



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

Responsabile: Prof. Alberta Azzi

Resoconto dell'attività svolta

Obiettivo dello studio era quello di studiare la comparsa di variazioni e il loro eventuale significato in ceppi di virus influenzale pandemico di tipo A(H1N1) 2009. In particolare, l'obiettivo era quello di individuare mutazioni correlabili con un aumento della patogenicità virale e mutazioni correlabili allo sviluppo di resistenza agli inibitori della neuraminidasi virale, i farmaci oggi più utilizzati per la terapia dell'influenza.

A questo scopo abbiamo analizzato:

A) per la ricerca di mutazioni correlabili con la patogenicità

1. 25 isolati ottenuti da pazienti con manifestazioni gravi di influenza
2. 26 isolati ottenuti da pazienti con forme lievi di influenza

B) per la ricerca di mutazioni correlabili con la resistenza

1. 14 isolati ottenuti da pazienti sottoposti a trattamenti prolungati con l'antivirale Oseltamivir, o comunque da pazienti, soprattutto pediatrici, immunodepressi,
2. 8 isolati da pazienti ricoverati in terapia intensiva
3. 29 isolati da pazienti con forme lievi di influenza.

Sono state analizzate sequenze dell'emoagglutinina (EA) virale, H1, codificanti per il sito di legame al recettore, e sequenze della neuraminidasi comprendenti quelle codificanti per l'aminoacido in posizione 274 nella neuraminidasi N1; infatti la variazione H274Y risulta associata alla resistenza ad Oseltamivir.

Sono state sviluppate reazioni particolarmente sensibili per consentire il sequenziamento delle regioni di interesse direttamente dal campione clinico.

Per la ricerca della mutazione associata alla resistenza ad Oseltamivir è stato messo a punto un nuovo metodo, basato sul pyrosequencing, il cui principale vantaggio, rispetto al metodo di sequenziamento classico, consiste nella rapidità e nei costi più contenuti (se si analizza un elevato numero di campioni).

Risultati

Ricerca di mutazioni nell'EA.



È stata trovata una sostituzione nell'EA in posizione 222 (D222E) con una frequenza superiore al 50% nei pazienti con forme di influenza gravi, ma anche in casi lievi con frequenza inferiore, ma con una differenza non statisticamente significativa. Nella stessa posizione 222 la sostituzione D222G è segnalata in letteratura come associata ad un aumento della patogenicità del virus, probabilmente a causa di un suo più spiccato tropismo per le vie aeree inferiori. Dai nostri studi ancora in corso sembra che anche la mutazione D222E tenda a comparire più frequentemente nei campioni respiratori più profondi. Infatti, in alcuni pazienti con forme gravi di influenza nel tampone faringeo sono stati rilevati ceppi con acido aspartico (D) in posizione 222, mentre nel broncoaspirato prelevato in parallelo è presente il ceppo con acido glutammico (E) nella stessa posizione.

Ricerca di varianti virali resistenti ad Oseltamivir

Sia con il metodo classico di sequenziamento che con il pyrosequencing sono stati individuati 5 ceppi di virus H1N1 pandemico con la mutazione H274Y, associata alla resistenza. Quattro di questi provenivano da bambini sottoposti a chemioterapia anti-tumorale (4/14) e 1 da una paziente ricoverata in terapia intensiva. In due casi è stato possibile dimostrare che il ceppo isolato all'inizio del trattamento con oseltamivir era sensibile, mentre quello isolato dagli stessi due pazienti dopo 5 giorni di trattamento era resistente. Sembra dunque che anche il virus pandemico, in seguito a trattamento prolungato, tenda a sviluppare resistenza ad oseltamivir con elevata frequenza, restando, tuttavia, sensibile all'altro inibitore della neuraminidasi, Zanamivir.

Pubblicazioni

Parte del lavoro svolto è stato presentato a due congressi

- 1) Influenza 2010 – Oxford, 21-23 settembre 2010 (la pubblicazione degli atti è in corso)
- 2) Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia – Riccione – ottobre 2010

Parte del lavoro è stato oggetto di due pubblicazioni:

Puzelli S, Facchini M, De Marco MA, Palmieri A, Spagnolo D, Boros S, Corcioli F, Trotta D, Bagnarelli P, Azzi A, Cassone A, Rezza G, Pompa MG, Oleari F, Donatelli I; Influnet Surveillance Group for Pandemic A(H1N1) 2009 Influenza Virus in Italy. Molecular surveillance of pandemic influenza A(H1N1) viruses circulating in Italy from May 2009 to February 2010: association between haemagglutinin mutations and clinical outcome. **Eurosurveillance, Volume 15, Issue 43, 28 October 2010**

A.M. Iorio, B. Camilloni, E. Lepri, M. Neri, M. Basileo, A. Azzi. Induction of cross-reactive antibodies to 2009 pandemic H1N1 influenza virus (pH1N1) after seasonal vaccination (winters 2003/04 and 2007/08). **Procedia in Vaccinology** (in press)

Altri due lavori sono in preparazione