

RASSEGNA

Il virus influenzale: una nuova pandemia dietro l'angolo?

Concetta Castilletti, Maria Rosaria Capobianchi

Laboratorio di Virologia, INMI "L. Spallanzani" IRCCS, Roma

Key words: Influenza virus, pandemic, antigenic shift, antiviral drugs

Influenza virus: a protean virus causing a new pandemic behind the corner?

SUMMARY

Differently from other viral diseases, like measles, smallpox and poliomyelitis, influenza is caused by a virus that undergoes continuous antigenic changes, and has several animal reservoirs.

Influenza virus is an enveloped virus, with a segmented negative RNA strand genome, belonging to the family *Orthomyxoviridae*. Influenza viruses are grouped in three different genotypes: A, B and C. Only genotype A viruses are able to cause relevant outbreaks, and are capable of infecting both humans and animal species.

Antigenicity of surface glycoproteins (hemagglutinin, HA, and neuraminidase, NA) stimulate a protective immune response. The emergence of small antigenic changes determined on HA and NA by point mutations (*antigenic drift*) is on the basis of the seasonal outbreaks, whose spread is allowed by the incomplete protection provided by immunity against the previous infecting viral strains. The reassortment of genome segments that may occur after mixed infection with different antigenic types is on the basis of the appearance of new antigenic combinations (*antigenic shift*), leading to the emergence of vaste outbreaks, possibly involving most of the human world population (pandemics).

Two classes of drugs are available against influenza: inhibitors of viral entry into the host cell and inhibitors of viral release (neuraminidase inhibitors). As a common phenomenon accompanying the usage of selective drugs, the emergence of resistant viral strains is a problem that is to be considered when planning the large use of antiviral drugs to restrict the spread of a possible pandemic.

The recent appearance of a paper describing the complete sequence of the virus causing the tremendous pandemic called "spanish flu" in 1918, and of a paper reporting the *in vitro* reconstruction of this virus through reverse genetic methods, raised some concern about the possibility that the new information could be used in an offensive way by bioterrorists. On the other hand, thanks to these scientific achievements, the first steps have been accomplished towards the elucidation of pathogenic mechanisms underlying the high pathogenicity of this virus, so rendering more realistic the possibility of preparing appropriate tools to cope with the next pandemic expected to be behind the corner.

INTRODUZIONE

A differenza di altre malattie, quali il morbillo, il vaiolo e la poliomielite, l'influenza è causata da virus che vanno incontro a continue modificazioni antigeniche, e per i quali esistono serbatoi animali.

Numerose epidemie di dimensioni mondiali (pandemie), emerse a seguito di cambiamenti genetici radicali del virus (*antigenic shift*), hanno in passato causato milioni di morti. Anche se è impossibile prevedere quando si verificherà la comparsa di un nuovo ceppo di virus influenzale con potenziale pandemico, è sicuro che tale evento si verificherà.

La recente emergenza di ceppi di virus influenzale di origine aviaria ad elevata patogenicità, la massiccia disseminazione a volatili domestici e selvatici che, dalle zone di origine in Sud Est asia-

tico, si sta trasferendo verso occidente, la ripetuta trasmissione ad esseri umani esposti ad allevamenti infetti e la elevata letalità dell'infezione che ne è derivata, hanno alimentato, nell'ambito sanitario e nella popolazione generale, una crescente preoccupazione per la possibilità che il temuto evento sia prossimo a verificarsi.

I recenti successi scientifici, che hanno consentito di ottenere la sequenza completa del virus che ha causato la spaventosa pandemia del 1918 e la sua ricostruzione *in vitro*, da una parte hanno suscitato timori che le nuove informazioni possano essere utilizzate a scopo offensivo per operazioni di terrorismo biologico, dall'altra hanno rinsaldato la fiducia nella scienza e la speranza che le nuove conoscenze possano chiarire i meccanismi alla base della elevata letalità del virus pandemico che ha causato la spaventosa epidemia

denominata “spagnola”, fornendo una opportunità senza precedenti per approntare una risposta adeguata per una futura emergenza pandemica (5). La presente rassegna è dedicata agli aspetti virologici, diagnostici e terapeutici dell’influenza umana.

IL VIRUS: CARATTERISTICHE GENERALI

I virus influenzali, appartenenti alla famiglia *Orthomyxoviridae*, (dal Greco *orthos*: corretto, e *myxa*: muco), all’osservazione ultramicroscopica appaiono in una forma rotondeggiante, dotata di grande eterogeneità e pleomorfismo, con un diametro di 80-120 nm (figura I) (8).

Sin dal primo isolamento di un virus influenzale dall’uomo, ottenuto nel 1933 ad opera dei ricercatori del National Institute for Medical Research di Londra, questi virus sono stati oggetto di enorme interesse scientifico. Il genoma virale è costituito da RNA a singola elica a polarità negativa, organizzato in 8 segmenti per i tipi A e B, e in 7 per il tipo C (vedi: Nomenclatura e tipi antigenici), complessato con la nucleoproteina, a formare un nucleocapside a simmetria elicoidale. Il nucleocapside è, a sua volta, avvolto da un involucro pericapsidico, il cui componente principale è un doppio strato lipidico in cui sono inseriti due tipi di proiezioni glicoproteiche radiali di diversa struttura ed attività biologica: emagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA), oltre alla proteina M2 (canale ionico). Al di sotto del pericapside vi è uno strato interno (matrice) contenente principalmente M1 (figura II).

Il ciclo replicativo degli ortomixovirus si può suddividere in fasi comuni ad altri virus: adsorbimento, penetrazione, trascrizione del genoma e traduzione delle proteine, assemblaggio e maturazione della progenie virale.

Durante la fase di adsorbimento, tramite le molecole di HA il virus si lega ai residui di acido sialico presenti nelle glicoproteine o nei glicolipidi esposti sulla membrana cellulare. I differenti virus influenzali, a seconda dei residui aminoacidici presenti nel sito di legame dell’HA, hanno una diversa specificità per il tipo di legame con cui l’acido sialico terminale è connesso al residuo preterminale di galattosio ($\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$). Nelle cellule della mucosa degli uccelli l’acido sialico è legato al galattosio prevalentemente con un legame $\alpha 2,3$, nella trachea del maiale il legame è di tipo sia $\alpha 2,3$ che $\alpha 2,6$, mentre nell’uomo il legame è prevalentemente di tipo $\alpha 2,6$ (2); pertanto, il tropismo per la specie umana o per gli uccelli è determinato dall’affinità di legame dell’HA per queste diverse strutture glucidiche terminali, le specie suine, invece, sono normalmente suscettibili sia a virus di tropismo aviario che a virus di

tropismo umano.

Una volta adsorbito, il virus entra, mediante fenomeni di endocitosi mediata dal recettore, nella cellula ospite, dove, nel citoplasma, avviene l’apertura del nucleocapside ed il rilascio del materiale genetico e dell’RNA-polimerasi-RNA-dipendente necessaria per la trascrizione dell’RNA genomico. La fase di trascrizione utilizza sia enzimi virali sia enzimi cellulari ed avviene nel nucleo della cellula. Il meccanismo di traduzione delle catene nascenti di RNA virale sfrutta le sequenze cap degli mRNA cellulari per essere trasportato nel citoplasma. Ogni gene dà origine ad un singolo trascritto, ma i trascritti di due geni (M ed NS) subiscono processi di splicing che portano alla formazione di mRNA codificanti proteine diverse (es: M1 e M2; NS1 ed NS2) (tabella 1). Avvenuta la produzione delle proteine

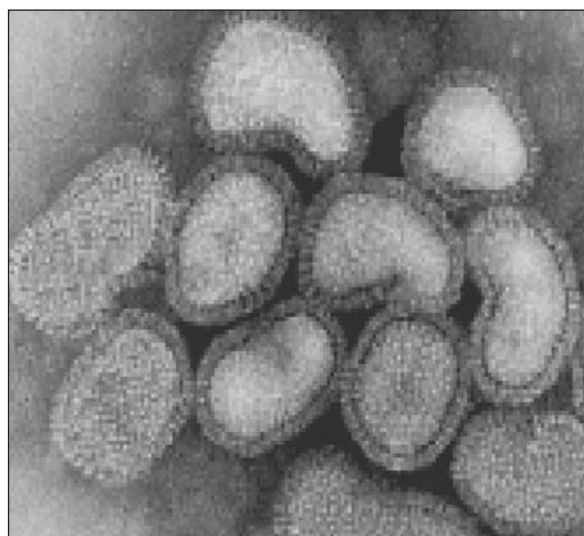


Figura I. Immagine al microscopio elettronico delle particelle di virus influenzale di tipo A (tratta dal manuale: *Avian influenza: assessing the pandemic threat*, WHO gennaio 2005)

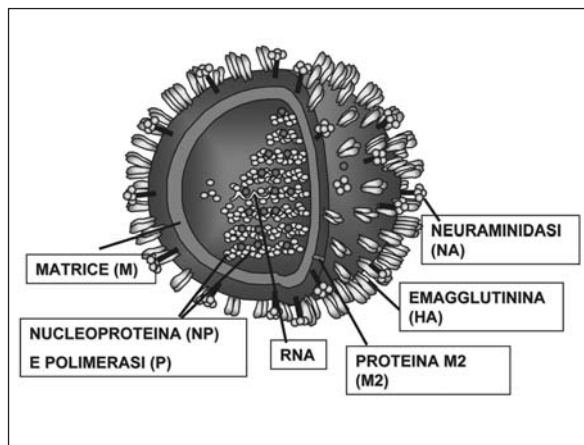


Figura II. Raffigurazione schematica di una particella di virus influenzale

virali, le copie del genoma virale a polarità positiva assumono una nuova funzione, fungendo da stampo per la sintesi dei corrispondenti segmenti di RNA genomico a polarità negativa, sempre ad opera della trascrittasi virale. I segmenti del genoma virale, replicati in migliaia di copie, sono quindi “impacchettati” nel nucleocapside. La maturazione completa del virione avviene a livello della membrana cellulare da cui è rilasciato per gemmazione.

NOMENCLATURA E TIPI ANTIGENICI

In base alla differente antigenicità della nucleoproteina e della matrice i virus influenzali sono suddivisi in tre diversi genotipi: A, B e C. I virus di tipo A sono associati ad epidemie e sono capaci di dare infezione sia nell’uomo che in altre specie animali. I virus di tipo B sono presenti solo nell’uomo e causano una forma di malattia più lieve del tipo A. Il tipo C infetta solo gli umani e generalmente dà un’infezione asintomatica o paucisintomatica. I virus influenzali di tipo A sono suddivisi in sottotipi e classificati in base alla specificità antige-

nica delle glicoproteine di superficie (HA ed NA), identificate con un numero. Attualmente si conoscono sedici differenti sottotipi di HA e nove differenti tipi di NA (tabella 2).

Il sistema corrente di nomenclatura dei virus influenzali prevede l’ospite di origine, la collocazione geografica del primo isolamento, il numero di ceppo, l’anno di isolamento e tra parentesi la descrizione antigenica dell’HA e della NA [es.: A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1)]; per convenzione l’ospite per la specie umana è omesso.

FENOMENI GENETICI

Uno degli aspetti più importanti e caratteristici dell’infezione da virus influenzale è quello relativo all’estrema variabilità antigenica del virus. Gli studi virologici ed epidemiologici condotti hanno indicato che l’elevata variabilità è legata alla mancanza di fedeltà dell’enzima replicativo, e costituisce una strategia per evadere le difese dell’ospite. È stato calcolato che la frequenza di mutazioni per HA del tipo H3 si aggira su 6.7×10^{-3} sostituzioni per sito per anno. Questo fenomeno dà luogo al cosiddetto antigenic drift (“deriva antigenica”), che designa la variabilità che si osserva a carico dei geni che codificano per l’HA e l’NA, e che si traduce in leggere alterazioni della struttura primaria delle proteine corrispondenti, con la conseguente possibile modificazione della struttura terziaria e dell’antigenicità.

Tale fenomeno è alla base dello sviluppo delle epidemie stagionali. Infatti, consente la circolazione di ceppi di virus influenzali lievemente diversificati, ed è caratterizzato dal fatto che i lievi cambiamenti rendono le difese immunitarie pre-esistenti nella popolazione non pienamente efficaci verso i nuovi ceppi formati.

Accanto al fenomeno di progressiva variazione antigenica a carico di uno o più geni superficiali, il virus influenzale è soggetto ad un altro fenomeno genetico, denominato antigenic shift (variazioni maggiori), responsabile di cambiamenti ben più radicali che sono alla base dell’insorgenza di ceppi con caratteristiche antigeniche a carico dell’HA e/o della NA molto diverse dai ceppi circolanti in un determinato periodo.

Questo fenomeno si origina quando nella stessa cellula si trovano due virus dello stesso tipo ma con costituzione genetica differente. La progenie può presentare combinazioni di segmenti genici diversi rispetto ai due virus parentali, generando virus che, in un “background” proveniente da un parentale, contengono HA e/o NA provenienti dall’altro parentale. Questo fenomeno di riassortimento può avvenire anche tra virus di tipo A con differente tropismo.

I virus influenzali di tipo A sono stati isolati in

Tabella 1. Segmenti di RNA del genoma del virus influenzale di tipo A e proteine codificate

Segmento	Proteina	Funzione
1	Polimerasi (PB2)	Riconoscimento della sequenza cap dell’RNA della cellula ospite, attività polimerasica
2	Polimerasi (PB1)	Endonucleasi, attività polimerasica
3	Polimerasi (PA)	Componente del complesso di trascrittasi dell’RNA e replicasi
4	Emagglutinina (HA)	Principale glicoproteina di superficie, legame al recettore cellulare, attivazione della proteolisi, principale determinante antigenico
5	Nucleoproteina (NP)	Formazione delle ribonucleoproteine (RNP), switch dalla sintesi di mRNA ad RNA template ed RNA virionico
6	Neuraminidasi (NA)	Glicoproteina di superficie, attività neuraminidasi, determinante antigenico
7	Matrice	M1 Principale proteina virionica, intragisce con le RNP e con NS2
		M2 Proteina di membrana, essenziale per il distacco dalla cellula
8	Non Strutturale NS1	Inibisce la formazione degli mRNA cellulari, sequestra le dsRNA riducendo la capacità di risposta da parte dell’interferon
		NS2 Interagisce con M1 ed favorisce il trasporto delle RNP dal nucleo al citoplasma

Tabella 2. Sottotipi di emagglutinina e neuraminidasi di virus influenzale di tipo A isolati dall'uomo, da altri mammiferi e dagli uccelli

Sottotipi	Specie di origine e ceppo prototipo			
	Uomo	Suino	Cavallo	Avispecie diverse
Emagglutinina				
H1	PR/8/34	Sw/la/15/30	-	Dk/Alb/35/76
H2	Sing/1/57	-	-	Dk/Ger/1215/73
H3	HK/1/68	Sw/Taiwan/70	Eq/Miami/1/63	Dk/Ukr/1/63
H4	-	-	-	Dk/Cz/56
H5	-	-	-	Tern/S.A./61
H6	-	-	-	Ty/Mass/3740/65
H7	-	-	Eq/Prague/1/56	FPV/Dutch/27
H8	-	-	-	Ty/Ont/6118/68
H9	-	-	-	Ty/Wis/1/66
H10	-	-	-	Ck/Ger/NI/49
H11	-	-	-	Dk/Eng/56
H12	-	-	-	Dk/Alb/60/76
H13	-	-	-	Gull/MD/704/77
H14	-	-	-	Dk/Gurjev/263/82
H15	-	-	-	Dk/Austral/341/83
H16	-	-	-	BHG/Sweden/2/99
Neuraminidasi				
N1	PR/8/34	Sw/la/15/30	-	Ck/Scot/59
N2	Sing/1/57	Sw/Taiwan/70	-	Ty/Mass/3740/65
N3	-	-	-	Tern/S.A./61
N4	-	-	-	Ty/Ont/6118/68
N5	-	-	-	Sh/Austral/1/72
N6	-	-	-	Dk/Cz/56
N7	-	-	Eq/Prague/1/56	FPV/Dutch/27
N8	-	-	Eq/Miami/1/63	Dk/Ukr/1/63
N9	-	-	-	Dk/Mem/546/74

diversi animali fra cui anatre, polli, maiali, balene, cavalli, e foche. Gli uccelli selvatici sono considerati serbatoi naturali di tutti i sottotipi di influenza A e si pensa che siano la sorgente dei virus influenzali di tutti gli altri animali.

I maiali sono facilmente suscettibili all'infezione sia dei ceppi di tropismo aviario che dei ceppi di tropismo umano, oltre che dei ceppi di tropismo suino.

Questo porta alla possibile coesistenza nello stesso animale di ceppi con tropismo differente che per fenomeni di antigenic shift possono riassortire causando la produzione di un nuovo virus con caratteristiche antigeniche e di fitness completamente diverse da quelle del virus umano ed aviario di partenza.

Il virus neoprodotto potrebbe essere capace di infettare l'uomo e di essere trasmesso da persona a persona, inoltre potrebbe avere caratteristiche antigeniche di HA ed NA del tutto diverse, verso le quali la popolazione non possiede difese immunitarie. Questi virus sono fonte di nuove pandemie più o meno gravi (figura III).

I recenti episodi di trasmissione all'uomo di virus influenzale aviario ad alta patogenicità hanno ridestato l'interesse, dei ricercatori per i virus influenzali legato alla possibile minaccia di una nuova pandemia.

Recentemente sono stati pubblicati, quasi contemporaneamente, due lavori in cui, grazie a tecniche innovative, un team di ricercatori è riuscito a "resuscitare" il virus che ha causato la più grande e mortale pandemia del secolo scorso, la pandemia del 1918-1919, denominata "spagnola", permettendo lo studio molto accurato delle proprietà associate con la sua straordinaria virulenza.

In particolare, utilizzando frammenti del genoma virale estratto dal tessuto polmonare di cadaveri sepolti nel permafrost in Alaska e da materiale autoptico fissato ed archiviato è stato possibile sia effettuare una caratterizzazione molecolare ed un'analisi filogenetica di questo virus, sia generare virus ricombinanti contenenti uno o più geni completi del virus della pandemia del 1918, sino ad ottenere un virus influenzale esprimente tutti gli otto segmenti di geni attraverso la combinazione di analisi di sequenza e tecniche di ingegneria genetica (reverse genetics).

Dagli studi di sequenza e dall'analisi filogenetica del genoma completo del virus è stato dimostrato che il virus del 1918 non è stato generato da fenomeni di riassortimento, come è invece avvenuto per le altre due pandemie mondiali del 1957 e

del 1968. Infatti, la sequenza aminoacidica della polimerasi del virus della pandemia del 1918 si differenzia dalla sequenza della polimerasi del virus aviario corrispondente solo per dieci residui aminoacidici.

Verosimilmente un virus interamente aviario è passato all'uomo e si è adattato al nuovo ospite senza eventi di ricombinazione con virus già circolanti nella popolazione umana e senza passaggio in altri ospiti animali (figura IV).

Il fatto che alcune delle differenze osservate nel virus del 1918 sono presenti anche nei ceppi di virus aviario ad alta patogenicità H5N1 e H7N7 che hanno causato casi di malattia spesso fatali nell'uomo, ha suggerito, destando molto interesse nella comunità scientifica, che questi cambiamenti possono facilitare la replicazione del virus nelle cellule umane aumentandone la patogenicità (6). In netto contrasto con i contemporanei virus umani H1N1, il virus del 1918 ha la capacità di replicarsi in assenza di tripsina, causa morte nel topo e nelle uova embrionali di pollo, e mostra un elevato tropismo per le cellule dell'epitelio bronchiale umano.

Il taglio proteolitico dell'HA è un prerequisito per una replicazione multiciclica e la capacità per un virus influenzale di replicarsi in assenza di tripsi-

na è una caratteristica rilevante nel determinare il grado di patogenicità nei mammiferi. Tuttavia, dal momento che la sequenza genica dell'HA del virus del 1918 non presenta le stesse caratteristiche genetiche associate con l'alta patogenicità dei ceppi aviari H5N1 e H7N7, è stata ipotizzata la presenza di un meccanismo nuovo ed ancora sconosciuto di taglio proteolitico dell'HA (7). Inoltre, mediante tecniche di emoadsorbimento ed emoagglutinazione, alcuni ricercatori hanno dimostrato che il virus del 1918 lega preferenzialmente l'acido sialico legato con legame $\alpha 2,6$ al precedente residuo di galattosio (recettore umano), un ceppo di quel sottotipo (A/NY/1/18) lega sia l'acido sialico umano che l'aviario (legato con legame $\alpha 2,3$). Gli studi di comparazione della sequenza aminoacidica dell'HA degli isolati umani con la sequenza *consensus* dell'HA aviaria corrispondente hanno dimostrato che la sostituzione di un singolo aminoacido è sufficiente per il cambio di tropismo da aviario ad umano del virus. L'elevata patogenicità del virus del 1918, la mancanza nella popolazione mondiale di difese

immunitarie specifiche, il suo possibile uso come arma biologica ha suscitato non poche polemiche sull'utilità di condurre esperimenti con tale virus. In accordo con le linee guida del National Institute of Health e del Centers for Disease Control and Prevention gli studi sono stati condotti in laboratori di biosicurezza di livello 3 avanzato ed in accordo con il National Science Advisory Board for Biosecurity le ricerche sono state pubblicate per permettere alla comunità scientifica internazionale di ampliare le conoscenze sull'argomento. Gli studi condotti in tale direzione possono dare concrete indicazioni sull'identificazione di nuove molecole target per lo sviluppo di nuove terapie e vaccini per il trattamento e la prevenzione di nuove pandemie influenzali.

DIAGNOSI

La diagnosi precoce dell'influenza riduce l'uso eccessivo ed inappropriato degli antibiotici e dà la possibilità, se necessario, di trattare il paziente con una terapia antivirale mirata. Inoltre, si sente sempre più la necessità di porre rapidamente diagnosi, soprattutto negli episodi di emergenze epidemiche, come ci ha insegnato la passata esperienza della SARS, ed in relazione alla minaccia di emergenza di future epidemie (es. influenza pandemica).

La diagnosi eziologica delle infezioni respiratorie di origine virale è un campo complesso e per lo più poco esplorato anche dai laboratori di microbiologia di livello più elevato. A ciò concorrono la concomitanza di più fattori:

- a) al di fuori degli episodi epidemici più conclamati, la diagnosi eziologica su base clinica è resa difficile dalla non specificità della sintomatologia (febbre, dolori muscolari, emicrania, stanchezza, tosse secca, mal di gola e spesso raffreddore);
- b) le infezioni respiratorie di origine virale sono per lo più di breve durata ed autolimitanti; queste caratteristiche non invogliano i clinici a richiedere una diagnosi eziologica;
- c) i virus che causano infezioni respiratorie acute sono numerosi e scarsamente correlati tra di loro.

Inoltre è importante sottolineare che l'approccio diagnostico al paziente è ben diverso dall'approccio di sorveglianza, in quanto la sintomatologia delle affezioni respiratorie, come già detto, non presenta caratteristiche distintive a seconda all'eziologia.

Pertanto, la diagnosi va impostata come diagnosi differenziale, considerando un'ampia lista di microrganismi, tra cui batteri (*Clamidia*, *Coxiella burnetii*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* spp, *Haemophilus influenzae*) e virus, oltre ai virus

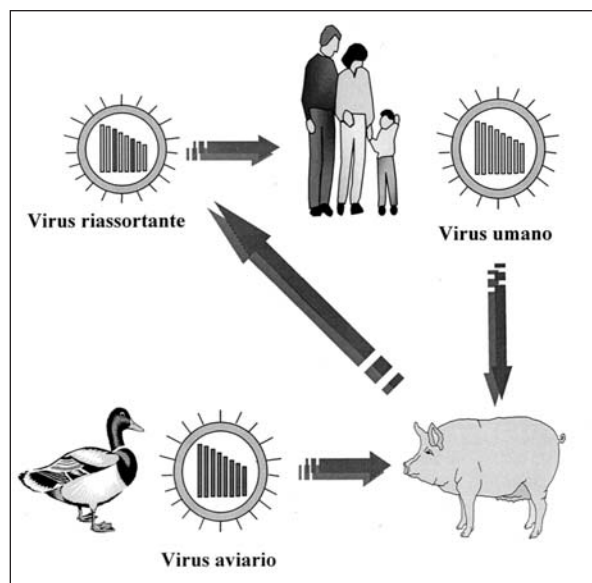


Figura III. Antigenic shift, riassortimento di segmenti genici tra due virus provenienti da specie diverse, in una specie suscettibile ad entrambi.

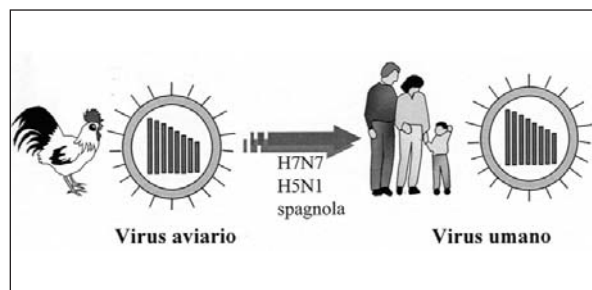


Figura IV. Passaggio diretto di virus aviari all'uomo senza eventi di ricombinazione con virus circolanti nella popolazione umana.

influenzali di tipo A e B (incluso i ceppi ad alta patogenicità, come H5N1), bisogna tenere in considerazione i virus parainfluenzali (di gruppo 1, 2 e 3), il virus Respiratorio Sinciziale, il Metapneumovirus, gli Adenovirus, Cocksackievirus ed ECHO virus, Rhinovirus, e coronavirus umani (inclusi NL63, OC43, 229E e SARS-CoV).

I campioni appropriati per la diagnosi di influenza sono: il tampone nasofaringeo o faringeo, aspirato nasale in base al tipo di test utilizzato (tabella 3). I campioni dovrebbero essere raccolti entro i primi quattro giorni di malattia.

Inoltre bisognerebbe raccogliere due campioni di siero, uno durante la fase acuta ed un altro durante la fase di convalescenza (2-4 settimane dopo la fase acuta).

I metodi virologici disponibili per la diagnosi comprendono la dimostrazione diretta del virus o la evidenziazione della risposta anticorpale.

I metodi per la ricerca del virus sono di tipo molecolare:

- RT-PCR specifica o real-time PCR
- Caratterizzazione molecolare mediante sequenziamento genico dei prodotti di amplificazione ottenuti nella prima fase della ricerca diretta

biologici:

- Isolamento virale su uova embrionate di pollo o e su colture cellulari idonee, quali ad esempio le MDCK, in presenza di tripsina. La tipizzazione del virus isolato viene eseguita mediante inibizione dell'emoagglutinazione, immunofluorescenza utilizzando anticorpi monoclonali specifici, o sequenziamento virale o analisi dei frammenti prodotti da enzimi di restrizione (RFLP).

Esistono anche metodi in grado di dare risposte più rapide, basati sulla ricerca diretta degli antigeni virali nelle secrezioni respiratorie con immunofluorescenza o con flocculazione. Quest'ultima categoria di test vengono usualmente identificati come test rapidi, e possono essere eseguiti direttamente al letto del malato, senza bisogno di strumentazione.

La ricerca di anticorpi specifici viene eseguita mediante tecniche di: fissazione del complemento, immunofluorescenza indiretta, inibizione dell'emagglutinazione e neutralizzazione dell'infettività. I test sierologici vanno in genere eseguiti su coppie di sieri intervallati, e pertanto i risultati sono interpretabili solo in tempi relativamente lunghi, e sono difficilmente utilizzabili per la gestione clinica dei pazienti.

FARMACI ANTI-INFLUENZALI

Per il trattamento delle infezioni da virus influenzale di tipo A sono attualmente disponibili due

classi di farmaci antivirali specifici: gli inibitori della proteina virale M2 (amantadina e rimantadina) e gli inibitori della neuraminidasi virale (zanamivir e oseltamivir).

L'amantadina è un'ammina tricyclica simmetrica che a basse dosi inibisce specificatamente le prime fasi del ciclo replicativo del virus influenzale di tipo A. In particolare, essa, si ritrova ad alte concentrazioni nei lisosomi cellulari, ha come proteina target la M2 ed ostacola la rimozione dell'involucro virale ed il rilascio dell'acido nucleico virale nel citoplasma.

Il meccanismo di azione della rimantadina è sostanzialmente simile a quello dell'amantadina anche se ha una farmacocinetica sostanzialmente diversa. Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia dell'amantadina e della rimantadina nella profilassi dell'infezione.

Entrambi i farmaci prevengono la malattia nel 70-90% dei casi ma permettono infezioni subcliniche che stimolano lo sviluppo di una forma di immunità naturale. Sfortunatamente sono stati isolati da pazienti virus influenzali (anche di tipo B) che hanno sviluppato una resistenza ad entrambi i farmaci.

Inoltre in uno studio sulla resistenza all'amantadina condotto su 134 ceppi di virus aviario rappresentativi dei sottotipi H5, H6, H7, ed H9, è stato dimostrato che nei ceppi isolati nel periodo 1979-1983 non è stato trovato neanche un ceppo resistente mentre nei virus isolati nel Sud Est Asiatico tra il 2000 ed il 2004 è stata trovata una media del 19% di ceppi resistenti ed in particolare il sottotipo H5 è stato quello che ha presentato la percentuale più alta di isolati resistenti all'amantadina (3).

Tabella 3. Metodi diagnostici disponibili per l'influenza

PROCEDURA	TIPO DI VIRUS	CAMPIONI IDONEI	TEMPI DI RISPOSTA
Coltura virale	A e B	Tampone naso faringeo, lavaggio nasale, sputo	5-10 giorni ¹
Ricerca diretta dell'antigene	A e B	Tampone naso faringeo, lavaggio nasale, sputo	2-4 ore
RT-PCR	A e B	Tampone naso faringeo, lavaggio nasale, sputo	1-2 giorni
Test diretti rapidi	A e B ²	Tampone naso faringeo, lavaggio o aspirato nasale	<30 minuti
Sierologia	A e B	Due campioni di siero, uno della fase acuta ed uno dopo 2-4 settimane	>2 settimane

¹Se disponibile il test di isolamento rapido (shell vial) il tempo di risposta si riduce a 2-3 giorni

²Solo alcuni test in commercio distinguono tra virus influenzale di tipo A e di tipo B

- dal momento che gli siRNA sono disegnati su regioni molto conservate del genoma del virus influenzale, è possibile utilizzarli per la prevenzione ed il trattamento dell'influenza causata sia da ceppi di origine umana che aviaria

Una rappresentazione schematica dei meccanismi d'azione dei farmaci anti-influenzali è raffigurata in figura V.

BIBLIOGRAFIA

1. Ge Q, Eisen HN, Chen J. Use of siRNAs to prevent and treat influenza virus infection. *Virus Res* 2004; 102: 37-42.
2. Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 11181-6.
3. Ilyushina NA, Govorkova EA, Webster RG. Detection of amantadine-resistant variants among avian influenza viruses isolated in North America and Asia. *Virology* 2005; 341: 102-6.
4. Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 2004; 364: 759-65.
5. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the Mother of All Pandemics. *Emerging Infectious Diseases* 2006;12: 15-22.
6. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*. 2005; 437: 889-93.
7. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, et al. Characterization of the Reconstructed 1918 Spanish Influenza Pandemic Virus. *Science* 2005; 310: 77-80.
8. Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses, in: D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 4th ed, 2001, vol. 1, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
9. Yen HL, Monto AS, Webster RG, Govorkova EA. Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice. *J Infect Dis* 2005; 192: 665-72.

Links per le linee guida dell'OMS per la diagnosi dell'influenza

1. *WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance*. Geneva, WorldHealth Organization (document WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5), available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrnscs20025rev.pdf>
2. *Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans*, available at: http://www.who.int/entity/csr/disease/avian_influenza/guidelines/avian_labtests2.pdf

Maria Rosaria Capobianchi

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) "L. Spallanzani", IRCCS
Via Portuense 292 - 00149 Roma
Tel. 06 55170434; Fax 06 5582346
e-mail: capobianchi@inmi.it