

Workshop

AVIAN INFLUENZA AND PANDEMIC RISK

October 19, 2006

Summary

Lo stato dell'arte su ricerca, piani di intervento, epidemiologia e diagnostica, in relazione alla circolazione di virus influenzali con potenziale pandemico, sono stati gli argomenti trattati dai numerosi relatori, italiani ed internazionali, che hanno partecipato con originali presentazioni al Workshop, organizzato da ISS ed Università La Sapienza di Roma e svoltosi il 19 ottobre in ISS.

Il convegno ha avuto un carattere essenzialmente "operativo" ed ha inteso identificare le componenti chiave del Piano d'azione globale per il controllo dell'influenza aviaria e per limitare il rischio di una pandemia influenzale umana. Infatti, per la prima volta rispetto alle passate pandemie, la comunità scientifica ha l'opportunità di studiare e tentare di prevenire un evento pandemico, o almeno di limitarne l'impatto sulla popolazione umana.

Il Convegno ha avuto una speciale "Opening Lecture" da parte del Prof. R.G. Webster, uno dei massimi esperti di influenza a livello internazionale, che ha ripetutamente messo in chiaro i rischi concreti di una pandemia, ed è stato tra i primi esperti a livello mondiale ad essere chiamato a fronteggiare l'emergenza sanitaria ad Hong Kong nel 1997.

OPENING LECTURE

"Emerging influenza viruses: past and present"

R.G. WEBSTER

Il Prof. Webster ha presentato la sua relazione sull'evoluzione, gli aspetti clinici e la patogenesi dell'influenza aviaria ed umana.

Secondo Webster, una nuova pandemia di influenza è inevitabile. Tuttavia non è possibile sapere se sarà provocata dal virus H5N1 circolante dal 1997 ad oggi nelle popolazioni animali di Paesi del Sud-Est Asiatico, Europa ed Africa con numerosi casi di trasmissione all'uomo o da altri sottotipi virali (H7, H9), che pure si sono dimostrati capaci di superare la barriera di specie, provocando casi di infezione umana.

Webster ha ricordato che il Sud-Est asiatico è stato l'epicentro delle pandemie di influenza del 1957 e del 1968. In queste regioni sono comparsi i primi focolai causati dal virus H5N1 ed il virus continua a perpetuarsi nelle specie aviarie domestiche di queste aree geografiche, nonostante l'implementazione di piani di vaccinazione del pollame domestico. Il numero crescente dei focolai di infezione umana aumenta il rischio di evoluzione del virus verso l'acquisizione della capacità di facile e stabile trasmissione interumana, con conseguente adattamento alla specie umana.

Attualmente si distinguono almeno due lineaggi virali dell' H5N1, in uno dei quali sono riconoscibili almeno tre sottoclassi diverse, con caratteristiche antigeniche tali da richiedere una revisione del ceppo vaccinale utilizzato attualmente per la preparazione di vaccini pandemici sperimentali (vaccini mock-up) (H5N1 influenza continuing evolution and spread. [Webster RG, Govorkova EA.](#) (2006) N. Engl J. Med. Nov 23; 355(21):2174-7) Altro elemento di preoccupazione è l'evidenza di una diversa sensibilità ai farmaci

appartenenti alla classe degli adamantani ([Hurt AC, Selleck P, Komadina N, Shaw R, Brown L, Barr IG](#). Susceptibility of highly pathogenic A(H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes. *Antiviral Res.* 2006 Nov 10).

Un' ulteriore caratteristica è la ricorrenza stagionale del virus H5N1, che appare simile a quella dei virus influenzali umani: durante la stagione invernale si presentano i focolai negli animali ed i casi di trasmissione all'uomo. In base a questi dati ci si può attendere la recrudescenza del fenomeno nei prossimi mesi, con nuovi focolai nelle specie aviarie selvatiche in grado di trasmettere l'infezione al pollame.

SESSION I

AVIAN INFLUENZA AND EPIDEMIOLOGY

Chairpersons: M. Clementi, G. Palù

“Avian Influenza : an ecological approach by long term monitoring in wild bird species in Italy”

M. Delogu, L. Campitelli, I. Donatelli

La relazione del **Dr. Delogu** ha presentato una panoramica sull'attività di ricerca, svolta dal 1992 ad oggi all'interno di un'area di studio della Toscana (Oasi WWF di Orbetello), nell'ambito di studi in collaborazione con ISS, Università di Bologna, il WWF, l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia, con lo scopo di seguire nel tempo le popolazioni virali all'interno delle specie ospite ed inserite nel contesto ambientale. Tale attività si avvale di metodiche di campionamento stratificato in funzione delle classi di sesso e di età delle specie serbatoio (ad oggi con circa 10.000 soggetti esaminati) e dei loro rapporti potenziali con virus influenzali “endemic” e di nuova comparsa.

Lo studio ha evidenziato la presenza di molteplici sottotipi virali circolanti nelle popolazioni di uccelli acquatici selvatici in Italia. Sono stati studiati i ruoli ecologici tra le diverse specie simpatiche evidenziando come, all'interno degli Anseriformi (*Anatinae*) e di Rallidi sia sempre il Germano Reale (*Anas platyrhynchos*) ad avere nel tempo un ruolo principale nella circolazione dei virus influenzali. Le popolazioni virali isolate in tale specie risultano essere alquanto eterogenee e variabili nei diversi anni..

E' stato ulteriormente possibile isolare un virus (H7N3 LPAI), che da analisi filogenetiche risulta il precursore diretto di virus circolanti nelle popolazioni aviarie domestiche. Dati filogenetici preliminari sul sottotipo H1 dimostrano come questi virus presenti nelle popolazioni aviarie selvatiche studiate in Italia si discostino dai *clusters* Americani (aviari), Europei (aviari e suini) e classici (H1N1 della “Spagnola” e virus classici), aprendo nuove prospettive di visione sull'ecologia dei diversi sottotipi.

“Epidemiological models of Pandemic Influenza”

G. Rezza

Nella relazione del **Dr. G. Rezza** sono stati descritti i diversi fattori che determinano l'emergenza e la diffusione di una nuova malattia infettiva nella popolazione umana, con particolare riferimento alle condizioni che possono determinare un incremento della probabilità di contrarre un virus a partire da un focolaio animale (come

ad esempio modifiche nella densità di popolazione o di comportamenti umani), così come ai fattori che possono aumentare l'efficienza della trasmissione interumana (come ad esempio le mutazioni adattative del virus).

La recente epizoozia di influenza aviaria da H5N1 e l'insorgenza di casi umani attribuibili a contatto diretto con volatili infetti pone diversi interrogativi sulla possibile evoluzione verso l'emergenza di una pandemia. Finora il virus non si è dimostrato capace di trasmettersi in maniera efficiente da uomo a uomo e l'unica catena di trasmissione intrafamiliare ad oggi confermata non ha superato la seconda generazione di casi attribuibili a trasmissione interumana.

Non è tuttavia possibile predire se e quando l'H5N1 acquisirà la caratteristica di virus pandemico e se questo avverrà attraverso mutazioni sequenziali o attraverso fenomeni di ricombinazione genetica. In ogni caso resta da stabilire se i modelli epidemiologici utilizzati per l'influenza umana stagionale possono essere impiegati anche per stimare l'impatto di una eventuale pandemia da virus aviario "umanizzato".

SESSION II

PATHOGENICITY AND VIRUS – HOST INTERACTION

Chairpersons: G. Antonelli, A. Macri

"Enigmas of Influenza"

Y. Kawaoka

L'intervento del Prof. Y. Kawaoka ha affrontato la problematica relativa alla trasmissione interspecie dei virus influenzali soprattutto attraverso un brillante studio che ha impiegato lectine con affinità specifica ai residui $\alpha 2,3$ - (recettore aviario) od $\alpha 2,6$ -Gal (recettore umano).

L'affinità preferenziale a residui di acido sialico con legame $\alpha 2,3$ -Gal, quale importante fattore dell'inefficiente trasmissibilità dei virus di origine aviaria all'uomo, sembra avere una chiara controparte nella patologia virale nella scarsa presenza di tale recettore lungo l'alto tratto respiratorio umano, con una espressione quasi esclusivamente limitata alle basse vie respiratorie ed in particolare a cellule di giunzione bronchiolo-alveolare.

I dati qui presentati, unitamente ad un altro recente studio dello stesso autore ([Yamada S](#), [Suzuki Y](#), [Suzuki T](#), [Le MQ](#), [Nidom CA](#), [Sakai-Tagawa Y](#), [Muramoto Y](#), [Ito M](#), [Kiso M](#), [Horimoto T](#), [Shinya K](#), [Sawada T](#), [Kiso M](#), [Usui T](#), [Murata T](#), [Lin Y](#), [Hay A](#), [Haire LF](#), [Stevens DJ](#), [Russell RJ](#), [Gamblin SJ](#), [Skehel JJ](#), [Kawaoka Y](#). Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. Nature. 2006 Nov 16;444(7117):378-82.) basato su relazioni strutturali dell'HA di vari ceppi isolati di virus influenzali H5N1 nell'acquisizione della capacità di legame ad acido sialico $\alpha 2,6$ -Gal, tipico dei virus influenzali in circolazione nell'uomo, confermano l'importante ruolo dell'affinità di legame dell'HA a recettori specie-specifici quale elemento di barriera nella trasmissione interspecie di virus di origine aviaria potenzialmente pandemici all'uomo.

Altra parte dell'intervento ha riguardato dati di microscopia elettronica a favore di una organizzata disposizione degli 8 frammenti ribonucleoproteici (RNP) costituenti il

genoma virale. Tale evidenza, unitamente a precedenti studi dell'autore sull'esistenza di regioni nucleotidiche responsabili di una selettiva incorporazione delle RNP, favoriscono definitivamente l'idea di un meccanismo selettivo di assemblaggio del genoma virale in seguito ad interazioni specifiche tra RNP, suggerendo altresì un possibile target per l'azione di antivirali.

“Influenza virus and cell apoptosis”

Z. Zakeri

L'influenza, come molti altri virus, può indurre morte della cellula ospite interagendo in diversi modi con la machinery cellulare. Il gruppo diretto dalla Prof. ssa **Zakeri** ha studiato i meccanismi utilizzati dal virus influenzale per uccidere la cellula ospite attraverso un processo apoptotico. Il virus è in grado di provocare un danno mitocondriale con aumentata permeabilità di membrana e rilascio di citocromo c che è indipendente dall'espressione di proteine anti-apoptotiche della famiglia di Bcl-2. Sorprendentemente, sia la caspasi 3 che la caspasi 8, enzimi effettori di morte per apoptosi, non sono essenziali per il killing della cellula, indotto dal virus in quanto la loro inibizione determina solo un cambiamento del tipo di morte cui va incontro la cellula. I risultati mostrati hanno indicato nel complesso che il virus influenzale è in grado di utilizzare vie diverse e “spesso alternative” per indurre la morte cellulare e questo può influire nella patogenesi e nella progressione della malattia

“Intracellular signals and influenza virus pathogenesis”

A.T. Palamara, L. Nencioni

La relazione della Prof. **Palamara** è stata focalizzata sui meccanismi molecolari attraverso i quali la cellula ospite controlla il ciclo replicativo del virus influenzale così come la risposta infiammatoria all'infezione. Recenti risultati ottenuti dal suo gruppo di ricerca presso l'Università di Roma “la Sapienza” hanno dimostrato che il virus, entrando nella cellula, provoca uno shift dello stato ossido-riduttivo intracitoplasmatico che passa da condizioni fisiologicamente riducenti a condizioni temporaneamente ossidanti. Questo fenomeno favorisce la replicazione virale ed il processo infiammatorio in quanto contribuisce all'attivazione di fattori di trascrizione e di chinasi intracitoplasmatiche, oltre che al corretto folding di proteine virali. Gli studi finora effettuati gettano le basi per l'identificazione di nuove strategie antinfluenzali basate sull'interferenza con pathways cellulari che possono costituire target utilizzabili per il trattamento “in toto” dell'infezione provocata da tutti i ceppi virali riducendo al minimo la probabilità di selezione di varianti resistenti

“Influenza virus and regulation of inflammatory cytokine production”

M.G. Santoro

L'intervento della Prof.ssa **M.G. Santoro** è stato focalizzato sulla relazione tra patogenesi e risposta infiammatoria, conseguente all'infezione con virus influenzale. Il rilascio di citochine, particolarmente IL-8, a seguito dell'attivazione di NF-kB dovuta ad

una attività chinasi del fattore I κ B indotta dall'infezione virale, appare inibito da ciclopentenoni prostanoidi. L'efficace protezione ottenuta con questi composti nei riguardi di infezioni con dosi letali di virus dell'influenza in modello murino, implica importanti possibili applicazioni terapeutiche in tal senso.

“Influenza and T cell immunity in mice”

M.R. Castrucci

A conclusione della sessione, la Dott.ssa **M.R. Castrucci** ha riportato l'evidenza di un sostanziale incremento della risposta citotossica al virus dell'influenza dopo singola immunizzazione con virus intero inattivato, combinata ad un breve trattamento dei topi con cloroquina. Pur nel rispetto di un riconosciuto e primario ruolo degli anticorpi neutralizzanti nella protezione dall'infezione con virus influenzali, tale strategia di immunizzazione costituisce una interessante prospettiva di miglioramento sulla indicibilità di una risposta citotossica da parte di vaccini inattivati in generale ed in particolare da virus influenzale inattivato intero. Essa inoltre costituisce un contributo agli studi su un possibile vaccino anti-influenzale universale.

SESSION III

CONTROL STRATEGIES FOR AVIAN AND PANDEMIC INFLUENZA

Chairpersons: R. Marabelli, S. Salmaso

“The Global challenges of Pandemic Influenza”

P.R. Gully

Il Dott. **P. Gully** ha illustrato il punto di vista dell'OMS riguardo al rischio di pandemia ed alle azioni di controllo della pandemia previste dal “WHO Strategic Action Plan for Pandemic Influenza” (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/index.html), tra cui rientra il rafforzamento del sistema di allerta rapida internazionale, impiego di metodi diagnostici rapidi e il coordinamento globale degli studi per lo sviluppo di un vaccino pandemico.

“Control strategies for Avian Influenza in poultry”

G. Cattoli

Il Dott. **G. Cattoli** ha descritto le strategie di controllo per contenere la circolazione dei virus influenzali aviari negli allevamenti avicoli, affrontando l'argomento controverso della vaccinazione contro l'influenza aviaria, e ricordando che per evitare i rischi correlati (possibilità che il virus diventi endemico nel paese o la possibilità di indurre drift antigenico) è fondamentale che vengano rispettate rigorose condizioni di biosicurezza e che l'intervento vaccinale sia eseguita all'interno di Piani di sorveglianza delle popolazioni vaccinate (<http://www.izsvenezie.it/>).

“Italian National Pandemic Plan”

D. Greco

Il Dott. **D. Greco** ha presentato il Piano Pandemico Italiano (<http://www.ccm.ministerosalute.it/>), che si sviluppa secondo le sei fasi pandemiche

dichiarate dal WHO - prevedendo per ogni fase e livello, obiettivi ed azioni - e rappresenta il riferimento nazionale in base al quale saranno messi a punto i Piani operativi regionali. Inoltre ha descritto l'articolazione della struttura operativa, che comprenderà un'unità centrale di crisi presso il Centro per il Controllo delle Malattie (CCM), unità territoriali presso gli assessorati regionali alla Sanità e unità locali negli ospedali. Un obiettivo prioritario del Piano è il rafforzamento del sistema di sorveglianza virologica, che è già in fase di implementazione nell'ambito di un programma congiunto ISS-CCM, che sarà trattato nella successiva sessione, dedicata al ruolo del Laboratorio ed alla costruzione/allargamento della rete dei Laboratori periferici.

“Adjuvant- based solutions for pandemic influenza vaccine”

R. Rappuoli

Il Dott. **R. Rappuoli** ha affrontato il tema della preparazione di un vaccino pandemico, evidenziando la difficoltà di ottenere una soddisfacente risposta protettiva e la necessità di produrre un numero di dosi sufficiente a soddisfare l'aumentato fabbisogno mondiale in caso di pandemia. Una soluzione proposta prevede l'uso di un vaccino contenente una sostanza adiuvante (MF59), peraltro già contenuto nei vaccini stagionali, che permette di ridurre la quantità di proteina virale necessaria a indurre immunità protettiva e che ha mostrato la capacità di indurre una ampia immunità cross-reattiva, si diversi tipi di virus influenzali umani ed aviari

SESSION IV

THE ROLE OF LABORATORY FOR THE EARLY CONTAINEMENT OF AN INFLUENZA PANDEMIC

Chairpersons: P. Verani, P. Crovari

“The diagnostic methods for Pandemic Influeza”

M. Zambon

La Dr.ssa **M. Zambon** ha trattato la complessa tematica relativa ai metodi diagnostici utilizzabili in caso di pandemia. Il ruolo del laboratorio risulta, infatti, fondamentale nella prevenzione e/o gestione di qualsiasi emergenza infettivologica, permettendo la rapida identificazione dei primi focolai di infezione. Questo consente di circoscrivere ed eradicare l'infezione o, almeno, di rallentarne la diffusione nella popolazione. L'efficacia degli interventi è condizionata dalla disponibilità di metodiche rapide, sensibili e specifiche (Real time RT-PCR con sonde di nuova generazione).

Particolare attenzione è stata dedicata alla descrizione degli algoritmi clinici e diagnostici stabiliti dall'OMS, alla qualificazione dei Laboratori di Referenza accreditati per la diagnostica di virus a potenziale pandemico, attraverso la partecipazione a programmi internazionali di Controllo di Qualità.

Infine sono state descritte nuove metodiche (test Munana, test di Pyrosequencing), in grado di valutare la resistenza virale ai farmaci antinfluenzali attualmente disponibili, quali gli Inibitori della neuraminidasi e gli adamantani. Queste tecniche sono state sviluppate e sono ancora in corso di validazione, nell'ambito di un progetto “European

Vigilance Network against Viral Resistance-Virgil) , che vede tra i Laboratori partecipanti sia la Health Protection Agency (HPA) che l'ISS.

“Italian influenza surveillance system”

I. Donatelli, S. Puzelli, G. Morace

La Dr.ssa **I. Donatelli** ha descritto le attività di sorveglianza virologica condotte in Italia dal *National Influenza Centre-NIC* dell'ISS, in collaborazione con il Ministero della Salute ed un network di 15 laboratori periferici (rete Influnet) , sia in riferimento alle attività svolte in periodo inter-pandemico e finalizzate all'aggiornamento annuale della composizione vaccinale, sia in riferimento alle nuove misure previste dal Piano Pandemico Nazionale (<http://www.ccm.ministerosalute.it>) , per quanto si riferisce al rafforzamento della rete dei laboratori diagnostici. In particolare, nell'ambito delle misure messe in atto dall'OMS per rendere la rete internazionale dei laboratori partecipanti al *WHO Global Influenza Programme-GIP* , sono stati riportati i risultati del primo Quality Control Assessment-QCA, a cui ha partecipato anche il NIC-ISS, ottenendo il pieno riconoscimento delle sue competenze, in termini di capacità diagnostiche. Analogo programma di verifica è attualmente in corso, nell'ambito di un programma congiunto CCM-ISS., per la valutazione delle capacità diagnostiche della rete nazionale dei laboratori Influnet. Sono stati riportati i risultati della prima fase del *trial* e presentato il conseguente programma di addestramento tecnico-scientifico, che sarà svolto presso i laboratori del Dipartimento di Malattie Infettive dell'ISS.

“New approaches for detection of Avian Influenza Viruses”

L. Di Trani

A chiusura del meeting nella relazione della Dott.ssa **L. Di Trani** sono state evidenziate le fasi di sviluppo ed esempi di applicazioni di metodiche diagnostiche molecolari, quali Real Time PCR (RRT-PCR) e microarrays , applicate alla identificazione dei virus influenzali.

Infatti nella fase di emergenza legata al rischio della circolazione del virus H5N1 nei paesi del Sud Est asiatico, in Africa ed Europa, il controllo della infezione nelle specie aviarie selvatiche prevede un rafforzamento ed un ampliamento di piani di monitoraggio e sorveglianza negli animali domestici e nei volatili selvatici. L'approccio molecolare, mediante test dotati di elevata sensibilità e specificità, consente di ridurre i costi delle prove ed i tempi di analisi. Oltre che per la diagnostica tali saggi possono essere applicati a studi di patogenesi virale e identificazione del virus da matrici biologiche diverse.

“Discussion and Closing remarks”

Convened by Prof. A. Cassone

Il Direttore di Dipartimento ha chiuso il Convegno facendo il punto sul rischio di pandemia influenzale emerso dai vari interventi e sulle risposte da dare a questo rischio. Il ha messo soprattutto in evidenza che la migliore preparedness ad una pandemia viene assicurata dal costante e diuturno intervento di contrasto alle patologie infettive emergenti

su scala globale ed assicurando qualità e competenze nella rete dei laboratori di microbiologia, a livello locale, regionale e di riferimento nazionale.