

ATTUALITÀ NELL'APPROCCIO ALLA
GESTIONE E AL CONTROLLO DELLE
MALATTIE INFETTIVE

ROVIGO, 1 dicembre 2006

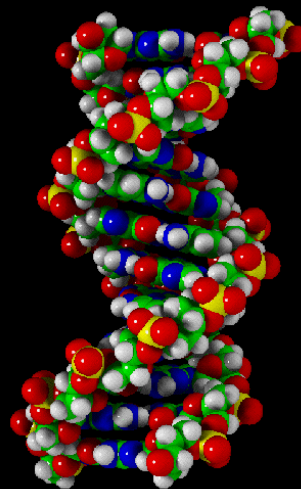
Applicazione delle nuove metodologie alla
ricerca epidemiologica



Prof. Pierlanfranco D'Agaro
Dipartimento Scienze di Medicina Pubblica
UCO Igiene e Medicina Preventiva
Università degli Studi di Trieste

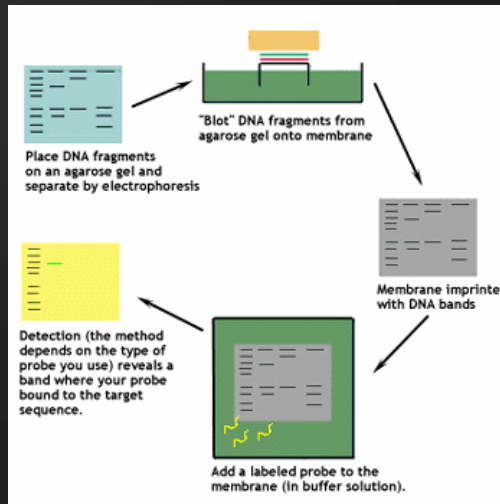
1953 - WATSON JD, CRICK FH,
Molecular structure of nucleic acids; a
structure for deoxyribose nucleic acid.
Nature; 171:737-8.

DNA



1975 - Southern EM.
 Detection of specific sequences among DNA
 fragments separated by gel electrophoresis.
 J Mol Biol.; 98:503-17.

Southern blot



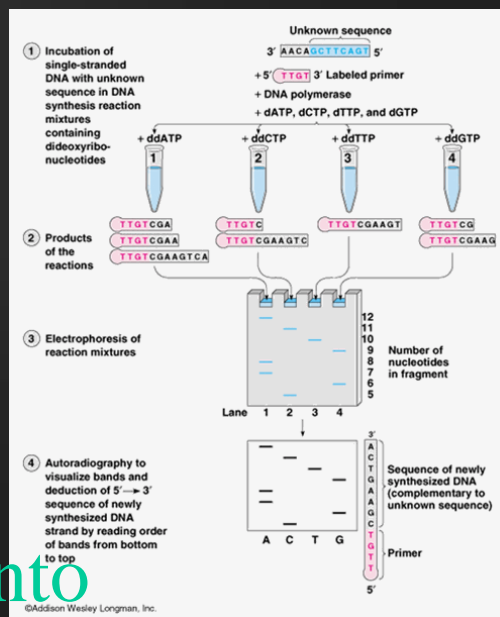
1977 - Sanger F, Nicklen S,
 Coulson AR.
**DNA sequencing with
 chain-terminating
 inhibitors.**

Proc Natl Acad Sci U S A,
 74: 5463-7.

1977 - Maxam AM, Gilbert W
**A New Method for
 Sequencing DNA.**

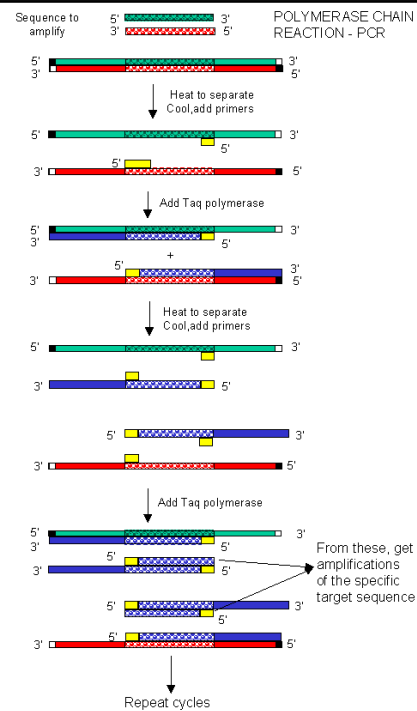
Proc Natl Acad Sci U S A,
 74: 560-664 .

Sequenziamento



1988 – Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, et al. **Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase** *Science*; 239: 487-91

PCR



La rivoluzione della PCR

- **Ricerca di segnali genetici di agenti non coltivabili**
- Aumentata importanza delle tecniche dirette
- Semplificazione delle tecniche quantitative
- Riduzione dei tempi delle indagini di laboratorio
- Semplificazione delle tecniche di caratterizzazione molecolare
 - Ibridazione
 - Sequenziamento
- Eliminazione/riduzione di tecniche che richiedono l'uso di sostanze radioattive (Southern blot, dot blot, sequenziamento, ecc.)

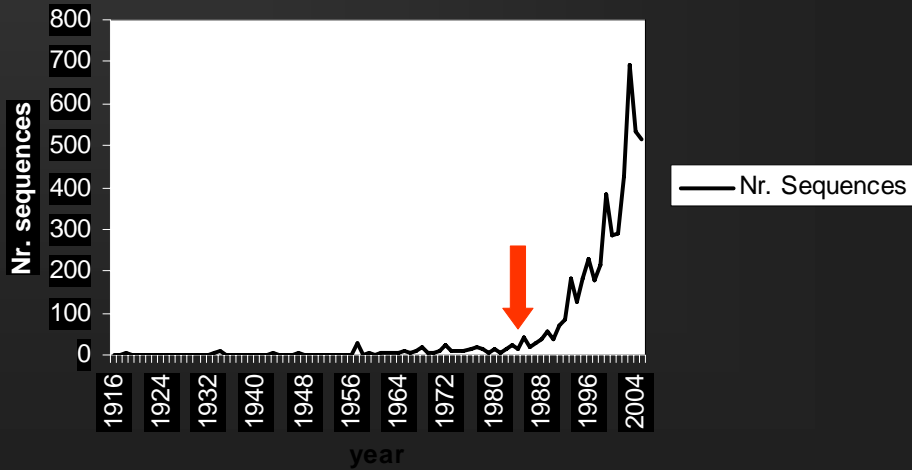
Agenti non coltivabili o di difficile isolamento

- HIV
- HCV
- HBV
- HPV
- JCV-BKV
- SARS CoV
- HHV6
- CMV
- Chlamydia trachomatis
- Chlamydia pneumoniae
- Mycobacterium tuberculosis
- Pneumocystis carinii
- Rickettsia sp.
- Borrelia sp.
- Toxoplasma gondii

La rivoluzione della PCR

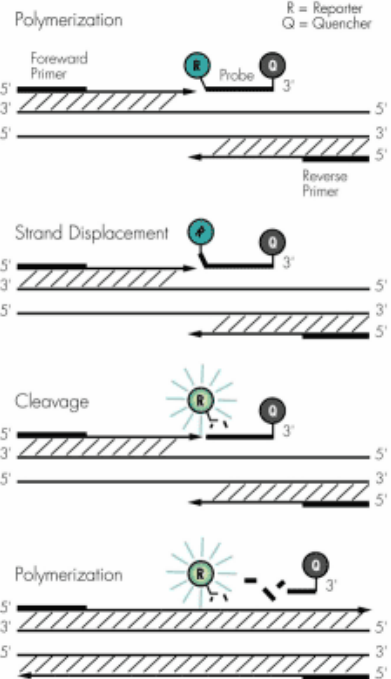
- Ricerca di segnali genetici di agenti non coltivabili
- Aumentata importanza delle tecniche dirette
- Semplificazione delle tecniche quantitative
- Riduzione dei tempi delle indagini di laboratorio
- Eliminazione/riduzione di tecniche che richiedono l'uso di sostanze radioattive (Southern blot, dot blot, sequenziamento, ecc.)
- Semplificazione delle tecniche di caratterizzazione molecolare
 - Ibridazione
 - Sequenziamento

Numero di sequenze di HA di virus influenzali (umani) di tipo A per anno di isolamento disponibili nel Influenza Sequence Database



1996 – Gibson UE, Heid CA, Williams PM.
A novel method for real time quantitative RT-PCR.
Genome Res. 1996; 6: 995-1001.

Real Time PCR



Real Time PCR

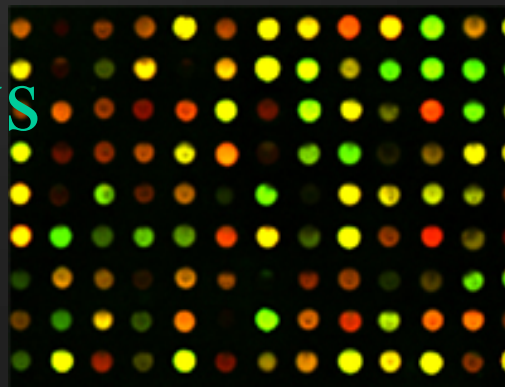
- Ulteriore semplificazione delle tecniche quantitative
- Ulteriore riduzione dei tempi delle indagini di laboratorio
- Semplificazione degli studi di espressione genica

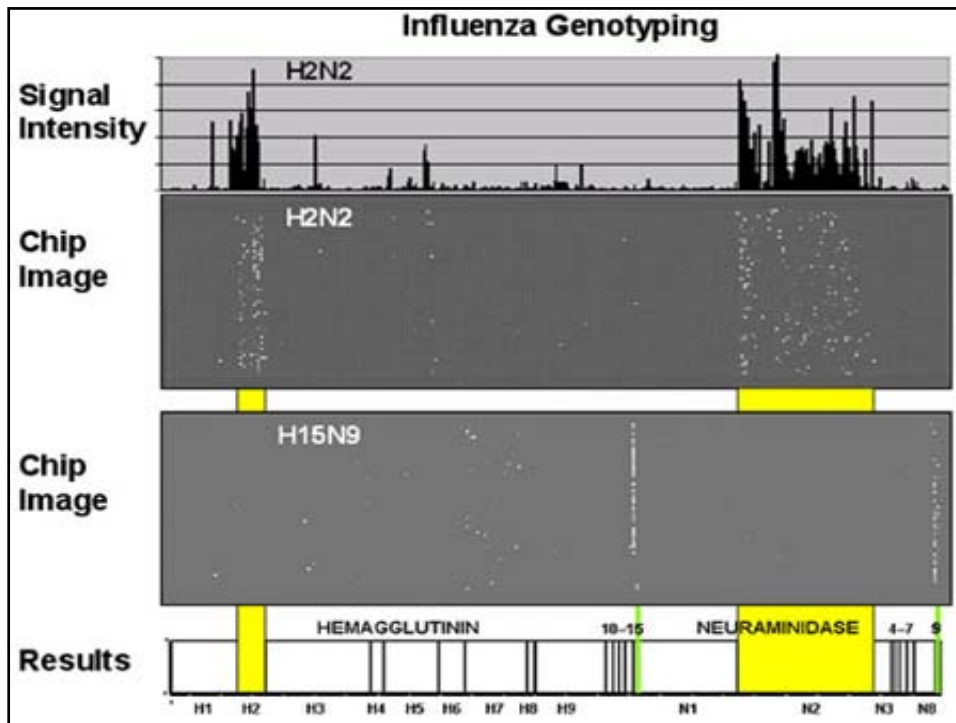
1991- Fodor SP, Read J, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 251: 767-73

1995 - Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*; 270: 467-70.

Microarrays

- Studi di espressione
- Identificazione/ tipizzazione di agenti
- Ricerca di marcatori di farmacoresistenza





Applicazioni

- Epidemiologia molecolare
- Sorveglianza epidemiologica

Epidemiologia Molecolare

- Epidemiologia del cancro
- Epidemiologia ambientale
- Epidemiologia delle malattie infettive

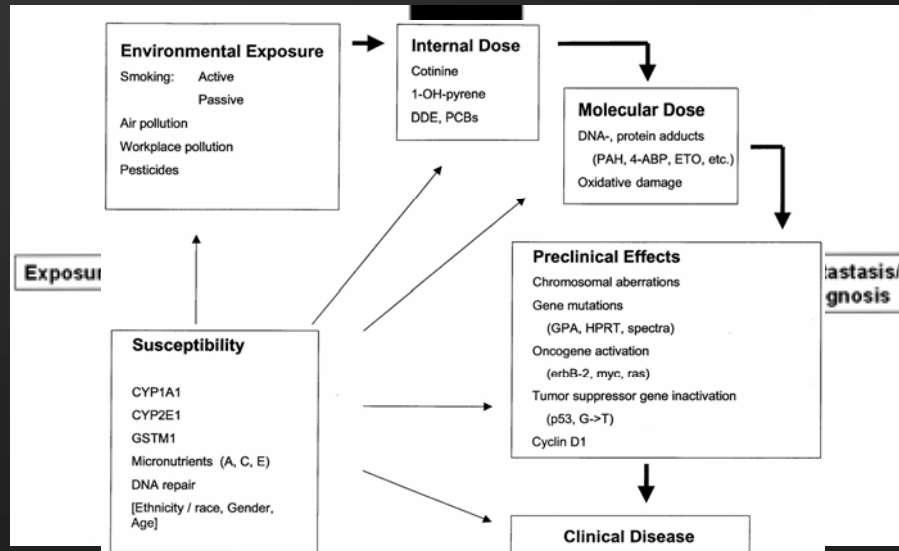
EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE

- “L’applicazione di tecniche molecolari per descrivere le malattie e le condizioni pre-cliniche, per quantificare l’esposizione e i suoi effetti biologici e per identificare la presenza di geni di suscettibilità” (Spilberg et al. J Clin Epidemiol, 1997, 50: 633-638)

METODOLOGIA
EPIDEMIOLOGICA

BIOLOGIA
MOLECOLARE

Epidemiologia molecolare dei tumori



Perera FP, Weinstein IP, Carcinogenesis, 2000, 21:517-524
Chen Y-C, Hunter DJ, CA Cancer J Clin, 2005, 55: 45-54

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELLE MALATTIE INFETTIVE

- “Identifica gli *agenti* responsabili di malattie infettive e determina la loro *sorgente*, le loro relazioni biologiche, le vie di *trasmissione*, i geni responsabili per la loro *virulenza*, gli antigeni rilevanti per la *profilassi vaccinale*, i fenomeni di *resistenza ai farmaci*.” (Levin BR et al, Science, 1999, 283: 806-9)
- “L’applicazione della biologia molecolare allo studio dell’epidemiologia delle malattie infettive.” (Tompkins LS, in *Molecular genetics of bacterial pathogenesis*, ASM, 1994: 63-73)

APPROCCIO MOLECOLARE: APPLICAZIONI NELL'EPIDEMIOLOGIA DELLE MALATTIE INFETTIVE

Sorveglianza epidemiologica - controllo delle malattie emergenti e ri-emergenti

- Caratterizzazione, Rilevamento, Diagnosi
- Sorveglianza di eventi epidemici
- Sorveglianza al fine di valutare i programmi di intervento

Epidemiologia molecolare

- Ricerca delle origini
- Studio dell'ecologia dell'agente infettivo
- Studio delle vie di trasmissione e dell'interazione ospite/agente

Sorveglianza epidemiologica - controllo delle malattie emergenti e ri-emergenti

- **Caratterizzazione, Rilevamento, Diagnosi**
- Sorveglianza di eventi epidemici
- Sorveglianza al fine di valutare i programmi di intervento

L'ESEMPIO DELL'INFLUENZA

Epidemia
Sorveglianza virologica



Caratterizzazione
molecolare/antigenica



Individuazione nuove
varianti



Vaccino

Rischio pandemico

Sorveglianza virologica
attiva



Rapida identificazione
dei casi



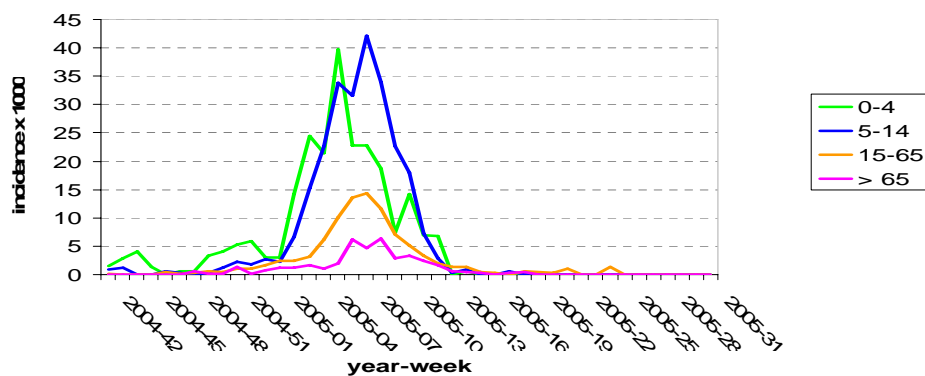
Contenimento della
diffusione

Influenza – stagione 2004/05 - epidemiologia

- Elevata incidenza di ILI (picco >1,6%)
- Interessamento anche di adulti e anziani

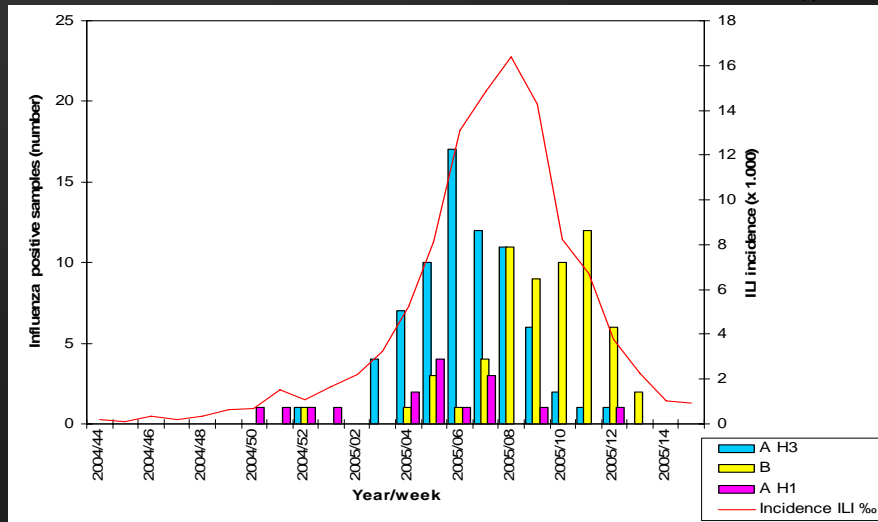
2004-05

Fig. 2 - Age specific ILI incidence in the 2004-05 epidemic season



Influenza – stagione 2004/05 – caratterizzazione

- Circolazione di virus di tipo A(H3) e B



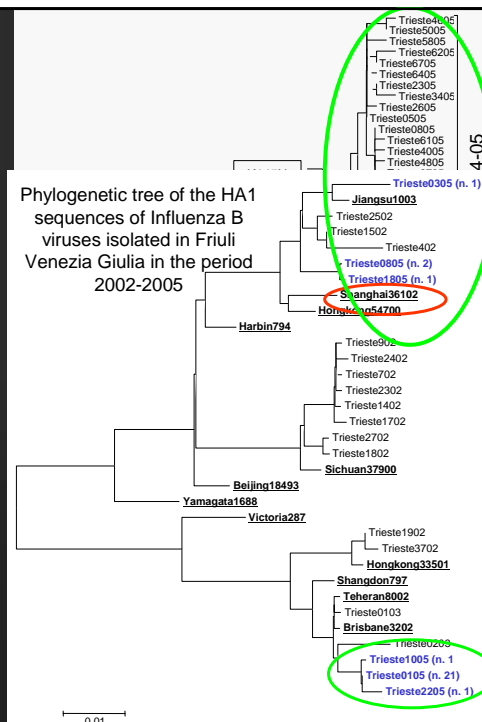
Influenza – stagione 2004/05

Composizione del vaccino:

- A/New Caledonia/20/99(H1N1)-like
- A/Fujian/411/2002(H3N2)-like
- B/Shanghai/361/2002-like

Ceppi circolanti:

- A/California/7/04
- B/Teheran/80/02



Influenza – stagione 2005/06

- 5-30 gennaio 2006: segnalati in Turchia 12 casi di influenza H5N1 con 4 morti
- 15 gennaio - 2 febbraio 2006: tre casi di ILI in camionisti turchi sbarcati da un traghetto a Trieste

Esclusione di Influenza Aviaria H5, H7 e H9 in meno di 8 ore mediante Real Time PCR e conferma dopo 24 ore mediante block PCR

Identificazione in due casi di influenza A H3 mediante Real Time PCR e block PCR

SARS

- 28/04/2003: bambina cinese da sei giorni in Italia, proveniente dalla Cina centrale, viene visitata in PS per febbre, sintomi respiratori
- rX → Polmonite interstiziale
- Definizione di “caso probabile” e ricovero in Malattie infettive

Approccio diagnostico

Ricerca del SARS-CoV



- *Isolamento in coltura*
- *Test rapidi*
- *Test molecolari*
- *Sierologia*



Ricerca altri agenti

- *Influenza A e B*
- *Parainfluenza 1-4*
- *Adenovirus*
- *CMV*
- *RSV*
- *Metapneumovirus*
- *Chlamydia pneum.*
- *Mycoplasma pneum.*
- *Legionella pneum.*
- *altri*

SARS

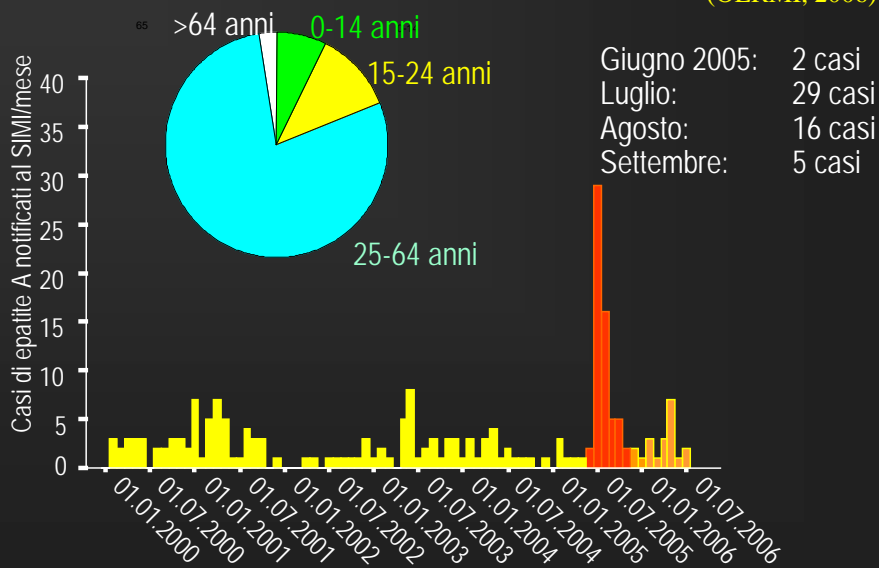
- **Esclusione di SARS Coronavirus**
 - Negatività Real time PCR e RT-PCR
 - Negatività coltura
 - Negatività sierologica
- **Diagnosi di Parainfluenza 3**
 - Diagnosi molecolare: RT-PCR
 - Isolamento in coltura LLC-Mk2
 - Sieroconversione

Sorveglianza epidemiologica - controllo delle malattie emergenti e ri-emergenti

- Caratterizzazione, Rilevamento, Diagnosi
- Sorveglianza di eventi epidemici
- Sorveglianza al fine di valutare i programmi di intervento

Incidenza di Epatite A in Liguria: casi notificati

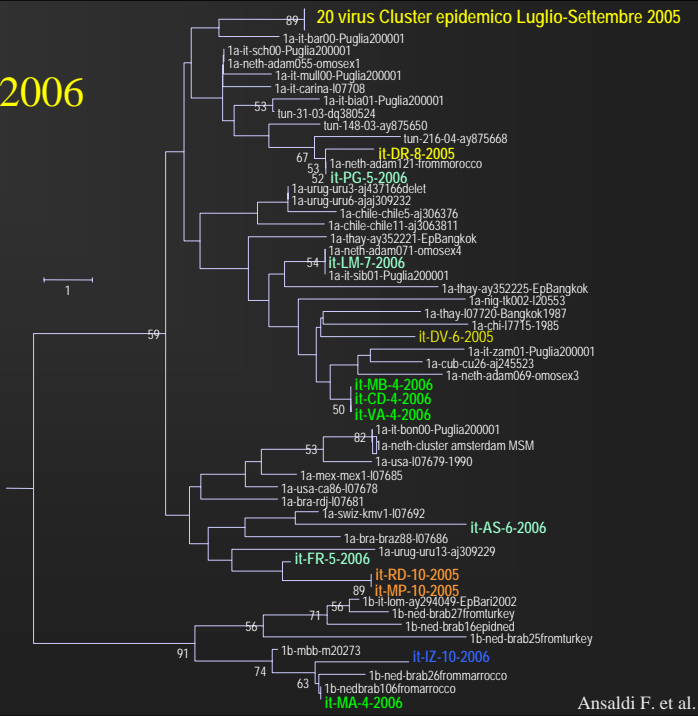
(OERMI, 2006)



Ansaldo F. et al.

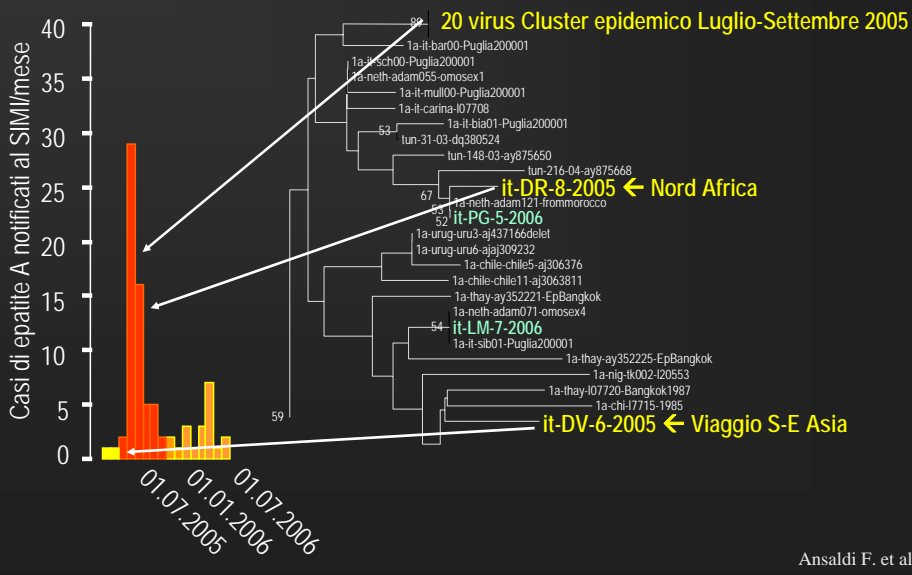
Epatite A in Liguria 2005-2006

Giu-Settembre 2005
 Ottobre 2005
 Aprile 2006
 Maggio-Luglio 2006
 Ottobre 2006



Ansaldo F. et al.

- Quale è la provenienza del virus "epidemico" ?
- E' un'epidemia da fonte comune?



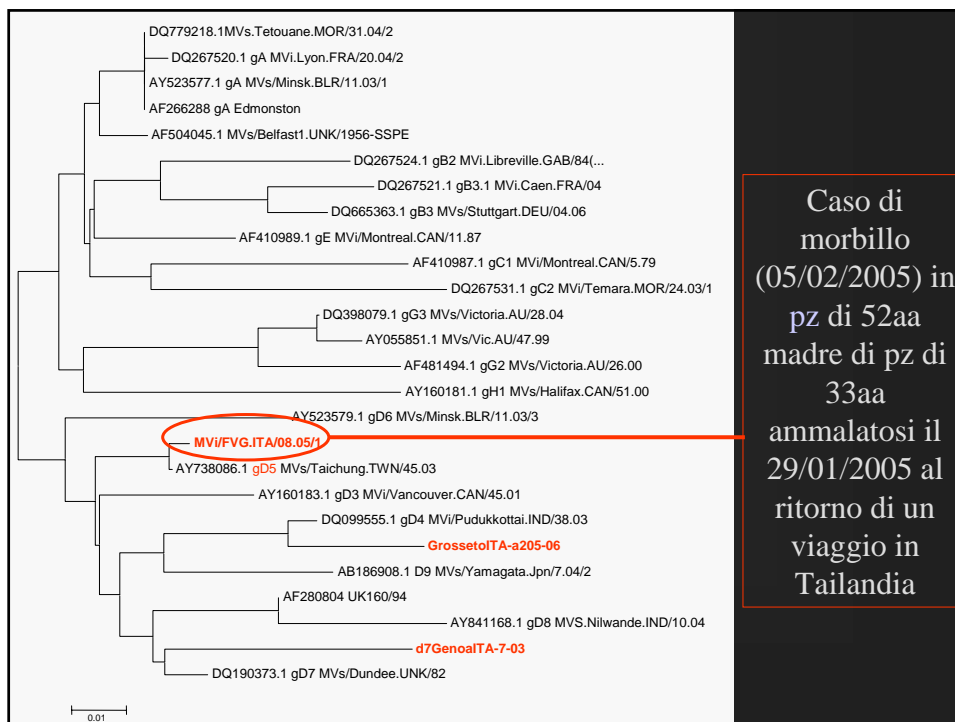
Ansaldo F. et al.

Sorveglianza epidemiologica - controllo delle malattie emergenti e ri-emergenti

- Caratterizzazione, Rilevamento, Diagnosi
- Sorveglianza di eventi epidemici
- Sorveglianza al fine di valutare i programmi di intervento

GENOTIPIZZAZIONE MORBILLO

- Nei paesi con morbillo ancora endemico: il maggior numero dei casi è dovuta a uno o pochi genotipi circolanti con una discreta variabilità intra-genotipo
- Nei paesi che hanno eliminato il morbillo o lo stanno eliminando: i pochi casi sono dovuti a genotipi diversi con minima variabilità intra-genotipo
- I genotipi hanno una distribuzione geografica caratteristica che consente di individuare i casi importati
- Tutti i ceppi vaccinali sono di tipo A



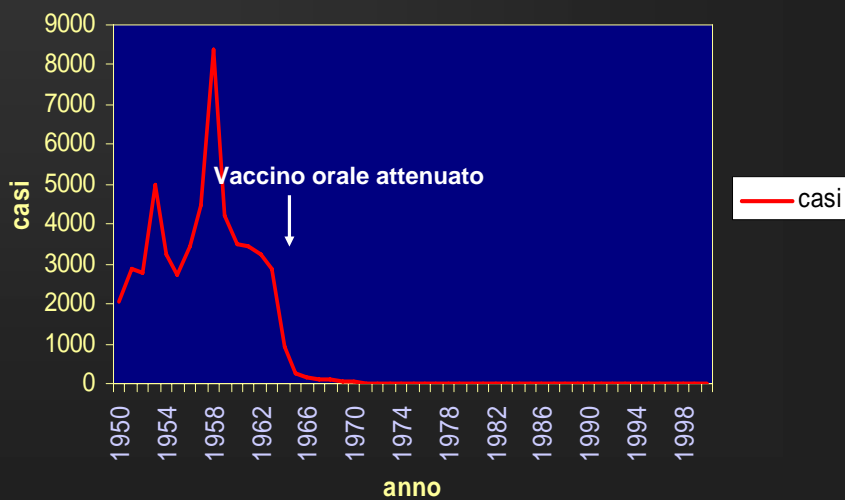
Distribuzione geografica dei genotipi

genotipo	Paesi con morbillo endemico o identificati come sorgente
B3	Africa centrale e occidentale
C2	Marocco, Europa occidentale, Repubblica Ceca
D2	Sud africa, Zambia
D3	Giappone, Taiwan, Filippine
D4	India, Pakistan, Iran, Kenia, Russia, Etiopia, Sud Africa
D5	Giappone, Thailandia
D6	Russia, Brasile, Argentina, Bolivia, Ita, Tur, Ger, Pol, Spa
D7	Germania, Spagna
D8	Etiopia, Nepal, India
d9 n.g.	Indonesia, Venezuela
G2	Indonesia, Malesia
g3 n.g.	Timor Est, Indonesia
H1	Cina, Corea
H2	Vietnam

LA POLIOMIELITE

- L'avvento avverso di maggior importanza associato all'OPV è la paralisi flaccida vaccino associata (VAPP)
Incidenza: 1/2.400.000 dosi; 1/750.000 prime dosi
- Ricerca dei marcatori di attenuazione e di neurovirulenza
- Sorveglianza della circolazione dei virus vaccinali e dei Poliovirus derivati da Vaccino (VDPV)

Casi di poliomielite in Italia



Polio in Italia: 1981-2001

16 casi:

- Un caso di importazione dalla Libia
- Due dall'Arabia Saudita
- Uno dall'Iran
- Dodici casi di **VAPP** (con i tipi 2 o 3)

OPV

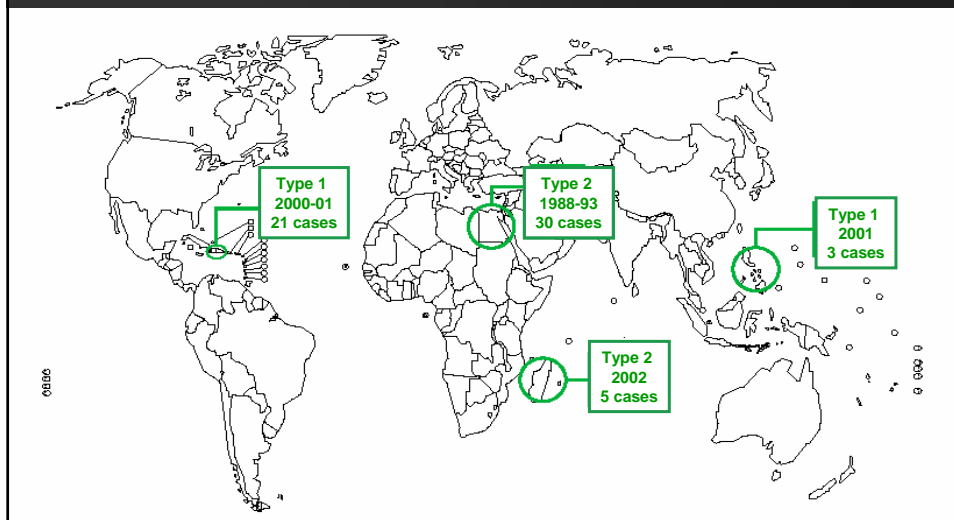
Differenze tra ceppo selvaggio e vaccinale

- **Tipo 1: 56 nucleotidi** (**480** nella regione 5' terminale, 65 nel gene VP4, 225 nel VP3, 134 nel VP1)
- **Tipo 2: 23 nucleotidi** (**481** nella regione 5' terminale, nel 2908 VP1)
- **Tipo 3: 10 nucleotidi** (2-3 critici) (**472** nella regione 5' terminale, 2034 nel VP3)
- **480, 481 e 472** si trovano nella regione corrispondente a IRES (Internal Ribosome Entry Site), elemento cruciale per avviare la traduzione virus-specifica

VDPV

- Isolati che presentano una divergenza nucleotidica superiore o uguale all'1% rispetto ai ceppi vaccinali per VP1:
 - Eliminati da soggetti con immunodeficienza congenita che diventano portatori cronici dopo esposizione ai vaccini OPV (rari).
 - Emergenti e circolanti in comunità con bassi livelli di immunizzazione
 - Originati da processi di ricombinazione tra ceppi vaccinali e virus selvaggi (anche enterovirus non polio)

cVDPV



Sorveglianza virologica

- Classificazione degli isolati:
 - Poliovirus selvaggi, ceppi importati
 - OPV (VAPP)
 - cVDPV

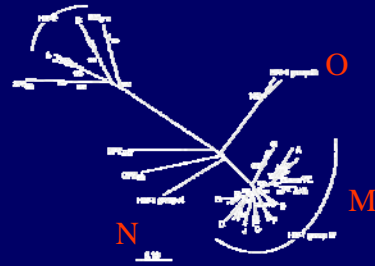
“Epidemiologia molecolare”

- Ricerca delle origini
- Studio dell'ecologia dell'agente infettivo
- Studio delle vie di trasmissione e dell'interazione ospite/agente

Classificazione HIV-1

- Due tipi: HIV 1 e 2
- Tre gruppi HIV1
 - M (Major)
 - O (Outlier)
 - N (non M non O)
- Nove sottotipi M (A, B, C, D, F, G, H, J, K)
- Ricombinanti inter sottotipo
 - Almeno 21 Circulating Recombinant Forms (CRF)
 - numerosi Unique Recombinant Forms (URF)

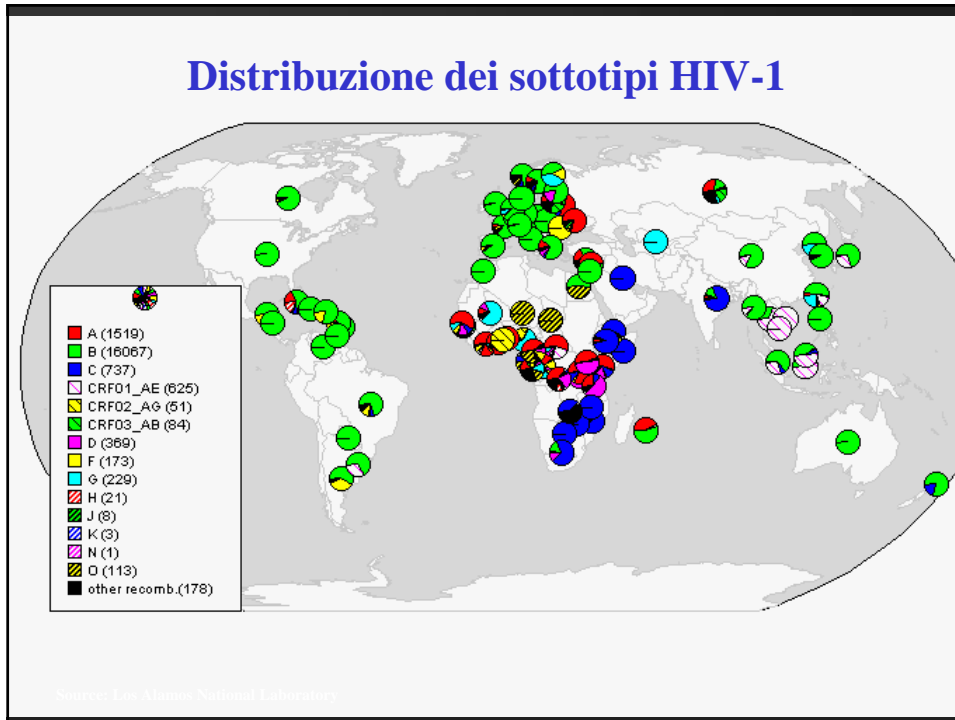
Genetic relationship between HIV and non-human primate lentiviruses



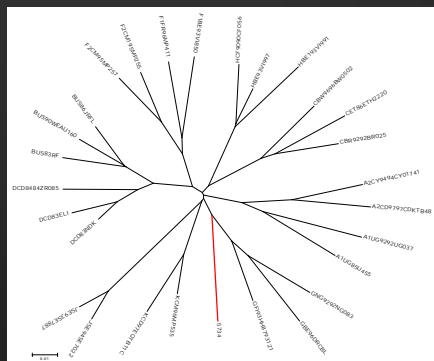
Prevalenza globale e distribuzione

- Il sottotipo C è responsabile di circa il 50% delle infezioni da HIV-1 nel mondo
- I virus con la prevalenza più alta appartengono ai sottotipi A, B, C, D, and CRF01_AE, CRF02_AG
- Molte epidemie regionali sono caratterizzate da una miscela di sottotipi mentre altre sono dominate da un solo sottotipo o CRF.
- I pattern epidemiologici regionali sono diversi, complessi e dinamici.

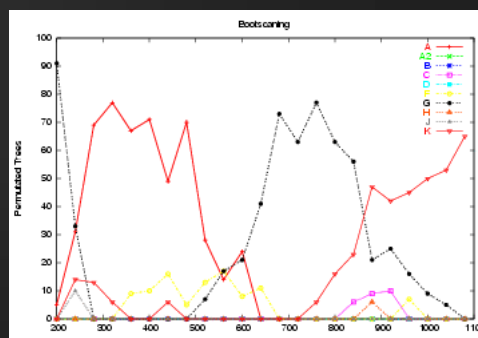
Distribuzione dei sottotipi HIV-1



Analisi della sequenza 7918



Albero filogenetico

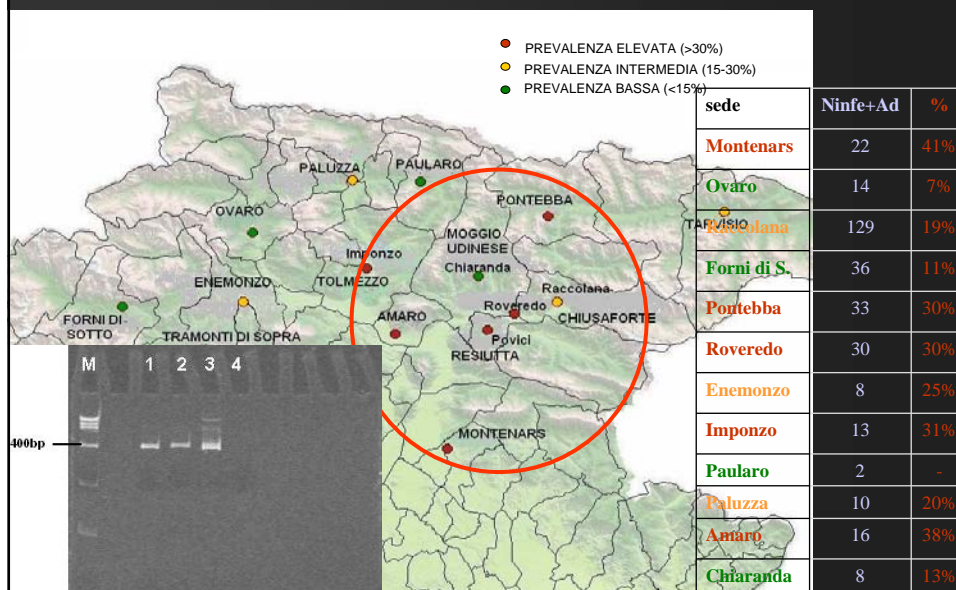


Bootstrap

“Epidemiologia molecolare”

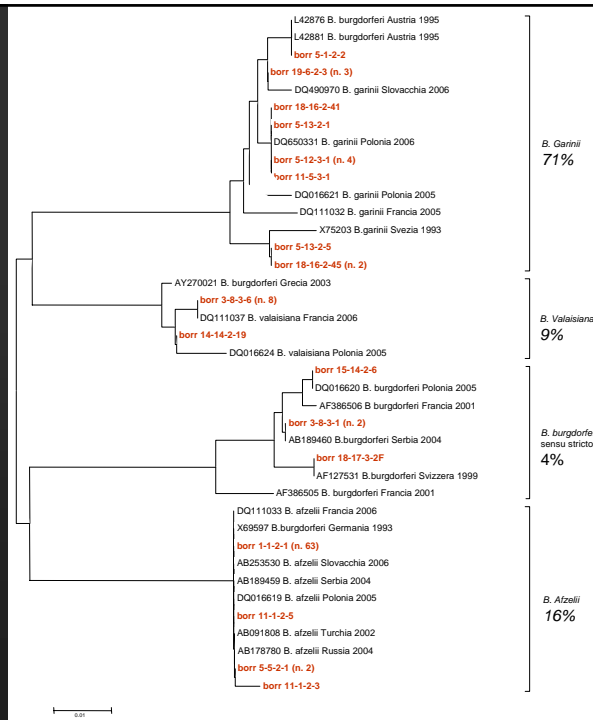
- Ricerca delle origini
- Studio dell'ecologia dell'agente infettivo
- Studio delle vie di trasmissione e dell'interazione ospite/agente

PREVALENZA DI BORRELIA b. PER SITO

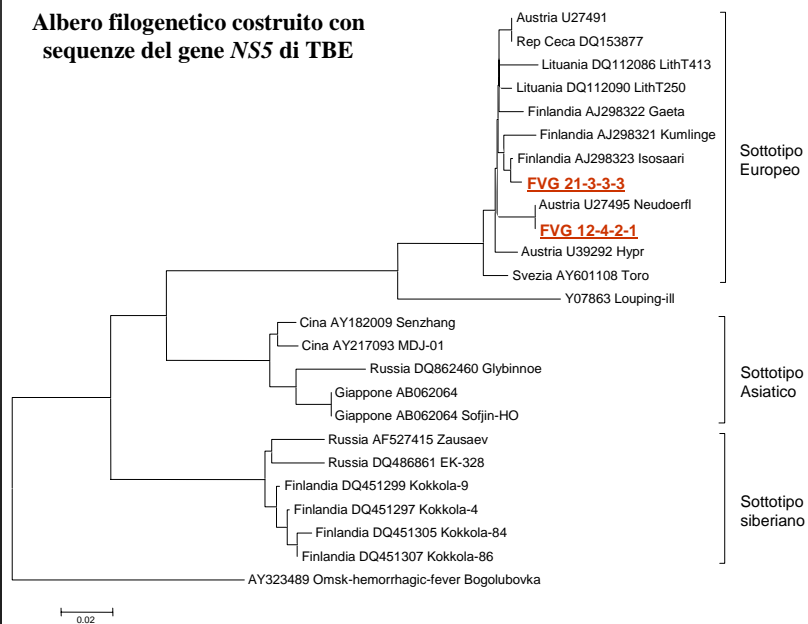


Albero filogenetico costruito con sequenze del gene Fla di *Borrelia burgdorferi* s.l.

- classificazione di agenti di difficile isolamento
- Distribuzione delle specie circolanti
- Confronto con ceppi di aree vicine



Albero filogenetico costruito con sequenze del gene NS5 di TBE



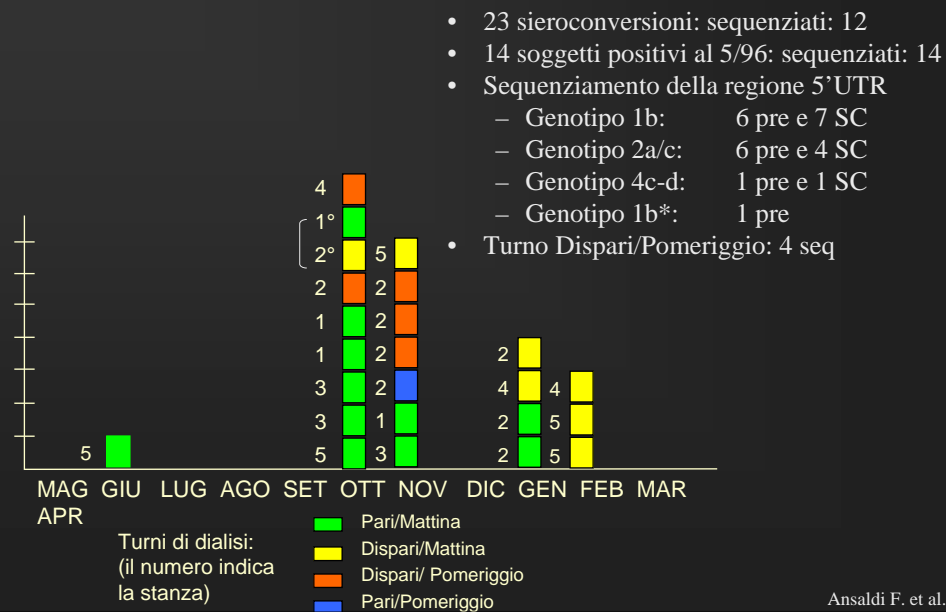
Prevalenza di *Borrelia b.*, *Rickettsia sp.* e TBE nel biennio 2005-06
(2006: dati preliminari)

	2005		2006	
	N°	% POS	N°	% POS
BORRELIA b.	397	24%	240	12.1%
RICKETTSIA sp.	397	6.5%	240	5.8%
TBE	397	0.25%	300	0.33%

“Epidemiologia molecolare”

- Ricerca delle origini
- Studio dell'ecologia dell'agente infettivo
- Studio delle vie di trasmissione e dell'interazione ospite/agente

CURVA EPIDEMICA RIFERITA A 23 CASI DI HCV VERIFICATISI IN PZ DIALIZZATI NEL PERIODO MAGGIO '96 - APRILE '97



CEPPI ISOLATI NEI PAZIENTI DEL TURNO DISPARI/POMERIGGIO

STANZA 1	STANZA 2	STANZA 3	STANZA 4	STANZA 5
2a/c 9 acces 1b Paz. 2	1b Paz. 15 1b Paz. 16 4cd, Paz. 17	2a/c 9 acces 2a/c 9 acces	1b Paz. 5 1b BE113 4cd, Paz. 7 1b Paz. 18	2a/c 9 access

(Note: In the original image, red arrows point from Stanza 2 to Stanza 3, and from Stanza 4 to Stanza 5. Green arrows point from Stanza 1 to Stanza 2, and from Stanza 4 to Stanza 5.)

LEGENDA: in grassetto e corsivo le varianti isolate nei pazienti sieroconvertiti nel corso dell'epidemia, in stile normale le varianti dei soggetti già anti-HCV positivi nel maggio '96

Ansaldo F. et al.

Conclusioni

- Le nuove tecniche molecolari forniscono un supporto straordinario allo studio dell'epidemiologia delle malattie infettive:
 - Investigazione epidemica
 - Sorveglianza epidemiologica
 - Valutazione del rischio infettivo ambientale
- Sono tecniche caratterizzate da elevata sensibilità e presentano rischi elevati di contaminazione
 - Devono essere effettuate in strutture controllate da personale esperto nella esecuzione delle stesse e nella interpretazione dei risultati



UCO Igiene e Medicina Preventiva
Università degli Studi di Trieste
Dir. Prof. Cesare Campello
Laboratorio di Virologia

- Dal Molin G.
- Comar M.
- Biagi C.
- Petronio F.
- Samar E.
- Rossi T.
- Santon D.
- Martinelli E.

