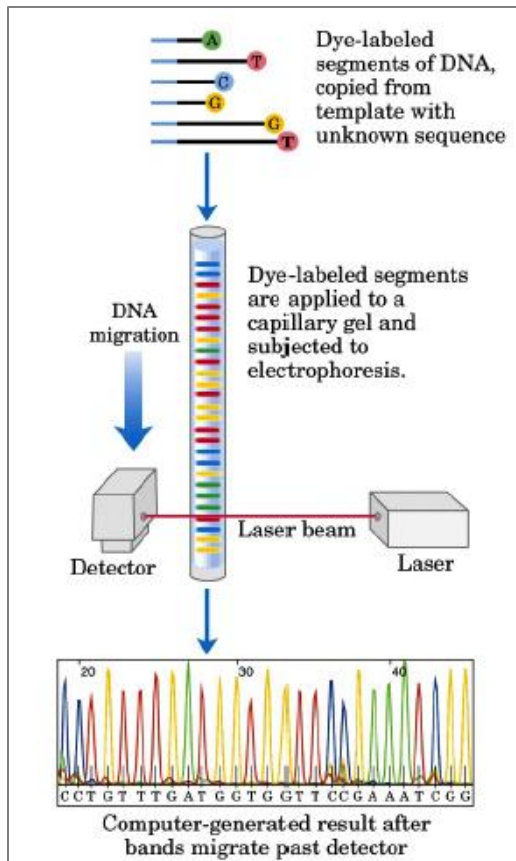


Figura 17: schema del sistema di sequenziamento automatico.

nucleotide nella sequenza. La sequenza del prodotto di amplificazione del frammento genico dei virus influenzali è stata ottenuta dalla lettura degli elettroferogrammi dei due frammenti amplificati per ogni virus influenzale, eseguita attraverso la lettura dei picchi: la sequenza dei picchi, infatti, corrisponde alla sequenza dei nucleotidi dell'amplificato, e il colore del picco identifica in modo univoco un tipo di base azotata. Normalmente, l'elettroferogramma è interpretato in modo automatico dal software utilizzato per il sequenziamento. Tuttavia, se l'interpretazione non risulta ovvia, il sistema di lettura inserisce una "N" al posto della base azotata mancante. La sequenza può essere, così, corretta manualmente dopo lettura.

## 12. Analisi dei dati di sequenza

L'analisi dei dati di sequenza è stata eseguita utilizzando i programmi BioEdit 7.0.9.0 (90) e FinchTV 1.4 (91), programmi di bioinformatica che permettono di importare le sequenze ottenute dai diversi *primers*, assemblare una sequenza consenso grazie ad un confronto con una sequenza di riferimento e ottenere la successione corretta di basi azotate delle sequenze dei campioni in studio per poter effettuare in un secondo momento l'analisi filogenetica.

### 12.1. *Editing* delle sequenze

Tutte le sequenze nucleotidiche relative ai *morbillivirus* ottenute dalla lettura dell'elettroferogramma sono state studiate e caratterizzate molecolarmente. Le sequenze sono state raggruppate in file di testo in formato FASTA. Ogni singola sequenza, in formato FASTA, compare con una riga di descrizione, rappresentata dal nome della sequenza preceduto dal carattere ">", seguita da una serie di righe contenenti la sequenza nucleotidica vera e propria, identificata con le lettere delle 4 basi azotate.

### 12.2. Allineamento delle sequenze

Le sequenze sono state, successivamente, confrontate tra loro e con le sequenze di riferimento presenti nelle banche dati elettroniche di sequenze genetiche GenBank (92).

Le sequenze di riferimento utilizzate e i relativi *Accession Number* sono riportati nelle tabelle 2, 3, 4.

Successivamente, le sequenze sono state allineate mediante l'utilizzo del programma bioinformatico ClustalW, incluso in BioEdit (90). Il software allinea tutte le sequenze a due a due, confrontando ogni possibile combinazione, e calcola la distanza genetica per ogni coppia. I risultati di quest'analisi vengono quindi utilizzati per costruire un semplice albero iniziale di sequenze, che servirà da guida per l'allineamento multiplo, le sequenze sono posizionate una sopra l'altra, così da incolonnare i residui omologhi delle diverse sequenze. Il file di allineamento è stato salvato, sempre in formato FASTA, ed è stato analizzato mediante l'utilizzo del programma bioinformatico BioEdit (90). Inoltre per la costruzione di un albero filogenetico è necessario che tutte le sequenze nucleotidiche in studio abbiano la stessa lunghezza, per questo motivo, attraverso BioEdit (90), le sequenze del file di allineamento sono state tagliate.

<b>Accession Number</b>	<b>Sequenza</b>	<b>Paese d'isolamento</b>	<b>Anno d'isolamento</b>
DQ917480.1	MVi/Maharastra.IND/05	INDIA	2005
DQ917471.1	MVi/Virudhunagar.IND/47.05-2	INDIA	2005
JQ083637.1	MVs/Pune.Ind/03.11/O.F	INDIA	2011
EU812316.1	MVs/Bijnore.IND/04.06/3	INDIA	2006
EU812302.1	MVs/Port Blair.IND/06.06/2/OF	INDIA	2006
DQ917470.1	MVi/Virudhunagar.IND/47.05-1	INDIA	2005
JQ304248.1	MVs/Vellore.IND/20.11/1	INDIA	2011
EU812272.1	MVs/Bagalkot.IND/48.06	INDIA	2006
KM043778.1	MVs/Faridabad.IND/22.14	INDIA	2014
KM034774.1	MVs/Jaipur.IND/23.14/2	INDIA	2014
KM034770.1	MVi/Sundargarh.IND/10.14	INDIA	2014
KM034767.1	MVs/Haridwar.IND/06.14/1	INDIA	2014
KM104670.1	MVs/WesternAustralia.AUS/25.14/	AUSTRALIA	2014
KJ690842.1	MVs/WesternAustralia.AUS/12.14/	AUSTRALIA	2014
KJ690778.1	MVs/WesternAustralia.AUS/11.14/	AUSTRALIA	2014
KF027149.1	MVs/NewSouthWales.AUS/41.12/	AUSTRALIA	2012
DQ852620.1	Mvi/Sydney.AUS/6.03	AUSTRALIA	2003
KJ452401.1	MVs/Sofia.BGR/23.13/	BIELORUSSIA	2013
KF738776.1	MVs/Pernambuco.BRA/19.13/3	BASILE	2013
KC917295.1	MVs/Vancouver.CAN/21.06/	CANADA	2006
JN873029.1	MVs/Alberta.CAN/34.11/	CANADA	2011
KF265360.1	MVs/Berlin.DEU/14.13/	GERMANIA	2013
KJ767568.1	MVs/Berlin.DEU/06.14/	GERMANIA	2014
KM051410.1	MVs/Nuernberg.DEU/19.14/	GERMANIA	2014
KM051408.1	MVs/Marburg.DEU/20.14/	GERMANIA	2014
KM051404.1	MVs/Frankfurt-am-Main.DEU/14.14/	GERMANIA	2014
KJ452440.1	MVs/Greiz.DEU/46.13/	GERMANIA	2013
KF425327.1	MVs/Barcelona.ESP/28.13/2	SPAGNA	2013
KF715450.1	MVs/Roquefort.FRA/16.13/	FRANCIA	2013
KJ659905.1	MVs/LeRheu.FRA/11.14/	FRANCIA	2014
KJ659904.1	MVs/Caen.FRA/12.14/	FRANCIA	2014
		GRAN	
EF079137.1	MVs/London.GBR/18.06/4	BRETAGNA	2006
KJ126839.1	MVs/Dublin.IRL/51.13/	IRLANDA	2013
JX315600.1	MVs/Dublin.IRL/35.11/2	IRLANDA	2011
KJ713279.1	MVs/Kerry.IRL/14.14/	IRLANDA	2014
KJ573575.1	MVs/Trento.ITA/31.10	ITALIA	2010
KJ625224.1	MVs/Genova.ITA/11.10/2	ITALIA	2010
KJ625222.1	MVs/Torino.ITA/14.10/2	ITALIA	2010
JX559403.1	MVs/Napoli.ITA/17.12/3	ITALIA	2012
AB856418.1	MVs/Kawasaki C.JPN/34.13	GIAPPONE	2013

AB915258.1	MVs/Osaka.JPN/15.13/	GIAPPONE	2013
KF856747.1	MVs/Keserwan.LBN/12.13/292	LIBANO	2013
KM073916.1	MVi/KualaLumpur.MYS/20.14/	MALASYA	2014
KF257914.1	MVs/Funchal.PRT/14.13/	PORTOGALLO	2013
KJ769096.1	MVs/Warsaw.POL/04.14/	POLONIA	2014
KJ690781.1	MVs/Zuid-HollandZuid.NLD/11.14/	OLANDA	2014
KM201404.1	MVs/Oslo.NOR/14.14/	NORVEGIA	2014
KJ690844.1	MVs/Maastricht.NLD/14.14/	OLANDA	2014
KJ690829.1	MVs/Malmo.SWE/3.14/	SVEZIA	2014
KJ690807.1	MVs/Stockholm.SWE/15.13/	SVEZIA	2013
KJ923021.1	MVs/Linkoping.SWE/21.14/	SVEZIA	2014
KF764692.1	MVs/Istanbul.TUR/2.13/5	TURCHIA	2013
KF664184.1	MVs/Chachoengsao.THA/33.13/2	TAILANDIA	2013
KC767648.1	MVs/Surin.THA/7.13/1	TAILANDIA	2013
JF683609.1	MVs/Taipei.TWN/22.09	TAIWAN	2009
KJ955467.1	MVs/Maribor.SVN/20.14/	SLOVENIA	2014
KJ638890.1	MVs/California.USA/8.14/2	USA	2014
KJ934647.1	MVs/California.USA/15.14/2	USA	2014
KJ934650.1	MVs/California.USA/14.14/3	USA	2014
JX402873.1	MVi/California.USA/19.12/	USA	2012
KC492072.1	MVs/New-York.USA/37.12/	USA	2012
KF715477.1	MVs/Strasbourg.FRA/35.13/	USA	2013
AY037037.1	MVi/Washington.USA/12.99	USA	1999
KF385865.1	MVs/New York.USA/19.13/2	USA	2013
		GRAN	
JX984461.1	MVs/Taunton.GBR/27.12/	BRETAGNA	2012

Tabella 2: sequenze di riferimento del genotipo D8.



<b>Accession Number</b>	<b>Sequenza</b>	<b>Paese d'isolamento</b>	<b>Anno d'isolamento</b>
AM849053.1	MVi/Shkodra.ALB/44.06	ALBANIA	2006
KM213616.1	MVs/NewSouthWales.AUS/24.14/	AUSTRALIA	2014
KM213611.1	MVs/NewSouthWales.AUS/9.14/2	AUSTRALIA	2014
KM213609.1	MVs/Victoria.AUS/27.14/3	AUSTRALIA	2014
KM044250.1	MVs/Victoria.AUS/24.14/3	AUSTRALIA	2014
KJ731834.1	MVs/Liege.BEL/11.14/	BELGIO	2014
JX679080.1	MVs/Ontario.CAN/31.12	CANADA	2012
		REPUBBLICA	
	MVs/Bozoum-	CENTRAFRICA	
KF002583.1	Bossemptele.CAF/104.13/8	NA	2013
		REPUBBLICA	
	MVs/Bozoum-	CENTRAFRICA	
KF002582.1	Bossemptele.CAF/121.13/9	NA	2013
		REPUBBLICA	
		CENTRAFRICA	
KF002577.1	MVs/Bossembele.CAF/52.13/6	NA	2013
		REPUBBLICA	
		CENTRAFRICA	
KC954661.1	MVs/Lobaye.CAF/137.12/32	NA	2012
		REPUBBLICA	
		CENTRAFRICA	
KF002578.1	MVs/Begoua.CAF/70.13/7	NA	2013
		REPUBBLICA	
		CENTRAFRICA	
KF002573.1	MVs/Ombella-Mpoko.CAF/145.12/38	NA	2012
KJ769097.1	MVs/Zurich.CHE/03.14/2	SVIZZERA	2014
KJ767571.1	MVs/Zurich.CHE/03.14/	SVIZZERA	2014
HM211176.1	MVs/HongKong.CHN/14.10	CINA	2010
		REPUBBLICA	
KJ769095.1	MVs/Usti-nad-Labem.CZE/10.14/	CECA	2014
		REPUBBLICA	
KJ769093.1	MVs/Liberec.CZE/11.14/	CECA	2014
KJ767567.1	MVs/Pfarrkirchen.DEU/07.14/	GERMANIA	2014
KM051407.1	MVs/Landshut.DEU/14.14/	GERMANIA	2014
KJ769092.1	MVs/Landshut.DEU/09.14/	GERMANIA	2014
KM051406.1	MVs/Ingolstadt.DEU/18.14/	GERMANIA	2014
KJ767570.1	MVs/Berlin.DEU/04.14/	GERMANIA	2014
KF831030.1	MVs/Landshut.DEU/27.12	GERMANIA	2012
DQ665363.1	MVs/Stuttgart.DEU/04.06	GERMANIA	2006
JN873063.1	MVs/Freiburg.DEU/26.07	GERMANIA	2007
JX308253.1	MVs/Cotopaxi.ECU/7.12/1	ECUADOR	2012

GQ374255.1	MVs/Alicante.ESP/4.06		SPAGNA	2006
GQ228460.1	MVs/Madrid.ESP/9.06/2		SPAGNA	2006
EU086728.1	MVs/Madrid.SPA/05.06/1		SPAGNA	2006
KJ659903.1	MVs/Nimes.FRA/12.14/		FRANCIA	2014
GU937498.1	MVs/Gaillac.FRA/06.09		FRANCIA	2009
			GRAN	
KJ650198.1	MVs/Tonbridge.GBR/5.14/		BRETAGNA	2014
			GRAN	
HQ202161.1	MVs/NewcastleUponTyne.GBR/26.10/		BRETAGNA	2010
	MVs/Kingston	upon	GRAN	
EF079141.1	Thames.GBR/20.06/3		BRETAGNA	2006
			GRAN	
EF079148.1	MVs/London.GBR/26.06/3		BRETAGNA	2006
			GRAN	
EU111661.1	MVs/London.GBR/28.07/8		BRETAGNA	2007
			GRAN	
EF554311.1	MVs/London.GBR/9.07		BRETAGNA	2007
			GRAN	
EF079129.1	MVs/London.GBR/31.05		BRETAGNA	2005
			GRAN	
JX126855.1	MVs/Bradford.GBR/18.12/		BRETAGNA	2012
KJ474826.1	MVs/Dublin.IRL/7.14/		IRLANDA	2014
KF254764.1	MVs/Saravan.IRN/20.13/5		IRLANDA	2013
JX266443.1	MVs/Sistan.IRN/20.12/5		IRLANDA	2012
KJ579173.1	MVs/Rome.ITA/7.14/ScarLi		ITALIA	2014
KJ573573.1	MVs/Asti.ITA/21.10/1		ITALIA	2010
KJ573572.1	MVs/Genova.ITA/32.10/2		ITALIA	2010
KJ571155.1	MVs/Grosseto.ITA/9.14/5		ITALIA	2014
KJ571154.1	MVs/Grosseto.ITA/9.14/4		ITALIA	2014
KJ571153.1	MVs/Grosseto.ITA/9.14/3		ITALIA	2014
KJ571152.1	MVs/Grosseto.ITA/9.14/2		ITALIA	2014
KJ571151.1	MVs/Grosseto.ITA/9.14/		ITALIA	2014
KJ556899.1	MMVs/ITA/08.14/EsJoDu		ITALIA	2014
KJ556898.1	MVs/ITA/08.14/MenAn		ITALIA	2014
KJ556897.1	MVs/ITA/08.14/AnCri		ITALIA	2014
KJ556896.1	MVs/ITA/08.14/CheNa		ITALIA	2014
KJ556895.1	MVs/ITA/08.14/RaRTa		ITALIA	2014
JX559405.1	MVs/Roma.ITA/27.11/		ITALIA	2011
KJ700872.1	MVs/Rome.ITA/12.14/BuMaBa		ITALIA	2014
KJ700873.1	MVs/Rome.ITA/13.14/MuLuc		ITALIA	2014
JQ783031.1	MVs/Latina.ITA/50.06		ITALIA	2006
JQ783030.1	MVs/Aprilia.ITA/49.06		ITALIA	2006
JQ783029.1	MVs/Albano.ITA/48.06		ITALIA	2006

JQ783028.1	MVs/Pomezia.ITA/48.06/1	ITALIA	2006
JQ783023.1	MVs/Padova.ITA/23.07	ITALIA	2007
JQ783022.1	MVs/Bari.ITA/21.07	ITALIA	2007
JQ783021.1	MVs/Ferrara.ITA/15.07	ITALIA	2007
JQ783020.1	MVs/Viterbo.ITA/13.07	ITALIA	2007
JQ783019.1	MVs/Ancona.ITA/13.07	ITALIA	2007
JQ783018.1	MVs/Viterbo.ITA/11.07	ITALIA	2007
JQ783017.1	MVs/Milano.ITA/11.07	ITALIA	2007
JQ783016.1	MVs/Parma.ITA/11.07	ITALIA	2007
JQ783015.1	MVs/Grosseto.ITA/11.07	ITALIA	2007
JQ783014.1	MVs/Roma.ITA/10.07/3	ITALIA	2007
JQ783013.1	MVs/Roma.ITA/10.07	ITALIA	2007
JQ783012.1	MVs/Latina.ITA/07.07	ITALIA	2007
JQ783011.1	MVs/CapoD'Orlando.ITA/04.07	ITALIA	2007
JQ783010.1	MVs/Barletta.ITA/03.07	ITALIA	2007
JQ783009.1	MVs/Roma.ITA/02.07	ITALIA	2007
JQ783008.1	MVs/Roma.ITA/01.07	ITALIA	2007
EF468495.1	MVs/Barletta.ITA/San06	ITALIA	2006
EF533886.1	MVs/Roma.ITA/43.06/2	ITALIA	2006
AB968230.1	MVs/Okayama.JPN/12.14/150797	GIAPPONE	2014
EF031462.1	MVi/Nairobi.KEN/41.05/1	KENIA	2005
JQ417717.1	MVi/Srwk.MYS/35.10/	MALASYA	2010
JN135231.1	MVs/Bosso.NGA/1.11/3	NIGER	2011
JN126026.1	MVs/Chanchaga.NGA/47.10/1	NIGER	2010
KJ690847.1	MVs/DenHaag.NLD/15.14/	OLANDA	2014
KJ605467.1	MVs/Boskoop.NLD/11.14/	OLANDA	2014
KJ605465.1	MVs/DenHaag.NLD/10.14/	OLANDA	2014
KJ605463.1	MVs/Haarlem.NLD/7.14/	OLANDA	2014
KJ690785.1	MVs/DenHaag.NLD/12.14/3	OLANDA	2014
KJ690783.1	MVs/DenHaag.NLD/12.14/	OLANDA	2014
AB367920.1	MVs/IJmuiden.NLD/34.07	OLANDA	2007
JX680820.1	MVs/Oslo.NOR/19.11/	NORVEGIA	2011
KJ634500.1	MVi/Cagayande Oro.PHL/2.14/	FILIPPINE	2014
KJ634501.1	MVi/San Pedro.PHL/52.13/	FILIPPINE	2013
KJ690838.1	MVs/Stockholm.SWE/9.14/	SVEZIA	2014
KJ755835.1	MVs/Istanbul.TUR/34.12/	TURCHIA	2012
KF224903.1	MVs/Michigan.USA/18.13/	USA	2013
KJ955454.1	MVs/Washington.USA/15.14/	USA	2014
KM191168.1	MVs/Washington.USA/22.14/	USA	2014
KJ731838.1	MVs/California.USA/13.14/	USA	2014
KJ638895.1	MVs/California.USA/10.14/	USA	2014
KJ923188.1	MVi/Washington.USA/13.14/	USA	2014
KJ731840.1	MVs/Alabama.USA/13.14/	USA	2014
KJ409437.1	MVs/Oregon.USA/2.14/	USA	2014

KJ409436.1	MVs/Wisconsin.USA/4.14/	USA	2014
KM017106.1	MVs/Missouri.USA/19.14/	USA	2014
JN005818.1	MVs/Massachusetts.USA/6.11/	USA	2011
KJ638892.1	MVs/New York.USA/8.14/6	USA	2014
KJ511007.1	MVs/New York.USA/5.14/	USA	2014
JF973040.1	MVi/Harare.ZWE/45.09/2	ZIMBAWE	2009

**Tabella 3: sequenze di riferimento del genotipo B3.**

<b>Accession</b>		<b>Paese</b>	<b>Anno</b>
<b>Number</b>	<b>Sequenza</b>	<b>d'isolamento</b>	<b>d'isolamento</b>
EU878302.1	MVs/Maastricht.NLD/22.08	OLANDA	2009
FJ356078.1	MVi/Phare.THA/27.08/1	TAILANDIA	2008
JX187580.1	MVs/Ancona.ITA/8.08	ITALIA	2008
GU937504.1	MVs/Villeneuve.FRA/28.08	FRANCIA	2008
KC683899.1	MVi/Nakhonsawan.THA/40.08/1	TAILANDIA	2008
		GRAN	
FJ150693.1	MVs/London.GBR/22.08/9	BRETAGNA	2008
FJ911610.1	MVs/Granada.ESP/25.08/	SPAGNA	2008
GQ338676.1	MVs/Taipei.TWN/34.08/2	TAIWAN	2008
FJ356073.1	MVi/Lopburi.THA/8.08/1	TAILANDIA	2008
KC683898.1	MVi/Bangkok.THA/39.08/1	TAILANDIA	2008
KJ573574.1	MVs/Bologna.ITA/24.10	ITALIA	2010
AB779760.1	Mvs/Yamanashi.JPN/51.12	GIAPPONE	2012
KJ690780.1	MVs/NewSouthWales.AUS/11.14/	AUSTRALIA	2014
KJ210629.1	MVs/Victoria.AUS/2.14/4	AUSTRALIA	2014
KJ452437.1	MVs/Heidelberg.DEU/43.13/	GERMANIA	2013
KF856741.1	MVs/WesternAustralia.AUS/44.13	AUSTRALIA	2013
KF856740.1	MVs/Victoria.AUS/44.13/2	AUSTRALIA	2013
KF769439.1	MVs/WesternAustralia.AUS/41.13/4	AUSTRALIA	2013
KF818393.1	MVs/Amiens.FRA/43.13/	FRANCIA	2013
KC164506.1	MVs/Victoria.AUS/1.12/	AUSTRALIA	2012
KF039700.1	MVs/WesternAustralia.AUS/47.12/	AUSTRALIA	2012
KF039701.1	MVs/WesternAustralia.AUS/49.12/	AUSTRALIA	2012
JQ609272.1	MVs/NewSouthWales.AUS/15.11	AUSTRALIA	2011
KF447436.1	MVs/Victoria.AUS/1.11/	AUSTRALIA	2011
KF741211.1	MVs/NewSouthWales.AUS/40.13/2	AUSTRALIA	2013
JX036511.1	MVs/HongKong.CHN/02.12	CINA	2012
AB640866.1	MVs/Hiroshima.JPN/14.11	GIAPPONE	2014
AB841081.1	MVs/Aichi.JPN/13.13	GIAPPONE	2013
AB811458.1	MVs/Mie.JPN/12.13	GIAPPONE	2013
JX905351.1	MVs/Bago/MMR/45.10/2	MYANMAR	2010
JX905330.1	MVi/Yangon/MMR/7.10/3	MYANMAR	2010
KC447376.1	MVi/Kuala-Lumpur.MYS/45.11/	MYANMAR	2011
KC447372.1	MVi/Kuala-Lumpur.MYS/44.11/	MYANMAR	2011
KC464374.1	MVi/Kuala-Pilah.MYS/46.11/	MYANMAR	2011
KC447377.1	MVi/Sabah.MYS/45.11/2/	MYANMAR	2011
JN254743.1	MVs/Sgor.MYS/15.11/240/	MYANMAR	2011
JQ417713.1	MVi/Sgor.MYS/34.11/	MYANMAR	2011
JQ417695.1	MVi/Sgor.MYS/29.11/	MYANMAR	2011
JN254744.1	MVi/Sgor.MYS/15.11/244/	MYANMAR	2011
KC464375.1	MVi/Gombak.MYS/52.11/	MYANMAR	2011
JN254740.1	MVi/Klumpur.MYS/13.11/186/	MYANMAR	2011

JN254741.1	MVi/Klumpur.MYS/14.11/213/	MYANMAR	2011
JQ417715.1	MVi/KLumpur.MYS/34.11/	MYANMAR	2011
JQ417705.1	MVi/KLumpur.MYS/40.11/	MYANMAR	2011
KC464377.1	MVi/Hulu-Langat.MYS/52.11/	MYANMAR	2011
JN599046.1	MVs/Prk.MYS/21.11/M402/	MYANMAR	2011
JX275761.1	MVi/Cheras.MYS/17.12/	MYANMAR	2012
KC139075.1	MVi/Gombak.MYS/37.12/	MYANMAR	2012
JX026855.1	MVi/Kajang.MYS/11.12/	MYANMAR	2011
JX122391.1	MVi/Tanah-Merah.MYS/16.12/2/	MYANMAR	2012
JQ978699.1	MVi/Kajang.MYS/7.12/	MYANMAR	2012
JX275768.1	MVi/Hulu-Langat.MYS/21.12/	MYANMAR	2012
JX486000.1	MVi/Hulu-Langat.MYS/25.12/	MYANMAR	2012
FJ831440.1	MVs/Alkmaar.NLD/09.09/	OLANDA	2009
KC608973.1	MVi/Uttaradit.THA/35.08/1[D9	TAILANDIA	2008
KC683902.1	MVs/Nong-Khai.THA/8.09/3	TAILANDIA	2009
JQ417663.1	MVs/Istanbul.TUR/09.11/1	TURCHIA	2011
JQ905273.1	MVs/Istanbul.TUR/07.11/6	TURCHIA	2011
KF224899.1	MVs/Texas.USA/15.13/	USA	2013
JQ942133.1	MVi/Maryland.USA/36.11/	USA	2011
JQ942129.1	MVi/Indiana.USA/26.11/1	USA	2011

Tabella 4: sequenze di riferimento del genotipo D9.

### 13. Analisi filogenetiche

L'analisi filogenetica, volta a studiare le distanze evolutive esistenti tra le sequenze in esame, viene condotta valutando tali distanze rappresentate attraverso alberi filogenetici, che costituiscono dei grafici bidimensionali composti da nodi connessi tra loro tramite rami.

I nodi terminali rappresentano i *taxa* attuali, mentre i nodi interni rappresentano quelli ancestrali.

Le relazioni filogenetiche vengono definite attraverso la topologia dell'albero: la distribuzione dei nodi e la lunghezza dei rami forniscono indicazioni sulla divergenza evolutiva esistente tra i diversi *taxa*, permettendo di individuare gruppi monofiletici e linee evolutive.

L'analisi filogenetica rappresenta, oggi, l'unico metodo affidabile per la tipizzazione delle sequenze, permette inoltre di esaminare le relazioni genetiche all'interno di un gruppo di sequenze o tra virus provenienti da diverse aree geografiche, fornendo indicazioni epidemiologiche sull'origine e la propagazione dei virus in una popolazione.

#### 13.1. Analisi filodinamica

I metodi filogenetici computazionali possono risultare utili in un contesto di Sanità Pubblica per valutare caratteristiche virologiche importanti (come ad esempio le forze di pressione selettiva che agiscono su una popolazione virale o il suo andamento di crescita), per analizzare alcune caratteristiche dell'infezione (come il numero riproduttivo di base di un'epidemia) e di stimare con buona precisione il momento in cui un dato microrganismo ha iniziato a diffondersi nella popolazione. In questo contesto, grande rilevanza ha assunto la teoria dell'orologio molecolare (*Molecular Clock*) (93) (94) (95).

Tale modello si basa sull'assunto che le mutazioni si accumulino nel tempo in modo pressoché costante e permette di delineare le relazioni intercorrenti tra le distanze genetiche e il tempo, permettendo al tempo stesso di datare gli eventi di divergenza evolutiva (96).

Le sequenze virali vengono datate in base al momento del prelievo e i rami dell'albero filogenetico hanno una lunghezza proporzionale al tempo. Questo tipo di approccio stima la distanza temporale dei rami ed il tempo dell'antecessore comune più recente (TMRCA, *time of the most recent common ancestor*). I modelli più semplici prevedono un orologio molecolare più rigido (*strict clock model*), nel quale si assume che tutti i *lineage* evolvano alla stessa velocità; diversamente, nei modelli più complessi (*relaxed clock model*) le velocità evolutive variano nel tempo e tra i vari *lineage*, fornendo degli intervalli di variabilità intorno ad un valore medio della velocità evolutiva. Per l'analisi filodinamica condotta in questo studio, dopo aver testato tutti i modelli evolutivi, è stato selezionato un orologio molecolare di tipo *relaxed*, in cui ogni *lineage* ha un *rate* evolutivo proprio e non correlato con quello dei *lineage* contigui.

Questo tipo di analisi richiede inoltre dei sistemi di inferenza statistica che ne supportino la significatività.

L'analisi filodinamica fonda le sue basi sulle teorie della statistica Bayesiana (97), che calcola la probabilità a posteriori dell'albero (ovvero la probabilità di ottenere un certo albero in base ai dati forniti), diversamente da quanto avviene nel *Maximum Likelihood*, che ricerca la miglior verosimiglianza (*likelihood*) dell'albero (ovvero la probabilità di ottenere i dati in base all'albero generato). La probabilità a posteriori è così calcolata, secondo le teorie Bayesiane, a partire dalla probabilità a posteriori dell'analisi filogenetica e dalla *likelihood* dell'albero.

Le probabilità a posteriori stimate vengono approssimate mediante l'algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) (98). Inizialmente viene generato uno *starting tree* casuale che viene poi confrontato con un nuovo albero ottenuto modificando in modo sistematico il precedente e i relativi parametri; il secondo albero viene quindi accettato o rifiutato sulla base della probabilità a posteriori in uno specifico processo di campionamento. Questo sistema di confronto viene ripetuto un numero elevato di volte (minimo 1 milione di generazioni 'a catena') fino a ottenere l'albero con il più alto prodotto di probabilità a posteriore nodale tra tutti quelli generati (definito *consensus tree* o *Maximum clade credibility tree*). In questo modo si ottiene una stima della significatività dei *cluster* dell'albero, fornendo così dei valori di supporto statistico.

Un altro concetto fondamentale per studiare l'evoluzione di una specie virale in una popolazione è quello della coalescenza (99). La teoria della coalescenza si basa sulla correlazione tra il tempo in cui due *taxa* o due *lineage* hanno condiviso uno stesso antecessore e le dimensioni della popolazione in esame. Applicando un orologio molecolare ad un albero filogenetico, è possibile stimare i nodi interni, che rappresentano gli eventi coalescenti, su una reale scala temporale; la teoria della coalescenza rappresenta così un ottimo strumento per valutare le modificazioni di una popolazione virale avvenute nel passato.

Per tracciare l'evoluzione dei *lineage* virali, da cui estrapolare gli eventi di coalescenza, è necessario disegnare uno *skyline plot*, che mostra le dimensioni della popolazione virale e il suo andamento su scala temporale.

Questo tipo di approccio è alla base dei metodi Bayesiani e del programma *Beast* (100)

*Beast* stima le dimensioni effettive, la velocità di mutazione ed i *pattern* di crescita di una popolazione in base ad un modello evolutivo, basandosi su cinque componenti fondamentali:

- *Substitution model*: definisce le differenti velocità evolutive con cui avvengono le sostituzioni lungo i rami dell'albero.



- *Rate model among sites*: definisce la distribuzione delle differenti velocità all'interno dei siti.
- *Rate model among branches*: definisce la distribuzione delle differenti velocità tra i singoli rami, convertendo l'albero, che è in scala temporale, in unità di sostituzioni per sito per anno; questo modello è utilizzato per stimare il tempo di divergenza della popolazione.
- *Tree*: definisce il modello delle relazioni filogenetiche tra le sequenze.
- *Tree prior*: fornisce i parametri del modello evolutivo e la topologia dell'albero. Attualmente i modelli parametrici disponibili sono *constant size* (1 parametro), *exponential growth* (2 parametri) e *logistic growth* (3 parametri).

La teoria dell'orologio molecolare è stata applicata per poter studiare l'evoluzione del *morbillivirus* e per stimare alcune caratteristiche della dinamica evolutiva del virus e della infezione.

Per l'analisi delle nostre sequenze è stato selezionato, tramite l'utilizzo del programma *JModelTest2* (101), il modello GTR-G (*General-Time Reversible+Gamma distribution rate*). Inoltre sono stati testati diversi modelli demografici parametrici (*constant population size*, *exponential*, *logistic growth*) e il modello non parametrico *skyline plot*. Questi modelli evolutivi sono stati confrontati con un test di *Maximum Likelihood* in modo da valutare quale fosse il modello più rappresentativo per il *dataset* di sequenze di questo studio. Sulla base del *Bayes Factor* ottenuto è stato scelto il modello *relaxed skyline*.

L'analisi ottenuta tramite *Beast*, deve poi essere validata dal software *TRACER* (102), il quale verifica la stima dell'effettiva dimensione del campione (*ESS*, *effective sample size*). L'incertezza delle stime ottenute è stata indicata con intervalli di *Highest Posterior Density* del 95% (*HPD*).

L'albero datato mostrato è stato ottenuto selezionando l'albero con il più alto prodotto di probabilità a posteriori (*maximum clade credibility*), mediante il programma *Tree Annotator* (103).

### 13.2. Analisi della pressione selettiva

E' stata valutata la pressione selettiva sito-specifica positiva e negativa utilizzando diversi approcci: *single likelihood ancestor counting* (*SLAC*) (104), *fixed-effects likelihood e internal fixed-effects likelihood* (*FEL/IFEL*) (104) (105) ed il *Mixed Effects Model of Episodic Diversifying Selection* (*MEME*) (106).

Tutti e tre gli approcci sono disponibili sul server *DataMonkey* (107) (108), basato sul pacchetto *HyPhy* (109).

Il metodo SLAC utilizza l'allineamento per costruire un Albero filogenetico *Maximum Likelihood* da cui è in grado di ricostruire (secondo i parametri stimati di tasso di sostituzione e lunghezza dei bracci) sito per sito la sequenza ancestrale, ottenuta valutando il numero minore possibile di mutazioni. Da questa sequenza vengono quindi calcolati i valori dN e dS e confrontati fra loro. Il test assume che in assenza di pressione selettiva una sostituzione sinonima random ha probabilità  $p=S/S+N$  e calcola ad ogni sito quanto il valore osservato si discosta da quello atteso; se la frequenza di sostituzioni sinonime osservate ad un determinato sito si discosta significativamente (valore p di significatività) dal valore calcolato significa che in tale sito agisce pressione selettiva.

Il metodo FEL, invece, dopo aver costruito l'albero calcola, per ogni sito, due parametri: a (tasso di sostituzione sinonima) and b (tasso sostituzione non-sinonima). Ad ogni sito viene quindi effettuato un LRT per valutare se a è uguale a b e viene ricavato un valore di significatività p. Se la differenza risulta statisticamente significativa allora il sito è soggetto pressione selettiva (104) I siti selezionati negativamente sono stati identificati comparando le stime di SLAC e FEL di dN e dS a livello di ciascun sito con un livello di significatività = 0,1 (110). Il valore di IFEL va a valutare i valori descritti in precedenza ma a livello dei rami interni all'albero.

Il metodo MEME, è stato recentemente sviluppato per identificare la pressione selettiva positiva sia pervasiva che episodica. Questo metodo combina gli effetti fissi che avvengono a livello di un sito e gli effetti *random* che avvengono a livello dei rami. Questo modello è un'estensione di FEL, dove è permesso che i valori  $\omega$  possono variare lungo i rami secondo una distribuzione 2-bin, vale a dire alcuni rami possono essere sotto pressione selettiva positiva, mentre altri sotto pressione selettiva negativa.

# Risultati

## 14. Profilo epidemiologico del morbillo in Lombardia nel biennio 2013-2014

### 14.1. Casi di morbillo in Lombardia da luglio 2013 a novembre 2014

Da luglio 2013 a novembre 2014 in Lombardia sono stati segnalati 596 casi di morbillo, di cui il 56.2% (335/596) dei casi è stato confermato in laboratorio. L'11.4% (68/596) delle segnalazioni di morbillo è risultato negativo agli esami di laboratorio e quindi classificato come non caso. Pertanto i casi di morbillo (possibili, probabili e confermati) in Lombardia nel periodo in studio sono stati complessivamente 528 (88,6%; 528/596).

Circa il 52,5% (277/528) dei casi interessava il sesso maschile (figura 18).

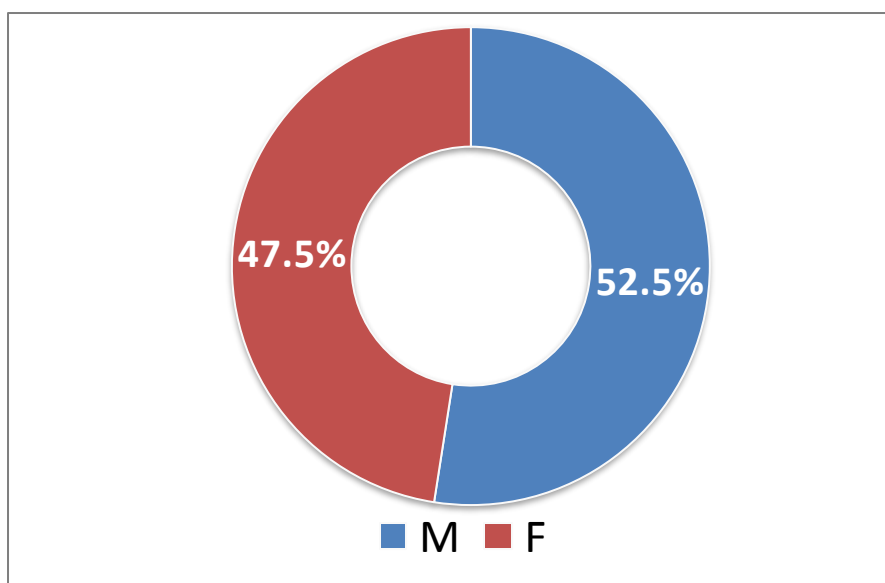


Figura 18: Distribuzione percentuale per sesso dei casi di morbillo. Lombardia luglio 2013 - novembre 2014.

La figura 19 riporta la distribuzione percentuale dei casi di morbillo in Lombardia per classe d'età nel periodo in studio. La maggior parte dei casi (359 casi, pari al 68%) si è verificata nella fascia di età 15-39 anni. Il 9% dei casi (47) è stato osservato in bambini sotto i cinque anni di età, di cui il 6,4% (3/47) in pazienti con meno di un anno. L'età mediana dei casi è risultata di 28 anni (range: 0-62anni).

Complessivamente 401 casi segnalati (75,9%) erano non vaccinati, 50 casi (9,5%) avevano ricevuto una dose di vaccino e 3 (0,6%) due dosi (figura 20).

La figura 21 riporta la distribuzione temporale e la ASL di appartenenza dei casi segnalati. Il maggior numero di segnalazioni è stato registrato a luglio 2013 (107 casi, pari a 20,3%) e a novembre 2013 (102 casi pari al 19,3%), nel 2014 il picco epidemico è stato registrato in primavera – fine febbraio-inizi di luglio – (116 casi; 22%).

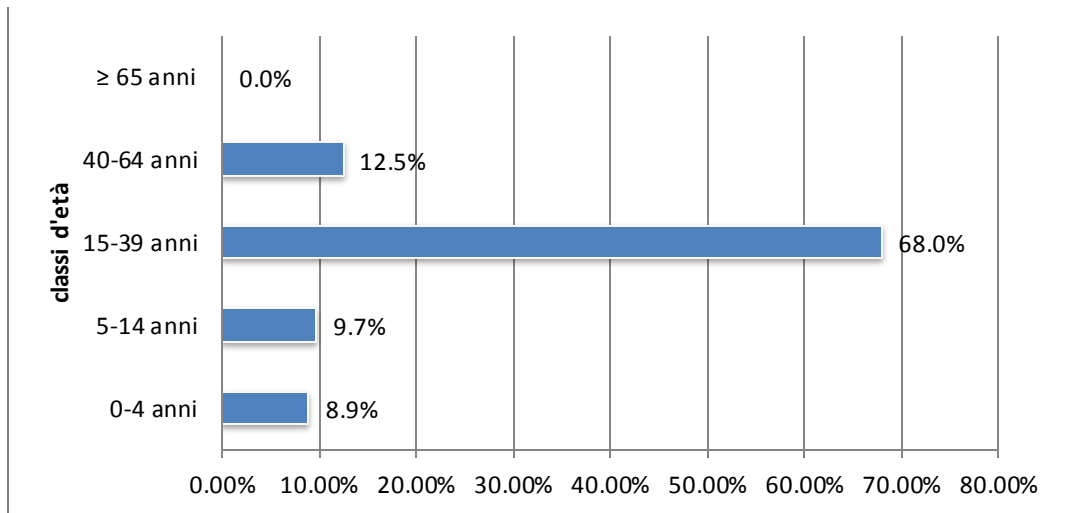


Figura 19: Proporzioe dei casi di morbillo per classe d'età. Lombardia luglio 2013-novembre 2014.

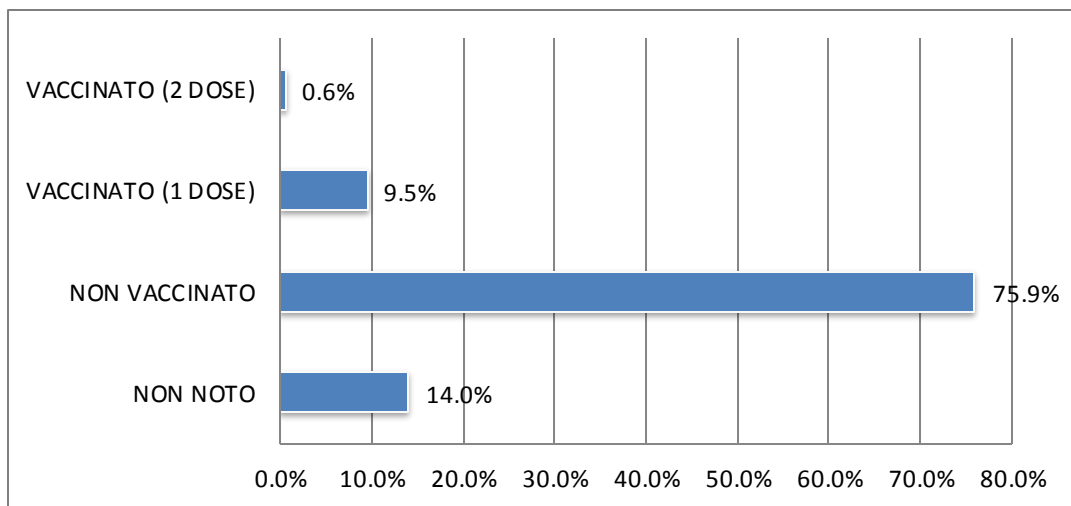


Figura 20: Proporzioe dei casi di morbillo per stato vaccinale. Lombardia luglio 2013-novembre 2014.

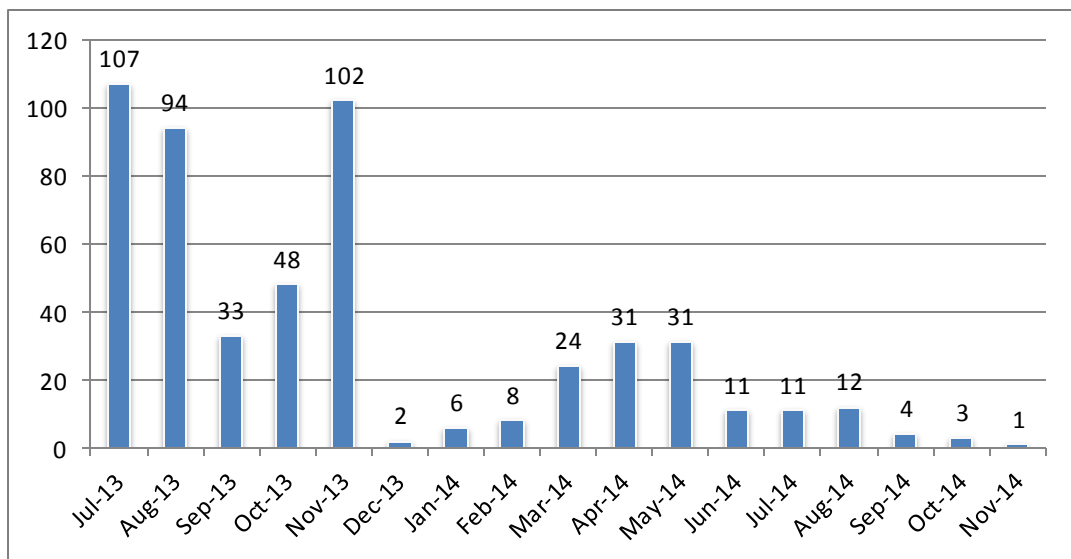


Figura 21: Distribuzione temporale e ASL di appartenenza dei casi segnalati. Lombardia luglio 2013-novembre 2014.

Le ASL che hanno riportato il maggior numero di segnalazioni sono state le ASL di Milano con il 46,2%, il 10,6% ed il 8,7% (ASL Città di Milano, ASL Milano 1 e ASL Milano 2 rispettivamente).

Complessivamente sono stati segnalati 86 focolai, che hanno interessato 183 casi. Il 65% dei casi (343) è stato segnalato come caso sporadico.

Il 5,5% dei casi (29/528) ha riferito di aver fatto un viaggio all'estero. 13 (44,8%; 13/29) di questi presentavano una compatibilità temporale con le tempistiche di incubazione virale, facendo supporre la presenza di casi d'importazione. In figura 22 sono riportati i paesi in cui i casi avevano soggiornato.

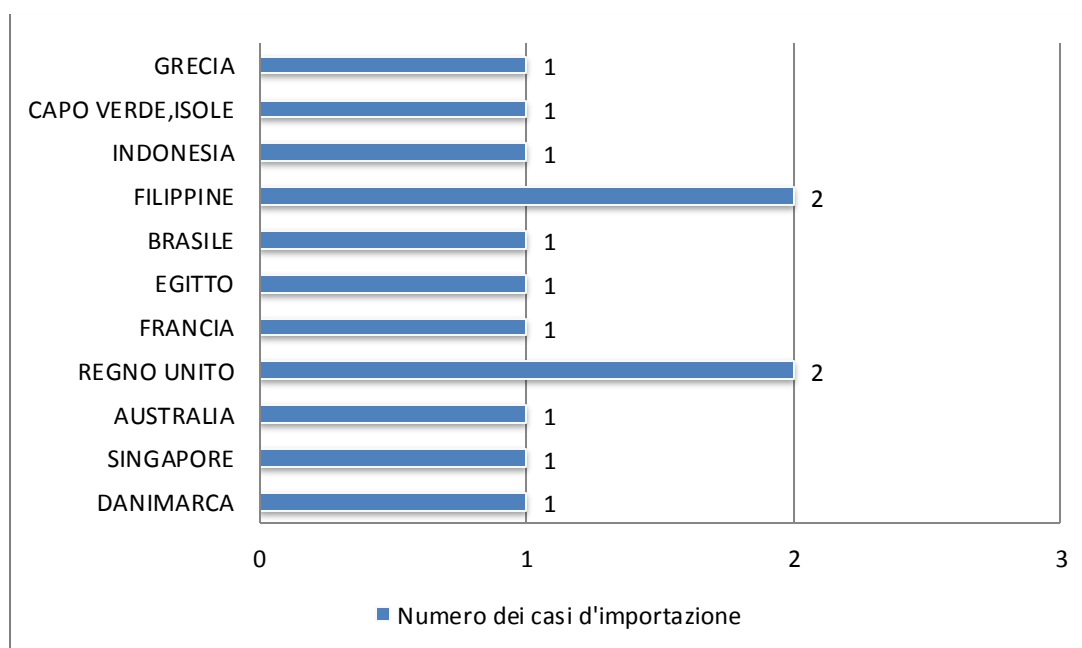


Figura 22: Numero dei casi d'importazione e destinazione del viaggio. Lombardia luglio 2013-novembre 2014.

#### 14.2. Sorveglianza integrata morbillo - rosolia in Lombardia

Nell'ambito della sorveglianza integrata morbillo rosolia, da luglio 2013 a settembre 2014, il centro di riferimento regionale (CRR) ha ricevuto e analizzato sia per morbillo che per rosolia, i campioni biologici (sangue, tampone naso/faringeo, urina) di 115 pazienti con sospetta infezione.

I campioni raccolti provenivano da pazienti aventi età compresa tra 1 mese e 65 anni (età mediana 26 anni).

Il sistema di sorveglianza integrata ha permesso di confermare 63 (54,8%; 63/115) casi di morbillo; mentre nessun caso di rosolia è stato confermato.

Il maggior numero di casi confermati (76,2%; 48/63) è stato osservato nella fascia d'età compresa tra i 15 e i 39, che è stata anche la classe di età con il maggior numero di segnalazioni di morbillo in Lombardia, seguita dalla fascia d'età 40 – 64 anni con il 12,7% (8/63) (figura 23).

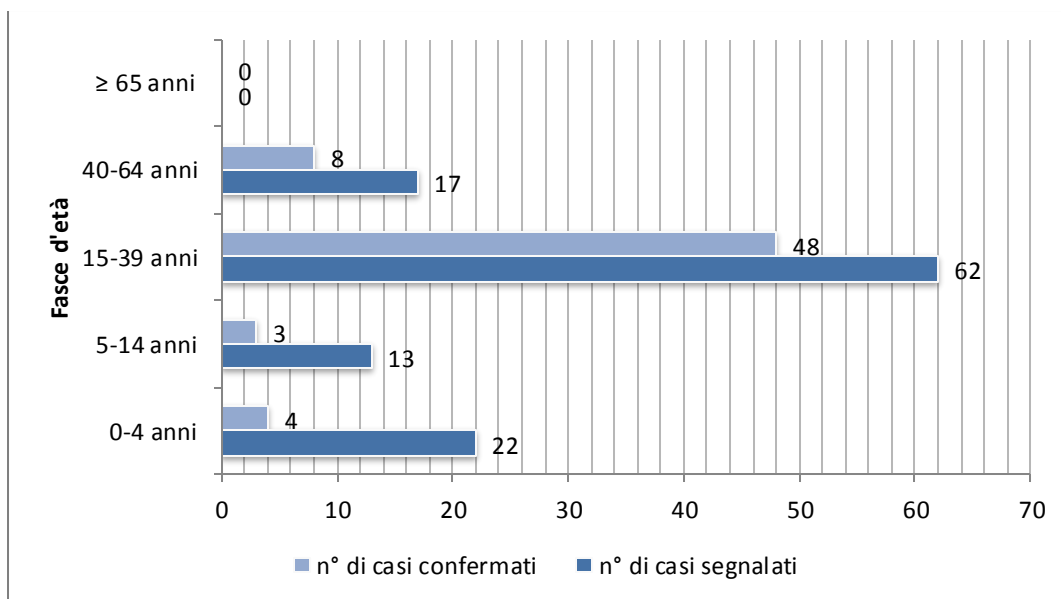


Figura 23: Numero dei casi confermati e dei casi segnalati di morbillo per classe d'età. Lombardia luglio 2013-settembre 2014.

La maggior parte delle segnalazioni di morbillo e delle conferme di laboratorio si collocano nel periodo compreso tra febbraio e agosto 2014 con un picco ad aprile e maggio (figura 24).

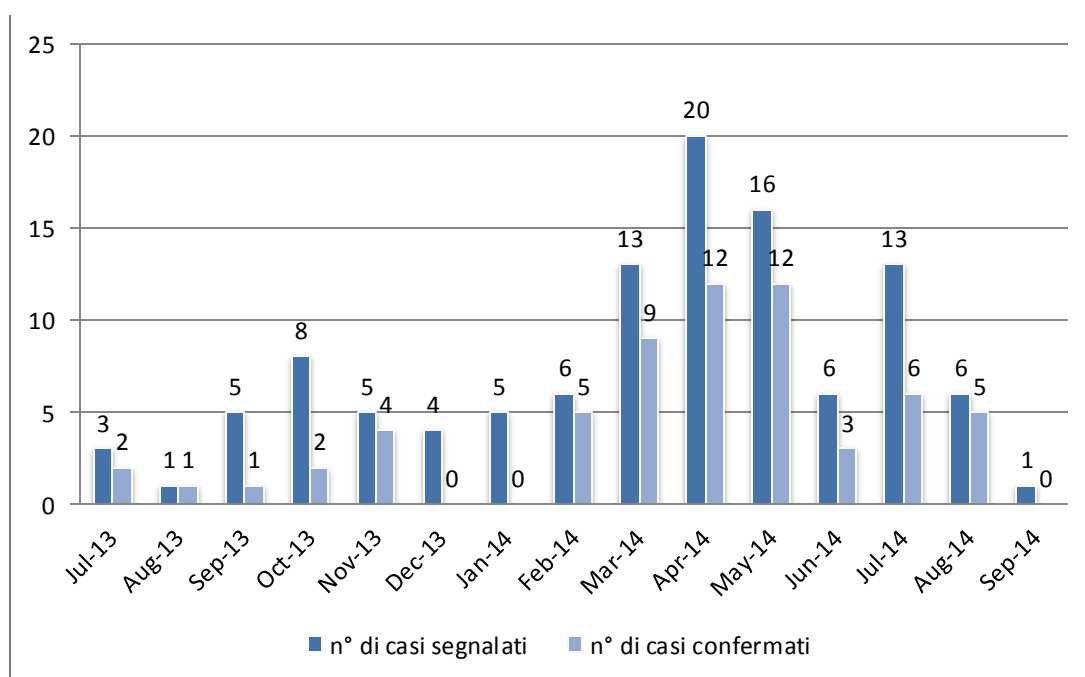


Figura 24: Distribuzione temporale dei casi di morbillo segnalati e di quelli confermati. Lombardia luglio 2013-settembre 2014.

In figura 25 viene mostrata la provenienza geografica dei casi confermati di morbillo, il 47,6% (30/63) proveniva da Milano, il 19% (12/63) dalla provincia di Pavia e il 11,2% (7/63) da Monza; le ASL di Milano, Pavia e Monza e Brianza hanno inviato i campioni per la sorveglianza integrata di oltre la metà dei casi segnalati (77,8%).

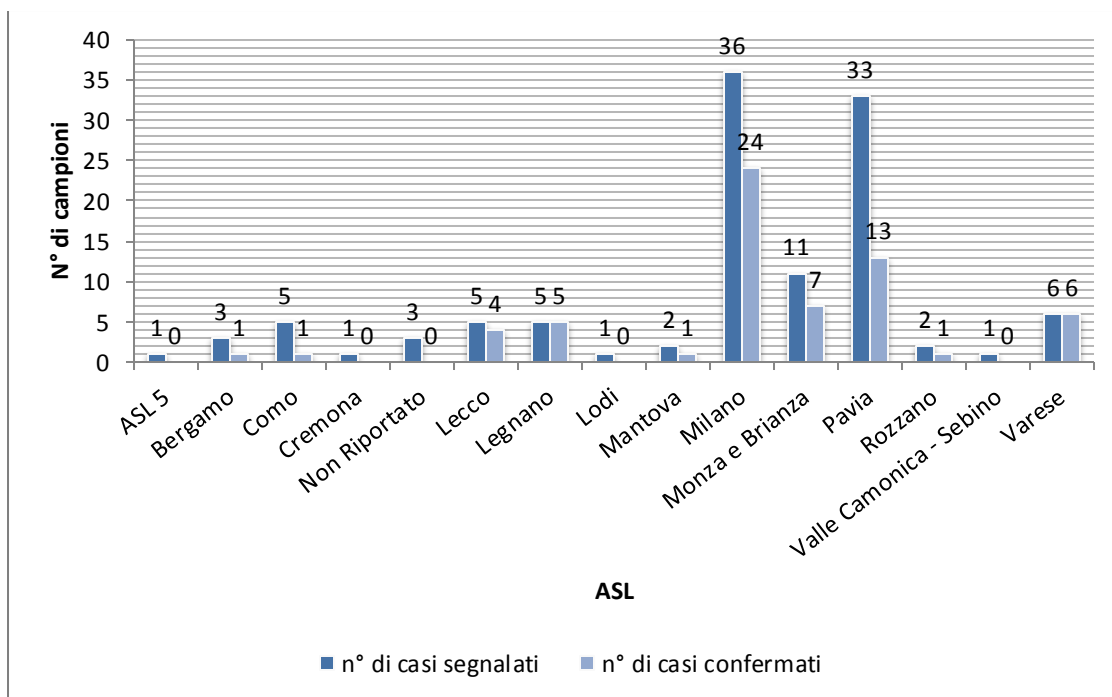


Figura 25: Distribuzione geografica dei casi di morbillo segnalati e di quelli confermati. Lombardia luglio 2013-settembre 2014.

Dall'analisi dei dati riguardanti lo stato vaccinale è emerso che il 60,3% (38/63) dei casi confermati non era vaccinato, il 27% (17/63) presentava uno stato vaccinale non noto (figura 26).

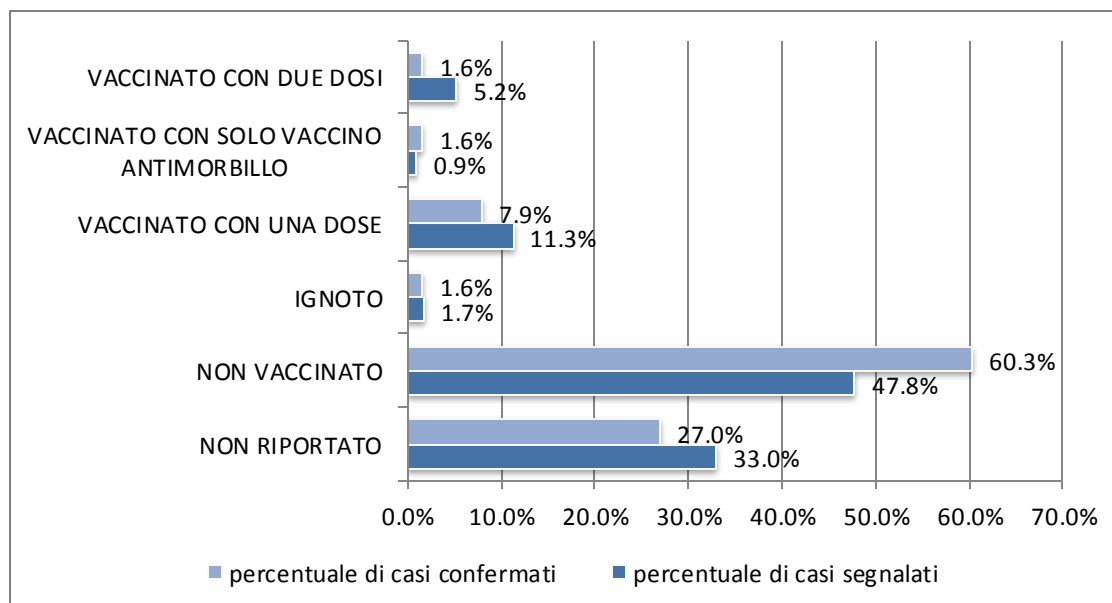


Figura 26: Proporzioni dei casi segnalati di morbillo e di quelli confermati per stato vaccinale. Lombardia luglio 2013-settembre 2014.



## 15. Profilo genetico dei ceppi di morbillivirus circolanti in Lombardia

### 15.1. Prevalenza dei genotipi virali

Per la genotipizzazione dei ceppi di *morbillivirus* circolanti in Lombardia, è stata amplificata e sequenziata la regione C-terminale del gene N del virus del morbillo. L'analisi del genotipo virale è stata ultimata con successo per 53 dei 63 casi confermati nel periodo in studio.

Complessivamente, delle 53 sequenze geniche virali analizzate, 42 (79,2%; 42/53) appartenevano al genotipo D8, 8 (15,1%; 8/53) al genotipo B3, entrambi endemici in Italia dal biennio 2006 – 2007 (71) (80), 3 sequenze geniche virali (5,7%; 3/53) appartenevano al genotipo D9, non endemico nel nostro territorio. (figura 27).

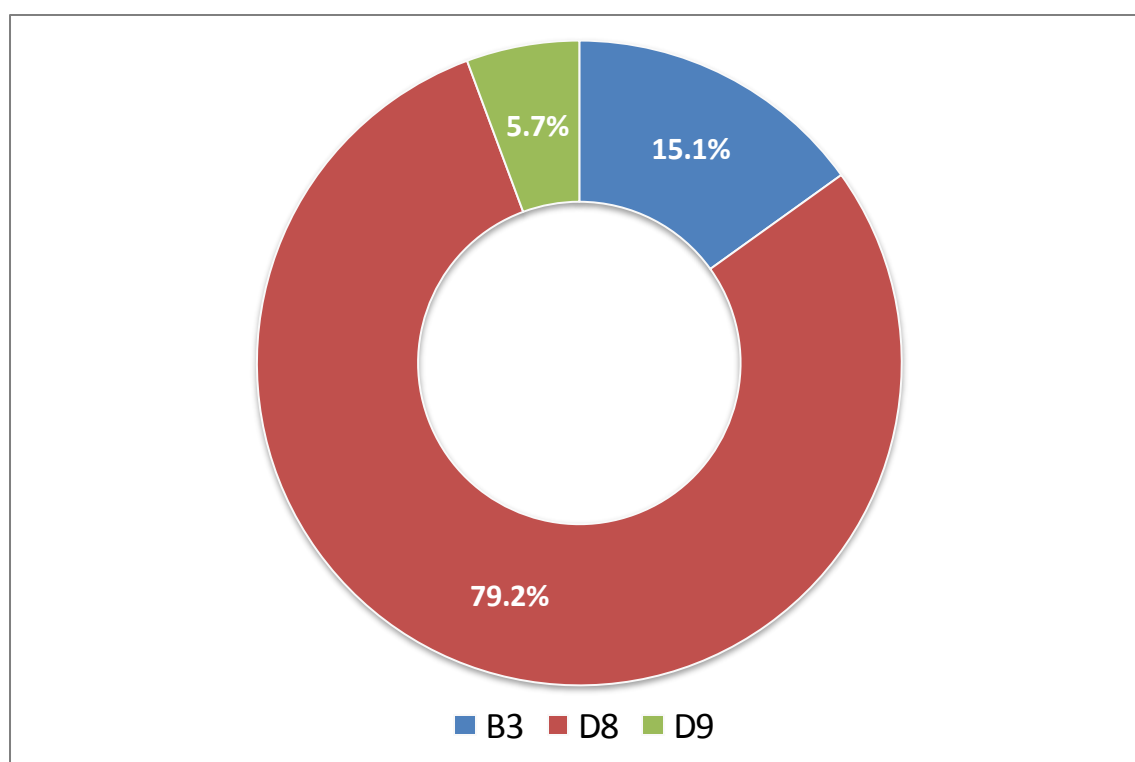


Figura 27: Prevalenza dei genotipi di morbillo circolanti in Lombardia da luglio 2013 a settembre 2014.

## 15.2. Studio epidemiologico-molecolare dei genotipi virali circolanti in Lombardia

Le prime sequenze identificate a luglio 2013 appartenevano al genotipo D8, circolante in tutto il periodo in studio. Il genotipo B3 è circolato nella primavera 2014 e ad agosto 2014. Tre casi di genotipo D9 sono stati identificati nei mesi di agosto e novembre 2013, in figura 28.

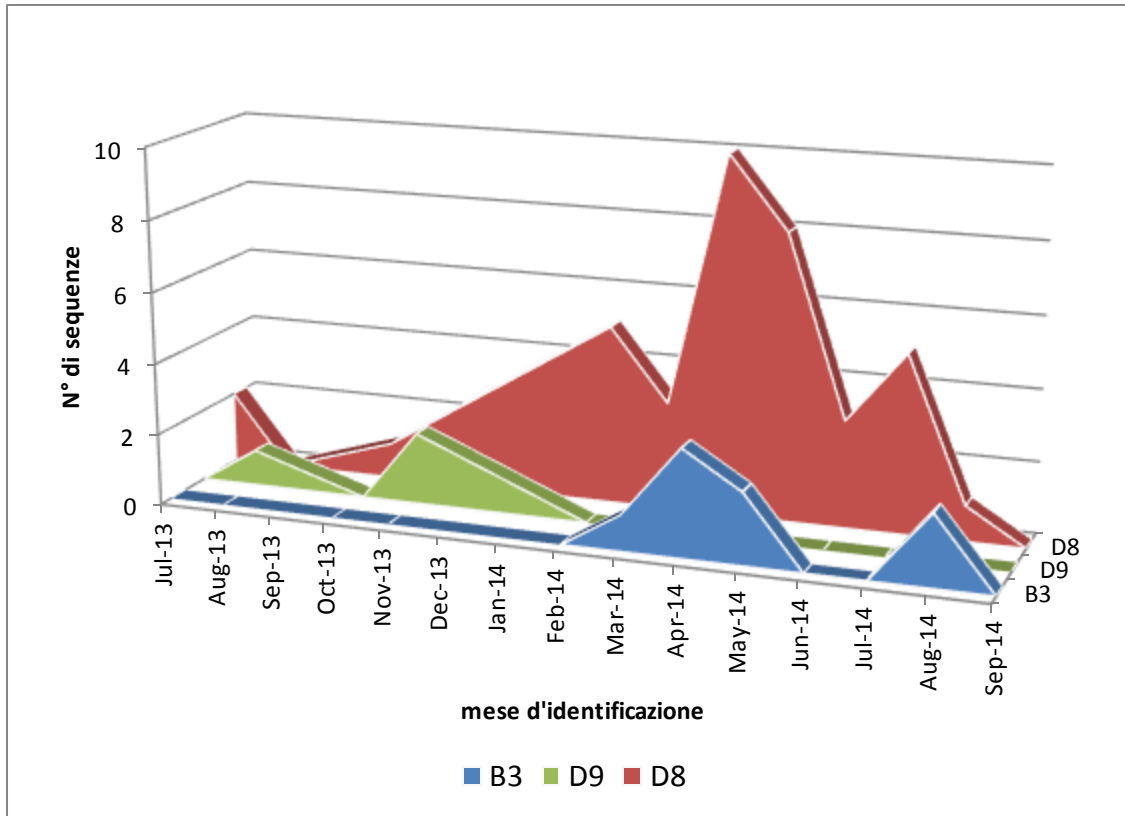


Figura 28: Distribuzione temporale dei genotipi di morbillo. Lombardia luglio 2013-settembre 2014.

## 15.3. Genotipo D8

La Figura 29 mostra l'albero filogenetico con radice del genotipo D8 ottenuto analizzando 42 sequenze identificate durante la sorveglianza e 65 sequenze di riferimento prese dal database *GenBank*, attraverso l'utilizzo di metodi Bayesiani.

L'albero ottenuto ha evidenziato la presenza di 4 cluster (1-4). I cluster 1 e 2 sono stati ulteriormente suddivisi in sub-cluster.

I ceppi di *morbillivirus* di genotipo D8 circolanti in Lombardia nel periodo in studio segregavano in due distinti cluster, cluster 1 e cluster 2, a loro volta suddivisi in 5 (1A-1E) e in 3 (2A – 2C) sub-cluster.

La prima sequenza D8, identificata nel luglio 2013 da un campione prelevato da una studentessa dell'Università Cattolica di Milano (che ha dato origine a un focolaio universitario) apparteneva al cluster 1E. Lo stesso ceppo di *morbillivirus* (similarità del 100%) è stato identificato nell'ambito di un focolaio familiare a Lecco nel novembre 2013.

Il cluster 1E sembra essere costituito da ceppi virali più vecchi rispetto agli altri ceppi identificati in Lombardia.

Sempre a luglio 2013 è stata identificata un'altra sequenza D8 appartenente al sub-cluster 2B da un caso sporadico di Pavia; altri ceppi virali 2B strettamente correlati

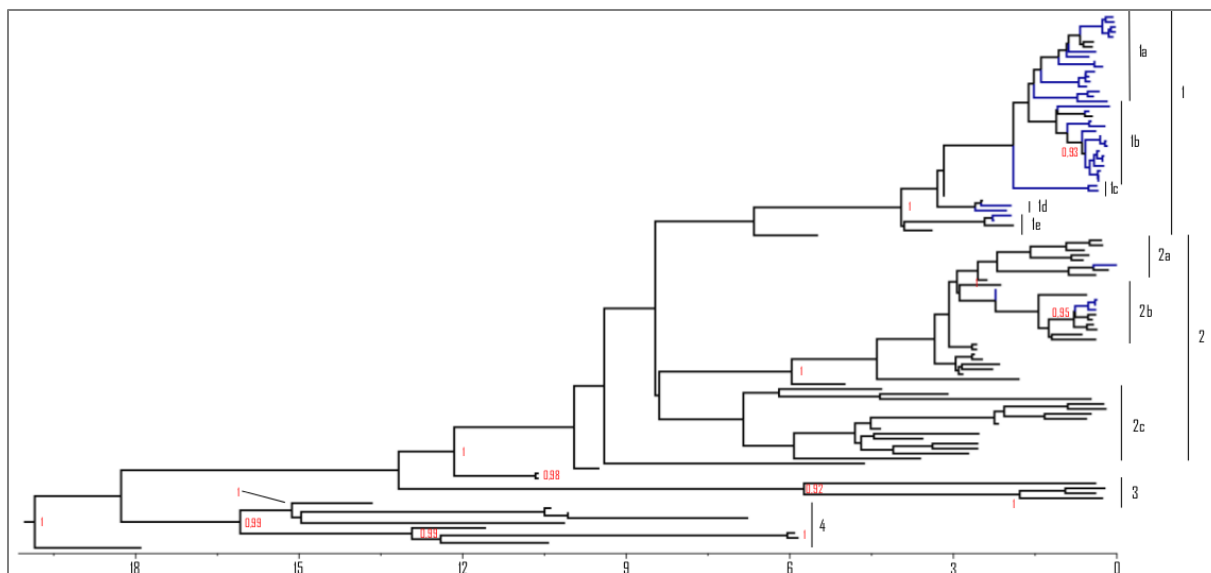


Figura 29: Albero filogenetico ottenuto dall'analisi delle sequenze di morbillio genotipo D8 con il metodo Bayesiano, modello GTR-G. La lunghezza dei rami è proporzionale al tempo. In corrispondenza dei nodi dei due alberi sono indicati i valori di *posterior probability*.

(similarità 99-100%) hanno dato origine ad aprile 2014 a due focolai familiari a Monza e a un focolaio in una scuola primaria di Milano.

Nei primi giorni di ottobre 2013 è isolata una sequenza 1D da un caso di morbillio segnalato nella provincia di Lecco e collegato ad un focolaio familiare; la sequenza è risultata identica ad una sequenza identificata negli ultimi giorni di ottobre da un altro caso lecchese segnalato come caso sporadico.

A fine gennaio 2014 è stata isolata una sequenza D8 appartenente al sub-cluster 1B da un caso sporadico di Milano. Virus 1B strettamente correlati (similarità 99,5-100%) sono stati isolati a febbraio 2014 da un caso sporadico segnalato a Legnano, e tra marzo e maggio 2014 da altri 9 casi sporadici e da un focolaio familiare di Pavia. A giugno 2014 sono stati identificati altri due casi sporadici, uno a Milano e l'altro a Varese.

Nello stesso periodo, sequenze 1A (similarità 99,3-100%) sono state isolate soprattutto a Milano (da febbraio a luglio 2014), ma anche a Legnano (febbraio-marzo 2014), Monza (aprile 2014), Varese (giugno 2014) e Pavia (luglio 2014). I ceppi virali 1a sono stati responsabili complessivamente di 9 casi sporadici e di 4 focolai familiari.

Ceppi virali 1C identici (similarità 100%) sono stati responsabili di due focolai, uno a Milano e l'altro a Legnano, ad aprile 2014.

Un virus 2A è stato isolato a Milano nell'agosto 2014 da un caso sporadico di ritorno da un viaggio nel Regno Unito.

#### 15.4. Genotipo B3

In figura 30 è riportato l'albero ottenuto dall'analisi filogenetica delle sequenze del genotipo B3, ottenuto da 8 sequenze isolate durante la sorveglianza e da 112 sequenze di riferimento presenti nella banca dati *GenBank*.

L'albero ha evidenziato la presenza di 7 cluster, il primo dei quali può essere suddiviso in 2 sub-cluster.

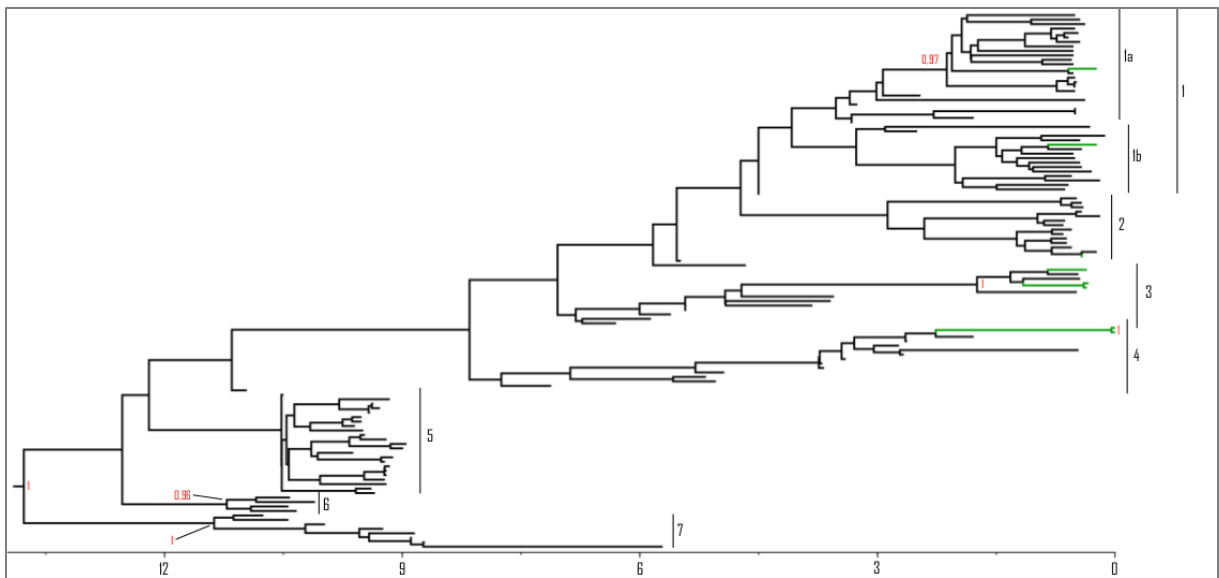


Figura 30: Albero filogenetico ottenuto dall'analisi delle sequenze di morbillio genotipo B3 con il metodo Bayesiano, modello GTR-G. La lunghezza dei rami è proporzionale al tempo. In corrispondenza dei nodi dei due alberi sono indicati i valori di *posterior probability*.

In Lombardia, nel periodo in studio, sono circolati ceppi di *morbillivirus* di genotipo B3 che segregavano in 4 distinti cluster denominati da 1 a 4; il cluster 1 è risultato a sua volta suddiviso in due sub-cluster (1A e 1B).

La prima sequenza virale di genotipo B3, appartenente al cluster 2, è stata identificata da un caso sporadico di Milano a marzo 2014.

Ceppi di *morbillivirus* di genotipo B3 sono stati successivamente (aprile 2014) responsabili di due casi sporadici, uno a Legnano e l'altro a Pavia, e di un focolaio familiare a Monza. Le sequenze segregavano nel cluster 3 (similarità 99,7-100%).

Due casi sporadici sostenuti da virus di genotipo B3, sono stati identificati a maggio 2014 a Varese e a Mantova. I ceppi segregavano nel sub-cluster 1B e 1A

Ad agosto 2014, un caso segnalato come sporadico e un focolaio familiare sono stati sostenuti da virus che segregavano nel cluster 4.

### 15.5. Genotipo D9

In figura 31 è riportato l'albero ottenuto dall'analisi filogenetica delle sequenze di genotipo B3, ottenuto da 3 sequenze isolate durante la sorveglianza e da 61 sequenze di riferimento presenti in *GenBank*.

L'albero ha evidenziato la presenza di 4 cluster, il primo dei quali può essere suddiviso a sua volta in 2 sub-cluster.

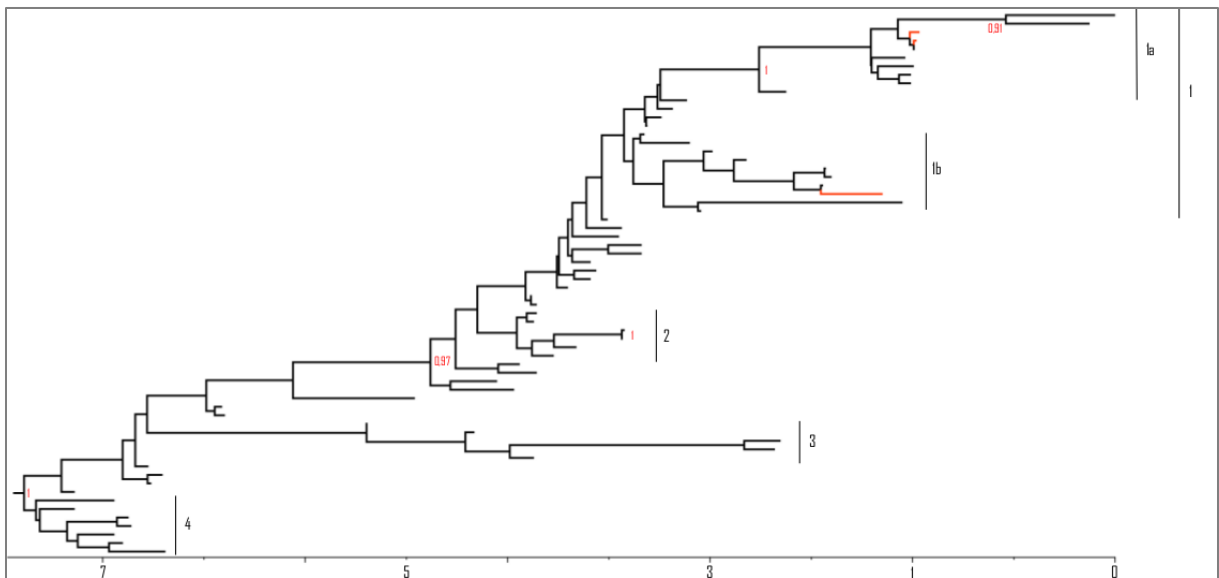


Figura 31: Albero filogenetico ottenuto dall'analisi delle sequenze di morbilli genotipo D9 con il metodo Bayesiano, modello GTR-G. La lunghezza dei rami è proporzionale al tempo. In corrispondenza dei nodi dei due alberi sono indicati i valori di *posterior probability*.

Tre sequenze di genotipo D9 sono state identificate in Lombardia nel periodo in studio. Tali sequenze segregavano nel cluster 1, rispettivamente sub-cluster 1A e 1B.

Nel mese di agosto 2014 è stata identificata una sequenza appartenente al genotipo D9, sub-cluster 1B, da un caso sporadico in provincia di Varese di ritorno da un viaggio in Australia territorio in cui il genotipo D9 è endemico.

Nel mese di novembre 2014 il virus D9 ha dato origine ad altri due casi segnalati come sporadici nella provincia di Monza - Brianza. Le sequenze sono risultate identiche (similarità 100%) e segregavano nel sub-cluster 1A. Queste sequenze sembrano derivare da sequenze circolanti in Australia e Giappone.

## 16. Analisi filodinamica delle sequenze in studio

Per l'analisi dell'*evolutionary rate*, sia il modello *strict* che il modello *relaxed* di orologio molecolare sono stati testati mediante l'impiego di diversi modelli demografici.

Il confronto effettuato attraverso il *Bayes factor* test ha dimostrato che:

- il modello di orologio molecolare che poteva descrivere significativamente meglio i dati era il modello di orologio *relaxed*.
- il non-parametric *Bayesian skyline plot* è risultato il modello di popolazione più adatto per valutare gli allineamenti in studio

Questa scelta è risultata ottimale per tutti e tre gli allineamenti.

### 16.1. Genotipo D8

#### 16.1.1. Stima dell'*evolutionary rate*

Analizzando le sequenze in studio, utilizzando le condizioni ottimali stimate, per il genotipo D8 è stato calcolato un tasso medio evolutivo pari a:  
 $2.97 \times 10^{-6}$  subs/site/year (95% HPD:  $1,6 - 4,5 \times 10^{-6}$ ).

#### 16.1.2. Stima del time of the most recent commune ancestor (tMRCA) delle sequenze appartenenti al genotipo D8

La radice dell'albero datato ottenuto dall'analisi delle sequenze del genotipo D8 ha avuto un tMRCA medio stimato di 18 anni, nel 1996 (tabella 5). Il cluster 4 è stato il primo a divergere tra 13 e 18 anni fa, invece i cluster 1 e 2 sembrano aver avuto origine 11 anni fa (2003), con un 95% HPD di 10 – 15 anni. I ceppi isolati durante la sorveglianza e che segregano nel cluster 1 sembrano aver iniziato a circolare nella popolazione tra i 3 e i 7 anni fa (2011-2007), mentre le sequenze appartenenti ai sub-cluster 2A e 2B hanno avuto un tMRCA medio stimato di circa 5 anni (2009).

Nodo	tMRCA giorni	tMRCA anni, mesi	Anno	95% HPD giorni
radice	6616,57	18, 1	1995	5964,27 - 7481,96
cluster 4	5360,26	14, 11	1999	4906, 96 – 6623,17
cluster 3	1913,21	5, 3	2008	517,43 – 4983,63
cluster 1, 2	4391,67	12	2001	3637,8 – 5339,92
sub-cluster 2A, 2B	1988,33	5, 5	2008	1659,46 – 2867,36
sub-cluster 2B	262,72	0, 8	2014	259,28 – 985,03
cluster 1	1318,90	3, 7	2010	1232,50 – 2500,50
Sub-cluster 1B	599,35	1, 8	2012	244,8 – 1008,99

Tabella 5: Stima del tMRCA delle sequenze in esame del genotipo D8.

### 16.1.3. Dinamiche di popolazione

L'analisi delle sequenze D8 ha evidenziato come l'andamento della popolazione virale sia in aumento a partire dal 1995, anno della radice, con due piccolissime diminuzioni del numero effettivo di infezioni che si sono verificate alla metà degli anni 1990 e tra il 2013 ed il 2014 (figura 32).

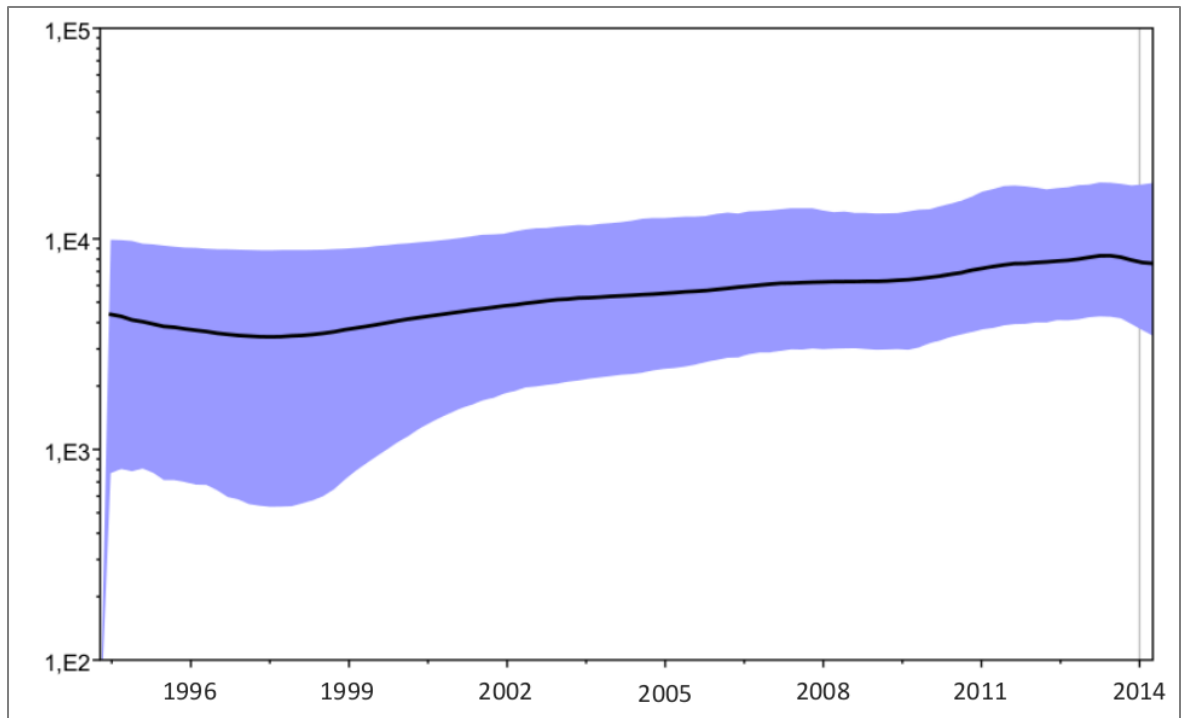


Figura 32: *Bayesian skyline plots* (BSP) ottenuto dall'analisi delle sequenze in studio del genotipo D8.

### 16.1.4. Analisi della pressione selettiva

Lo studio della pressione selettiva per le sequenze appartenenti al genotipo D8 ha evidenziato la presenza di un codone sottoposto a selezione positiva (posizione 547 dall'inizio del gene N), confermato da due metodi.

I siti sotto selezione negativa erano i prevalenti, un totale di 9 siti sono stati rilevati da FEL, 4 dei quali sono stati anche confermati da IFEL, evidenziando questa pressione anche a livello dei rami interni.

## 16.2. Genotipo B3

### 16.2.1. Stima dell'evolutionary rate

Utilizzando le condizioni ottimali stimate, per il genotipo B3 è stato calcolato un tasso medio evolutivo pari a  $2,44 \times 10^{-6}$  subs/site/year (95% HPD:  $1,3 - 3,7 \times 10^{-6}$ ).

### 16.2.2. Stima del tMRCA delle sequenze appartenenti al genotipo B3

Il valore di tMRCA per la radice dell'albero del genotipo B3 è risultato risalire a poco più di 12 anni fa (95% HPD = 11 - 14), suggerendo un'origine dei ceppi attualmente in circolazione al 2001 (tabella 6).

Nodo	tMRCA giorni	tMRCA anno, mesi	Anno	95% HPD giorni
radice	4592,44	12, 7	2001	3978,59 – 5289,96
cluster 7	3791,47	10, 5	2003	3584,02 – 4118,07
cluster 6	3738,24	10, 8	2003	3533,01 – 4451,87
cluster 5	3508,31	9, 7	2004	3500,2 – 4451,45
cluster 4	15	/	2014	0,01 – 361,9
cluster 3	580,98	1, 7	2012	231,65 – 1184,64
cluster 1	708,35	1, 11	2012	485,8 – 1368,45

Tabella 6: Stima del tMRCA delle sequenze B3.

### 16.2.3. Dinamiche di popolazione

Il Bayesian skyline plots (BSP) ottenuto dall'analisi delle sequenze in studio del genotipo B3 ha evidenziato come l'andamento della popolazione virale sia in aumento a partire dal 2001 (anno della radice). Un primo picco di infezioni è avvenuto a cavallo del 2004, seguito da un secondo picco alla fine del 2013 (figura 33).

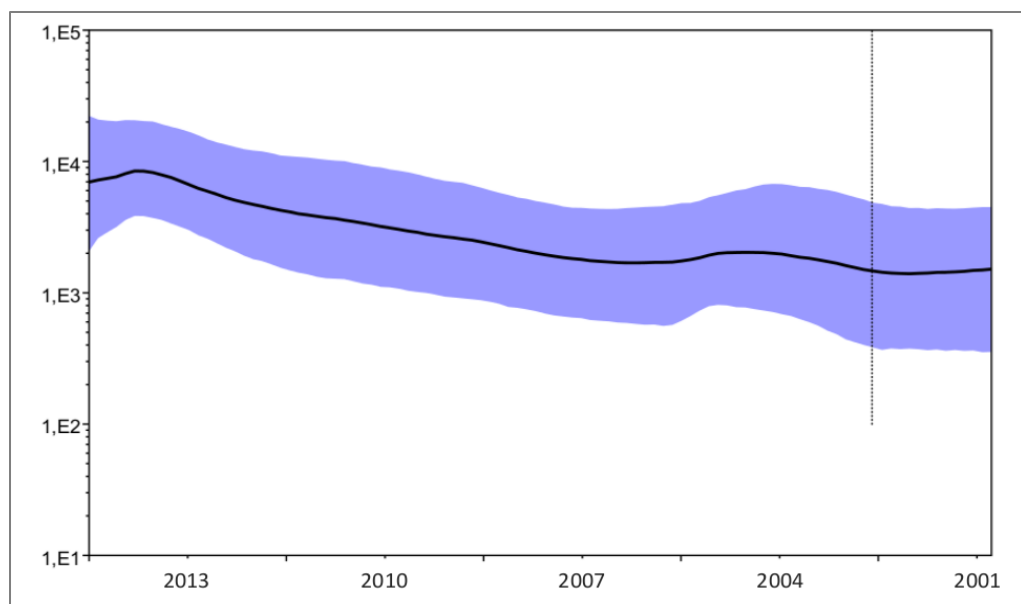


Figura 33: Bayesian skyline plots (BSP) ottenuto dall'analisi delle sequenze del genotipo B3.



#### 16.2.4. Analisi della pressione selettiva

L'analisi di pressione selettiva sito-specifica ha identificato per le sequenze appartenenti al genotipo B3 1 codone sottoposto a selezione positiva (posizione 462 dall'inizio del gene N), che ha evidenziato positività anche a livello dei rami interni. Un totale di 7 siti sono risultati sotto pressione selettiva negativa mediante analisi con FEL e 1 di loro è stato dimostrato essere sotto selezione negativa anche mediante l'analisi con IFEL, evidenziando una pressione anche a livello dei rami interni.

### 16.3. Genotipo D9

#### 16.3.1. Stima dell'evolutionary rate

Per il genotipo D9 è stato calcolato un tasso medio evolutivo pari a  $5,96 \times 10^{-6}$  subs/site/year (95% HPD:  $2,2 - 10,7 \times 10^{-6}$ ).

#### 16.3.2. Stima del tMRCA delle sequenze appartenenti al genotipo D9

La radice dell'albero datato ottenuto dall'analisi delle sequenze del genotipo D9 ha mostrato un tMRCA medio stimato di 7 anni (2007). Il più recente sub-cluster 1A sembra aver iniziato a circolare nella popolazione circa 2 anni fa (2012), tabella 7.

Nodo	tMRCA giorni	tMRCA anni, mesi	Anno	95% HPD giorni
radice	2694,12	7, 5	2006	2621,04 – 3287,08
cluster 1, 2, 3, 4	1690,64	4, 8	2009	1603,02 – 2232,58
sub-cluster 1A	879,22	2, 5	2011	812,00 – 991,27

Tabella 7: Stima del tMRCA delle sequenze D9

#### 16.3.3. Dinamiche di popolazione

L'analisi delle sequenze appartenenti al genotipo D9 ha mostrato, in figura 34, un trend in aumento del numero effettivo di infezioni dal 2006 al 2009, seguito da una diminuzione fino al 2014.

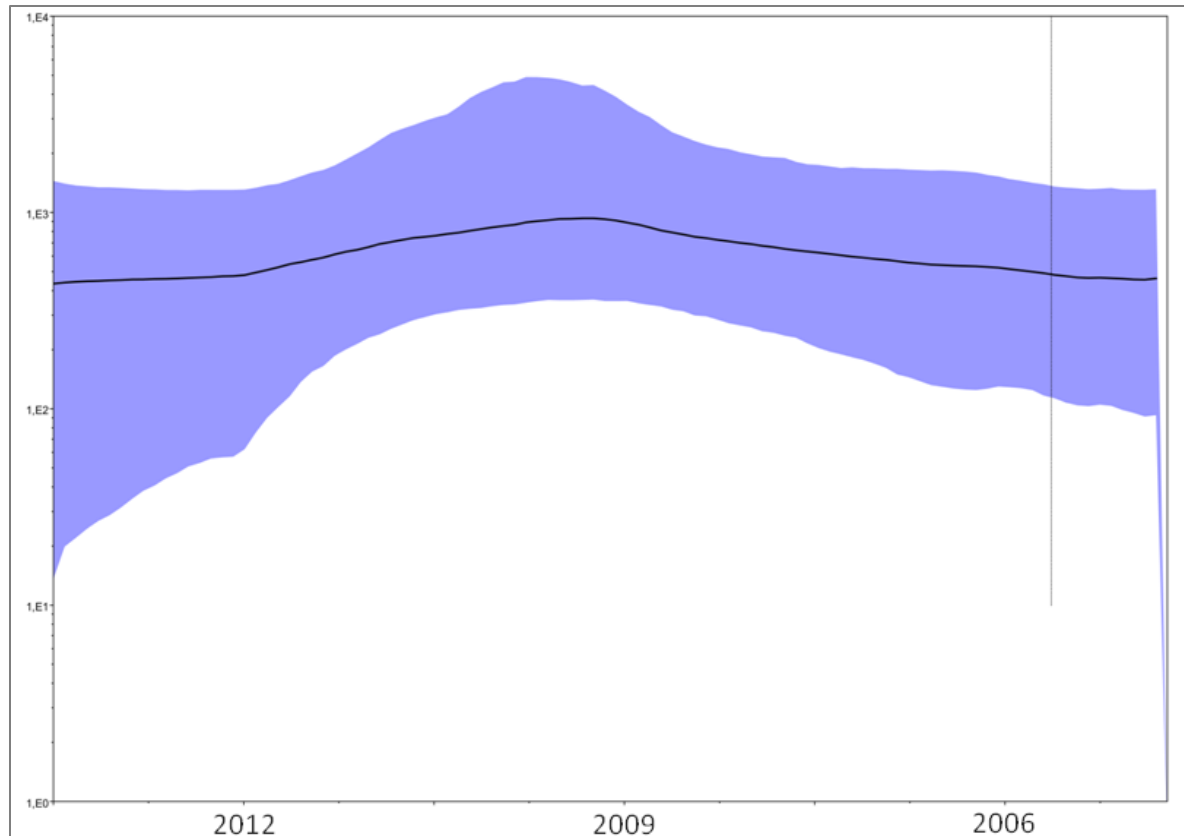


Figura 34: Bayesian skyline plots (BSP) ottenuto dall'analisi delle sequenze del genotipo D9.

#### 16.3.4. Analisi della pressione selettiva

L'analisi della pressione selettiva delle sequenze appartenenti al genotipo D9 ha indicato l'assenza di siti soggetti a pressione positiva e la presenza di 7 siti soggetti a pressione selettiva negativa.

# Conclusioni

## 17. Conclusioni

Il morbillo è una malattia virale contagiosa, prevenibile con la vaccinazione, che presenta i requisiti necessari per l'eliminazione (trasmissione esclusivamente interumana, virus geneticamente stabile, assenza di serbatoi animali o ambientali, periodo di contagiosità breve, immunità permanente conferita dall'infezione, disponibilità di un vaccino efficace e sicuro). In assenza di misure preventive la malattia può avere un grave impatto sulla salute della popolazione.

In linea con gli obiettivi della Regione Europea dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il 23 marzo 2011, è stato approvato il Piano Nazionale per l'Eliminazione del Morbillo e della Rosolia congenita (PNEMoRc) 2010-20 (67). Accanto a misure mirate atte ad incrementare le coperture vaccinali per due dosi di vaccino trivalente contro morbillo, parotite e rosolia (MPR), nel PNEMoRc 2010-2015 viene sottolineata l'importanza della sorveglianza per raggiungere gli obiettivi di eliminazione.

Il mantenimento dei livelli ottimali di copertura vaccinale e l'implementazione del sistema di sorveglianza sono le pietre angolari su cui si fonda il programma di eliminazione del morbillo e rosolia.

Per quel che riguarda il primo punto, i modelli matematici consentono di stimare l'impatto che le diverse strategie vaccinali possono avere sull'andamento epidemiologico di una malattia ed in particolare di stabilire il tasso critico di copertura vaccinale da raggiungere per arrivare all'eliminazione della malattia. Particolare influenza su questo parametro ha il *tasso di riproduzione di base* ( $R_0$ ) del microrganismo che consiste nel numero di casi secondari che ogni caso primario è in grado di indurre in una popolazione suscettibile. Diversi lavori apparsi in letteratura (111) (112) (113) sono stati condotti con l'obiettivo di stimare "sul campo" il tasso di riproduzione di base del morbillo. Van Boven M, *et al* (114) hanno studiato con metodi bayesiani un'epidemia in una scuola pubblica tedesca per stimare i parametri epidemiologici chiave quali il numero di riproduzione di base  $R_0$ , l'efficacia del vaccino VE e la copertura vaccinale critica PC. Sebbene i risultati abbiano confermato l'elevata efficacia del vaccino ( $VE= 0,997$ ), l' $R_0$  del morbillo, solitamente compreso tra 16 e 18, è risultato particolarmente elevato, pari a 30,8. Questi dati suggeriscono che una copertura vaccinale superiore al 95% ( $PC= 0,971$ ) e mantenuta per lunghi periodi potrebbe essere necessaria per raggiungere l'*herd immunity* e quindi l'eliminazione della malattia nella popolazione.

In Lombardia dal 1999 i bambini tra il 12° e il 15° mese vengono vaccinati con il vaccino MPR. Nel 2001 è stata raggiunto il target del 95% di copertura vaccinale per la prima dose

di vaccino. La copertura vaccinale ha continuato a salire fino al 2007, raggiungendo la percentuale del 96,7%. Dopo di che si è osservato una graduale diminuzione fino all'attuale livello pari al 93,7%.

Un totale di 5024 casi di morbillo sono stati notificati dal 2000 ad oggi in Lombardia. Nel 2002, nonostante il raggiungimento del target della copertura vaccinale nel 2001, è stata registrata un'epidemia di morbillo di 645 casi notificati. Dal 2004 al 2007, anni in cui la copertura vaccinale era superiore al target, si è osservato una diminuzione dei casi (complessivamente 296). Dal 2008 ad oggi, anni in cui la copertura vaccinale è diminuita al di sotto del target vaccinale, sono stati notificati 3205 casi. Dal 2008 ad oggi sono state osservate tre ampie epidemie di morbillo. La più estesa è stata quella del 2008 con 1075 casi notificati ed un tasso d'incidenza di 2 ogni 100000 abitanti. Un secondo evento epidemico è stato osservato nel 2011 con 771 casi notificati; infine nel 2013 si è verificato un terzo evento pandemico (774 casi notificati), dopo un brevissimo periodo inter-epidemico nel 2012 (115).

Un sistema di sorveglianza di elevata qualità e sensibilità rappresenta uno strumento fondamentale per raggiungere e dimostrare l'eliminazione del morbillo all'interno di un Paese.

La sorveglianza di laboratorio ha pertanto una forte connotazione di sanità pubblica in quanto è parte integrante del programma mondiale di eradicazione. Il morbillo rappresenta un esempio paradigmatico di come le metodologie di caratterizzazione molecolare delle varianti virali abbiano arricchito sia l'indagine epidemiologica sia l'attività di sorveglianza, entrambe volte al controllo della trasmissione del virus.

L'analisi di sequenza dei geni che codificano per l'emoagglutinina e per la nucleoproteina ha permesso di classificare 7 gruppi genetici maggiori o *clade* denominati con le lettere dell'alfabeto (A-F) all'interno dei quali vengono identificati 24 genotipi differenti, riconosciuti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. Il fatto che questi genotipi abbiano una distribuzione geografica definita rende possibile individuare, in un Paese in cui la circolazione dei ceppi autoctoni è assente o molto limitata, l'origine del genotipo responsabile di un'epidemia e le sue modalità di trasmissione.

Un lavoro pubblicato nel 2012 (71) riporta l'analisi filogenetica delle sequenze del virus del morbillo identificate in Italia dal 2002 al 2007. I risultati dimostrano una predominante circolazione nel territorio italiano del genotipo D7 nel periodo 2002-2004. Il genotipo D7 è stato responsabile quindi delle epidemie del 2002 e 2003 che hanno colpito soprattutto le regioni del sud (incidenza di 738/100 000 nel 2002 e di 544/100 000 nel 2003). L'analisi delle sequenze ha mostrato che tutti i ceppi D7 erano strettamente correlati tra loro e con i ceppi di altri paesi Europei (Gran Bretagna e Australia). Il genotipo D7 è stato rimpiazzato nel biennio 2006-2007 dai genotipi D4 e B3. Le sequenze di genotipo D4, isolato per la prima

volta a Grosseto nel 2006, erano strettamente correlate a quelle circolanti nello stesso periodo in India, Gran Bretagna e Germania. Il genotipo B3 ha iniziato a circolare in Italia a fine 2006-inizio 2007 (isolato a Napoli) ed è strettamente correlato a sequenze isolate in Albania, Svizzera e Gran Bretagna. Nello stesso periodo sono stati anche determinate sequenze C2, A, D5 (importate dal Giappone) e D8. Gli ultimi anni sono stati caratterizzati inizialmente dalla predominante circolazione del genotipo D4, di origine canadese (Montreal 1989), giunto in Europa a fine 2006 e divenuto endemico in Europa e in Italia nel 2008. Il genotipo D8 è comparso nel 2007 ed è divenuto predominante nel triennio 2010-2013 (116). Il genotipo D9 è stato identificato in Italia dal 2008 (72).

Nei paesi in via di eliminazione la sorveglianza molecolare gioca un ruolo fondamentale per valutare la circolazione dei ceppi endemici, identificare i casi di importazione e la loro provenienza.

Obiettivi specifici del presente lavoro di tesi sono stati quelli di descrivere il profilo epidemiologico del morbillo in Lombardia nel biennio 2013-2014 e caratterizzare molecolarmente i ceppi di *morbillivirus* al fine di genotipizzarli, analizzarli filogeneticamente e studiarne le caratteristiche evolutive.

Da luglio 2013 a novembre 2014 in Lombardia i casi di morbillo (possibili, probabili e confermati) sono stati complessivamente 528. La maggior parte dei casi (68%; 359/528) si è verificata nella fascia di età 15-39 anni. Il 9% dei casi (47) è stato osservato in bambini sotto i cinque anni di età, di cui 3 in bambini con meno di un anno. Complessivamente sono stati segnalati 86 focolai, che hanno interessato 183 casi. Il 65% dei casi (n=343) è stato segnalato come caso sporadico. Il maggior numero di segnalazioni è stato registrato da luglio 2013 a novembre 2013. Le ASL che hanno riportato il maggior numero di casi sono state le ASL di Milano.

Il sistema di sorveglianza integrata ha permesso di confermare 63 casi di morbillo; nessun caso di rosolia è stato confermato. La gran parte delle segnalazioni di morbillo e delle conferme di laboratorio si collocano nel periodo compreso tra febbraio e agosto 2014 con un picco ad Aprile e Maggio. Dall'analisi dei dati riguardanti lo stato vaccinale è emerso che il 60,3% dei casi confermati non era vaccinato e il 27% presentava uno stato vaccinale non noto.

L'analisi del genotipo virale è stata ultimata con successo per 52 dei 63 casi confermati nel periodo in studio. Complessivamente, delle 53 sequenze geniche virali analizzate, 42 (79,25%) appartenevano al genotipo D8, 8 (15,38%) al genotipo B3, entrambi endemici in Italia dal biennio 2006 – 2007, e 3 sequenze geniche virali (5,7%). Le prime sequenze identificate a luglio 2013 appartenevano al genotipo D8, circolante in tutto il periodo in

studio. Il genotipo B3 è circolato nella primavera 2014 ed agosto 2014. Tre casi di genotipo D9 sono stati identificati nei mesi di agosto e novembre 2013.

L'analisi filogenetica dei ceppi di *morbillivirus* ha permesso di identificare 7 varianti virali di genotipo D8 circolanti in Lombardia nel periodo in studio. Le varianti D8 hanno dato origine a 12 focolai, per lo più familiari, e a 21 casi, 19 dei quali segnalati come casi sporadici. Lo studio della similarità delle sequenze geniche ha permesso di identificare che 21 casi segnalati come sporadici erano in realtà sostenuti da virus identici.

Le 5 varianti virali di genotipo B3 hanno dato luogo a 6 casi sporadici e a due cluster. Due casi segnalati come sporadici e un focolaio familiare erano sostenuti da virus identici. Inoltre un caso sporadico identificato a maggio segregava in un cluster all'interno del quale si raggruppano anche le sequenze appartenente ai ceppi di morbillo che hanno dato origine nell'aprile 2014 all'*outbreak* della nave da crociera (117).

Una sequenza appartenente al genotipo D9, sub-cluster 1B, mai precedentemente identificata in Italia, è stata isolata da un caso sporadico in provincia di Varese di ritorno da un viaggio in Australia, territorio in cui il genotipo D9 è endemico. Il virus D9 ha dato origine successivamente ad altri due casi segnalati come sporadici nella provincia di Monza-Brianza. Le sequenze sono risultate identiche (similarità 100%). È interessante notare come non ci siano correlazioni tra le 3 sequenze identificate durante la sorveglianza lombarda e le uniche 2 sequenze italiane appartenenti al genotipo D9 identificate nel 2008 e nel 2010. Ciò conferma l'assenza della circolazione endemica sul nostro territorio del genotipo D9.

Non esistono al momento studi che consentano di stimare e datare l'origine dei ceppi di *morbillivirus* circolanti in Italia. La stima del tMRCA (*time to the Most Recent Common Ancestor*) ottenuta nel presente lavoro di tesi suggerisce che i genotipi attualmente circolanti nel nostro territorio abbiano un'origine compresa fra 7 – 8 anni fa per il genotipo D8 e la presenza del genotipo B3 nel nostro territorio già 10 anni fa.

L'osservazione degli *skyline-plot* (BSP) ottenuti dall'analisi dinamica delle sequenze ha rilevato che tutti e tre i genotipi presentano un andamento della popolazione virale sostanzialmente costante nel periodo in studio. In particolare per il genotipo D8 è stato osservato un aumento a partire dal 1995, anno della radice, con due piccolissime diminuzioni del numero effettivo di infezioni che si sono verificate a metà degli anni 1990 e tra il 2013 ed il 2014. Anche l'analisi del BSP del genotipo B3 ha evidenziato come l'andamento della popolazione virale sia in aumento a partire dal 2001 (anno della radice). Un primo picco di infezioni è avvenuto a cavallo del 2004, seguito da un secondo picco alla fine del 2013. Invece l'analisi del BSP per il genotipo D9 ha mostrato un *trend* in aumento del numero effettivo di infezioni dal 2006 al 2009, seguito da una diminuzione fino ad oggi.



Per indagare le forze evolutive che portano alla variabilità dei genotipi di morbillo, è stata valutata la pressione selettiva che agisce a livello della proteina virale N. È interessante notare che, nonostante il ruolo della proteina come principale antigene riconosciuto dal sistema immunitario, bersaglio della risposta anticorpale neutralizzante, solo pochi amminoacidi hanno dimostrato di essere sotto pressione selettiva significativa. Complessivamente, a livello dell'allineamento delle sequenze del genotipo D8 è stato trovato 1 sito sottoposto a pressione selettiva positiva.

Tra le sequenze del genotipo B3 analizzate, solo 1 codone è risultato essere sotto pressione selettiva positiva con entrambe i metodi di indagine utilizzati. Infine, l'analisi delle sequenze D9 non ha evidenziato la presenza di nessun codone sottoposto a pressione positiva. L'effetto della pressione selettiva negativa è stata prevalente fra le sequenze della proteina N di tutti e tre i genotipi analizzati.

Come riportato da altri autori (36), i tassi di mutazione dei ceppi virali in studio si sono rivelati bassi. Questo dato conferma la stabilità genetica dei *morbillivirus*.

In conclusione, i risultati ottenuti dal presente lavoro di tesi hanno dimostrato che le ultime epidemie di morbillo (2013-2014) sono state sostenute da virus appartenenti ai genotipi D8 e B3 endemici nel territorio italiano dal biennio 2006-2007. Oltre ai ceppi autoctoni D8 e B3, è stata dimostrata la circolazione di ceppi D9 di recente introduzione nel territorio lombardo. L'approfondimento delle caratteristiche geniche del virus in studio ha permesso di valutare la circolazione dei diversi genotipi e studiarne le caratteristiche molecolari. Metodi filogenetici computazionali sono stati utilizzati per determinare alcune caratteristiche relative alla comparsa del virus del morbillo e della sua diffusione nella popolazione umana. Attraverso lo studio dell'evoluzione molecolare del virus è stato possibile definire sia il momento in cui i diversi genotipi virali hanno cominciato a differenziarsi (mediante il calcolo del tasso evolutivo), sia di valutare le caratteristiche dell'espansione spazio-temporale del virus. Inoltre è stata valutata la pressione selettiva che agisce sulla regione C-terminale del gene N.

La valutazione del profilo genetico dei ceppi virali circolanti fornisce informazioni importanti sull'origine di focolai epidemici e risulta un approccio innovativo fondamentale per la ricostruzione dei *link* epidemiologici. Il morbillo rappresenta un esempio paradigmatico di come le metodologie molecolari e bioinformatiche arricchiscano sia l'indagine epidemiologica sia l'attività di sorveglianza, entrambe volte al controllo della trasmissione del virus.

# I. Elenco delle figure e delle tabelle

## 18. Elenco delle figure:

1. Figura 1: Virus del morbillo al microscopio elettronico.....	7
2. Figura 2: Foto al microscopio di cellule giganti con inclusioni intra-citoplasmatiche.....	9
3. Figura 3: Macchie di Koplik .....	<b>Errore. Il segnalibro non è definito.</b>
4. Figura 4: fasi della patogenesi del morbillo.....	10
5. Figura 5: numero di casi di morbillo notificati nel mondo da dicembre 2013 a maggio 2014. (dati OMS) .....	11
6. Figura 6 distribuzione temporale e geografica dei casi di morbillo (dati OMS). .....	12
7. Figura 7: suddivisione filogenetica della famiglia <i>Paramyxoviridae</i> . .....	13
8. Figura 8: Struttura schematica della particella virale.....	14
9. Figura 9: Schema del genoma virale.....	16
10. Figura 10: schema della replicazione del virus del morbillo.....	<b>Errore. Il segnalibro non è definito.</b>
11. Figura 11: Copertura vaccinale per il vaccino contro il morbillo nei bambini nel 2004.....	22
12. Figura 12: Coperture vaccinali per MPR1-MPRV e M-MPR1 – MPRV nei bambini di età inferiore a 24 mesi (anni 2000 - 2013), luglio 2014.....	23
13. Figura 13: tasso di notifica dei casi di morbillo in Europa, ottobre 2013 – settembre 2014. .....	26
14. Figura 14: distribuzione geografica dei diversi genotipi di morbillo, aprile 2013 - marzo 2014. (fonte OMS) .....	28
15. Figura 15: Schema delle fasi di estrazione dell'RNA con kit Invisorb® Spin Virus RNA Mini Kit (STRATEC Molecular).....	37
16. Figura 16: Frammenti di DNA separati tramite elettroforesi su gel, colorati con Atlas ClearSight ed esposti a luce ultravioletta. ....	42
17. Figura 17: schema del sistema di sequenziamento automatico.....	44
18. Figura 18: Distribuzione percentuale per sesso dei casi di morbillo. Lombardia luglio 2013-novembre 2014. ....	59
19. Figura 19: Proporzione dei casi di morbillo per classe d'età. Lombardia luglio 2013-novembre 2014. ....	60
20. Figura 20: Proporzione dei casi di morbillo per stato vaccinale. Lombardia luglio 2013-novembre 2014. ....	60
21. Figura 21: Distribuzione temporale e ASL di appartenenza dei casi segnalati. Lombardia luglio 2013-novembre 2014. ....	60
22. Figura 22: Numero dei casi d'importazione e destinazione del viaggio. Lombardia luglio 2013-novembre 2014.....	61

23. Figura 23: Numero dei casi confermati e dei casi segnalati di morbillo per classe d'età. Lombardia luglio 2013-settembre 2014. ....	62
24. Figura 24: Distribuzione temporale dei casi di morbillo segnalati e di quelli confermati. Lombardia luglio 2013-settembre 2014. ....	62
25. Figura 25: Distribuzione geografica dei casi di morbillo segnalati e di quelli confermati. Lombardia luglio 2013-settembre 2014. ....	63
26. Figura 26: Proporzioni dei casi segnalati di morbillo e di quelli confermati per stato vaccinale. Lombardia luglio 2013-settembre 2014. ....	63
27. Figura 27: Prevalenza dei genotipi di morbillo circolanti in Lombardia da luglio 2013 a settembre 2014. ....	64
28. Figura 28: Distribuzione temporale dei genotipi di morbillo. Lombardia luglio 2013-settembre 2014. ....	65
29. Figura 29: Albero filogenetico ottenuto dall'analisi delle sequenze di morbillo genotipo D8 con il metodo Bayesiano, modello GTR-G. La lunghezza dei rami è proporzionale al tempo. In corrispondenza dei nodi dei due alberi sono indicati i valori di posterior probability.....	66
30. Figura 30: Albero filogenetico ottenuto dall'analisi delle sequenze di morbillo genotipo B3 con il metodo Bayesiano, modello GTR-G. La lunghezza dei rami è proporzionale al tempo. In corrispondenza dei nodi dei due alberi sono indicati i valori di <i>posterior probability</i> .....	67
31. Figura 31: Albero filogenetico ottenuto dall'analisi delle sequenze di morbillo genotipo D9 con il metodo Bayesiano, modello GTR-G. La lunghezza dei rami è proporzionale al tempo. In corrispondenza dei nodi dei due alberi sono indicati i valori di posterior probability.....	68
32. Figura 32: <i>Bayesian skyline plots</i> (BSP) ottenuto dall'analisi delle sequenze in studio del genotipo D8.....	70
33. Figura 33: <i>Bayesian skyline plots</i> (BSP) ottenuto dall'analisi delle sequenze del genotipo B3. ....	<b>Errore. Il segnalibro non è definito.</b>
34. Figura 34: <i>Bayesian skyline plots</i> (BSP) ottenuto dall'analisi delle sequenze del genotipo D9.....	<b>Errore. Il segnalibro non è definito.</b>

## 19. Elenco delle tabelle:

1. Tabella 1: Malattie causate dai virus della famiglia Paramyxoviridae nei diversi ospiti animali.....	14
2. Tabella 2: sequenze di riferimento del genotipo D8.....	47
3. Tabella 3: sequenze di riferimento del genotipo B3.....	51
4. Tabella 4: sequenze di riferimento del genotipo D9.....	53
5. Tabella 5: Stima del tMRCA delle sequenze in esame del genotipo D8. ....	69
6. Tabella 6:Stima del tMRCA delle sequenze B3.....	71

7. Tabella 7: Stima del tMRCA delle sequenze D9..... 73

## II. Bibliografia

## 20. Bibliografia

1. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. **Ender's JF, Peebles TC.** 1954 Jun, Proc Soc Exp Biol Me, p. 86(2):277-86.
2. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. **Yanagi Y, Takeda M, Ohno S.** 2006 Oct, J Gen Virol, p. 87(Pt 10):2767-79.
3. Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaque. **de Swart RL, Ludlow M, de Witte L, Yanagi Y, van Amerongen G, McQuaid S.** 2007 Nov, PLoS Pathog, p. 3(11):e178.
4. Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. **de Witte L, Abt M, Schneider-Schaulies S, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB.** 2006 Apr, J Virol, p. 80(7):3477-86.
5. DC-SIGN and CD150 have distinct roles in transmission of measles virus from dendritic cells to T-lymphocytes. **de Witte L, de Vries RD, van der Vlist M, Yüksel S, Litjens M, de Swart RL.** 2008 Apr , PLoS Pathog, p. 4(4):e1000049.
6. [http://www.salute.gov.it/portale/salute/pl\\_5.jsp?lingua=italiano&id=13&area=Malattie\\_infettive](http://www.salute.gov.it/portale/salute/pl_5.jsp?lingua=italiano&id=13&area=Malattie_infettive). ministero della salute. 2014.
7. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. **Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, Tsao MS, Richardson CD.** PLoS Pathog. 2011 , p. 7(8):e1002240.
8. Measles virus glycoprotein complex assembly, receptor attachment, and cell entry. **Navaratnarajah CK, Leonard VH, Cattaneo R.** Curr Top Microbiol Immunol. 2009, p. 329:59-76.
9. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. **Mühlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prüfer S, Uhlig KM, Leonard VH, Navaratnarajah.** Nature. Novembre 2011 , p. 480(7378):530-3.
10. Measles mortality: a retrospective look at the vaccine era. **Barkin RM.** Am J Epidemiol. Oct 1975 , p. 102(4):341-9.
11. Measles in suburban Khartoum: an epidemiological and clinical study. **Ibrahim SA, Mustafa OM, Mukhtar MM, Saleh EA, El Mubarak HS, Abdallah A.** Trop Med Int Health. May 2002 , p. 7(5):442-9.
12. Electrocardiographic changes in measles. **Olowu AO, Taiwo O.** Ann Trop Paediatr. Mar 1990 , p. 10(1):109-16.
13. Acute encephalitis associated with measles: MRI features. **Lee KY, Cho WH, Kim SH, Kim HD, Kim IO.** Neuroradiology. Feb 2003 , p. 45(2):100-6.
14. Subacute measles encephalitis with AIDS diagnosed by fine needle aspiration biopsy. A case report. **Poon TP, Tchertkoff V, Win H.** 1998 , Acta Cytol, p. 42(3):729-33.

15. Subacute sclerosing panencephalitis: clinical and magnetic resonance imaging evaluation of 36 patients. **Oztürk A, Gürses C, Baykan B, Gökyigit A, Eraksoy M.** 2002 , J Child Neurol, p. 17(1):25-9.
16. A continuing high incidence of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. **Takasu T, Mgone JM, Mgone CS, Miki K, Komase K, Namae H, Saito Y, Kokubun Y, Nishimura T, Kawanishi R, Mizutani T, Markus TJ, Kono J, Asuo PG, Alpers MP.** 2003 , Epidemiol Infect, p. 131(2):887-98.
17. Tissue inflammatory response in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). **Anlar B, Söylemezoğlu F, Aysun S, Köse G, Belen D, Yalaz K.** 2001 , J Child Neurol, p. 16(12):895-900.
18. The clinical significance of measles: a review. **Perry RT, Halsey NA.** 2004 , J Infect Dis, p. 189 Suppl 1:S4-16.
19. Sex differences in measles mortality: a world review. **M, Garenne.** 1994 , Int J Epidemiol, p. 23(3):632-42.
20. V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. **Patterson JB, Thomas D, Lewicki H, Billeter MA, Oldstone MB.** 2000 , Virology, p. 267(1):80-9.
21. Measles virus and immunomodulation: molecular bases and perspectives. **Schneider-Schaulies S, ter Meulen V.** 2002 , Expert Rev Mol Med, p. 4(13):1-18.
22. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. **Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y.** 2000, Nature, p. 406(6798):893-7.
23. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. **Yanagi Y, Takeda M, Ohno S.** 2006 Oct, J Gen Virol, p. 87(Pt 10):2767-79.
24. Immunoglobulin M specific for measles and mumps in multiple sclerosis. **Millar JH, Fraser KB, Haire M, Connolly JH, Shirodaria PV, Hadden DS.** 1971 , Br Med J, p. 2(5758):378-80.
25. Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. **Plumet S, Duprex WP, Gerlier D.** 2005 , J Virol, p. 79(11):6900-8v.
26. Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. **Cattaneo R, Rebmann G, Schmid A, Bacsko K, ter Meulen V, Billeter MA.** 1987 , EMBO J, p. 6(3):681-8.
27. Characterization of in vitro transcription and transcriptional products of measles virus. **Ray J, Fujinami RS.** 1987 , J Virol, p. 61(11):3381-7.
28. Genetic recombination during coinfection of two mutants of human respiratory syncytial virus. **Spann KM, Collins PL, Teng MN.** 2003 , J Virol, p. 77(20):11201-11.
29. Electron cryotomography of measles virus reveals how matrix protein coats the ribonucleocapsid within intact virions. **Liljeroos L, Huiskonen JT, Ora A, Susi P, Butcher SJ.** 2011, Proc Natl Acad Sci U S A, p. 108(44):18085-90.



30. Polyploid measles virus with hexameric genome length. **Rager M, Vongpunsawad S, Duprex WP, Cattaneo R.** 2002, EMBO J, p. 21(10):2364-72.
31. Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. **Manié SN, de Breyne S, Vincent S, Gerlier D.** 2000 , J Virol, p. 74(1):305-11.
32. Microbiologia medica. **Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller.**
33. Measles endemicity in insular populations: critical community size and its evolutionary implication. **Black FL.** 1966 , J Theor Biol, p. 11(2):207-11.
34. Is rinderpest virus the archevirus of the Morbillivirus genus? **Norrby E, Sheshberadaran H, McCullough KC, Carpenter WC, Orvell C.** 1985, Intervirology, p. 23(4):228-32.
35. The evolutionary and epidemiological dynamics of the paramyxoviridae. **Pomeroy LW(1), Bjørnstad ON, Holmes EC.** 2008 , J Mol Evol, p. 66(2):98-106.
36. Origin of measles virus: divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries. **Furuse Y, Suzuki A, Oshitani H.** 2010 , Virol J, p. 7:52.
37. Cellular Inclusions in Cerebral Lesions of Lethargic Encephalitis. **Dawson JR.** 1933 , Am J Pathol, p. 9(1):7-16.3.
38. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. **Enders JF, Peebles TC.** 1954 , Proc Soc Exp Biol Med, p. 86(2):277-86.
39. Propagation of measles virus in cultures of chick embryo cells. **Katz SL, Milovanovic MV, Enders JF.** 1958 , Proc Soc Exp Biol Med, p. 97(1):23-9.
40. Studies with measles virus. II. Isolation of virus and immunologic studies in persons who have had the natural disease. **Ruckle G, Rogers KD.** 1957 , J Immunol, p. 78(5):341-55.
41. Global control and regional elimination of measles, 2000–2012. 2014 , Wkly Epidemiol Rec, p. 89(6):45-52.
42. Measles eradication: past is prologue. **Heymann DL, Fine PE, Griffiths UK, Hall AJ, Mounier-Jack S.** 2010 , Lancet, p. 376(9754):1719-20.
43. Development of attenuated measles-virus vaccines. A summary of recent investigation. **Enders JF, Katz SL, Holloway A.** 1962 , Am J Dis Child, p. 103:335-40.
44. The first measles vaccine. **Baker JP.** 2011, Pediatrics, p. 128(3):435-7.
45. [http://www.salute.gov.it/portale/news/p3\\_2\\_1\\_1\\_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero&id=1714](http://www.salute.gov.it/portale/news/p3_2_1_1_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero&id=1714). ministero della salute. 2014.
46. [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pagineAree\\_811\\_listaFile\\_itemName\\_11\\_file.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_811_listaFile_itemName_11_file.pdf). ministero della salute. 2013.
47. Field effectiveness of live attenuated measles-containing vaccines: a review of published literature. **Uzicanin A, Zimmerman L.** 2011 , J Infect Dis, p. 1:S133-48.

48. International measles incidence and immunization coverage. **Hall R, Jolley D.** 2011 , J Infect Dis, p. 1:S158-63.
49. Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. **Wakefield AJ, Murch SH, Anthony A, Linnell J, Casson DM, Malik M, Berelowitz M, Dhillon AP, Thomson MA, Harvey P, Valentine A, Davies SE, Walker-Smith JA.** 1998 , Lancet, p. 351(9103):637-41.
50. Measles outbreaks in a population with declining vaccine uptake. **Jansen VA, Stollenwerk N, Jensen HJ, Ramsay ME, Edmunds WJ, Rhodes CJ.** 2003 , Science, p. 301(5634):804.
51. Communicating science to the public: MMR vaccine and autism. **Offit PA, Coffin SE.** 2003 , Vaccine, p. 22(1):1-6.
52. MMR vaccine and autism: vaccine nihilism and postmodern science. **Poland GA.** 2011 , Mayo Clin Proc, p. 86(9):869-71.
53. A population-based study of measles, mumps, and rubella vaccination and autism. **Madsen KM, Hviid A, Vestergaard M, Schendel D, Wohlfahrt J, Thorsen P, Olsen J, Melbye M.** 2002 , N Engl J Med, p. 347(19):1477-82.
54. Epidemiologic basis for eradication of measles in 1967. **Sencer DJ, Dull HB, Langmuir AD.** 1967, Public Health Rep, p. 82(3):253-6.
55. Can measles be eradicated globally?. **de Quadros CA.** 2004 Feb, Bull World Health Organ, p. 82(2):134-8.
56. [www.euro.who.int/document/e81567.pdf](http://www.euro.who.int/document/e81567.pdf). OMS. Strategic plan for measles and congenital rubella infection in the WHO European Region. 2003.
57. [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA63/A63\\_18-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_18-en.pdf) Global eradication of measles. Report by the Secretariat. Sixty-third World Health. 2010.
58. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/measles-and-rubella/publications/2014/eliminating-measles-and-rubella.-framework-for-the-verification-process-in-the-who-european-region>. Eliminating measles and rubella. Framework or the verification process in the WHO European Region. Regional office for Europe, 2014.
59. The principles of disease elimination and eradication. **Dowdle WR.** 1998, Bull World Health Organ, p. 76 Suppl 2:22-5.
60. Measles eradication in the Americas: progress to date. **de Quadros CA, Izurieta H, Venczel L, Carrasco P.** 2004, J Infect Dis, p. 1:S227-35.
61. Progress toward measles elimination--Southern Africa, 1996-1998. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1999 , MMWR Morb Mortal Wkly Rep, p. 48(27):585-9.
62. Measles eradication: is it in our future?. **Orenstein WA, Strebel PM, Papania M, Sutter RW, Bellini WJ, Cochi SL.** 2000 , Am J Public Health, p. 90(10):1521-5.

63. Elimination of endemic measles transmission in Australia. **Heywood AE, Gidding HF, Riddell MA, McIntyre PB, MacIntyre CR, Kelly HA.** 2009 , Bull World Health Organ, p. 87(1):64-71.
64. The concept of herd immunity and the design of community-based immunization programmes. **Anderson RM.** 1992, Vaccine, p. 10(13):928-35.
65. Measles vaccines and the potential for worldwide eradication of measles. **Meissner HC, Strebel PM, Orenstein WA.** 2004, Pediatrics, p. 114(4):1065-9.
66. An epidemic of measles in southern Greenland, 1951; measles in virgin soil. II. The epidemic proper. **Christensen PE, Schmidt H, Bang HO, Andersen V, Jordal B, Jensen O.** 1953, Acta Med Scand, p. 144(6):430-49.
67. [http://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6\\_2\\_2\\_1.jsp?lingua=italiano&id=1519](http://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?lingua=italiano&id=1519). Salute, Ministero della. Piano nazionale per l'eliminazione del morbillo e della rosolia congenita (PNEMoRc) 2010-2015. 23 Marzo 2011.
68. What will it take to achieve measles elimination in the World Health Organization European Region: progress from 2003-2009 and essential accelerated actions. **Martin R, Wassilak S, Emiroglu N, Uzicanin A, Deshesvoi S, Jankovic D, Goel A, Khetsuriani N.** 2011 , J Infect Dis, p. 204 Suppl 1:S325-34.
69. The state of measles and rubella in the WHO European Region, 2013. **Muscat M, Shefer A, Ben Mamou M, Spataru R, Jankovic D, Deshevoy S, Butler R, Pfeifer D.** 2014 , Clin Microbiol Infect, p. 20 Suppl 5:12-8.
70. [http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0020/254234/EpiBrief\\_2\\_2014-rev3-with-data.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0020/254234/EpiBrief_2_2014-rev3-with-data.pdf?ua=1). **WHO Regional Office for Europe.** A report on the epidemiology of selected vaccine-preventable diseases in the European Region. 2014.
71. Molecular epidemiology of measles virus in Italy, 2002-2007. **Magurano F, Fortuna C, Marchi A, Benedetti E, Bucci P, Baggieri M, Nicoletti L.** 2012 , Virol J, p. 9:284.
72. Molecular epidemiology of measles virus in Italy during 2008. **Magurano F, Fortuna C, Baggieri M, Filia A, Benedetti E, Bucci P, Marchi A, Nicoletti L.** 2013, Ann Ist Super Sanita, p. 49(1):50-5.
73. Simultaneous IgM reactivity by EIA against more than one virus in measles, parvovirus B19 and rubella infection. **Thomas HI, Barrett E, Hesketh LM, Wynne A, Morgan-Capner P.** 1999 , J Clin Virol, p. 14(2):107-18.
74. Update of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses: new genotypes and reference strains. OMS. 2003, Wkly Epidemiol Rec, p. 78(27):229-32.
75. New measles genotype, Uganda. **Muwonge A, Nanyunja M, Rota PA, Bwogi J, Lowe L, Liffick SL, Bellini WJ, Sylvester S.** 2005 , Emerg Infect Dis, p. 11(10):1522-6.

76. Global distribution of measles genotypes and measles molecular epidemiology. **Rota PA, Brown K, Mankertz A, Santibanez S, Shulga S, Muller CP, Hübschen JM, Siqueira M, Beirnes J, Ahmed H, Triki H, Al-Busaidy S, Dosseh A, Byabamazima C, Smit S, Akoua-Koffi C, Bwogi J, Bukenya H, Wairagkar N, Ramamurty N, Incomserb P, Pattamadilok S, Jee Y, Lim W, Xu W, Komase K, Takeda M, Tran T, Castillo-Solorzano C, Chenoweth P, Brown D, Mulders MN, Bellini WJ, Featherstone D.** 2011, *J Infect Dis*, p. 204 Suppl 1:S514-23.
77. New measles virus genotype associated with outbreak, China. **Zhang Y, Ding Z, Wang H, Li L, Pang Y, Brown KE, Xu S, Zhu Z, Rota PA, Featherstone D, Xu W.** 2010, *Emerg Infect Dis*, p. 16(6):943-7.
78. Monitoring progress toward measles elimination by genetic diversity analysis of measles viruses in China 2009-2010. **Zhang Y, Wang H, Xu S, Mao N, Zhu Z, Shi J, Huang G, Liu C, Bo F, Feng D, Lu P, Liu Y, Wang Y, Lei Y, Chen M, Chen H, Wang C, Fu H, Li C, He J, Gao H, Gu S, Wang S, Ling H, Liu Y, Ding Z, Ba Z, Feng Y, Measles Virology Surveillance Working Group.** 2014 Sep, *Clin Microbiol Infect*, p. 20(9):O566-77.
79. Measles virus nomenclature update: 2012. WHO. 2012, *Wkly Epidemiol Rec*, p. 87(9):73-81.
80. High genetic diversity of measles virus, World Health Organization European Region, 2005-2006. **Kremer JR, Brown KE, Jin L, Santibanez S, Shulga SV, Aboudy Y, Demchyshyna IV, Djemileva S, Echevarria JE, Featherstone DF, Hukic M, Johansen K, Litwinska B, Lopareva E, Lupulescu E, Mentis A, Mihneva Z, Mosquera MM, Muscat M, Naumova MA, Nedeljkovic J.** 2008, *Emerg Infect Dis*, p. 14(1):107-14.
81. Rapid replacement of endemic measles virus genotypes. **Santibanez S, Tischer A, Heider A, Siedler A, Hengel H.** 2002, *J Gen Virol*, p. 83(Pt 11):2699-708.
82. Global distribution of measles and rubella genotypes--update. OMS. 2006, *Wkly Epidemiol Rec*, p. 81(51/52):474-9.
83. <http://www.simi.iss.it/normativa.htm>. SIMI. 1990.
84. [http://www.epicentro.iss.it/focus/morbillo/pdf/sorveglianza-speciale\\_morbillo.pdf](http://www.epicentro.iss.it/focus/morbillo/pdf/sorveglianza-speciale_morbillo.pdf). Ministero della salute. Piano nazionale di eliminazione del morbillo e della rosolia congenita: istituzione di un sistema di sorveglianza speciale per morbillo. 20 Aprile 2007.
85. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:086:0044:0062:EN:PDF>. ECDC, Official Journal of the European Communities. Commission Decision of 19 March 2002 laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council.

86. [http://www.who.int/ihr/elibrary/manual\\_diagn\\_lab\\_meas\\_rub\\_en.pdf](http://www.who.int/ihr/elibrary/manual_diagn_lab_meas_rub_en.pdf). OMS. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, second edition, WHO/IVB/07.01, 2007.
87. [www.regione.lombardia.it](http://www.regione.lombardia.it). Lombardia, Regione. Istituzione di un sistema di sorveglianza integrato per il morbillo e la rosolia alla luce del nuovo Piano Nazionale di Eliminazione del morbillo e della rosolia congenita 2010-2015. 2013.
88. A multiplex TaqMan PCR assay for the detection of measles and rubella virus. **Hübschen JM, Kremer JR, De Landtsheer S, Muller CP**. 2008, J Virol Methods, p. 149(2):246-50.
89. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf). OMS Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza 2011.
90. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Hall TA**. 1999, Nucl. Acids Symp, p. 41: 95-98.
91. <http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>. Geospiza's FinchTV.
92. [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). National Center for Biotechnology Information (NCBI). GenBank. [Online]
93. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. **Pybus OG, Rambaut A**. 2009, Nature , p. 10: 540-550.
94. Use of phylogenetics in the molecular epidemiology and evolutionary studies of viral infection. **Lam TT, Hon CC, Tang JW**. 2010, Clin Lab Sci , p. 47: 5-49.
95. The modern molecular clock. **Bromham L, Penny D**. 2003, Nat Rev Genet , p. 4: 216-224.
96. Molecular Dating of phylogenetic trees: a brief review of current methods that calculate divergence times. **Rutschmann F**. 2006, Divers Distrib , p. 12: 35-48.
97. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP**. 2001, Science , p. 2310-2314.
98. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their application. **Hastings WK**. 1970, Biometrika , p. 57: 97-109.
99. The coalescent. **Kingman JFC**. 1982, Stoch Process Appl, p. 13: 235-248.
100. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **Drummond AJ, Rambaut A**. 2007, BMC Evolutionary Biology, p. 7: 214-222.
101. <https://code.google.com/p/jmodeltest2/wiki/GettingStarted>. JModelTest2.
102. <http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>. TRACER.
103. <http://beast.bio.ed.ac.uk/treeannotator>. TreeAnnotator.
104. Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. **Kosakovsky Pond SL, Frost SD**. 2005, Molecular Biology and Evolution , p. 22(5): 1208-1222.

105. Adaptation to different human populations by HIV-1 revealed by codon-based. **Pond SL, Frost SD, Grossman Z, Gravenor MB, Richman DD, Brown AJ.** 2006 , PLoS Comput Biol, p. 2(6):e62.
106. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. **Murrell B, Wertheim JO, Moola S, Weighill T, Scheffler K, Kosakovsky Pond SL.** 2012, PLoS Genet, p. 8(7):e1002764.
107. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. **Delpont W, Poon AF, Frost SD, Kosakovsky Pond SL.** *Bioinformatics* . 26(19):2455-7, 2010 .
108. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon. **Pond SL, Frost SD.** *Bioinformatics*. 21(10):2531-3, 2005 .
109. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. **Pond SL, Frost SD, Muse SV.** *Bioinformatics*. 2005, p. 21(5):676-9.
110. Column sorting: rapid calculation of the phylogenetic likelihood function. **Kosakovsky Pond SL, Muse SV.** *Syst Biol*. 53(5):685-92 2004 .
111. Estimating measles transmission potential in Italy over the period 2010-2011. **Ajelli M, Merler S, Fumanelli L, Bella A, Rizzo C.** 2014, *Ann Ist Super Sanita*, p. 50(4):351-6.
112. Estimating the measles effective reproduction number in Australia from routine. **Chiew M, Gidding HF, Dey A, Wood J, Martin N, Davis S, McIntyre P.** 2014 , *Bull World Health Organ*, p. 92(3):171-7.
113. Is the basic reproductive number ( $R(0)$ ) for measles viruses observed in recent outbreaks lower than in the pre-vaccination era? **Plans Rubio P.** 2012, *Euro Surveill*, p. 17(31):22.
114. Estimation of measles vaccine efficacy and critical vaccination coverage in a highly vaccinated population. **Van Boven M, Kretzschmar M, Wallinga J, O'Neill PD, Wichmann O, Hahné S.** 2010, *Journal of the Royal Society Interface* , p. 7(52):1537-1544.
115. Surveillance and vaccination coverage of measles and rubella in Northern Italy. **Amendola A, Bubba L, Piralla A, Binda S, Zanetti A, Pariani E, Ronghiero A, Premoli M, Pellegrinelli L, Coppola L, Gramegna M, Baldanti F, Zanetti A.** 2014 , *Hum Vaccin Immunother*, p. 19:e35865.
116. Genotyping of circulating measles strains in Italy in 2010. **Baggieri M, Fortuna C, Ansaldi F, Chironna M, Marchi A, Bucci P, Benedetti E, el Manso M, Declich S, Nicoletti L, Magurano F.** 2014, *Ann Ist Super Sanita*, p. 50(4):345-50.
117. Measles outbreak on a cruise ship in the western Mediterranean, February 2014, preliminary report. **Lanini S, Capobianchi MR, Puro V, Filia A, Del Manso M, Karki T, Nicoletti L, Magurano F, Derrough T, Severi E, Bonfigli S, Lauria F, Ippolito G, Vellucci L, Pompa MG.** 2014, *Euro Surveill*, p. 19(10). pii: 20735.







## Riassunto:

### 1. Introduzione

Il morbillo è una malattia infettiva causata da un virus del genere *morbillivirus* (famiglia dei *Paramixoviridae*) molto contagiosa, prevenibile con la vaccinazione, che presenta i requisiti necessari per l'eliminazione (trasmissione esclusivamente interumana, virus geneticamente stabile, assenza di serbatoi animali o ambientali, periodo di contagiosità breve, immunità permanente conferita dall'infezione, disponibilità di un vaccino efficace e sicuro). In assenza di misure preventive la malattia può avere un grave impatto sulla salute della popolazione.

In linea con gli obiettivi della Regione Europea dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il 23 marzo 2011, è stato approvato il Piano Nazionale per l'Eliminazione del Morbillo e della Rosolia congenita (PNEMoRe) 2010-20. Nel piano, accanto a misure mirate atte ad incrementare le coperture vaccinali per due dosi di vaccino trivalente contro morbillo, parotite e rosolia (MPR), per raggiungere gli obiettivi di eliminazione viene sottolineata l'importanza della sorveglianza. In previsione dell'obiettivo di eliminazione risulta infatti fondamentale un sistema di sorveglianza sensibile in grado, non solo di individuare tempestivamente tutti i nuovi casi di morbillo, ma anche di valutare la circolazione dei diversi genotipi virali. Nei paesi in via di eliminazione la sorveglianza molecolare gioca dunque un ruolo fondamentale per valutare la circolazione dei ceppi endemici, identificare i casi di importazione e la loro provenienza.

### 2. Scopo

Descrivere il profilo epidemiologico e virologico del morbillo in Lombardia nel biennio 2013-2014 e caratterizzare molecularmente i ceppi di *morbillivirus* al fine di genotipizzarli, analizzarli filogeneticamente e studiarne le caratteristiche evolutive.

### 3. Materiali e metodi

Sono stati analizzati i campioni respiratori e/o da urina provenienti da pazienti con una diagnosi sospetta di morbillo, raccolti nell'ambito del sistema di sorveglianza integrata per il morbillo e la rosolia della regione Lombardia da luglio 2013 a novembre 2014. I campioni sono stati sottoposti a estrazione dell'RNA e a successiva amplificazione genica mediante real-time RT-PCR per l'identificazione degli acidi nucleici del virus del morbillo e del virus della rosolia.

Per valutare la variabilità genetica e l'evoluzione molecolare dei *morbillivirus* circolanti in Lombardia tutti i campioni risultati positivi sono stati sottoposti a nested PCR per l'amplificazione di un frammento del gene N. gli amplificati sono stati sequenziati e l'analisi delle sequenze ottenute è stata condotta attraverso diversi programmi bioinformatici.

### 4. Risultati

Da luglio 2013 a novembre 2014 in Lombardia sono stati segnalati 596 casi di morbillo, l'11,4% (68/596) delle segnalazioni di morbillo è risultato negativo agli esami di laboratorio e quindi classificato come non caso. Pertanto i casi di morbillo (possibili, probabili e

confermati) in Lombardia nel periodo in studio sono stati complessivamente 528 (88,6%; 528/596).

La maggior parte dei casi (359 casi, pari al 68%) si è verificata nella fascia di età 15-39 anni. Il 9% dei casi (47) è stato osservato in bambini sotto i cinque anni, di cui il 6,4% (3/47) in pazienti con meno di un anno. Complessivamente 401 casi segnalati (75,9%) erano non vaccinati, 50 casi (9,5%) avevano ricevuto una dose di vaccino e 3 (0,6%) due dosi.

Come centro di riferimento regionale per la sorveglianza integrata morbillo-rosolia, da luglio 2013 a settembre 2014, abbiamo ricevuto e analizzato i campioni biologici (sangue, tampone naso/faringeo, urina) di 115 pazienti con sospetta infezione. Il 54,8% (63/115) dei casi è risultato positivo al virus del morbillo; nessun caso di rosolia è stato confermato. Il maggior numero di casi confermati (76,2%; 48/63) è stato osservato nella fascia d'età compresa tra i 15 e i 39, seguita dalla fascia d'età 40 - 64 anni con il 12,7% (8/63). Il 60,3% (38/63) dei casi confermati non era vaccinato, il 27% (17/63) presentava uno stato vaccinale non noto.

L'analisi del genotipo virale è stata ultimata con successo per 53 dei 63 casi confermati nel periodo in studio. Di questi, 42 (79,2%; 42/53) appartenevano al genotipo D8, 8 (15,1%; 8/53) al genotipo B3 e 3 (5,7%; 3/53) appartenevano al genotipo D9. Il genotipo prevalente è risultato il D8, circolante in tutto il periodo in studio. Il genotipo B3 è circolato nella primavera 2014 e ad agosto 2014. Tre casi di genotipo D9 sono stati identificati nei mesi di agosto e novembre 2013.

L'albero, ottenuto dall'analisi delle sequenze D8, ha evidenziato la presenza di 4 cluster (1-4), i cluster 1 e 2 sono stati ulteriormente suddivisi in sub-cluster. Le sequenze della sorveglianza lombarda segregavano nei cluster 1 e 2, a loro volta suddivisi in 5 (1A-1E) e in 3 (2A - 2C) sub-cluster.

L'analisi filogenetica delle sequenze B3 ha evidenziato la presenza di 7 cluster, il primo dei quali suddiviso in 2 sub-cluster. Le sequenze identificate in Lombardia clusterizzavano in 4 distinti cluster (1-4); il cluster 1 è risultato a sua volta suddiviso in due sub-cluster (1A e 1B).

L'albero, ottenuto dall'analisi delle sequenze D9, ha evidenziato la presenza di 4 cluster, il primo dei quali a sua volta suddiviso in 2 sub-cluster. Le sequenze lombarde segregavano nel cluster 1, sub-cluster 1A e 1B.

I tassi medi evolutivi, calcolati mediante analisi dell'*evolutionary rate*, sono stati stimati pari a:

- $2,97 \times 10^{-6}$  subs/site/year (95% HPD:  $1,6 - 4,5 \times 10^{-6}$ ) per le sequenze D8
- $2,44 \times 10^{-6}$  subs/site/year (95% HPD:  $1,3 - 3,7 \times 10^{-6}$ ) per le sequenze B3
- $5,96 \times 10^{-6}$  subs/site/year (95% HPD:  $2,2 - 10,7 \times 10^{-6}$ ) per le sequenze D9

Il valore di tMRCA per la radice albero del genotipo D8 risale a 18 anni fa, i ceppi isolati presso il nostro laboratorio appartenenti al cluster 1 condividevano un unico nodo significativo interno con un tMRCA medio stimato a circa 4 anni fa, le sequenze appartenenti al cluster 2 presentavano un tMRCA medio stimato risalente a 5 anni fa.

Il valore di tMRCA per la radice dell'albero del genotipo B3 è risultato risalire a poco più di 12 anni fa. I tre isolati del genotipo D9 hanno mostrato un tMRCA significativo risalente a circa 5 anni fa, con una radice a 7 anni fa.

Il *Bayesian skyline plots* (BSP) ottenuto dall'analisi dinamica delle sequenze ha rilevato che tutti e tre i genotipi presentano un andamento della popolazione virale sostanzialmente costante nel periodo in studio.

L'analisi della pressione selettiva sito-specifica delle sequenze del genotipo D8 ha identificato la presenza di un codone sottoposto a selezione positiva, mentre 9 siti sono risultati sotto pressione selettiva negativa. Per le sequenze appartenenti al genotipo B3, l'analisi della pressione selettiva ha identificato 1 codone sottoposto a selezione positiva, mentre 7 siti sono risultati sotto pressione selettiva negativa. Per quanto riguarda il genotipo D9, l'analisi ha indicato l'assenza di siti soggetti a pressione positiva e la presenza di 7 siti soggetti a pressione selettiva negativa.

## 5. Conclusioni

I risultati ottenuti dai presenti lavori di tesi hanno dimostrato che le ultime epidemie di morbillo (2013-2014) sono state sostenute da virus appartenenti ai genotipi D8 e B3 endemici nel territorio italiano dal biennio 2006-2007. Oltre ai ceppi autoctoni D8 e B3, è stata dimostrata la circolazione di ceppi D9 di recente introduzione nel territorio lombardo.

L'approfondimento delle caratteristiche geniche del virus in studio ha permesso di valutare la circolazione dei diversi genotipi e studiarne le caratteristiche molecolari. Metodi filogenetici computazionali sono stati utilizzati per determinare alcune caratteristiche relative alla comparsa del virus del morbillo e della sua diffusione nella popolazione umana. Attraverso lo studio dell'evoluzione molecolare del virus è stato possibile definire sia il momento in cui i diversi genotipi virali hanno cominciato a differenziarsi (mediante il calcolo del tasso evolutivo), sia di valutare le caratteristiche dell'espansione spazio-temporale del virus. Inoltre è stata valutata la pressione selettiva che agisce sulla regione C-terminale del gene N.

La valutazione del profilo genetico dei ceppi virali circolanti fornisce informazioni importanti sull'origine di focolai epidemici e risulta un approccio innovativo fondamentale per la ricostruzione dei *link* epidemiologici. Il morbillo rappresenta un esempio paradigmatico di come le metodologie molecolari e bioinformatiche arricchiscano sia l'indagine epidemiologica sia l'attività di sorveglianza, entrambe volte al controllo della trasmissione del virus.