

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Indagini virologiche e siero-epidemiologiche
su virus influenzali aviari
e sviluppo di un vaccino pandemico**

**Progetto europeo FLUPAN
“Preparing for an influenza pandemic”
Rapporto preliminare**

Laura Campitelli (a), Marzia Facchini (a), Angela Di Martino (a),
Domenico Spagnolo (a), Laura Calzoletti (a), Concetta Fabiani (a),
Barbara Bedini (b), Tiziana Grisetti (a), Livia Di Trani (b), Isabella Donatelli (a)

*(a) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate
(b) Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN
06/22**

Istituto Superiore di Sanità

Indagini virologiche e siero-epidemiologiche su virus influenzali aviari e sviluppo di un vaccino pandemico. Progetto europeo FLUPAN "Preparing for an influenza pandemic". Rapporto preliminare.

Laura Campitelli, Marzia Facchini, Angela Di Martino, Domenico Spagnolo, Laura Calzoletti, Concetta Fabiani, Barbara Bedini, Tiziana Grisetti, Livia Di Trani, Isabella Donatelli
2006, 28 p. Rapporti ISTISAN 06/22

Le pandemie influenzali hanno sempre un severo impatto sulla salute pubblica, come dimostrano gli elevati tassi di morbosità e mortalità ad esse associati. L'epidemia di influenza aviaria verificatasi nel 1997 ad Hong Kong e causata da un virus H5N1, che ha colpito anche 18 persone provocando 6 decessi, ha rappresentato un'allerta che ha per la prima volta messo in luce la insufficiente preparazione, a livello mondiale, nel fronteggiare un possibile evento pandemico. Per questa ragione, nel 2001 la Comunità Europea, nell'ambito del V Programma Quadro della ricerca, ha finanziato un Progetto volto a migliorare la capacità dell'Europa di prevenire o controllare una pandemia, attraverso la messa a punto di vari strumenti, primo dei quali il vaccino pandemico. Il Progetto FLUPAN, a cui ha partecipato anche l'Istituto Superiore di Sanità, è iniziato nel 2001 e si concluderà alla fine del 2006. Nel presente rapporto sono descritti i risultati preliminari del progetto.

Parole chiave: Influenza, Pandemia, Vaccino

Istituto Superiore di Sanità

Virological and seroepidemiological investigations on avian influenza viruses and pandemic vaccine development. European project FLUPAN "Preparing for an influenza pandemic". Progress report.

Laura Campitelli, Marzia Facchini, Angela Di Martino, Domenico Spagnolo, Laura Calzoletti, Concetta Fabiani, Barbara Bedini, Tiziana Grisetti, Livia Di Trani, Isabella Donatelli
2006, 28 p. Rapporti ISTISAN 06/22 (in Italian)

Influenza pandemics have a huge impact on public health, as shown by the usually high rates of associated morbidity and mortality. Recently in Hong Kong a pandemic warning occurred, when a lethal chicken H5N1 virus crossed the species barrier into man and 18 people became ill, a third of them dying as a result. This event pointed out that at global level there is insufficient preparation to cope with a possible pandemic. FLUPAN is a European research project on pandemic influenza, funded within EC the V framework research programme. The main aim is to improve the European capacity to manage pandemic event primarily by producing a safe and effective vaccine against highly pathogenic avian influenza viruses. The Istituto Superiore di Sanità (the National Institute of Health in Italy) has taken part into this Project that started in 2001 and will be completed by the end of 2006. In this report preliminary results are described.

Key words: Influenza, Pandemic, Vaccine

Si ringraziano per la preziosa collaborazione: Simona Puzelli, Graziella Morace, Francesca Beneduce (*Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità*).

Per informazioni su questo documento scrivere a: campitel@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2006

INDICE

Pandemie influenzali: problematiche relative a nuovi virus e sviluppo di un vaccino <i>ad hoc</i>	1
FLUPAN: obiettivi e articolazione del progetto	4
Obiettivi del progetto	4
Articolazione del progetto e gruppi partecipanti.....	4
Risultati preliminari del progetto	7
Monitoraggio della circolazione di virus influenzali in specie animali	7
Selezione di ceppi virali per la produzione di vaccini	16
Sviluppo di un vaccino pandemico ottenuto da un ceppo aviario ad alta patogenicità	17
Generazione del virus vaccinale.....	17
Allestimento del vaccino inattivato	20
Allestimento di una batteria di ceppi prototipi e dei reagenti per il controllo di qualità del vaccino pandemico.....	21
Sviluppo di metodiche sierologiche alternative per la identificazione di anticorpi verso virus aviari nell'uomo e in altri mammiferi	21
Sierosorveglianza nell'uomo	21
Conclusioni	24
Bibliografia	27

PANDEMIE INFLUENZALI: PROBLEMATICHE RELATIVE A NUOVI VIRUS E SVILUPPO DI UN VACCINO AD HOC

Le pandemie influenzali sono associate ad alta morbosità, mortalità e a sconvolgimenti dell'organizzazione sociale ed economica dei paesi colpiti. Tre di tali eventi si sono verificati nel XX secolo: nel 1918, nel 1957 e nel 1968. La pandemia del 1918-1919 in particolare ha provocato dai 40 ai 50 milioni di morti in tutto il mondo, molti dei quali tra adulti giovani e sani, che di solito rappresentano la fascia di età meno colpita dalle forme cliniche più gravi dell'influenza. Le pandemie influenzali sono causate da virus influenzali di tipo A, il cui spettro d'ospite va dagli uccelli acquatici selvatici (che costituiscono il serbatoio naturale di questi microrganismi) a una varietà sempre più ampia di specie sia aviarie che di mammiferi, incluso l'uomo. Uno degli avanzamenti più importanti degli ultimi 40 anni nell'ambito della epidemiologia dell'influenza è stata la scoperta che i virus responsabili delle due ultime pandemie (1957 e 1968) erano derivati da un rimescolamento genetico tra virus influenzali che infettano specificamente gli uccelli acquatici selvatici, e virus influenzali tipici dell'uomo (1). Lo scambio di segmenti genici (o riassortimento genetico) tra virus influenzali di tipo A è reso possibile dal fatto che il genoma è costituito da 8 segmenti distinti, i quali codificano per 11 proteine. L'influenza nella sua forma pandemica si caratterizza quindi come una zoonosi, ma fino al 1997 si riteneva che l'introduzione di un virus aviario nell'uomo potesse avvenire solo in seguito a co-infezione di un opportuno ospite intermedio (es. il suino) con un virus aviario e uno tipicamente umano, seguita dalla generazione di un nuovo ceppo riassortante (2).

Dal 1968, data dell'ultima pandemia, l'epidemia di influenza aviaria causata da un virus di sottotipo H5N1, verificatasi ad Hong Kong nel 1997, ha rappresentato il primo vero campanello d'allarme dal punto di vista del rischio pandemico e un punto di svolta nella comprensione delle modalità di trasmissione interspecie del virus influenzale (3-4). Infatti, per la prima volta si sono verificati passaggi multipli di virus influenzali direttamente dai volatili all'uomo, indicando l'esistenza di un altro possibile meccanismo sottostante l'emergenza di ceppi pandemici (4). Inoltre, il virus responsabile si è rivelato letale per il pollame, e in 1/3 dei casi (6/18) anche nell'uomo. Se questo virus ad alta patogenicità avesse acquisito la capacità di trasmettersi efficacemente da uomo a uomo le conseguenze a livello mondiale avrebbero potuto essere devastanti. L'eradicazione del virus da Hong Kong, ottenuta attraverso la distruzione di tutto il pollame vivo locale, ha posto fine all'allarme pandemico (5). L'eventualità che si verifichi la successione di eventi che possono determinare la comparsa di un ceppo pandemico è rara e soprattutto imprevedibile. Tuttavia la consistente periodicità delle pandemie (i documenti storici indicano che eventi di tipo pandemico si sono verificati costantemente nei secoli passati) e il ripetersi di nuovi episodi di trasmissione diretta dagli uccelli all'uomo a partire dal 1997 hanno indotto la comunità scientifica e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ad avviare una serie di iniziative volte a migliorare la preparazione della comunità internazionale nei confronti di una pandemia (6). In particolare, gli sforzi si sono concentrati sull'allestimento di un vaccino *ad hoc* dal momento che, anche in caso di pandemia, il vaccino rimane lo strumento di prevenzione e controllo più efficace dell'influenza.

Le peculiari caratteristiche del virus H5N1, qui di seguito elencate, hanno però messo in evidenza l'inadeguatezza delle metodologie tradizionalmente usate per produrre i ceppi vaccinali diretti contro l'influenza epidemica o stagionale. Le principali problematiche emerse sono le seguenti:

1. Il virus H5N1 è un virus ad alta patogenicità (*High Pathogenicity*, HP), cioè è letale per il pollame domestico. I virus HP possono appartenere a due sottotipi del virus influenzale di tipo A, H5 e H7, e devono la loro alta virulenza alla inserzione di una sequenza di aminoacidi multibasici nel sito di clivaggio dell'emagglutinina (HA), la proteina responsabile del legame del virus al recettore cellulare e il principale antigene virale (7). Questi virus sono potenzialmente pericolosi sia per l'uomo che per l'ambiente. Inoltre sono letali per le uova embrionate di pollo, il substrato di crescita dei ceppi vaccinali influenzali. Pertanto per la preparazione di vaccino è necessario utilizzare unicamente virus a bassa patogenicità, che non presentano la sequenza amminoacidica citata.
2. La strategia inizialmente usata per ottenere un virus attenuato è consistita nell'utilizzo di un sottotipo H5N3 non-patogeno, antigenicamente simile al virus H5N1, per produrre un ceppo vaccinale mediante il sistema classico dei virus riassortanti ad alta crescita: il metodo prevede l'infezione contemporanea di uova embrionate con il ceppo antigenicamente rilevante e con un ceppo attenuato per l'uomo in grado di replicarsi efficacemente in tale substrato. In questo modo è possibile isolare un virus il cui corredo genetico è costituito dai 2 segmenti che codificano per le proteine di superficie (HA ed NA) del ceppo antigenicamente di interesse, mentre i restanti 6 segmenti del genoma virale influenzale derivano dal ceppo ad alta crescita, di solito è rappresentato dal virus umano, A/PR/8/34 (8). Questa strategia può richiedere tempi lunghi e, nel caso del virus H5N3, non ha prodotto il riassortante desiderato; si è ottenuto un virus vaccinale a basso titolo, scarsamente immunogenico.
3. La disponibilità di dosi sufficienti di vaccino, anche dopo l'ottenimento di un ceppo vaccinale con caratteristiche antigeniche idonee e a titolo elevato, sarebbe comunque fortemente limitata dal numero di uova embrionate a disposizione, non è espandibile oltre un certo limite.
4. Un altro importante problema, emerso a seguito dell'episodio di Hong Kong, è dato dal fatto che il test sierologico più comunemente usato per valutare la risposta anticorpale verso il virus o il vaccino influenzale, vale a dire il test di inibizione della emagglutinazione (*Haemagglutination Inhibition*, HI) (test HI), risulta poco sensibile per l'identificazione di anticorpi specifici diretti verso i virus influenzali di tipo aviario (9). Ciò comporta la difficoltà, da una parte, di effettuare studi di sierosorveglianza nell'uomo volti a evidenziare forme di trasmissione subclinica di virus aviari, dall'altra di valutare la immunogenicità di un vaccino pandemico ottenuto a partire da un virus aviario.
5. Sono risultate evidenti le scarse conoscenze sulla diffusione e le caratteristiche dei virus aviari presenti nel serbatoio degli uccelli acquatici selvatici e sui fattori epidemiologici che ne favoriscono il passaggio al pollame di allevamento, quest'ultimo essendo all'origine di tutti i casi di trasmissione di virus aviario all'uomo verificatisi finora.
6. Gli allarmi pandemici più significativi a tutt'oggi sono stati causati dal virus H5N1, che dal 2003 ha ripreso a circolare nel pollame del Sud-Est Asiatico, con numerosi casi associati di trasmissione all'uomo (10), e in misura minore dal virus H7N7, che in Olanda nel 2003 si è trasmesso dal pollame all'uomo causando più di 80 casi di infezione, uno dei quali mortale (11). Malgrado ciò, al momento non possiamo sapere con certezza se la prossima pandemia sarà provocata da questi o da altri virus aviari. Poiché i sottotipi di emagglutinine aviarie di tipo A sono 16, è possibile che altri sottotipi emergano dal serbatoio animale. Sarebbe quindi importante disporre di una batteria di ceppi prototipi rappresentativi di tutti i sottotipi, consentendo una notevole riduzione dei tempi per la messa a punto di un eventuale ceppo vaccinale. Per la stessa ragione, sarebbe

fondamentale che i reagenti di referenza (antigeni ed antisieri opportunamente calibrati), necessari per il controllo di qualità (identità e contenuto antigenico) dei vaccini eventualmente prodotti a partire dagli stessi ceppi prototipi, fossero già disponibili in caso di dichiarazione di una pandemia influenzale .

Per affrontare i problemi su esposti e mettere in condizione l'Europa di produrre un vaccino innocuo ed efficace nei confronti di virus influenzali aviari ad alta patogenicità in tempi ragionevolmente rapidi, nel 2001 la Comunità Europea ha finanziato il progetto denominato "Preparing for an Influenza Pandemic" (conosciuto con l'acronimo FLUPAN). Questo progetto ha rappresentato il primo tentativo di affrontare le problematiche legate ad una eventuale pandemia con un approccio unitario, che dalla sorveglianza del virus negli animali arriva fino alla valutazione in trial clinici della immunogenicità e sicurezza del vaccino ottenuto a partire da un ceppo di campo ad alta patogenicità.

FLUPAN: OBIETTIVI E ARTICOLAZIONE DEL PROGETTO

Obiettivi del progetto

Scopo generale del progetto era quello di utilizzare tecnologie innovative oltre a quelle già disponibili per valutare i punti chiave delle azioni da intraprendere in caso di pandemia influenzale. Gli obiettivi specifici del progetto erano i seguenti:

- Intensificare la sorveglianza dell'influenza nelle specie animali per avere il quadro aggiornato dei sottotipi di virus influenzali nei serbatoi animali (volatili selvatici e domestici, suini) nell'Unione Europea (EU), attraverso studi di caratterizzazione antigenica e genetica che permettessero anche di selezionare i ceppi virali da utilizzare per la messa a punto di vaccini pandemici.
- Sviluppare un metodo affidabile per attenuare un virus aviario ad alta patogenicità, mediante la tecnologia detta “*reverse genetics* basata su plasmidi” (vaccino geneticamente modificato o GM).
- Produrre un ceppo vaccinale attenuato in grado di crescere ad alto titolo su colture cellulari, così da aumentare la capacità produttiva di vaccini, riducendo la dipendenza dalla disponibilità di uova embrionate.
- Valutare la sicurezza, l'immunogenicità e l'efficacia protettiva del vaccino pandemico GM in vari modelli animali (topo, furetto, pollo).
- Valutare la sicurezza ed immunogenicità del vaccino pandemico GM in trial clinici effettuati su soggetti giovani sani.
- Allestire una batteria di ceppi vaccinali prototipi, ottenuti con il metodo dei riassorbanti ad alta crescita, per i vari sottotipi potenzialmente pandemici, e di reagenti necessari per il controllo di qualità dei vaccini prodotti a partire dagli stessi ceppi.
- Allestire saggi anticorpali innovativi per la siero-sorveglianza delle infezioni umane con virus aviari e la risposta anticorpale dei soggetti vaccinati con vaccino pandemico GM.

Articolazione del progetto e gruppi partecipanti

Il progetto FLUPAN è organizzato in 8 gruppi di attività o *workpackage* (WP) portati avanti da 6 unità operative, coordinate dal Partner 1. Di seguito sono elencati i gruppi di ricerca partecipanti e i relativi *workpackage* in cui sono stati coinvolti:

- *Partner 1*
National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC) – UK
Responsabile J.M. Wood → WP4, WP5, WP7
- *Partner 2*
University of Reading – UK
Responsabile W. Barclay → WP2

- *Partner 3*
Istituto Superiore di Sanità – Italia
Responsabile I. Donatelli →WP1, WP8
- *Partner 4*
Health Protection Agency (HPA) – UK
Responsabile M. Zambon →WP4, WP8
- *Partner 5*
Aventis Pasteur Merieux (APM) – Francia
Responsabile F. Vogel →WP3
- *Partner 6*
University of Bergen – Norvegia
Responsabile L. Haaheim →WP5, WP6

Nell'ambito del WP1 (Partner 3) era previsto, per l'intera durata del progetto, il monitoraggio della circolazione dei virus influenzali nelle specie animali aviarie e suine, la loro caratterizzazione antigenica e genetica, e la selezione dei ceppi virali per uso vaccinale, in particolare di ceppi ad alta patogenicità da utilizzare nei successivi esperimenti di attenuazione. Una parte di questa attività (i campionamenti degli animali) si è svolta sul territorio e si è avvalsa quindi della collaborazione di tre *sub-contractor*: l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (sezioni di Brescia e Parma), e l'Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica (Ozzano, Bo).

I ceppi ad alta patogenicità selezionati erano poi utilizzati per la messa a punto della tecnologia di *reverse genetics* con la quale il virus ad alta patogenicità veniva attenuato e quindi modificato in modo da ottenere il ceppo vaccinale desiderato (WP 2, Partner 2, in collaborazione con Partner 1).

Lo step successivo prevedeva lo sviluppo di un vaccino prototipo inattivato, a partire dal ceppo vaccinale ottenuto in WP2 e adattato a crescere su colture cellulari. Il vaccino era formulato in presenza /assenza di adiuvante, e la messa a punto teneva conto anche degli aspetti regolatori relativi alla produzione di un vaccino pandemico prodotto su linee cellulari al fine di ottenere l'autorizzazione all'immissione in commercio (WP3, Partner 5).

Il ceppo vaccinale ottenuto in WP2, nonché altri ceppi virali non-patogeni selezionati in WP1, erano utilizzati in parallelo per la produzione dei reagenti per il controllo di qualità del vaccino e per la creazione di una batteria di ceppi prototipi considerati più a rischio di trasmissione all'uomo (WP4, Partner 1).

Il ceppo vaccinale attenuato e inattivato ottenuto in WP3 era a sua volta utilizzato per valutare la sicurezza, l'immunogenicità e l'efficacia protettiva in vari modelli animali: topo, pollo, furetto (WP5, Partner 6 e 1).

Una volta verificata la sicurezza e l'efficacia del vaccino nei modelli animali, era previsto il passaggio ai trial clinici nell'uomo di fase 1 e 2 (WP6, Partner 6 in collaborazione con Partner 4).

In parallelo con lo sviluppo del vaccino pandemico, veniva effettuata la messa a punto di metodiche sierologiche alternative in grado di determinare efficacemente la risposta anticorpale verso virus e vaccini di origine aviaria sia nell'uomo che nell'animale. Lo studio veniva svolto inizialmente utilizzando sieri ottenuti da lavoratori professionalmente esposti a virus aviari durante epidemie di influenza aviaria verificatesi nel Nord Italia. Successivamente, le metodiche standardizzate erano usate per valutare la risposta anticorpale verso il vaccino pandemico sia negli animali che nell'uomo (WP8, Partner 4 in collaborazione con Partner 3).

In Figura 1 è illustrata l'articolazione del progetto, con i contributi dei singoli partner a ciascuno dei Workpackage.

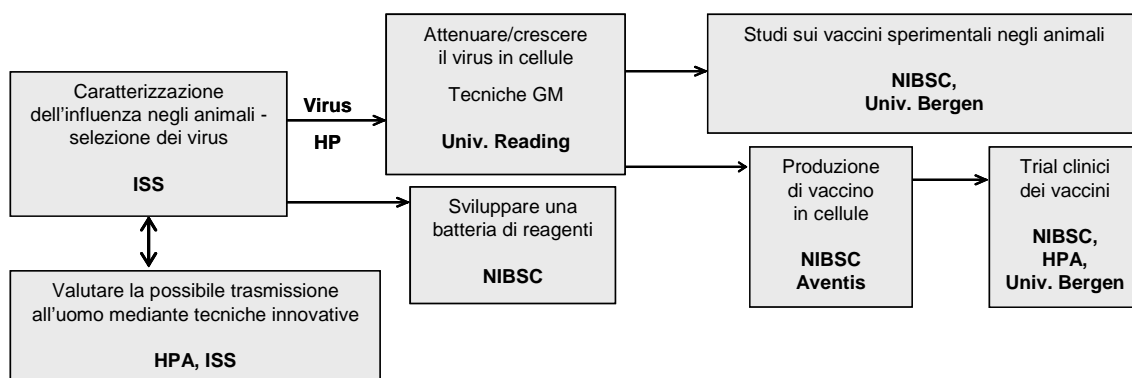


Figura 1. Rappresentazione schematica della articolazione del progetto FLUPAN

RISULTATI PRELIMINARI DEL PROGETTO

Monitoraggio della circolazione di virus influenzali in specie animali

Le specie animali monitorate erano: a) uccelli acquatici selvatici migratori e non, campionati nelle zone umide della Laguna di Orbetello a prosecuzione di un programma di monitoraggio iniziato nel 1992 (12); b) pollame domestico di allevamenti industriali del Nord Italia, e c) suini di allevamento nella zona di Parma. In totale, nel corso di 4 anni sono stati raccolti e analizzati più di 1500 campioni cloacali prelevati da uccelli selvatici, oltre 5000 campioni tracheali e cloacali da pollame domestico e circa 600 campioni da suini. In Tabella 1 sono indicati i sottotipi virali identificati complessivamente.

Tabella 1. Elenco dei sottotipi isolati nelle diverse specie animali nel periodo 1999-2004

Specie animale	Sottotipo virale isolato
Uccelli acquatici selvatici	H1N1 H2N3 H3N8 H4N2 H4N6 H4N8 H5N2 H5N3 H6N5 H6N8 H7N1 H7N3 H8N4 H8N5 H10N2 H10N8 H11N6
Pollame domestico	H5N2 - LP H7N1 - HP H7N1 - LP H7N3 - LP
Suini	H9N2 - LP H1N1 H1N2 H3N2

LP = isolati virali a bassa patogenicità; **HP** = isolati virali ad alta patogenicità

Nell'ambito di queste attività di monitoraggio, sono risultati di particolare rilevanza due virus influenzali di sottotipo H7N3 (A/Mallard/Italy/33/01 e A/Mallard/Italy/43/01) isolati per la prima volta in Italia da anatre selvatiche nell'autunno del 2001. Infatti, un anno dopo, nel 2002, un virus dello stesso sottotipo H7N3 ha causato una estesa epidemia nel pollame domestico degli allevamenti del Nord Italia, e pur trattandosi di un ceppo poco virulento per il pollame (ceppo a bassa patogenicità o LP), è stata motivo di gravi problemi per l'industria del settore, tanto da indurre la EU ad approvare una campagna vaccinale mirata nel pollame stesso.

Studi di caratterizzazione antigenica e molecolare hanno permesso di valutare le relazioni evolutive tra i virus circolanti nel serbatoio dei volatili selvatici e quelli dello stesso sottotipo isolati un anno dopo nel pollame domestico (rappresentati da A/Turkey/Italy/214845/02 e A/Turkey/Italy/220158/02, i primi due isolati dell'epidemia).

La caratterizzazione sierologica delle HA dei virus H7N3 degli uccelli selvatici e domestici in studio ha evidenziato un profilo antigenico indistinguibile tra i due gruppi (animali selvatici e domestici), come mostra la Tabella 2.

Tabella 2. Caratterizzazione antigenica dei virus influenzali analizzati mediante il test HI

Virus	Antisieri iperimmuni			Antisieri di furetto Ck/It/13474/99 (H7N1)		Anticorpo monoclonale
	RT/NJ *(C)	Ty/2676 (P)	Ty/214845 (P)	F4/02	F5/02	Ty/2676
A/Ruddy/Turnstone/NJ/65/85 (H7N3-LP)	5120	320	320	40	10	160
A/England/268/96 (H7N7-LP)	2560	320	320	40	40	160
A/Turkey/Italy/2676/99 (H7N1-LP)	5120	2560	640	160	80	1280
A/Mallard/Italy/250/02 (H7N1-LP)	5120	2560	640	160	80	1280
A/Mallard/Italy/33/01 (H7N3-LP)	5120	640	640	80	20	320
A/Mallard/Italy/43/01 (H7N3-LP)	5120	640	640	80	< ^a	320
A/Turkey/Italy/214845/02 (H7N3-LP)	5120	640	640	80	20	320
A/Turkey/Italy/220158/02 (H7N3-LP)	5120	640	640	80	< ^a	320
A/Duck/Jiangxi/1742/03 (H7N7-LP)	2560	640	640	80	40	160
A/Duck/Jiangxi/1760/03 (H7N7-LP)	2560	640	640	80	40	160
A/Duck/Jiangxi/1786/03 (H7N7-LP)	2560	640	640	80	40	160
A/Duck/Jiangxi/1814/03 (H7N7-LP)	2560	640	640	80	40	160
A/Mallard/Italy/299/05 (H7N7-LP)	2560	640	640	80	40	160

a: <10; **RT/NJ**: A/Ruddy/Turnstone/NJ/65/85; **Ty/2676**: A/Turkey/Italy/2676/99; **Ty/214845**: A/Turkey/Italy/214845/02;

*C: coniglio; P: pollo; F: furetto. LP: a bassa patogenicità; i titoli in grassetto indicano la reattività dei virus con l'antisiero omologo

Inoltre, il confronto delle sequenze nucleotidiche e delle dedotte sequenze aminoacidiche ha rilevato un elevatissimo grado di similarità, con valori compresi tra 99,0% e 99,9% per la sequenza nucleotidica e tra 99,0% e 100,0% per quella aminoacidica, confermando così i dati sierologici. In conclusione i ceppi isolati da specie aviarie selvatiche sono risultati strettamente correlati con i virus circolanti l'anno successivo nel pollame domestico.

In Tabella 3 sono mostrate le percentuali di similarità tra il virus A/ Turkey/Italy/214845/02 e A/Mallard/Italy/33/01, per tutti i segmenti genici.

Tabella 3. Omologie genetiche rispetto ad A/Mallard/Italy/33/01

Virus	Gene	HA1 (76-1021)		N3 (260-1189)		NP (41-505)		NS (16-816)		M1 (44-781)		PB1 (1456-2295)		PB2 (76-894)		PA (10-800)	
		nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
A/Turkey/Italy/214845/02 (H7N3-LP)	A/Mallard/Italy/199/01 (H7N3-LP)	99,4	99,7	99,0	99,0	99,6	98,7	99,6	99,3	98,9	99,2	99,8	100,0	99,8	99,6	99,4	100,0
A/Mallard/Italy/199/01 (H7N3-LP)		99,9	100,0	99,9	99,7	99,8	99,4	99,9	100,0	99,9	100,0	99,6	100,0	100,0 ^a	100,0	99,6	100,0
A/Turkey/Italy/2676/99 (H7N1-LP)		97,7	98,7	N.A.	N.A.	91,0	96,2	72,0	64,4	98,5	100,0	95,4	99,6	96,8	99,3	97,1	99,2
A/Mallard/Italy/250/02 (H7N1-LP)		99,6	99,0	N.A.	N.A.	96,6	98,7	98,4	99,3	95,9	100,0	95,2	99,6	96,0	99,6	99,7	99,6
A/Chicken/Netherlands/1/03 (H7N7-HP)	A/Netherland/219/03 (H7N7-HP)	97,3	99,0	N.A.	N.A.	94,7	98,7	98,3	96,6	95,0	100,0	96,7	99,6	97,4	99,6	95,4	99,6
A/Netherland/219/03 (H7N7-HP)		97,1	98,7	N.A.	N.A.	94,4	98,7	98,4	97,0	95,0	100,0	96,7	99,6	97,7	99,6	95,2	99,6
A/Duck/Jiangxi/1742/03 (H7N7-LP)	A/Mallard/Italy/299/05 (H7N7-LP)	96,3	98,7	N.A.	N.A.	98,1	99,4	98,6	99,3	98,5	100,0	94,3	99,6	96,5	98,9	95,6	98,9
A/Mallard/Italy/299/05 (H7N7-LP)		98,9	99,0	N.A.	N.A.	92,9	99,4	98,5	99,3	98,1	100,0	93,2	99,6	88,3	100,0	93,8 ^b	98,8

^a è stato possibile fare un'analisi dell'omologia solo del frammento nucleotidico 409-883^b è stato possibile fare un'analisi dell'omologia solo del frammento nucleotidico 1120-1871**LP** = isolati virali a bassa patogenicità; **HP** = isolati virali ad alta patogenicità**nt**: sequenza nucleotidica;**aa**: sequenza aminoacidica

L'analisi genetica del gene per la neuraminidasi (NA), la seconda proteina di superficie del virus con funzione di sialidasi, ha inoltre dimostrato che i due gruppi di virus presentano una somiglianza del 99% a livello nucleotidico per quasi tutta la lunghezza del gene, con l'unica, significativa eccezione rappresentata dalla regione dello stelo o *stalk* della molecola, nella quale i virus aviari domestici differiscono da quelli selvatici per la presenza di una delezione di 23 aminoacidi (Figura 2).

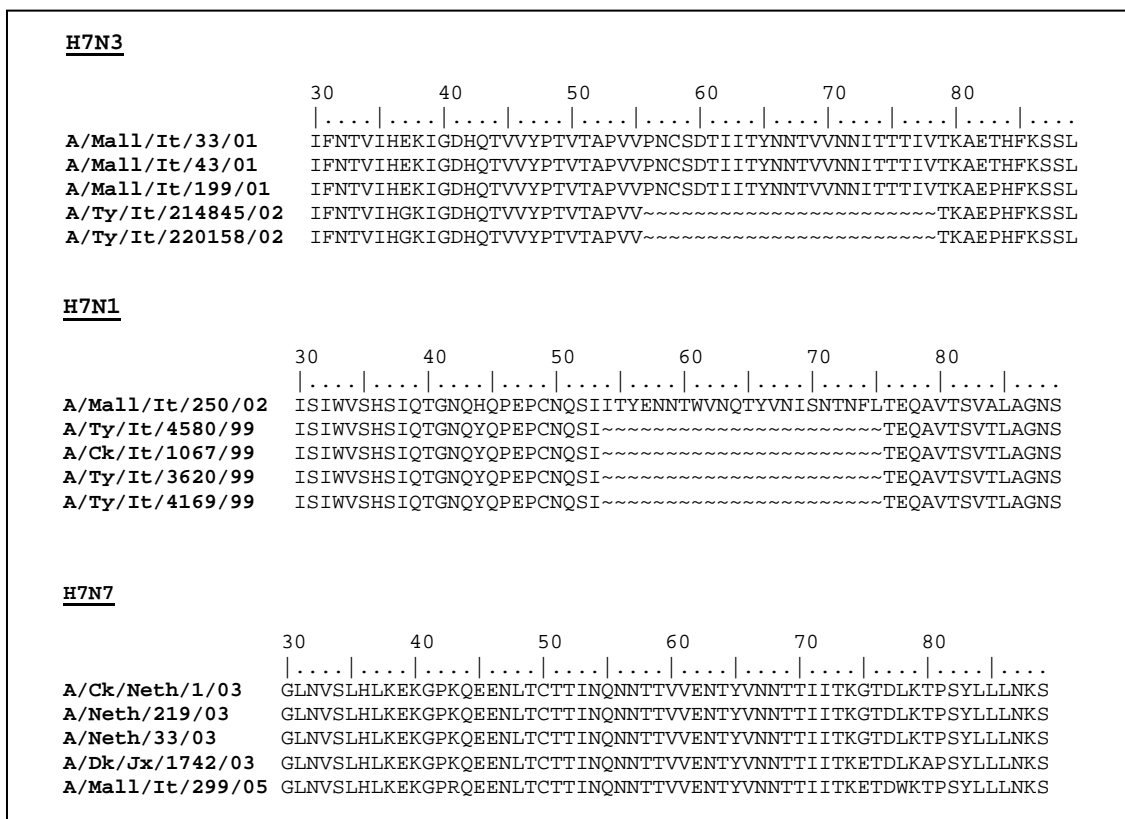


Figura 2. Allineamento della *stalk region* della NA dei virus N3, N1, N7

Una delezione di lunghezza variabile nella *stalk region* del gene NA, è una caratteristica frequentemente osservata in molti virus isolati dal pollame domestico e si ritiene che possa essere il risultato di un primo adattamento dei virus influenzali aviari selvatici, nei quali la delezione non è mai stata osservata, al pollame domestico, che rappresenta un ospite non naturale del virus influenzale (13). Il vantaggio adattativo nel pollame domestico di questa delezione (che *in vitro* determina una riduzione dell'attività sialidasica del virus) non è stato ancora chiarito (14-15).

L'analisi filogenetica di tutti i segmenti genici, esemplificata nel dendrogramma relativo al gene HA (Figura 3), conferma la stretta correlazione tra i due gruppi di virus.

I dati sopra riportati e l'osservazione che fino all'estate 2002 il regolare monitoraggio sierologico effettuato dagli Istituti Zooprofilattici non ha rilevato la presenza di virus di sottotipo H7 nel pollame domestico del Nord Italia, danno sostegno all'ipotesi che un ceppo virale influenzale di sottotipo H7N3, circolante nella popolazione degli uccelli acquatici migratori, sia entrato nella popolazione di uccelli domestici dell'Italia del Nord durante i movimenti migratori delle anatre selvatiche tra l'Italia e il Nord Europa, dove si trovano i siti riproduttivi di tali specie.

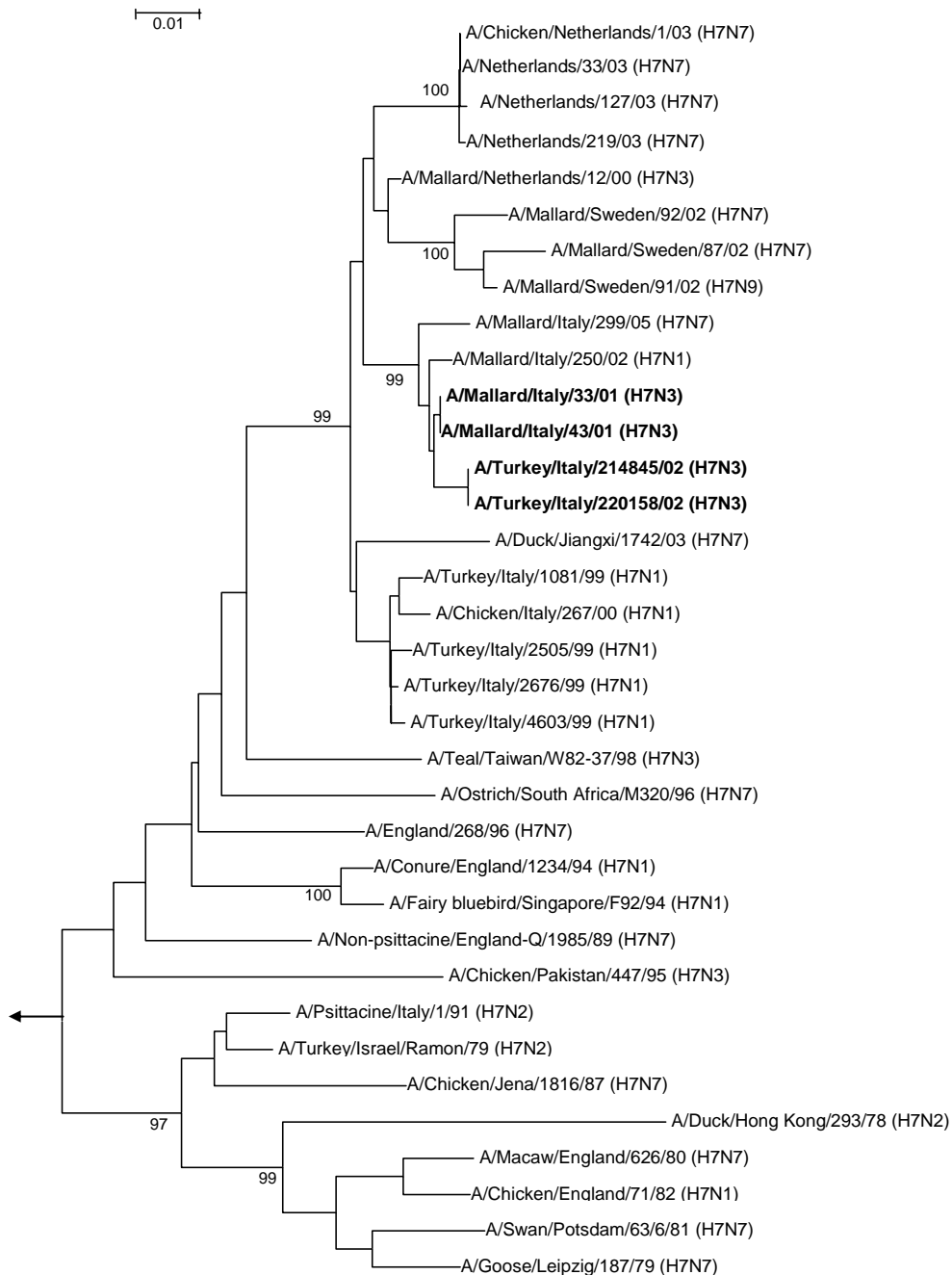


Figura 3. Relazioni filogenetiche tra i virus di sottotipo H7 isolati in Italia, per confronto con le sequenze disponibili in banca dati. Le lunghezze di braccio sono proporzionali alle distanze genetiche tra i vari taxa. L'albero filogenetico è stato ottenuto con il pacchetto di software Mega 3 (16)

Quindi attraverso questo lavoro viene dimostrato per la prima volta che un virus influenzale aviario isolato da una specie non serbatoio è derivato *in toto* da virus precursori che circolavano nelle anatre selvatiche durante gli anni precedenti. Fino ad allora l'ipotesi che tutti i virus aviari

isolati da uccelli domestici derivassero da virus presenti nel serbatoio delle specie acquatiche selvatiche era basata solo su dati filogenetici relativi ad uno o più segmenti, ma non erano mai stati identificati virus selvatici praticamente identici o quasi alla loro controparte domestica in un arco di tempo e di spazio ravvicinati (17).

I fattori epidemiologici implicati in questo passaggio non sono noti. Tuttavia la presenza nelle zone ad alta intensità di allevamenti di una fitta rete di vie d'acqua (canali e laghi) e il fatto che i virus influenzali trovano nelle acque di zone umide un ambiente che ne favorisce sia la conservazione per lunghi periodi, sia la trasmissione per via oro-fecale ad altri uccelli suscettibili, permette di ipotizzare un ruolo di questi "habitat" nella trasmissione di virus tra uccelli selvatici di passaggio lungo le rotte di migrazione, quelli stanziali e infine i domestici, sia rurali che di allevamento industriale. Carenze nella messa in atto e nel rispetto delle norme di biosicurezza in questi ultimi può avere contribuito a queste introduzioni, che sono avvenute ripetutamente nel corso degli ultimi 10 anni in Italia, come è stato evidenziato anche da altri autori (18).

In precedenza, sempre nel Nord Italia, tra marzo del 1999 e aprile del 2000, si era verificata una vasta epidemia di influenza aviaria nel pollame domestico. Era quindi importante capire la relazione tra il gene HA dei ceppi influenzali di sottotipo H7N3 e quelli dei virus di sottotipo H7N1, per comprendere l'origine di questi ultimi dei quali non era stato identificato un precursore nelle specie serbatoio.

I risultati delle analisi sierologiche e genetiche hanno mostrato che l'HA dei due gruppi virali è molto simile, per quanto distinguibile sierologicamente con gli antisieri diretti verso i ceppi virali H7N1. (Tabella 2, Figura 3). Pertanto, anche nel caso del virus H7N1 si può parlare di una introduzione dal serbatoio degli uccelli acquatici selvatici. Presumibilmente il precursore del virus H7N1 che ha infettato il pollame nel 1999 ha continuato a circolare nel serbatoio naturale dei volatili selvatici, dove tutti i sottotipi virali sono mantenuti regolarmente (2), è andato incontro a riassortimento con altri virus di sottotipo N3 e si è trasmesso nuovamente nel pollame domestico nel 2002.

Oltre alle ripetute infezioni umane associate al virus H5N1, casi di trasmissione di virus aviari all'uomo si sono verificati anche in concomitanza di un'epidemia di virus HP di sottotipo H7N7 avvenuta in Olanda nel pollame domestico nel 2003 (19), nello stesso periodo in cui in Italia era in corso l'epidemia di influenza aviaria da virus H7N3.

Virus di sottotipo H7 hanno continuato a circolare in Italia anche negli anni successivi, come dimostrano i dati del monitoraggio virologico effettuato nell'ambito delle ricerche previste dal Progetto (Tabella 1), e nello stesso periodo sono stati isolati da anatre domestiche in Cina. Anche in considerazione della contemporanea circolazione dei virus H5N1, che a tutt'oggi sono considerati la principale minaccia pandemica (10), abbiamo ritenuto importante analizzare le relazioni di derivazione esistenti tra i virus isolati in Italia, in Olanda e in Cina, al fine di valutare a livello molecolare il grado di rischio pandemico eventualmente associato ai virus da noi identificati.

Virus aviari di sottotipo H7N3, H7N1, H7N7 selvatici e domestici, isolati in Italia e in Cina dal 1999 al 2005 (Tabella 4), sono stati quindi analizzati e confrontati antigenicamente e/o geneticamente.

È stato possibile dimostrare che i virus di sottotipo H7 circolanti in varie specie di uccelli in Europa e in Asia nell'arco di sei anni, sono caratterizzati da un elevato grado di eterogeneità a livello genetico, dovuto soprattutto a fenomeni di riassortimento genico. Una conferma della elevata frequenza con cui questi eventi di riassortimento tra virus si verificano è indicata dal fatto che, per quanto riguarda i geni codificanti la nucleoproteina (NP) e la polimerasi virale PB2 in particolare, il ceppo asiatico H7N7 risulta strettamente correlato evolutivamente ai virus isolati in Italia, mentre il ceppo selvatico H7N7 italiano è maggiormente associato ai ceppi isolati in Cina in anni recenti (Figure 4 e 5).

Tabella 4. Virus aviari, di sottotipo H7, analizzati

Virus	Sottotipo	Data di isolamento	Località
A/Turkey/Italy/3889/99	H7N1	aprile 1999	Lombardia (Italia)
A/Turkey/Italy/4603/99	H7N1	aprile 1999	Lombardia (Italia)
A/Turkey/Italy/4169/99	H7N1	maggio 1999	Lombardia (Italia)
A/Turkey/Italy/2676/99	H7N1	agosto 1999	Lombardia (Italia)
A/Mallard/Italy/33/01	H7N3	ottobre 2001	Toscana (Italia)
A/Mallard/Italy/43/01	H7N3	ottobre 2001	Toscana (Italia)
A/Mallard/Italy/199/01	H7N3	dicembre 2001	Toscana (Italia)
A/Mallard/Italy/250/02	H7N1	gennaio 2002	Toscana (Italia)
A/Turkey/Italy/214845/02	H7N3	ottobre 2002	Lombardia (Italia)
A/Turkey/Italy/220158/02	H7N3	ottobre 2002	Lombardia (Italia)
A/Duck/Jiangxi/1742/03	H7N7	agosto 2003	Jiangxi (Cina)
A/Duck/Jiangxi/1786/03	H7N7	agosto 2003	Jiangxi (Cina)
A/Duck/Jiangxi/1814/03	H7N7	agosto 2003	Jiangxi (Cina)
A/Duck/Jiangxi/1760/03	H7N7	agosto 2003	Jiangxi (Cina)
A/Mallard/Italy/299/05	H7N7	febbraio 2005	Lombardia (Italia)

L'eterogeneità genetica osservata nei virus da noi analizzati è confermata dalle percentuali di similarità nucleotidica (Tabella 3). Tuttavia, queste differenze si riducono drasticamente quando si osservano le percentuali di similarità a livello aminoacidico. Nella maggior parte dei casi, infatti, le proteine appaiono fortemente conservate. Questo fenomeno riguarda anche i virus isolati in aree geografiche molto distanti, e conferma l'ipotesi che il virus influenzale, particolarmente nel suo serbatoio naturale, è in stasi evolutiva (2).

I dati ottenuti dall'omologia di sequenza sono confermati dall'analisi filogenetica, effettuata confrontando le sequenze da noi ottenute, con quelle di ceppi aviari, umani, suini ed equini disponibili in GenBank, in particolare con i ceppi H7 isolati in Italia da specie aviarie selvatiche e domestiche e i virus isolati in Olanda nel 2003 (sottotipo H7N7).

L'albero filogenetico dell'HA1, riportato in Figura 3, indica che anche i virus H7N7 olandesi e quelli circolanti in Italia condividono un precursore comune recente.

Infatti come possiamo vedere dai dati relativi alle percentuali di similarità delle sequenze aminoacidiche (Tabella 3), i virus influenzali isolati in Olanda nel 2003 sia aviari (A/Chicken/Netherlands/1/03) sia umani (A/Netherlands/219/03) presentano un alto grado di similarità rispetto al virus isolato in Italia A/Mallard/Italy/33/01 (99% e 98,7%, rispettivamente).

Anche negli alberi filogenetici relativi alla maggior parte degli altri geni i virus H7N7 olandesi si collocano su un braccio fratello dell'albero rispetto ai virus influenzali aviari italiani.

Questa evidenza può essere spiegata dal fatto che le rotte migratorie degli uccelli acquatici svernanti in Italia passano anche sul Nord Europa, Olanda compresa, ed è ipotizzabile che grazie a questi spostamenti i virus influenzali aviari si diffondano in aree geografiche anche distanti tra loro.

Una differenza fondamentale tra i virus LP H7 isolati in Italia dal 2001 e quelli HP olandesi è rappresentata dal fatto che i primi non posseggono un sito di clivaggio multibasic dell'HA, che risulta invece associato ai casi di infezione nell'uomo con esito grave o fatale osservati con gli H5N1 sia ad Hong Kong nel 1997 che in numerosi paesi asiatici a partire dal 2003 e con gli H7N7 in Olanda, responsabili di diverse infezioni nell'uomo.

Per quanto riguarda i geni della neuraminidasi, i virus H7 da noi analizzati sono associati a tre sottotipi NA diversi: N1, N3 e N7. L'analisi filogenetica mostra che, nell'ambito di ciascun sottotipo, le NA sono molto simili, anche se i virus provengono da specie aviarie e aree geografiche diverse.

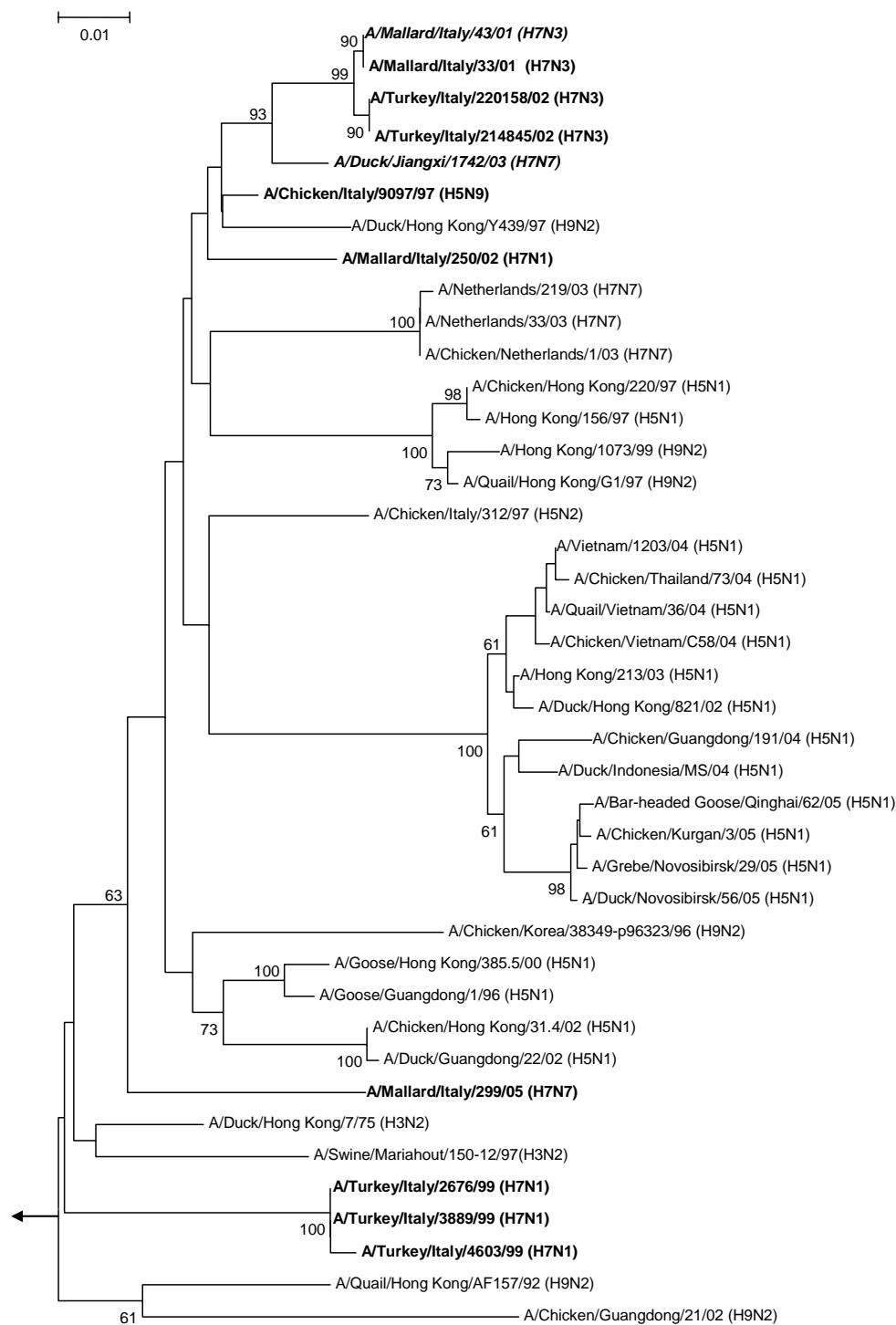


Figura 4. Albero filogenetico relativo al gene NP dei virus di sottotipo H7 isolati in Italia e di altri sottotipi virali, ottenuto per confronto con le sequenze disponibili in banca dati. Le lunghezze di braccio sono proporzionali alle distanze genetiche tra i vari taxa. L'albero filogenetico è stato ottenuto con il pacchetto di software Mega 3 (16)

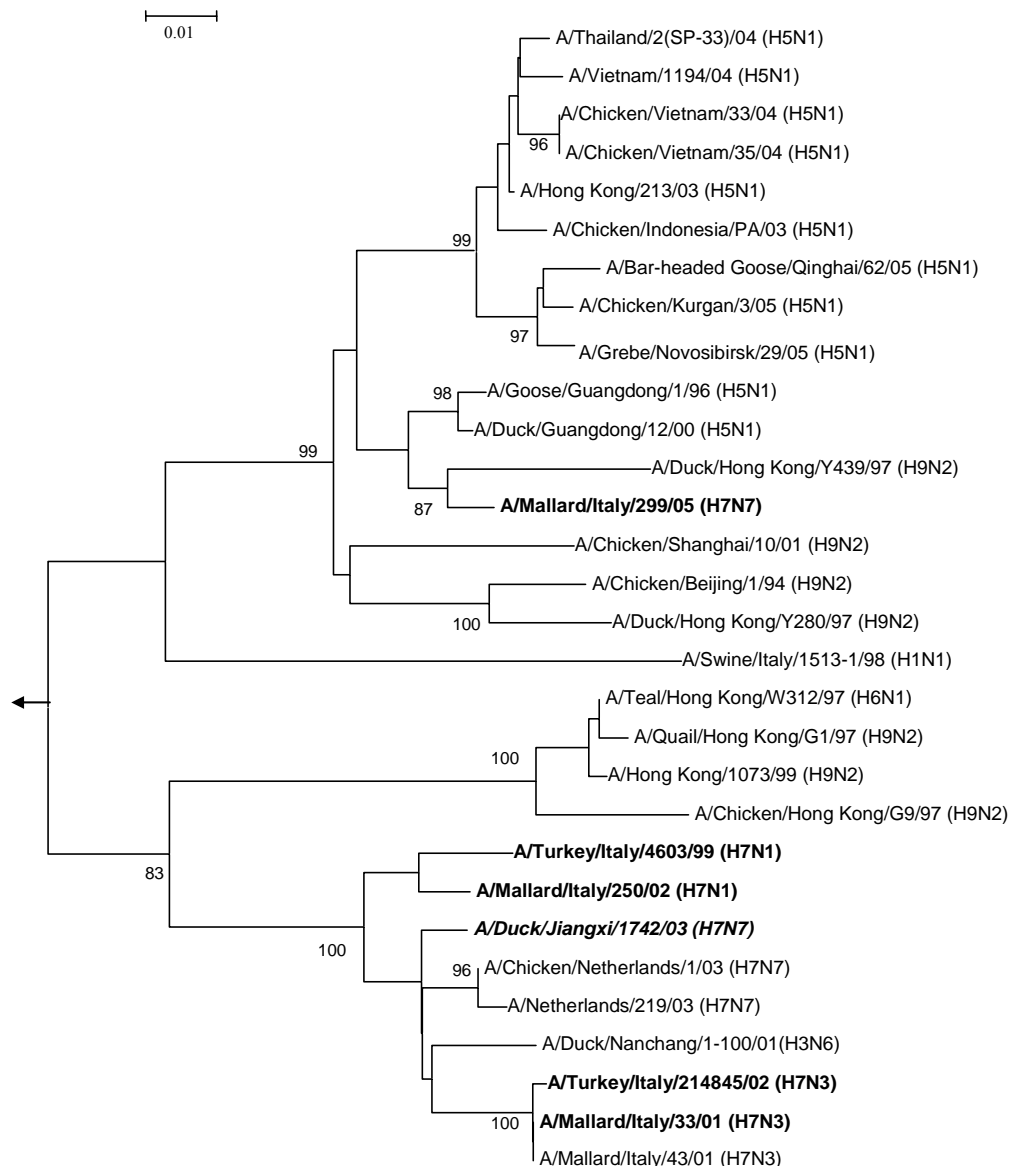


Figura 5. Albero filogenetico relativo al gene PB2 dei virus di sottotipo H7 isolati in Italia e di altri sottotipi virali, ottenuto per confronto con le sequenze disponibili in banca dati. Le lunghezze di braccio sono proporzionali alle distanze genetiche tra i vari taxa. L'albero filogenetico è stato ottenuto con il pacchetto di software Mega 3 (16)

Sia i virus H7N1 che H7N3 isolati da specie domestiche presentano nello *stalk* della NA una delezione di 22 e 23 aminoacidi, rispettivamente, che è invece assente nei virus degli stessi sottotipi isolati da anatre selvatiche (Figura 2).

Studi precedenti hanno dimostrato che i virus influenzali aviari con delezioni nella *stalk region* tendono a compensare la diminuzione dell'attività neuraminidasi attraverso la diminuzione dell'affinità di legame dell'HA all'acido sialico, ad esempio aumentando la glicosilazione della testa globulare dell'HA localizzata sulla subunità HA1 (14).

Tale meccanismo sembra essere quello più frequentemente operante in natura, come indica il fatto che diversi virus influenzali isolati da polli e tacchini con delezioni nella *stalk region* possiedono potenziali siti di glicosilazione aggiuntivi nelle loro subunità HA1, rispetto ai ceppi selvatici dello stesso sottotipo.

Ciò non è sempre vero, nel nostro studio, infatti, si riscontrano situazioni differenti a seconda del sottotipo di NA:

- I virus H7N3 isolati da specie domestiche presentano una delezione di 23 aminoacidi nella *stalk region* della neuraminidasi (NA) ma non mostrano siti di glicosilazione addizionali nella regione della testa globulare dell'emagglutina (HA). Infatti, virus H7N3 isolati da specie domestiche in Lombardia quasi un anno dopo l'inizio dell'epidemia, non hanno acquisito potenziali siti di glicosilazione aggiuntivi rispetto ai virus H7N3 isolati all'inizio dell'epidemia (Campitelli, dati non pubblicati).
- Al contrario, i virus H7N1 isolati da specie domestiche nel 1999, in cui è presente una delezione nello *stalk* della molecola NA (in questo caso di 22 aminoacidi), presentano da uno a due siti di glicosilazione aggiuntivi nella testa globulare dell'emagglutina, rispetto ai ceppi H7 selvatici.
- Infine, i virus H7N7 isolati sia da specie aviarie selvatiche che domestiche non presentano né la delezione nella *stalk region* di NA né potenziali siti di glicosilazione aggiuntivi all'estremità distale della molecola di HA.

I risultati del nostro studio confermano che il pool genico dei virus influenzali aviari circolanti in Asia ed in Europa è sostanzialmente comune, anche se al suo interno esiste un elevato grado di eterogeneità genetica.

L'identificazione, nel serbatoio naturale degli uccelli selvatici acquatici, di virus che, pur isolati in aree geografiche lontane, condividono molti segmenti genici supporta l'ipotesi del ruolo fondamentale degli uccelli migratori nella diffusione ad ampio raggio dei virus influenzali.

Inoltre, emerge chiaramente come il serbatoio naturale degli uccelli selvatici sia la fonte prima e continua dei virus successivamente identificati nel pollame domestico e che possono trasmettersi anche ai mammiferi, uomo compreso.

Per questa ragione è fondamentale che venga rafforzata la sorveglianza virologica in tutto il mondo negli animali serbatoio dei virus influenzali.

Selezione di ceppi virali per la produzione di vaccini

Il virus H7N1 che ha dato inizio all'epidemia di influenza aviaria che nel 1999-2000 si è abbattuta sugli allevamenti di pollame ad alta intensità del Nord Italia, provocando la distruzione di più di 14 milioni di volatili, era inizialmente a bassa patogenicità, ma a partire da Dicembre 1999 è mutato in una forma ad alta patogenicità grazie alla acquisizione di aminoacidi multibasici (motivo SRVR) nel sito di clivaggio dell'HA (15). Alcuni di questi virus sono stati analizzati sia a livello molecolare sia per valutare la loro capacità di infettare specie di mammiferi, quale il topo, senza un preliminare adattamento del virus. Studi precedenti avevano infatti evidenziato che alcuni dei virus H5N1 di Hong Kong che avevano infettato l'uomo possedevano questa capacità (20). Dal punto di vista molecolare, i nostri studi hanno stabilito che tutti i ceppi H7N1, sia HP che LP, presentavano una delezione di 22 aminoacidi nello *stalk* della neuraminidasi (vedi Figura 2), mentre tutti i ceppi HP analizzati da noi e da altri autori (15) possedevano una inserzione di aminoacidi multibasici nel sito di clivaggio, a differenza dei virus a bassa patogenicità da cui erano derivati. Relativamente alla possibilità di infettare i topi,

nell'ambito del gruppo di virus ad alta patogenicità alcuni ceppi mostravano la capacità di replicarsi nei polmoni di topo senza adattamento, provocando una infezione letale (Tabella 5).

Tabella 5. Caratteristiche genetiche (relative a HA ed NA) e fenotipiche (infezione di mammifero) di virus influenzali italiani selezionati per la preparazione di un vaccino pandemico

Virus	HA				NA		Infezione in topo senza adattamento
	% similarità con A/Ck/It/13474/99		sito di glicosilazione aggiuntivo	amino-acidi inseriti al sito di clivaggio	% similarità con A/Ck/It/13474/99	delezione di 22 aminoacidi	
	nt	aa	posizione		nt	posizione	
A/Chicken/Italy/13474/99 (HP)	-	-	123	SRVR	-	54-75	+
A/Turkey/Italy/12598/99 (HP)	99,9	100,0	123	SRVR	99,8	54-75	-
A/Turkey/Italy/3889/99 (LP)	99,2	98,4	123	-	99,6	54-75	-
A/Chicken/Italy/4575/99 (LP)	99,1	98,4	123	-	99,6	54-75	-

nt: sequenza nucleotidica;

aa: sequenza aminoacidica

La scelta del ceppo candidato per il vaccino pandemico si è quindi orientata su un virus H7N1 con questa caratteristica, denominato A/Chicken/Italy/13474/99.

Per quanto riguarda la identificazione di altri ceppi utili per costituire una batteria di virus prototipi, tra i molteplici stipiti virali collezionati nei quattro anni di attività, è stata data la priorità a quelli che già l'OMS aveva identificato come più a rischio perché avevano dimostrato in più occasioni di potersi trasmettere da una specie aviaria a una di mammifero (non solo l'uomo). I sottotipi a più alta priorità, oltre ad H5 e H7, sono: H2, H9, H6, H4 e H13. Tra questi, l'H2, l'H6 e l'H4 sono stati ripetutamente isolati da uccelli acquatici selvatici in Italia, e sono stati quindi selezionati e trasferiti al WP4, per essere inseriti nella batteria di sottotipi già a disposizione in caso di pandemia, nonché per la produzione di corrispondenti reagenti per il controllo di qualità di un eventuale vaccino pandemico.

Sviluppo di un vaccino pandemico ottenuto da un ceppo aviario ad alta patogenicità

Generazione del virus vaccinale

Nel 1999 è stato per la prima volta messa a punto una tecnologia basata sul DNA ricombinante, che permette di generare un virus influenzale interamente a partire dai segmenti genici retrotrascritti e clonati in plasmide. Questo sistema è noto come “*reverse genetics* basata su plasmidi” (Figura 6) e richiede la generazione di copie esatte degli 8 segmenti del genoma virale, insieme con l'espressione delle 4 proteine coinvolte nella replicazione virale – le tre proteine della polimerasi e la nucleoproteina (21). I segmenti di RNA virale sono generati a partire da 8 plasmidi, ciascuno dei quali contenente uno dei segmenti genici, sotto il controllo del promotore della RNA polimerasi I cellulare, che solitamente trascrive l'RNA ribosomale e produce copie di RNA esattamente identiche al segmento clonato. Inoltre, per avviare più facilmente il ciclo

replicativo virale, sono espressi, tramite quattro plasmidi di espressione, i 4 geni codificanti la polimerasi virale. La successiva co-trasfezione dei 12 plasmidi così ottenuti (8 dei quali codificano i segmenti genici del virus mentre gli altri 4 codificano le proteine necessarie per la replicazione) in una idonea linea cellulare di mammifero, dà origine al virus infettivo.

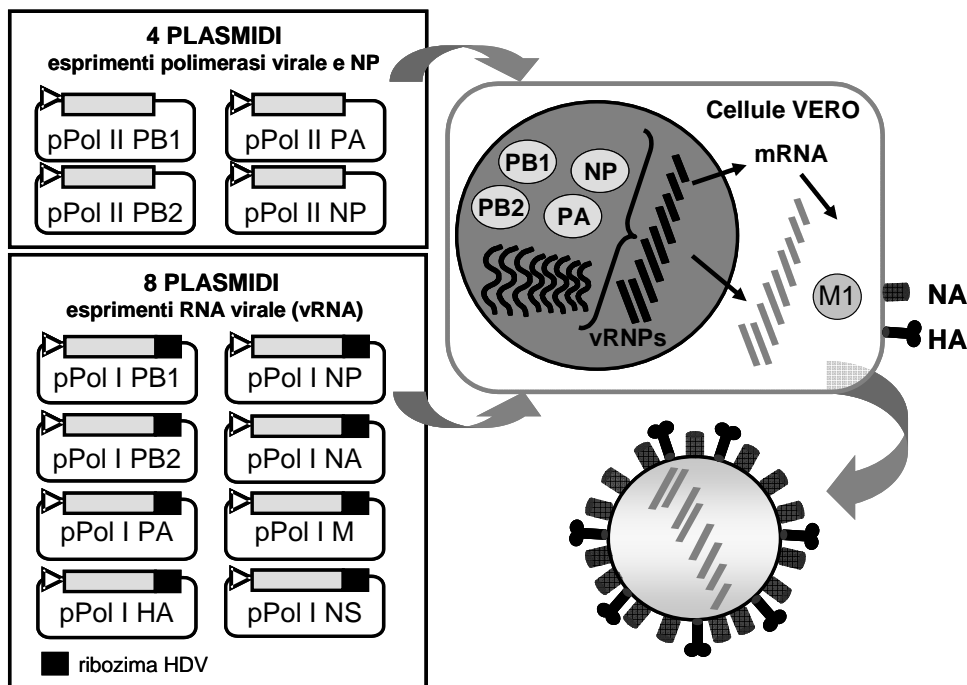


Figura 6. Sistema per la generazione di virus influenzali mediante *reverse genetics* basata su plasmidi

Questa metodologia permette quindi di “disegnare” un vaccino influenzale *su misura* grazie all’utilizzo di semplici tecniche di ingegneria genetica con le quali modificare i singoli segmenti genici, e di selezionare un determinato segmento genico a partire dal virus desiderato (22). Oggetto dell’attività del WP2 è stato quindi la creazione di un virus vaccinale a partire da un ceppo aviario ad alta patogenicità, che fosse tuttavia privo del fenotipo virulento e fosse in grado di replicarsi ad alta crescita su linee cellulari accettabili per la produzione di un vaccino influenzale, esattamente come un riassortante ad alta crescita. La strategia adottata e i risultati ottenuti sono descritti di seguito:

1. Tramite tecniche di ingegneria genetica, sono stati rimossi i nucleotidi codificanti per gli aminoacidi basici addizionali al sito di clivaggio dell’emagglutina del ceppo H7N1 HP selezionato in WP1 (Figura 7). È stato dimostrato, infatti, che questi residui conferiscono, all’HA che li presenta, la proprietà di essere “tagliata” nelle due subunità funzionali a partire dal polipeptide precursore, direttamente da proteasi intracellulari presenti in tutti i tessuti e non solo in quelli delle mucose respiratoria (nei mammiferi) o gastrointestinale (negli uccelli) che rappresentano i tessuti bersaglio del virus influenzale. Nel pollame, ma in alcuni casi anche nel topo e nel furetto, ciò causa una infezione che interessa più organi ed è responsabile dell’esito spesso fatale di queste infezioni (23).

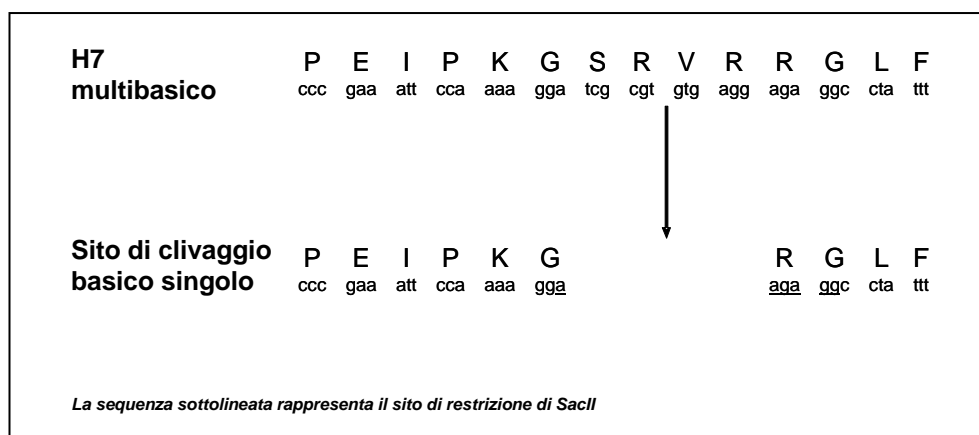


Figura 7. Strategia di mutagenesi sito-diretta del gene HA

2. È stato poi effettuato il clonaggio dell'HA modificata e della NA del ceppo H7N1 nei plasmidi di trascrizione. I restanti 6 segmenti sono stati clonati nei plasmidi di trascrizione a partire dal ceppo A/PR/8/34, adattato alla crescita ad alto titolo in cellule di rene di scimmia (*African Green*) VERO (una linea cellulare riconosciuta dall'OMS per la coltivazione di virus vaccinali ad uso umano). Sempre a partire da PR/8 sono stati ottenuti i plasmidi di espressione codificanti i geni della polimerasi.
3. I 12 plasmidi sono stati co-trasfettati in cellule VERO ed è stato generato un virus infettante (*virus rescue*). Il virus ottenuto è geneticamente un riassortante del tutto equivalente a quelli ottenuti con il sistema della coinfezione in uovo: possiede, infatti, le proteine di superficie del ceppo pandemico, che inducono la risposta anticorpale protettiva, cresce bene in cellula o in uovo, e non è patogeno per l'uomo, quindi può essere manipolato dal personale coinvolto nella produzione industriale del vaccino. Il ceppo ottenuto è stato denominato RED3. La strategia complessiva è illustrata in Figura 8.
4. Per verificare la non-patogenicità del riassortante, il virus è stato inoculato in uova embrionate, in pollo, topo e furetto. In tutti questi sistemi, tranne che nel topo, RED3 si è dimostrato pienamente attenuato rispetto al ceppo selvaggio parentale. In particolare, l'indice di patogenicità intravenosa (IVPI) nel pollo è risultato pari a 0, mentre il ceppo parentale aveva un IVPI pari a 3, il valore massimo per un ceppo HP. Nel topo, RED3 è letale, ma questa evidenza non sorprende se si considera che entrambi i ceppi parentali, A/Chicken/Italy/13474/99 e A/PR/8/34 sono letali nel topo. Per aumentare ulteriormente l'attenuazione di RED3 sono stati ottenuti anche altri virus riassortanti, nei quali sono state introdotte mutazioni cosiddette *cold-adapted* o *ca*, vale a dire mutazioni puntiformi localizzate su uno o più segmenti genici in grado di limitare la crescita del virus a temperature nettamente più basse di quelle presenti nel tratto respiratorio degli animali infettati.

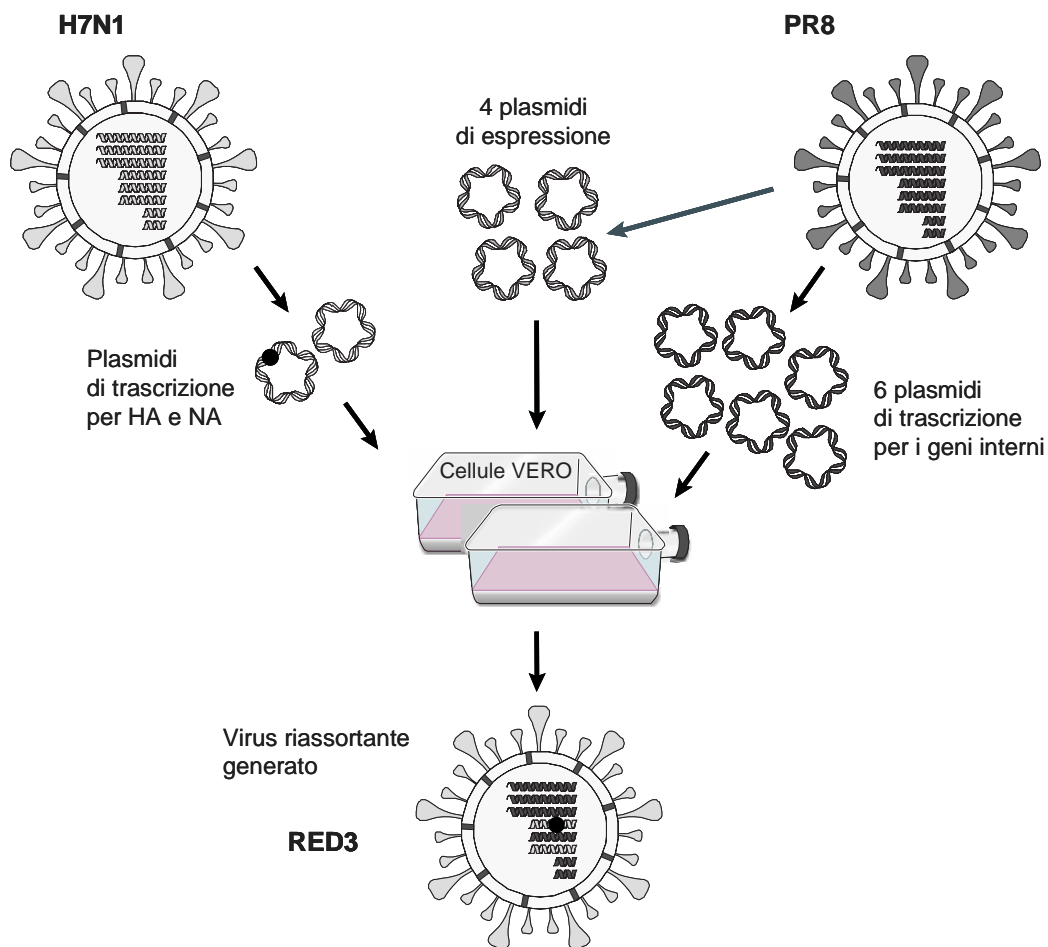


Figura 8. Produzione del virus riassortante H7N1 mediante *reverse genetics* basata su plasmide

5. In parallelo con la generazione di RED3, è stato prodotto un ceppo vaccinale H3N2 a partire dal ceppo parentale umano A/Panama/2007/99, utilizzando la medesima metodologia tranne che per la mutagenesi dell'HA, non necessaria per il virus H3N2. Lo scopo era di avere un controllo del metodo e di verificare la equivalenza tra il ceppo riassortante ottenuto per *reverse genetics* e quello ottenuto col metodo classico dei riassortanti ad alta crescita ottenuti in seguito a coinfezione.

Allestimento del vaccino inattivato

Il virus ottenuto in WP2 è stato trasferito alla unità responsabile del WP3, il cui compito era quello di produrre un lotto pilota di vaccino cresciuto su cellule, inattivato, ulteriormente processato per eliminare la componente lipidica del virione (vaccino “split”) e addizionato con adiuvante. Il vaccino così ottenuto, nella forma adiuvata e non, è stato utilizzato negli studi di immunogenicità e di efficacia nei modelli animali (attualmente in fase di completamento) e verrà poi testato nei trial clinici di fase I/II il cui inizio è previsto per l'autunno 2006.

Allestimento di una batteria di ceppi prototipi e dei reagenti per il controllo di qualità del vaccino pandemico

Sono stati selezionati vari ceppi per ottenere virus riassortanti con il metodo classico e per produrre i corrispondenti reagenti. In particolare, sono stati preparati reagenti verso i sottotipi H2, H5, H9, H7, H6 e H10. I ceppi di partenza provenivano sia dal WP1 (ISS-sorveglianza animale) sia dai laboratori di riferimento dell'OMS.

Sviluppo di metodiche sierologiche alternative per la identificazione di anticorpi verso virus aviari nell'uomo e in altri mammiferi

La scoperta che il test di inibizione dell'emagglutinazione, considerato a tutt'oggi il "gold standard" per la diagnosi sierologica di infezioni con virus influenzali umani, è poco sensibile per la ricerca di anticorpi verso virus influenzali aviari, era stata messa in luce già da molti anni (24-25), ma la reale portata del problema si è manifestata a seguito dell'incidente di Hong Kong del 1997. Infatti, a fronte di soggetti la cui infezione era documentata virologicamente, il test HI eseguito secondo il protocollo standard (26) dava risultati negativi (9). Per risolvere tale problema sono state considerate metodiche sierologiche alternative:

1. È stato messo a punto un test di inibizione della emagglutinazione "modificato", con emazie di equino, al fine di aumentare la sensibilità del test. È noto infatti che i virus influenzali aviari hanno una specificità di recettore tale per cui si legano preferenzialmente all'acido sialico terminale di glicoproteine o carboidrati presenti sulle superfici cellulari e tissutali, legato al penultimo zucchero in conformazione α -2,3. Questo tipo di recettore, distinto da quello in conformazione α -2,6 riconosciuto dai virus influenzali umani, è presente in misura molto più abbondante sulle emazie di cavallo che di tacchino o pollo, e aumenta la capacità di rilevamento degli anticorpi nel test in questione (27, 28).
2. È stato modificato e validato il protocollo per il test di microneutralizzazione (MN) specificamente per i virus H7, a partire da quello utilizzato per la valutazione dei sieri verso il virus H5N1/97 (9). Come tutti i saggi di neutralizzazione, il test MN identifica la presenza di anticorpi in grado di bloccare o ridurre l'infezione, cioè, al pari del saggio HI, di anticorpi funzionali diretti verso il virus, anche se richiede necessariamente virus vivo per la sua esecuzione; questo può essere uno svantaggio se i virus sono altamente patogeni, quindi manipolabili solo in laboratori dotati di strutture ad alto contenimento.
3. Altre metodiche sono in corso di valutazione, con l'obiettivo di ridurre al minimo il ricorso al virus vivo e di rendere più rapide le analisi.

Sierosorveglianza nell'uomo

Le metodiche descritte sopra sono state utilizzate in studi di sierosorveglianza dell'influenza aviaria nell'uomo, volti ad evidenziare eventuali casi di trasmissione di virus aviari all'uomo anche in forma sub-clinica; tali ricerche sono state condotte nell'ambito del WP8, in collaborazione tra Partner 4 e 3 (HPA e ISS).

A seguito delle epidemie di influenza aviaria da virus H7N1 e H7N3 in pollame d'allevamento che si sono susseguite dal 1999 al 2003 nel Nord Italia, si è ritenuto importante

valutare il rischio di trasmissione di virus influenzali aviari all'uomo in condizioni di elevata esposizione a questi patogeni. A tal fine, i sieri del personale impiegato nel settore avicolo e/o di persone venute a contatto con gli animali infetti, sono stati analizzati mediante una combinazione di tecniche sierologiche tra le quali: il saggio di microneutralizzazione, il test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) modificato, e il western blotting.

Dei 185 sieri testati, raccolti durante l'epidemia del 2003 causata dal sottotipo H7N3 a bassa patogenicità, sette sono risultati positivi con almeno due delle metodiche usate, dimostrando una chiara evidenza di infezione in seguito ad esposizione al virus H7 (Tabella 6).

Tabella 6. Epizootie di influenza aviaria in Italia e risultati sierologici

Regioni	Lombardia	Lombardia	Veneto	Veneto	Lombardia	Lombardia
	1	2	N. epizootie		5	6
			3	4		
Periodo epizootie	29/3/1999 – 17/12/1999	17/12/1999 – 5/4/2000	17/12/1999- 5/4/2000	14/8/2000 – 15/3/2001	16/10/2002 – 30/9/2003	16/10/2002 – 30/9/2003
Virus circolanti	H7N1	H7N1	H7N1	H7N1	H7N3	H7N3
Patogenicità	LP	HP	HP	LP	LP	LP
Antigeni usati nei test	A/Ty/It/2676/99 (H7N1)	A/Ty/It/2676/99 (H7N1)	A/Ty/It/2676/99 (H7N1)	A/Ty/It/3889/99 (H7N1)	A/Ty/It/3889/99 (H7N1)	A/Ty/It/3889/99 (H7N1)
	A/Ty/It/3889/99 (H7N1)	A/Ty/It/3889/99 (H7N1)	A/Ty/It/3889/99 (H7N1)	A/Ty/It/214845/02(H7N3)	A/Ty/It/214845/02(H7N3)	A/Ty/It/214845/02(H7N3)
Risultato sierologico						
N. sieri	85	513	159	41	43	142
N. positivi						
Test ^a HI	0	0	0	0	1 (C03)	3 (87, 90, 102)
Test ^b MN	0	0	0	0	4 (B03, C01, C03, C08)	3 (87, 90, 102)
Test SRH	0	0	0	NT	NT	NT

HI, test di inibizione dell'emoagglutinazione; **HP**, alta patogenicità; **LP**, bassa patogenicità; **MN**, microneutralizzazione; **NT**, non testato; **SRH**, emolisi radiale singola.

^a in parentesi sono riportati i numeri identificativi dei sieri la cui reattività nei confronti dei virus H7N1 e H7N3 è stata confermata mediante western blotting.

^b in parentesi sono riportati i numeri identificativi dei sieri la cui reattività nei confronti dei virus H7N1 e H7N3 è stata confermata mediante western blotting. I sieri che sono risultati positivi hanno mostrato valori da 30 a >30.

Nessuna sieropositività, invece, è stata riscontrata nelle persone esposte al virus H7N1 che aveva circolato tra il 1999 e il 2001, malgrado l'elevato grado di cross-reattività tra le HA dei due gruppi di virus. A questo proposito è stato ipotizzato che gli anticorpi verso la neuraminidasi N1, già presenti nell'uomo, potrebbero aver conferito una qualche forma di protezione crociata verso il virus (29).

I dati ottenuti rappresentano la prima evidenza sierologica di trasmissione di un virus a bassa patogenicità nell'uomo durante una epizootia nel pollame domestico, essendo i casi umani precedentemente verificatisi associati solo a virus ad alta patogenicità. Il potenziale rischio insito in questo tipo di evento è che l'uomo stesso, se coinfectato durante una epidemia di influenza aviaria a bassa patogenicità da un virus aviario e uno umano, potrebbe svolgere quel

ruolo di “ospite intermedio” in grado di dare origine ad un virus pandemico riassortante. Anche per far fronte a questo rischio, dal 2003 le autorità sanitarie in Italia hanno incluso gli operatori del settore avicolo tra coloro per i quali la vaccinazione contro l’influenza stagionale è raccomandata ed offerta gratuitamente. I nostri dati sottolineano anche l’importanza di una continua attività di monitoraggio dell’influenza sia negli animali domestici e selvatici che nelle persone a stretto contatto con essi.

CONCLUSIONI

Il susseguirsi di epidemie di influenza aviaria associate ad infezioni umane, che dal 1997 continuano a verificarsi, ha reso più concreta la possibilità di una pandemia influenzale e sempre più pressante la necessità, da parte delle autorità sanitarie e dell'opinione pubblica mondiale, di poter contare su strumenti efficaci per il suo controllo da utilizzare nell'ambito di una strategia pianificata a livello globale. Non a caso, da allora ad oggi l'OMS ha moltiplicato gli sforzi e le iniziative volte a migliorare la "preparazione alla pandemia" a livello sia locale che globale, come è ben documentato anche dalla sezione dedicata all'influenza aviaria sul sito web dell'OMS stesso (www.who.int/en/). Nel sito sono disponibili numerosi documenti che vanno dalla raccolta e valutazione dei dati virologici ed epidemiologici, con relativa valutazione periodica del rischio, a linee-guida generali tra cui il piano pandemico globale, fino a protocolli dettagliati quali quelli per la diagnosi e il trattamento dei pazienti.

Per rispondere ai vari problemi di sanità pubblica posti dall'emergenza pandemica, sono stati avviati molti progetti che affrontano la possibile emergenza di un ceppo pandemico da vari punti di vista, a partire dalle ricerche incentrate sugli aspetti ecologici e sul ruolo delle varie specie animali nella trasmissione e nel mantenimento del virus, agli studi di patogenicità, ma soprattutto agli studi che hanno come obiettivo la ricerca e sviluppo di vaccini pandemici. Il progetto FLUPAN ha inteso fornire un contributo complessivo a queste attività.

Un successo importante di questo progetto è stata la realizzazione di un vaccino pandemico prototipo inattivato ottenuto a partire da un ceppo virale ad alta patogenicità che è stato totalmente attenuato e che cresce ad alte rese su linee cellulari. La tecnologia con cui questo vaccino è stato prodotto, recentemente sviluppata, permette di generare un ceppo vaccinale "su misura". In più, rispetto alla metodologia originale, il virus ottenuto è stato adattato a crescere su cellule già validate e approvate per la produzione vaccinale dagli organismi regolatori. Inoltre tutte le fasi dell'allestimento sono state eseguite secondo le buone pratiche di produzione e in assicurazione di qualità. Si è cioè tenuto conto dei requisiti di legge per la produzione di un vaccino influenzale convenzionale, in modo da disporre di un lotto finale il più possibile equivalente, dal punto di vista della qualità, a quelli stagionali in commercio.

Un ultimo punto riguarda i problemi connessi alla manipolazione di virus ad alta patogenicità per la produzione di un ceppo influenzale attenuato, utilizzando la metodologia di *reverse genetics*. Il rilascio dell'autorizzazione ad effettuare gli esperimenti di trasfezione che hanno prodotto il ceppo riassortante attenuato, nonché gli esperimenti di infezione in animale (tutti rigorosamente eseguiti in strutture con il più alto livello di contenimento, o livello 4) ha richiesto una attenta e prolungata valutazione da parte degli organismi preposti, trattandosi di una tecnologia nuova ed essendo il virus risultante un prodotto "geneticamente modificato" a tutti gli effetti. Una volta verificata l'effettiva innocuità del virus risultante, questo sistema è stato definitivamente accettato anche da parte delle autorità sanitarie. L'importanza di questo traguardo è evidenziata dal fatto che proprio grazie al lavoro compiuto per l'allestimento del vaccino H7N1 il Centro di Referenza per la produzione di reagenti per il vaccino influenzale presso il NIBSC, e uno dei partner del FLUPAN, l'NIBSC, è riuscito a preparare in tempi molto rapidi (20 giorni) una serie di ceppi vaccinali riassortanti le cui proteine di superficie derivano da quelle del virus H5N1 che dal 2003 è diventato endemico in alcune aree geografiche, infettando anche l'uomo (30). Infatti, la disponibilità di un set di plasmidi, quello per PR8, già pronto, e di un protocollo standardizzato per la generazione di un virus vivo dalla trasfezione con i plasmidi, ha permesso non solo di ottenere il ceppo vaccinale desiderato, che nel 1997 non

era stato possibile generare, ma di ottenerlo in tempi molto più rapidi di quelli richiesti per produrre i riassortanti con il metodo tradizionale.

Le fasi finali del progetto FLUPAN prevedono la valutazione del vaccino ottenuto su linee cellulari sia nei modelli animali che nell'uomo. I trial clinici, inizialmente previsti per la primavera 2006, avranno luogo a partire dall'autunno di quest'anno e permetteranno finalmente di valutare l'efficacia del vaccino così formulato, ovvero la capacità di indurre una risposta immunitaria sia umorale che cellulare. Gli studi negli animali dovrebbero indicare anche quali, tra i parametri immunologici valutati, può essere considerato maggiormente predittivo di una efficace protezione dall'infezione. Qualora questo vaccino prodotto su cellule si rivelasse adeguato in termini di protezione e con reattogenicità comparabile a quella di un vaccino influenzale tradizionale, potrebbe rappresentare una valida alternativa all'attuale sistema di produzione in uova embrionate e un significativo avanzamento nelle metodologie per l'allestimento di un vaccino pandemico in tempi rapidi e in quantità tali da fornire la copertura a una più ampia fascia di popolazione nel mondo.

I risultati ottenuti finora hanno portato dei contributi significativi anche alla comprensione dei meccanismi di trasmissione interspecie, dalle specie aviarie a quelle domestiche, e da queste ultime all'uomo. Attraverso gli studi portati avanti dalla nostra unità operativa, abbiamo avuto la possibilità di confrontare per la prima volta un virus aviario isolato nel pollame domestico con il suo diretto precursore circolante nell'avifauna selvatica acquatica, nella quale i virus influenzali aviari vengono mantenuti nel tempo, in assenza di pressioni evolutive di alcun genere, in una condizione di co-adattamento estremamente efficace al fine di garantire una continua circolazione del virus (2). La trasmissione di questi virus a specie aviarie domestiche, alle quali il virus è meno adattato, genera facilmente mutazioni che possiamo definire "tipiche", quali la delezione dello *stalk* della neuraminidasi e l'inserzione di aminoacidi multibasici nel sito di clivaggio dell'HA, soprattutto quando questi animali si trovano in condizioni di sovraffollamento, come accade negli allevamenti intensivi (15). Tuttavia, non è ancora chiaro quali siano i determinanti genetici che favoriscono un passaggio interspecie efficiente. Studi che valutino la replicazione in cellule di origine diversa, e la infezione sperimentale di specie aviarie differenti con questi virus, potrebbero aiutare a capire se il virus circolante nel serbatoio selvatico è in grado di infettare il pollame domestico con la stessa efficienza dei ceppi isolati in pollo o tacchino. Recenti studi hanno evidenziato che l'emagglutinina del virus H7N3 da uccelli selvatici è meno sensibile alle variazioni di pH intracellulari del corrispondente ceppo di tacchino (31). Quale sia la correlazione funzionale di questa differenza rispetto alla replicazione in anatra o tacchino non è noto. Né sono conosciuti, se non in piccola misura, i fattori che favoriscono la trasmissione di virus dal pollame all'uomo o ai mammiferi più in generale. La scoperta che anche ceppi aviari a bassa patogenicità possono infettare l'uomo rappresenta un'evidenza importante, dal momento che la co-infezione di un uomo con un virus aviario e uno tipicamente umano potrebbe dar luogo a un virus riassortante con una potenziale trasmissibilità inter-umana.

La messa a punto di nuove metodiche sierologiche permetterà di valutare in modo più appropriato la risposta umorale verso i virus influenzali aviari nell'uomo. La disponibilità di questi strumenti è essenziale per una corretta valutazione della immunogenicità dei vaccini influenzali derivati da virus aviari, soprattutto al fine di stabilire la dose di antigene minima necessaria ad ottenere una protezione efficace dall'infezione o dai sintomi più gravi, a fronte della prevedibile scarsità di dosi disponibili a cui si è accennato precedentemente e della minore capacità immunogenica di un vaccino diretto contro un sottotipo virale nuovo per la popolazione umana.

La situazione di rischio perdurante che si è determinata a partire dal 2004 con il virus H5N1 ha ulteriormente stimolato le ricerche volte a fronteggiare al meglio una eventuale pandemia.

Gli sforzi sono diretti a migliorare il controllo delle epidemie di influenza aviaria nelle specie bersaglio, ad implementare un sistema di sorveglianza mondiale più efficiente e rapido nella individuazione di casi di infezione da virus aviari nell'uomo, e infine a migliorare l'offerta vaccinale. Relativamente a quest'ultimo aspetto, le strategie possibili vanno dalla ricerca sugli adiuvanti, a quella sulle vie di somministrazione più efficaci, alla messa a punto di vaccini in grado di indurre una risposta immunitaria non sottotipo-specifica (vaccini "universali"). Una "call for proposals" sull'influenza aviaria e pandemica è stata recentemente pubblicata dalla Commissione Europea nell'ambito del VI Programma Quadro della Ricerca Europea, indicando tra i vari temi anche la necessità di proseguire gli studi e le ricerche avviate da progetti quali il FLUPAN.

BIBLIOGRAFIA

1. 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(11):4603-8.
2. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992;56(1):152-79. Review.
3. Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF, Webster RG. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 1998;351(9101):472-477. Erratum in: *Lancet* 1998;351(9111):1292.
4. Horimoto T, Kawaoka Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(1):129-49. Review.
5. Sims LD, Ellis TM, Liu KK, Dyrting K, Wong H, Peiris M, Guan Y, Shortridge KF. Avian influenza in Hong Kong 1997-2002. *Avian Dis* 2003;47(3 Suppl):832-838.
6. WHO. *WHO global influenza pandemic preparedness plan. The role of WHO and recommendations for national measures before and during pandemics*. Geneva: World Health Organization; 2005. (WHO/CDS/CSR/GIP/2005.5). Disponibile all'indirizzo: http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/GIP_2005_5Eweb.pdf; ultima consultazione 6/9/06.
7. Vey M, Orlich M, Adler S, Klenk HD, Rott R, Garten W. Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology* 1992;188(1):408-13.
8. Robertson JS, Nicolson C, Newman R, Major D, Dunleavy U, Wood JM. High growth reassortant influenza vaccine viruses: new approaches to their control. *Biologicals* 1992;20(3):213-20.
9. Rowe T, Abernathy RA, Hu-Primmer J, Thompson WW, Lu X, Lim W, Fukuda K, Cox NJ, Katz JM. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol* 1999;37(4):937-43.
10. WHO. *Avian influenza: assessing the pandemic threat*. Geneva: World Health Organization; 2005. (WHO/CDS/2005.29). Disponibile all'indirizzo: <http://www.who.int/csr/disease/influenza/H5N1-9reduit.pdf>; ultima consultazione 6/9/06.
11. Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus AD. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(5):1356-61.
12. De Marco MA, Foni E, Campitelli L, Raffini E, Delogu M, Donatelli I. Long-term monitoring for avian influenza viruses in wild bird species in Italy. *Vet Res Commun* 2003;27(suppl. 1):107-14.
13. Suarez DL. Evolution of avian influenza viruses. *Vet Microbiol* 2000;74:15-27.
14. Baigent SJ, McCauley JW. Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res* 2001;79:177-85.
15. Banks J, Speidel ES, Moore E, Plowright L, Piccirillo A, Capua I, Cordioli P, Fioretti A, Alexander DJ. Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *Arch Virol* 2001;146:963-73.
16. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004;5(2):150-63.
17. Campitelli L, Mogavero E, De Marco MA, Delogu M, Puzelli S, Frezza F, Facchini M, Chiapponi C, Foni E, Cordioli P, Webby R, Barigazzi G, Webster RG, Donatelli I. Interspecies transmission

- of an H7N3 influenza virus from wild birds to intensively reared domestic poultry in Italy. *Virology* 2004;323(1):24-36.
18. Capua I, Marangon S, Dalla Pozza M, Terregino C, Cattoli G. Avian influenza in Italy 1997-2001. *Avian Dis* 2003;47:839-43.
19. Osterhaus ADME. Avian influenza A (H7N7) virus associated with human conjunctivitis and a fatal case of acuter respiratory distress syndrome. In: *Proceedings of the V conference "Options for the control of influenza"*; Okinawa, Japan October 7-11, 2003.
20. Gao P, Watanabe S, Ito T, Goto H, Wells K, McGregor M, Cooley AJ, Kawaoka Y. Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. *J Virol* 1999;73(4):3184-9.
21. Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(16):9345-50.
22. Wood JM, Robertson JS. From lethal virus to life-saving vaccine: developing inactivated vaccines for pandemic influenza. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(10):842-7. Review.
23. Rott R, Klenk HD, Nagai Y, Tashiro M. Influenza viruses, cell enzymes, and pathogenicity. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152 (4 Pt 2):S16-9. Review.
24. Profeta ML, Palladino G. Serological evidence of human infections with avian influenza viruses. *Arch Virol* 1986;90:355-60.
25. Hinshaw VS, Webster RG, Easterday BC, Bean WJ. Replication of avian influenza A viruses in mammals. *Infect Immun* 1981;34:354-61.
26. WHO. *WHO manual on animal influenza. Diagnosis and surveillance*. Geneva: World Health Organization; 2002. (WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev. 1). Disponibile all'indirizzo: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf>; ultima consultazione 12/9/06.
27. Stephenson I, Wood JM, Nicholson KG, Zambon MC. Sialic acid receptor specificity on erythrocytes affects detection of antibody to avian influenza haemagglutinin. *J Med Virol* 2003;70(3):391-8.
28. Stephenson I, Wood JM, Nicholson KG, Charlett A, Zambon MC. Detection of anti-H5 responses in human sera by HI using horse erythrocytes following MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 vaccine. *Virus Res* 2004;103(1-2):91-5.
29. Puzelli S, Di Trani L, Fabiani C, Campitelli L, De Marco MA, Capua I, Aguilera JF, Zambon M, Donatelli I. Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. *J Infect Dis* 2005;192(8):1318-22.
30. Nicolson C, Major D, Wood JM, Robertson JS. Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. *Vaccine* 2005;23:2943-52.
31. Giannecchini S, Campitelli L, Calzoletti L, De Marco MA, Azzi A, Donatelli I. Comparison of in vitro replication features of H7N3 influenza viruses from wild ducks and turkeys: potential implications for interspecies transmission. *J Gen Virol* 2006;87:171-5.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, settembre 2006 (n. 3) 3° Suppl.