

# Ruolo del Laboratorio di Riferimento Nazionale nell'eliminazione del morbillo: sorveglianza e epidemiologia molecolare

Loredana Nicoletti e Fabio Magurano

*Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed  
Immunomediate*

ISS – Roma



- ▶ Fin dall'inizio, uno dei punti di forza del Piano Nazionale di Eliminazione del Morbillo e della Rosolia Congenita è stata l'istituzione di un Sistema di Sorveglianza Speciale per Morbillo che prevede che tutti i casi sospetti siano indagati con appropriate indagini di laboratorio.
- ▶ A tal fine venne individuato un Laboratorio di Riferimento Nazionale presso l'allora Laboratorio di Virologia, ora Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, dell'Istituto Superiore di Sanità.

- ▶ Dal 2002 in occasione delle epidemie e dal 2006 regolarmente, il Laboratorio Nazionale di Riferimento per il Morbillo e la Rosolia si occupa della raccolta dei campioni e dell'analisi nei casi di Morbillo e Rosolia (a cui si aggiunge, al di fuori del Piano nazionale, anche la Parotite).

# Metodi di conferma di laboratorio

- ▶ Sierologici: Dosaggio IgM specifiche nel sangue.
- ▶ Virologici: Isolamento virale dalle urine o dalla saliva
- ▶ Molecolari: Identificazione dell'RNA virale e successivo sequenziamento

# Kit per il campionamento

Cartoncino per  
sangue  
capillare

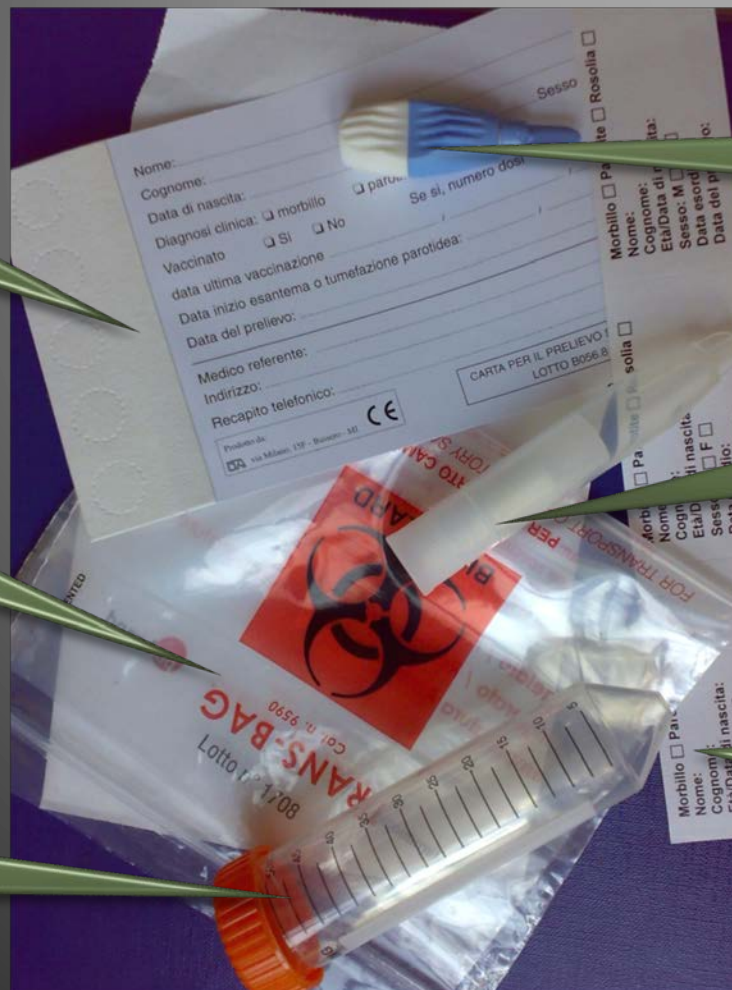
Biohazard bag

Provetta per  
urina

Lancetta

Tampone  
salivare

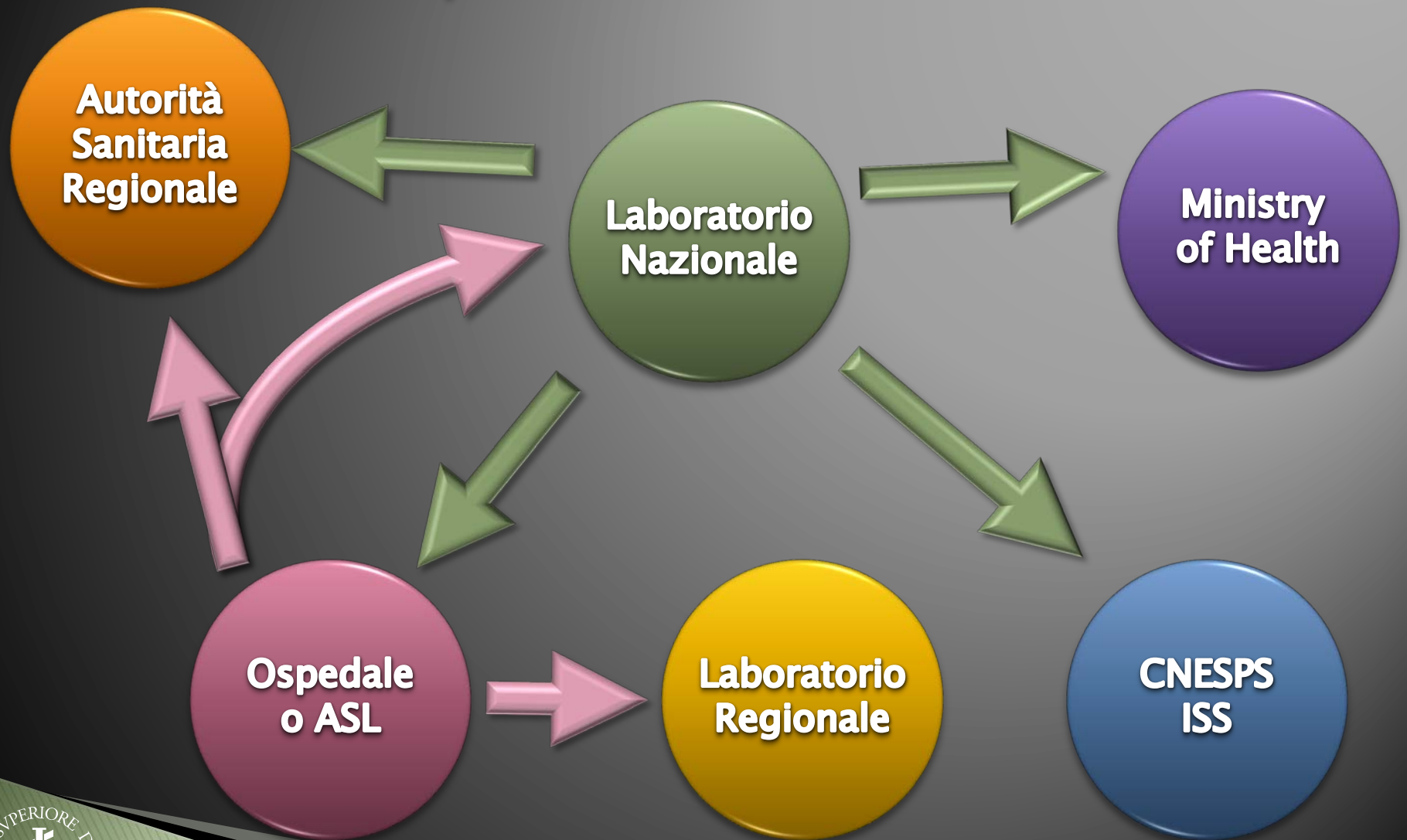
Etichette  
adesive



- ▶ Più di 5000 kit sono stati inviati alle ASL o alle Regioni.
- ▶ I campioni raccolti sono stati ritirati a cura del Laboratorio di Riferimento Nazionale.
- ▶ Tutti i campioni sono stati processati e i risultati inviati.



# Flow chart per Morbillo e Rosolia

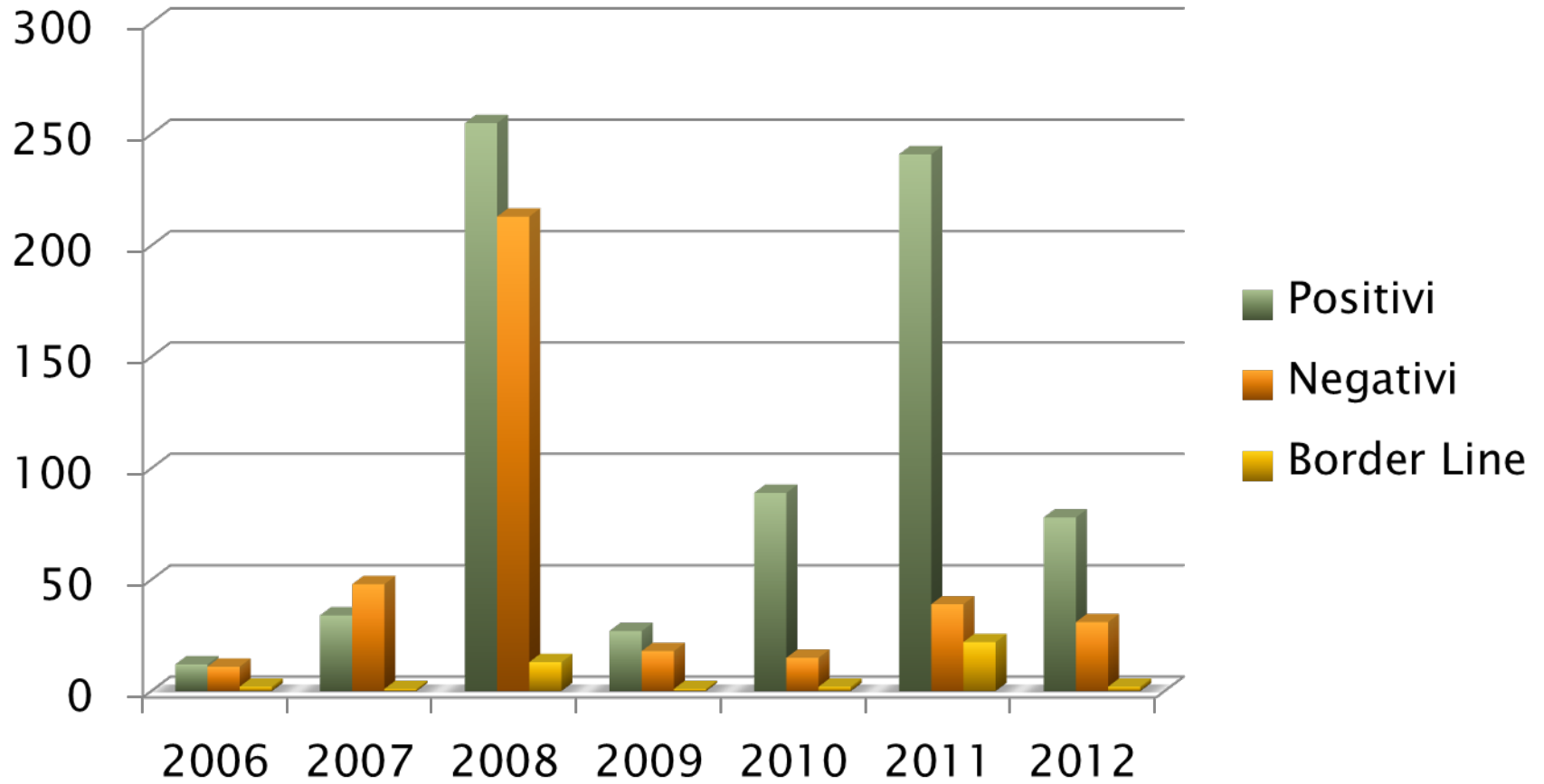


# Diagnosi sierologica

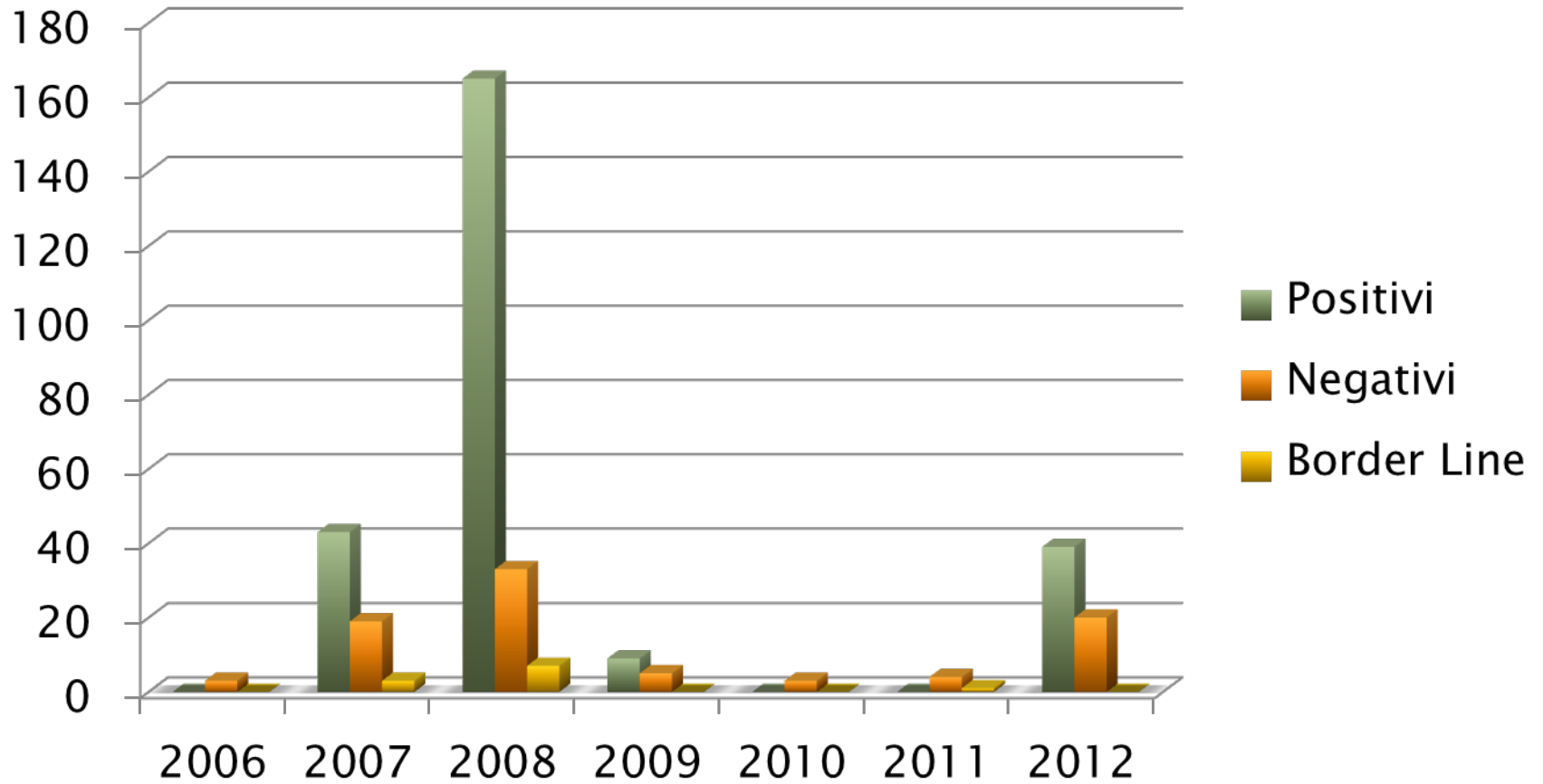
- ▶ Il saggio ELISA IgM è effettuato sul sangue capillare prelevato con la carta bibula.
- ▶ Il saggio non è effettuato sui campioni di saliva (i normali kit diagnostici non sono idonei per questo tipo di campione).
- ▶ Se disponibile (<1% dei casi) il saggio è eseguito sul siero.



# IgM Morbillo



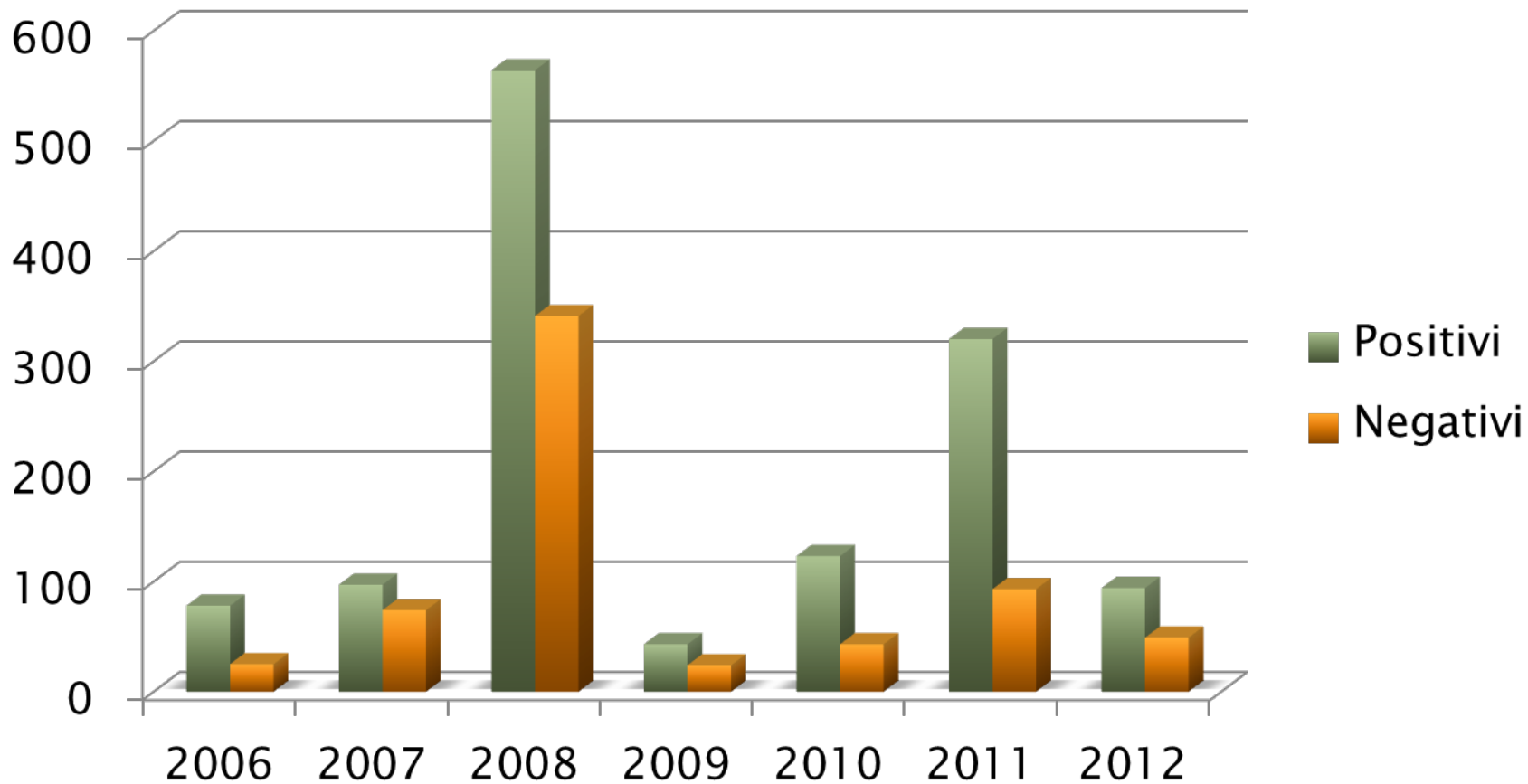
# IgM Rosolia



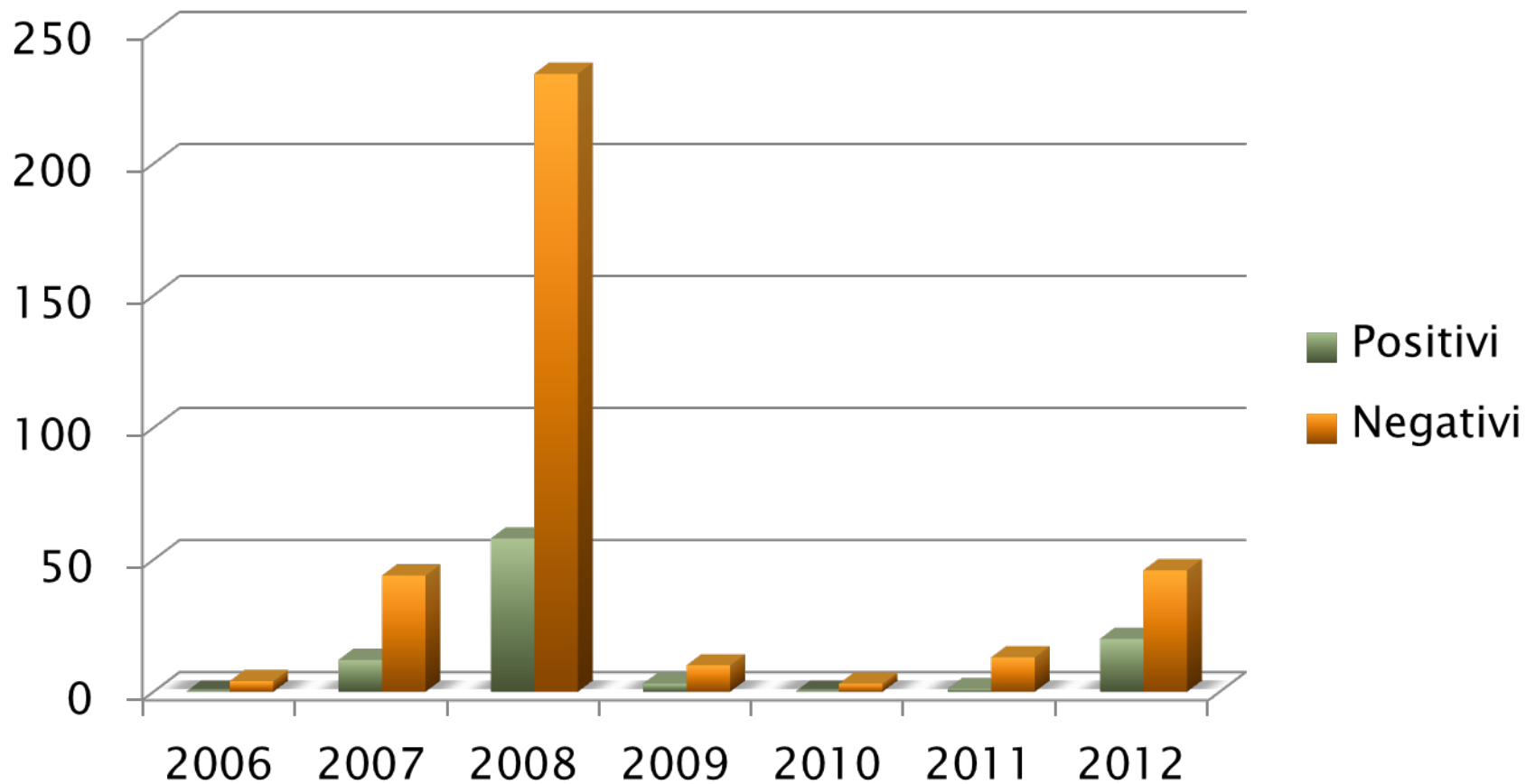
# Diagnosi molecolare

- ▶ Il saggio RT Nested-PCR per Morbillo e Rosolia è effettuato sull'RNA estratto da campioni di urina. La saliva è utilizzata come campione alternativo quando l'urina non è disponibile.
- ▶ L'isolamento virale non è utilizzato come metodo di routine.

# PCR Morbillo



# PCR Rosolia

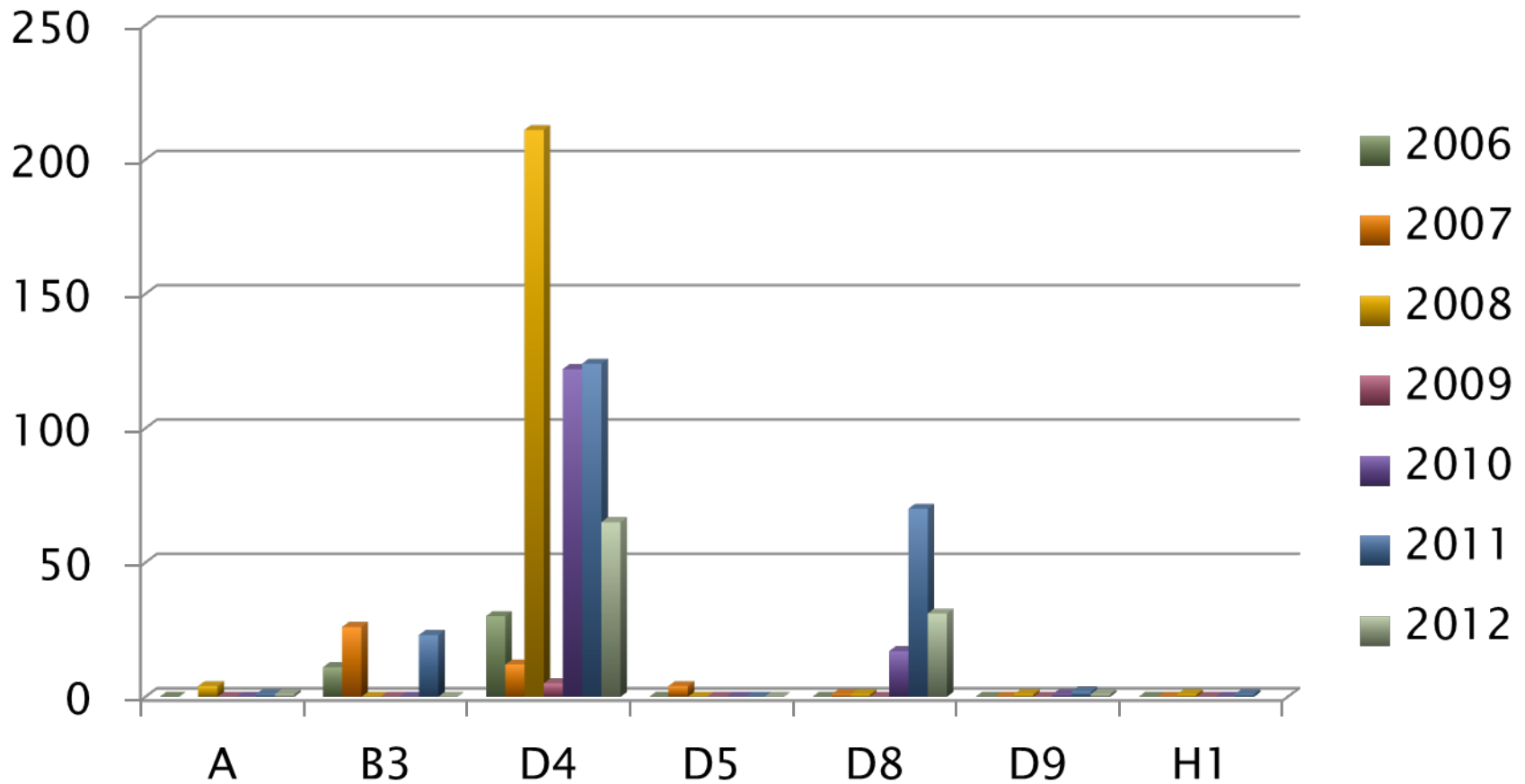


# Sequenziamento ed analisi

- ▶ Per il Morbillo l'analisi è effettuata su una regione ipervariabile (450 nt) del gene della nucleoproteina (N).
- ▶ Per la Rosolia l'analisi è effettuata su una regione (750 nt) del gene della glicoproteina dell'envelope (E1).



# Ceppi di Morbillo circolanti





# Ministero della Salute

DIPARTIMENTO DELLA SANITÀ PUBBLICA E INNOVAZIONE  
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE

**UFFICIO 05 ex DGPREV- Malattie Infettive e profilassi  
Internazionale**

*Risposta al Foglio del .....*

*.....*

Ministero della Salute

DGPRE

0004460-P-20/02/2013

I.4.c.a.9/2011/20



117771011

*Roma*..... 2013

Agli Assessorati alla Sanità  
delle Regioni a Statuto  
Ordinario e Speciale

Loro Sedi

Agli Assessorati alla Sanità  
delle Province Autonome  
di Trento e Bolzano

Loro Sedi

e p.c. All'Istituto Superiore di Sanità

Roma

All'Agenzia Italiana per il Farmaco

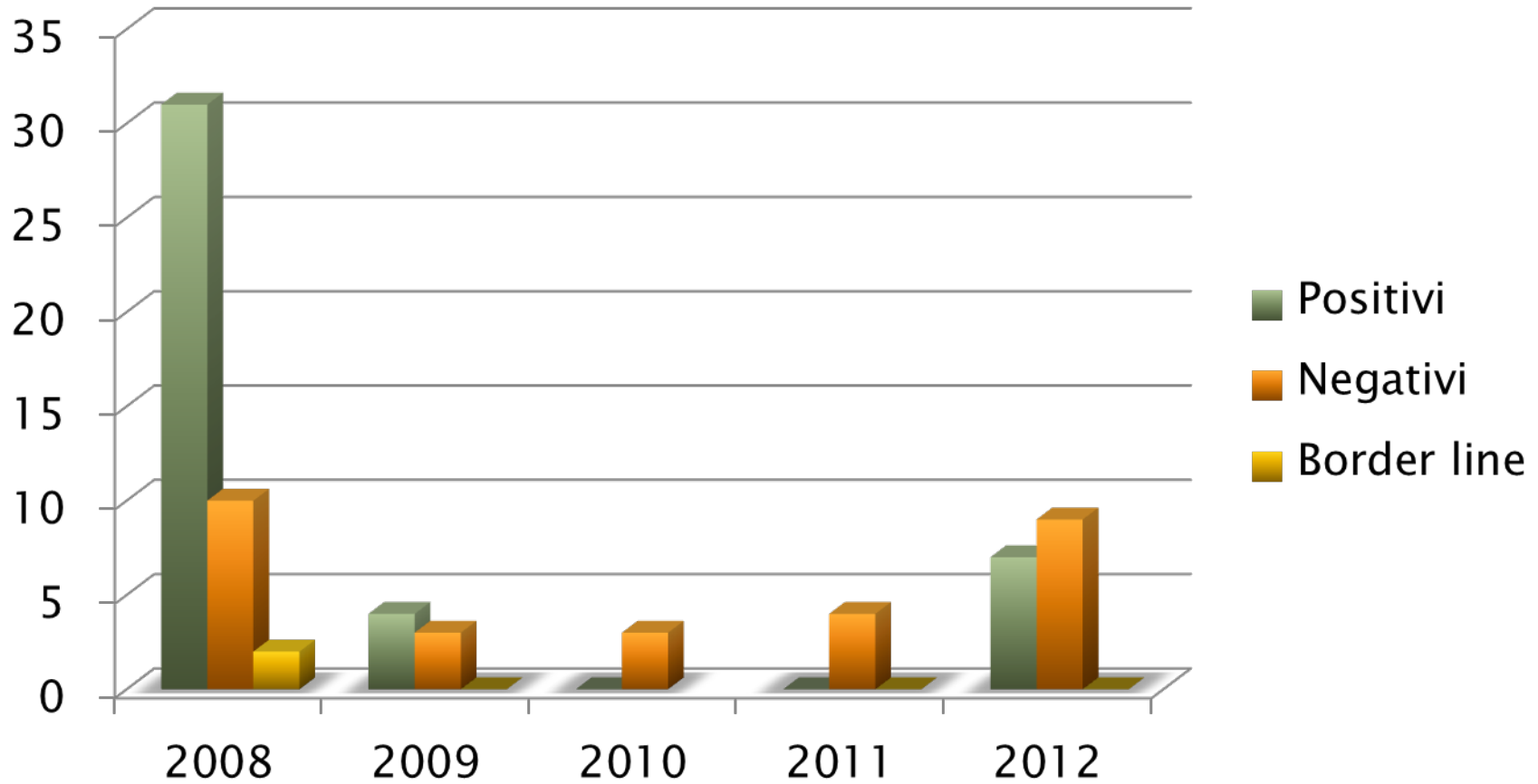
**OGGETTO** Istituzione di un sistema di sorveglianza integrato per il morbillo e la rosolia alla luce del nuovo Piano Nazionale di Eliminazione del morbillo e della rosolia congenita 2010-2015



- ▶ Per i soggetti con diagnosi clinica di Morbillo che risultino negativi alle indagini di laboratorio per tale virus, vengono eseguiti i saggi per la Rosolia.
- ▶ Per i soggetti con diagnosi clinica di Rosolia che risultino negativi alle indagini di laboratorio per tale virus, vengono eseguiti i saggi per il Morbillo.

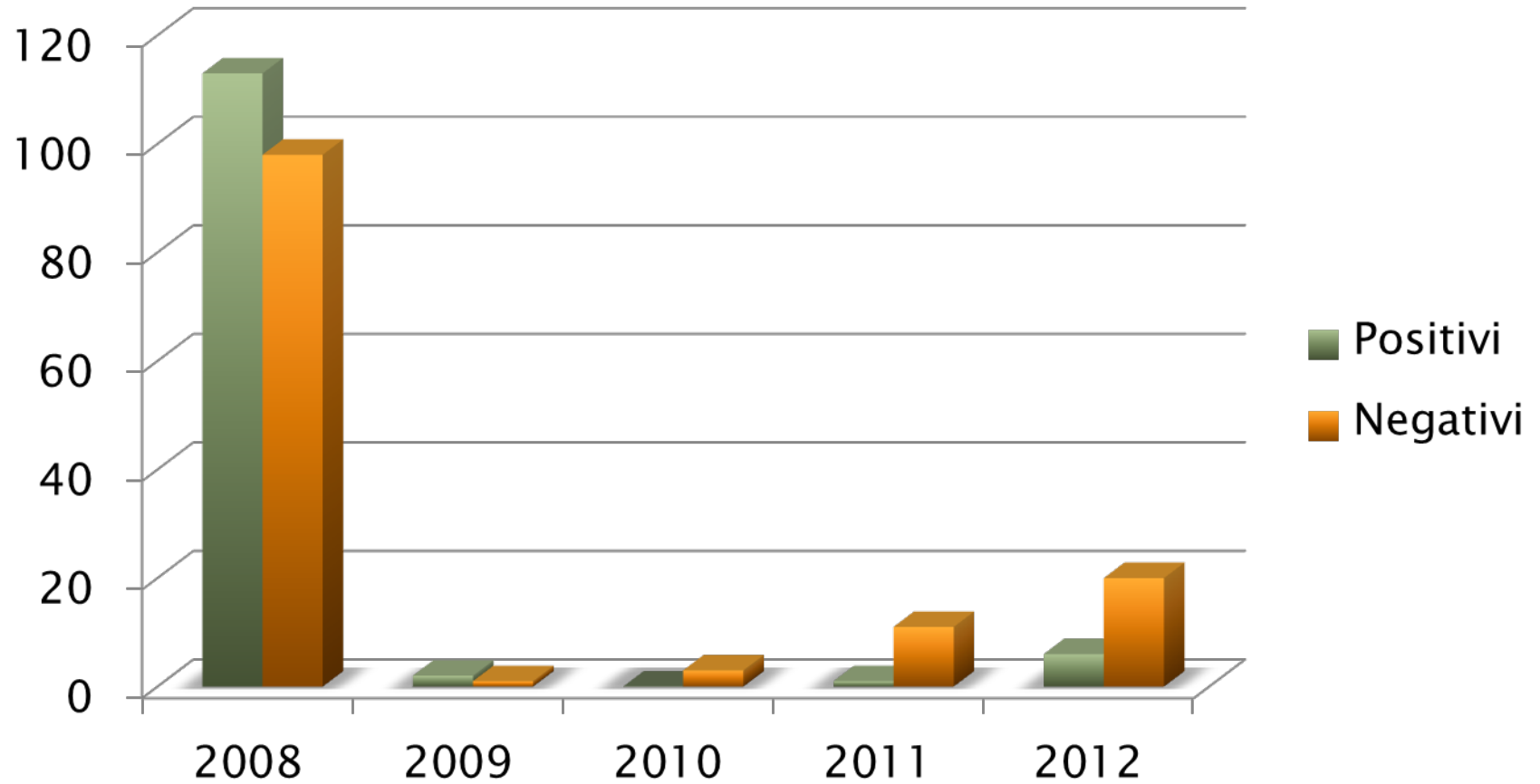
# Diagnosi clinica Morbillo

## ELISA Rosolia



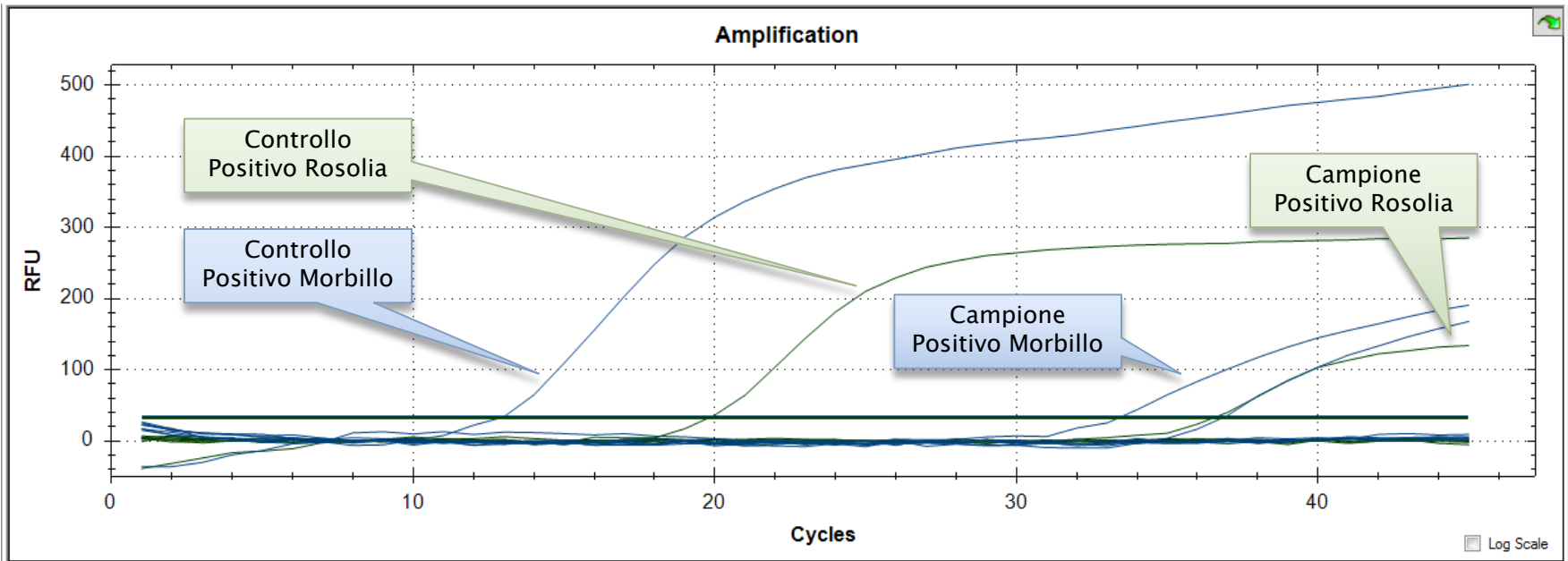
# Diagnosi clinica Morbillo

## PCR Rosolia



- ▶ Al fine di accelerare i tempi, è stata messa a punto un saggio Real time duplex, in grado di eseguire contemporaneamente l'analisi di un campione sia per il Morbillo che per la Rosolia.
- ▶ Il saggio è stato validato e dal 1 Gennaio 2013 viene utilizzato routinariamente al posto dei due saggi separati RT Nested PCR





FAM  HEX

Step Number: 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk											
B	Unk											
C	Unk											
D	Unk											
E	Unk											
F	Unk											
G	Pos											
H	Neg											

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A01	FAM		Unkn	mo2763	N/A
B01	FAM		Unkn	mo2771	N/A
C01	FAM		Unkn	mo2767	N/A
D01	FAM		Unkn	mo2770	33.44
E01	FAM		Unkn	mo2769	N/A
F01	FAM		Unkn	mo2768	36.87
G01	FAM		Pos Ctrl		12.97
H01	FAM		Neg Ctrl		N/A
A01	HEX		Unkn	mo2763	N/A
B01	HEX		Unkn	mo2771	N/A
C01	HEX		Unkn	mo2767	36.47
D01	HEX		Unkn	mo2770	N/A
E01	HEX		Unkn	mo2769	N/A
F01	HEX		Unkn	mo2768	N/A
G01	HEX		Pos Ctrl		19.74
H01	HEX		Neg Ctrl		N/A



# Validazione del saggio duplex Real time PCR

Diagnosi Morbillo			
	Real Time +	Real Time -	TOTALE
RT PCR +	26	1	28
RT PCR -	0	16	15
TOTALE	26	17	43

Diagnosi Rosolia			
	Real Time +	Real Time -	TOTALE
RT PCR +	3	0	3
RT PCR -	3	6	9
TOTALE	6	6	12

# Diagnosi clinica Morbillo Real Time PCR Rosolia

Diagnosi Morbillo PCR Rosolia			
	Real Time +	Real Time -	TOTALE
RT PCR +	1	0	1
RT PCR -	3	8	11
TOTALE	4	8	12

# Con la collaborazione di

- ▶ Fabio Magurano
- ▶ Claudia Fortuna
- ▶ Antonella Marchi
- ▶ Paola Bucci
- ▶ Eleonora Benedetti
- ▶ Melissa Baggieri