



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

Responsabile: Prof. Alberta Azzi

Resoconto dell'attività svolta

La continuazione dello studio iniziato nel 2009 aveva lo scopo di

- monitorare la diffusione della mutazione D222E anche nella stagione epidemica 2010-2011 e valutare il suo possibile contributo alla patogenicità del virus.
- monitorare la diffusione della resistenza agli antivirali anche nella stagione epidemica 2010-2011 e estendere la ricerca anche ad altre mutazioni correlabili al fenomeno.

A questo scopo, sono stati analizzati complessivamente, dal 15/11/2010 al 30/04/2011, 936 campioni respiratori per la ricerca di virus influenzali, raccolti da 829 pazienti. Di questi 204 erano stati inviati dai medici sentinella. I restanti provenivano da pazienti ricoverati in diversi Ospedali della Toscana e soprattutto presso l'AOU Careggi e l'AO Meyer.

Tutti i campioni pervenuti sono stati analizzati tramite RT-PCR real time, dopo estrazione dell'RNA. Tutti i campioni inviati dai medici sentinella e parte di quelli inviati dai reparti ospedalieri (a seconda del tipo di tampone impiegato per il prelievo) sono stati anche inoculati in colture di cellule MDCK per l'isolamento virale. Complessivamente, sono stati inoculati in MDCK 100 campioni pervenuti nell'arco di tempo della sorveglianza virologica. Da 36 di questi è stato isolato il virus influenzale di tipo A(H1N1) 2009 e da 3 è stato isolato un virus influenzale di tipo B. Tutti i campioni positivi per l'isolamento erano risultati positivi anche alla RT-PCR.

In totale, 182 pazienti sono risultati positivi alla PCR real time per il virus H1N1 2009, 11 per virus di tipo B, e 4 per virus di tipo A(H3N2).

Nella tabella 1 sono riassunti i risultati complessivi della ricerca delle mutazioni in posizione 222 dell'HA nella fase pandemica e nella stagione successiva.



Tabella 1. Frequenza delle diverse mutazioni in due stagioni epidemiche

Stagione influenzale	malattia (n° di casi)	campioni (n°)	Aminoacido in posizione 222			
			D (wild type)	E	G	Popolazione mista
2009-2010	Lieve (24)	TF (24)	16	8	0	0
	Grave (21)	TF (17)	6	7	0	4
		BAL (7)	1	4	0	2
2010-2011	Lieve (10)	TF (10)	9	1	0	0
	Grave (10)	TF (7)	5	0	2	0
		BAL(4)	1	0	2	1
Total	Lieve (34)	TF(34)	25	9	0	0
	Grave (31)	TF (24)	11	7	2	4
		BAL (11)	2	4	2	3

TF, tampone faringeo, BA, broncoaspirato

Durante la stagione epidemica 2010-2011, nel 60% (6/10) dei casi gravi in questo studio è stata dimostrata la presenza di ceppi di virus con la mutazione D222G, nel 30 % erano presenti ceppi virali senza questa mutazione (wild type) e nel 10 % era presente una popolazione virale mista senza mutazione e con mutazione D222N.

Nell'insieme dei due anni di studio la mutazione D222G è risultata presente nel 10% dei casi gravi, al momento del ricovero, nel 13 % era presente una popolazione mista contenente diverse varianti virali. Ceppi con la mutazione D222G hanno mostrato di raggiungere cariche più elevate nel tratto respiratorio inferiore, in accordo con il suo maggior tropismo polmonare.

Questa mutazione così come la presenza di popolazioni miste non è invece mai emersa nei ceppi coinvolti in casi lievi. La mutazione D222G sembra pertanto essere, in accordo con la letteratura, un marker di patogenicità del virus H1N1 2009, così come la presenza di popolazioni virali diverse nello stesso campione. E' tuttavia chiaro che la patogenicità è multifattoriale e vi concorrono altri fattori del virus e dell'ospite.



Ricerca di varianti virali resistenti ad Oseltamivir

E' stato messo a punto un metodo di screening molto rapido e a costi contenuti per la ricerca della mutazione H274Y, marker di resistenza ad oseltamivir (l'antivirale contro i virus dell'influenza oggi più utilizzato). Tale metodo si basa sull'amplificazione di una breve sequenza del gene della neuraminidasi virale comprendente il sito responsabile della mutazione, seguita dall'analisi del profilo di melting (HRM, high resolution melting). Questo sistema consente di individuare prontamente varianti resistenti o anche miste limitando la necessità di ricorrere al sequenziamento tramite pyrosequencing ai casi di incerta interpretazione.

L'analisi di un centinaio di ceppi con HRM, confermata dall'analisi tramite pyrosequencing, ha dimostrato la presenza di 10 ceppi resistenti (5 in casi pediatrici e 5 in pazienti adulti) solo tra pazienti ricoverati. Inoltre, è risultato che la mutazione associata alla resistenza emerge nel corso del trattamento ma è stato osservato anche che i ceppi resistenti possono essere trasmessi, essendo risultati già presenti prima dell'inizio del trattamento farmacologico, nelle primissime fasi dell'infezione.

Pubblicazioni

Parte del lavoro svolto è stato presentato a 3 congressi

- 1) Influenza 2011 – Oxford, 7-9 settembre 2011
- 2) Congresso della Società Italiana di Virologia – Orvieto – 12 settembre 2011
- 3) Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia – Riccione – ottobre 2011

Due lavori sono stati sottoposti per la pubblicazione al Journal: Influenza virus and other respiratory viruses. Un terzo lavoro è in preparazione.