

INFEZIONI VIRALI EMERGENTI E RIEMERGENTI TRA PASSATO, PRESENTE E FUTURO: CONOSCERE PER INTERVENIRE

Massimiliano Galdiero*, Marilena Galdiero*

* Università della Campania “L. Vanvitelli” – Dipartimento di Medicina Sperimentale – Sezione di Microbiologia e Microbiologia clinica

L'ULTIMA PANDEMIA

COVID-19 è una malattia emergente da betacoronavirus che è venuta alla luce per la prima volta a Wuhan, nella provincia di Hubei in Cina, all'inizio del dicembre 2019, ma in un lampo ha raggiunto un'entità pandemica. Al 25 ottobre 2020 si registra un impressionante numero globale di 42.512.186 casi di COVID-19, inclusi 1.147.301 decessi [1]. La pandemia, causata dal virus della sindrome respiratoria acuta severa (SARS-CoV-2), rappresenta una grave minaccia per la sanità pubblica poiché l'infezione comporta un ampio spettro di manifestazioni cliniche che possono variare da uno stato iniziale asintomatico che può progredire in polmonite fino alla sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS, dall'inglese Acute Respiratory Distress Syndrome) seguita da sindrome da disfunzione multiorgano (MODS, dall'inglese Multiple Organ Dysfunction Syndrome) e finanche morte [2].

Per comprendere le manifestazioni cliniche della malattia è necessario analizzare brevemente i meccanismi patogenetici del virus. Il sito di penetrazione del virus nell'organismo è principalmente attraverso le mucose nasali e laringofaringee, da dove raggiunge gli organi dell'apparato respiratorio inducendo i sintomi tipici delle fasi iniziali dell'infezione che comprendono febbre e tosse. Dopo una replicazione virale nel sito d'ingresso i virus infettano le cellule immunitarie residenti, infiltranti e circolanti. Le cellule immunitarie circolanti trasportano il virus ad altri organi portando a un'infezione di tutti quegli organi che esprimono concentrazioni adeguate del principale recettore cellulare del virus (cioè, l'enzima 2 di conversione dell'angiotensina – ACE2) [3]. La dinamica replicativa del virus si è rivelata molto elevata nelle prime fasi dell'infezione, infatti la carica virale nei campioni di tampone faringeo ed espettorato del paziente raggiunge il picco dopo 5-6 giorni dall'insorgenza dei sintomi, passando da circa 10^4 a 10^7 copie per ml, a differenza di quanto osservato nel 2003 in pazienti affetti da SARS-CoV in cui il picco viremico si raggiungeva dopo 10 giorni dall'insorgenza dei sintomi. Nei pazienti COVID-19 la carica virale diminuisce durante la fase di convalescenza, ma rimane elevata nei pazienti con esiti fatali, quindi la persistenza di elevate cariche virali nelle fasi iniziali è cruciale per l'esito della patologia [4]. Tuttavia, come ogni malattia virale, la fase di guarigione da COVID-19 è sicuramente associata a una “clearance” virale. Il virus SARS-CoV-2 penetra nelle cellule suscettibili attraverso la fusione della membrana (envelope) del virus con la membrana della cellula ospite. Questo meccanismo è diretto dalla proteina

spike (S) che deve essere scissa in due subunità S1/S2 dalle proteasi dell'ospite per rilasciare il peptide di fusione (una specifica sequenza aminoacidica caratterizzata da elevata idrofobicità) necessario per aprire una breccia nella membrana cellulare per consentire l'ingresso nella cellula eucariotica del capsido virale che contiene il genoma del virus. Le proteasi dell'ospite necessarie per la scissione della proteina S variano tra i diversi coronavirus portando a diverse caratteristiche epidemiologiche e patologiche (in particolare la gamma dell'ospite, il tropismo tissutale, le vie di trasmissione e la mortalità) di ciascun virus (ricordiamo che attualmente sono noti ben sette diversi coronavirus in grado di infettare l'uomo, compreso il nuovo virus pandemico). Una delle proteasi cellulari coinvolta nell'ingresso del virus SARS-CoV-2 nelle cellule ospiti è la serina proteasi transmembrana 2 (TMPRSS2). Inoltre, la glicoproteina di superficie S del virus SARS-CoV-2 possiede un particolare sito polibasico (simile al sito di scissione dell'emoagglutinina (HA) del virus dell'influenza, un segno distintivo dei ceppi influenzali ad alta patogenicità) che la rendono suscettibile alla scissione da parte della furina, una proteasi ubiquitaria espressa in una varietà di organi e tessuti, tra cui cervello, polmoni, tratto gastrointestinale, fegato, pancreas e tessuti riproduttivi. L'adesione del virus alla superficie cellulare è, come detto, determinata dalla presenza del recettore cellulare ACE2. Zou et al. [5], hanno analizzato mediante sequenziamento massivo dell'RNA di singole cellule (single-cell RNA-seq) l'espressione di tale recettore rivelando che polmoni, cuore, esofago, reni, vescica e ileo sono tutti organi vulnerabili all'infezione virale da SARS-CoV-2, che è, quindi, in grado di indurre infezioni sistemiche così come i ceppi ad alta patogenicità dei virus influenzali. Inoltre, SARS-CoV-2 può generare elevate cariche virali nelle fasi iniziali dell'infezione con l'esito di un potente effetto citopatico con lisi delle cellule epiteliali e endoteliali infette, innescando il rilascio di alti livelli di citochine e chemochine proinfiammatorie.

In effetti, un segno distintivo del coronavirus ad alta patogenicità, inclusi SARS-CoV e Mers-CoV, è la cosiddetta "tempesta di citochine" [6]. Il virus SARS-CoV-2 attiva il sistema immunitario innato, i macrofagi e le altre cellule coinvolte nella risposta immunitaria innata attraverso i recettori Toll-Like (TLR). Questa risposta infiammatoria sistemica senza vincoli provoca il rilascio di enormi quantità di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF- α , TGF β , ecc.) e chemochine (ad es. CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10) [7]. Oltretutto, l'infezione virale è un potente fattore in grado di scatenare una risposta antivirale capace di attivare una complessa azione di difesa che sfocia, tra le varie cose, nell'aumento della temperatura corporea e nella produzione precoce di interferoni (IFN), entrambi capaci di limitare l'aumento della replicazione virale e del conseguente titolo virale. Da un punto di vista clinico, se è presente un ritardo nella produzione di IFN o comunque della risposta innata si raggiunge una minore clearance della carica virale a parità di tempo e le conseguenze potrebbero essere una risposta infiammatoria persistente con infiltrazione di monociti-macrofagi e neutrofilo e un rilascio aberrante e incontrollato

di citochine pro-infiammatorie e chemochine. Pertanto la mancanza di una risposta antivirale tempestiva e adeguata può essere cruciale per la patogenesi del COVID-19 [8, 9, 10].

MA IL COVID-19 SI POTEVA PREVEDERE?

Per quanto devastante sia stata finora e continui ad essere la pandemia di COVID-19, il mondo scientifico si aspettava qualcosa di simile. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stilato l'elenco delle diverse malattie infettive che rappresentano una seria minaccia per la salute pubblica, per la maggior parte delle quali non ci sono ancora vaccini disponibili e farmaci efficaci, con il principale obiettivo di stimolare sia le attività di ricerca di base sia il monitoraggio epidemiologico nella speranza di non presentarci totalmente impreparati innanzi alle future emergenze.

Allo stato attuale, le malattie di origine virale prioritarie sono:

- COVID-19
- Febbre emorragica Crimea-Congo
- Malattia da virus Ebola e malattia da virus di Marburg
- Febbre di Lassa
- Coronavirus della sindrome respiratoria mediorientale (MERS-CoV) e della sindrome respiratoria acuta severa (SARS-CoV)
- Malattie Hendra e Nipah
- Febbre della Rift Valley
- Zika virus
- Influenza Aviaria
- Monkeypox virus
- “Malattia X”

Anche prima del COVID-19 nella lista dell'OMS era presente la “Malattia X”, intesa come una malattia futura che gli esseri umani non avevano mai visto prima e che avrebbe potuto causare una pandemia. COVID-19 ha dimostrato di essere l'attesa Malattia X e ora siamo in piena fase pandemica, con scienziati provenienti da tutto il globo che lavorano, spesso anche in collaborazione, per sviluppare trattamenti e vaccini per combatterla [11]. Ma la “Malattia X” resta prioritaria nella lista dell'OMS, solo che allo stato attuale, non siamo in grado di prevedere con precisione né spaziale né temporale la prossima. In particolare, le infezioni respiratorie emergenti e riemergenti sono sotto osservazione in modo più imponente considerata la facilità della loro trasmissione, anche se non bisogna sottovalutare altre patologie, che si trasmettono attraverso altri animali e specialmente insetti (artropodi), che possono essere responsabili di epidemie più o meno vaste. Infatti, questo non è un elenco esaustivo, né indica le cause più probabili della prossima epidemia. L'OMS si ripropone di rivedere e aggiornare questo elenco a seconda delle necessità e delle

evenienze, al fine di organizzare attività di ricerca e sviluppo per contrastare eventuali crisi sanitarie.

Dunque, la Malattia X semplicemente rappresenta la consapevolezza che una grave epidemia internazionale potrebbe essere causata da un agente patogeno attualmente sconosciuto.

IL GIRO DEL MONDO IN 80 VIRUS

I termini “malattie infettive emergenti e riemergenti” si riferiscono principalmente a due categorie principali di malattie infettive: infezioni emergenti di recente, causate da nuovi patogeni; e malattie infettive riemergenti, causate dalla ricomparsa di microorganismi che riappaiono dopo un calo significativo e/o una totale eradicazione.

Fondamentalmente, un’epidemia è un evento che si verifica quando c’è un aumento, spesso improvviso, della frequenza di una malattia superiore a quanto normalmente previsto in quella popolazione e in quella zona; mentre il termine pandemia (da: *pân* ‘tutto’ e *dêmos* ‘popolo’) si riferisce a un’epidemia che si diffonde contemporaneamente in più paesi o continenti, colpendo un gran numero di persone.

Sfortunatamente, negli ultimi decenni, la comunità globale ha dovuto affrontare diversi focolai di emergenze e riemergenze di malattie infettive, con gravi minacce per la sicurezza sanitaria e l’economia in tutto il mondo. Il verificarsi di focolai di malattie significative, come la SARS (sindrome respiratoria acuta grave) originata in Cina nel 2002 [12], la pandemia di influenza suina H1N1 del 2009 dal Messico [13], la MERS (sindrome respiratoria del Medio Oriente) che si è verificata in Arabia Saudita nel 2012 [14], l’epidemia di virus Ebola (EBOV) in Africa occidentale alla fine del 2013 [15], l’epidemia di virus Zika (ZIKV) originata in Brasile nel 2015 [16], l’emergenza sanitaria del 2018 in Nigeria causata dal virus Lassa [17], e la pandemia in corso della malattia COVID-19, ha rinnovato interesse nello sviluppo di strategie per prevenire, trattare e/o controllare più rapidamente i virus emergenti e riemergenti con un alto potenziale epidemico.

Negli ultimi decenni, un certo numero di virus è venuto alla luce per la prima volta o è ricomparso, dando luogo a epidemie e pandemie significative. Ad esempio, l’infezione da ZIKV era conosciuta come una malattia tropicale minore confinata in alcune limitate aree dell’Africa centrale e del Sud Est asiatico, dove dal 1968 al 2007 sono stati registrati casi d’infezione umana. La prima vera epidemia si è verificata nel 2007 sull’isola di Yap (Micronesia), dove sono stati segnalati 185 casi. Tra il 2013 e il 2014 varie epidemie si sono verificate in diverse isole del pacifico: Polinesia francese, Isola di Pasqua, Isole Cook e Nuova Caledonia. Nel 2015-2016 si assiste ad una vera pandemia da ZIKV con 500.000 casi, 18 decessi e 3.700 bambini nati con difetti congeniti e da quel momento il virus risulta presente in maniera endemica in buona parte del sud America, dei caraibi e del sud-est asiatico, anche se in molti altri territori è stata accertata la presenza di vettori competenti (*Aedes aegypti*) [18]. Infatti, diversi sono stati

i focolai epidemici di virus trasmessi da vettori (artropodi), tra cui il virus West Nile (WNV) [19], ZIKV, virus della febbre gialla (YFV) e virus Dengue (DENV). Le malattie trasmesse da vettori, inclusa la febbre Chikungunya causata dall'alphavirus chikungunya (CHIKV), sono estremamente difficili da eradicare perché i virus sono mantenuti in natura mediante propagazione tra vettori e ospiti, senza contatto uomo-uomo. Il CHIKV appartiene al genere alphavirus della famiglia togaviridae ed è trasmesso da zanzare del genere *Aedes*, (come *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, comunemente chiamata zanzara tigre). La malattia da CHIKV è nota per aver causato diversi eventi epidemici a partire da quello registrato in Tanzania nel 1952. Da allora, sono stati descritti numerosi focolai epidemici in Asia, in Africa, nelle Americhe e anche in Italia e in altri Paesi europei. Infatti, in Italia oltre all'epidemia del 2007 in Emilia Romagna con 217 casi confermati in laboratorio, nel 2017 si è verificata una seconda epidemia che ha interessato alcuni comuni del Lazio e della Calabria dove sono stati segnalati 489 casi di CHIKV, di cui 270 confermati in laboratorio. Circa il 6% dei soggetti infetti è stato ricoverato in ospedale. L'epidemia più recente da CHIKV è stata registrata in Sudan, da maggio a ottobre 2018, con 13.978 casi, nessuno dei quali ha richiesto il ricovero ospedaliero [20]. Altri virus appartenenti al genere alphavirus e più precisamente al complesso Semliki come il CHIKV, sono il virus Semliki Forest (SFV) (Uganda), da cui origina il nome del complesso, il virus del Ross River (RRV) (Australia, Fiji, Samoa, Isole di Cook e Nuova Caledonia), il virus Mayaro (MAYV) (principalmente in Amazzonia in Brasile, ma nel 2015 è stato ritrovato in un giovane paziente ad Haiti), il virus o'nyong-nyong (ONNV) (Uganda e Kenya), e il virus Una (UNAV) (Sud America).

Oggi, diverse regioni del globo sono endemiche per almeno un flavivirus, dove il DENV rappresenta il più diffuso con circa 50-100 milioni di persone che vengono infettate ogni anno, ma da tenere sotto controllo ci sono anche i soliti WNV, YFV, Zika virus e negli ultimi tempi anche il virus Rocio (ROCV), un flavivirus neurotropico potenzialmente emergente in Brasile. L'Italia è stato uno dei paesi più colpiti in Europa da WNV, riferendo il primo caso umano di infezione da WNV nel 2008. Ogni anno in Italia sono stati segnalati casi umani di WNV fino al recente focolaio osservato nel 2018 con 230 casi. Quindi, l'Italia può essere considerato un esempio di endemizzazione di un patogeno emergente [19].

Tra le febbri emorragiche virali, la febbre di Lassa è una malattia acuta trasmessa dai roditori causata dal virus di Lassa (LASV), endemica in molti paesi dell'Africa occidentale. Altre febbri emorragiche sono causate da virus appartenenti alla famiglia Filoviridae, EBOV e virus Marburg (MARV). L'epidemia di Ebola del 2013-2016 in Africa occidentale è stata la più grande da quando il virus è stato identificato per la prima volta nel 1976, con un tasso di mortalità per l'ebolavirus dello Zaire del 75% con 11.310 decessi, mentre la più grande epidemia di malattia da virus Marburg registrata si è verificata in Angola nel 2004. La più recente epidemia di Marburg in Uganda nel

2017, ha riportato solo 3 casi di infezione, ma tutti fatali. La più recente epidemia di Ebola (2019-2020) nella Repubblica Democratica del Congo sembra essere quasi terminata ma ha causato 3.456 infezioni con 2.276 morti.

Nel 1999, un paramyxovirus sconosciuto e poi chiamato virus Nipah (NiV) è stato identificato come la causa di un'epidemia di encefalite grave verificatasi in Malesia e Singapore con una mortalità elevatissima [21]. In una recente epidemia del 2018 in Kerala (India), ci sono stati 23 casi e 17 morti. Inoltre, il virus della febbre emorragica della Crimea-Congo (CCHFV) è considerato una delle principali malattie emergenti che si stanno diffondendo all'interno delle nazioni europee, a seguito della crescente distribuzione delle zecche antropofile appartenenti al genere *Hyalomma*. Ogni anno, più di 1.000 casi di CCHFV, dovuti alla trasmissione da uomo a uomo, sono segnalati nell'Europa sudorientale. La febbre emorragica della Crimea-Congo è presente nell'Europa orientale, in particolare nell'ex Unione Sovietica, in tutto il Mediterraneo, nella Cina nord-occidentale, nell'Asia centrale, nell'Europa meridionale, in Africa, nel Medio Oriente e nel subcontinente indiano [22]. La febbre emorragica della Crimea-Congo è una delle principali zoonosi emergenti da tenere sotto osservazione poiché è solo una questione di quando e dove ci saranno i primi casi anche in Italia. Infatti, alcuni studi dimostrano la presenza di CCHFV in Italia basandosi sull'analisi dell'introduzione delle zecche sugli uccelli migratori provenienti da aree endemiche, e sulla circolazione del virus, attraverso il monitoraggio sierologico di CCHFV in popolazioni animali che potrebbero fungere da serbatoi, come gli ovini [23]. Il monitoraggio della circolazione del virus è effettuato nelle zone costiere del Lazio e della Toscana dove avviene l'arrivo degli uccelli migratori ma soprattutto perché interessate dalla presenza del vettore [24]. Comunque, ad oggi in Italia non è stato segnalato alcun caso di CCHF.

Un'altra malattia infettiva emorragica emergente trasmessa dalle zecche è la febbre grave con sindrome da trombocitopenia (SFTS) causata dal Dabie bandavirus (precedentemente SFTS virus [SFTSV]). Isolato nel 2009 da campioni di siero di pazienti in fase acuta, il virus è stato segnalato in 23 province cinesi, e più di 5000 casi sono stati diagnosticati tra il 2009 e il 2016 e la provincia di Henan ha registrato il numero più alto di casi, rappresentando il 45% dei casi segnalati durante il 2011-2014 in Cina. Questa nuova malattia da bunyavirus ha un alto tasso di mortalità (da circa il 5% a più del 40%). I pazienti con SFTS sono stati identificati in Giappone, Corea del Sud, Vietnam e Taiwan nel 2015, e un ultimo focolaio si è verificato nella Cina orientale nella prima metà del 2020 mentre il mondo stava combattendo la pandemia globale COVID-19. [25].

LE MUTAZIONI COME STILE DI VITA

Di solito, c'è scarsa conoscenza o totale ignoranza sull'identità, l'epidemiologia e la patogenesi di un nuovo agente infettivo che compare per la prima volta in una certa

area geografica (come nel caso di nuovi coronavirus o nuove varianti influenzali), così come scarse sono le informazioni sulla capacità di diffusione del virus al di fuori dal serbatoio zoonotico, rendendo difficile prevedere se, dove e quando si verificherà un'epidemia. I patogeni emergenti e riemergenti rappresentano una minaccia epidemica costante per l'umanità non solo per le conseguenze sulla salute pubblica, ma anche per gli effetti economici, sociali e politici che possono provocare a livello globale.

In generale, i principi che stanno alla base dell'evoluzione dei virus sono molto simili ai principi dell'evoluzione darwiniana per le altre forme viventi, che coinvolgono la variazione genetica, la selezione naturale e la sopravvivenza delle caratteristiche più favorevoli. Tuttavia, l'evoluzione del virus include anche fenomeni come alti tassi di errore, esistenza di quasi-specie virali (un concetto esclusivamente presente nei virus) e scambio genetico attraverso vasti pool genetici di differenti linee genealogiche che generano relazioni di tipo reticolato estendendo i concetti tradizionali di evoluzione. Evoluzione significa semplicemente un cambiamento non ciclico nelle caratteristiche genetiche di un virus, e i virus sono gli agenti genetici in più rapida evoluzione tra tutte le entità biologiche. Conoscere i meccanismi evolutivi permette di comprendere la diversità dei virus e le relazioni con l'ospite, oltre a fornire spiegazioni per l'emergere di nuove malattie virali; infatti, la maggior parte delle malattie virali emergenti è dovuta a salti di specie da ospiti infettati in modo persistente che hanno storie evolutive a lungo termine con l'ospite del virus (chiamati serbatoi naturali). Pertanto, l'evoluzione del virus appare antica ma inestricabilmente legata al suo ospite. Inoltre, in contrasto con l'evoluzione dell'ospite, le quasi-specie virali mostrano un'adattabilità basata sul concetto di popolazione che estende la sua capacità di selezione del più adatto fino ad includere virus con diversi gradi di *fitness*.

Una delle principali ricadute pratiche dell'evoluzione del virus è comprendere l'emergere di nuovi agenti patogeni virali. La natura imprevedibile e stocastica di tali adattamenti virulenti rende difficile qualsiasi previsione, poiché il legame tra virulenza ed evoluzione non è chiaramente definito e allo stato attuale delle conoscenze abbiamo solo alcuni tratti certi di patogenicità virale. L'adattabilità microbica attraverso complessi meccanismi di mutagenesi e selezione rappresenta uno dei fattori determinanti dell'evoluzione dei virus che sottende al cambio di ospite e quindi all'emergenza di nuovi virus. Chiaramente sono presenti altri fattori di fondamentale importanza come i cambiamenti climatici e ambientali che possono influenzare la diffusione di virus o di specie animali, che fungono da serbatoi, in aree diverse dall'usuale. Anche la diffusione di vettori (insetti, roditori, pipistrelli etc.) può modificare le opportunità di incontro del virus con una nuova specie suscettibile. Ancora è importante non sottovalutare come alcune circostanze sociopolitiche (cioè malnutrizione, cattive condizioni igieniche, disordini sociali, guerre) possano influenzare ed aumentare la suscettibilità umana alle malattie. Vari fattori

antropogenici sono, quindi, responsabili del contatto tra ospite e virus come l'urbanizzazione, i cambiamenti nelle pratiche agricole, la deforestazione, i viaggi e il commercio, il trasporto di larve di artropodi al seguito delle merci, la caccia e le pratiche di pascolo. In Africa, lo stretto contatto tra primati non umani e umani si verifica frequentemente a causa dell'abitudine tradizionale di cacciare gli animali come fonte di cibo. Molto spesso nessun singolo fattore può spiegare da solo l'emergere o la ricomparsa di un patogeno virale.

La febbre emorragica argentina (AHF), causata dal virus Junin, è un perfetto esempio di come i cambiamenti nelle pratiche agricole possano influenzare la diffusione di patologie zoonotiche alla popolazione umana. Il serbatoio naturale per il virus Junin è rappresentato dai topi della specie *Calomys musculus*, e il loro numero è aumentato enormemente dopo la bonifica della pampa (pianure argentine) per rendere i vasti terreni adatti alla coltivazione del mais. Questa specie di roditori elimina il virus attraverso l'urina e gli escrementi cosicché gli agricoltori che lavoravano nei campi sono stati infettati mediante inalazione di aerosol contaminati da virus rilasciati con gli escrementi. Un discorso simile può essere fatto per comprendere l'emergenza di altre infezioni come la febbre emorragica boliviana e la febbre di Lassa, causate rispettivamente dal virus Machupo e dal virus della febbre Lassa, attraverso i rispettivi roditori che fungono da ospiti naturali *Calomys callosus* e *Mastomys natalensis*. Invece, il genere henipavirus contiene due virus, il virus Hendra (HeV) e il NiV. L'HeV è stato associato alla morte di cavalli in Australia. Questo focolaio di HeV è emerso in seguito ad infezione respiratoria di alcuni cavalli che hanno trasmesso l'infezione alle persone che sono venute a contatto, principalmente gli allevatori e i veterinari. NiV è stato, invece, isolato in un focolaio in Malesia nel 1999 dove si è reso responsabile di molti decessi. Le persone che lavorano a stretto contatto con i suini o impegnate nell'allevamento di suini su larga scala sono state infettate da suini infettati da NiV. Questo episodio è stato di ispirazione per una pellicola cinematografica di grande successo dal titolo inequivocabile: "Contagion".

Inoltre, una riuscita introduzione in un'altra specie e la diffusione di un'infezione in modo sostenibile per la sopravvivenza della specie virale può essere influenzata da una serie di meccanismi molecolari e come detto evolutivi che influenzano il virus, una volta che i fattori ambientali hanno provocato l'incontro iniziale tra un virus e un potenziale nuovo ospite [26].

La mutazione e la ricombinazione rappresentano il meccanismo più diffuso di variazione del genoma dei virus. In più, nel caso dei virus con genoma a RNA, questi meccanismi possono essere ulteriormente amplificati dalla mutagenesi standard (mutazioni puntiformi, cioè mis-incorporazione all'interno della nascente catena nucleotidica di nucleotidi errati), cioè eventi ipermutazionali innescati dall'assenza di attività di correzione degli errori delle RNA polimerasi in cui mancano le esonucleasi di correzione 3'-5'. Pertanto, il tasso di mutazione puntiforme tra i virus a RNA è di

circa 10^{-3} e 10^{-5} , mentre i virus a DNA hanno un tasso di mutazione di 10^{-8} - 10^{-11} per nucleotide copiato. Questi tassi di errore implicano che nei virus con genoma ad RNA si avrà una media di 0,1-10 mutazioni alla replicazione di un genoma di lunghezza di 10.000 residui. Espresso in altri termini, se anche fosse possibile partire da un singolo virus all'interno di una cellula infetta non è possibile mantenere inalterata la sequenza nucleotidica di un genoma a RNA nemmeno dopo pochi cicli di replicazione [27].

Gli altri meccanismi di mutagenesi sono rappresentati dal riassortimento e dalla ricombinazione. Il riassortimento, che è limitato ai soli virus a RNA con genomi segmentati, prevede l'inserimento nel virione della progenie di segmenti da due diversi virus che contemporaneamente infettano la stessa cellula. Sono state riportate ampie variazioni di efficienza nel riassortimento tra virus. Alcuni virus segmentati mostrano (hantavirus e virus di Lassa) bassi livelli di riassortimento. Tuttavia, altri (virus influenzali e rotavirus) mostrano un maggiore livello di riassortimento. I virus influenzali saranno descritti come esempio cardine nel seguito di questo scritto, mentre per quanto riguarda i rotavirus, un ceppo emergente con segmenti derivati dai rotavirus bovini (G10) è stato ritrovato nell'uomo e finanche in Campania alcuni anni fa [28].

La ricombinazione, invece, può verificarsi in tutti i virus, indipendentemente dall'organizzazione genomica. Il modello ampiamente accettato di ricombinazione dei genomi virali è la ricombinazione chiamata "copy-choice". In questo processo, le polimerasi passano da una molecola di acido nucleico (il donatore) a un'altra (l'accettore) durante la sintesi del nuovo filamento, rimanendo legate alla catena nascente dell'acido nucleico. La ricombinazione può essere di due tipi, omologa e non omologa. La ricombinazione omologa si verifica più spesso tra regioni di elevata somiglianza di sequenza. La ricombinazione non omologa avviene, invece, tra regioni genomiche differenti e quindi geneticamente dissimili.

Tutti questi meccanismi di mutagenesi pongono le basi per quella selezione positiva che è un processo mediante il quale un genotipo virale diventa dominante in una popolazione. Particolarmente rilevanti per l'emergenza di un nuovo virus sono i casi in cui un genoma minoritario in una popolazione esprime una sequenza amminoacidica superficiale che ha la capacità di riconoscere un recettore in un tipo di cellula appartenente a un organismo che non è l'ospite naturale per il virus. Un problema di una criticità enorme è che una o poche sostituzioni di aminoacidi possono essere spesso sufficienti per consentire una modifica del tropismo della cellula ospite.

Quindi, eventi di selezione positiva possono tendere a rendere una popolazione virale sempre più competente a replicarsi in un nuovo organismo, attraverso la sostituzione di alcune sottopopolazioni virali con altre. La diffusione da uomo a uomo può successivamente avvenire come risultato di un aumento generale della carica virale o può richiedere mutazioni aggiuntive (in genere mutazioni puntiformi) che favoriscono la trasmissione [29].

Pertanto, due gruppi di meccanismi, molecolari ed evolutivi, sono intimamente intrecciati per produrre un esito altamente imprevedibile. Imprevedibile sarà la variante del virus e imprevedibile sarà il virus stesso come pure il suo ospite. Imprevedibile saranno il luogo, il momento e le modalità della sua comparsa.

VIRUS DELL'INFLUENZA: UN ESEMPIO ESEMPLARE

Tra le pandemie, quelle influenzali possono essere considerate le calamità naturali più devastanti della storia umana. L'influenza è una malattia antica, talvolta dagli esiti fatali, anche se spesso sottovalutata. Essa ha causato milioni di decessi tra epidemie locali e pandemie globali. Il virus influenzale appartiene alla famiglia degli Orthomyxoviridae, rappresentata da virus con genoma ad RNA a filamento negativo suddiviso in sei-otto segmenti di RNA individuali.

Il motivo per cui l'influenza rimane perennemente un problema clinico in tutto il mondo è la sua impareggiabile capacità di eludere il sistema immunitario dell'ospite. Il virus riesce a garantirsi l'evasione immunologica alterando frequentemente l'antigenicità delle sue proteine di superficie emoagglutinina (HA) e neuroaminidasi (NA). Le differenze antigeniche nelle proteine "nucleoproteina" (NP) e "proteina di matrice 1" (M1) consentono di classificare i virus influenzali come influenza di tipo A, B o C, mentre l'ulteriore sottotipizzazione dei virus di tipo A si basa sulla correlazione delle loro glicoproteine HA e NA. Attualmente, 16 sottotipi HA (da H1 a H16) e 9 NA (da N1 a N9) sono stati identificati nei virus di tipo A [30]. I virus influenzali di tipo A sono stati isolati da vari animali, inclusi esseri umani, maiali, cavalli, mammiferi marini, e uccelli. Gli uccelli acquatici selvatici, gli uccelli costieri e i gabbiani sono i serbatoi naturali del virus dell'influenza A e possono essere infettati da virus che presentano combinazioni dei 16 diversi sottotipi di HA e dei 9 diversi sottotipi di NA.

L'epidemiologia dei virus influenzali umani è dettata dalla loro continua variazione antigenica per sfuggire alla risposta immunitaria dell'ospite. I virus influenzali possiedono due diversi e complessi meccanismi che consentono loro di reinfectare gli esseri umani e causare malattie, vale a dire "deriva antigenica" o "antigenic drift" (accumulo di mutazioni nel tempo) e "deviazione antigenica" o "antigenic shift" (riorganizzazione dei segmenti di RNA virale in cellule infettate con due o più virus diversi, noto anche come "riassortimento genico"). Per i virus dell'influenza umana A, le velocità evolutive differiscono tra le proteine, probabilmente riflettendo differenze nella pressione selettiva dell'ospite [31]. In effetti, le proteine HA e NA si evolvono più velocemente delle proteine del complesso polimerasico (PB2, PB1, PA) e delle proteine NP e M1, perché è probabile che le sostituzioni dei residui nei domini antigenici delle glicoproteine di superficie HA e NA possano produrre vantaggi selettivi consentendo ai ceppi mutati di eludere l'immunità preesistente. La deriva antigenica, quindi, si verifica come risultato di mutazioni puntiformi in specifici geni che conducono a minori e graduali modifiche antigeniche nelle proteine HA e NA. A livello

nucleotidico, i tassi di mutazione riportati vanno da $\sim 5 \times 10^{-4}$ a $\sim 8 \times 10^{-3}$ sostituzioni nucleotidiche per sito [32]. A causa della fedeltà riproduttiva, relativamente bassa, della RNA polimerasi RNA dipendente (RdRP), che difetta (rispetto alla DNA polimerasi) della capacità di “correzione delle bozze” (attività di esonucleasi una caratteristica comune a tutte le RNA polimerasi), l’influenza accumula costantemente mutazioni all’interno del suo genoma durante la replicazione. È importante notare che queste mutazioni possono essere silenti o possono alterare la virulenza e la patogenicità del virus. Ad esempio, se un virus aviario altamente patogeno acquisisce le mutazioni necessarie che facilitano la sua capacità di entrare e replicarsi in modo efficiente negli esseri umani, il virus può diventare una seria minaccia per l’uomo. Lo stesso varrebbe per un virus di patogenicità minore, ma molto efficace nella sua diffusione da uomo a uomo, che nel tempo potrebbe accumulare abbastanza mutazioni da diventare altamente virulento. La selezione delle varianti di deriva antigenica è un evento sequenziale con l’accumulo graduale di mutazioni, mentre la deviazione (shift) antigenica può verificarsi all’improvviso e soprattutto ad intervalli irregolari e imprevedibili.

Questo secondo meccanismo di modifica dell’antigenicità del virus è molto meno frequente poiché si verifica solo quando due virus diversi coinfettano lo stesso individuo. Il meccanismo mutazionale genetico è uno scambio di interi segmenti genomici tra i due virus. Ciò è possibile solo perché il genoma del virus dell’influenza è costituito da otto segmenti di RNA separati e indipendenti, quindi la coinfezione di una cellula ospite con due virus diversi può produrre virus della progenie contenenti segmenti genici di entrambi i virus parentali. In questo modo, tramite il riassortimento dei segmenti genomici, viene creato un virus totalmente nuovo, risultante in una patogenicità imprevedibile e un pattern antigenico superficiale completamente nuovo per la popolazione. Infatti, considerando che questo evento di riassortimento si verifica solitamente tra virus provenienti da diverse specie ospiti (ad es. un virus umano e un virus aviario), il nuovo virus può presentare immediatamente determinanti antigenici HA e/o NA del ceppo dell’influenza aviaria contro il quale la popolazione umana non dispone di alcuna immunità significativa. Una volta che il ceppo pandemico è stato creato (generalmente per deviazione antigenica), il nuovo virus può modificare ulteriormente i suoi determinanti di virulenza mentre continua a replicarsi (generalmente per deriva antigenica) [33].

Una caratteristica di grande importanza per comprendere la possibile patogenicità dei virus influenzali si può estrapolare dalle seguenti osservazioni. Alcuni ceppi di virus influenzali sono in gran parte asintomatici negli uccelli domestici (pollame) [e sono considerati virus dell’influenza aviaria a bassa patogenicità (LPAI dall’inglese Low Pathogenicity Avian Influenza)], mentre altri ceppi causano malattia severa nei polli che è spesso fatale entro 48 ore [sono considerati ceppi di influenza aviaria altamente patogena (HPAI dall’inglese High Pathogenicity Avian Influenza)]. I

serbatoi naturali che fungono da ospiti per i virus LPAI sono rappresentati dagli *Anseriformi* (principalmente anatre, oche e cigni) e dai *Caradriformi* (principalmente gabbiani, sterne e trampolieri). Negli uccelli selvatici, i virus LPAI infettano prevalentemente le cellule epiteliali del tratto intestinale e vengono successivamente escreti con le feci [34]. Tuttavia, l'infezione di uccelli selvatici da virus LPAI è tipicamente subclinica e si verifica in assenza di lesioni evidenti. I virus LPAI possono attraversare la barriera di specie e infettare mammiferi marini selvatici, mammiferi terrestri e uccelli domestici. I suini possono essere facilmente infettati dai virus dell'influenza aviaria. Le manifestazioni della malattia possono variare da una malattia acuta del tratto respiratorio a un'infezione inapparente [35]. I suini sono stati tradizionalmente percepiti come un "recipiente di miscelazione" per facilitare la generazione di nuovi virus influenzali mediante riassortimento genico. Questo perché le cellule epiteliali respiratorie dei suini esprimono acidi sialici (SA) legati al galattosio in posizione sia α -2,3 (recettore per ceppi aviari presente generalmente nelle cellule di uccelli) che α -2,6 (recettore presente nelle cellule umane e specifico per ceppi di influenza umana) [36] e la presenza simultanea di SA α -2,6Gal e SA α -2,3Gal consentirebbe ai suini di essere potenzialmente infettati da virus sia aviari che umani. Tuttavia, l'importanza dei suini nel meccanismo di riassortimento è anche da ricercare nella presenza di un gran numero di suini in stretta vicinanza ad altre specie animali, in particolare uccelli acquatici addomesticati, aumentando il rischio di un evento di trasmissione interspecie, almeno in alcune aree del mondo. Un ulteriore fenomeno che può indurre la manifestazione di pandemie è rappresentato dal fatto che il pollame domestico può essere facilmente infettato da diversi virus LPAI (es. virus H5, H6, H7, H9) che diventano endemici nella popolazione. Tuttavia, la conseguenza più rilevante delle infezioni del pollame con virus LPAI è l'elevata possibilità di evoluzione in queste specie da virus LPAI a virus HPAI mediante il consueto meccanismo di deriva antigenica a seguito di mutazioni puntiformi.

L'HA subisce una scissione post-traslazionale nelle subunità HA1 e HA2 da parte delle proteasi dell'ospite, con la generazione di un dominio fusogenico all'estremità amminica di HA2 che induce la fusione tra l'involucro virale e la membrana endosomiale [37]. L'attivazione proteolitica è di fondamentale importanza per determinare l'infettività virale e la diffusione del virus ai vari organi [38] e la glicoproteina HA ha un ruolo chiave nella patogenicità del virus influenzale [39]. Il precursore HA0 dell'emoagglutinina attivata presente sui virus dell'influenza stagionale, così come quello presente sui virus LPAI, ha una sequenza del sito di scissione XT/XR e può essere selettivamente tagliato da un numero limitato di proteasi tipo tripsina, mentre nei virus HPAI il clivaggio endoproteolitico dell'HA0 avviene attraverso proteasi ubiquitarie, che riconoscono una sequenza amminoacidica multibasica nel sito di scissione, come RXK/RR e KXK/RR [40]. I virus influenzali dei sottotipi H5 e H7 possono diventare altamente patogeni in seguito all'infezione di

uccelli domestici, causando focolai di HPAI. Il passaggio da un fenotipo LPAI al fenotipo HPAI dei virus dell'influenza A H5 e H7 è possibile in seguito all'introduzione di residui di amminoacidi basici nel sito di scissione HA0 mediante sostituzione o inserimento, risultando nel cosiddetto sito di scissione multibasica (MBCS), che facilita la replicazione del virus a livello sistemico. Le proteasi per il comune clivaggio della HA nelle infezioni da influenza stagionale e LPAI sono prevalentemente distribuite nel tratto respiratorio e intestinale e la maggior parte dei virus influenzali umani epidemici noti fino ad oggi sono in grado di dare manifestazioni polmonari e gastroenteriche. Al contrario, nei virus HPAI le sequenze amminoacidiche sono prontamente scisse da proteasi intracellulari ubiquitariamente presenti, come la furina [41].

I dati storici suggeriscono che potrebbero esserci state almeno 14 pandemie negli ultimi 500 anni (1509–2009), ovvero circa una pandemia ogni 36 anni. Ma la nostra conoscenza dei virus influenzali pandemici a livello del virus è piuttosto limitata poiché i virus pandemici sono stati isolati solo dal 1957 in poi e il virus pandemico del 1918 è stato ricostruito utilizzando un approccio “archeo-virologico” [42]. Non conosciamo i sottotipi o la composizione genetica delle pandemie antecedenti al 1918, pertanto considereremo come “era pandemica” gli eventi dal 1918 in poi. Negli ultimi 100 anni abbiamo sperimentato cinque pandemie verificatesi negli anni: (1) 1918-1919; (2) 1957–1958; (3) 1968; (4) 1977-1978; e (5) 2009–2010.

Il virus pandemico del 1918-1919: la pandemia influenzale spagnola colpì per la prima volta nel 1918 come una malattia respiratoria insolita associata a un aumento sproporzionato dei decessi tra i giovani adulti. L'origine dell'influenza spagnola non è chiara, ma le ricostruzioni dei genomi virali dai tessuti di diverse vittime hanno dimostrato che l'agente eziologico era un virus H1N1 di discendenza aviaria. Anche le caratteristiche epidemiologiche della pandemia erano senza precedenti, compresa la sua comparsa in un massimo di tre ondate entro il primo anno e la mortalità estremamente elevata registrata. La pandemia ha ucciso circa 50 milioni di persone [43].

Il virus pandemico del 1957-1958: l'“influenza asiatica” ebbe origine nella provincia cinese dello Yunan nella primavera del 1957, diffondendosi rapidamente nel sud-est asiatico e in Giappone, e successivamente in Australia, Indonesia e India, e successivamente in Europa, Africa, Nord e Sud America e Caraibi. In soli 6 mesi, la pandemia aveva coperto il globo. Una seconda ondata si è verificata nell'autunno del 1957. Inoltre, se l'origine del virus è stata collegata al virus pandemico H1N1 del 1918, si sono verificati eventi di riassortimento per generare un nuovo virus soprattutto per la sua composizione antigenica esterna. I segmenti genici che codificano HA e NA sono stati sostituiti da un sottotipo H2 simile all'HA aviario e da un sottotipo N2 di NA, con gli altri cinque segmenti genici conservati dalla linea H1N1 derivata dal 1918. Complessivamente, ha colpito circa il 40-50% della popolazione mondiale dove il 25-30% dei contagiati ha manifestato malattia clinica [44].

Il virus pandemico del 1968: anche questa pandemia ha avuto origine in Cina, nel 1968, diffondendosi a Hong Kong e successivamente in India, Australia, Europa e Stati Uniti. L'H3N2 del 1968, denominato "Hong Kong" è stato causato da un evento di riassortimento tra un virus H2N2 umano circolante e un ceppo aviario. La nuova configurazione derivava dall'acquisizione di una nuova HA (sottotipo H3) ed il segmento PB1. Rispetto alle precedenti pandemie del secolo, l'influenza di Hong Kong era relativamente lieve (riduzione della durata e della gravità della malattia clinica), forse a causa dell'immunità della popolazione contro il sottotipo N2 dell'NA che il nuovo virus pandemico H3N2 condivideva con il virus H2N2 circolante [44].

Il virus pandemico del 1977-1978: a rigor di termini, ci fu una quarta pandemia, l'influenza russa, nel 20° secolo. È stata innescata da un ceppo H1N1 apparso nel 1977. Questa pandemia era considerata una pandemia benigna, o non una "vera" pandemia, e riguardava principalmente soggetti nati dopo il 1950 (quindi persone di età inferiore ai 25 anni), poiché la popolazione anziana già presentava un'immunità protettiva come conseguenza della precedente esposizione al ceppo H1N1. La caratterizzazione molecolare di questo virus ha mostrato che sia gli antigeni HA che NA erano notevolmente simili a quelli degli anni '50. Si ritiene che non sia probabile che un virus influenzale si possa essere mantenuto in natura per 20 anni senza accumulare mutazioni, quindi è possibile che l'epidemia del 1977 fosse il risultato del rilascio accidentale di un ceppo di laboratorio negli anni '50 [45].

Il virus pandemico 2009-2010: il virus pandemico H1N1 del 2009 è stato derivato dal riassortimento tra due virus preesistenti dell'influenza suina, un virus della linea suina nordamericana H1N2 denominato "triple-reassortant" e un virus della linea suina eurasiatica H1N1. Al momento non è noto se il nuovo virus sia emerso prima nell'uomo o nei suini. Il virus pandemico del 2009 è anche collegato al virus pandemico del 1918. Infatti, esso deriva da molteplici eventi di riassortimento attribuiti in ultima analisi alla linea "classica" dei suini H1N1 che circolava enzooticamente nei suini del Nord America dal 1918 [46].

Il nuovo virus H1N1 è stato identificato per la prima volta in un'epidemia diffusa in Messico nel marzo-aprile 2009, ma potrebbe aver circolato nell'uomo già dalla fine del 2008. Mentre è stata descritta una polmonite grave, in particolare associata all'epidemia iniziale messicana, la maggior parte dei casi negli Stati Uniti e in altri paesi sono stati autolimitanti e sono apparsi clinicamente simili all'influenza stagionale. L'infezione umana da H1N1 ha generalmente provocato una bassa mortalità, sebbene alcuni soggetti (comprese le donne incinte, i malati di patologie croniche, persone immunosopresse) avevano un rischio significativamente più alto di malattia grave. La pandemia H1N1 del 2009 ha ereditato i suoi segmenti dei geni NA e M dalla linea H1N1 di tipo aviario europeo e i suoi rimanenti sei segmenti genici (PB2, PB1, PA, HA, NP e NS) dalla linea suina nordamericana H1N2 chiamata "triple reassortant". I

segmenti del gene HA, NP e NS di questo lignaggio derivano dal lignaggio classico dei suini H1N1 (origine 1918) [47].

Nonostante l'evidenza che la combinazione di uno dei sottotipi di HA con uno dei sottotipi di NA consenta un'ampia diversità genetica che potrebbe portare a un evento pandemico, entro il breve periodo della moderna virologia molecolare, dei 16 sottotipi di HA noti, le pandemie sono state causate solo da virus dei sottotipi H1, H2 e H3. Fino ad ora è stato dimostrato che tutti gli altri sottotipi di HA producono nuovi ceppi influenzali con una capacità di trasmissione da uomo a uomo molto bassa o inesistente. Tuttavia, le possibilità di un ulteriore adattamento del virus nell'uomo e di acquisire un'elevata trasmissibilità da uomo a uomo devono essere prese in seria considerazione supponendo che pur non potendosi prevedere la natura del prossimo virus influenzale pandemico, certamente esso deriverà da uno dei 16 sottotipi di HA noti nelle specie aviarie o di mammiferi. Negli ultimi anni, diversi nuovi virus influenzali originati mediante riassortimento genico (ad esempio, H5N1, H7N9, H9N2, H10N8) hanno oltrepassato la barriera di specie e sono sotto sorveglianza da parte della comunità scientifica e dei sistemi sanitari pubblici. Non è ancora chiaro se questi virus possano effettivamente causare pandemie o solo episodi isolati. Le condizioni ecologiche in molti paesi asiatici sono tali che nuovi virus con potenziale pandemico possano insorgere facilmente. Queste condizioni includono la circolazione durante tutto l'anno dei virus influenzali, insieme alla densità delle popolazioni di suini e pollame sia domestico che selvatico che spesso vivono nelle immediate vicinanze di una parte della popolazione umana. Queste condizioni possono facilitare il riassortimento genetico o il trasferimento diretto dei virus aviari all'uomo.

Di seguito sono descritti i principali sottotipi di virus dell'influenza aviaria A noti per infettare sia gli uccelli che gli esseri umani.

L'influenza A (H5N1) è stata rilevata per la prima volta nel 1996 nelle oche in Cina e segnalata nell'uomo nel 1997 durante un'epidemia di pollame a Hong Kong. Da allora è stata rilevata nel pollame e negli uccelli selvatici in più di 50 paesi in Africa, Asia, Europa e Medio Oriente. Dalla loro ricomparsa nel 2003, i virus dell'influenza A aviaria HPAI (H5N1) sono diventati enzootici in sei paesi (Bangladesh, Cina, Egitto, India, Indonesia e Vietnam). Sono state segnalate più di 700 infezioni umane da virus asiatici HPAI H5N1 dal 2003 e Indonesia, Vietnam ed Egitto hanno contato il più alto numero di casi umani HPAI asiatici H5N1 fino ad oggi. La prima segnalazione di un'infezione umana da H5N1 asiatico in America è stata in Canada nel 2014 e si è verificata in un viaggiatore che aveva recentemente visitato la Cina. La maggior parte delle infezioni umane da HPAI H5N1 asiatico si è verificata dopo un contatto prolungato e stretto con pazienti gravi, pollame o uccelli selvatici infetti. La diffusione da uomo a uomo è rara ma circa il 60% dei casi è risultato fatale. Un'infezione umana in Cina è stata causata da un virus dell'influenza A H5N6 nel 2014 [48].

Il virus dell'influenza A (H7N9) è un sottogruppo del gruppo più ampio di virus H7, che normalmente circolano tra gli uccelli. Questo particolare virus A (H7N9) non è stato rilevato negli esseri umani fino a quando non è stato trovato nel marzo 2013 in Cina. I pazienti erano due uomini di 87 e 27 anni e una donna di 35 anni, purtroppo tutti e tre deceduti. Dal 2013 in Cina sono stati segnalati un totale di 1.567 casi d'infezione umana da virus H7N9, associati a un alto tasso di mortalità di circa il 30%. I mercati del pollame vivo sono probabilmente la principale fonte di infezioni umane poiché è stato riferito che la maggior parte dei pazienti infetti aveva avuto contatti recenti con pollame vivo. Il nuovo virus H7N9 era di origine aviaria con HA derivato dal sottotipo H7N3 dell'anatra, il gene NA del virus H7N9 di un uccello migratore in Corea e i sei geni interni dei virus H9N2 del pollame. Sembra che questo nuovo riassortante possa essere trasmesso dal pollame all'uomo più facilmente dell'H5N1 e un recente studio epidemiologico ha mostrato che una percentuale considerevole delle persone coinvolte nell'industria avicola è stata esposta a H7, suggerendo un'elevata diffusione di infezioni lievi o asintomatiche [49].

I virus dell'influenza A H9 sono stati identificati in tutto il mondo negli uccelli selvatici e nel pollame e sono tutti virus LPAI. È stato segnalato che rare e sporadiche infezioni da virus H9N2 nell'uomo causano malattie generalmente lievi delle vie respiratorie superiori. I primi casi di infezione da un ceppo influenzale H9N2 sono stati segnalati in Cina e hanno colpito alcuni bambini. I sintomi dell'infezione da H9N2 sono lievi rispetto a quelli dell'infezione da H5N1. A livello molecolare, è stato descritto che i geni interni dell'H9N2 sono simili a quelli dell'H5N1 che ha causato le infezioni nel 1997, pertanto l'H9N2 è stato posto sotto il controllo delle autorità sanitarie come un potenziale ceppo pandemico [50].

Il primo virus dell'influenza aviaria H10N8 è stato isolato da un'anatra nel Guangdong all'inizio del 2012. Questo nuovo ceppo di influenza aviaria è apparso per la prima volta negli esseri umani entro la fine del 2013. Finora sono stati registrati solo pochi casi, tutti in Cina, ma con un elevato numero di esiti fatali. È abbastanza difficile valutare il reale potenziale pandemico posto da H10N8, infatti, nonostante le gravi infezioni provocate nell'uomo, che hanno portato alla morte in due casi su tre, i casi umani segnalati sono troppo sporadici per consentire uno studio epidemiologico ragionevole. Inoltre, dal febbraio 2014 non sono stati segnalati ulteriori casi [51].

Infine, da ricordare la comparsa a Taiwan dell'influenza A H6N1 nel 2013, quando questo nuovo virus è stato identificato in una paziente di sesso femminile di 20 anni. Ad ora, non è stata documentata la trasmissione da persona a persona del virus o altri casi negli uomini. La caratterizzazione molecolare di H6N1 ha rivelato che si tratta di un tipico virus dell'influenza aviaria di bassa patogenicità probabilmente derivato da eventi di riassortimento da diversi lignaggi H6N1 circolanti nei polli a Taiwan, che potrebbe non replicarsi e propagarsi bene nelle vie aeree superiori dei mammiferi. D'altra parte, una singola mutazione nell'HA dell'isolato umano potrebbe aver

aumentato la sua capacità di legarsi ai recettori dei mammiferi e, quindi, la sua patogenicità nell'uomo. Sulla base di questi dati, e considerando la co-circolazione e il potenziale riassortimento con molti altri sottotipi influenzali, questo virus H6N1 merita considerazione [52].

I virus dell'influenza A possono quindi causare malattie stagionali e episodi pandemici caratterizzati principalmente dal fatto che, a causa di enormi variazioni genetiche, possono presentarsi nuovi ceppi verso i quali l'uomo ha poca o nessuna immunità.

CONCLUSIONE

Obiettivo principale di questo scritto è stato quello di chiarire i tanti interrogativi che possono sorgere sull'emergenza di nuovi virus dal potenziale epidemico e pandemico. Per ovvii motivi non sono stati affrontati problemi cruciali come la diagnostica di infezioni non conosciute, la profilassi e la terapia, che avrebbero richiesto ben altri spazi. È stata già operazione complessa condensare in un singolo capitolo la teoria dell'evoluzione dei virus e del loro adattamento all'ospite; impossibile sarebbe stato estendere un singolo capitolo alla descrizione dei vari candidati vaccini e molecole farmacologiche attualmente allo studio per molti di questi agenti zoonotici. Ciò nonostante, l'esperienza pandemica COVID-19 ha il merito di aver portato la problematica dei virus emergenti e riemergenti all'attenzione dell'opinione pubblica. La speranza è che essa rappresenti un campanello d'allarme, così che i Governi e le Istituzioni capiscano quanto sia attuale e improcrastinabile contrastare le infezioni virali e necessario il rafforzamento di tutti i sistemi atti a fronteggiare con efficacia le sfide delle future emergenze. Indispensabile sarebbe quindi un maggiore e potenziato supporto alla ricerca di base, che è la principale attività capace di fornire tutte quelle informazioni sui patogeni necessarie alla realizzazione di vaccini e farmaci adeguati. Solo se le conoscenze sui meccanismi di base dei virus saranno a disposizione della comunità scientifica, sarà possibile affrontare i virus futuri. Per sostenere lo sviluppo di vaccini e terapie per minacce future, gli sforzi di tutta la comunità scientifica devono essere rivolti all'utilizzo di nuove tecnologie come la biologia strutturale per definire a livello atomico i dettagli delle proteine di superficie che potrebbero essere bersagli di vaccini e delle proteine virali che possono fungere target per il design di antivirali.

Si auspica, inoltre, una migliore sorveglianza globale, che sappia esplorare anche i sistemi innovativi di geolocalizzazione delle malattie infettive per garantire un'adeguata rilevazione e una migliore preparazione in risposta alle pandemie.

BIBLIOGRAFIA

- [1] WHO, Coronavirus disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Update – 25 October 2020, <https://covid19.who.int/?gclid>

- [2] Lescure FX, Bouadma L, Nguyen D, et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis* 2020; 20:697-706
- [3] Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol.* 2020; 5: 562-569
- [4] Pan Y, Zhang D, Yang P, et al. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis* 2020;20:411-412
- [5] Zou X, Chen K, Zou J, et al. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med* 2020; 14:185-192
- [6] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395: 497-506
- [7] Qin C, Zhou L, Hu Z, et al. (2020) Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020; 71:762-768
- [8] Galdiero M, Napoli C. COVID-19: Do not be phobic from fever. *J Infect Public Health.* 2020 Jul;13(7):938
- [9] Crimi E, Benincasa G, Figueroa-Marrero N, Galdiero M, Napoli C. Epigenetic susceptibility to severe respiratory viral infections: pathogenic and therapeutic implications: a narrative review. *Br J Anaesth.* 2020 Aug 19:S0007-0912(20)30563-8
- [10] Galdiero M. and Napoli C. Early reactive inflammatory mechanisms during COVID-19: Therapeutic Implications. In press on *Viral Immunology*
- [11] Stelitano D, Prasad-Goldklang M, Zhu Y, Bovier FT, Kalantarov GF, Mathieu C, Horvat B, Franci G, Cennamo M, Portella G, Galdiero M, Trakht IM, Moscona A, Whitt MA, Porotto M. Rapid and flexible platform to assess anti SARS-CoV-2 antibodies neutralization properties. Submitted
- [12] Peiris J.S. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003;361(9366):1319-1325
- [13] Reed C, Angulo FJ, Swerdlow DL, Lipsitch M, Meltzer MI, Jernigan D, Finelli L. Estimates of the Prevalence of Pandemic (H1N1) 2009, United States, April–July 2009. *Emerg Infect Dis.* 2009 Dec; 15(12): 2004–2007
- [14] Zaki A.M. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 2012;367(19):1814–1820
- [15] Waheed Y. Ebola in West Africa: an international medical emergency *Asian Pac J Trop Biomed,* 4 (9) (2014), pp. 673-674
- [16] Ai JW, Zhang Y, Zhang W. Zika virus outbreak: 'a perfect storm'. *Emerg Microbes Infect.* 2016 Mar; 5(3): e21
- [17] Lassa fever – Nigeria: disease outbreak news. Geneva: World Health Organization, April 20, 2018 (<http://www.who.int/csr/don/20-april-2018-lassa-fever-nigeria/en/>. opens in new tab)
- [18] Bogoch II, Brady OJ, Kraemer MUG, et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. *The Lancet.* 2016; 387: 335 - 336
- [19] Chianese A, Stelitano D, Astorri R, Serretiello E, Della Rocca M, Melardo C, Vitiello M, Galdiero M, Franci G. West Nile virus: An overview of current information. *Translational Medicine Reports* 2019; volume 3:8145
- [20] Astorri R, Serretiello E, Zannella C, Folliero V, Galdiero M, Franci G, Crudele V, Vitiello M. Chikungunya virus: Update on molecular biology, epidemiology and current strategies. *Translational Medicine Reports* 2019; 3:8156
- [21] Chua KB. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science.* 2000; 288: 1432 - 1435
- [22] Serretiello E, Astorri R, Chianese A, Stelitano D, Zannella C, Folliero V, Santella B, Galdiero M, Franci G, Galdiero M. The emerging tick-borne Crimean-Congo haemorrhagic fever virus: A narrative review. *Travel Med Infect Dis* 2020;37:101871
- [23] De Liberato C, Frontoso R, Magliano A, Montemaggiori A, Autorino GL, Sala M, et al. Monitoring for the possible introduction of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Italy based on tick sampling on migratory birds and serological survey of sheep flocks. *Prev Vet Med* 2018;149:47-52

- [24] Pascucci I, Di Domenico M, Capobianco Dondona G, Di Gennaro A, Polci A, Capobianco Dondona A, et al. Assessing the role of migratory birds in the introduction of ticks and tick-borne pathogens from African countries: an Italian experience. *Ticks Tick Borne Dis* 2019;10(6):101272
- [25] Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med*. 2011; 364: 1523 - 1532
- [26] Parvez M, Parveen S. Evolution and Emergence of Pathogenic Viruses: Past, Present, and Future. *Intervirology* 2017;60(1-2):1-7
- [27] Dolan PT, Whitfield ZJ, Andino R. Mapping the Evolutionary Potential of RNA Viruses. *Cell Host & Microbe* 2018; 23(4):435-446
- [28] Finamore E, Vitiello M, Kampanaraki A, Rao M, Galdiero M, Galdiero E, Bevilacqua P, Gallo MA, Galdiero M. G2 as an emerging rotavirus strain in pediatric gastroenteritis in southern Italy. *Infection* volume 39, pages113–119; 2011
- [29] Holmes EC, Drummond AJ. The Evolutionary Genetics of Viral Emergence. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2007;315:51-66
- [30] Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1186–243
- [31] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992;56:152–79
- [32] Chen R, Holmes EC. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. *Mol Biol Evol* 2006;23:2336–41
- [33] Franci G, Palomba L, Falanga A, Zannella C, D’Orlando V, Rinaldi L, Galdiero S, Galdiero M. Influenza virus infections: clinical update, molecular biology, and therapeutic options. *The Microbiology of Respiratory System Infections*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804543-5.00001-4>
- [34] Daoust PY, Kibenge FS, Fouchier RA, van de Bildt MW, van Riel D, Kuiken T. Replication of low pathogenic avian influenza virus in naturally infected Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) causes no morphologic lesions. *J Wildl Dis* 2011;47:401–9
- [35] Franca MS, Brown JD. Influenza pathobiology and pathogenesis in avian species. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014;385:221–42
- [36] Trebbien R, Larsen LE, Viuff BM. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Viol J* 2011;8:434
- [37] Webster RG, Rott R. Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin. *Cell* 1987;50:665–6
- [38] Klenk HD, Garten W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *TIM* 1994;2:39–43
- [39] Bosch FX, Garten W, Klenk HD, Rott R. Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of Avian influenza viruses. *Virology* 1981;113:725–35
- [40] Kido H, Okumura Y, Takahashi E, et al. Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses. *J Mol Genet Med* 2008;3:167–75
- [41] Remacle AG, Shiryayev SA, Oh ES, et al. Substrate cleavage analysis of furin and related proprotein convertases. A comparative study. *J Biol Chem* 2008;283:20897–906
- [42] Taubenberger JK, Hultin JV, Morens DM. Discovery and characterization of the 1918 pandemic influenza virus in historical context. *Antivir Ther* 2007;12:581–91
- [43] Taubenberger JK, Morens DM. Influenza: the once and future pandemic. *Public Health Rep* 2010;125(Suppl 3):16–26
- [44] Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 1989;63:4603–8
- [45] Nakajima K, Desselberger U, Palese P. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature* 1978;274:334–9
- [46] Garten RJ, Davis CT, Russell CA, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009;325:197–201

- [47] Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 2009;459:1122–5
- [48] Maurer-Stroh S, Li Y, Bastien N, et al. Potential human adaptation mutation of influenza A(H5N1) virus, Canada. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1580–2; Yang ZF, Mok CK, Peiris JS, Zhong NS. Human Infection with a Novel Avian Influenza A(H5N6) Virus. *N Engl J Med* 2015;373:487–9
- [49] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med* 2013;368:1888–97
- [50] Wang D, Yang L, Gao R, et al. Genetic tuning of the novel avian influenza A(H7N9) virus during interspecies transmission, China, 2013. *Euro Surveill* 2014;19(25):pii: 20836
- [51] Chen H, Yuan H, Gao R, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet* 2014;383:714–21
- [52] Shi W, Shi Y, Wu Y, Liu D, Gao GF. Origin and molecular characterization of the human-infecting H6N1 influenza virus in Taiwan. *Protein Cell* 2013;4:846–53