



Monitoraggio molecolare del virus dell'influenza pandemica A(H1N1)v 2009.

Responsabile: Prof. Alberta Azzi

Premessa

La prima segnalazione del virus pandemico A(H1N1)v 2009 nell'uomo sembra riconducibile ad un episodio epidemico di malattia respiratoria verificatosi in Messico, a La Gloria, Veracruz, nel febbraio 2009. L'episodio fu segnalato alla Pan American Health Organization solo il 12 Aprile. Il 15 e il 17 aprile vengono individuati dai CDC di Atlanta 2 casi di influenza da un nuovo virus del suino H1N1 verificatisi in California. I virus isoalti in California e quelli isolati in Messico risultano del tutto simili. L'infezione si estende rapidamente e già al 27 aprile l'OMS alza il livello di allerta dalla fase 3 alla fase 4 e subito dopo alla fase 5. La nuova influenza raggiunge rapidamente l'Europa, tramite casi di importazione dal Messico e dagli Stati Uniti. Inghilterra e Spagna sono tra i paesi inizialmente più colpiti, ma nessun paese europeo resta indenne. L'11 giugno l'OMS annuncia il passaggio alla fase 6: pandemia.

I ceppi di (H1N1)v 2009 isolati in quei primi mesi e nei mesi successivi mostrano una notevole stabilità, ovvero le loro sequenze nucleotidiche si mantengono abbastanza omogenee, probabile indice di una recente introduzione del virus nell'uomo. Il virus sembra caratterizzato da una bassa patogenicità, anche se destano preoccupazione gli effetti dell'infezione in gravidanza, e alcuni casi più gravi nei bambini e nei giovani, mentre relativamente protetti sembrano essere gli anziani. Il virus risulta sin dall'inizio geneticamente resistente all'amantadina ma sensibile agli inibitori della neuraminidasi. Solo rari casi di resistenza ad oseltamivir sono stati registrati, ma non hanno mostrato tendenza a diffondersi.

Tuttavia, conoscendo la grande variabilità tipica dei virus dell'influenza, si mantiene un continuo allarme relativo a possibili cambiamenti del virus che potrebbero avere importanti riflessi sulla sua patogenicità, ma anche sulla sensibilità ai farmaci antivirali e sull'efficacia del vaccino, a seconda delle sequenze interessate dalle eventuali mutazioni. Recentemente è stata segnalata una mutazione a livello del sito di legame al recettore nell'emoagglutinina la cui diffusione e il cui significato sono ancora da verificare.

Più il virus si mantiene in circolazione più aumenta il rischio che tali fenomeni si verifichino, anche se è possibile che il virus sia già sufficientemente adattato all'uomo e non abbia bisogno di ulteriori modifiche in tal senso.



Obiettivo dello studio è quello di studiare la comparsa di variazioni e il loro eventuale significato sia in isolati individuati nei mesi passati sia in quelli che verranno identificati nei prossimi mesi. Disponiamo infatti di oltre 500 isolati (individuati tramite RT-PCR real time) e di circa 30 ceppi virali isolati in colture cellulari, ottenuti da casi sia lievi che gravi. In particolare verranno analizzati geni H1 e N1, ma potranno essere presi in considerazione anche altri segmenti genici, quali i geni per le polimerasi e per la proteina NS1, il cui ruolo nella virulenza dei virus influenzali è spesso oggetto di attenzione.

Metodi

- 1) Ricerca del genoma virale nei campioni clinici tramite RT-PCR real time
- 2) Isolamento del virus in colture di cellule MDCK, in laboratorio BSL3
- 3) Analisi delle sequenze nucleotidiche complete di H ed N dai virus isolati in coltura
- 4) Analisi di sequenze nucleotidiche parziali di H ed N, amplificate direttamente dal campione clinico, per individuare la presenza di sostituzioni già note dalla letteratura (es: nella proteina N la mutazione H274Y associata a resistenza ad oseltamivir; nella proteina H mutazione D225G (o E) nel sito di legame al recettore). A tal fine sono già stati individuati i primers per amplificare sequenze di H o di N, di circa 200 nucleotidi, che includano la mutazione in oggetto. Verrà valutata la possibilità di analizzare le sequenze amplificate o tramite sequenziamento o tramite pyrosequencing o utilizzando l'analisi tramite High resolution melting (disponibile nello strumento Rotorgene 6000).
- 5) L'individuazione di particolari mutazioni in ceppi isolati in colture cellulari permetterà di valutarne direttamente alcuni effetti fenotipici (test di inibizione della replicazione virale in presenza di composti antivirali; test di inibizione dell'emoagglutinazione e di neutralizzazione da parte di sieri di soggetti vaccinati contro il virus pandemico; attività replicativa in varie linee cellulari)

Risultati attesi

L'analisi delle sequenze complete di H ed N, possibile solo sui ceppi isolati in coltura, consentirà di individuare mutazioni anche nuove eventualmente presenti nei nostri campioni, mentre l'analisi delle sequenze parziali amplificate dal campione clinico, consentirà di individuare la presenza di mutazioni già segnalate in letteratura e di verificarne la diffusione e l'importanza.