DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE, CHIMICA E FARMACIA
DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE
XXVI CICLO
COORDINATORE: Prof.ssa Annalisa Santucci

Studio dell'immunogenicità di due vaccini influenzali pre-pandemici "VERO-derived A/H5N1/Indonesia/05/2005" su una popolazione adulta

Campo scientifico-disciplinare: BIO/11

Tesi di Dottorato di:

Sara Sbragi

Supervisore:

Prof. ssa Cosima Tatiana Baldari

Co-Supervisore:

Prof. Emanuele Montomoli

Anno Accademico 2016-2017

INDICE

ABSTRACT Pag. 4

INTRODUZIONE

1. Il virus dell' influenza A Pag. 10
   1.1 Caratteristiche generali Pag. 10
   1.2 Nomenclatura Pag. 11
   1.3 Morfologia del virus influenzale A Pag. 11
   1.4 Le mutazioni antigeniche Pag. 17
   1.5 La replicazione virale Pag. 22
   1.6 Patogenesi del virus influenzale Pag. 25
   1.7 Epidemie e pandemie Pag. 26

2. Virus dell'influenza aviaria A/H5N1 Pag. 34

3. I vaccini Pag. 42
   3.1 I vaccini come strumento di prevenzione dell'influenza Pag. 42
   3.2 Sfide ed ostacoli per lo sviluppo di un vaccino pandemico Pag. 46
   3.3 Nuovi metodi per lo sviluppo dei vaccini Pag. 47
   3.4 L'uso degli adiuvanti nei vaccini influenzali Pag. 49
   3.5 Modalità di somministrazione ed effetti indesiderati Pag. 50

4. Il Sistema immunitario Pag. 52
   4.1 Immunità innata Pag. 52
   4.2 Immunità adattativa Pag. 54
   4.3 Immunità mucosale Pag. 58
   4.4 La risposta immunitaria contro il virus influenzale Pag. 59

5. Studi clinici Pag. 62
   5.1 Le fasi Pag. 62
   5.2 Criteri EMA per l'approvazione di un vaccino Pag. 63
   5.3 Metodiche per l'approvazione di un nuovo vaccino influenzale Pag. 64

MATERIALI E METODI

1. Lo studio clinico Pag. 69
2. Sinlge Radial Haemolysis Pag. 71
3. Haemoagglutination Inhibition Pag. 75
4. Micro Neutralization Pag. 80
5. Analisi statistiche Pag. 84

RISULTATI Pag. 85
DISCUSSIONE Pag. 92
BIBLIOGRAFIA Pag. 97

Abstract

The high risk for a possible future avian influenza pandemic is alarming the entire scientific world. There are two main reasons: first of all, in the last decades is emerged the great ability of avian influenza virus (AIV) to infect both domestic and wild birds, with the possibility to spread the infection around the world thanks their migratory flights; then, the growing number of AIV strains isolated in the last years, proving the genomic mutation skills of the virus, leading to the high risk to become capable to infect humans, generating a possible influenza pandemic.

In the present work two different studies has been performed in parallel with the aim to evaluate the immunogenicity of a new *Vero-cell derived A/H5N1/Indonesia/05/2005*, pre-pandemic influenza vaccine, in a healthy adult population after intramuscolar (IM) and intradermal injection (ID).

In both cases, the serum of every patient was evaluate at three time points: V1, before vaccination, V2, after 21 days (for intramuscolar vaccine) and 28 days (for intradermal vaccine) from the first vaccination and then, V3, after 43 days from the first immunization. After V2, the population received a second dose of vaccine. The intramuscolare vaccine has been evaluated through 5 different HA concentration per dose (5-10-15-30-60 µg/dose); the population composed by 180 healthy adults, has been divided into 5 different cohorts. In order to evaluate the immunogenicity of the intradermal vaccine, the population was composed by 60 healthy adults, vaccinated with 15 µg of HA/dose.

While in the first study, for each cohort was evaluated the intensity of the immune response through three different serological assays (SRH, HI and MN), in the second one, the evaluation was performed through the SRH and HI assays; the only two methods recognised and recommed by EMA to evaluate the immunogenicity and efficacy of a new influenza vaccine

The vaccines evaluated in the present study brings an important innovation derived by the use of Vero cells platform for the production of the virus, to replace the classical method based on embryonated hen eggs. Infact, in case of influenza pandemic, the use of eggs could have some disadavantages: the current method of viral production requires at least of 6-9 months and, in addition, the high patogenic avian influenza virus can't be propagated efficiently in embryonated hen eggs, because they kill the embryones very quickly.

For the IM vaccine, correlations between the three serological assays were performed in order to evaluate the difference in antibodies detection for each assay.

This IM vaccine has been administered in 5 different HA/dose concentrations. From the results it is possible to state that only the vaccine with 60 µg HA/dose is able to fullfil all CHMP criteria for all

the methods considered; infact, the vaccine with only 30 µg HA/dose is able to fullfil the three CHMP criteria only in HI assay.

Another important aspect to consider is the number of doses to administer in order to elicit a proper immune response: infact from the results emerged that a second dose of vaccine is recommended to obtain a statistically significant antibody increase in all cohorts.

The results obtained showed a good and positive level of correlation, confirming the hypotesis of this vaccine to be able to elicit a broader specrum of antibody.

It is not very easy to correlate the results obtained with the three different assays because of they detect the presence of different Abs classes: SRH assay detects the IgG1 and IgG3 implicate in the complement fixation reaction and direct only against the HA1 subunit, the HI assay lets to detect all antibodies that bind the HA1, then the MN is able to relieve the functional antibodies involved in neutralization reaction and directed both against HA1 both HA2 domains.

Is important to keep in mind that this vaccine does not contain any adjuvants, generally used in seasonal vaccine in order to increase the immune response in elderly and immunocompromised people. In this study the majority of population resulted completely *naïve* against the *A/H5N1/Indonesia/05/2005*. This could explain why the concentrations of HA/dose generally used in intramuscolar vaccines (10-15 µg HA/dose) are not able to elicit a good antibody response in the majority of subjects in the present study.

So, it would be interesting to evaluate the efficacy of this IM with the addition of an adjuvant in the formulation in order to reduce the HA concentration per dose; this introduction could be useful for the process of vaccines production (less HA concentration for dose would let to have more doses of vaccine available). Then, analyzing the same vaccine but administered through the intradermal route, and containing 15 µg HA/dose, it emerged that this vaccine does not fullfil none of the CHMP criteria neither in SRH nor in HI. Even though the results do not exceed the cut-off, is possible to see a statistically significant increase in antibody titers in the serum of the patients between pre and post vaccination. A first advantage is called “Dose-Sparing Concept”, that is using the same HA concentration for dose (15 µg), the intradermal vaccine let to use the half volume to injection respect a intramuscolar dose; in this way, in case of pandemic, it will be available a number of intradermal doses equal to twice the number of intramuscolar doses.

This concept was re-evaluated in 2009 during the A/H1N1 “swine” outbreak.

Another important advantage of intradermal vaccine is the easier way of administration. Infact, nowadays, special devices with micro-needles are present on the market and they let a quick, easy, painless and without side effects (e.g. no fever) administration.

In case of trained personnel (such as: physicians, nurses etc.) the intradermal injection can be made in self-administration. Considering all these advantages it is clear how the choice of a new intradermal vaccine, it could be the winning choice for an efficient vaccine production and administration in case of influenza pandemic.

Abstract

Il rischio di una possibile pandemia da virus aviario sta destando non poche preoccupazioni tra il mondo scientifico, in quanto, nel corso del XX e XXI secolo, è stato osservato come tale virus sia dotato di una grande capacità nel diffondersi trai volatili sia selvatici che domestici oltre che di un'elevata capacità di mutare rapidamente il suo genoma, caratteristica che potrebbe renderlo capace di trasmettersi non solo dal volatile infetto all'uomo ma addirittura ad arrivare ad una trasmissione interumana.

In questa tesi sono stati presi in considerazione due studi, con la finalità di valutare l'immunogenicità di un nuovo vaccino influenzale *split* A/H5N1/Indonesia/05/2005, Vero-cell derived, somministrato sia per via intramuscolare che intradermica.

In entrambi gli studi il siero dei soggetti arruolati è stato valutato in tre visite: V1, prima della somministrazione della prima dose di vaccino, V2 dopo 21 giorni (per il vaccino intramuscolare) e 28 giorni (per il vaccino intradermico) dalla prima vaccinazione ed infine V3, dopo 43 giorni dalla prima immunizzazione. Dopo il secondo prelievo di siero al Day 21/28 la popolazione arruolata ha ricevuto una seconda dose di vaccino.

Nel caso del vaccino intramuscolare la popolazione di 180 soggetti adulti e sani è stata suddivisa in 5 coorti a seconda della quantità di antigene HA contenuta nel vaccino.

Nel caso del vaccino intradermico invece, la popolazione risultava costituita da soli 60 soggetti adulti e sani ai quali è stata somministrata la stessa quantità di HA (15 µg/dose).

Mentre nello studio che coinvolgeva il vaccino intramuscolare, per ciascun gruppo di soggetti è stata eseguita la valutazione immunologica attraverso tre metodiche (SRH, HI e MN), nel caso del vaccino intradermico, la valutazione è stata fatta ricorrendo solamente all'SRH e all'HI.

L'HI e l'SRH infatti, rappresentano attualmente i due metodi raccomandati dall'EMA da utilizzare per valutare l'entità della risposta immunitaria in seguito alla vaccinazione anti-influenzale; tuttavia l'HI ha mostrato, in numerosi studi clinici, di essere poco sensibile nei confronti dello strain A/H5N1, quindi, per tale motivo si ricorre spesso anche alla MN, che permette di *detectare* solo gli anticorpi funzionali diretti contro il virus influenzale in questione.

Una importante introduzione di questo vaccino è stata l'utilizzo di cellule Vero per la produzione dell'antigene virale anziché delle uova embrionate di gallina, le quali, soprattutto in caso di pandemia,

presenterebbero diversi svantaggi: infatti, la produzione corrente basata sulle uova richiede un lasso di tempo di almeno 6-9 mesi e inoltre, i virus aviari ad alta patogenicità non possono essere propagati in uova embrionate di gallina, perché uccidono rapidamente gli embrioni.

Per il vaccino intramuscolare sono state fatte correlazioni trai tre diversi test serologici, in modo da valutare la differenza nella *detection anticorpale* per ciascun saggio.

Il vaccino intramuscolare è stato somministrato ai pazienti in 5 differenti concentrazioni di HA/dose. Dall'analisi dei risultati è stato possibile evidenziare come, soltanto il vaccino contenente 60 µg HA/dose fosse in grado di superare tutti e tre i criteri CHMP per tutte e tre le metodiche serologiche utilizzate; infatti la concentrazione di 30 µg HA/dose è risultata sufficiente per superare i tre criteri CHMP soltanto nel caso nella tecnica HI.
Un altro aspetto importante da considerare riguarda il numero di dosi di vaccino da somministrare: infatti, dalla lettura dei risultati in tutte e tre le metodiche, è emerso che è necessaria una seconda dose di vaccino per ottenere una risposta anticorpale statisticamente significativa per tutte le coorti.
Un altro dato importante da considerare è il grado di correlazione tra le tre differenti metodiche. Infatti, dall'analisi dei risultati è emerso un positivo ed alto grado di correlazione, confermando l'ipotesi che il presente vaccino è in grado di elicitare una buona risposta anticorpale.
Non risulta sempre di facile attuazione correlare i risultati ottenuti tra i tre differenti saggi in quanto rilevano la presenza di diverse classi di anticorpi presenti all'interno del siero del paziente vaccinato: l'SRH riesce a detectare le classi di immunoglobuline IgG1 e IgG3 coinvolte nella reazione di fissazione del complemento solo e soltanto dirette contro la testa dell'emoagglutinina, glicoproteina presente a livello dell' *envelope* del virus influenzale , l'MN è invece capace di rilevare gli anticorpi funzionali coinvolti nel processo di neutralizzazione diretti sia verso la porzione HA1 che HA2 dell'emoagglutinina virale, ed infine l'HI è capace di detectare gli anticorpi sierici diretti contro la porzione HA1 dell'emoagglutinina virale ma senza tenere conto se essi siano funzionali o meno.
È importante considerare quando si effettuano queste tipologie di test che i risultati possono essere inficiati da diversi fattori, come: lo stato di immunità, i setting geografici e l'età dei soggetti coinvolti.
Altro aspetto importante da tenere in considerazione è che il presente vaccino non contiene adiuvanti, che invece sono generalmente utilizzati nei vaccini stagionali per aumentare la risposta anticorpale in soggetti anziani o immunocompromessi.
Nel nostro caso, la maggiorparte della popolazione, come confermato dalle percentuali di sieronegativi in visita 1, risulta essere completamente naïve.

Questo potrebbe spiegare il perché della non efficacia delle dosi che generalmente vengono somministrate per i vaccini stagionali (10-15 µg HA/dose per ogni strain) per la somministrazione intramuscolare.

Sarebbe interessante quindi valutare l'efficacia del medesimo vaccino intramuscolare in seguito all'aggiunta di un adiuvante al fine anche di ridurre la concentrazione di HA da includere all'interno di ciascuna dose di vaccino, la quale rappresenterebbe un collo di bottiglia non indifferente per la fase di produzione (minore concentrazione di HA/dose si tradurrebbe infatti in un maggior quantitativo di dosi di vaccino disponibili)

Dall'analisi successiva del vaccino intradermico, valutato sempre contro lo strain A/H5N1/Indonesia/05/2005 e contenente 15 µg di HA/dose, risulta come questo non sia ad oggi in grado di soddisfare nessuno dei tre criteri CHMP valutati mediante test HI ed SRH.

Nonostante tali cut-off non siano stati raggiunti è tuttavia possibile notare un aumento statisticamente significativo del titolo anticorpale tra pre e post vaccinazione.

Nonostante la vaccinazione per via intramuscolare sia quella maggiormente utilizzata, sia in campo influenzale che per altre tipologie di malattie infettive (es. meningite, tetano, pertosse etc.), il vaccino intradermico presenta un numero elevato di vantaggi, i quali possono risultare cruciali nel momento dello scoppio di una possibile nuova pandemia influenzale.

Un primo vantaggio infatti, risiede in quello che viene definito "Dose-Sparing Concept", ovvero a partire dalla stessa concentrazione di HA/dose (15 µg), con il vaccino intradermico si utilizza la metà del volume di iniezione rispetto ad una dose intramuscolare Questo dà il potenziale di rendere disponibili in meno tempo possibile un numero di dosi intradermiche assimilabili al doppio di un vaccino intramuscolare, nel caso la domanda/richiesta di vaccino aumenti in maniera improvvisa ed esponenziale, come nel caso di una nuova pandemia. Questo concetto è stato rivalutato con molta attenzione nel 2009 a seguito della nuova ondata del ceppo "swine" H1N1.

Un altro importante vantaggio del vaccino intradermico risiede nel modo assai semplice in cui viene somministrato. Esistono infatti ad oggi, nuovi sistemi di iniezione dotati di microaghi che permettono una somministrazione estremamente rapida, indolore e con ridotti effetti collaterali (ad esempio assenza pressochè totale di reazioni febbrili).

Si parla perfino di autosomministrazione in caso di personale sufficientemente trainato come gli operatori sanitari e ospedalieri.

Resta comunque da studiare e valutare come poter aumentare la sua efficacia nell'elicitare una risposta anticorpale appropriata.

Introduzione

1. Il virus dell'influenza A

1.1 Caratteristiche generali

I virus influenzali appartengono alla famiglia *Orthomyxoviridae*: virus a singolo filamento di RNA a polarità negativa. Esistono tre diversi tipi di virus dell'influenza: A, B e C **(Boyd, 1999),** i quali variano in base all'organizzazione genomica, alla specificità dell'ospite, alla morfologia e alla variabilità delle glicoproteine di superficie. I virus influenzali, sono inoltre distinguibili sulla base delle differenze antigeniche esistenti tra le proteine della matrice (M) e le nucleoproteine (NP) **(Lamb et al., 2001).**

I **virus di tipo A,** responsabili degli attacchi pandemici del passato, e delle maggiori epidemie annuali, circolano sia tra la popolazione umana che in molte specie animali. Essi possono essere ulteriormente suddivisi in sottotipi in base alle diversità esistenti nella sequenza e nell'antigenicità dei due antigeni superficiali, Emoagglutinina (HA) e Neuraminidasi (NA). Attualmente sono stati isolati 16 sottotipi di HA (H1-H16) e 9 di NA (N1-N9). E'stato inoltre dimostrato come H1, H2, H3 e N1, N2 circolino nella popolazione umana. Gli altri sottotipi di HA e NA sono stati trovati in balene, suini, foche, bestiame, polli, furetti, gatti, tigri, pipistrelli ed equini, mentre gli uccelli acquatici selvatici sono stati identificati come il *reservoir* naturale di tutti i virus influenzali A.

I **virus di tipo B,** a differenza dei virus A, circolano quasi esclusivamente in ospiti umani; sono causa di epidemie meno severe che colpiscono principalmente i bambini, non esistono inoltre sottotipi distinti a livello delle proteine di superficie HA e NA.

I virus circolanti dell'influenza B appartengono a due distinte linee genetiche (Yamagata e Victoria). Questi hanno circolato insieme nella maggior parte delle recenti stagioni influenzali **(Cox et al., 1999)**.

I virus di tipo C causano un'infezione asintomatica, spesso associata ad un banale raffreddore ed ha come unico serbatoio l'uomo, quindi generalmente considerati di minor importanza rispetto agli altri **(Gioia et al., 2008)**.

Le pandemie sono associate esclusivamente ai virus di tipo A che, come detto precedentemente, presentano la capacità di circolare sia nell'uomo che in altre specie animali e quindi di andare in contro a riassortimenti genetici e dare origine a nuovi strain, i quali possono diffondersi rapidamente all'interno di una popolazione immunologicamente *naïve,* cioè che non è mai venuta a contatto con l'agente patogeno **(Alexander, 2000)**.

1.2 Nomenclatura

In accordo con la nomenclatura dettata dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità), ogni ceppo virale influenzale è definito in base all'ospite animale di origine (specificato solo se diverso dal genere umano), all'origine geografica, al numero di ceppo, all'anno di isolamento ed alle caratteristiche antigeniche di HA e NA.
Per ogni virus influenzale viene riportato il tipo antigenico (es. A, B o C), l'ospite di origine (specificato solo se diverso dal genere umano), l'origine geografica (es. Denver, California etc), il numero di strain (es 07, 01 etc), l'anno di isolamento (es. 1957, 2005, 2009 etc.) e per l'influenza A, tra parentesi, il sottotipo di HA e NA (es. H1N1, H5N1 etc). Ad esempio, la definizione "A/Hong Kong/1/68 (H3N2)" indica l'isolamento 1 del ceppo A dell'uomo, avvenuto ad Hong Kong nel 1968 **(Kubi, 2001)**.

1.3 Morfologia del virus influenzale A

La particella virale ha un diametro variabile tra gli 80 ed i 120 nm, e presenta un involucro pleiomorfo (*envelope*) grossolanamente circolare, dotato di proiezioni glicoproteiche che prendono il nome di spicole (*spike*) **(Dianzani et al., 2008)**. Tali spicole sono costituite dalle due glicoproteine di superficie HA e NA, che costituiscono gli antigeni fondamentali del virione e sono responsabili della variazione antigenica tipica dei virus influenzali e anche della immunità indotta nell'ospite. Nello specifico, l'HA rappresenta circa il 25% della proteina virale e la NA , approssimativamente il 5% **(Jawetz et al., 2011)**.
L'envelope fosfolipidico (derivato dalla membrana plasmatica della cellula infettata in seguito a gemmazione) contiene anche la **proteina di matrice 2 (M2),** un canale ionico protonico selettivo attivato dal basso pH presente negli endosomi e coinvolto sia nella acidificazione dell'ambiente virale che nell'assemblaggio di nuovi virioni. Al di sotto del doppio strato fosfolipidico si trova la proteina di matrice 1 (M1) che, oltre a fornire il supporto all'involucro esterno, interagisce, durante le fasi di montaggio col nucleo-capside. Quest'ultimo, a simmetria elicoidale, contiene il genoma, rappresentato da 8 filamenti singoli di RNA a polarità negativa **(Dianzani et al., 2008)**.

Le proteine codificate dal virus influenzale A sono:

1. emoagglutinina (HA)
2. neuroaminidasi (NA)
3. proteina di matrice 1 (M1)

4. proteina di matrice 2 (M2)
5. nucleoproteina (NP)
6. proteina 1 non strutturale (NSP1)
7. proteina 2 non strutturale (NSP2)
8. proteina acida polimerasica (PA)
9. proteina basica polimerasica 1 (PB1)
10. proteina basica polimerasica 2 (PB2)
11. proteina 1-F2 polimerasica basica (PB1-F2) **(Neumann et al., 2010)**

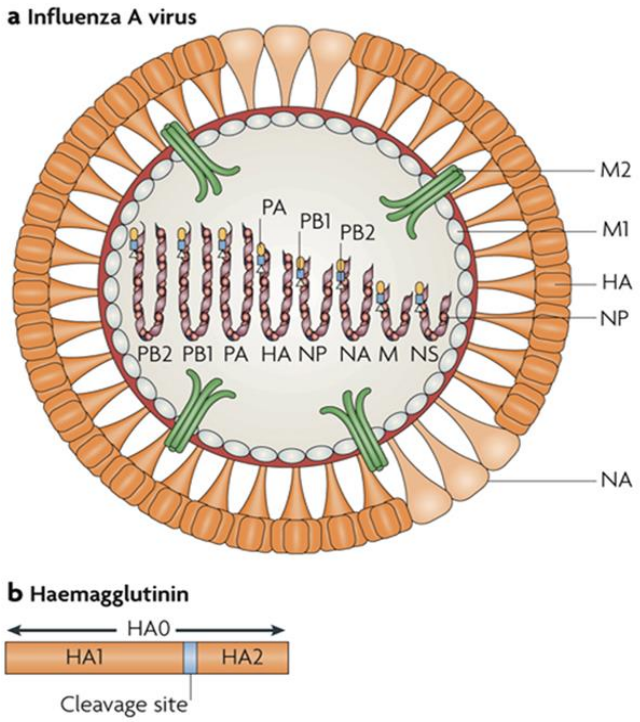

Fig. 1: Rappresentazione schematica del virione dell'influenza A. Due glicoproteine di membrane, emoagglutinina (HA) e neuraminidase (NA), e il canale ionico M2 sono inseriti all'interno dell'envelope virale che deriva dalla membrana plasmatica della cellula ospite. Il complesso ribonucleoproteinico include un segmento di RNA virale associate con la nucleoproteina (NP) e tre protein polimerasiche (PA, PB1 e PB2). La proteina di matrice (M1) è associate sia con la ribonucleoprotein ache l'envelope virale.
Sorgente: T. Horimoto and Y. Kawaoka, *Nature Reviews Microbiology,* 2005; 3(8):591-600.

Ciascun segmento di RNA è impacchettato dalla nucleoproteina virale (NP) e da proteine non strutturali (NSP2) che insieme formano il complesso ribonucleoproteico (RNP) o core virale. A una delle estremità di ciascun complesso RNP si trovano tre proteine polimerasiche (PB1, PB2 e PA) **(Nayak et al., 2009)** fondamentali per replicazione e trascrizione del RNA.

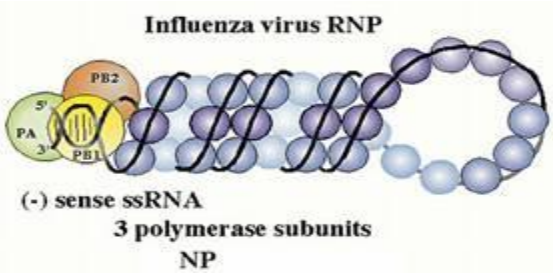

Fig. 2. Struttura della Ribonucleoproteina del virus influenzale**.** Sorgente: Portela & Digard, 2002.

I maggiori responsabili della stimolazione della risposta immunitaria nell'ospite sono le tre proteine virali di superficie HA, NA e la proteina di matrice 2 (M2) **(Anwar et al., 2006)**.

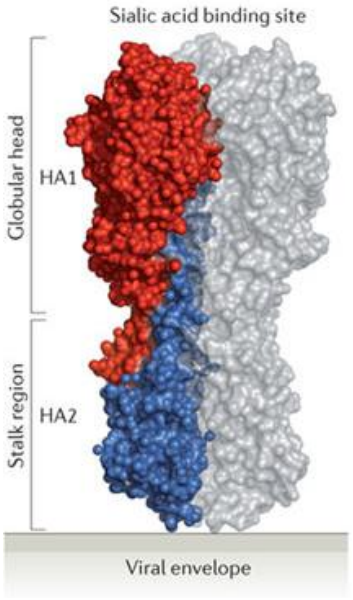

Fig. 3. Struttura dell'HA virale. In figura sono mostrate le due subunità dell'emoagglutinina: HA1 e HA2. Sorgente: Patrick C. Wilson & Sarah F. Andrews, *Nature Reviews Immunology* 12, 709-719 (October 2012).

L'emoagglutinina (HA), così chiamata per la sua attività emoagglutinante, cioè per la sua capacità di legare il virione ai globuli rossi con conseguente emoagglutinazione, è una glicoproteina di tipo I di circa 220kDa, codificata dal segmento quattro del RNA e ancorata alla membrana virale tramite la sua estremità C-terminale **(Ha et al.,2001).**

La molecola di HA può mutare ad eccezione della sequenza che rappresenta il sito di legame al recettore della cellula ospite. Il grado di variabilità della sequenza di questa proteina riflette il grado

di eterogeneità del virus dell'influenza: in natura infatti sono stati riconosciuti 16 sottotipi di HA (H1-H16) che differiscono per il 30% circa nella sequenza aminoacidica.

L'HA è costituita da due catene proteiche distinte: HA1 (50 kDa) e HA2 (27 kDa), le quali si originano tramite processi proteolitici a partire da un unico precursore (HA0) sintetizzato nella cellula infetta come una singola catena polipeptidica lunga circa 560 amminoacidi **(Dianzani et al., 2008).** Essa è poi scissa dalle proteasi della cellula ospite dando così origine a due sub unità: una testa globulare costituita dalla sub unità HA1 (di circa 50 kDa) unita, mediante ponti disolfuro, ad uno stelo, costituito prevalentemente da HA2 (di circa 27 kDa) **(Strayer Lubert, 2001).**

La testa globulare (HA1) è costituita da tre monomeri, ciascuno contenente il sito di legame per il recettore della cellula ospite e cinque siti antigenici ai quali si legano gli anticorpi neutralizzanti (**Ha et al., 2001).**

Lo stelo dell'emoagglutinina (HA2) invece, è ancorato all'envelope virale tramite la sua regione c-terminale. A livello di questa sub unità si trova la regione più conservata dell'emoagglutinina: una sequenza trans-membrana idrofobica denominata "fusion peptide". Questo dominio è fondamentale per il processo di destabilizzazione della membrana virale e di fusione con la membrana della cellula bersaglio **(Horimoto & Kawaoka, 2001).**

Da un punto di vista filogenetico, esistono due gruppi diversi di HA **(Air, 1981):**

Gruppo 1 contiene: H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 e H16;

Gruppo 2 contiene: H3, H4, H7, H10, H14 e H15

L'HA svolge un ruolo importante nel ciclo vitale del virus e rappresenta il determinante principale della virulenza. È responsabile del legame del virus all'acido sialico (SA) dei recettori della membrana della cellula ospite e anche della fusione tra le membrane del virus e l'endosoma con conseguente rilascio di RNPs virale nel citoplasma **(Skehel et al., 2000)**.

Un'altra importante funzione dell'HA è quella di permettere il legame del virione influenzale alla cellula target. Il sito di legame del recettore infatti è specie-specifico: l'HA dei virus influenzali umani riconosce solo i residui di acido sialico presenti sulla superficie delle cellule della mucosa respiratoria che presentano un legame alfa 2,6-galattosio, mentre l'HA dei virus influenzali aviari riconosce solo i residui di acido sialico che presentano un legame alfa 2,3-galattosio: questo tipo di recettori è presente essenzialmente sulla superficie delle cellule della mucosa respiratoria ed enterica di suini e volatili e, anche se in misura nettamente inferiore, della mucosa umana **(Ito et al., 1998)**

Tuttavia esistono animali come il suino, che presentano sia recettori con legame alfa 2,6-galattosio che alfa 2,3-galattosio, e che quindi possono essere infettati contemporaneamente da virus influenzali di tipo umano e di tipo aviario (mixing vessel) **(Trebbie et al., 2011)** (Figura 4).

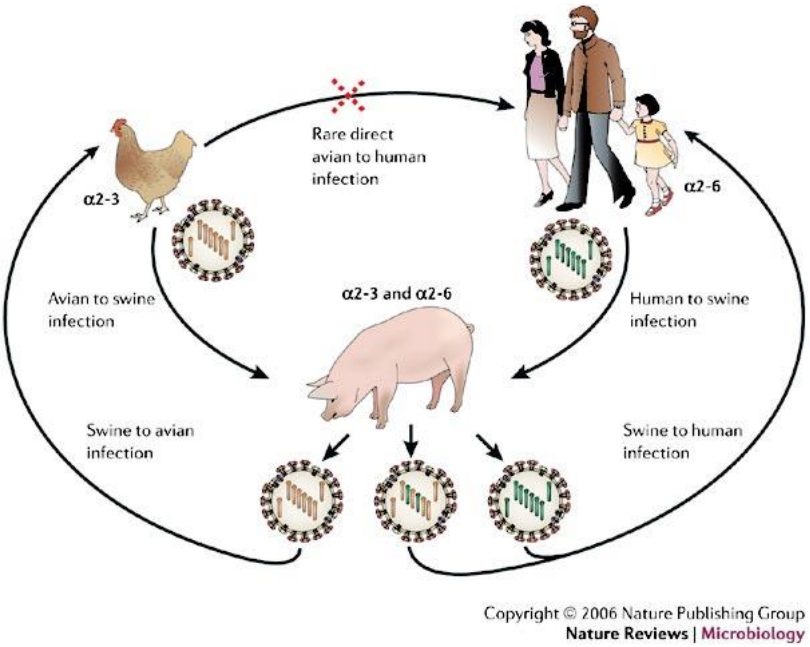

Fig. 4. Il suino come "mixing vessel" per i virus influenzali di tipo. Sorgente: Nature Reviews,2006.

Un'altra importante glicoproteina di superficie dei virus influenzali è rappresentata da NA.

La **neuraminidasi (NA)**, codificata dal segmento numero 6 del RNA virale, è una glicoproteina di membrana di tipo II, tetramerica, di circa 240 kDa, ed è il secondo maggiore antigene di superficie della particella virale. La NA è ancorata alla membrana virale con le sue estremità N-terminali.

In natura sono state riconosciute, ad oggi, 9 neuraminidasi (N1-N9)

Anche NA, come HA, filogeneticamente si divide in due gruppi:

Gruppo 1 - N1, N4, N5 e N8;

Gruppo 2 - N2, N3, N6, N7 e N9.

A livello strutturale la NA è costituita da un gambo idrofobico che ancora la proteina alla membrana virale e da una testa globulare che contiene i siti enzimatici e antigenici

È una sialidasi, cioè un enzima ad attività idrolasica che interviene nella rimozione dell'acido sialico dal recettore della cellula ospite.

Dopo aver completato il suo ciclo di replicazione, il rilascio finale del virus dalla superficie della cellula infettata può avvenire solo grazie all'azione della neuraminidasi virale che agisce rimuovendo l'acido sialico dalla superficie della cellula ospite. Senza il suo intervento le particelle virali appena formatesi si legherebbero nuovamente al recettore presente sulla superficie della cellula appena infettata e non sarebbero rilasciate efficientemente nello spazio extracellulare, rimanendo così adese alla cellula infettata a formare dei grossi aggregati **(Paulson, 1985).**

Pertanto, in conclusione, lo stabilirsi di un efficace infezione virale dipende sia dall'azione congiunta e sincrona dell'HA e della NA.

Un'altra importante proteina di membrana è la **proteina di matrice M2**. Presente in forma tetramerica, funziona da canale per il passaggio di ioni H+. Quando all'interno degli endosomi si abbassa il pH, questi canali ionici si attivano inducendo un'acidificazione del virione facilitando così il suo uncoating **(Pinto, 1992)**.

Le altre proteine virali sono:

La **proteina di matrice M1,** è la più abbondante proteina presente nel virus influenzale; è disposta sulla parte interna della membrana lipidica del virus e forma una matrice che circonda il complesso RNP svolgendo un ruolo fondamentale nell'assemblaggio e nella liberazione dei virioni per gemmazione **(Lamb et al., 1996)**.

Le altre proteine strutturali sono:

La **NP** è la maggiore proteina strutturale presente nel virus influenzale. Una volta trasportata all'interno del nucleo della cellula infettata, la nucleoproteina si lega al genoma virale per la trascrizione e l'assemblaggio del RNA **(Biswas et al.,1998)**.

La **PA** è codificata dal segmento 3 del RNA. Il suo ruolo nella sintesi del RNA non è del tutto chiaro, ma sembra che sia coinvolta nella degradazione proteolitica delle proteine co-espresse (**Sanz-Ezquerro et a.,l 1998)**.

La **PB1** è codificata dal segmento 2 del RNA e ha il compito di sintetizzare la proteina a partire dal mRNA virale.

La **PB2** è codificata dal segmento 1 del RNA. Durante l'iniziazione della trascrizione del mRNA, questa proteina riconosce e lega il cap '5 dal mRNA della cellula ospite che è usato come primer per la trascrizione del mRNA virale **(Nakagawa et al., 1996).**

Infine nel virus influenzale sono presenti anche proteine non strutturali, codificate dal segmento di RNA numero 8:

La **NSP1** ha funzioni multiple: regolazione dello splicing, esportazione nucleare degli mRNAs cellulari, stimolazione della traduzione **(Lamb et al., 1996)** e neutralizzazione dell'attività dell'interferone nella cellula ospite (funzione, quest'ultima, dimostrata da virus knock-out NSP1 che crescono meno efficientemente di virus non privati della proteina NSP1 (**Garcia-Sastre, 1998).** La **NSP2** pare rivesta un ruolo importante nell'esportazione del complesso RNP dal nucleo grazie all'interazione con la proteina M1 **(O'Neill, 1998)**.

Infine è stata recentemente scoperta un'altra proteina, la **N40,** codificata dal segmento PB2 **(Medina & Garcia-Sastre, 2011)** ma la sua funzione non è ancora nota.

Alcuni virus H5N1 esprimono anche la proteina pro-apoptotica PB1-F2, codificata dal segmento 2 del RNA **(Che et al., 2001)**.

Table 1: Influenza A virus genes and proteins

Gene ID	Segment	Protein name	Protein function
1	Polymerase B2 (PB2)	Polymerase B2 (PB2)	Internal protein, virus replication
2	Polymerase B1 (PB1)	Polymerase B1 (PB1)	Internal protein, virus replication
		PB1-F2	Mitochondrial targeting and apoptosis
3	Polymerase A (PA)	Polymerase A (PA)	Internal protein, virus replication
4	Hemagglutinin (HA)	Hemagglutinin (HA)	Surface glycoprotein, viral attachment, antigenic determinant, subtype specific (H1 through H16)
5	Nucleoprotein (NP)	Nucleoprotein (NP)	Nucleocapsid protein, RNA coating, nuclear targeting, RNA transcription, type (A,B,C) specific
6	Neuraminidase (NA)	Neuraminidase (NA)	Surface glycoprotein, antigenic determinant, viral release from host cells, subtype specific (N1 through N9)
7	Matrix (M)	Matrix 1 (M1)	Membrane protein stability, type (A,B,C) specific
		Matrix 2 (M2)	Membrane protein, viral uncoating, type (A,B,C) specific
8	Non-structural (NS)	Non-structural 1 (NS1)	Internal proteins
		Non-structural 2 (NS2)	Regulation of virus life cycle, especially mRNA transcription and localization of viral ribonucleic proteins

Adapted from Lamb and Krug, 2001.[2]

Fig 5: Elenco delle proteine codificate dal genoma del virus dell'influnza A e le corrispettive funzioni. Sorgente: Lamb and Krug, 2001.

1.4 Le mutazioni antigeniche

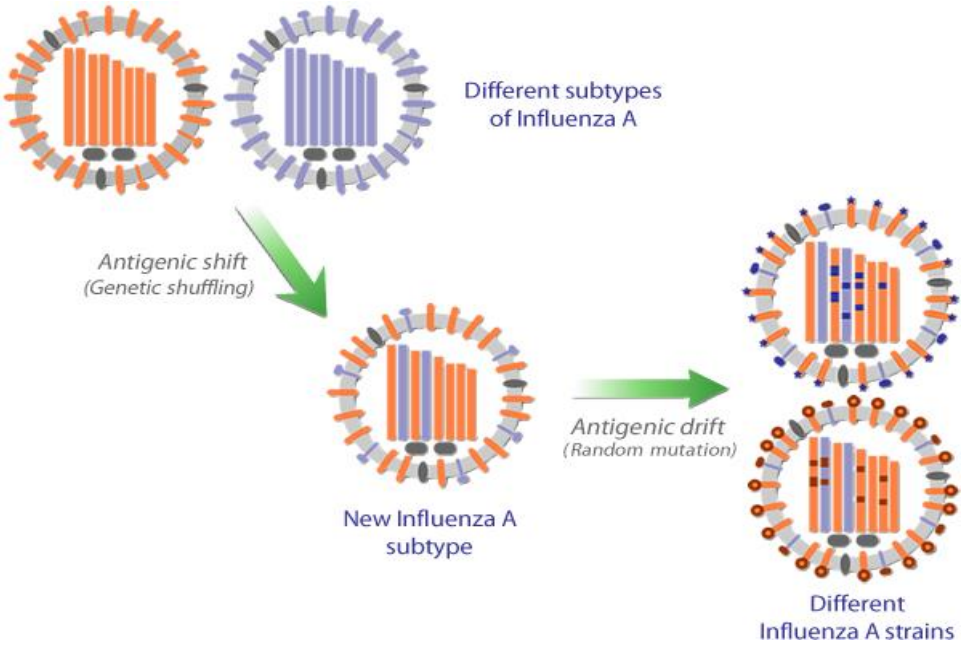

Fig. 6: Antigenic drift e shift; Sorgente:WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, http://www.influenzacentre.org/aboutinfluenza.htm.

I virus influenzali vanno incontro a continue evoluzioni antigeniche **(Wilschut et al., 2006).** È proprio questa loro caratteristica a permettere loro di evadere la risposta immunitaria preesistente nell'ospite, risultando così inefficiente contro le nuove varianti del virus influenzale che ogni anno si presentano durante la stagione invernale **(Zambon, 1999) (Monto, 2000).**

Dato che HA è l'antigene principale contro il quale gli anticorpi neutralizzanti sono diretti, è essenzialmente la variazione antigenica dell'HA ad essere responsabile dell'evasione del virus dalla risposta immunitaria dell'ospite. Altri antigeni virali vanno incontro a variazioni meno significative, ma possono anch'esse contribuire all' evasione del virus dalla difesa immunitaria dell'ospite **(Wilschut et al., 2006).** L'evoluzione antigenica dei virus influenzali fonda le basi primarie per il verificarsi delle epidemie di influenza annuali e delle pandemie occasionali.

Sono due, i meccanismi principali mediante i quali i virus dell'influenza A possono cambiare le loro caratteristiche antigeniche **(Kilbourne, 1997)**:

-*Antigenic Drift*

-*Antigenic Shift*

L'antigenic drift determina cambiamenti minori e graduali che si verificano attraverso mutazioni puntiformi nei due geni responsabili della codifica delle due principali proteine di mebrana: HA e NA. Le mutazioni puntiformi sono imprevedibili, comportano cambiamenti minori delle due proteine di superficie e sono la conseguenza della mancata capacità di effettuare correzioni delle bozze da parte dell'RNA polimerasi virale **(Alerstam et al., 1990)**.

In seguito alla replicazione dell'RNA del virus influenzale, la frequenza con la quale si può verificare una mutazione puntiforme è approssimativamente di 1 su 100.000 nucleotidi **(Stech et al., 1999)**. Considerando che la dimensione dell'intero genoma virale è di circa 14.000 nucleotidi, questo implica che le copie del genoma di molti nuovi virus conterranno una o più mutazioni. Mentre la maggior parte di queste mutazioni risulterà silente o genererà dei codoni di stop, altre provocheranno sostituzioni di aminoacidi nelle proteine codificate, che potranno dare origine a nuove varianti con un vantaggio rispetto al virus da cui è stato originato. Tale vantaggio consisterà nel fatto che queste nuove varianti non verranno più neutralizzate dagli anticorpi preesistenti dell'ospite **(Wright & Webster, 2001)**.

Queste variazioni antigeniche devono essere accuratamente valutate quando si prendono in considerazione gli strain da introdurre nei vaccini influenzali stagionali che sono revisionati ogni anno.

L'OMS infatti, conduce un'attenta sorveglianza annuale negli emisferi settentrionale e meridionale, al fine di investigare l'antigenicità dei virus influenzali prima della stagione influenzale, per essere

sicuri che gli strain introdotti nei vaccini corrispondano ai virus maggiormente circolanti, fornendo così un'affidabile protezione immunogenica (**Kanai et al., 2010)**.

I virus influenzali A subiscono antigenic drift molto più rapidamente dei virus B **(Alerstam et al., 1990); s**i manifestano in media ogni 2-8 anni **(Smith et al., 2004)**.

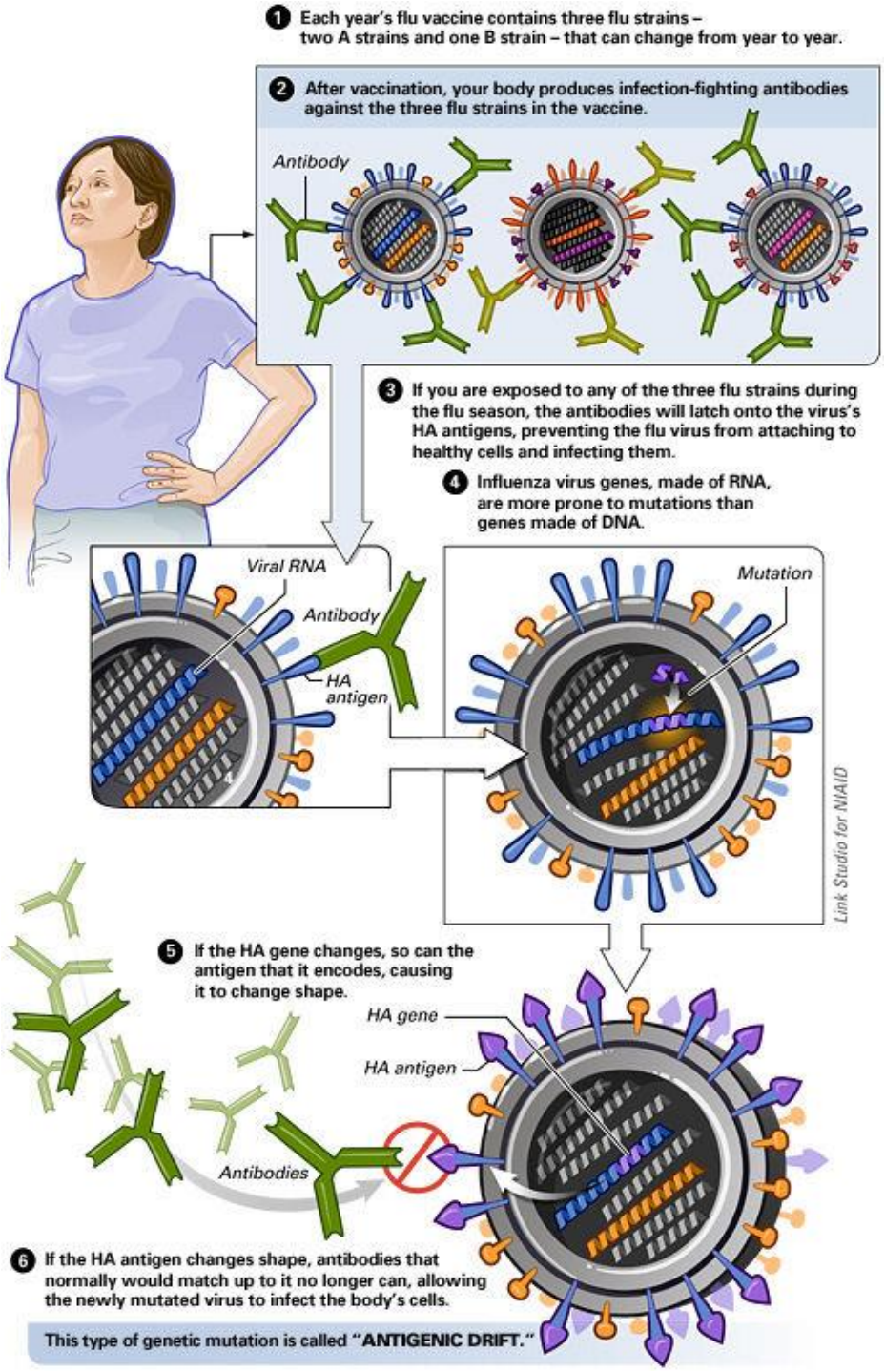

Fig. 7: Rappresentazione dell' Antigenic drift Sorgente; (http://niaid.nih.gov/topics/flu/research/basic/pages/antigenicdriftillustration.aspx)

Gli **antigenic shift** invece, sono cambiamenti antigenici di maggiore entità e avvengono solamente nei virus di tipo A **(Kilbourne, 1987).** Essi, sono dovuti al riassortimento genetico tra due virus influenzali di diversa origine (ad esempio uno umano e uno suino) **(Nicholson, 1998)** provocando la comparsa di un ceppo virale che presenta una proteina di superficie che appartiene ad un sottotipo del tutto diverso rispetto a quelli che solitamente circolano nell'uomo **(Jensen, 1957)**.

Il riemergere di virus circolati in precedenza è un altro meccanismo con cui si possono verificare gli antigenic shift. Ad esempio, il virus influenzale russo H1N1 che circolò negli anni'50 **(Nakajima et al., 1978) (Scholtissek, 1978)** nel 1977 contagiò le popolazioni immunologicamente naïve a quel sottotipo virale, specialmente i più giovani che non erano ancora stati infettati in passato da un H1N1 **(Kung et al., 1978)**.

Questo tipo di mutazione rappresenta la causa principale dell'insorgenza di possibili pandemie, in quanto il sistema immunitario degli uomini e degli animali recettivi in genere, non riconosce il nuovo virus (b).

L'antigenic shift può verificarsi per mezzo di due vie:

-diretta trasmissione di virus aviari da volatili (in particolare pollame) all'uomo: raramente un virus dell'influenza aviaria ad alta patogenicità è trasmesso direttamente dagli uccelli agli umani **(Wilschut et al., 2006).** Tuttavia può capitare che un virus aviario venga introdotto nella sua totalità nella popolazione umana e successivamente adattato al nuovo ospite. L'adattamento coinvolge una combinazione di mutazioni in differenti geni del virus, includendo i geni che codificano per l'HA e la polimerasi **(Gamblin et al., 2004)(Taubenberger et al., 2005)**.

L'adattamento di un virus aviario all'ospite umano può così dare origine ad un virus capace di trasmettersi da uomo a uomo.

-riassortimento genetico: avviene quando una cellula ospite è contemporaneamente infettata da due virus dell'influenza A. I segmenti di RNA da entrambi i virus sono replicati nel nucleo della cellula. Durante l'assemblaggio delle nuove particelle virali, i segmenti di RNA di entrambi gli strain possono essere mescolati insieme per dare origine ad un terzo nuovo strain virale con una combinazione di geni totalmente nuova.

Questo fenomeno può verificarsi ad esempio in animali come il maiale che presenta sulle proprie cellule sia i recettori per i residui di acido sialico con il legame alfa 2,6-galattosio sia quelli per i residui di acido sialico con il legame alfa 2,3-galattosio e che quindi può essere confettato sia da virus umani che aviari. Nel momento in cui ad esempio, il maiale viene infettato contemporaneamente da un virus A di origine aviaria e da uno di origine umana, può avvenire il fenomeno del riassortimento genetico. Infatti, durante la replicazione virale che avviene all'interno delle cellule del suino, nel

momento in cui saranno assemblati i nuovi virioni, quest'ultimi conterranno sia segmenti di genoma provenienti dal sottotipo virale aviario che da quello umano**. (Ito et al., 1998)**.

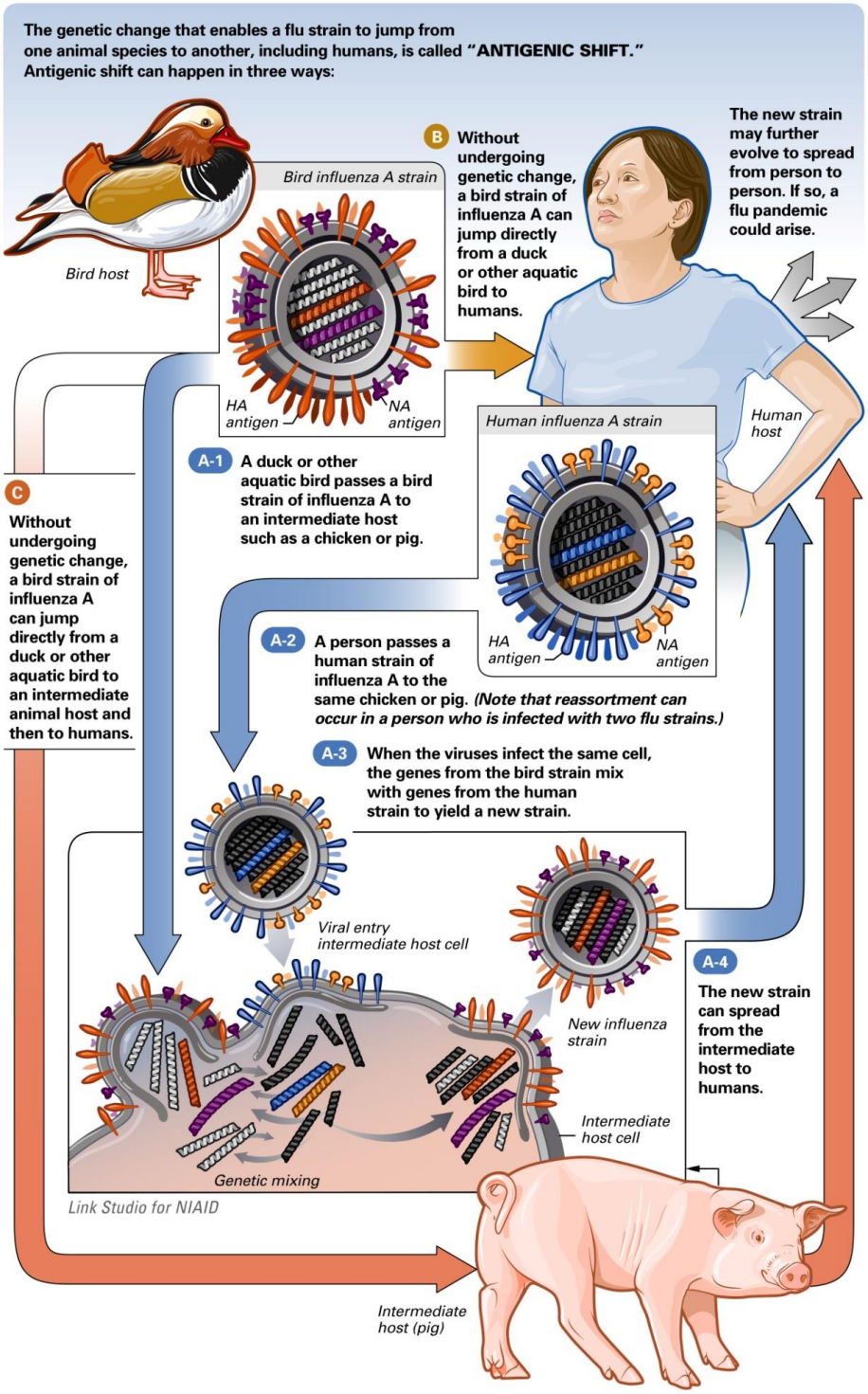

Fig. 8: Rappresentazione dell'Antigenic shift Sorgente: (http://niaid.nih.gov/topics/flu/research/basic/pages/antigenicshiftillustration.aspx)

È stato constatato che gli antigenic shift avvengono in media circa 3 volte ogni 100 anni **(Potter, 2001)**, il che è perfettamente in linea con le antigenic shift che sono state la causa delle 3 pandemie verificatesi nel XX secolo (1918, 1957, 1968).
Al momento, è lo strain A/H5N1 ad alta patogenicità a destare un'enorme preoccupazione, in quanto si teme che possa subire delle antigenic drift che gli permettano di acquisire la capacità di trasmettersi da uomo a uomo, provocando così un'importante pandemia a livello mondiale (**Smith et al., 2006).** Fortunatamente ad oggi, anche se questo strain ha subito considerevoli antigenic drift dal suo primo isolamento nel 1993, non è stato ancora in grado di sviluppare un'efficace trasmissione interumana **(WHO, 2005)**

1.5 La replicazione virale

Il meccanismo di replicazione può essere schematizzato nelle seguenti fasi:

1. Legame del virus ai recettori dell'acido sialico;
2. Ingresso del virus attraverso la membrana plasmatica della cellula ospite;
3. Endocitosi del virus;
4. Fusione della membrana virale con la membrana dell'endosoma;
5. Ingresso delle ribonucleoproteine virali nel nucleo, sintesi dell'RNA messaggero (mRNA) e replicazione virale;
6. Sintesi delle proteine virali;
7. Assemblaggio e rilascio dei virioni **(Wilschut et al.,2006).**

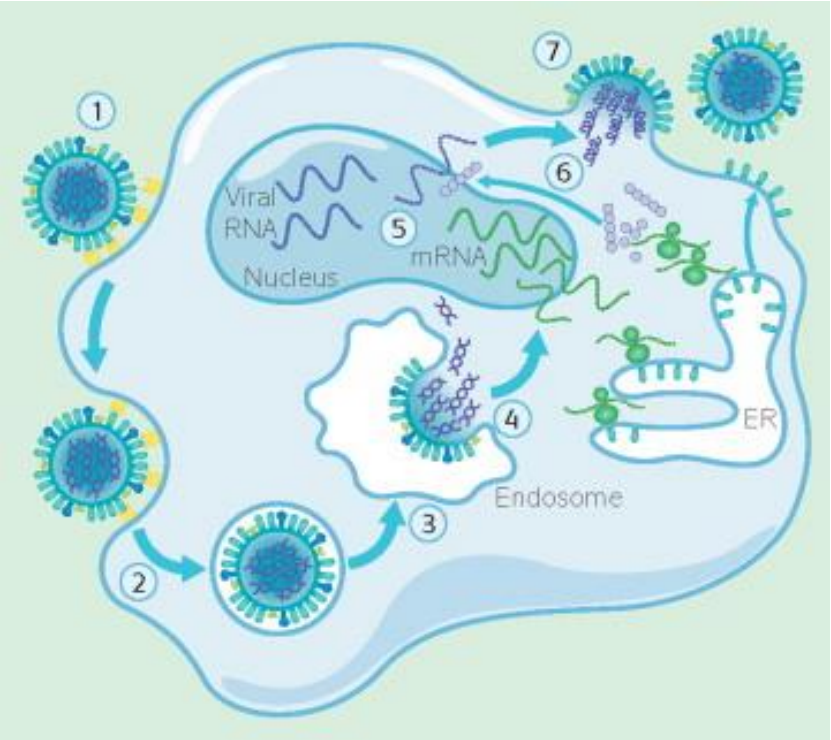

Fig. 9: Replicazione del virus influenzale. Sorgente: Wilschut et al.,2006**.**

Il virus si lega ai recettori mucoproteici specifici situati sulla membrana della cellula target dell'epitelio respiratorio umano, attraverso le spicole di HA che vanno a formare un legame con i residui di acido sialico presenti sulla cellula ospite **(Dianzani, 2008).** Le molecole di HA del virus influenzale hanno una specificità per legami α–2,3 o α–2,6–galattosio **(Bouvier et al., 2008).** Nell'epitelio tracheale umano predominano i legami del tipo α–2,6–galattosio, mentre i legami α–2,3 sono presenti essenzialmente nell'epitelio viscerale di anatra e, anche se in misura nettamente inferiore, nell'epitelio respiratorio umano, specialmente a livello bronchiolare e alveolare **(Couceiro et al.,1993)**. Per questo motivo l'uomo e gli altri primati potrebbero potenzialmente essere infettati anche da virus aviari dell'influenza (**Beare et al., 1999)**.

La NA cliva i residui di acido sialico permettendo alle particelle virali di infettare l'epitelio respiratorio sottostante.

Dopo l'attacco del virus alla membrana della cellula da infettare, si verifica la penetrazione del nucleocapside all'interno della cellula, per endocitosi. Le particelle virali sono così inglobate all'interno di endosomi generati dalla membrana plasmatica della cellula infettata **(Dianzani, 2008)** Il basso pH dell'endosoma innesca un cambiamento conformazionale a livello della struttura del HA, esponendo un "peptide di fusione" che ha appunto il compito di mediare la fusione dell'envelope virale con la membrana endosomiale, aprendo quindi un canale attraverso il quale il RNP virale viene rilasciato nel citosol della cellula infettata. Anche il canale ionico M2 del virus contribuisce all'

acidificazione dell'endosoma permettendo anche la dissociazione del RNP virale dalle proteine M1 di membrana.

La presenza delle sequenze della localizzazione nucleare (NLS) assicura il trasferimento degli RNP virali dal citoplasma all'interno del nucleo.

Le ribonucleoproteine virali hanno al loro interno RNA polimerasi, che utilizza come stampo l'RNA. All'interno del nucleo gli RNA virali a polarità negativa (RNAs), vengono trascritti in mRNA virali a polarità positiva (mRNAs) da parte delle trascrittasi (composte da PB1, PB2 e PA) che sono portate dalle ribonucleoproteine **(Lamb et al., 2001)**. Le trascrittasi, in un processo denominato "*cap snatching*" utilizzano brevi cap di mRNA cellulare come primer per innescare la sintesi dell'mRNA virale consentendo il legame dei ribosomi all'mRNA, inoltre inibiscono la sintesi di proteine proprie della cellula infettata a favore della produzione di componenti virali. A questo punto gli mRNAs sono trasportati nel citoplasma della cellula infettata e tradotti in proteine virali **(Wilschut et al., 2006)**.

Le proteine di superficie HA, NA e M2, sono processate nel reticolo endoplasmatico, glicosilate nell'apparato del Golgi, e trasportate sulla membrana cellulare

La sintesi delle proteine virali del core, invece, si verifica interamente nel *citosol*. **(Paulson, 1985)**.

Le NP virali si assemblano con i nuovi RNA virali che sono poi trasferiti nel citoplasma attraverso il complesso M1-NS2

Le RNP virali raggiungono le proteine M1 accumulate sul lato citoplasmatico del doppio strato lipidico e i nuovi virioni appena assemblati vengono riversati nell'ambiente extracellulare dalla cellula infettata **(Bouvier et al., 2008)**.

Alla fine del ciclo di replicazione virale, il rilascio dei nuovi virioni nello spazio extracellulare dipende dall'azione della NA virale, la quale ha il compito di rimuovere l'acido sialico dalla superficie della cellula ospite. Senza l'intervento della NA le particelle virali appena formatesi andrebbero nuovamente a legarsi al loro recettore sulla superficie della cellula ospite e non sarebbero rilasciate nello spazio extracellulare, rimanendo così adese alla cellula infettata sotto forma di grossi aggregati **(Paulson, 1985)**.

Sia gli anticorpi diretti contro le NA che gli inibitori delle NA, prevengono il rilascio dei nuovi virioni dalla cellula infettata, e quindi hanno la capacità di inibire la replicazione virale **(Bouvier et al., 2008)**.

1.6 Patogenesi del virus influenzale

Il virus dell'influenza è trasmesso per contagio aereo interumano diffondendo da persona a persona attraverso le goccioline di aerosol trasportate dall'aria; le particelle virali replicano nel tratto respiratorio ciliato e poi successivamente sono rilasciate all'esterno attraverso minuscole goccioline di aerosol emesse attraverso colpi di tosse, starnuti o semplicemente parlando.

Nel momento stesso in cui il virus dell'influenza viene inalato, il muco prodotto dalle cellule epiteliali del tratto respiratorio superiore lo intrappola, successivamente, attraverso le ciglia, viene trasportato nella parte posteriore della faringe dove può potenzialmente essere espettorato. Il virus influenzale provoca la lisi delle cellule dell'epitelio respiratorio che diventano così vacuolate ed edematose, lasciando integre solamente la membrana basale dell'epitelio respiratorio **(Wilschut et al., 2006)**.

Se il virus resta confinato esclusivamente a livello delle cellule ciliate e non della mucosa nasale, in genere causa una patologia senza complicanze. Se invece si verifica un'estensione a livello delle cellule epiteliali degli alveoli polmonari, spesso anche in associazione con un'infezione batterica secondaria, si può avere una grave polmonite **(Kuiken et al., 2008)**.

La sintomatologia tipica dell'influenza compare solo dopo un breve periodo di incubazione (generalmente dopo 1-2 giorni) e l'esordio è molto brusco, caratterizzato da febbre che si innalza rapidamente sino a 38-39°C e oltre, preceduta da intensa sensazione di freddo **(Moroni et al., 1996**) e accompagnata da cefalea, tosse secca, dolori ossei e muscolari generalizzati, malessere ad astenia. **(Cox et al., 2004)**.

Normalmente l'influenza ha un'evoluzione benigna ma, in alcuni soggetti, come gli anziani, i bambini molto piccoli, gli immunodepressi e i soggetti con patologie croniche (cardiovascolari, respiratorie, diabete, insufficienza renale etc.) possono sopraggiungere delle complicanze, talvolta anche fatali, in quanto più suscettibili e possono quindi subire una riacutizzazione o peggio ancora, un aggravamento della loro malattia di base o anche sviluppare complicazioni a carico dell' apparato respiratorio.

L'influenza può ovviamente complicarsi anche a causa di una sovrainfezione batterica dovuta ad un agente microbico che sfrutta l'indebolimento generale dell'organismo per potersi diffondere **(**www.focusinfluenza.it).

La forma di complicazione più grave è, senza dubbio, la polmonite.

La polmonite virale primaria è causata direttamente dal virus dell'influenza. La maggior parte delle persone ricoverate durante i periodi epidemici per questo tipo di patologia ha un'età superiore ai 40 anni. I pazienti presentano una sindrome influenzale seguita da tosse persistente, tachipnea e dispnea che può progredire in una sindrome da difficoltà respiratoria dell'adulto (ARDS). Nella maggior parte dei casi vi è un'abbondante espettorazione. In un terzo dei pazienti addirittura può manifestarsi

emottisi. Sebbene tecniche di ventilazione assistita abbiano permesso di migliorare anche le condizioni dei pazienti più gravi, il tasso di mortalità resta comunque elevato: intorno al 50%. Decisamente più comune è la polmonite batterica secondaria; infatti l'infezione da virus influenzale favorisce la suscettibilità dei pazienti per le sovrainfezioni batteriche. Ciò viene attribuito alla perdita dell'attività di clearance ciliare, alla disfunzione delle cellule fagocitarie e alla presenza di un ricco terreno di coltura per i batteri, rappresentato dall'essudato alveolare. I batteri più spesso implicati in questo processo sono: lo *Staphylococcus aureus*, lo *Streptococcus pneumoniae* e l'*Haemofilus influenzae* (**Jawetz et al., 2011)**

Come rhinovirus e coronavirus anche il virus influenzale, può aggravare il quadro clinico di pazienti con malattie polmonari croniche **(Rohde et al.2003),** probabilmente questo è legato al fatto che intervengono alcuni mediatori dell'infiammazione (citochine, interleuchine ecc..) (**Lin et al. 1988).**

1.7 Epidemie e pandemie

1.7.1 Epidemie stagionali

Il monitoraggio dei cambiamenti antigenici dei virus influenzali rappresenta la chiave per dar vita a un efficace sistema di sorveglianza immunitaria, permettendo così di mettere in atto misure preventive prima del possibile verificarsi di epidemie particolarmente aggressive o pandemie.

I virus influenzali sono la principale causa di infezioni a livello del tratto respiratorio superiore.

Nei Paesi tropicali l'influenza può verificarsi in qualsiasi periodo dell'anno, mentre le epidemie di influenza nelle regioni temperate avvengono quasi esclusivamente nei mesi invernali: da ottobre ad aprile nell'emisfero settentrionale e da aprile ad ottobre nell'emisfero meridionale.

Non è ancora del tutto chiaro il motivo di questa stagionalità, tuttavia è possibile ipotizzare alcune ragioni:

- l'affollamento di un gran numero di persone in luoghi chiusi (asili, scuole, palestre etc.) con scarso ricambio di aria favorisce la diffusione interumana del virus **(Taubenberger & Morens, 2006)**.
- le basse temperature invernali contribuiscono ad abbassare le difese immunitarie dell'ospite, rendendolo maggiormente suscettibile all'infezione **(Lofgren et al., 2007)**.

Secondo l'OMS durante le epidemie stagionali di influenza circa il 5-15% della popolazione mondiale viene infettato, con una media di 250.000-500.000 morti e 3-5 milioni di casi gravi **(WHO, 2014)**.

Le epidemie sono causate sia da virus di tipo A che B, mentre le pandemie sono scatenate esclusivamente da virus influenzale di tipo A **(Hay et al., 2001)**.

Le epidemie annuali di influenza sono causa di un elevato consumo di risorse sanitarie dovuto a: visite mediche, utilizzo di farmaci, complicanze e ospedalizzazioni ed è, ancora oggi, in Italia, la terza causa di morte per patologia infettiva, dopo l'AIDS e la tubercolosi **(Sauro et al., 2006)**.

Ogni anno nell'emisfero settentrionale, fino a 100 milioni di persone si ammalano di influenza; mediamente 1 adulto su 10 e 1 bambino su 3 contraggono la malattia **(Barker et al., 1980)**. Tra i bambini, 1 su 3 tende a sviluppare un'otite acuta media e per 1 su 100 è necessario un ricovero per complicanze **(Glezen et al., 1980)**.

Per quanto riguarda la sorveglianza epidemiologica della sindrome influenzale, nel 1999 il Ministero della Salute in accordo con l'ISS (Istituto Nazionale Superiore di Sanità), e con alcune Università (Genova e Milano) ha istituito "*InfluNet*", un "*sistema sentinella*" a cui prende parte un gran numero di medici su tutto il territorio nazionale. Le informazioni ottenute vengono inviate durante la stagione influenzale al CIRI (Centro Interuniversitario per la Ricerca dell'Influenza), all'ISS, alla rete dei laboratori periferici per l'influenza e agli Assessorati regionali alla Sanità. Tutte queste informazioni vengono poi trasmesse al Ministero della Salute **(Bartolozzi, 2012)**.

Secondo i dati ottenuti durante le ultime stagioni influenzali, come illustrato nel rapporto finale di InfluNet, si può vedere che: come si evince dal grafico sottostante, durante la stagione influenzale 2015-2016 la circolazione dei virus è iniziata più tardi e di conseguenza il picco è stato raggiunto due settimane dopo rispetto alle precedenti stagioni influenzali, ovvero nella seconda settimana di febbraio. La curva epidemica ha raggiunto il picco con un livello di incidenza pari a circa 6 casi per mille assistiti, decisamente inferiore rispetto a quello raggiunto durante la stagione precedente (durante la quale si erano verificati circa 11 casi per mille assistiti). Inoltre il picco epidemico è stato uno dei più bassi registrati negli ultimi dieci anni e l'influenza ha colpito solo l'8% degli italiani, per un totale di circa 4.900.000 casi dall'inizio della stagione. Questo valore colloca la stagione appena trascorsa ad un basso livello di intensità.

Come di consueto, anche durante la stagione influenzale 2015-2016 il virus ha colpito maggiormente i bambini della fascia di età 0-4 anni (incidenza: 22,7%), successivamente la fascia di età 5-14 anni (16,5 %), poi gli adulti della classe 15-64 anni (7%) per raggiungere il valore minimo negli anziani (2,9%).

Infine, i virus influenzali che hanno caratterizzato la stagione epidemica 2015-2016, sono stati sia virus influenzali di tipo A (43% dei campioni risultati positivi) che B (57% dei campioni positivi); tra quelli di tipo A ha maggiormente circolato il sottotipo A(H3N2) (62%) rispetto al sottotipo A(H1N1) (38%).

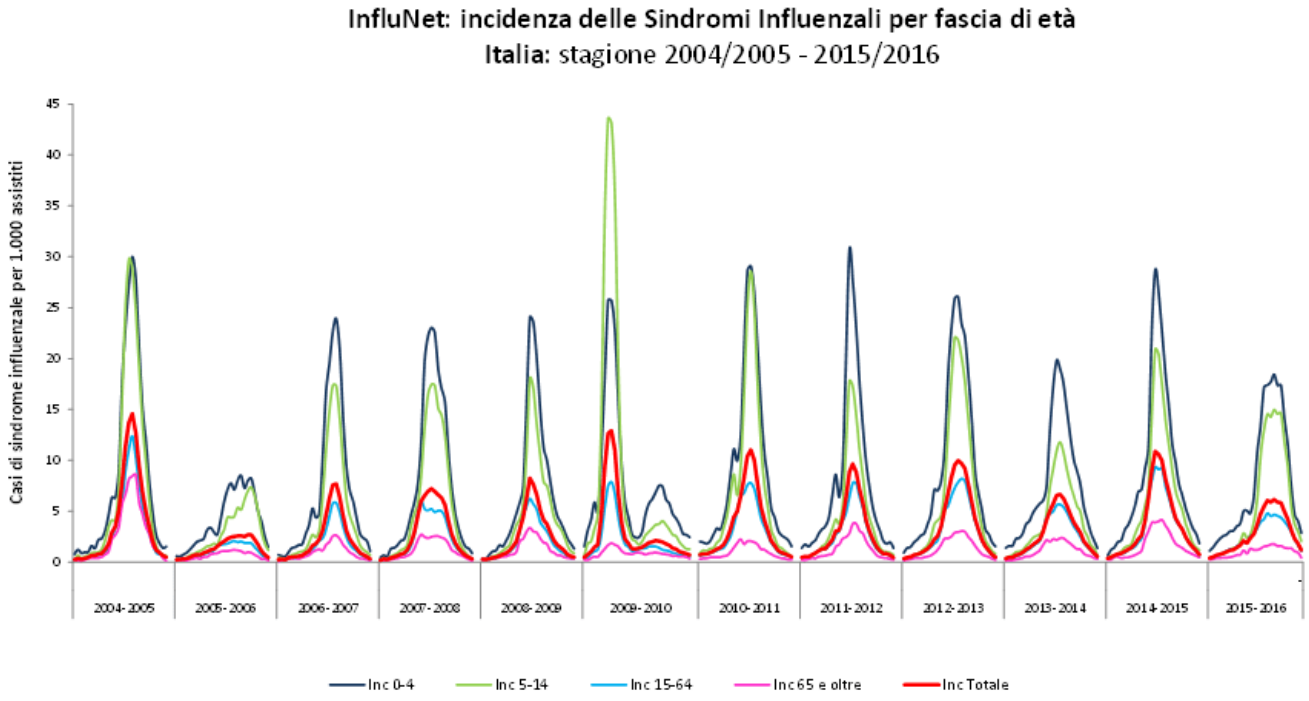

Fig. 10: Incidenza delle sindromi influenzali per fascia di età dalla stagione epidemica 2004/2005 alla stagione 2015/2016. Sorgente: http://www.epicentro.iss.it/problemi/influenza/BilancioInflunet2015-2016.asp.

1.7.2 Pandemie

Una pandemia è definita come "un'epidemia che si verifica a livello mondiale o su un'area vasta, attraversando i confini internazionali e generalmente colpendo un gran numero di persone**" (Last, 2001)**.

L'WHO ha definito tre prerequisiti che deve avere un virus influenzale affinchè si possa considerare pandemico:

1. un nuovo virus influenzale emerge nella popolazione generale verso il quale è immunologicamente naïve
2. questo nuovo virus deve essere in grado di replicare negli umani e provocare la malattia
3. il virus deve essere capace di trasmettersi da uomo a uomo

La WHO ha diviso il verificarsi di una pandemia in 6 fasi:

fase 1: un virus infetta gli animali (soprattutto gli uccelli selvatici o domestici) ma non ha acquisito la capacità di infettare gli uomini

fase 2: un virus influenzale animale ha sviluppato la capacità di infettare gli uomini e perciò può essere considerato un potenziale virus pandemico

fase 3: un virus influenzale animale o derivato da un riassortimento tra virus umano e animale ha causato casi sporadici o ha infettato piccoli gruppi di persone ma la trasmissione uomo-uomo non ha ancora raggiunto dimensioni tali da poter coinvolgere intere comunità.

Fase 4: il rischio di una pandemia è decisamente aumentato ma non è ancora certa. La trasmissione interumana è accertata ed il virus è in grado di colpire intere comunità. Nel caso una nazione si rendesse conto che si sono verificate le condizioni per dichiarare una fase 4, è necessario consultare immeditamente l'OMS e implementare le misure di contenimento.

Fase 5: ancora non si può parlare di pandemia ma la diffusione della malattia tra gli uomini si è verificata in più di una nazione di una data regione dell'OMS. La dichiarazione di una fase 5 indica un rischio molto elevato di pandemia imminente

Fase 6: questo è il livello pandemico. La malattia si è diffusa in almeno un'altra nazione di un'altra regione dell'OMS diversa da quella della fase 5. La pandemia globale è in corso.

Esistono inoltre altre due fasi:

1. post picco
2. post pandemica

-post picco: si riscontra una riduzione dei livelli pandemici, anche se non sono da escludere ulteriori ondate successive e quindi le nazioni devono essere pronte per fronteggiare un eventuale seconda ondata pandemica

-post pandemica: i livelli influenzali sono paragonabili a quelli di una epidemia di influenza stagionale (Figura 13).

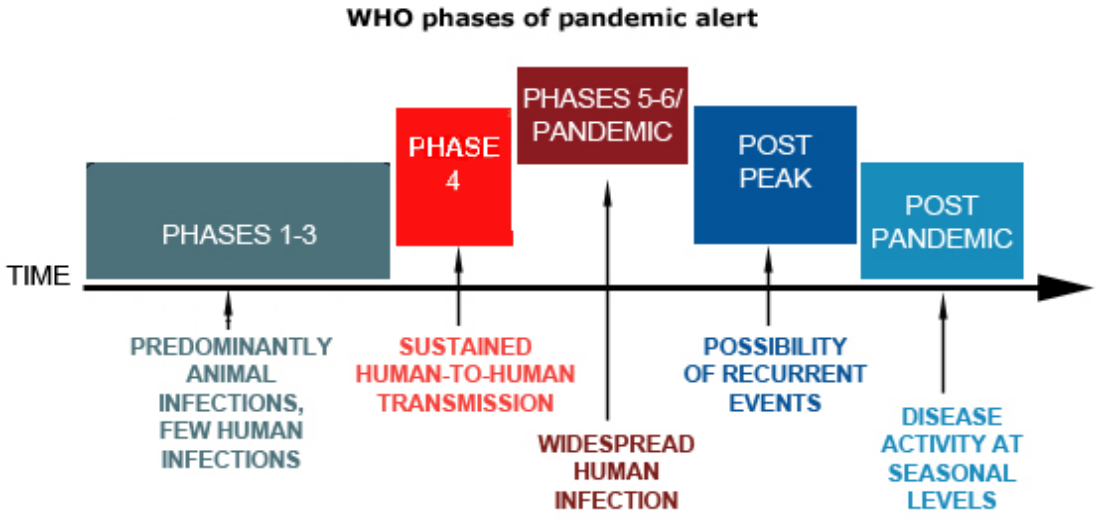

Fig. 13: Fasi della pandemia di influenza. Sorgente: http://www.who.int/csr/disease/flu/phase/en/.

Nel XX secolo 3 sono state le pandemie di influenza che hanno colpito la popolazione mondiale:

- l'influenza "Spagnola" del 1918 (A/H1N1)
- l'influenza "Asiatica" del 1957 (A/H2N2)
- l'influenza "Hong Kong" del 1968 (A/H3N2)

Ciascuna di esse differiva dalla precedente per l'agente eziologico, l'epidemiologia e la gravità della malattia. **(Kilburne, 2006)**

La prima pandemia è avvenuta tra il 1918-1919. Si tratta della famigerata "Influenza Spagnola" che fu di gran lunga la pandemia con il tasso di mortalità più elevato, provocando circa 50 milioni di morti in tutto il mondo nell'arco di soli 10 mesi

Fece la sua comparsa nel marzo del 1918 negli Stati Uniti, in particolare a Detroit, South Carolina e la prigione di S. Quintino, dove si verificarono numerose morti in giovani adulti per un inusuale malattia respiratoria.

L'infezione si diffuse rapidamente, attraversando sia l'Oceano Atlantico che l'Oceano Pacifico nel giro di pochi mesi, uccidendo molti soldati americani durante il loro viaggio in Europa nella primavera del 1918.

In Europa, i primi casi si verificarono a Madrid nel maggio del 1918, da qui il nome di influenza "Spagnola". Questa prima ondata infettò tutti gli eserciti in Europa tra maggio e giugno. Dopo l'ondata iniziale ci fu una forte riduzione nel numero di casi nell'estate del 1918, seguito da una seconda ondata, molto più severa, con picco nell'autunno del 1918, e poi una terza ondata nella primavera del 1919, associata al diffondersi globale dell'infezione **(Johnson & Mueller, 2002).**

Una prima particolarità di questa pandemia è legata al fatto che fu causata da un virus H1N1 capace di infettare simultaneamente uomini e suini **(Taubennerger et al., 2001).** Il virus della Spagnola infatti rappresentava un sottotipo virale completamente nuovo a cui la maggior parte della popolazione umana e suina risultava essere naïve.

Analisi filogenetiche recenti ipotizzano che i geni codificanti per l'HA e la NA del virus della Spagnola derivassero da un virus avian-like circolato molto poco nelle decadi precedenti **(Reid et al., 1999).**

Un'altra particolarità di questa pandemia è stata la classe maggiormente colpita. Infatti, in genere l'influenza ha un tasso di mortalità molto elevato in corrispondenza di una fascia di età molto giovane o molto anziana (curva a U); nel caso invece della Spagnola si è aggiunto un terzo picco in corrispondenza della fascia di età trai 20 e i 40 anni (curva a W) (figura 11). Questo fenomeno potrebbe essere dovuto al fatto che le persone nate prima del 1889 erano già state esposte ad un virus

circolante a quell'epoca che probabilmente aveva fornito una parziale immunoprotezione verso il virus influenzale del 1918 negli over 30 (**Taunbenberger & Morens, 2006)**.

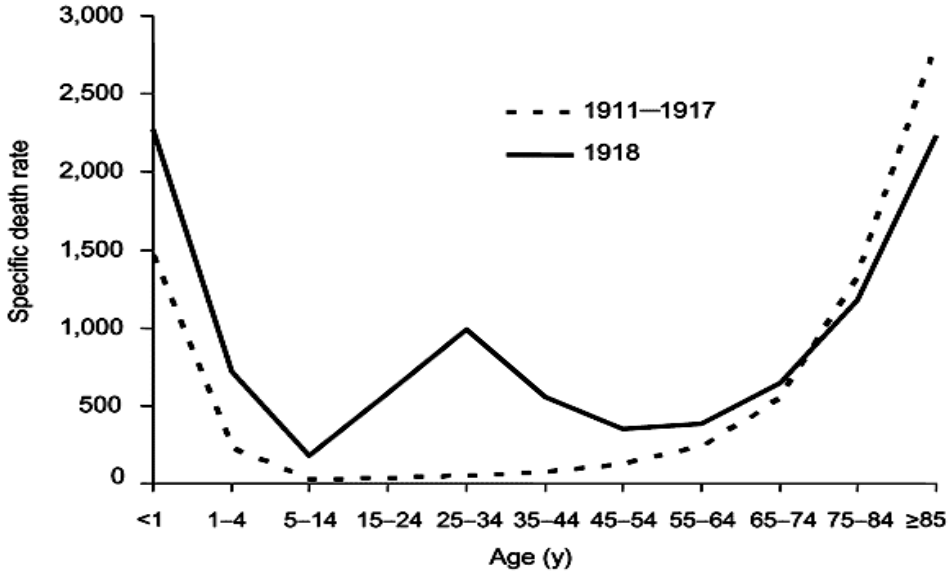

Fig. 11: Differenza nella distribuzione della mortalità in base alle diverse fasce di età tra la pandemia influenzale del 1918 e le precedenti epidemie stagionali (1911-1917). Sorgente: www.cdc.gov.

Nel marzo del 1957 ebbe origine in Cina un'altra pandemia: **l'influenza "Asiatica",** causata dal virus A/H2N2 di origine aviaria, che si diffuse rapidamente nel sud est asiatico e in Giappone, e successivamente, in maggio, in Australia, Indonesia, e India, e durante l'estate, in Europa, Africa, America. In soli 6 mesi, la pandemia si diffuse in tutto il mondo. Una seconda ondata si verificò nell'autunno del 1957.

In totale colpì il 40-50% della popolazione, con il 25-30% di persone che presentarono i sintomi clinici.

La mortalità era di 1/4000 e si rivelò essere molto alta soprattutto tra i giovani adulti e le persone molto anziane, provocando la morte di circa 1-1,5 milioni di persone **(Hilleman, 2002)**.

Il nuovo virus A/H2N2 si originò in seguito al riassortimento genetico tra il virus H1N1 umano responsabile dell'"Influenza Spagnola" e un virus H2N2 aviario; questo originò un virus completamente nuovo contenente 3 nuovi segmenti di RNA derivanti dal virus influenzale aviario (quelli codificanti rispettivamente per HA, NA, PB1) e 5 segmenti di RNA derivanti dal virus H1N1 circolante nel 1918

Successivamente, nel 1968, si verificò un'altra pandemia, definita "**Influenza Hong Kong**", provocata da un virus influenzale H3N2, derivato dal riassortimento genetico tra il virus H2N2 umano

circolante nel 1957 con un virus H3 aviario; in questo modo si originò un nuovo virus H3N2 contenente 2 nuovi segmenti di RNA derivanti dal virus aviario (quelli che codificano per HA, PB1) e 5 segmenti invece dal virus umano del 1918 **(Belsher, 2005)**.

La pandemia, che si svolse tra il 1968 ed il 1969, causò trai 750.000 e il milione di decessi **(Hilleman, 2002)**.

La prima pandemia del XXI secolo si è verificata nel 2009, quando tra fine marzo-inizio aprile sono stati identificati i primi pazienti infettati da virus H1N1 in Messico e negli Stati Uniti con rapida diffusione a livello mondiale **(Dawood et al., 2012)**.

L'agente eziologico responsabile fu nuovamente il virus H1N1 **(Taubenberger et al., 2010)**.

Analisi filogenetiche sulla sequenza virale hanno suggerito che la sua origine può essere ricercata nel triplo riassortimento di strain influenzali aviari, umani e suini **(Smith et al., 2009)**.

Questo nuovo virus provocò milioni di casi e almeno 16455 morti accertate dal WHO a marzo 2010 **(WHO, 2010)**.

La popolazione maggiormente colpita dall'influenza suina fu rappresentata da bambini e adolescenti. Una spiegazione plausibile potrebbe essere legata al fatto che parte degli adulti aveva acquisito già una certa immunità in seguito a precedenti esposizioni a virus influenzali H1N1 circolanti prima del 1957 **(Hancock et al., 2009)**.

L'influenza suina ha avuto un tasso di mortalità piuttosto elevato, tuttavia pare che le infezioni batteriche abbiano giocato un ruolo importante nei casi fatali **(Hajjar & McIntosh, 2010)**.

Years	Common name	Area of emergence	Subtype	Estimated reproductive number	Estimated CFR	Estimated attributable excess mortality worldwide	Age groups most affected	GDP loss (% change)
1918-1919	Spanish flu	Unclear	H1N1	1.5-1.8	2-3%	20-50 million	Young adults	-16.9 to 2.4
1957-1958	Asian flu	Southern China	H2N2	1.5	0.1-0.2%	1-4 million	Children	-3.5 to 0.4
1968-1969	Hong Kong flu	Southern China	H3N2	1.3-1.6	0.2-0.4%	1-4 million	All age groups	-0.4 to (-1.5)
2009-2010	Swine flu	Mexico	H1N1	1.4-1.6	<0.025%	151,700-575,500	Children (5-14), young adults and pregnant women	-0.03 to (-0.05)

Fig. 12: Caratteristiche delle pandemie influenzali verificatesi negli ultimi 100 anni. Sorgente: Yun Noh et al., 2013.

Non ci sono dubbi che ci saranno altre pandemie di influenza in futuro **(Wilschut et al., 2006)**. Infatti il punto non è "se" ma "quando" si verificherà. Tutti gli ingredienti per la formazione di nuovi virus influenzali con potenziale pandemico ci sono, soprattutto in Asia. Infatti come già indicato sopra, i

virus H2N2 del 1957 e il virus H3N2 del 1968 hanno avuto origine proprio nel continente asiatico, precisamente in Cina. Si è pensato che le condizioni ecologiche della Cina, come degli altri Paesi asiatici, potessero essere favorevoli per la crescita dei virus influenzali potenzialmente pandemici. Questo include la circolazione tutto l'anno di virus influenzali che, insieme alla alta densità di popolazione di persone, suini, pollame domestico, che vivono spesso a stretto contatto tra loro, rappresentano delle condizioni che facilitano il riassortimento genetico o il trasferimento diretto di virus aviari all'uomo. Comunque questo non esclude il fatto che nuovi virus con potenziale pandemico possano sorgere ovunque.

Inoltre è possibile che sottotipi virali pandemici circolati in passato (es H2N2) possano riemergere nel momento in cui l'immunità della popolazione contro tali virus sarà gradualmente scomparsa; cosa che è avvenuta di frequente in passato **(Nakajima et al., 1978)**.

Particolare preoccupazione destarono le minacce di possibili pandemie legate all'insorgenza del virus aviario H5N1 nel 1997 e al suo riemergere nel 2003.

Infatti tale strain minacciò di emergere come patogeno umano potenzialmente pandemico a partire dal 1997 quando uccise 6 delle 18 persone infettate. Prima di allora si pensava che la specificità del recettore dei virus aviari rappresentasse un impedimento per la trasmissione diretta agli uomini e che tale trasmissione (dagli uccelli acquatici agli uomini) richiedesse l'infezione di un ospite intermedio che presentasse entrambi i recettori, come ad esempio il maiale. Gli eventi del 1997 dimostrarono invece che anche il pollame domestico poteva fungere da ospite intermedio **(Webby & Webster, 2003)**.

2. Virus dell'influenza aviaria A/H5N1

I virus responsabili dell'influenza aviaria possono essere distinti in due categorie in base al grado di patogenicità che possono provocare: virus ad alta patogenicità (Highly Patogenic Avian Influenza, HPAI) e virus a bassa patogenicità (Low Patogenic Avian Influenza, LPAI) **(Swayne et al., 2000)**. Mentre i virus ad alta patogenicità causano una mortalità significativa nei polli, i virus a bassa patogenicità causano una malattia respiratoria lieve, diminuzione della produzione delle uova e/o depressione. Tuttavia è stato dimostrato che virus LPAI possono trasformarsi in virus HPAI. **(Neumann et al., 2010)**. Il primo virus H5N1 è stato isolato in Sud Africa nel 1961, tuttavia si trattava di un LPAI. Gli uccelli selvatici (oche selvatiche, anatre) sono riconosciuti essere il serbatoio per tutti i sottotipi di Virus Influenzali Aviari (AIV) **(Stallknecht et al., 2007)**. I virus influenzali aviari in genere non causano la malattia nei loro ospiti naturali. Il principale sito di replicazione virale negli uccelli acquatici è rappresentato dal tratto gastrointestinale: infatti, sono stati rilevati alti titoli di virus influenzale all'interno delle loro feci, favorendo così la diffusione del virus nelle zone di migrazione **(Stephenson et al., 2004)**. Trattandosi infatti di uccelli selvatici migratori, sono capaci di trasportare il virus anche in luoghi molto lontani dal loro sito di origine; da qui il nome di "s*huttle*" in quanto permettono il trasporto del virus per lunghe distanze in un periodo di tempo piuttosto breve. Infatti, nel 2006 sono stati isolati alcuni virus H5N1 ad alta patogenicità nei dintorni del lago Qinghai, risultanti strettamente correlati con una tipologia di virus aviario isolato nella lontana Croazia l'anno precedente, suggerendo così che questo virus potrebbe aver viaggiato da e verso l'Asia grazie a questi uccelli "*shuttle*" **(Wang et al., 2008)**. Questo esempio è emblematico del fatto che gli uccelli migratori ricoprano un ruolo chiave nella diffusione dei virus H5N1 ad alta patogenicità a livello mondiale, per cui si è rilevato necessario effettuare una attenta sorveglianza su queste determinate specie di uccelli **(Neumann et al., 2010)**.

L'uomo acquisisce il virus influenzale aviario essenzialmente attraverso il contatto diretto delle mucose del tratto respiratorio e della congiuntiva con le secrezioni infettive e gli escreti di uccelli infettati oppure con prodotti contaminati derivati dal pollame **(Wong et al., 2006)**. I principali comportamenti a rischio risultavano dunque essere: le operazioni di abbattimento, spennamento e preparazione degli uccelli infettati, il maneggiare i galli da combattimento, il consumo di pollame poco cotto e il giocare con gli animali da cortile, soprattutto anatre.

È vero che il principale *reservoir* dei virus influenzali aviari è rappresentato dagli uccelli acquatici migratori, tuttavia sono stati riscontrati anche casi in cui alcuni AIV hanno infettato altre specie animali, come: cavalli, suini, mammiferi marini, cani, gatti e addirittura tigri e leopardi di alcuni giardini zoologici tailandesi in seguito all'alimentazione con polli infetti crudi **(Keawcharoen et al.,**

2004). Uno studio molto importante fu condotto proprio sui felini. Per questo studio vennero reclutati 8 gatti: a 3 venne inoculato il virus H5N1 direttamente nelle vie aeree, altri 3 furono alimentati con pulcini infetti, mentre gli ultimi 2 furono esposti al virus solo per contatto diretto con gli altri gatti infetti. Tutti i felini mostrarono immediatamente tutti i sintomi della malattia: forte rialzo termico, letargia e dispnea, seguiti da gravi sintomi a livello polmonare. Un gatto morì dopo solo 6 giorni dall'infezione. Questo stava a dimostrare come in caso di epidemie da virus H5N1, i gatti domestici presentassero un rischio molto elevato di contrarre la malattia, sia in seguito all'ingestione di pollame e/o di uccelli selvatici infetti, sia in seguito al contatto diretto con altri animali già infettati dal virus H5N1. Inoltre, un altro aspetto decisamente preoccupante era rappresentato dal fatto che i gatti potessero rappresentare una grande opportunità per il virus H5N1 di adattarsi ai mammiferi, aumentando così notevolmente il rischio di una pandemia **(Kuiken, 2004).**

Il virus H5N1 HPAI fu inizialmente isolato da oche malate nella provincia di Guangdong in Cina nel 1996 **(Xu et al., 1999)** e differiva dal virus H5N1 LPAI isolato nelle oche nel 1961 per alcune piccole mutazioni a livello del gene che codificava per l'HA **(Medina, 2011)**.

Nel Marzo 1997, ad Hong Kong, fece la sua comparsa il virus H5N1 HPAI all'interno dei mercati di pollame vivo **(Harvey et al., 2004)** e successivamente, nel Maggio dello stesso anno, si verificò il primo caso di infezione umana da H5N1 **(Subbarao et al., 1998)**. Il suddetto virus venne isolato da campioni di fluido nelle alte vie respiratorie di un bambino di 3 anni che morì pochi giorni dopo il ricovero **(De Jong et al., 1997)**. Il bambino aveva presentato svariati sintomi: polmonite, sindrome di distress respiratorio (ARDS), sindrome di Reye, malfunzionamento multiorgano e diffusa coagulazione intravascolare **(Class et al., 1998)**. La polmonite generalmente si verifica nei pazienti affetti da influenza solo in seguito ad una infezione batterica secondaria; in questo caso invece, la polmonite fu causata direttamente dal virus, il quale si dimostrò resistente agli antibiotici **(Ligon, 2005)**. Nel Novembre-Dicembre dello stesso anno si verificò un'altra epidemia per un totale di 17 casi, sparsi in differenti distretti, quindi senza un apparente *clustering* geografico. Di questi 17 casi, 6 risultarono fatali. Dall'analisi dei virus che avevano determinato l'insorgenza nei polli e negli uomini, emerse che il gene che codificava per l'HA virale derivava con molta probabilità dal virus A/goose/Guangdong/1/96 mentre i rimanenti 7 geni derivavano da altri virus aviari.

Nel 2001 e 2003, nella regione di Fujian, nei suini presenti all'interno della stessa azienda furono isolati due differenti virus H5N1 HPAI. Successive analisi rivelarono che i 2 virus erano strettamente correlati tra loro e che inoltre mostravano una stretta omologia con il virus isolato in precedenza nelle anatre; questo suggerì che i 2 virus H5N1 ad alta patogenicità probabilmente erano già entrati in contatto con i suini e che probabilmente stavano circolando silenziosamente in questi animali già da tempo. Se questa ipotesi si fosse rivelata veritiera, avrebbe rappresentato un enorme problema per la

salute pubblica: i suini infatti, sono i principali "*mixing vessels*" per il riassortimento di virus umani e aviari, con il conseguente rischio di una pandemia. Nel continente cinese la prima infezione umana si è verificata nel 2005 **(Yu et al., 2006)**; da allora sono stati riscontrati 30 casi con 20 decessi. Nel 2005 si verificò un fatto eccezionale: lo sterminio di circa 6000 uccelli migratori nella riserva nazionale del lago di Qinghai. Fino a quel momento l'infezione degli uccelli acquatici da parte di virus H5N1 HPAI era stata sporadica e aveva sempre coinvolto un numero limitato di uccelli; quindi uno sterminio di tali proporzioni, era decisamente inusuale, considerato anche il fatto che gli uccelli rappresentano il *resorvoir* naturale di questi virus e che solitamente non manifestano sintomi. In questo caso invece i sintomi si sono manifestati e anche con una notevole violenza: si trattava infatti, sia di sintomi di carattere neuronale (tremore e opistotono), sia sintomi gastrointestinali (diarrea). Un altro problema particolarmente rilevante era legato al fatto che i campioni provenienti da diverse specie di uccelli acquatici sembravano essere strettamente correlati tra di loro, supportando l'ipotesi che i virus si fossero riassortiti tra loro **(Liu et al., 2005)**. Successivi studi di patogenicità dimostrarono come la maggior parte dei virus H5N1 HPAI isolati negli uccelli migratori del lago Qinghai fossero fatali anche per altre specie animali (polli e topi). Fin dalla sua prima apparizione documentata, l'OMS ha riportato 637 casi umani confermati di infezioni da H5N1, che comprendono 378 morti, con un tasso medio di mortalità del 60% **(WHO, 2013)**; i dati sono mostrati in figura 14.

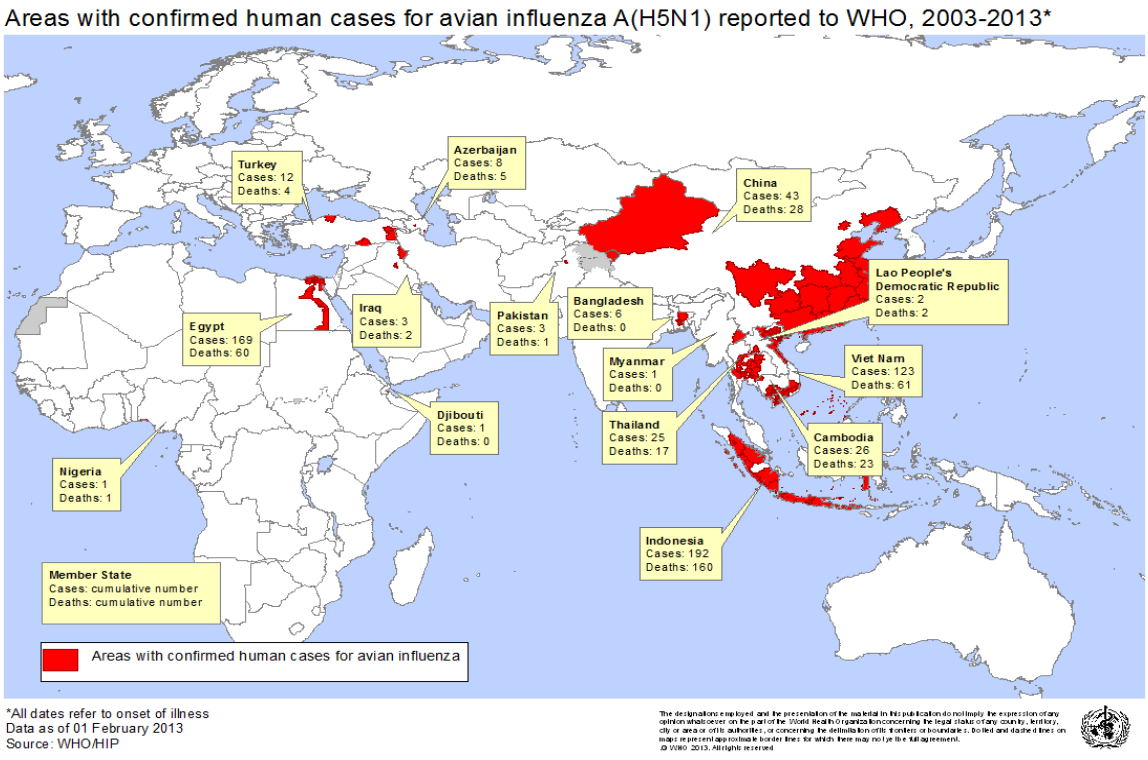

Fig.14 Sorgente: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/2003_AvianInfluenza_GlobalMap_01Feb13.png

Dalla loro comparsa, recensita nelle anatre nel sud della Cina nel 1999/2000, i virus H5N1 HPAI hanno subito frequenti ed estesi riassortimenti, dando vita ad un elevato numero di genotipi. Uno studio ha confermato il prevalere del genotipo Z nella maggior parte del continente asiatico **(Chen et al., 2006)**; tuttavia in altre province del sud della Cina, oltre al genotipo Z, sono presenti altri genotipi quali V, W e G **(**Figura. 15) **(Li et al., 2004)**. Dato che il precursore di tutti i virus aviari H5N1, A/goose/Guangdong/1/96, è stato inizialmente scoperto nel sud della Cina nel 1996 **(Xu et al., 1999)** e che i virus H5N1 in questa regione presentano la maggior diversità genetica, il sud della Cina è stato considerato come "*l'epicentro influenzale*" **(Shortridge et al., 1982)**, cioè l'epicentro dal quale possano emergere e diffondersi nuove pandemie influenzali.

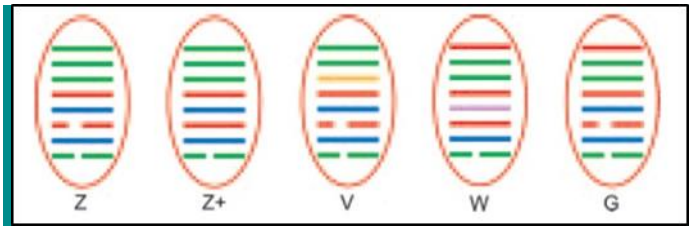

Fig. 15: Genotipi derivati dai riassortimenti dei virus influenzali H5N1 nel continente asiatico. Gli otto segmenti (procedendo dall'alto verso il basso) corrispondono rispettivamente a: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M e NS. Ogni colore rappresenta una stirpe virale; il rosso indica l'origine da Gs/GD/1/96. Sorgente: Chen et al., 2006.

Il motivo per cui il virus H5N1 HPAI non si è diffuso ancora efficacemente tra gli umani è stato attribuito all'affinità dell'HA dei virus aviari per l'acido sialico legato al galattosio con un legame α-2,3 presente sull'epitelio aviario (es. anatre) **(Roger et al., 1983)**. Proprio questa specificità di recettore si pensa sia uno dei fattori responsabili della barriera tra le specie che non permette ai virus aviari di infettare gli essere umani.

Tuttavia, recentemente è stato dimostrato che le cellule epiteliali del tratto respiratorio inferiore umano (bronchioli terminali e cellule epiteliali alveolari) presentano sia i recettori α-2,3 che α-2,6. Sebbene i recettori α-2,3 per i virus H5N1 sembrano essere mancanti nel tratto respiratorio più alto, pare che i virus H5N1 siano comunque in grado di replicarsi in colture cellulari di organi *ex vivo* del tratto respiratorio superiore **(Nicholls et al., 2007)**. Dall'altro lato, alcuni virus H5N1 isolati negli essere umani sembrano aver acquisito mutazioni nel gene codificante per HA associate con un cambiamento nell'affinità di legame verso i recettori α-2,3 e α-2,6 **(Yamada et al., 2006)**; tuttavia, al momento, non sembra che queste mutazioni siano sufficienti per conferire ai virus la capacità di trasmettersi efficacemente da uomo a uomo **(Peiris et al., 2007)**.

Ad oggi sono 5 i sottotipi di virus influenzali aviari conosciuti in grado di replicarsi nelle cellule umane e quindi di causare pandemie: H1N1, H3N2, H2N2, H1N2 e l'H5N1.

Come già precedentemente descritto, esistono cellule del tratto respiratorio inferiore umano, come i macrofagi alveolari, gli pneumociti di tipo II, le cellule epiteliali cuboidali non ciliate dei bronchioli terminali che esprimono solo recettori con l'acido sialico legato al galattosio attraverso un legame α-2,3 **(Nicholls et al., 2007)**. I maiali e alcuni tipi di uccelli acquatici esprimono invece sia recettori con l'acido sialico legato al galattosio attraverso un legame α-2,3 che α-2,6; quindi, in seguito ad una eventuale co-infezione da parte di due differenti virus (ad esempio uno umano e l'altro aviario) si può originare un virus riassortito completamente nuovo, aumentando in questo modo enormemente la possibilità che il virus acquisisca la capacità di trasmettersi dall'animale all'uomo e da un uomo ad un altro **(Gambaryan et al., 2008)**. Anche il virus A/H5N1, come tutti i virus influenzali, si diffonde soprattutto durante la stagione invernale; tuttavia il fenomeno migratorio che interessa gli uccelli selvatici, ad oggi considerati i principali *reservoir* dei virus H5N1 ad alta patogenicità, può causare la diffusione del virus anche negli altri animali, sia selvatici che domestici, durante tutto l'anno (**Abdelwhab & Hafez, 2011)**.

Ad oggi tutti i casi di infezione da H5N1 HPAI riscontrati nell'uomo sono sempre stati correlati al contatto diretto del soggetto in questione con del pollame infetto, ad esempio all'interno di aziende di pollame **(Ungchusak et al., 2005)**, nelle quali la diffusione del virus risulta estremamente facilitata visto la coesistenza degli animali in un ambiente particolarmente ristretto **(Gutierrez et al., 2011).**

È stato dimostrato come il virus influenzale possieda alcuni geni codificanti per proteine non strutturali implicati nell'aumento della virulenza: ad esempio la PB1 interagisce con due proteine mitocondriali inducendo l'apoptosi cellulare; in alcuni studi è stato dimostrato come una mutazione a livello del residuo N66S del gene della PB1, provochi una inibizione del processo di attivazione dell'IFN di tipo I, mentre altri hanno rilevato che il silenziamento dell'espressione della PB1 diminuisce la patogenicità dei virus influenzali aviari e la mortalità nei topi **(Oxford et al., 2005)**.

Oltre alla PB1 esiste un'altra proteina virale, la NS1, che contribuisce all'aumento della virulenza del virus influenzale: il gene che codifica per tale proteina impedisce che si attivi l'immunità innata, e riduce drasticamente la produzione di interferone nelle cellule infettate; quindi la mutazione anche di un singolo residuo all'interno della sequenza nucleotidica del gene dell'NS1 può contribuire ad aumentare la sua virulenza **(Jia et al., 2010)**. Ad esempio si è visto che la sostituzione dell'acido aspartico in posizione 80-84 e in posizione 191-195 provoca un aumento del titolo virale e delle citochine pro-infiammatorie (IFN e TNF-α) **(Li et al., 2006)**.

In conclusione, tutti gli studi sopracitati dimostrano come, anche singole mutazioni puntiformi, a livello della sequenza nucleotidica di geni codificanti per proteine dei virus influenzali aviari siano

in grado di provocare un aumento della virulenza e permettere loro di infettare anche i mammiferi **(De Jong et al., 2006)**.

Per quanto riguarda tuttavia la possibilità del verificarsi di una vera e propria pandemia provocata da un virus influenzale aviario, è necessario che si verifichi un *antigenic shift* a livello dell'HA e NA virale, provocata dal riassortimento genetico tra un virus influenzale umano e uno animale, causando così la comparsa di un nuovo virus, particolarmente virulento contro tutti i soggetti immunologicamente *naïve*.

Il problema maggiore è rappresentato dal fatto che il virus H5N1 ha la tendenza a mutare molto rapidamente. Esiste quindi un'alta probabilità che tali virus acquisiscano la capacità di infettare direttamente l'uomo, destando non poca preoccupazione per la sanità pubblica mondiale. Infatti, la trasmissione interumana sembrava improbabile fino alla comparsa dei primi casi: il primo si è verificato nel Settembre 2004 e il secondo nel Dicembre 2007.

Nel Settembre 2004, il paziente era una ragazza di 11 anni che viveva con la zia e che si presentò in ospedale con i seguenti sintomi: febbre, tosse e mal di gola, sviluppatisi 4 giorni dopo il suo ultimo contatto con polli domestici moribondi. Successivamente gli stessi sintomi si riscontrarono anche nella madre e nella zia, le quali erano state strettamente a contatto con la ragazza, prestandole cure sia in ospedale che a casa. La madre e la figlia morirono, la zia riuscì a sopravvivere. In questo caso si pensò che il contagio si fosse verificato per trasmissione diretta del virus dal paziente infetto alla madre e alla zia. In più, analisi filogenetiche del genoma virale mostrarono che il virus H5N1 in questione apparteneva al genotipo dominante Z e che non vi era stato alcun riassortimento con virus influenzali umani. Questa scoperta confermava il fatto che non si trattava di una nuova variante di virus aviario ma che tale virus aveva acquisito la capacità di trasmettersi da persona a persona **(Ungchusak et al., 2005)**. Nel Dicembre 2007 si verificò un secondo caso. Il paziente era un ragazzo di 24 anni che si presentò in ospedale con febbre alta, tosse e diarrea. L'unico potenziale luogo di esposizione al virus H5N1 HPAI risaliva all'ingresso in un negozio 6 giorni prima la comparsa dei sintomi. Purtroppo il ragazzo trasmise l'infezione anche al padre, il quale fu contagiato probabilmente in seguito a secrezioni respiratorie o per contatto diretto con i vestiti contaminati. L'analisi filogenetica del genoma del virus H5N1 in questione indicò che i campioni isolati sia dal padre che dal figlio erano identici. Il ragazzo purtroppo morì mentre il padre riuscì a sopravvivere grazie ad un trattamento precoce con antivirali **(Wang et al., 2008)**. Questi casi di trasmissione interumana e le analisi filogenetiche correlate suggeriscono che il virus potrebbe acquisire sempre di più la capacità di infettare gli uomini sia in seguito all'acquisizione di materiale genetico da altri virus influenzali umani per riassortimento, sia in seguito all'adattamento del suo sito di legame con i recettori dell'apparato respiratorio umano.

La possibilità di trasmissione interumana di uno dei patogeni umani più letali nel mondo moderno deve servire come promemoria dell'urgente bisogno di prepararsi per una futura pandemia di influenza aviaria.

Durante un'eventuale pandemia influenzale, la quantità di vaccini fornita potrebbe essere insufficiente e quindi potrebbe risultare di fondamentale importanza una terapia antivirale efficace e tempestiva.

I farmaci antivirali sono utilizzati sia per la prevenzione che per il trattamento delle infezioni influenzali in genere, ma per poter essere efficaci è necessario somministrarli alla comparsa dei primi sintomi.

Infatti, considerando che la replicazione virale nel tratto respiratorio raggiunge il suo picco tra le 24 e le 72 ore dopo l'insorgenza dei primi sintomi, i farmaci antivirali per essere davvero efficaci dovrebbero essere somministrati all'interno di questa finestra temporale; purtroppo questo non sempre è possibile, in quanto molti pazienti non cercano cure mediche immediatamente all'insorgenza dei primi sintomi, ma soprattutto perché quei pazienti che vivono in aree remote e rurali di nazioni in via di sviluppo presentano un'enorme difficoltà nell'avere accesso rapidamente alle cure mediche.

Attualmente sono disponibili quattro principi attivi dotati di attività antivirale, i quali appartengono a due distinte classi di farmaci antivirali: i bloccanti dei canali ionici M2 (amantadina e rimantadina) e gli inibitori delle NA (oseltamivir e zanamivir).

Gli inibitori dei canali ionici M2 inibiscono la replicazione del virus dell'influenza A, in quanto bloccano la proteina della matrice di membrana virale M2, che funziona da canale ionico necessario per la fusione della membrana virale con la membrana della cellula bersaglio, portando così alla formazione dell'endosoma, che si crea quando il virus viene internalizzato per endocitosi **(Crepaldi et al., 2002)**.

Attualmente, non sono considerati la miglior scelta per combattere i virus influenzali aviari perché sono associate con molti effetti tossici e con un rapido emergere di varianti resistenti al farmaco **(Moscona, 2005)**: infatti, virus con genotipo Z appartenenti al clade 1 che hanno infettato l' uomo in Vietnam, Cambogia e Tailandia dal 2003 presentavano delle mutazioni nel gene codificante per la proteina M2 che conferiva una elevata resistenza a questa classe di antivirali. Tale caratteristica rende questo gruppo di antivirali inefficaci nel trattamento e nella prevenzione di una possibile pandemia **(Li et al., 2004)**.

Appartengono alla classe degli inibitori delle NA, lo zanamivir e l'oseltamivir, questi farmaci sono efficaci nei confronti sia del virus dell'influenza A che B. Agiscono sulla NA, una proteina presente sulla superficie esterna del virus, interferendo così con la sua capacità di infettare le cellule e

impedendo la liberazione delle particelle virali dopo la replicazione all'interno della cellula infettata; in conclusione, questi farmaci rallentano la propagazione del virus all'interno del tratto respiratorio umano.

Questa nuova classe di antivirali è candidata a sostituire definitivamente le amantadine, sia per la loro bassa tossicità sia per la minore probabilità di insorgenza di ceppi virali resistenti.

Nel caso dei virus influenzali aviari, a seconda del tipo di NA, cambia nettamente la loro suscettibilità verso questa categoria di inibitori. Ad esempio, è stato dimostrato che i virus H5N1 isolati nel 1997 possono essere efficacemente inibiti da questi farmaci; tuttavia, di recente, nella regione vietnamita, è stato isolato un virus H5N1 resistente all'oseltamivir **(Le et al., 2005)**.

Tra i 2 inibitori della NA, a parità di efficacia, è da preferire l'oseltamivir, in quanto somministrato per via orale, mentre lo zanamivir è somministrato tramite inalazione di una polvere secca, con idoneo dispositivo; questa modalità di somministrazione, infatti, non risulta affatto pratica in alcune categorie di pazienti, come i bambini o gli anziani, quelli intubati e quelli incapaci, in seguito a determinate malattie invalidanti, di inalare la polvere in maniera corretta **(Wong et al., 2006)**.

Il periodo di incubazione è in genere più lungo rispetto a quello di un qualunque virus influenzale stagionale (anche due settimane), tuttavia i sintomi iniziali sono estremamente simili: febbre alta, cefalea, dolori ossei e muscolari generalizzati, malessere ad astenia **(Cox, 1999)**. In alcuni pazienti in epoca molto precoce compaiono inoltre: diarrea, vomito, dolore addominale e al petto, epistassi e sanguinamento delle gengive.

Con il trascorrere dei giorni ed il progredire dell'infezione, segue generalmente un decorso clinico estremamente aggressivo, con rapido deterioramento ed alti tassi di mortalità: pressochè la totalità dei pazienti sviluppa polmonite insensibile agli antibiotici.

L'attuale emergenza d'influenza A/H5N1 nel pollame e negli esseri umani ha generato un livello di allerta ed un aumento degli sforzi di sorveglianza globale e pianificazione di preparazione in caso di pandemia. La vaccinazione contro la pandemia è considerata l'opzione più efficace per limitare la diffusione di un ceppo pandemico

Pertanto vaccini efficaci contro l'influenza aviaria ad alta patogenicità sono una priorità di salute pubblica urgente e globale.

L' OMS ha accertato che attualmente siamo in una fase 3 di allerta pandemica, in quanto non è stata confermata ancora la diffusione a livello comunitario del virus influenzale aviario **(WHO, 2016)**.

3. I vaccini

3.1 I vaccini come strumento di prevenzione dell'influenza

Il primo che individuò gli enormi benefici della vaccinazione fu Edward Jenner che, nel 1796, dimostrò come, somministrando per intramuscolo il vaiolo bovino in soggetti sani, fosse possibile proteggere gli stessi dal vaiolo umano; lo scopo del vaccino è dunque quello di rendere gli individui immuni verso un determinato patogeno per un lungo arco di tempo.

Per il vaccino influenzale la situazione è tuttavia molto diversa, in quanto un individuo che contrae l'influenza non risulta immunizzato nei confronti di tutti i ceppi influenzali, ma solo verso lo strain specifico che lo ha infettato **(Geiger et al., 2006)**.

Per la prevenzione e il controllo dell'influenza esiste tutta una serie di norme igieniche che, se rispettate, potrebbero aiutare a ridurre il rischio di contagio; inoltre si potrebbe anche ricorrere all'utilizzo di farmaci antivirali diretti contro il virus influenzale, per avere una risposta più rapida ed efficace contro il virus ed eventualmente contenere una emergente pandemia **(Geeraedts et al., 2010)**; tuttavia, l'unica vera strategia per ridurre la morbilità e mortalità dell'influenza è solo ed esclusivamente la vaccinazione **(Nichol et al., 2006)**.

Il grado di protezione conferito dalla vaccinazione dipende strettamente dalla corrispondenza tra la composizione del vaccino ed i virus influenzali effettivamente circolanti, oltre che dall'età dei soggetti da vaccinare e dalla loro precedente esposizione ai virus influenzali **(Trombetta et al., 2014)**.

Da una ventina di anni nel nostro Paese, i ceppi da introdurre nel vaccino, solitamente in commercio dalla metà di ottobre di ogni anno, sono stabiliti da un DM pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale. Il Ministero della Salute, in seguito alle indicazioni dell'OMS, comunica alle case farmaceutiche quali ceppi virali dovranno essere introdotti nel nuovo vaccino antinfluenzale e stabilisce la quantità di antigene che deve essere presente all'interno del vaccino stesso per ogni singolo ceppo virale, fissata ormai da anni a 15 µg, con limite fiduciario del 95% non inferiore a 12 µg **(Bartolozzi, 2012)**.

In accordo con le raccomandazioni della World Health Organization (WHO), i vaccini influenzali annuali contengono antigeni derivanti da due diversi ceppi influenzali, A e B.

Il WHO si avvale, ogni anno da Febbraio e Settembre, di consulenti tecnici altamente specializzati con il compito di suggerire i virus da inserire nel nuovo vaccino influenzale **(WHO, 2013)**.

Quasi ogni anno, fanno la loro comparsa nuove varianti di virus influenzale caratterizzate da una differente specificità a livello delle proteine dell'*envelope* (HA e NA) che consentono loro di sfuggire alla neutralizzazione da parte degli anticorpi che si sono sviluppati durante vaccinazioni o infezioni avvenute negli anni precedenti **(Ghendon Y, 1991)**.

Gran parte dei vaccini in uso nei Paesi Occidentali e la totalità dei vaccini in uso in Italia, sono vaccini inattivati (TIV), contenenti i più importanti antigeni di superficie, l'HA e la NA **(Bartolozzi, 2012)**.
A loro volta i vaccini inattivati si dividono in vaccini split e a subunità, che consistono rispettivamente in particelle virali distrutte da agenti chimici e in NA e HA purificati.
La dose raccomandata per i vaccini influenzali inattivati è di 15µg di HA per ciascuno strain, per soggetti con età superiore ai 3 anni (in singola somministrazione) e due immunizzazioni con 7.5 µg di HA per ciascuno strain per bambini di età inferiore ai 3 anni **(Quinnan et al., 1983)**.
I vaccini split e a subunità sono generalmente ben tollerati e gli effetti collaterali più comunemente osservati sono dolore ed eritema nel sito di iniezione**.**
I vaccini inattivati sono in genere prodotti da virus propagati in uova embrionate di gallina
Dopo 2-3 giorni di incubazione, il liquido allantoideo è raccolto, e le particelle virali vengono purificate e concentrate prima dell'inattivazione con formaldeide o β-propiolattone.
Queste due formulazioni è riconosciuto che stimolano efficacemente la risposta immunitaria umorale, mentre non hanno la stessa forza nello stimolare l'attività delle cellule T citotossiche **(Ennis et al., 1999).** Infatti, sia i vaccini split che a subunità non hanno la capacità di penetrare all'interno del citosol e quindi gli antigeni contenuti nel vaccino non entrano a far parte delle MHC di classe I, con conseguente perdita della risposta T citotossica MHC I dipendente **(Yewdell et al., 1988).** Tuttavia, gli antigeni dei vaccini split e a subunità vengono presentati alle cellule *CD4+* dalle molecole MHC II con conseguente attivazione della risposta anticorpale mediata dalle cellule B, dominata dalla risposta IgG, seguita da quella delle IgM e poi IgA **(Hovden et al., 2005).**
Dopo la prima immunizzazione con vaccini split e a subunità si assiste ad un notevole incremento delle concentrazioni di anticorpi sierici (dapprima IgM e più tardi IgG) in genere dopo 7-8 giorni con un picco della risposta dopo 2-3 settimane dalla vaccinazione **(Cox et al., 1994).** Nel caso venga somministrata successivamente una dose booster, la risposta delle IgG si innesca con maggiore rapidità ed intensità.
Un terzo tipo di vaccino influenzale inattivato, è il vaccino a virus intero, che contiene infatti l'intero virus purificato. Dato che i vaccini split e a subunità innescano una soddisfacente risposta anticorpale e inducono meno reazioni avverse rispetto al vaccino a virus intero, quest'ultimo è ormai in disuso **(Jennings et al.,1981)**.
Infatti, il vaccino a virus intero è stato visto essere più immunogenico del vaccino a virus split e a subunità, tuttavia non è più largamente utilizzato in quanto altamente reattogenico. È anche vero però che negli ultimi anni, l'interesse verso un vaccino a virus intero si è decisamente rinnovato, a causa della scarsa risposta immunitaria osservata dopo la vaccinazione con il vaccino split e a subunità verso strain di influenza aviaria **(Bresson et al., 2006).** Infatti, mentre i vaccini split e a subunità

stimolano quasi esclusivamente la risposta immunitaria umorale, il vaccino a virus intero induce anche la risposta delle cellule T citotossiche. Il meccanismo di questo non è ancora del tutto noto, tuttavia è riconosciuto che il vaccino a virus intero facilita la fusione della membrana virale ed endosomiale nella stessa maniera in cui avviene dopo un'infezione o immunizzazione con un vaccino virosomiale **(Bungener et al., 2005).** Questo permette il trasporto del nucleocapside virale nel citosol delle cellule target con conseguente attivazione delle cellule T citotossiche attraverso la presentazione nelle MHC di classe I **(Yewdell et al., 1988).** Il più alto grado di attivazione delle cellule T citotossiche da parte dei vaccini a virus intero è anche riflettuto da un incremento del rapporto IgG2a/IgG1, oltre ad un maggior incremento dei livelli di IFN-γ e *IL-2* dopo la vaccinazione con virus intero piuttosto che con virus split **(Szyszko et al., 2006).**

In commercio esistono anche vaccini influenzali vivi attenuati (*Live Attenuated Influenza Vaccine - LAIV*) somministrati attraverso uno spray intra-nasale; tuttavia al momento tali vaccini sono licenziati ed utilizzati per l'uomo solo in Russia (il primo paese a licenziare tale vaccino per uso umano nella metà del secolo scorso), negli USA (dal 2003) ed in Norvegia. I vaccini LAIV sono raccomandati solo esclusivamente per soggetti di età compresa trai 2 ei 49 anni **(Nichol & Treanor, 2006),** sebbene l'immunogenicità di tali vaccini sia stata valutata e riconosciuta come alta solo in bambini dai 2 ai 16 anni sieronegativi al momento della vaccinazione. Per la vaccinazione annuale, sia per gli adulti che i bambini, è raccomandata una dose di 10^7 TCID50 per ciascuno strain contenuto nel vaccino **(Cox et al., 2004)**. Al di sotto dei 2 anni di età la somministrazione è stata sconsigliata a seguito di reazioni avverse quali forte congestione nasale e insorgenza di starnuti.

La risposta immune dopo la vaccinazione con vaccino influenzale vivo attenuato si pensa che mimi la risposta immunitaria dopo l'infezione. Tuttavia i titoli di anticorpi sierici indotti dopo la vaccinazione con virus vivo attenuato sono più bassi di quelli ottenuti con virus inattivati. La problematica principale concernente i vaccini LAIV risiede nel fatto che essi non rispondono ai classici test sierologici quali HI e SRH, rendendone estremamente complessa la formulazione e definizione di correlati di protezione. Comunque in contrasto con la formulazione dei vaccini inattivati, i vaccini LAIV inducono una significativa risposta mucosale IgA, che contribuisce alla protezione dall'infezione **(Treanor & Wright et al., 2003).** In aggiunta, i vaccini LAIV hanno il vantaggio di attivare effettivamente la risposta immunitaria CTL, provvedendo alla cross-reattività contro gli strains che hanno subito drift antigenico **(Belshe, 2004).**

I vaccini LAIV possono causare sintomi respiratori transitori, come naso che cola, ma sono in genere molto ben tollerati. Altro aspetto sicuramente positivo di tale tipologia di vaccini risiede nella modalità di somministrazione più semplice e tollerata soprattutto dalle fasce di età più basse (spray nasale), rispetto alla classica iniezione intramuscolare.

Gli strain contenuti nel vaccino sono generati per riassortimento, e consistono nei 6 geni interni di un virus originario (Master strain), adattato al freddo e sensibile alla temperatura, insieme ai geni per HA e NA dallo strain circolante **(Palese, 2006)**. Lo strain originario contiene mutazioni certe nei geni che codificano per PB2, PB1 e NP, che permettono una replicazione efficiente del virus contenuto nel vaccino alle temperature più basse (33°C) ma essenzialmente previene la replicazione alle temperature più alte (39 C°) risultando così in un fenotipo attenuato in grado di replicarsi efficacemente solo nella parte alta dell'apparato respiratorio umano; inabile così di provocare malattia **(Katz et al., 2006)**.

Mentre il vaccino LAIV risulta essere più immunogenico nei bambini, gli anziani rispondono meglio al vaccino TIV **(Treanor & Bett, 1998)**.

Comunque, mentre la vaccinazione dei bambini e degli adulti sani fornisce un alto grado di protezione **(Demicheli et al., 2004)** non è stata riscontrata una significativa riduzione delle infezioni da influenza tra le persone anziane vaccinate **(Rivetti et al., 2006)**.

In generale possiamo affermare che i vaccini sono utilizzati per prevenire le complicanze serie delle infezioni influenzali negli over 65 e per ridurre significativamente le ammissioni in ospedale per influenza e polmonite, come di tutte le altre possibili complicanze mortali che ne possono derivare **(Rivetti et al., 2006)**.

Nello specifico, per quanto riguarda i vaccini influenzali aviari, negli ultimi anni, molti trials pre-clinici e clinici sono stati portati avanti al fine di valutare la risposta immunitaria dopo l'immunizzazione con tale tipologia di vaccini. I risultati purtroppo sono stati poco convincenti, inquanto solo una debole risposta anticorpale è stata rilevata sia nella cavia che nell'uomo. Alti dosaggi, due vaccinazioni successive e l'uso di adiuvanti si sono dimostrati molto spesso necessari per raggiungere un titolo HI ≥ 40 nell'uomo. Comunque, nonostante i bassi livelli anticorpali rilevati, le cavie vaccinate sono ugualmente risultate protette contro gli strain letali dei virus aviari **(Ninomiya et al., 2007).** Pertanto, i correlati di protezione nei confronti della malattia conclamata con sintomi seri e conseguente morte, nel caso dei virus aviari possono non necessariamente essere rispecchiati da pre-esistenti anticorpi sierici circolanti. Se questo sia anche il caso per l'uomo ancora non si sa, mentre i vaccini sviluppati contro virus aviari ad alta patogenicità possono essere al momento solo valutati per la loro sicurezza e immunogenicità nell'uomo e non per la protezione contro determinati strains **(Subbarao & Joseph, 2007).** L'incertezza per quanto riguarda il meccanismo immunologico che esiste dietro la protezione contro l'immunizzazione con vaccini influenzali aviari rivela delle limitazioni nella nostra conoscenza del virus influenzale aviario e quindi molte ricerche in questo campo si dimostrano essere urgentemente necessarie.

3.2 Sfide e ostacoli per lo sviluppo di un vaccino pandemico

I recenti casi di infezione da H5, H7 e H9 nel pollame ed il crescente numero di casi umani di influenza aviaria, rappresentano una crescente minaccia pandemica e ha condotto ad una ricerca sempre più intensiva di possibili vaccini influenzali aviari. Questo lavoro ha rivelato numerose sfide per lo sviluppo di un vaccino pandemico, sia riguardo l'immunogenicità dei vaccini che i processi per produrlo.

Con le correnti capacità di produzione, è stato indicato che non più di 900 milioni di dosi di un vaccino influenzale monovalente (15 µg HA) possono essere prodotte in un anno **(Poland et al., 2007)**. Perciò, in uno scenario pandemico, la domanda di vaccino per un mercato globale (circa 6 miliardi di persone) eccederà enormemente la capacità di produrlo; inoltre è estremamente probabile che saranno necessarie due dosi di vaccino, raddoppiando così il numero delle dosi necessarie. Quindi l'enorme incremento della domanda di vaccino richiederà un rapido ed efficace aumento della produzione.

Purtroppo esistono diversi ostacoli che rendono molto difficile l'incremento massivo della produzione di vaccino aviario.

In primo luogo, la maggior parte dei produttori usa ancora uova embrionate di gallina per la produzione dei vaccini, rendendo l'incremento della produzione ancora più difficoltoso, in quanto la produzione corrente basata sulle uova richiede un lasso di tempo di almeno 6-9 mesi e inoltre, i virus aviari ad alta patogenicità H5 e H7 non possono essere propagati in uova embrionate di gallina, perché uccidono rapidamente gli embrioni **(Peiris et al., 2007)**.

L'uso di virus ad alta patogenicità non modificati richiederebbe una biosafety di livello 3 (BSL-3), opzione disponibile solo per pochi produttori europei.

A causa dello scarto temporale di svariati mesi (anche 6-9) tra lo scoppio di una possibile pandemia e la disponibilità di un vaccino efficace, molti Paesi hanno considerato la possibilità di sviluppare un vaccino pre-pandemico. Dato che il vaccino deve essere prodotto in anticipo, è molto probabile che sia antigenicamente differente dallo strain pandemico. Comunque, la speranza è che il vaccino pre-pandemico permetta comunque di ottenere una sufficiente immunità per cross reazione tale da ridurre il numero di morti e la gravità della malattia clinica. I candidati per il vaccino aviario finora utilizzati nei trial clinici si sono dimostrati debolmente immunogenici. Nella maggior parte dei casi, per poter soddisfare tutti e tre i criteri CPMP, sono state necessarie alte concentrazioni di antigene, due dosi di vaccino e formulazioni adiuvate **(Treanor et al., 2006)(Stephenson et al., 2006)(Nicholson et al., 2001)(Hehme et al., 2002)(Bresson et al., 2006)**.

La bassa immunogenicità potrebbe essere dovuta a fattori a tutt'oggi sconosciuti dei virus aviari, ma sicuramente è anche influenzata dal fatto che la popolazione è immunologicamente *naïve* verso questi

virus. Inoltre, una scarsa risposta immunitaria dopo la vaccinazione porterà alla necessità di aumentare la quantità di antigene all'interno del vaccino, aumentando in tal modo, ulteriormente la richiesta di una produzione già messa a dura prova. Perciò la ricerca di una modalità per risparmiare la dose di antigene vaccinale e di adiuvanti per intensificare la risposta del sistema immunitario dell'ospite è diventata di estrema urgenza.
Per affrontare la sfida sia per la produzione che per l'immunogenicità del vaccino, la ricerca recente per i vaccini influenzali si è altamente focalizzata su nuovi metodi di produzione, sull'uso di adiuvanti e su nuove modalità di somministrazione del vaccino.

3.3 Nuovi metodi per lo sviluppo dei vaccini

Il metodo attualmente più consolidato nella produzione dei vaccini si basa sulla coltivazione dei virus in uova embrionali di pollo, tuttavia è una tecnica che presenta dei limiti, come ad esempio i tempi estremamente lunghi richiesti per tutto il processo **(Onions, 2010)**. Il virus viene fatto crescere all'interno della cavità allantoidea dell'uovo di pollo, quindi viene raccolto, inattivato con agenti chimici (come la formalina) e purificato attraverso una serie di ultra centrifugazioni. Le particelle virali a questo punto o vengono scisse attraverso l'utilizzo di etere e di un detergente oppure, o in alternativa, vengono solubilizzate usando solo un detergente.
Tuttavia, come già anticipato, esistono alcuni limiti nell'utilizzo delle uova come terreno di coltura per il virus, quali:

- sono necessarie da 1 a 2 uova per ottenere una singola dose di vaccino **(Brühl et al., 2001)**, quindi questo processo richiede un numero decisamente ingente di uova di altissima qualità;
- la difficoltà nel trovare fornitori affidabili di elevati quantitativi di uova di altissima qualità **(Gerdil et al., 2003)**;
- in caso di pandemia il vaccino non potrebbe essere immesso in commercio immediatamente in quanto la consegna di un ingente quantitativo di uova di altissima qualità richiederebbe tempi piuttosto lunghi **(Minor et al., 2009)**;
- i passaggi richiesti per la coltivazione dei virus influenzali all'interno delle uova possono portare alla selezione di varianti di virus influenzali che differiscono da quello originale da un punto di vista della specificità antigenica;
- Sono necessarie delle fasi di purificazione per ridurre la quantità di proteine contaminanti presenti nell'uovo e quindi per ridurre il rischio di allergie legate alla presenza di albumina. **(Kistner et al., 1999)**.

Una valida alternativa alla propagazione dei virus influenzali nelle uova è rappresentata dalla possibilità di propagarli in linee cellulari di mammifero. Questo sistema è decisamente più flessibile e può essere portato su scala industriale in qualunque momento dell'anno, provvedendo ad una risposta più rapida nel caso dell'emergere di una nuova variante di virus epidemico o pandemico.
I virus cresciuti nelle linee cellulari sono anche più simili antigenicamente a quelli isolati dai campioni clinici umani, comparati alle varianti cresciute nelle uova. Tre differenti linee cellulari sono state usate storicamente in trials clinici di vaccini influenzali:

- Madin Derby canine kidney (MDCK),
- African green monkey kidney (VERO),
- Human retinoblast cell line (Per.C6).

È stato condotto uno studio che comparava l'immunogenicità dei vaccini influenzali prodotti ricorrendo alla crescita su uova e su linea cellulare ed è stato dimostrato che i due vaccini sono ugualmente immunogenici. Tuttavia i vaccini *cell-derived* possono stimolare la produzione di un maggior numero di anticorpi cross reattivi rispetto ai vaccini *egg derived* (**Govorgova et al., 1999)**, una qualità questa da non sottovalutare, soprattutto nel caso in cui l' epidemia influenzale sia causata da un virus diverso antigenicamente rispetto allo strain contenuto nel vaccino.
Questo metodo presenta dunque tutta una serie di vantaggi:

- possibilità di iniziare immediatamente a produrre vaccini in caso di pandemia, dato che le cellule posso essere facilmente richieste dalle apposite banche delle cellule **(Minor et al., 2009)**;
- le linee cellulari permettono la coltivazione di una vasta gamma di strains influenzali permettendo loro di replicarsi e raggiungere alti titoli **(Onions et al., 2010)**;
- le endotossine sono completamente eliminate, quindi non c'è assolutamente il rischio che il vaccino contenga additivi antibiotici e/o proteine dell'uova, risultando perciò sicuro anche per coloro che hanno allergie verso queste sostanze **(Kistner et al., 2007)**.

Tuttavia, la moderna ricerca sui vaccini continua a progredire ed è focalizzata, ad oggi, sulla tecnologia del "reverse genetics" (ad oggi utilizzata per lo sviluppo di vaccine contro il meningococco di tipo B) e del DNA ricombinante.
L'uso del "reverse genetics" può accorciare il tempo di disponibilità del vaccino da 2-3 mesi a meno di 4 settimane dall'isolamento del virus (**Palese, 2006)(Hoffmann et al.,2001)**. Questa tecnica permette di ottenere generazioni di virus influenzali interamente dal DNA plasmidico clonato dalla co-transfezione di cellule appropriate con 8 o 12 plasmidi derivati dall'RNA virale **(Fodor et al., 1999)(Subbarao &Katz, 2004)**. Inoltre, consente all'HA di essere geneticamente modificato, per

esempio con la rimozione di aminoacidi multibasici nel sito di clivaggio dell' HA nei virus influenzali aviari ad alta patogenicità.
Questa modifica rende il virus meno virulento, permettendo così l'utilizzo delle uova come substrato e la produzione del vaccino in BSL-2 **(Webby et al., 2004)**.
La tecnologia del DNA ricombinante consente la produzione dei vaccini influenzali senza la dipendenza dell'utilizzo delle uova embrionate di pollo e senza la necessità di generazioni di isolati di virus influenzali A ad alta crescita.
In questo metodo, un gene per l'HA può essere rapidamente clonato ed espresso in cellule di insetto da un baculovirus ricombinante.
L'HA espressa da un baculovirus ricombinante è stata usata come vaccino in molti trails clinici ed è stata ben tollerata in dosi di 15-135 µg HA per strain vaccinale **(Katz et al., 2006)**.

3.4 L'uso degli adiuvanti nei vaccini influenzali

Gli adiuvanti sono sostanze che quando vengono incorporate nella formulazione dei vaccini possono qualitativamente e quantitativamente incrementare la risposta all'antigene vaccinale. Sebbene gli adiuvanti non siano normalmente usati per vaccini annuali influenzali, si sono resi indispensabili per aumentare l'immunogenicità dei vaccini influenzali aviari. In aggiunta le formulazioni di vaccino adiuvate possono risultare molto utili per la vaccinazione annuale nei gruppi di persone il cui sistema immunitario generalmente risponde meno alla vaccinazione, come gli over 65 e gli immunodepressi. Inoltre gli adiuvanti hanno un ruolo fondamentale nell'indurre la risposta immunitaria sia innata che adattativa nell'ospite e nello sviluppare memoria verso alcuni antigeni del vaccino**. (Lee et al., 2014)**.
In realtà per la maggior parte degli adiuvanti, il meccanismo di azione è ancora sconosciuto, tuttavia si pensa che incrementino la risposta al vaccino attraverso l'attivazione del sistema immunitario innato e ottimizzino l'up-take e la presentazione dell'antigene da parte delle APCs.
Il più vecchio adiuvante è rappresentato dai sali di alluminio (idrossido o fosfato): poco costosi, facilmente utilizzabili, che innescavano un'intensa risposta Th2, ma meno efficaci nell'evocare una risposta cellulo-mediata Th1 **(Yun Noh & Joo Kim, 2013)**.
Un passo avanti notevole nella preparazione di un adiuvante più efficace dell'alluminio, è stato compiuto con la scoperta dell'MF59. Si tratta di una emulsione olio (squalene 9,75 mg come fase oleosa) in acqua (contenente muramil-tripeptide, Tween 80 e Span 85) (**Bartolozzi et al., 2012)** che ha dimostrato la sua efficacia nello stimolare le cellule del sistema immunitario ad esprimere citochine e chemochine nel sito di iniezione; quest'ultime hanno il compito di reclutare le cellule del sistema immunitario innato e le cellule APCs **(Lee et al., 2014)**.

In conclusione, l'adiuvante perfetto dovrebbe avere tutta una serie di caratteristiche, quali: evocare una buona risposta immunitaria sia umorale che cellulo-mediata, al tempo stesso non provocare reazioni locali o reazioni di ipersensibilità, né tantomeno essere cancerogeno o teratogeno.
Infine, un ulteriore passo in avanti nella preparazione degli adiuvanti per il vaccino dell'influenza è quello riguardante i virosomi. Si tratta di un vaccino antinfluenzale a liposomi, che consiste nell'inserzione di HA e NA purificate in una membrana di fosfatidilcolina; i liposomi associati al vaccino contro l'influenza (detti anche virosomi) sono dunque delle particelle lipidiche che rallentano la dismissione dell'antigene, agendo quindi come adiuvanti (**Bartolozzi et al., 2012)**.

3.5 Modalità' di somministrazione ed effetti indesiderati

Nel caso del vaccino influenzale stagionale, la somministrazione avviene generalmente per via intramuscolare e deve essere ripetuta ogni anno, preferibilmente all'inizio della stagione epidemica: in Italia, dove il picco di massima morbilità si registra tra gennaio e febbraio, il momento giusto per vaccinare si estende da metà ottobre a fine novembre **(Circolare ministeriale, 2008)**. In genere una sola dose è sufficiente quando si suppone che il vaccinato, per l'età, abbia già acquisito una esperienza immunologica, come avviene in soggetti già vaccinati in precedenza o in soggetti con età superiore ai 3 anni (**Bartolozzi et al., 2012)**.
Quindi, mentre per i bambini dai 6 mesi ai 3 anni è consigliata una dose doppia a distanza di 4 settimane, per i pazienti più grandi è prevista una singola somministrazione.
La **via intramuscolare** è la via di somministrazione più usata; viene praticata nella fascia antero-laterale della coscia in bambini al di sotto dei due anni, e nel deltoide in bambini di età superiore ai due anni e negli adulti.
Gli effetti collaterali più comuni riscontrabili in seguito alla somministrazione intramuscolare del vaccino antinfluenzale sono rappresentati da dolore, arrossamento, tumefazione e prurito in sede d'iniezione, e generalmente si verificano dopo circa 12-24 ore dalla somministrazione del vaccino **(Bartolozzi et al., 2012).**
Tuttavia la necessità di sviluppare vaccini sempre più immunogenici per una possibile pandemia ha focalizzato l'attenzione su altre vie di somministrazione, come la via intradermica e intranasale.
Via intradermica: in base ad alcuni studi è stato dimostrato che questa via di somministrazione presenta alcuni vantaggi rispetto alla via intramuscolare:

- possibilità di ampliare la disponibilità del vaccino usando una dose ridotta "Dose Sparing";
- immunogenicità simile a quella che si ottiene con la via intramuscolare;

- risposta discreta anche in soggetti over 65, che in genere rispondono ai vaccini con minore intensità;
- il derma contiene un numero notevole di cellule dendritiche (cellule di Langherans), molto potenti nel fornire risposte immunologiche sia umorali (anticorpi) che cellulo-mediate (CD4+, CD8+);
- Facilità e rapidità di somministrazione, ed in alcuni casi possibilità di auto-somministrazione (almeno per personale sanitario)

Via intra-nasale: questa via di somministrazione è usata per i vaccini influenzali LAIV, anche se recentemente è stata testata anche per la somministrazione di vaccini inattivati somministrati attraverso gocce nasali con e senza l'utilizzo di adiuvanti. In entrambi i casi è stato rilevato come la somministrazione intra-nasale sia in grado di indurre una buona risposta immunitaria sia livello mucosale (IgA) che a livello sierico. Questo rappresenta un vantaggio rispetto ai vaccini somministrati per via intramuscolare e intradermica, in grado di elicitare solo una risposta anticorpale sierica (sistemica), in quanto la risposta mucosale (locale) rappresenta una importantissima linea di difesa dalle infezioni **(Muszkat et al., 2003)(Atmar et al., 2007)**.

In particolare per i virus influenzali, i quali iniziano il loro ciclo infettivo a livello della parte alta del tratto respiratorio, per poi passare alla parte bassa, un buon livello di Immunoglobuline di tipo A neutralizzanti garantirebbe una protezione maggiore rispetto a livelli sierici di Immunoglobuline di tipo G.

4. Il sistema immunitario

Il sistema immunitario consiste in cellule e molecole con ruoli specifici di difesa dell'organismo contro microrganismi esterni potenzialmente patogeni; quali batteri, virus, funghi e parassiti. La risposta immunitaria può essere inizialmente divisa in innata (naturale) e acquisita (adattativa), sebbene le diverse parti del sistema immunitario mostrino un alto livello di interazione.
L'immunità innata è aspecifica, rappresenta la prima linea di difesa del nostro organismo, non cambia dopo una seconda esposizione allo stesso microrganismo e non ha memoria.
L'immunità acquisita invece è specifica, è provvista di memoria a lungo termine verso uno specifico antigene e accresce in seguito al secondo contatto con un determinato microrganismo **(Delves & Roitt, 2000)**.

4.1 Immunità innata

L'immunità innata rappresenta la prima linea difensiva dell'organismo contro microrganismi estranei; si attiva immediatamente dopo l'incontro di un patogeno con l'ospite, mentre in genere per l'immunità acquisita occorrono diversi giorni per l'attivazione.
L'immunità innata si divide in più componenti: barriere fisiche e chimiche, come gli epiteli e le sostanze antimicrobiche prodotte dalle superfici epiteliali, cellule specifiche, come le cellule fagocitiche (neutrofili e macrofagi) e Natural Killer (NK), le proteine del sangue, un esempio sono le proteine del complemento e fattori solubili come le citochine che hanno la funzione di regolare e coordinare molte attività delle cellule dell'immunità innata.
Per stabilire un'infezione, il patogeno deve prima penetrare le barriere fisiche di superficie, come la pelle o le membrane mucose. Per il virus influenzale, il rivestimento di muco dell'epitelio del tratto respiratorio rappresenta la principale barriera fisica, intrappolando il virus e, successivamente, grazie al movimento meccanico delle cellule ciliate dell'epitelio respiratorio, vengono spinte all'esterno.
Se il virus influenzale riesce a superare queste barriere fisiche, allora si attivano le cellule del sistema immunitario innato: macrofagi, cellule dendritiche, granulociti e cellule NK **(Delves & Roitt, 2000),** che rappresentano la seconda linea difensiva contro i patogeni.
In seguito all'ingresso di un virus influenzale nell'organismo entrano immediatamente in gioco i PAMPs (patterns molecolari patogeno-associato) che, attraverso i PRRs (recettori di riconoscimento), attivano la cascata di segnalazione antivirale, la quale termina con la produzione di interferone (IFN), citochine e chemochine **(Sanders et al., 2011)**. Trai PRRs risulta di particolare importanza nel

riconoscere un'infezione da parte di un virus influenzale A i cosiddetti *Toll-like receptors*, ovvero recettori intracellulari che riconoscono l'RNA del virus dopo che il complesso ribonucleoproteico ha subito il processo di degradazione all'interno dell'endosoma acidificato **(Lund et al., 2004)**.
Sono stati identificati tre tipi di IFN **(Chelbi-alix et al., 2007)**:

- Tipo I comprende IFN-α e IFN-β che hanno un ruolo importante nel contenere l'infezione virale **(Van Hoeven et al., 2009)** in quanto, legandosi ai recettori nelle cellule vicine, stimolano la sintesi di alcune proteine antivirali che inibiscono la replicazione del virus all'interno della cellula ospite con varie modalità: alcune proteine antivirali infatti sono responsabili della degradazione del RNA virale, altre inibiscono il trasporto del nucleocapside virale, altre ancora impediscono la sintesi dell'RNA del virus. In aggiunta IFN-α e IFN-β stimolano la proliferazione delle cellule T e delle cellule natural killer (158).
- Tipo II comprende IFN-γ , che contribuisce sia ad attivare la risposta adattiva citotossica delle cellule T (CTL) nei confronti del virus influenzale, sia a mantenere la memoria della risposta CTL **(Bot et al., 1998)**.
- Tipo III comprende IFN-Δ, che contribuisce a controllare l'infezione a livello dei polmoni **(Mordstein et al., 2008)**.

Gli IFN-α e IFN-β
Quando il virus influenzale invade un ospite, le cellule dell'immunità innata rapidamente differenziano in cellule effettrici a breve vita, con il compito di eliminare l'agente infettivo nel minor tempo possibile.
Macrofagi, cellule dendritiche e cellule NK sono le cellule che rivestono un ruolo di maggior importanza nella risposta immunitaria innata.
I macrofagi presenti a livello degli alveoli polmonari, in assenza di infezione, sono in uno stato relativamente quiescente, ovvero producono livelli bassi di citochine e impediscono l'attivazione della risposta immunitaria innata e adattiva in assenza di un patogeno **(McGill et al., 2009) (Snelgrove et al., 2008)**.
Al momento di un'infezione invece, i macrofagi vengono attivati e contribuiscono ad incrementare la risposta pro-infiammatoria delle citochine, come IL-6 e TNF-α **(van Riel et al., 2011)**.
Inoltre, i macrofagi alveolari hanno anche un ruolo di fondamentale importanza nel limitare la diffusione del virus all'interno del tratto respiratorio mediante un meccanismo di fagocitosi di cellule apoptotiche infette **(Hashimoto et al., 2007)**.
Le cellule NK sono linfociti citotossici del sistema immunitario innato con la capacità di lisare le cellule dell'ospite che sono state infettate dal virus, sia attraverso un meccanismo diretto che indiretto:

nel primo caso le cellule NK riconoscono direttamente i recettori NKp44 e NKp46 legati alle emoagglutinine espresse sulla superficie delle cellule infettate dal virus influenzale **(Mendelson et al., 2010),** nel secondo caso le cellule NK mediante il legame del proprio recettore CD16 alla porzione Fc degli anticorpi legati alle cellule infettate, ne mediano la lisi attraverso il processo di citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC) **(Jegerlehner et al., 2004)**.

Infine ci sono le cellule dendritiche (DC) il cui maggior ruolo consiste nel presentare l'antigene (*Antigen Presenting Cells - APC*), fungendo dunque da ponte tra il sistema immunitario innato e quello adattativo; nel corso di un'infezione queste cellule, una volta internato il virus, migrano a livello dei linfonodi e li espongono sulla loro superficie cellulare alcuni frammenti di antigene processato innescando così la risposta immunitaria adattiva; linfociti T *CD4+ e CD8+* (naïve e della memoria) sia ai linfociti B **(McGill et al., 2009)**.

Le DC possono comportarsi da cellule presentanti l'antigene attraverso due meccanismi diversi.

Il primo meccanismo per l'acquisizione dell'antigene si innesca in seguito all'infezione della cellula stessa da parte del virus **(Hamilton-Easton et al., 1995)**; i proteasomi presenti nel citosol della cellula dendritica degradano le proteine del virus in corti peptidi che poi vengono trasportati fino al reticolo endoplasmatico (ER) mediante il trasportatore TAP, dove formano un complesso con le molecole MHC di classe I. Questo complesso, tramite l'apparato di Golgi, viene dunque indirizzato sulla membrana della cellula infettata, dove potrà così essere riconosciuto dalle cellule T citotossiche *CD8+* **(Yewdell et al., 2003)**.

Il secondo meccanismo attraverso il quale le cellule dendritiche fungono da APC avviene in seguito alla fagocitosi delle particelle virali o di cellule apoptotiche infettate dal virus **(Kim et al., 2009).** Le proteine del virus infettante vengono degradate all'interno degli endosomi in piccoli peptidi che vengono trasferiti sulla membrana della DC dove, legandosi con l'MHC di classe II, formano un complesso che viene riconosciuto dalle cellule T helper *CD4+*, ovvero cellule che stimolano la proliferazione delle cellule B e la loro maturazione in plasmacellule, con conseguente produzione di anticorpi **(van de Sandt et al., 2012)**.

4.2 Immunità adattativa

Questo tipo di risposta rappresenta la seconda linea difensiva messa in atto dall'ospite nei confronti dell'infezione sostenuta da un virus. È una risposta altamente specifica ed efficace, tuttavia in caso di un primo contatto con un determinato antigene, relativamente lenta. La situazione cambia invece notevolmente in seguito ad un successivo incontro con lo stesso virus: infatti la risposta è decisamente più veloce ed intensa **(van de Sandt et al., 2012)**.

Il sistema immunitario adattativo può essere diviso in una immunità cellulare, mediato dalle cellule T, e in una immunità umorale, mediata dalle cellule B.
Le cellule T, a loro volta, possono essere ulteriormente classificate in cellule *CD4+* e *CD8+* a seconda delle molecole di superficie espresse.

4.2.1. Immunità cellulare:

Nell'immunità adattativa cellulare, le cellule che rivestono il ruolo principale sono le cellule T (*CD4+* e *CD8+).*
La maggiorparte delle cellule *CD4+* sono cellule T helper (Th), così chiamate per il loro ruolo cruciale nell'attivazione sia delle cellule T che B, mentre le cellule *CD8+* attivate sono chiamate cellule citotossiche (Tc), per la loro abilità nel promuovere la lisi delle cellule infettate **(Delves & Roitt, 2000)**.
Inoltre, una sottopopolazione di cellule T è chiamata cellule T regolatorie (T-reg) che possono esprimere sia cellule molecole *CD4+* che *CD8+* e sono coinvolte nella down regulation della risposta immunitaria dopo la neutralizzazione dei patogeni e anche nella tolleranza verso i self antigens **(Romagnani, 2006)**. Le cellule T CD4+ naïve si attivano in seguito al riconoscimento di epitopi virali associati a MHC di classe II e all'interazione con molecole co-stimolatorie sulle cellule APC; una volta attivati avviene il loro differenziamento in Th1 o Th2, che differiscono per le citochine che secernono **(Delves & Roitt, 2000)**. Le cellule Th1 producono *IL-2, IFN-γ e TNF-α* (fattore di necrosi tumorale) e sono coinvolti principalmente nell'attivazione della risposta immunitaria adattativa mediata dalle cellule T citotossiche.
Le cellule Th2 invece producono mentre *IL-4, IL-5, IL-6, IL-9,IL-10 e IL-13* ed hanno il compito di innescare l'attivazione e la differenziazione delle cellule B, con conseguente produzione di anticorpi **(Mosmann & Sad, 1996)(Dong &Flavell, 2001)**.
Tuttavia risulta praticamente impossibile distinguere l'immunità legata alle cellule Th1 e quella legata alle cellule Th2, in quanto molte citochine supportano più o meno indirettamente entrambi i tipi di immunità. Per esempio, *IL-4* e *IL-13* delle cellule Th2 stimolano la secrezione di *IL-12*, che a sua volta guida la differenzazione delle cellule T naïve in cellule Th1 **(Gor et a., 2003)**.
Mentre le cellule Th riconoscono gli epitopi virali associati a MHC di classe II, le cellule Tc riconoscono i complessi antigene-MCH I **(Heath & Carbone, 2001)**.
Il complesso MHC I si trova in tutte le cellule nucleate dell'organismo, mentre il complesso MHC II è localizzato esclusivamente nelle cellule che presentano l'antigene, incluse le cellule dendritiche, i macrofagi e cellule B.

Le due classi di proteine MHC presentano anche diverse tipologie di antigene: le proteine MHC di classe II presentano essenzialmente peptidi da particelle non viventi e microrganismi extracellulari che sono stati fagocitati, come batteri, mentre le proteine MHC di classe I presentano generalmente antigeni intracellulari come i virus **(Heath & Carbone, 2001)(Bontrop, 2006)**

Le cellule Th secernono citochine che hanno un ruolo centrale nella scelta del tipo di risposta immunitaria da prediligere in seguito al contatto con un determinato antigene **(Delves & Riott, 2000)**.

Per quanto riguarda le cellule Tc, la loro attivazione può essere divisa nella fase di differenziazione e di citotossicità.

Nella prima fase, le cellule T *CD8+* naïve sono attivate e differenziate in cellule effettrici funzionali (CTL) che possono poi riconoscere e uccidere le cellule infettate dal virus **(Andersen MH et al., 2006)**.

Infatti, le cellule infettate dal virus mostrano peptidi virali in associazione con le molecole MHC I sulla loro superficie, quindi rappresentando esse stesse dei target per le cellule CTL.

Le cellule CTL legano quindi il complesso peptide virale-MHC I ed uccidono la cellula infettata dal virus attraverso diversi meccanismi: ad esempio le CTL possono rilasciare *perforine* all'interno della membrana della cellula infettata, provocando la formazione di pori che permettono il passaggio di enzimi dalla CTL alla cellula infettata dal virus e provocandone l'apoptosi; in aggiunta, le CTL possono promuovere la morte delle cellule infettate attraverso il rilascio di citochine, soprattutto *IFN-γ* e *TNF-α* **(Andersen et al., 2006) (Delves & Riott, 2000)**.

I CTL riconoscono soprattutto epitopi delle proteine virali altamente conservate, come M1, NP, PA e PB2. (Figura 15).

4.2.2. Immunità umorale:

L'immunità adattativa umorale è mediata dagli anticorpi secreti in seguito alla differenziazione delle cellule B in ASCs (antibody secreting cells) e plasmacellule (Figura 16).

Esistono 5 diverse classi di anticorpi: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA, con IgM, IgG e IgA le più importanti per l'immunità umorale in seguito all'ingresso di una particella virale.

Le cellule B mature, prima di interagire con un antigene, esprimono sia IgM che IgD come recettori di membrana leganti l'antigene. In seguito alla stimolazione della particella estranea, alcune cellule sono attivate a secernere IgM, mentre altre subiscono un "class switching" e iniziano a produrre IgG, IgE o IgA.

Mentre IgA è il principale anticorpo trovato nelle secrezioni mucosali, IgM e IgG sono gli anticorpi prevalenti nel fluido interstiziale e sangue, e sono essenziali per la risposta immunitaria primaria e secondaria, rispettivamente **(Goldsby et al., 2003)**.

Infatti, in seguito ad un'infezione primaria, nel siero si riscontra la presenza di diverse classi di anticorpi: IgM, IgA e IgG, con il prevalere della prima classe; nel caso invece di una risposta secondaria, a prevalere sono le IgG e le IgM non sono presenti (**Rimmelzwaan et al., 1997)**.
Inoltre mentre le IgM hanno la capacità di neutralizzare il virus e attivare la cascata del complemento con conseguente lisi della cellula infettata, le IgG sono correlate esclusivamente ad una protezione duratura nel tempo.
Quest'ultima classe di anticorpi può essere suddivisa in diverse sottoclassi in base alla struttura, la funzione e l'half life: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
Il frammento Fc delle IgG2, interagisce con i componenti del complemento e con i recettori Fc che si trovano sulla superficie delle cellule come le cellule NK, i macrofagi, i neutrofili e le mastocellule, con un'alta affinità, provocando una efficiente attivazione della citotossicità cellulo-mediata anticorpo dipendente (ADCC) e opsono-fagocitosi da parte dei macrofagi **(Huber et al.,2006)**.
Esistono inoltre due diverse popolazioni di cellule B: B1 e B2. Le cellule che secernono anticorpi della linea B1 esprimono anticorpi innati (soprattutto IgM) che si legano con una bassa affinità a numerosi antigeni diversi, quindi con bassa specificità **(Baumgarth et al., 2000).** La produzione di questi anticorpi può essere considerata come la prima linea di difesa dai patogeni a livello dell'immunità umorale
Le cellule che secernono anticorpi invece della linea B2 esprimono anticorpi specifici in risposta ad una determinata stimolazione antigenica e in occasione di un secondo incontro con lo stesso antigene aumenta notevolmente la loro affinità e quindi anche la produzione anticorpale specifica diventa più rapida e intensa **(Manz et al., 2005)**.
Gli anticorpi secreti dalle cellule B possono essere direttamente protettivi, qualora inibiscano stericamente il legame del microrganismo con il suo specifico recettore sulla cellula target; tuttavia nella maggior parte dei casi, gli anticorpi non offrono solo ingombro sterico ma giocano un ruolo fondamentale in fenomeni quali l'attivazione del complemento, l'opsonizzazione e l'ADCC **(Goldsby et al., 2003)**.
Mentre, come già citato in precedenza, le CTL riconoscono essenzialmente epitopi delle proteine virali altamente conservate, come M1, NP, PA e PB2, nel caso delle cellule B, gli anticorpi da esse secreti sono diretti in particolar modo contro la HA e NA virale. Purtroppo però, nel caso degli anticorpi diretti contro l'HA virale, in particolare contro la sub-unità HA1, si tratta quasi esclusivamente di anticorpi virus ceppo-specifici e non riescono quindi a neutralizzare sottotipi virali **(De Jong et al., 2000)**. Ciò è dovuto principalmente alla elevata capacità del virus di mutare velocemente attraverso il meccanismo di drift antigenico.

Nel caso degli anticorpi diretti contro la NA virale, questi vanno ad interferire con l'ultima fase del ciclo di replicazione del virus, impedendo il rilascio di nuovi virioni nell'ambiente extracellulare e quindi la loro propagazione.

Esiste una notevole differenza tra gli anticorpi diretti contro la HA e quelli specifici anti-NA, infatti quest'ultimi non hanno la capacità di neutralizzare il virus; questo non significa però che non siano ugualmente importanti nel debellare l'infezione, infatti, inibendo l'attività enzimatica della NA, gli anticorpi possono limitare la diffusione virale riducendo notevolmente la durata e la severità della malattia **(Bosch et al., 2010)**.

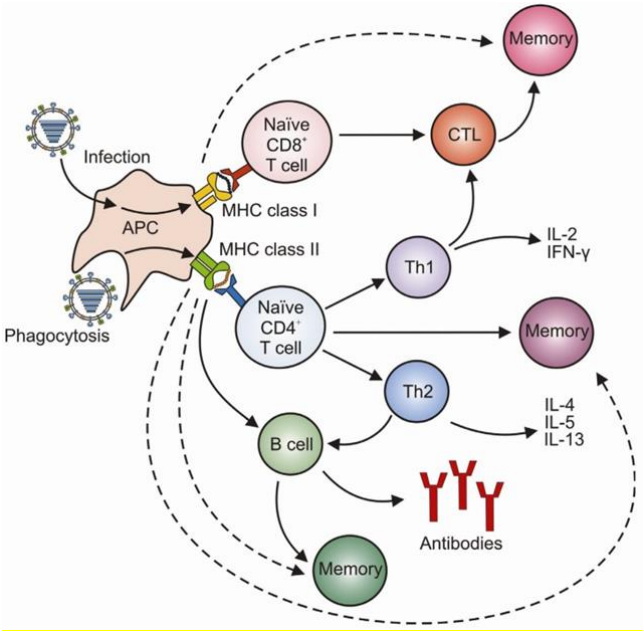

Fig. 16: Induzione della risposta immunitaria umorale e cellulare.

L'induzione della risposta immunitaria dopo il primo incontro con il virus influenzale è indicato dalle frecce continue; mentre le frecce tratteggiate indicano l'attivazione rapida di popolazioni di cellule della memoria virus-specifiche al secondo contatto con un determinato ceppo di virus A. Sorgente: van de Sandt et al., 2012.

4.3 Immunità mucosale

Le superfici mucose ricoprono completamente il tratto gastrointestinale, genito urinario e respiratorio e contengono un sistema immunitario "mucosale" sia innato che adattativo altamente specializzato che rappresenta la prima linea di difesa contro le infezioni da patogeni esterni.

La funzione dei tessuti linfoidi associati alle mucose (MALT) è praticamente indipendente dal compartimento immunitario sistemico e, per i virus respiratori come quello influenzale, il tessuto

linfoide associato al tratto respiratorio risulta essenziale per la difesa dell'ospite dall'infezione. Nell'uomo, questo tessuto consiste soprattutto nell'anello di Waldeyer (adenoidi, tonsille tubariche, tonsille palatine e tonsille linguali) **(Tamura & Kurata, 2004)**. Il trasporto dell'antigene dalla mucosa fino ai tessuti linfoidi è facilitata delle cellule di membrana (M) presenti nel tratto respiratorio in associazione con le strutture MALT. Le cellule M sono coinvolte nel meccanismo di trasporto di macromolecole e particelle attraverso l'epitelio, permettendo così l'interazione della particella virale con i macrofagi e i linfociti T e B del MALT. Questo porta ovviamente ad un'alta concentrazione di antigene a livello del MALT, dove di conseguenza si formeranno un alto numero di cellule presentanti l'antigene specifiche (Kraal, 2005).

La maggiorparte degli anticorpi secreti sulle superfici mucosali è rappresentata dalle IgA, sebbene localmente anche le IgM e IgG prodotte possano contribuire alla difesa mucosale **(Holmgren & Czerkinsky, 2005)**.

Le IgA nella loro forma dimerica (due molecole di IgA legate da una catena di giunzione) si possono legare ai recettori Ig polimerici (pIgR) espressi a livello baso-laterale sulle cellule epiteliali; questi recettori ne facilitano il trasporto attraverso le cellule epiteliali e la porzione extracellulare del recettore legata alle IgA viene poi rilasciata nel lume come IgA secretoria (SIgA).

SIgA ha diverse funzioni: può legare gli antigeni presenti nel lume, bloccando così i siti di legame del recettore presenti sulla superficie del virus; inoltre gli anticorpi IgA dimerici interagiscono con gli antigeni virali all'interno degli endosomi endoteliali durante il trasporto pIgR- mediato, neutralizzando così il virus anche a livello intracellulare. I dimeri di IgA possono inoltre interagire con gli antigeni nella lamina propria e trasportarli nel lume attraverso il trasporto pIgR-mediato **(Brandtzaeg, 2003).**

4.4. La risposta immunitaria contro il virus influenzale

In seguito all'incontro dell'organismo con il virus influenzale, sia il sistema immunitario umorale che cellulare sono importanti, infatti né *CD4+* e *CD8+* né le cellule B da sole possono efficacemente rimuovere il virus **(Gerhard, 2001**).

Comunque gli anticorpi prodotti contro le proteine HA e NA della superficie virale sono quelli che giocano il ruolo più importante neutralizzandone l'attività. Come già citato in precedenza, mentre gli anticorpi diretti contro l'HA virale possono neutralizzare il virus e prevenire l'infezione delle cellule target, gli anticorpi diretti verso la NA riducono solo il rilascio di nuovi virioni da parte delle cellule infettate, ma non sono in grado di prevenire efficacemente l'infezione **(Johansson et al., 1989)**.

Gli anticorpi diretti verso l'HA virale misurati efficacemente attraverso il saggio HI (Haemoagglutination Inhibition) e sono correlati con la resistenza alla malattia influenzale nell'uomo, e un titolo HI ≥40 è considerato essere protettivo nel 50% dei soggetti **(Hobson et al., 1972)**.

Il tratto respiratorio umano rappresenta la principale via di ingresso per il virus influenzale e le IgA secretorie rappresentano la prima linea di difesa contro l'infezione **(Brokstad et al., 2001)**. Dapprima il livello anticorpale aumenta a livello linfonodale e le immunoglobuline a predominare nella risposta precoce sono le IgM, mentre le IgG e le IgA predominano nel corso della risposta tardiva. Nella milza il livello di anticorpi aumenta con qualche giorno di ritardo rispetto ai linfonodi ed è dominato sempre dalle IgM **(Fazesak et al., 1994)**. Nei linfonodi e nella milza viene prodotta la maggior parte degli anticorpi circolanti nel siero, dove un incremento del titolo anticorpale (soprattutto IgM) è in genere osservato dai 5-7 giorni dopo l'infezione **(Palladino et al., 1995)**.

L'immunità umorale a lungo termine si pensa che sia mediata dalle cellule memoria e dalle plasmacellule a lunga vita. A quest'ultima categoria di cellule appartengono le cellule antigene-specifiche non proliferanti che migrano verso il midollo osseo e vi persistono, mantenendo un livello basale e costante di specifici anticorpi sierici **(Manz et al., 2005).** In certi casi infatti, gli anticorpi possono anche persistere per anni, come lo dimostra il fatto che sono stati trovati tassi di attacco ridotti per il virus influenzale A/USSR/77 (H1N1) nei soggetti che avevano sperimentato l'infezione da virus H1N1 20-25 anni prima (cioè prima della scomparsa del sottotipo avvenuta nel 1957) **(Haaheim, 2003)**.

Dopo un'infezione ripetuta mediata dal medesimo strain influenzale, la risposta CTL emerge più rapidamente rispetto a quanto avviene in seguito ad un'infezione primaria ed è associata con un notevole incremento dell'attività citotossica **(Thomas et al., 2006).** I CTL influenza-specifici riconoscono epitopi virali multipli sulle cellule bersaglio e cellule presentanti l'antigene, con epitopi da NP, PA, e proteina M a rappresentare quelli di maggior importanza **(La Gruta & Doherty, 2006)**. Queste proteine sono altamente conservate tra i vari virus influenzali, perciò le cellule T citotossiche provvedono alla più alta cross protezione contro gli strain influenzali che subiscono antigenic drift piuttosto degli anticorpi, che sono diretti generalmente contro le proteine di superficie che sono anche quelle maggiormente variabili (HA e NA).

E' stato rilevato che nel corso dell'infezione da virus influenzale, entrano in gioco due diversi pools di cellule T della memoria: le cellule T della memoria centrale che si accumulano nei linfonodi e midollo osseo, e le cellule T della memoria effettrici che possono trovarsi negli organi periferici. Le cellule della memoria differiscono sostanzialmente dai loro precursori *naïve* in quanto persistono a frequenze più alte, e generano funzioni effettrici più rapide in risposta all'esposizione ad un antigene ed hanno meno richieste stringenti per la co-stimolazione **(Hikono et al., 2006)**.

La risposta immune in seguito all'infezione da virus aviario è stata studiata per molti sottotipi, come l'H5, l'H7e l'H9. Sebbene si possa assumere che la risposta immunitaria dell'ospite verso il virus dell'influenza aviario sia molto simile a quello del virus influenzale umano, sono state riscontrate alcune differenze. Ad esempio, il picco dei livelli di anticorpi nella cavia infettata con un virus aviario H7 è stato trovato ai giorni 42-56 **(Joseph et al., 2007)**, quindi con un significativo ritardo rispetto alla risposta verso i virus influenzali umani. La ragione di questo è ancora sconosciuta, ma si è riscontrata la stessa cosa anche dopo l'immunizzazione della cavia con un vaccino a virus H5N1 attenuato. Anche la risposta delle citochine indotta dopo l'infezione è diversa: le infezioni da virus H5N1 hanno dimostrato indurre nell'uomo una sindrome emofagocitosica reattiva, provocata dalle elevate concentrazioni di citochine pro-infiammatorie **(To et al., 2001)**. Elevati concentrazioni di citochine sono state associate con la sostituzione di un amminoacido nella molecola NS1 (Asp-Glu sostituzione nella posizione 92), responsabile dell'incremento della resistenza virale agli IFNs e TNF-α **(Seo et al., 2002)**. Questo può condurre alla regolazione disfunzionale della secrezione delle citochine da parte del sistema immunitario dell'ospite, che può promuovere così l'ipercitochemia **(Seo et al., 2004)**. La molecola NS1 del virus dell'influenza spagnola è stato visto essere un antagonista molto efficace dell'interferone nelle cellule umane. Comunque il gene che codifica per l'NS1 del virus dell'influenza spagnola non possedeva la sostituzione aminoacidica che correla con la virulenza del virus H5N1 aviario **(Taubenberger, 2006)**, questo a ribadire il concetto che ancora purtroppo sui virus aviari e sul perché delle loro estrema virulenza non si hanno informazioni certe.

5. Studi clinici

5.1 Le fasi

Tutti i trial clinici prevedono obbligatoriamente 4 fasi, che hanno obiettivi diversi: la fase I, II e III hanno prevalentemente scopi conoscitivi e registrativi, mentre la fase IV ha lo scopo di approfondire e consolidare le conoscenze ottenute dalle tre fasi precedenti essenzialmente sul tema dell'efficacia del vaccino, comparandola a prodotti già presenti sul mercato.

In realtà, per essere precisi, le 4 fasi prima menzionate sono precedute da una fase 0, detta anche o preclinica. La fase 0 dura in genere 3-4 anni e consiste inizialmente, in una serie di test di tossicità in vitro e successivamente in esperimenti su animali da laboratorio.

In seguito ai risultati ottenuti durante la fase 0, si fa seguire la fase I, che ha lo scopo di ottenere informazioni sulla sicurezza del nuovo vaccino, sulle dosi da somministrare e sugli eventuali effetti avversi. Generalmente questa fase è eseguita su un numero ristretto di volontari sani (20-80 persone).

Alla fase I, che può durare mesi, segue la fase II, caratterizzata da un notevole ampliamento del numero dei partecipanti (alcune centinaia) al fine di valutare l'efficacia e la sicurezza del vaccino. Questa fase è eseguita sulla popolazione target, ovvero i destinatari del vaccino in corso di valutazione. Dopodichè si passa alla fase III, che prevede un ulteriore aumento dei partecipanti al trial (alcune migliaia) con l'obiettivo di valutare la sicurezza e l'efficacia del vaccino in un bacino di utenza più ampio ed eventualmente confrontarlo anche con gli altri vaccini già registrati. Dopo le prime 3 fasi, i dati ottenuti sono raccolti in un dossier che viene sottoposto all'esame dell'EMA per l'Europa e alla FDA per gli Stati Uniti .

La fase IV invece è definita anche come fase post-marketing e consente di ricavare nuove informazioni sulla sicurezza e l'efficacia del vaccino dopo il suo ingresso nel mercato.

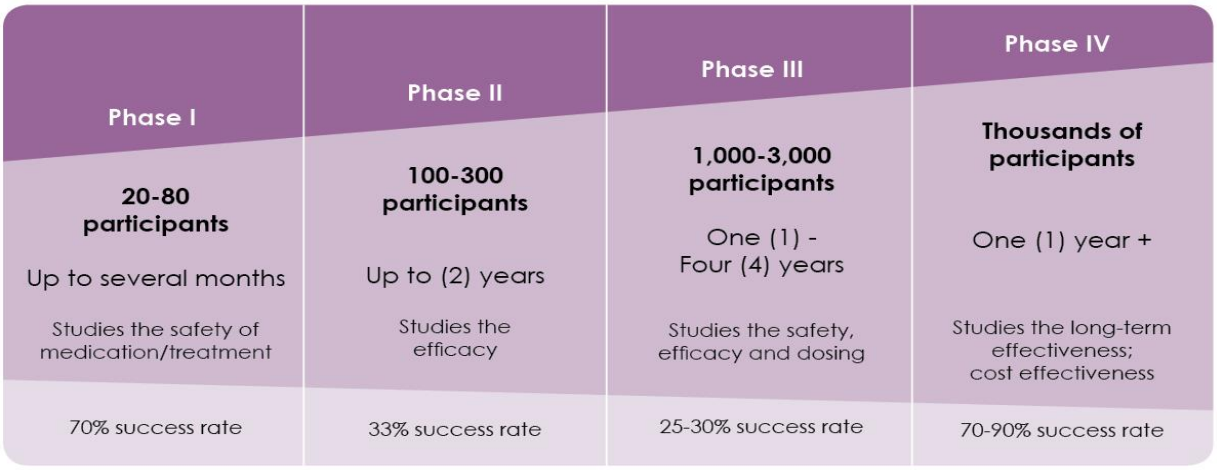

Fig. 16: Rappresentazione schematica delle fasi che fasi che compongono uno studio clinico. Sorgente: https://cern-foundation.org

5.2 Criteri EMA per l'approvazione di un vaccino

Secondo il Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) il Single Radial Haemolysis (SRH) e l'Hemagglutination Inhibition (HI) rappresentano le due metodiche di elezione per poter valutare l'entità della risposta anticorpale nei confronti di un nuovo vaccino influenzale (immunogenicità), permettendone o men l' immissione nel commercio **(CPMP/BWP/214/96).** Tuttavia, nel corso dei numerosi trails pre-clinici e clinici messi in atto con l'obiettivo di valutare l'immunogenicità di un nuovo vaccino influenzale aviario, è stato riscontrato come la tecnica HI presenti una scarsa sensibilità nei confronti del virus A/H5N1 **(Profeta & Palladino, 1986),** di conseguenza, anche se la Micro Neutralizzazione (MN) non fa parte dei test obbligatori richiesti dal CPMP, viene sempre più richiesta dagli Sponsor.

Il test MN porta con sè alcuni problemi, maggiormente legati al fatto che tale metodica sierologica risulta di difficile standardizzazione e validazione, con un elevato grado di variabilità tra laboratori (Inter lab variability). Problemi questi che hanno portato, ancora oggi, all'assenza di una definizione di correlato di protezione e quindi all'assenza di un cut-off riconosciuto a livello internazionale per la valutazione della sieroprotezione. Normalmente si ricorre ad un cut-off ≥ 20, derivante una serie di valutazioni statistiche eseguite dagli Sponsor e accettate dall'ente regolatorio (EMA).

L'EMA infatti, ha stabilito una serie di tre criteri atti a valutare l'immunogenicità di un nuovo vaccino pandemico; questi criteri sono differenti nel caso si tratti di soggetti adulti di età compresa trai 18 ed i 59 anni e nel caso di soggetti con over 60.

Per i soggetti di età compresa trai 18 ed i 59 anni devono necessariamente essere soddisfatti tutti e tre i criteri:

- il numero di sieroconversioni o l'aumento significativo del titolo anticorpale deve essere >40%
- l'aumento della media geometrica del titolo anticorpale (GMT increase) > 2.5
- la proporzione dei soggetti con un titolo anticorpale maggiore di 25 mm2 (SRH), 40 (HI) o 20 (MN) deve essere >70%

Invece, per i soggetti over 60 i limiti da superare sono leggermente più bassi:

- il numero di siero conversioni o l'aumento significativo del titolo anticorpale deve essere >30%
- l'aumento della media geometrica del titolo anticorpale (GMT increase) > 2.0
- la proporzione dei soggetti con un titolo anticorpale maggiore di di 25 mm2 (SRH), 40 (HI) o 20 (MN) deve essere >60% **(EMEA/CHMP/VWP/263499/2006)**

Come si può notare, non esiste ad oggi nessuna regolamentazione riguardante i criteri che un vaccino influenzale aviario deve possedere per poter essere somministrato nella popolazione pediatrica, non esistono infatti dei criteri ufficiali per la valutazione dell'immunogenicità.

5.3 Metodiche per l'approvazione di un nuovo vaccino influenzale

5.3.1 Single Radial Haemolysis (SRH)

La metodica denominata Single Radial Haemolysis (SRH) è una tecnica sierologica sviluppata nel 1975 da Schild in grado di stimare l'attività emolitica degli anticorpi presenti nel siero, diretti verso il virus in questione **(Schild et al., 1975).** Si tratta di una emolisi mediata dal complemento e indotta dalla presenza di complessi antigene-anticorpo, che provoca la formazione di un alone di emolisi, facilmente individuabile, la cui misura è direttamente proporzionale alla concentrazione degli anticorpi diretti contro i virus influenzali presenti nel siero (Figura 17).

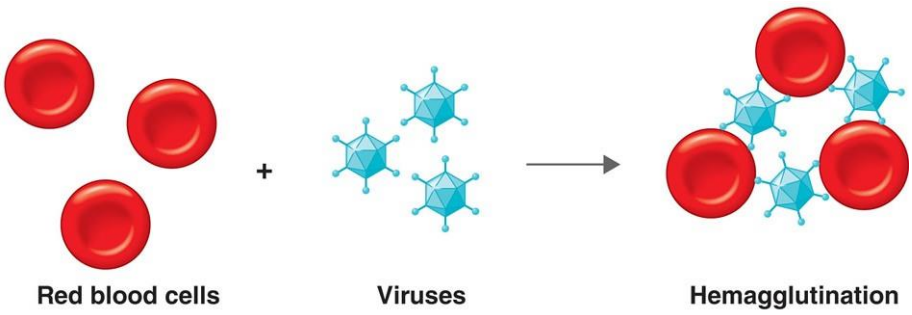

Fig.17: Rappresentazione schematica del legame tra eritrociti e virus, con conseguente emoagglutinazione.

Il principale svantaggio di questa tecnica è rappresentato dal fatto che non è altamente specifica, in quanto non individua soltanto gli anticorpi diretti verso i virus influenzali ma anche verso altri virus come: il virus Dengue, il virus Japanese Encephalitis i coronavirus e tutta una serie di virus parainfluenzali.

Questa tecnica tuttavia presenta anche diversi vantaggi:

- È una tecnica estremamente semplice, economica, veloce, affidabile e riproducibile, in cui i risultati si esprimono numericamente, e quindi non sono influenzabili dall'operatore. **(Russel et al., 1975),**
- La quantità di campione da utilizzare è decisamente esigua (6 µl).
- Permette di analizzare contemporaneamente un gran numero di campioni in maniera molto veloce.
- È una tecnica altamente sicura perché, a differenza della MN che necessita dell'utilizzo di virus vivi, per l'SRH sono sufficienti virus inattivati; aspetto che risulta essere estremamente utile quando si lavora con virus aviari come l'H5N1, in quanto i test di laboratorio possono essere tranquillamente eseguiti in BLS 2 **(Wood et al., 2001).**
- L'SRH si è rivelata una tecnica molto utile nel testare vaccini diretti verso i virus aviari, in quanto è stato dimostrato che la metodica di elezione, ovvero l'HI, sottostimava la risposta immunitaria verso questo tipo di virus **(Nicholson et al., 2001).**
- L'SRH è una tecnica ufficialmente riconosciuta dall' European Medicines Agency (EMA) e quindi utilizzata di routine per determinare l'immunogenicità di ogni nuovo vaccino influenzale.

5.3.2. Hemagglutination Inhibition (HI)

Il test HI è considerato il "gold standard", ovvero la tecnica di elezione per la valutazione della immunogenicità dei nuovi vaccini.

L'HI è una tecnica originariamente descritta da Hirst (1942) e poi sviluppata da Salk (1944), che si basa sulla capacità dell'HA del virus dell'influenza di legarsi ai globuli rossi dell'ospite provocandone l'agglutinazione. Nel momento in cui gli anticorpi si legano ai siti antigenici dell'HA virale, questi siti di legame risultano bloccati e quindi non possono più legarsi agli eritrociti, inibendo così l'emoagglutinazione.

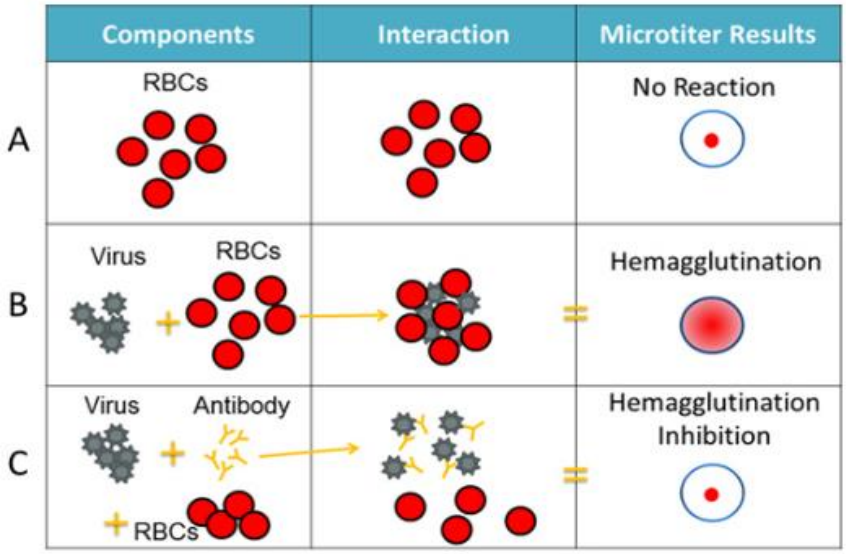

Fig.18: Rappresentazione schematica del saggio HI: in presenza di anticorpi specifici diretti contro un determinato virus, viene inibita l'emoagglutinazione.

In seguito alla vaccinazione, titoli in HI di 40 indicano indicare una probabilità di protezione dall'infezione nel 50% dei soggetti, mentre titoli compresi tra 120 e 160 indicano che circa il 90% dei soggetti vaccinati risulta protetto **(Hannoun et al., 2004).**

I principali vantaggi sono legati al fatto che l'HI è un test facile da eseguire, molto affidabile se eseguito correttamente, e che richiede attrezzature e reagenti poco costosi.

Tuttavia presenta anche alcuni svantaggi:

- La necessità di rimuovere eventuali inibitori aspecifici della emoagglutinazione presenti nel siero da testare;
- La necessità di standardizzare gli antigeni ogni volta che viene eseguito il test (Test delle 4 Unità);
- La necessità di operatori specializzati che siano in grado di leggere correttamente i risultati;
- Bassa sensibilità per virus influenzali stagionali di tipo B;
- Come già precedentemente accennato, l'HI è un test poco sensibile nella individuazione dell'HA dei virus aviari H5.

Tuttavia è stato dimostrato che sostituendo i globuli rossi di tacchino o pollo, solitamente utilizzati per virus stagionali, con quelli di mucca o di cavallo si ottiene una maggiore sensibilità anche se la tecnica è ancora in fase di standardizzazione.

Il successo di questa sostituzione è correlato alla capacità dell'HA del virus aviario di legare essenzialmente recettori con residui di acido N-acetilmuramico α2,3-galattosio, che sono infatti presenti in alte concentrazioni sulla superficie dei globuli rossi di mucca e di cavallo, mentre nel

pollo e nel tacchino se ne rilevano solo basse concentrazioni **(Hirst, 1941).** Quindi, ne consegue che i virus aviari hanno la tendenza a legare preferenzialmente i globuli rossi di mucca e di cavallo, anche se la loro specificità si riduce in maniera inversamente proporzionale con l'aumentare dell'età dei globuli rossi; infatti, proprio per tale motivo è consigliabile utilizzare il sangue entro una settimana dalla sua raccolta **(Stephenson, 2006).**

5.3.3 Micro Neutralizzazione (MN)

Come già precedentemente descritto, la Micro Neutralizzazione (MN) non fa parte dei test obbligatori richiesti dal CPMP per licenziare un nuovo vaccino influenzale, tuttavia per le sue caratteristiche viene sempre più richiesta dagli Sponsor e consigliato dallo stesso ente regolatorio.
Il test MN per il virus dell'influenza si basa sul presupposto che gli anticorpi neutralizzanti presenti nel siero del paziente diretti contro l'HA virale inibiscano l'infezione virale delle cellule.
L'assenza di infettività cellulare indica che nel siero sono presenti alte concentrazioni di anticorpi specifici diretti contro quel determinato virus influenzale in grado di neutralizzarlo.
La MN presenta svariati vantaggi:

- È un test molto sensibile e altamente specifico che ha lo scopo di rilevare gli anticorpi neutralizzanti presenti nel siero umano o animale specifici per un determinato virus influenzale.
- Può essere utilizzata per determinare l'immunogenicità di un nuovo vaccino influenzale aviario, al posto dell'HI, che risulta relativamente insensibile alla misurazione degli anticorpi anti-H5.
- Rileva essenzialmente anticorpi diretti verso la HA del virus influenzale, quindi permette la detection degli anticorpi funzionali specifici per i diversi strain virali.
- Dato che utilizza un virus vivo e infettivo, il dosaggio anticorpale può essere fatto immediatamente non appena compare un nuovo ceppo influenzale e in tempi decisamente rapidi. Infatti, un saggio di MN con lettura dell'effetto citopatico (CPE) per rilevare le cellule infettate dal virus può produrre risultati soddisfacenti entro 5 giorni; entro 2 giorni basato su un sistema di lettura Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).

Tra gli svantaggi invece ricordiamo:

- prevede l'utilizzo del virus vivo e infettivo, quindi necessita di laboratorio di livello 3 (BLS3), che solo pochi laboratori hanno a disposizione. Negli ultimi anni, tuttavia, per ovviare a questo problema, sono state introdotte le Pseudotypes (PPT) **(Temperton et al., 2007),** in cui proteine essenziali retrovirali (GAG) interagiscono con glicoproteine di altri virus capsulati e assemblati in particelle infettive. I PPT possono esprimere HA di diversi strain influenzali e quindi,

non essendo più particelle virali vive ed infettive, i test possono essere tranquillamente effettuati in BLS2;

- è una metodica piuttosto complessa ed articolata e quindi richiede personale formato e altamente specializzato;
- prevede una tempistica molto precisa per la raccolta dei campioni da testare: innanzitutto devono essere raccolti almeno due campioni, uno nella fase acuta (entro 7 giorni dall'inizio dei sintomi simil-influenzali) e uno nella fase di convalescenza (almeno 14 giorni dopo il campione in fase acuta e comunque entro 2 mesi dalla comparsa della malattia).Un aumento del titolo anticorpale di almeno 4 volte dimostra una siero conversione.
- dato che non esiste al momento un cut-off universalmente riconosciuto per l'MN, è necessario conoscere i titoli anticorpali in una popolazione di controllo di pari età per determinare il titolo minimo indicativo di una risposta anticorpale specifica diretta verso lo strain influenzale utilizzato nel test.

Il protocollo di micro neutralizzazione si compone essenzialmente di tre parti:

1. determinazione della dose infettante la coltura tissutale (TCID50)
2. test di Micro Neutralizzazione
3. lettura in Cytopatic Effect (CPE) o lettura in ELISA.

Materiali e Metodi

1. Lo Studio Clinico

L'obiettivo del trial clinico di fase III trattato in questo studio di tesi, è stato quello di valutare l'immunogenicità di due nuovi vaccini inattivati (*split*), non adiuvati, il primo intramuscolare (IM), il secondo intradermico (ID), diretti entrambi contro il virus HPAI A/H5N1/Indonesia/05/2005 (Figura 19).

I vaccini in esame, sono stati prodotti a partire da virus propagati in linee cellulari VERO, approvate dalla WHO, FDA, EMA, e MHLW per la produzione di vaccini contro il polio virus, l'influenza e la Japanese Encephalitis **(Montagnon et al., 1999)(Tauber et al., 2007)**.

Per il vaccino intramuscolare sono stati arruolati 180 soggetti adulti sani, di età compresa trai 18 ed i 64 anni e suddivisi in cinque coorti, sulla base dalla concentrazione di antigene contenuta nel vaccino somministrato:

1. 5 µg di HA A/H5N1/Indonesia/05/2005
2. 10 µg di HA A/H5N1/Indonesia/05/2005
3. 15 µg di HA A/H5N1/Indonesia/05/2005
4. 30 µg di HA A/H5N1/Indonesia/05/2005
5. 60 µg di HA A/H5N1/Indonesia/05/2005.

Tutte e 5 le coorti hanno ricevuto il vaccino per via intramuscolare in corrispondenza della visita 1 dopo il primo prelievo di sangue (*Day 0*), e una seconda dose booster a 21 giorni, dopo il secondo prelievo di sangue (*Day 22*). Al giorno 43 (21 giorni dopo la 2° vaccinazione) (*Day43*) è stato effettuato il terzo ed ultimo prelievo di sangue.

I criteri per arruolare i partecipanti allo studio sono stati i seguenti:

- soggetti sani di età compresa trai 18 ed i 59 anni
- soggetti capaci di partecipare al trial clinico sia fisicamente che mentalmente
- in caso di donne in età fertile, non dovevano essere in stato di gravidanza al momento dell'arruolamento e non dovevano esserlo fino alla conclusione dello studio clinico.

I criteri di esclusione:

- soggetti con precedenti infezioni da virus H5N1 o vaccinazioni con vaccini anti-H5N1

- soggetti ad alto rischio di contrarre infezioni da H5N1 (per esempio coloro che lavorano in industrie di pollame oppure in fattorie)
- soggetti con reazioni allergiche o anafilattiche;
- soggetti con malattie metaboliche, epatiche, cardiovascolari, neurologiche, gastrointestinali, renali, reumatiche o ematologiche
- soggetti con immunodeficienza innata o acquisita
- soggetti che sono stati sottoposti ad una trasfusione di sangue nei 30 giorni antecedenti l'inizio dello studio;
- soggetti che hanno donato plasma o sangue nei 30 giorni precedenti l'inizio del trial;
- soggetti che hanno ricevuto un vaccino influenzale nelle 4 settimane precedenti l'inizio dello studio;
- soggetti con malati o sottoposti a trattamento farmacologico nelle 4 settimane antecedenti l'inizio dello studio;
- soggetti con asplenia funzionale o chirurgica;
- soggetti a cui è stato somministrato un farmaco in fase di ricerca nelle 4 settimane precedenti l'inizio dello studio;
- soggetti con condizioni dermatologiche o tatuaggi che possono interferire nel sito di iniezione;
- soggetti con problemi di abuso di alcol e droghe;
- soggetti che facenti parte del team di ricerca che conduce il trial clinico;
- se donna, incinta o in fase di allattamento all'inizio dello studio;
- soggetti che possono presentare qualsiasi altra condizione che porta alla loro esclusione dallo studio clinico.

Ogni siero è stato analizzato attraverso la metodica SRH, HI e MN, da due operatori diversi e in duplicato.

Per il vaccino intradermico, i criteri per l'arruolamento dei partecipanti è stato il medesimo utilizzato per il vaccino intramuscolare. Sono stati arruolati 60 soggetti adulti sani, di età compresa tra i 18 e 65 anni, in un'unica corte a cui sono state somministrate due dosi di vaccino intradermico ciascuna contenente 15 µg di HA A/H5N1/Indonesia/05/2005.

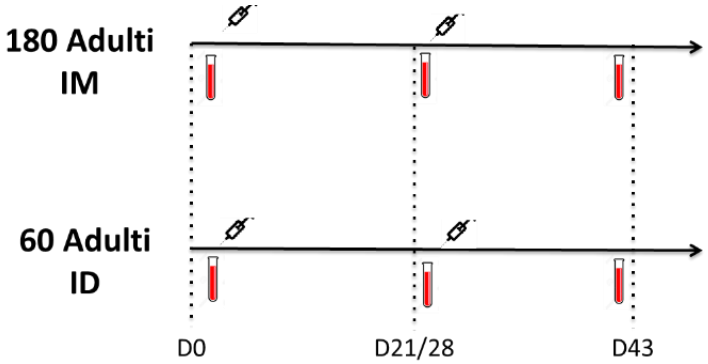

Fig. 19: Studio clinico; disegno schematico raffigurante tempi di prelievo e vaccinazione sia per i soggetti coinvolti nello studio intradermico che per quelli coinvolti nello studio intramuscolare.

2. Single Radial Haemolysis

2.1 Materie prime e reagenti

- Antigene: A/H5N1/Indonesia/05/2005 (dal National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)
- Sangue al 50% in Alsever di tacchino
- Agarosio
- Agarosio Low Gelling
- Chromium(III) Chloride hexahydrate
- Complemento di Guinea Pig
- Controllo negativo: siero umano privato di IgA, IgG e IgM (da Sigma Aldrich)
- Controllo positivo: siero standardizzato iperimmune di pecora immunizzata con A/H5N1/Indonesia/05/2005 (dal NIBSC)
- Phosphate Buffered Saline
- Sodium Azide
- Campioni di siero da testare per A/H5N1/Indonesia/05/2005

2.2 Preparazione delle soluzioni

- **Phosphate Buffered Saline Tablets (PBS):** dissolvere una tavoletta ogni 200 ml di acqua distillata e sterilizzare in autoclave a 121°C per 20 minuti.

- **1.5% di Agarosio contenente 0.1% di Sodium Azide:** pesare e dissolvere in un cilindro graduato 1 g di Agarosio, 0.5 g di Agarosio Low Gelling (per abbassare and 0.1 g di Sodium Azide (NaN_3) in circa 80 ml di PBS. Aggiungere altro PBS fino ad ottenere un volume finale di 100 ml. Versare la soluzione in una beuta e posizionarla su un agitatore magnetico rotante con piastra preriscaldata ad almeno 150 °C al fine di ottenere una completa solubilizzazione Lasciare la soluzione in un bagnetto a 47.5°C.
- **Chromium (III) Chloride hexahydrate 1M:** pesare e dissolvere in un tubo da 15 ml contenente già 6 ml di acqua distillata, 2.66 g di $CrCl_3$. Portare ad un volume finale di 10 ml con altra acqua distillata.
- **Soluzione di globuli rossi (RBCs) al 10-13%:** centrifugare 5 ml della soluzione risospesa in 50% di Alsever per 15 minuti a 1600 rpm. Rimuovere il sovranatante e risospendere il pellet di globuli rossi in PBS. Centrifugare ancora per 15 min a 1600 rpm. Rimuovere il sovranatante, prendere la quantità di pellet di globuli rossi necessaria per il test e risospendere in PBS fino ad arrivare ad una concentrazione di 10-13%.
  La percentuale di RBCs dipende dal tipo di animale usato nel test.
- **Soluzione di Complemento di Guinea Pig:** reidratare il complemento liofilizzato con 1 ml di acqua distillata.

2.3 Metodica SRH

2.3.1 Titolazione del virus

Come prima cosa è necessario effettuare la titolazione, mediante macrometodo, dell'antigene virale (Ag) da utilizzare durante il saggio, in modo da valutare la sua capacità emoagglutinante. Questo metodo si basa proprio sulla capacità dei globuli rossi di emoagglutinare in presenza del virus influenzale, il quale infatti, si lega ai recettori di acido sialico presenti sulla superficie dei globuli rossi, con conseguente emoagglutinazione.

Preparare 4 file da 15 tubi e trasferirvi 250µl di soluzione fisiologica (ad eccezione del primo tubo di ogni fila)

Preparare due diluizioni in base 10 (1/10 e 1/100) di Ag e trasferire 500 µl di Ag diluito 1/10 nel primo tubo delle prime due file, così da poter fare una valutazione in doppio.

Quindi trasferire 250 µl del contenuto del primo tubo di ciascuna fila al secondo tubo, e così via fino all'ultimo tubo di ciascuna fila, scartando i 250 µl avanzati dal quindicesimo tubo.

Seguire la stessa procedura anche per l'Ag diluito 1/100.
Aggiungere 250 μl della soluzione di globuli rossi di tacchino allo 0,35% in ciascun tubo.
Lasciare incubare a temperatura ambiente per 1 ora.
Allestire dunque i tubi per il controllo qualità del test: per il controllo positivo, preparare 4 tubi, contenenti l'Ag non diluito con lo stesso volume di eritrociti; per il controllo negativo preparare sempre 4 tubi ma stavolta contenenti solo globuli rossi e soluzione fisiologica, in ugual volume.
Il test di titolazione si considera valido solo se il controllo positivo presenta totale emoagglutinazione, altrimenti significa che la sospensione virale non è sufficientemente concentrata.
Per trovare il titolo emoagglutinante dell'antigene virale calcolare la media geometrica del logaritmo dell'inverso della diluizione dell'ultimo tubo in cui è ancora visibile ad occhio nudo la presenza di emoagglutinazione sia per la diluizione 1:10 che 1:100. Utilizzare il valore ottenuto come esponente di 10 e corrisponde al titolo dell'antigene virale.
A questo punto, dopo aver trovato il titolo dell'antigene da utilizzare, si può calcolare la diluizione da eseguire in modo da utilizzare il virus con un titolo di 2000 HAU/ml durante il saggio SRH.
Infatti, per ottenere 2000 HAU/ml si deve moltiplicare il titolo ottenuto in 250 μl per 4 (per averlo in ml) e poi si deve dividere per 2000. Il valore ottenuto è il reciproco della diluizione dell'Ag iniziale da utilizzare per il saggio SRH.

2.3.2 Saggio SRH

La prova è eseguita su piastre di polistirene compresso di dimensioni 70 x 22 mm e volume 3 cc (Figura20).
Prima di iniziare il test si deve procedere alla inattivazione del complemento presente nei sieri da testare incubandoli a 56 °C per 30 minuti.
Per ogni piastra sono necessari:

- 0,3 ml di sospensione di globuli rossi al 10-13%
- 2,55 ml di 1.5% di Agarosio contenente 0.1% di Sodium Azide
- 0,3 ml di CrCl3 2.5mM
- 0,15 ml di complemento di Guinea Pig

Ciascuna piastra può contenere al massimo 20 pozzetti. I controlli positivo e negativo sono in genere posizionati negli ultimi due pozzetti in basso a destra.
Mixare 0.3 ml di RBCs alla concentrazione di 10-13% con 0.3 ml di antigene virale inattivato diluito con PBS in modo tale da avere una concentrazione di 2000 unità di emoagglutinina/ml.
Incubare a +2/+8 °C per 20 minuti

Aggiungere 0.3 ml di soluzione di $CrCl_3$ 2,5 mM al fine di aumentare l'affinità di legame tra gli eritrociti e l'antigene.

Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente

Centrifugare a 1600 rpm per 15 minuti

Rimuovere il sovranatante e risospendere il pellet con PBS in base alla seguente formula:

vol. di globuli rossi sol. – (vol. di globuli rossi sol. X conc. di globuli rossi sol.)

Durante l'incubazione del mix antigene-RBCs, preparare il gel all'1.5% di Agarosio contenente 0.1% di Sodium Azide

Mantenere in bagno termostatato a 47.5 C°

Aggiungere il complemento di Guinea Pig al gel di agarosio.

Versare 3 ml di sospensione in ogni piastra.

Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente e poi per 30 minuti a +2 +8 °C per favorire la polimerizzazione del gel

Praticare dei fori di 2.256 mm di diametro con un punzone calibrato

Seminare 6 µl di siero in ciascun pozzetto

In ogni piastra seminare 6 µl di un antisiero standard completamente privo di anticorpi IgG/IgA/IgM (controllo negativo) e 6 µl di un siero di pecora iperimmune con un titolo di anticorpi diretti verso lo strain virale preso in esame considerato estremamente alto (controllo positivo)

Incubare ogni piastra per 16-18 ore a +2 +8°C

Incubare ogni piastra in bagno termostatato per 90 minuti a 37°C

Leggere il diametro degli aloni di emolisi in mm usando il visualizzatore di calibratura **(Trombetta et al., 2015)**.

Gli eventuali anticorpi anti influenzali presenti nel campione si legano all'antigene adsorbito ai globuli rossi, attivando la reazione a cascata del complemento che emolizza l'eritrocita dando così origine ad un alone più chiaro nella piastra.

Le dimensioni delle zone di emolisi intorno a ciascun pozzetto sono proporzionali alla quantità di anticorpi contenuti nei campioni **(Schild et al., 1975)**.

Dopo la lettura di ogni singola piastra, il diametro degli aloni di emolisi, in mm, è trasformato in area attraverso un foglio di calcolo digitale.

Ogni piastra è letta da due operatori diversi in momenti diversi, al fine di ridurre l'eventuale errore dovuto alla soggettività dell'operatore.

Inoltre il saggio SRH viene svolto in duplicato e i sieri pre e post vaccinazione testati in contemporanea, come previsto dalle Guidelines della CPMP **(CPMP/BWP/214/96).**

2.3.3 Controllo qualità

È bene ricordare che prima di procedere con la lettura dei risultati e la loro interpretazione, é necessario osservare i pozzetti di controllo.
Infatti, nel pozzetto in cui è stato seminato il controllo positivo si deve leggere un alone di emolisi superiore a 25mm², mentre nel pozzetto in cui è stato seminato il controllo negativo non si deve osservare alcun alone di emolisi.
In accordo con le Guidelines indicate dall'EMA:

- Sono da considerarsi negativi tutti i soggetti che non presentano alcun alone di emolisi o comunque con area di emolisi < 4 mm^2
- Sono da considerarsi positivi, ma non protetti, tutti i soggetti con area di emolisi compresa tra 4 mm^2 e 25 mm^2
- Sono da considerarsi sia positivi e che protetti, i pazienti con area di emolisi ≥ 25 $mm^{2.}$.

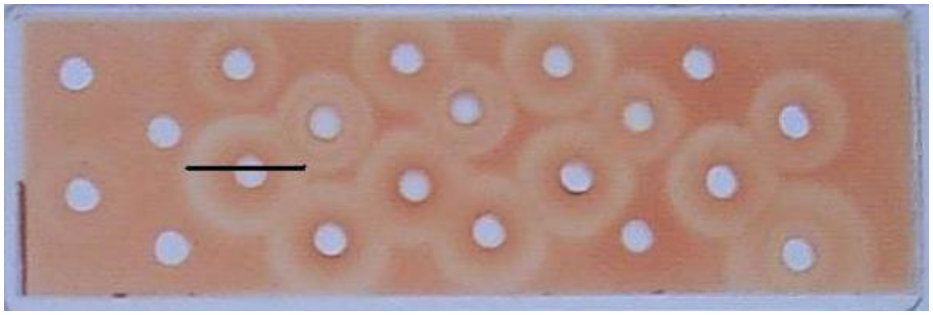

Fig. 20: Esempio di piastra SRH: la foto evidenzia la presenza di aloni di emolisi intorno ai pozzetti positivi e zone prive di aloni di emolisi che rappresentano i pozzetti negativi.

3. Hemagglutination inhibition

3.1 Materie prime e reagenti

- Antigene: A/H5N1/Indonesia/05/2005 (dal NIBSC)
- Globuli rossi di tacchino 50% in Alsever

- RDE (Receptor Destroying Enzyme) di Vibrio Cholerae
- Sodio Citrato Tribasico
- Soluzione Fisiologica
- Campioni di siero da testare per A/H5N1/Indonesia/05/2005

3.2 Preparazione delle soluzioni

- **Soluzione fisiologica allo 0,9%:** per ogni litro di acqua distillata aggiungere 9g di Cloruro di Sodio al fine di ottenere una soluzione allo 0.9%. Autoclavare per 21 minuti a 121°C.
- **Sospensione di globuli rossi allo 0,35%:** centrifugare 5ml di globuli rossi al 50% in Alsever per 15 minuti a 1600 rpm. Eliminare il sovranatante e risospendere i globuli rossi con soluzione fisiologica sterile. Centrifugare nuovamente per 15 minuti a 1600 rpm. Togliere il sopranatante, e prelevare la quantità necessaria di globuli rossi per eseguire la prova. Infine, risospendere in soluzione fisiologica sterile in modo da avere una concentrazione finale di globuli rossi dello 0,35% (es. 350µl di globuli rossi in 100 ml di soluzione fisiologica).
- **Ricostituzione del liofilizzato RDE:** ricostituire il liofilizzato con acqua sterile, in base alle indicazioni del fornitore.
- **Soluzione Sodio Citrato all' 8%:** aggiungere 80g di Citrato di Sodio per ogni litro di acqua distillata. Sterilizzare la soluzione in autoclave per 20 minuti a 121°C.
- **Preparazione dei sieri:** aggiungere 5 parti di RDE a ciascun volume di siero (es. 40µl di siero + 200µl di RDE) e incubare a bagnomaria overnight a 37 °C.

Successivamente addizionare 4 parti di Citrato di Sodio ad ogni volume di siero (es. 40µl di siero + 160µl di Citrato di Sodio).
Incubare nuovamente i sieri a bagnomaria a 56 °C per 1 ora.
Lo stesso trattamento viene effettuato per il controllo negativo e per il controllo positivo utilizzati nel test.

3.3 Rilevazione di agglutinine aspecifiche nei sieri

Le agglutinine aspecifiche eventualmente presenti in un campione di siero possono provocare l'agglutinazione dei globuli rossi interferendo con i risultati del test.
Quindi, al fine di rimuovere le agglutinine aspecifiche, i sieri trattati sono assorbiti con globuli rossi di tacchino, in questo modo:

Aggiungere a 20 volumi di sieri trattati con RDE, un volume di eritrociti concentrati
Mescolare bene e incubare a 4 °C per 1 ora.
Centrifugare per 10 minuti a 1200 rpm.
Infine rimuovere il siero assorbito prestando molta attenzione.
Per permettere dunque di rilevare la presenza di eventuali agglutinine aspecifiche, aggiungere 50µl di ciascun siero assorbito nel 1 primo pozzetto della piastra di microtitolazione. Aggiungere poi 25µl di soluzione fisiologica dal secondo pozzetto fino all'ultimo.

Effettuare quindi delle diluizioni scalari, utilizzando una pipetta multicanale, di 25µl di siero dal primo pozzetto fino all'ultimo.
Terminata l'operazione, aggiungere 25µl di soluzione fisiologica in tutte le piastre.
Aggiungere poi in ogni piastra 50µl di globuli rossi e agitare manualmente.
Procedere con l'incubazione per 30 minuti.
Infine procedere con la lettura dei risultati: se si verifica l'agglutinazione dei globuli rossi, potrebbero essere presenti delle agglutinine aspecifiche nel campione e quindi risulta necessario procedere con un nuovo assorbimento del siero con globuli rossi **(WHO, 2011).**

3.4 Metodica HI

3.4.1 Titolazione del virus mediante micrometodo

Come nell'SRH, anche nell'HI, come prima cosa, bisogna titolare il virus in esame in modo da osservarne le capacità emoagglutinanti. Bisognerà quindi determinare, ad occhio nudo, la presenza o meno di aggregati derivanti dall'agglutinazione tra i globuli rossi e l'antigene virale.
Il metodo di titolazione utilizzato in questo caso è un micrometodo, eseguito in piastre di polistirene a 96 pozzetti e fondo a "V".
Preparare due diluizioni in base 10 (1/100 e 1/1000) di antigene virale: da una provetta contenente 100µl di antigene e 900µl di soluzione fisiologica (diluizione 1/10) prelevare 100µl trasferirli in una seconda provetta, contenente già 900µl di soluzione fisiologica (diluizione 1/100).
Ripetere l'operazione trasferendo 100µl di soluzione 1/100 in una terza provetta contenente già 900µl di fisiologica (diluizione 1/1000).
Procedere con l'allestimento delle piastre: trasferire 50µl di soluzione fisiologica in ciascun pozzetto, tranne nel primo pozzetto della prima e della seconda fila (dove verranno aggiunti 100µl di antigene diluito 1/100) e nel primo pozzetto della terza e della quarta fila (dove verranno trasferiti 100µl di antigene diluito 1/1000)

Con l'utilizzo di una pipetta multicanale procedere con una diluizione scalare trasferendo ogni volta 50µl (partendo dai pozzetti della prima fila e trasferendoli verso quelli della seconda e così via fino all'ultima, scartando ovviamente i 50µl che avanzano da quest'ultima).
Infine aggiungere 50µl di globuli rossi di tacchino allo 0,35% in ogni pozzetto.
Lasciare incubare a temperatura ambiente per 30 minuti
Il virus impiegato nel saggio HI deve avere un titolo di 4UEA/25µl; per calcolare a quanto corrisponde il valore si divide per 8 il titolo dell'Ag trovato attraverso il micrometodo.
Il valore ottenuto costituisce il reciproco della diluizione dell'Ag da utilizzare per il saggio HI.

3.4.2 Prova delle 4 unità

Prima di effettuare il saggio HI è necessario verificare che l'Ag sia stato diluito correttamente; per far questo si procede con la prova delle 4 unità, che viene svolta in quadruplo, su piastre di polistirene da 96 pozzetti e fondo a "V".
Aggiungere nel primo pozzetto 100µl di antigene diluito in base ai risultati ottenuti attraverso la titolazione con il micrometodo.
Dal secondo al sesto pozzetto aggiungere 50µl di soluzione fisiologica.
Procedere con le diluizioni scalari dell'antigene trasferendo ogni volta 50µl a partire dal primo pozzetto e procedendo verso il secondo e così via fino al sesto.
Aggiungere 50µl di globuli rossi di tacchino allo 0,35%
Incubare la piastra per 1 ora a temperatura ambiente.
Come controllo qualità della piastra, allestire anche alcuni pozzetti con 50µl di soluzione fisiologica e 50µl di globuli rossi per il controllo negativo.
Trascorso il tempo di incubazione procedere con la lettura della piastra: se nei primi 4 pozzetti della piastra (che contengono rispettivamente 8, 4, 2, e 1 UEA/50µl) è presente emoagglutinazione, allora la diluizione dell'antigene è stata eseguita correttamente. In caso contrario deve essere ripetuto il calcolo del titolo apportando le dovute modifiche.

3.4.3 Saggio HI

Anche per il test HI sono utilizzate piastre in polistirene a 96 pozzetti e fondo a "V"
Ogni siero viene testato su una fila di 8 pozzetti
Aggiungere nel primo pozzetto di ogni fila 50µl di siero, mentre dal secondo all'ottavo pozzetto disporre 25µl di soluzione fisiologica.
Effettuare le diluizioni scalari del siero trasferendo, con una pipetta multicanale, 25µl di siero dal primo all'ottavo pozzetto.

In ogni pozzetto inoculare 25µl di antigene e lasciare incubare la piastra per 1 ora a temperatura ambiente.

Trascorsi 60 minuti, aggiungere in ogni pozzetto 50µl di globuli rossi di tacchino allo 0,35% e lasciare nuovamente le piastre ad incubare per 1 ora a temperatura ambiente.

Infine leggere i risultati: il reciproco della diluizione di siero più alta in cui è ancora completamente inibita l'agglutinazione rappresenta il titolo HI del siero testato.

Per un controllo qualità interno devono essere allestiti 4 pozzetti con 25µl di soluzione fisiologica, 25µl di antigene e 50µl di globuli rossi (controllo positivo) e 4 pozzetti con solamente 50µl di soluzione fisiologica e 50µl di globuli rossi (controllo negativo)

In ogni piastra inoltre, sempre per il controllo qualità, devono essere sempre presenti:

- Un controllo positivo, costituito da una fila di 8 pozzetti dove viene testato un siero iperimmune di pecora standardizzato con un titolo anticorpale specifico per il ceppo in esame estremamente elevato
- Un controllo negativo, costituito invece da una fila di 8 pozzetti allestiti per testare un siero standardizzato con totale assenza di IgG, IgM ed IgA.

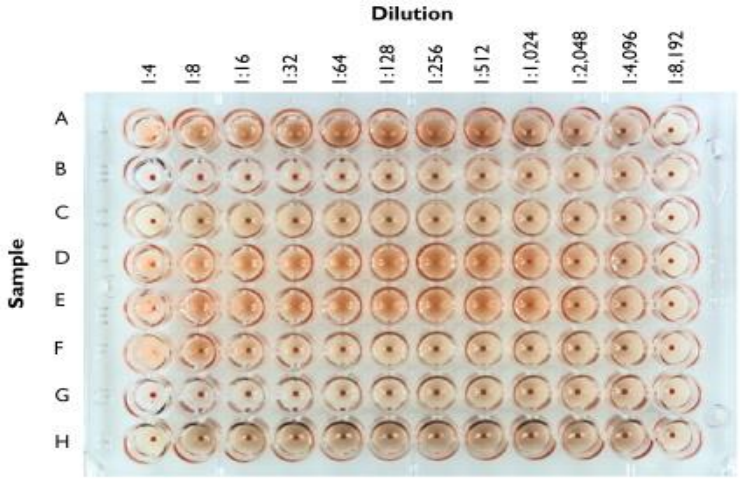

Fig. 21: Esempio di una piastra HI. Notare come nella fila B, ci sia totale assenza di emoagglutinazione, mentre nella fila A è presente fin dal primo pozzetto. Sorgente: http://www.virology.ws/2009/05/27/influenza-hemagglutination-inhibition-assay.

Il test HI è considerato accettabile solo se:

1. I pozzetti contenenti Ag specifico, soluzione fisiologica e globuli rossi (controllo positivo) presentano emoagglutinazione.
2. I pozzetti contenenti solo globuli rossi e soluzione fisiologica (controllo negativo) non presentano emoagglutinazione.
3. Il siero standardizzato con titolo anticorpale assente presenta emoagglutinazione sin dal primo pozzetto
4. Il siero standardizzato iperimmune di pecora con alto titolo anticorpale specifico per l'antigene in esame ha un titolo superiore a 1/40.
5. I pozzetti relativi ad uno stesso siero, testato più volte, non differiscono per oltre 2 valori di diluizione.

Per concludere, il cut-off universalmente riconosciuto al di sopra del quale un soggetto si considera sieroprotetto è titolo HI $\geq$ 40.

4. Micro Neutralizzazione (MN)

4.1 Preparazione della sospensione di cellule VERO

Per il saggio di MN è necessaria una sospensione cellulare costituita da cellule VERO ad una concentrazione di 2 x 10^5 cellule/ml sospese in medium specifico per la crescita cellulare.
La preparativa è ottenuta partendo da fiasche da 175 cm^3 contenenti un monostrato cellulare con una confluenza intorno al 70-80%; se la confluenza è adeguata si può procedere alla preparazione della sospensione cellulare come previsto dal protocollo.
Dispensare 100 µl di sospensione cellulare in ciascun pozzetto all'interno di una piastra da microtitolazione di polistirene a 96 pozzetti e fondo piatto.
Incubare le piastre per 16-30 ore a 36+/-2 ° C e 5 +/-1% di CO_2.

4.2 Titolazione del ceppo virale

Nel trial clinico oggetto di questa tesi, la sospensione virale utilizzata è stata ordinata presso il NIBSC.
Il titolo iniziale della sospensione virale viene valutato tramite la metodica del Tissue Culture Infective Dose (TCID50) su cellule VERO, il quale permette di calcolare la più alta diluizione dell'antigene virale che provoca effetto citopatico nel 50% delle colture cellulari, ed è indicato come TCID50/ml.

Per effettuare la titolazione del virus in esame, eseguire delle diluizioni seriali in base 10 del virus con la soluzione di medium all'interno di micropiastre di polistirene a 96 pozzetti a fondo piatto.
Lasciare incubare con 100 µl di sospensione cellulare VERO ad una concentrazione di 2 x 105 cells/ml
Dopo 5 giorni leggere il risultato mediante l'utilizzo di un microscopio ottico **(Wood et al., 1994):** per il calcolo si considera la più alta diluizione del virus che è ancora in grado di indurre un effetto citopatico nelle cellule.
A questo punto per calcolare esattamente il titolo virale si ricorre ad uno specifico software informatico che si basa sull'applicazione della formula di Spearman/Karber **(Spearman, 1909; Finney,1964)**

$$X0-d(1/2)+d(N/R)$$

Dove:

- X0: logaritmo positivo della più alta diluizione del virus in cui si ha un effetto citopatico
- d: step diluizione in scala logaritmica (base 10)
- N: la somma di tutte i pozzetti che presentano un effetto citopatico dall'ultima colonna completamente infetta (compresa)
- R: numero di ripetizioni per diluizioni

4.3 Saggio di Micro Neutralizzazione

Ciascun campione di siero viene testato in 8 ripetizioni in doppio utilizzando i *megablock* (volume 2,2 ml) e per ciascuna prova viene aggiunto ed un controllo negativo (siero umano privo di IgG, IgA e IgM e) e un controllo positivo (siero iperimmune di pecora immunizzata con ceppo influenzale A/H5N1/Indonesia/05/05).
Per ogni siero da testare eseguire le diluizioni seriali 1:2, partendo da una diluizione di 1:80 per il controllo positivo e di 1:5 per i sieri e il controllo negativo.
Una volta eseguite le diluizioni, preparare la sospensione virale da utilizzare nel saggio diluendo lo stock iniziale.
Aggiungere la sospensione virale ai sieri diluiti, mantenendo il rapporto 1:1 (500µl).
Incubare la mix siero-virus a 37°C per 1 ora.
Trasferire quindi la mix siero-virus dal megablock alla piastra di microtitolazione a 96 pozzetti contenente il subconfluente /confluente monostrato cellulare seminato il giorno precedente.

In ogni piastra è previsto un controllo cellulare che serve a monitorare che la crescita cellulare in assenza di virus sia corretta, e che la piastra non venga contaminata.

Contemporaneamente all'esecuzione del saggio MN, viene eseguita anche una titolazione del virus diluito immediatamente dopo lo scongelamento e un'ulteriore titolazione dello stesso virus dopo 1 ora dallo scongelamento, in modo tale da essere certi che il titolo virale non cambi durante la durata del test e che sia lo stesso per tutte i sieri da analizzare.

Incubare le piastre da micro titolazione a 96 pozzetti per 5 giorni a 36 +/- 2 ° C e 5 +/- 1% di CO_2 **(Wood et al., 1994).**

Al termine del periodo di incubazione, osservare ciascun pozzetto della piastra di microtitolazione al microscopio ottico per constatare la presenza o meno di effetto citopatico (CPE) nel monostrato cellulare.

I risultati sono così registrati:

• Un risultato positivo cioè un "CPE" è contrassegnato con il simbolo (+).

• Un risultato negativo, ovvero l'assenza di "CPE", è contrassegnato con il simbolo (-).

Il titolo di neutralizzazione (NT) viene calcolato secondo la formula di Spearman-Karber **(Spearman, 1909; Finney,1964)**

$$X = \frac{V}{2} \cdot 2^{(\frac{Nneg}{R}+0,5)}$$

Dove:

X = titolo di neutralizzazione

V = diluizione di partenza del siero nel test (diluizione del siero + sospensione virale nel rapporto 1: 1)

Nneg = numero di risultati negativi su una piastra

R= numero di ripetizioni

Il NT viene definito come la diluizione del siero per mezzo del quale il 50% dei pozzetti sono protetti contro un effetto citopatico virale (CPE) (Figura22).

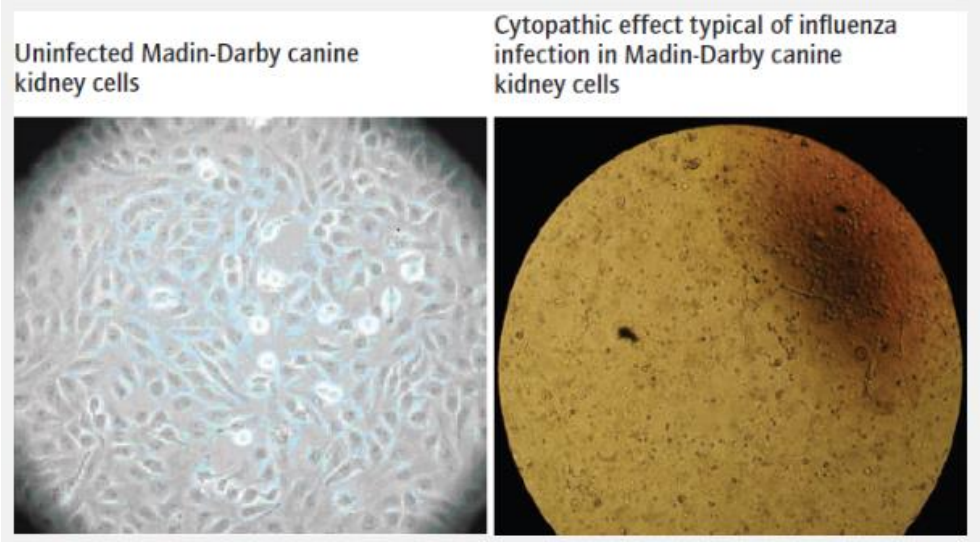

Fig.22: Differenze tra un monostrato di cellule MDCK con e senza effetto citopatico dovuto a infezione da virus influenzale. Sorgente: www.WHO.int

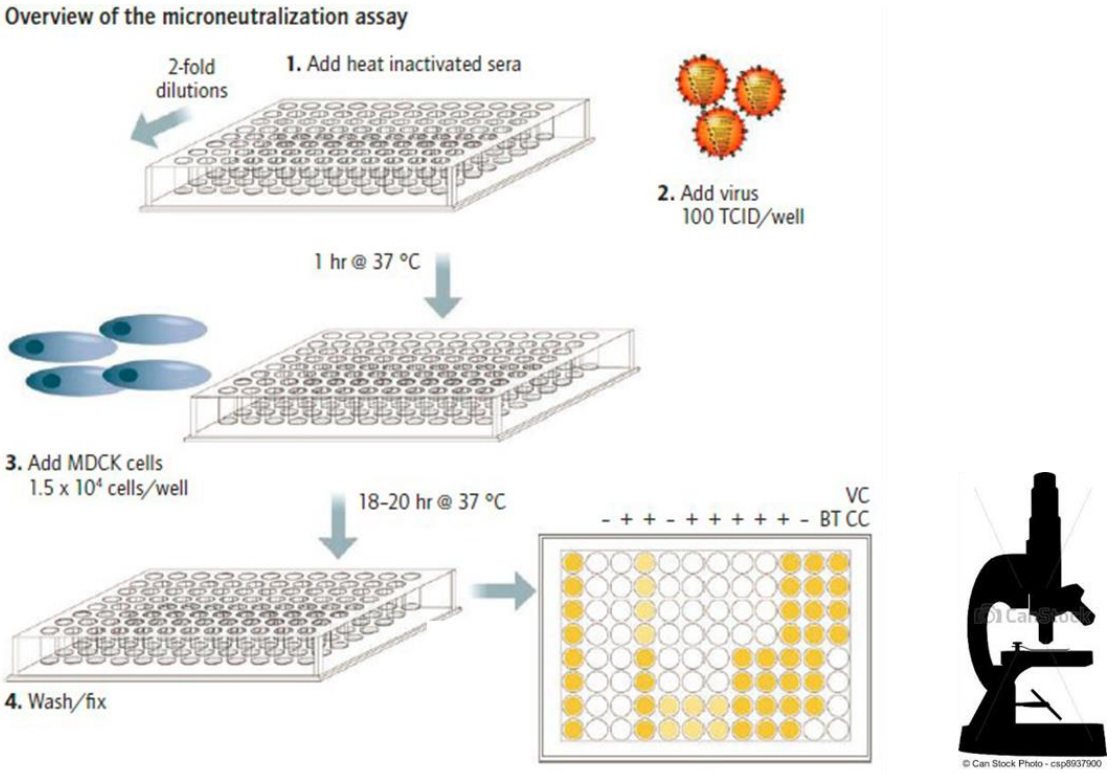

Fig.25: Rappresentazione schematica del test di micro neutralizzazione.

5. Analisi Statistiche

Tutti i dati sono stati analizzati mediante GraphPad Prism versione 5.0 dopo essere stati trasformati in fase logaritmica (Log). Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per comparazioni multiple all'interno dei tre gruppi. Il test di Frieman è stato utilizzato per comparare i dati pre- e post vaccino all'interno di ogni test sierologico. Le correlazioni tra i diversi saggi sono state analizzate mediante il test di Spearman (Spearman rank test). Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato come statisticamente significativo.

Risultati

Vaccino Intramuscolare

Tutti i 540 campioni di siero (180 soggetti in 3 diverse visite) sono stati titolati mediante il test sierologico HI, SRH e MN allo scopo di valutare la presenza di anticorpi specifici contro l'HA virale. Tutti i test sono stati eseguiti rigorosamente in cieco, senza quindi poter essere a conoscenza né di come è stata organizzata la suddivisione delle coorti né del numero della visita. La valutazione ed elaborazione statistica dei risultati è stata possibile solo in un secondo momento mediante accordo con l'ente responsabile dello studio clinico.

Dall'analisi statistica dei risultati è stato riscontrato un aumento significativo ($p < 0.0001$) dei titoli anticorpali contro l'emagglutinina virale dopo la somministrazione di due dosi di vaccino intramuscolare in tutte e tre le metodiche utilizzate in questo studio (HI, SRH e MN) (Figura 26); una singola dose, infatti non sembra in grado di elicitare una risposta anticorpale significativa. Tale incremento è stato valutato considerando tutte le coorti nella loro totalità. Dai risultati ottenuti la percentuali di sieronegativi pre-vaccino è risultata essere del 90%, 85.5% e 100% rispettivamente per le metodiche di SRH, HI e MN. Dopo la prima e la seconda dose di vaccino le percentuali di sieronegativi risultano essere diminuite per tutti i test serologici (49,5%-3,33% SRH, 77,2%,37.7% HI e 78,3%-10% MN).

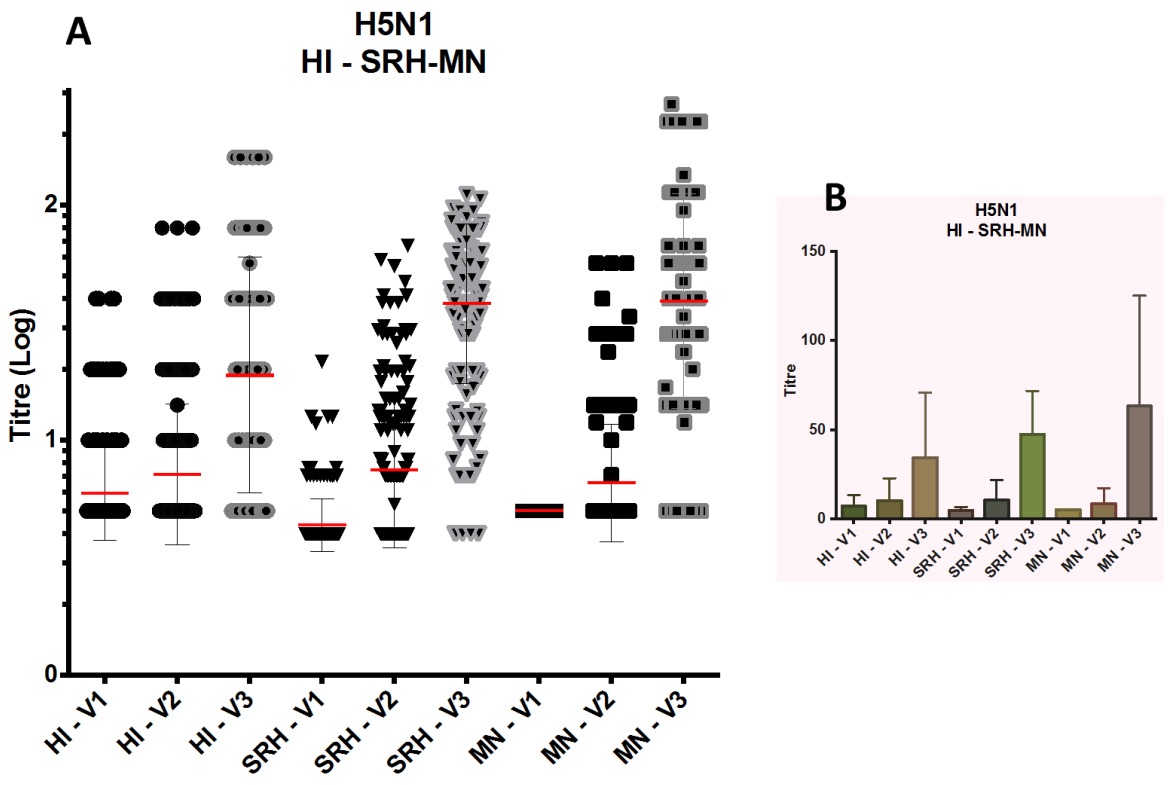

Fig 26: (A) Grafico raffigurante i risultati per ciascuno dei 180 soggetti suddivisi per visita e metodica sierologica utilizzata. I titoli sono stati trasformati in valori logaritmici (Log) per essere meglio analizzati e distribuiti nel grafico sopra riportato. **(B)** Istogramma raffigurante l'andamento delle tre visite nei tre diversi test sierologici utilizzati, in questa raffigurazione è più facile cogliere il progressivo aumento del titolo anticorpale.

Risultati HI: 30 e 60 µg di HA/dose inducono una risposta elevata

Tutti e tre i criteri CHMP, utilizzati per valutare l'efficacia della risposta anticorpale a seguito della vaccinazione influenzale, e che devono necessariamente essere raggiunti per poter licenziare un nuovo vaccino influenzale pandemico, risultano ampiamente superati solo per le coorti immunizzate con vaccino intramuscolare contenente 30 e 60 µg di HA (Figura 27). Tuttavia, in entrambi i casi, la risposta anticorpale ha raggiunto e superato la soglia di validità solo a seguito della seconda dose di vaccino, risultando così indispensabile al fine di incrementare significativamente tale risposta. Viceversa, la dose da 5 µg di HA risulta quasi del tutto inefficace per il raggiungimento delle soglie di validità, fatta eccezione per l'incremento geometrico medio del titolo, il quale in HI risulta soddisfatto dopo la seconda dose di vaccino. Le dosi di 10 e 15 µg di HA risultano mediamente in grado di dare una buona risposta anticorpale, ad eccezione del criterio di siero protezione, il quale

rimane ampiamente al di sotto della soglia di validità (70%) anche dopo la seconda somministrazione di vaccino.

La percentuale relativamente alta di titoli anticorpali sopra il limite di rilevabilità, considerando che si tratta di un vaccino pandemico aviario, può essere spiegato considerando l'età dei soggetti arruolati nel presente studio clinico. È stato dimostrato infatti, che una popolazione più matura dal punto di vista immunologico (rispetto ai lattanti e bambini) presenti un'elevata percentuale di anticorpi in grado di cross-reagire, anche se in minima parte, con componenti aspecifiche dell'HA virale, andando ad inibire la reazione di emoagglutinazione. Questa può essere dovuta a marginali similitudini tra la HA di virus stagionali di tipo A ed il virus H5N1/Indonesia/05/2005 (Veguilla et al., 2011)

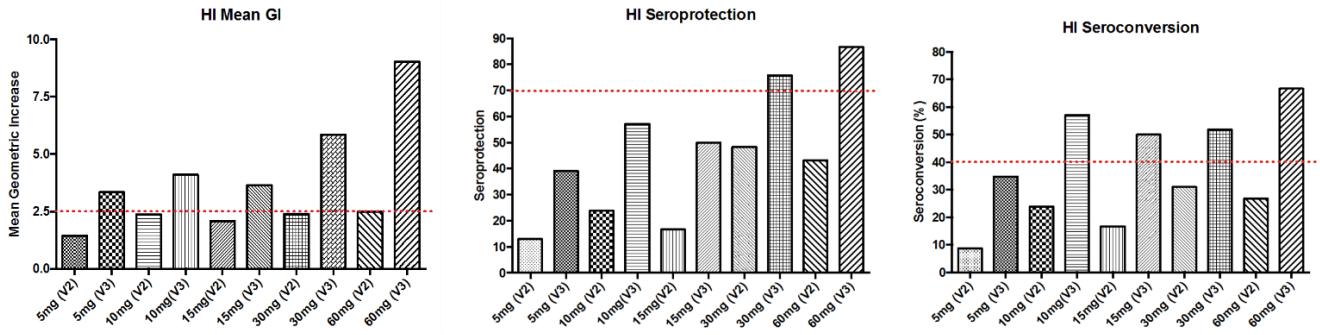

Fig. 27: I tre criteri CHMP analizzati mediante i risultati ottenuti con la metodica di HI; solo le coorti immunizzate con vaccino contenente 30 e 60 µg di HA/dose sono in grado di soddisfare tutti e tre i criteri CHMP. *Mean GI* = Incremento geometrico medio, rappresentato dalla ratio tra i titoli pre e post vaccino; *Seroprotection Rate*= proporzione di soggetti che raggiungono un titolo HI ≥ 40; *Seroconversion rate*= almeno 4 volte l'incremento del titolo di partenza.

Risultati SRH: solo la dose da 60 µg/ dose di HA è in grado si indurre una risposta anticorpale soddisfacente

I 540 campioni di siero sono stati valutati anche mediante il test SRH, al fine di valutare la presenza di anticorpi IgG1 e IgG3, ovvero gli anticorpi maggiormente coinvolti nella reazione di fissazione del complemento.

Dall'analisi dei risultati si nota un andamento estremamente simile a quello riscontrato nella metodica HI, dove solo le dosi contenenti 30 e 60 µg di HA sembrano dare risultati soddisfacenti, superando le soglie di protezione (Figura 28). In questo caso solo la dose contenete 60 µg HA risulta in grado di dare una risposta sierica che supera tutti e tre i criteri di accettabilità; il criterio di siero-protezione a 30 µg HA infatti non riesce a raggiungere tale soglia, seppur per una piccola percentuale di soggetti.

Dall'analisi dei risultati SRH si evince ancora più chiaramente che la seconda dose di vaccino risulta necessaria per elicitare una risposta anticorpale sufficiente; infatti, dopo una sola somministrazione abbiamo per tutti e tre i criteri una risposta minima o nulla (*Seroprotection e seroconversion*).

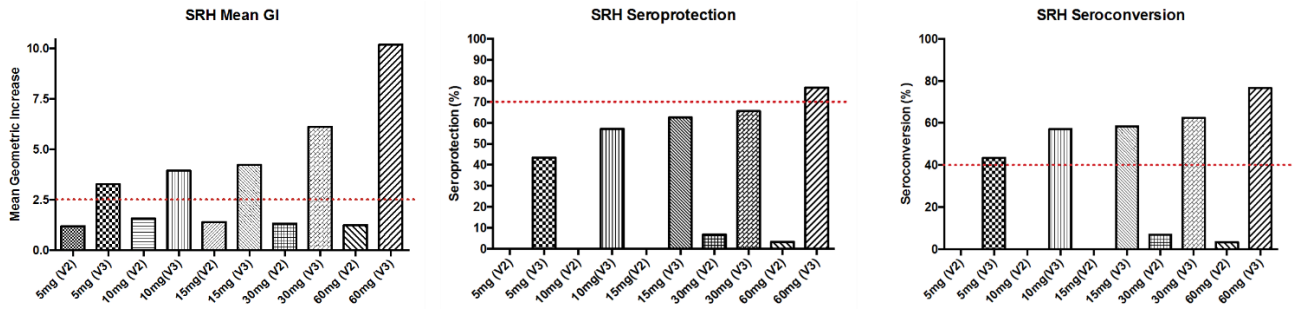

Fig. 28: I tre criteri CHMP analizzati mediante i risultati ottenuti con la metodica SRH; solo la coorte immunizzata con vaccino contenente 60 µg HA/dose è in grado di soddisfare tutti e tre i criteri CHMP. *Mean GI* = Incremento geometrico medio, rappresentato dalla ratio tra i titoli pre e post vaccino; *Seroprotection Rate*= proporzione di soggetti che raggiungono un'area di emolisi in SRH ≥25mm^2; *Seroconversion rate*= almeno 4 volte l'incremento del titolo (area) di partenza.

Risultati MN: livelli anticorpali mediamente più bassi

I risultati ottenuti con il test di micro neutralizzazione confermano l'andamento già rilevato con la metodica SRH, nonostante i livelli anticorpali rilevati risultino quantitativamente più bassi. Tali risultati sono comunque in linea con le nostre aspettative, in quanto l'MN rileva solo gli anticorpi IgG1 funzionali.

Anche in seguito a questo test appare chiaro che è indispensabile somministrare una seconda dose di vaccino in modo da elicitare una concentrazione di anticorpi sierici statisticamente significativa per tutte le coorti; anche se solo la dose contenente 60 µg di HA risulta in grado di soddisfare tutti e tre i criteri CHMP. A questo punto è doverosa una precisazione concernente la metodica di micro neutralizzazione. I criteri CHMP sono stati messi a punto e validati solo per HI e SRH, in quanto per l'MN non sono ancora stati stabiliti dei correlati di protezione. Generalmente l'unico criterio universalmente riconosciuto valido per l'MN è un incremento del titolo iniziale di almeno 4 volte (*4-fold increase*). I criteri CHMP sono stati dunque adattati al presente test di MN in maniera soggettiva in modo da avere almeno un punto di comparazione, ma senza che tali soglie siano state validate da enti quali EMEA o FDA.

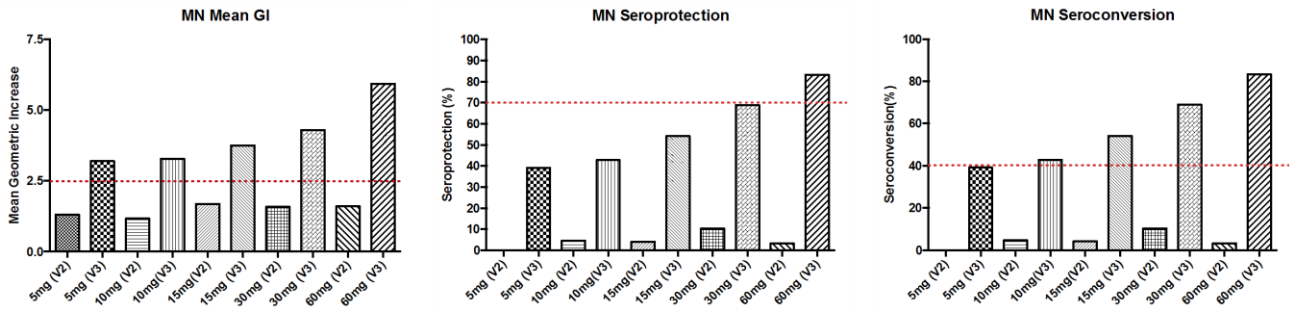

Fig. 29: I tre criteri CHMP attribuiti soggettivamente alla metodica MN; solo la coorte immunizzata con vaccino contenente 60 µg HA/dose è in grado di soddisfare tutti e tre i criteri CHMP.

Correlazioni

Allo scopo di valutare se i risultati ottenuti attraverso le tre metodiche HI, SRH ed MN correlano più o meno positivamente tra di loro, è stata effettuata un'analisi di regressione lineare su tutti i titoli medi geometrici delle visite 3. Sono state scelte le visite 3 in quanto le visite 1 e 2 presentavano troppi campioni negativi rischiando di falsare l'analisi. Il test di Pearson è stato utilizzato per valutare la bontà di tale correlazione (Figura 30). Il coefficiente di Pearson (*R*) risulta essere 0.7657, 0.7334 e 0.6557 rispettivamente per MN vs SRH, SRH vs HI e MN vs HI. Tutti e tre i risultati ottenuti indicano una positiva e buona correlazione, specialmente per le metodiche SRH ed MN. La più bassa correlazione, seppur ampiamente positiva, risulta essere tra la metodica MN ed HI.

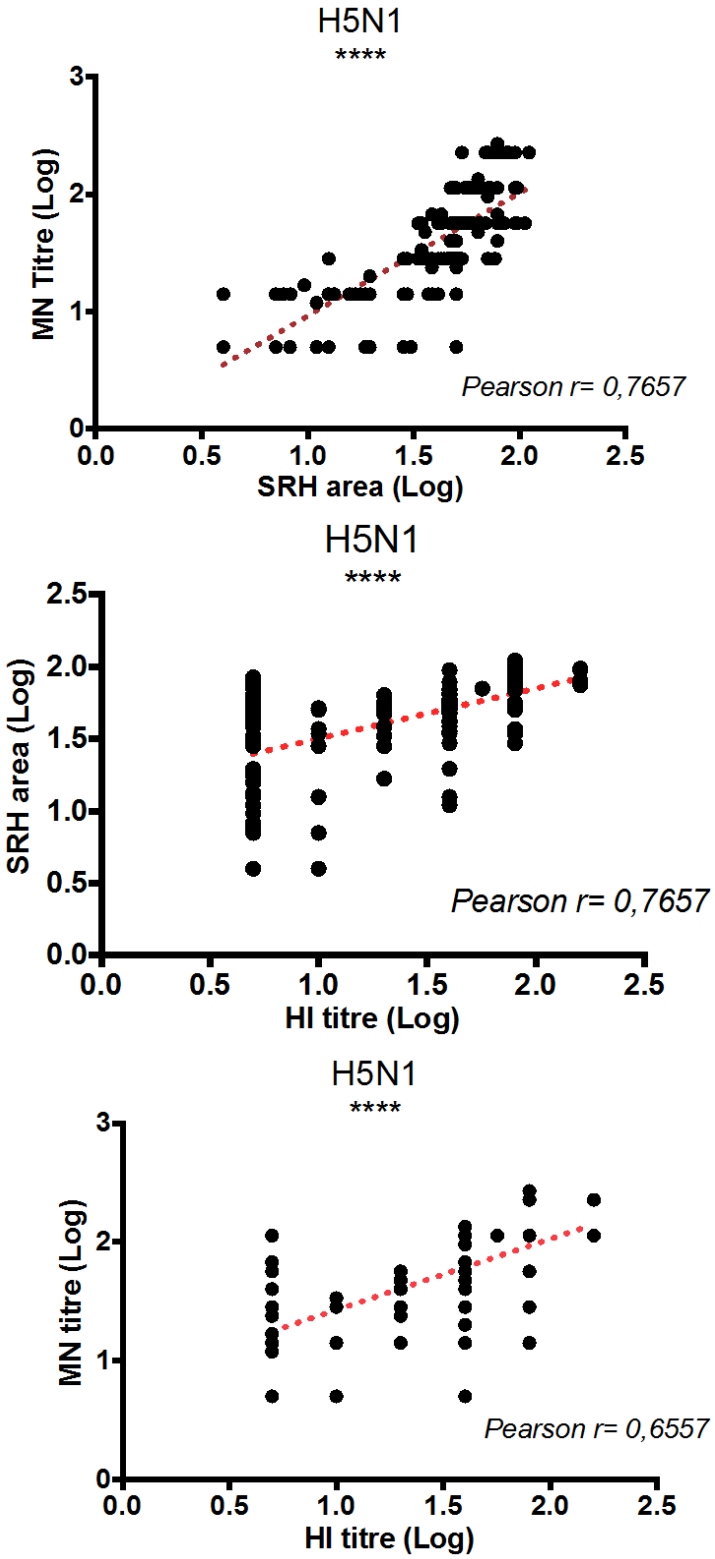

Fig. 30: Analisi di regressione lineare di MN vs SRH, SRH vs HI e MN vs HI dei titoli medi dopo trasformazione logaritmica in base 10.

Vaccino Intradermico

Tutti i 180 campioni di siero (60 soggetti in 3 diverse visite a cui è stato somministrato un vaccino intradermico contenente 15 µg HA/dose) sono stati titolati mediante i test sierologici HI ed SRH allo

scopo di valutare la presenza di anticorpi specifici contro l'HA virale. Tutti i test sono stati eseguiti rigorosamente in cieco. La valutazione ed elaborazione statistica dei risultati è stata possibile solo in un secondo momento in seguito ad accordo con l'ente responsabile dello studio clinico.

Dall'analisi statistica dei risultati è stato riscontrato un aumento significativo ($p < 0.001$ *e* $p < 0.0001$) nei titoli anticorpali contro l'emagglutinina virale dopo due dosi di vaccino intradermico in entrambe le metodiche utilizzate in questo piccolo studio (HI, SRH) (Figura 31).

Nonostante sia stato riscontrato un aumento statisticamente significativo tra la visita 1 e la visita 3, nessuno dei tre criteri CHMP è stato raggiunto (dati non mostrati).

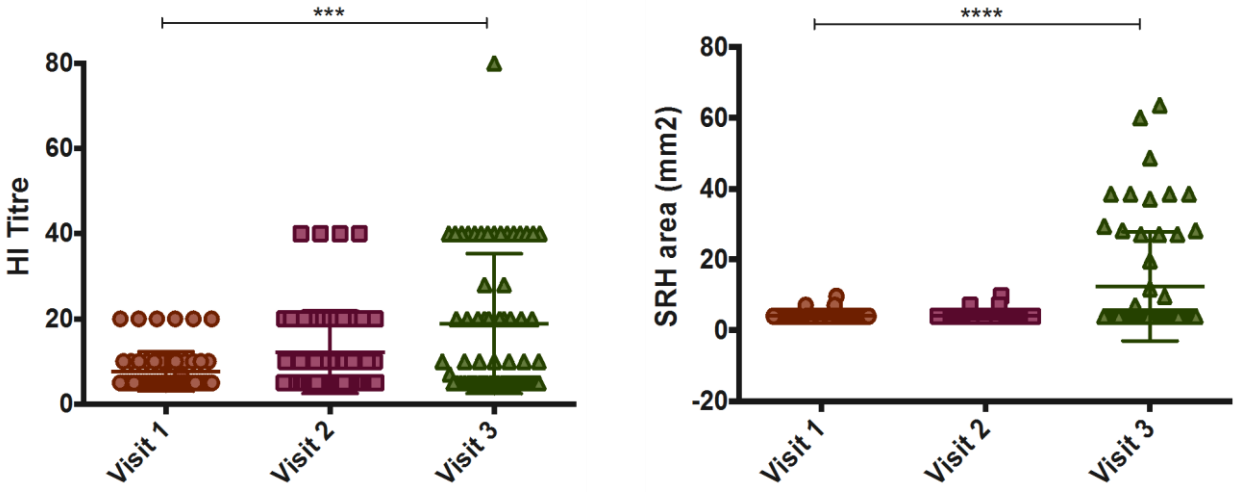

Fig. 31: Grafici mostranti i risultati HI ed SRH per il vaccino pre-pandemico intradermico. Per entrambe le metodiche possiamo osservare un aumento statisticamente significativo dei titoli anticorpali tra la visita 1 e la visita 3; *$p < 0.001$ per HI e $p < 0.0001$ per SRH.*

Discussione

Le epidemie influenzali si verificano ogni anno durante la stagione invernale nei climi temperati con diversi tassi di severità **(Cox et al.,2004)**

Nella mortalità e morbidità relativi all'influenza influiscono diversi fattori, come: il tipo e sottotipo di virus circolante, l'età media della popolazione coinvolta ed i livelli della preesistente immunità protettiva presenti nella popolazione e diretta contro lo strain virale circolante.

I bambini rappresentano uno dei fattori più rilevanti in termini di diffusione dell'influenza all'interno della popolazione, in quanto capaci di mantenere alti titoli virali nella parte alta dell'apparato respiratorio più a lungo rispetto agli adulti favorendo così il contagio **(Weinberg et al., 2004).**

Le epidemie influenzali avvengono ogni anno a causa di continue mutazioni che si verificano a carico del genoma virale attraverso il meccanismo di *drift antigenico* **(Wright & Webster, 2001).**

L'OMS sin dal 1952 ha istituito il GISM (Global Influenza Surveillance Method) con il fine di creare un network internazionale di laboratori capace di raccomandare ogni anno i nuovi strains influenzali da includere all'interno del vaccino stagionale.

A partire dal 1997, anno in cui lo strain HPAI H5N1 fece la sua comparsa in Cina causando un'importante epidemia trai polli ad Hong Kong, poi trasmessa all'uomo con un totale di 18 casi tra cui 6 mortali, l'interesse della sanità pubblica verso il virus influenzale aviario è andato via via crescendo.

Dal dicembre 2003 al dicembre 2015 si sono registrati un totale di 668 casi di infezioni nell'uomo causati dal ceppo aviario A/H5N1/Indonesia, con un totale di 393 decessi in 16 diversi Paesi **(http://www.wpro.who.int/emerging_disease/avianinfluenza/en/).**

I Paesi in cui è stato registrato il maggiore numero di casi sono tutti collocati all'interno del continente asiatico, tra questi quelli con i più alti tassi di incidenza sono stati: Cina, Cambogia, Vietnam e Indonesia.

Nel corso del 2015 sono state contagiate dal virus HPAI H5N1 18 persone con un totale di 9 decessi. Questi dati dimostrano che tale virus continua a circolare, con il rischio costante che vada incontro a mutazioni che gli permettano di acquisire la capacità di diffusione interumana.

Per tali motivi la WHO continua a dare molta importanza alla campagna di sorveglianza del virus aviario per effettuare un costante ed attento monitoraggio delle tendenze globali nella trasmissione di tale ceppo virale e permettere anche di selezionare gli strain giusti da utilizzare nella produzione di vaccini pre pandemici.

La vasta circolazione del virus A/H5N1 trai volatili domestici, la sporadica trasmissione alle persone in stretto contatto con essi e la grande capacità del virus aviario di andare incontro a continue

mutazioni genomiche, sono tutti fattori che contribuiscono a destare un'enorme preoccupazione per lo scoppio di una possibile pandemia.

Infatti, in caso di pandemia da A/H5N1/Indonesia l'intera popolazione mondiale risulterebbe completamente naïve dal punto di vista immunologico, il che significa che nessuno avrebbe gli anticorpi protettivi diretti contro il virus in questione e quindi, considerando l'alto tasso di mortalità di questo strain virale, si verificherebbero milioni di morti.

Ovviamente per impedire che ciò avvenga, si potrebbe ricorrere alla vaccinazione di massa, ma questo richiederebbe un'elevata disponibilità di vaccini in tempi estremamente ridotti; non solo, molti studi clinici atti a valutare l'immunogenicità di un vaccino anti-A/H5N1/Indonesia (come quello oggetto della tesi) hanno evidenziato la necessità di effettuare almeno un richiamo del vaccino, al fine di elicitare una risposta immunitaria sufficiente a proteggere la popolazione **(Treanor, 2006),** allungando ancora di più i tempi.

Ad oggi in commercio sono disponibili due tipi di vaccini influenzali: gli IIV (Inactivated Influenza Vaccine), generalmente somministrati per via parenterale tramite un'iniezione intramuscolare e intradermica, e i LAIV (Live Attenuated Influenza Vaccine), somministrati esclusivamente sottoforma di spray da nebulizzare per via intranasale.

Per quanto riguarda gli IIV, possono contenere il virus intero, oppure split o a subunità; in quest'ultimo caso, per elicitare una buona risposta anticorpale nella formulazione vengono inclusi anche degli adiuvanti **(Podda, 2001).**

I vaccini inattivati anti-influenzali presenti ad oggi sul mercato contengono un quantitativo ben standardizzato di HA virale, mentre non ci sono ancora richieste altrettanto preciso riguardanti il dosaggio della NA.

Il riconoscimento della HA come immunogeno principale del virus influenzale risale ai primi "*challenge studies",* condotti sull'uomo utilizzando anche strain virali vivi attenuati che causavano l'infezione ma non la malattia, mostrando una elevata, positiva correlazione tra la protezione dall'infezione e la quantità di anticorpi presenti nel siero del paziente diretti contro la HA virale, misurata tramite la metodica dell'HI.

Quindi, l'HA del virus influenzale è ampiamente riconosciuto come il maggior determinante antigenico per la produzione di anticorpi neutralizzanti sia dopo l'infezione naturale sia dopo la vaccinazione.

Gli attuali test serologici generalmente usati per misurare e quantificare gli specifici anticorpi anti-influenzali includono l'HI, l'SRH e la MN, ma solo per l'HI e l'SRH sono stati stabiliti dei correlati di protezione.

Nel 1996 la CHMP (Committee for Medical Products for Human use) dell'EMA ha definito le specifiche che un nuovo vaccino influenzale deve soddisfare affinchè possa essere licenziato.
Innanzitutto lo studio per stabilire l'immunogenicità di un nuovo vaccino influenzale deve coinvolgere almeno 50 persone trai 18 e i 60 anni e over 60.
La CHMP raccomanda due saggi: l'HI e l'SRH, per i quali i correlati di protezione sono già stati stabiliti e universalmente accettati.
Per licenziare un nuovo vaccino influenzale stagionale è sufficiente che uno solo dei tre criteri EMA sia soddisfatto, mentre nel caso di un vaccino pre-pandemico, devono necessariamente essere soddisfatti tutti e tre.
Nel presente studio di tesi è stata valutata l'immunogenicità di un nuovo vaccino pre-pandemico somministrato sia per via intramuscolare che per via intradermica, diretto contro lo strain A/H5N1/Indonesia/05/2005, rispetto ai tre criteri CHMP stabiliti dall'EMA, e mediante l'utilizzo di tre differenti test serologici: l'HI, considerato il *"gold standard"* nel campo degli studi sul virus influenzale, l'SRH che si basa sulla reazione di emolisi causata dall'attivazione della reazione di fissazione del complemento e la MN, basata invece sulla capacità del virus influenzale di produrre un effetto citopatico visibile mediante osservazione al microscopio ottico.
Per il vaccino intramuscolare sono state fatte correlazioni trai diversi test serologici con il fine di valutare la differenza nella *detection anticorpale* per ciascun saggio.
Il vaccino intramuscolare è stato somministrato ai pazienti in 5 differenti concentrazioni di HA/dose. Dall'analisi dei risultati è stato possibile evidenziare come, soltanto il vaccino contenente 60 µg HA/dose fosse in grado di superare abbondantemente tutti e tre i criteri CHMP per tutte le metodologie serologiche utilizzate in questo studio; sebbene anche la concentrazione di 30 µg HA/dose sia risultata sufficiente per la tecnica HI.
Un altro aspetto importante da considerare riguarda il numero di dosi di vaccino da somministrare: infatti, tutte e tre le metodiche concordano sulla necessità di una seconda dose di vaccino al fine di elicitare una risposta anticorpale sufficiente e statisticamente significativa in tutte le concentrazioni di HA/dose valutate.
Un altro dato importante da considerare è inoltre, il grado di correlazione tra le tre differenti metodiche. Dall'analisi dei nostri risultati si è rivelato un positivo ed alto grado di correlazione, andando così a confermare l'ipotesi della capacità del presente vaccino di elicitare una buona risposta anticorpale.
I tre differenti saggi sono infatti capaci di rilevare la presenza di diverse classi di anticorpi presenti all'interno del siero del paziente vaccinato: l'SRH riesce a *detectare* le classi di immunoglobuline IgG1 e IgG3 coinvolte nella reazione di fissazione del complemento solo e soltanto dirette contro la

testa dell'emoagglutinina, glicoproteina presente a livello dell' *envelope* del virus influenzale , l'MN è invece capace di rilevare gli anticorpi funzionali di classe IgG1 coinvolti nel processo di neutralizzazione ed opsonizzazione **(Eidem et al., 2015),** diretti sia verso la porzione HA1 che HA2 dell'emoagglutinina virale, ed infine l'HI è capace di *detectare* solo gli anticorpi di classe IgG diretti contro la porzione HA1 dell'emoagglutinina virale ma senza tenere conto se essi siano funzionali o meno.

È importante considerare quando si effettuano queste tipologie di test che i risultati possono essere inficiati da diversi fattori, come: lo stato di immunità, i setting geografici e l'età dei soggetti coinvolti.

Altro aspetto importante da tenere in considerazione è che il presente vaccino non contiene adiuvanti, che invece sono generalmente utilizzati nei vaccini stagionali per aumentare la risposta anticorpale in soggetti anziani o immunocompromessi.

Nel nostro caso, la maggiorparte della popolazione, come confermato dalle percentuali di sieronegativi in visita 1, risulta essere completamente naïve.

Questo potrebbe spiegare il perché della non efficacia delle dosi che generalmente vengono somministrate per i vaccini stagionali (10-15 µg HA/dose per ogni strain) per la somministrazione intramuscolare.

Sarebbe interessante quindi valutare l'efficacia del medesimo vaccino intramuscolare in seguito all'aggiunta di un adiuvante al fine anche di ridurre la concentrazione di HA da includere all'interno di ciascuna dose di vaccino, la quale rappresenterebbe un collo di bottiglia non indifferente per la fase di produzione (minore concentrazione di HA/dose si tradurrebbe infatti in un maggior quantitativo di dosi di vaccino disponibili) **(Linbad, 2004)**

Il maggior effetto dell'adiuvante infatti è la sua abilità nell'attivare e mobilitare cellule dendritiche che hanno incontrato e catturato l'antigene influenzale, permettendone e accelerandone la migrazione verso i centri linfonodali per iniziare così la risposta cellulo T mediata.

Dall'analisi successiva del vaccino intradermico, valutato sempre contro lo strain A/H5N1/Indonesia/05/2005 e contenente 15 µg di HA/dose, risulta come questo non sia ad oggi in grado di soddisfare nessuno dei tre criteri CHMP valutati mediante test HI ed SRH.

Nonostante tali cut-off non siano stati raggiunti è tuttavia possibile notare un aumento statisticamente significativo del titolo anticorpale tra pre e post vaccinazione.

Nonostante la vaccinazione per via intramuscolare sia quella maggiormente utilizzata, sia in campo influenzale che per altre tipologie di malattie infettive (es. meningite, tetano, pertosse etc.), il vaccino intradermico presenta un numero elevato di vantaggi, i quali possono risultare cruciali nel momento dello scoppio di una possibile nuova pandemia influenzale.

Un primo vantaggio infatti, risiede in quello che viene definito “Dose-Sparing Concept”, ovvero a partire dalla stessa concentrazione di HA/dose (15 µg), con il vaccino intradermico si utilizza la metà del volume di iniezione rispetto ad una dose intramuscolare **(Lambert & Laurent, 2008).** Questo è possibile grazie alla presenza di un elevato numero di cellule presentanti l’antigene a livello del derma, in grado di attivare una risposta cellulare e anticorpale di notevole entità. Questo dà il potenziale di rendere disponibili in meno tempo possibile un numero di dosi intradermiche assimilabili al doppio di un vaccino intramuscolare, nel caso la domanda/richiesta di vaccino aumenti in maniera improvvisa ed esponenziale, come nel caso di una nuova pandemia. Questo concetto è stato rivalutato con molta attenzione nel 2009 a seguito della nuova ondata del ceppo “swine” H1N1.
Un altro importante vantaggio del vaccino intradermico risiede nel modo assai semplice in cui viene somministrato **(Bragazzi et al., 2016).** Esistono infatti ad oggi, nuovi sistemi di iniezione dotati di microaghi che permettono una somministrazione estremamente rapida, indolore e con ridotti effetti collaterali (ad esempio assenza pressochè totale di reazioni febbrili).
Si parla perfino di autosomministrazione in caso di personale sufficientemente trainato come gli operatori sanitari e ospedalieri **(Icardi et al., 2012) (Coleman et al, 2012).**
Prendendo insieme tutti questi vantaggi appare chiaro come la scelta di un nuovo vaccino intradermico, magari adiuvato, potrebbe rappresentare la scelta vincente per una produzione e somministrazione efficiente in caso di pandemia influenzale.
Resta comunque da studiare e valutare come poter aumentare la sua efficacia nell’elicitare una risposta anticorpale appropriata.

Bibliografia

Abdelwhab E. M. & Hafez H.M., 2011. An overview of the epidemic of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in Egypt: epidemiology and control challenges. Epidemiology and Infection, 139(5): 647-57.

Alerstam T. & Lindstrom A., 1990. Optimal bird migration: the relative importance of time, energy, and safety. In Bird migration: Physiology and ecophysiology. E. Gwinner (ed.). Springer-Verlag, Berlin, Germany, 331-51.

Alexander D.J., 2000. A review of avian influenza in different bird species. Veterinary Microbiology, 74(1-2): 3-13

Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC., 2006. Cytotoxic T cells. J Invest Dermatol. 126(1):32-41

Anwar T., Lal S.K., Khan A.U., 2006. In silico analysis of genes nucleoprotein, neuroaminidase and hemagglutinin: a comparative study on different strains of influenza A (Bird Flu) virus sub-type H5N1. In silico Biology, 6(3): 161-8.

Atmar RL, Keitel WA, Cate TR, Munoz FM, Ruben F, Couch RB., 2007. A dose-response evaluation of inactivated influenza vaccine given intranasally and intramuscularly to healthy young adults. Vaccine. 25(29):5367-73

Barker WH., Mulloooly JP., 1980. Impact of epidemic type a influenza in a defined adult population. Am J Epidemiol, 112: 798-813

Bartolozzi Giorgio, 2012. Vaccini e Vaccinazioni (terza edizione). Elsevier, 23, 535-630.

Baumgarth N, Chen J, Herman OC, Jager GC, Herzenberg LA., 2000. The role of B1 and B2 cells in immune protection from influenza virus infection. Curr Top Microbiol Immunol. 252:163-9

Beare AS., Webster RG., 1999. Replication of avian influenza viruses in humans. Archives of Virology, 119, 37-42.

Belshe R., 2005. The Origins of Pandemic Influenza — Lessons from the 1918 Virus. N Engl J Med, 353:2209-2211.

Belshe R., Ambrose C.S., Yi T., 2008. Safety and efficacy of live attenuated influenza vaccine in children 2-7 years of age. Vaccine, 26 Suppl 4: D10-6.

Belshe RB., 2004. Current status of live attenuated influenza virus vaccine in the US. Virus Res. 103(1-2):177-85

Biswas S.K., Boutz P.L., Nayak D.P., 1998. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. Journal of Virology, 72(7): 5493-5501.

Blackburne B. P., Hay A. J., Goldstein R. C., 2008. Changing selective pressure during antigenic changes in human influenza H3. Plos Pathogens 4 (5), 1-9.

Bosch BJ, Bodewes R, de Vries RP, Kreijtz JH, Bartelink W, van Amerongen G, Rimmelzwaan GF, de Haan CA, Osterhaus AD, Rottier PJ., 2010. Recombinant soluble, multimeric HA and NA exhibit distinctive types of protection against pandemic swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus infection in ferrets. Journal of Virology, 84, 10366–10374.

Bot A, Bot S, Bona CA., 1998. Protective role of gamma interferon during the recall response to influenza virus. Journal of Virology, 72, 6637–6645.

Bouvier NM, Palese P., 2008. The biology of influenza viruses. Vaccine 26, 49-53.

Boyd R., 1999. Fondamenti di microbiologia medica. 1°edizione italiana sulla 5° americana (revisione dell'edizione italiana a cura da Maria Grazia Neri e Pier Egisto Valensin). Antonio Delfino editore.

Bragazzi NL, Orsi A, Ansaldi F, Gasparini R, Icardi G., 2016. Fluzone®Intra-dermal (Intanza ®/ Istivac ® intra-dermal): an updated overview. Hum Vaccin Immunother. 10.1080/21645515.

Brandtzaeg P. Role of mucosal immunity in influenza.In:Brown F, Haaiheim LR, Wood JM, Schild GC, eds. 2003. Laboratory correlates of immunity to influenza-A reassessment. Dev Biol. Basel: Karger. 115:39-48

Bresson JL, Perrone C, Launay O, Gerdil C, Saville M, Wood J, Holschler K, Zambon MC., 2006. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004(H5N1) vaccine: phase I randomised trial. Lancet. 367(9523):1657-64

Brokstad KA, Cox RJ, Eriksson JC, Olofsson J, Jonsson R, Davidsson A., 2001. High prevalence of influenza specific antibody secreting cells in nasal mucosa. Scand J Immunol. 54(1-2):243-7

Brühl P, Kerschbaum A, Kistner O, Barrett N, Dorner F, Gerencer M., 2001. Humoral and cell-mediated immunity to Vero cell-derived influenza vaccine. Vaccine, 19, 1149-58.

Bungener L, Seree K, Bijl L, Leserman L, Wilschut J, Daemen T, Machy P., 2002. Virosome-mediated delivery of protein antigens to dendritic cells. Vaccine. 20(17-18):2287-95

Chelbi-Alix MK, Wietzerbin J., 2007. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. Biochimie, 89, 713–718.

Chen H., Smith G. J. D., Li K. S., Wang J., Fan X. H., Rayner J. M., Vijaykrishna D., Zhang J. X., Zhang L. J., Guo C. T., Cheung C. L., Xu K. M., Duan L., Huang K., Qin K., Leung Y. H. C., Wu W. L., Lu H. R., Chen Y., Xia N. S., Naipospos T. S. P., Yuen K. Y., Hassan S. S., Bahri S., Nguyen T. D., Webster R. G., Peiris J. S. M., Guan Y., 2006. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. The

Chen W., Calvo P.A., Malide D., Gibbs et al., 2001. A novel Influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. Nature Medicine, 7(12): 1306-12.

Coleman BL, McGeer AJ, Halperin SA, Langlay JM, Shamount Y, Taddio A, Shah V, Mc Neil SA., 2012. A randomized trial comparing immunogenicity, safety, and preference for self- versus nurse-administered intradermal influenza vaccine. Vaccine. 30(44): 6287-93.

EMEA/CHMP/VWP/263499/2006: EMEA, 2007. Guideline on Influenza vaccines prepared from viruses with the potential to cause a pandemic and intended for use outside of the core dossier context.

Class E. C. J., Osterhaus A. D. M. E., van Beek Ruud., de Jong J. C., Rimmelwaan G. F., Senne D. A., Krauss S., Shortridge K. F., Webster R. G., 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. The Lancet, 351, 472-77.

Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG., 1993. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. Virus Research , 29(2), 155-65.

Cox NJ, Subbarao K., 1999. Influenza. The Lancet, 354, 1277-1287.

Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P., 2004. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. Scandinavian Journal of Immunology, 59(1):1-15.

Cox RJ, Brokstad KA, Zuckerman MA, Wood JM, Haaheim LR, Oxford JS., 1994. An early humoral immune response in peripheral blood following parenteral inactivated influenza vaccination. Vaccine. 12(11):993-9

CPMP/BWP/214/96: EMEA., 1996. Note for Guidance on harmonisation of requirements for influenza vaccines

Crepaldi G., Baritussio A., 2002. Trattato di medicina interna. Vol III. Piccin.

Dawood F.S., Iuliano A.D., Reed C., Shay D.K., Po-Yung Cheng, Don Bandaranayake, Breiman R.F., 2012. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. Lancet Infect Dis ;12(9):687-95.

De Jong M.D., Simmons C.P., Thanh T.T. et al., 2006. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. Nature Medicine, 12(10): 1203-07.

De Jong J. C., Class E. C., Osterhaus A. D., Webster R. G., Lim W. L., 1997. A pandemic warning? Nature, 389 (6651), 554.

De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD., 2000. Influenza virus: A master of metamorphosis. Journal of Infectious Disease, 40, 218–228.

Delves PJ, Roitt IM., 2000. The immune system. First of two parts. N Engl J med. 343(1):37-49

Delves PJ, Roitt IM., 2000. The immune system. Second of two parts. N Engl j Med. 343(2):108-17

Demicheli V, Rivetti D, Deeks JJ, Jefferson TO., 2004. Vaccines for preventing influenza in healthy adults. Cochrane Database Syst Rev. (3):CD001269

Dianzani F., Antonelli G., Capobianchi M.R., Dolli A., 2008. Manuale di virologia medica. 2° edizione. Mc Graw Hill.

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C., 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. Science, 303, 1529–1531.

Dong C, Flavell RA., 2001. Th1 and Th2 cells. Curr Opin Hematol. 8(1):47-51

Eidem S, Tete SM, Jul-Larsen A, Hoscheler K, Montomoli E, Brokstad KA,Cox RJ. 2015. Persistence and avidity maturation antibodies to A(H1N1)/09 in health care workers following repeated annual vaccination. Vaccine. http://dx.doi.org/10.1016/J.Vaccine.2015.05.081.

Ennis FA, Cruz J, Jameson J, Klein M, Burt D, Thipphawong J., 1999. Augmentation of human influenza A virus-specific cytotoxic T lymphocyte memory by influenza vaccine and adjuvanted carriers (ISCOMS). Virology. 259(2):256-61

Fasezak G, Rosenwirth B, Dukor P, Gergely J, Rajnavolgyi E., 1994. IgG isotype distribution of local and systemic immune responses induced by influenza virus infection. Eur J Immunol. 24(12):3063-7

Finney DJ., 1964. Statistical method in biological assay, Charles Griffin & Cc. Ltd., London.

Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownlee GG, Garcia-Sastre A., 1999. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. J Virol.73(11):9679-82

Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Pazynina G.V. et al., 2008. 6-sulfo sialyl Lewis X is the common receptor determinant recognized by H5, H6, H7 and H9 influenza viruses of terrestrial poultry. Virology Journal, 5: 85.

Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ., 2004. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. Science 303: 1838-1842

Garcia-Sastre A., Egorov A., Matassov D., Brandt D., Levy D. E., Durbin J. E., Palese P., Muster T., 1998. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. Virology, 252, 324-30.

Geeraedts F, Saluja V, ter Veer W Amorij JP Frijlink HW, Wilschut J, Hinrichs WL Huckriede A., 2010. Preservation of the immunogenicity of dry-powder influenza H5N1 whole inactivated virus vaccine at elevated storage temperatures. The AAPS Journal, 12(2), 215-222.

Geiger DA, King PG, Geiger MR., 2006. Influenza vaccine: Review of effectiveness of the U.S. immunization program, and policy considerations. Journal of American Physicians and Surgeons, 11, 69-74.

Gerdil C., 2003. The annual production cycle for influenza vaccine. Vaccine, 21, 1776-9.

Gerhard W., 2001. The role of the antibody response in influenza virus infection. Curr Top Microbiol Immunol. 16(3):171-7

Ghendon Y., 1991. Influenza surveillance. Bulletin of the World Health Organization, 61, 509-515.

Gioia C, Castilletti C, Tempestilli M, Piacentini P, Bordi L, Chiappini R, Agrati C, Squarcione S, Ippolito G, Puro V, Capobianchi MR, Poccia F., 2008. Cross-subtype Immunity against Avian Influenza in person recently vaccinated for Influenza; Emerging infectious diseases, 14, 121-128.

Glezen WP., Parades A., Taber LH., 1980. Influenza in children. Relationship to other respiratory agents. Jama, 243: 1345-9

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J., 2003. B-cell generation, activation and differentiation. Immunology. Fifth ed. New York: W.H.Freeman and company. 247-75

Gor DO, Rose NR, Greenspan NS., 2003. Th1-Th2: a procrustean paradigm. Nat Immunol. 4(6):503-5

Govorgova EA, Kodihalli S, Alymova IV, Fanget B, Webster RG., 1999. Growth and immunogenicity of influenza viruses cultivated in Vero or MDCK cells and in embryonated chicken eggs. In: Brown F, Robertson JS, Schild GC, Wood JM, eds. Inactivated influenza vaccines prepared in cell culture. Dev Biol Stand. Basel: Karger. 98:39-51

Gutièrezz R.A., Sorn S., Nicholls J.M., Buchy P., 2011. Eurasian Tree Sparrows, risk for H5N1 virus spread and human contamination through Buddhist ritual: an experimental approach. Plos One, 6(12): e28609.

Ha Y., Stevens D.J., Skehel J.J., Wiley D.C., 2001. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(20): 11181-6.

Haaheim LR., 2003. Original antigeni sin. A confounding issue? In: Brown F, Haaheim LR, Wood JM, Schild GC, eds. Laboratory correlates of immunity to influenza-A reassessment. Dev Biol. Basel:Karger. 115:49-53

Hajjar S.A., McIntosh K., 2010. The first influenza pandemic of the 21st century. Annals of Saudi medicine, 30(1):1-10

Hamilton-Easton A, Eichelberger RL., 1995. M. Virus-specific antigen presentation by different subsets of cells from lung and mediastinal lymph node tissues of influenza virus-infected mice. Journal of Virology, 69, 6359–6366.

Hancock K., Veguilla V., Lu X., Zhong W., 2009. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. England Journal, 361(20):1945-52.

Harvey R., Martin A. C. R., Zambon M., Barclay W. S., 2004. Restrictions to the Adaptation of Influenza A Virus H5 Hemagglutinin to the Human Host. Journal of Virology, 78(1), 502-507.

Hashimoto Y, Moki T, Takizawa T, Shiratsuchi A, Nakanishi Y., 2007. Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. Journal of Immunology, 178, 2448–2457.

Hauge S, Madhum A, Cox RJ, Haaheim LR., 2007. Quality and kinetics of the antibody response in mice after three different low-dose influenza virus vaccination strategies. Clin Vaccine Immunol. 14(8):978-83

Hay AJ, Gregory V, Douglas AR, Lin YP., 2001. The evolution of human influenza viruses. The Royal Society, 356, 1861-1870.

Heath WR, Carbone FR., 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. Nat Rev Immunol. 1(2):126-34

Hehme N, Engelmann H, Kunzel W, Neumeier E, Sanger R., 2002. Pandemic preparedness: lessons learnt from H2N2 and H9N2 candidate vaccines. Med Microbiol Immunol (Berl). 191(3-4):203-8

Hikono H, Kohlmeier JE, Ely KH, Scott I, Roberts AD, Blackman MA, Woodland DL., 2006. T cell memory and recall responses to respiratory virus infections. Immunol Rev. 211:119-32

Hilleman M., 2002. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control vaccine. 20(25-26): 3068-87

Hobson D, Curry RL, Beare AS, Ward-Gardner A., 1972. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. J Hyg (Lond). 70(4):767-77

Hoffmann E, Krauss S, Perez D, Webby R, Webster RG., 2002. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. Vaccine. 20(25-26):3165-70

Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. Nat Med., 2005. 11(4 suppl):S45-53

Horimoto T. & Kawaoka Y., 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. Clinical Microbiology Reviews, 14 (1): 129-49.

Hovden AO, Cox RJ, Haaheim LR., 2005. Whole influenza virus vaccine is more immunogenic than split influenza vaccine and induces primarly an IgG2a response in BALB/c mice. Scand J Imunol. 62(1):36-44

Huber VC, McKeon RM, Brackin MN, Miller LA, Keating R, Brown SA, Makarova N, Perez DR, Macdonald GH, McCullers JA., 2006. Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. Clin Vaccine Immunol. 13(9):981-90

Icardi G, Orsi A, Ceravolo A, Ansaldi F., 2012. Current evidence on intradermal influenza vaccines administered by Soluvia licensed micro injection system. Hum Vaccin Immunother. 8(1): 67-75.

Ito T., Couceiro J.N., Kelm S. et al., 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. Journal of Virology, 72(9): 7367-73.

Jawetz, Melnick, Adelberg's, 2011. Microbiologia medica. 25° edizione. Piccin.

Jegerlehner A, Schmitz N, Storni T, Bachmann MF., 2004. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: Weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. Journal of Immunology, 172, 5598–5605.

Jenning R, Potter CW, Massey PM, Duerden BI, Martin J, Bevan AM., 1981. Responses of volunteers to inactivated influenza virus vaccines. J Hyg (Lond). 86(1): 1-16.

Jensen K.E., 1957. The nature of sierological relationship among host influenza viruses. Advanc Virus, Res 4: 279-282

Jia D., Rahbar R., Chan R.W. et al., 2010. Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling. Plos One, 5(11): e13927.

Johansson BE, Bucher DJ, Kilbourne ED., 1989. Purified influenza virus haemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection. J Virol. 63(3):1239-46

Johnson NP, Mueller J., 2002. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 ”Spanish” influenza pandemic. Bull Hist Med 76:105-115

Joseph T, McAuliffe J, Lu B, Jin H, Kemble G, Subbarao K., 2007. Evaluation of replication and pathogenicity of avian influenza a H7 subtype viruses in a mouse model. J Virol. 81(19):10558-66

Kanai Y., Boonsathorn N., Chittaganpitch M., 2010. The impact of antigenic drift on influenza A virus on human herd immunity: Sero-epidemiological study of H1N1 in health Thai population in 2009. Vaccine, 28: 5437-44.

Katz JM, Garg S, Sambhara S., 2006. Influenza vaccines: current and future strategies. In Kawaoka Y, ed. Influenza virology. First ed. Norfolk:Caister Academic Press. 203-28

Keawcharoen J., Oraveerakul K., Kuiken T., Fouchier R. A., Amonsin A., Payungporn S., Noppornpanth S., Wattanodorn S., Theambooniers A., Tantilertcharoen R., Pattanarangsan R., Arya N., Ratanakorn P., Osterhaus D. M., Poovorawan Y., 2004. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. Emerging Infectious Diseases Journal, 10 (12), 2189-91.

Kilbourne E.D., 2006. Influenza pandemics of the 20th century. Emerging Infectious Diseases, 12(1): 9-14.

Kilbourne E.D., 1987. Influenza. Plenum medical book company.

Kim TS, Braciale TJ., 2009. Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses. PLoS One, 4

Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Eder G, Dorner F., 1999. Development of a Vero cell-derived influenza whole virus vaccine. Developments in biological standardization, 98, 101-10 (discussion 111).

Kraal G., 2005. Nasal-associated lymphoid tissue. In: Mestecky J, Lamn ME, Strober W, Bienenstock J,McGhee JR, Mayer L, eds. Mucosal immunology, volume 1. Third ed. Londo: Elsevier Academic Press. 415-22

Kubi J., 2001. Immunologia. Edizione italiana a cura di Moretta L. e Dianzani U. Utet.

Kuiken T and Taubenberger JK., 2008. Pathology of human influenza revisited, Vaccine, 26(4), 59-66.

Kuiken T., Rimmelzwaan G., van Riel D., Van Amerongen G., Baars M., Fouchier R., Osterhaus A., 2004. Avian H5N1 influenza in cats. Science. 306(5694): 241.

Kung H. C., Jen K. F. & Yuan W. C., 1978. Influenza in 1977: recurrence of influenza virus A subtype H1N1. Bulletin of the World Health Organization, 56, 913-18.

La Gruta NL, Doherty PC., 2006. Quantitative and qualitative characterization of the CD8+ T cell response to influenza virus infection. In: Kawaokw Y, ed. Influenza virology. First ed. Norfolk:Caister Academic Press. 155-67

Lamb R. A. & Krug R. M., 1996. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields B. N., Knipe D. M., Howley (ed.), Fields Virology, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa, 1353-95.

Lamb RA, Krug RM., 2001. Ortomyxoviruses: the viruses and their replication. In Knipe D.M., Howley P.M., Griffin DE et al., editors Fields Virology, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 1487-1531.

Lambert PH, Laurent PE., 2008. Intradermal vaccine delivery: will new delivery system transform vaccine administration? Vaccine. 26: 3197-208.

Last J., 2001. A dictionary of epidemiology. 4th edition. New York: Oxford University Press.

Le Q. M., Kiso M., Someya K., Sakai Y. T., Nguyen T. H., Nguyen K. H., Pham N. D., Ngyen H. H., Yamada S., Muramoto Y., Horimoto T., Takada A., Goto H., Suzuki T., Suzuki Y., Kawaoka T., 2005. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. Nature, 437 (7062), 1108.

Lee YT, Kim KH, Ko EJ, Lee YN, Kim MC, Kwon YM, Tang Y, Cho MK, Lee YJ, Kang SM., 2014. New vaccines against influenza virus. Clinical and Experimental vaccine research, 3, 12-28.

Li K. S., Guan Y., Wang J., Smith G. J., Xu K. M., Duan L., Rahardjo A. P., Puthavathana P., Buranathai C., Nguyen T. D., Estoepangestie A. T., Chaisingh A., Auewarakul P., Long H. T., Hanh N. T., Webby R. J., Poon L. L., Chen H., Shortridge K. F., Yuen K. Y., Webster R. G., Peiris J. S., 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. Nature, 430, 209-13.

Li Z., Jiang Y., Jiao P., 2006. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. Journal of Virology, 80(22): 11115-23.

Ligon L. B., 2005. Avian Influenza Virus H5N1: a review of its history and information regarding its potential to cause the next pandemic. Pediatric Infectious Diseases, 16, 326-35.

Lin CY, Kuo YC, Liu WT, Lin CC., 1998. Immunomodulation of influenza virus infection in the precipitating asthma attack. Chest, 93, 1234-1238.

Linbad EB. 2004. Aluminium adjuvants: in retrospect and prospect. Vaccine. 22: 3658-68.

Liu J., Xiao H., Lei F., Zhu Q., Qin K., Zhang X.-w., Zhang X.-l., Zhao D., Wang G., Feng Y., Ma J., Liu W., Wang J., Gao G. F., 2005. Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus Infection in Migratory Birds. Science, 309, 1206.

Lofgren E., Fefferman N.H., Naumov Y.N., Gorski J., Naumova N., 2007. Influenza seasonality: underlying causes and modeling theories. Journal of Virology, 81(11): 5429-36.

Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA., 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences), 101, 5598–5603.

ManzRA, Huser AE, Hiepe F, Radbruch A., 2005. Maintenance of serum antibody levels. Annu Rev Immunol. 23:367-86

McGill J, Heusel JW, Legge KL., 2009. Innate immune control and regulation of influenza virus infections. Journal of Leukocyte Biology, 86, 803–812.

Medina R.A. & Garcia-Sastre A., 2011. Influenza A viruses: new research developments. Nature Reviews. Microbiology, 9(8): 590-603

Mendelson M, Tekoah Y, Zilka A, Gershoni-Yahalom O, Gazit R, Achdout H, Bovin NV, Meningher T, Mandelboim M, Mandelboim O., 2010. NKp46 O-glycan sequences that are involved in the interaction with hemagglutinin type 1 of influenza virus. Journal of Virology, 84, 3789–3797.

Minor PD, Engelhardt OG, Wood JM et al., 2009. Current challenges in implementing cell-derived influenza vaccines: Implications for production and regulation, July 2007, NIBSC, Potters Bar, UK. (Conference Report). Vaccine, 27, 2907-13.

Montagnon B.J., Vincent-Falquet J.C., Saluzzo J.F., 1999. Experience with Vero cells at Pasteur Merieux Connaught. Dev. Bio. Stand, 98:137-140.

Monto A.S., 2000. Epidemiology and virology of influenza illness. The American journal of managed care, 6 (Suppl 5): S255-64.

Mordstein M, Kochs G, Dumoutier L, Renauld JC, Paludan SR, Klucher K, Staeheli P., 2008. Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. PLoS Pathogens, 4

Moroni M., Esposito R., De Lalla F., 1996. Manuale di malattie infettive. Masson.

Moscona A., 2005. Neuraminidase inhibitors for Influenza. The New England Journal of Medicine, 353, 1363-73.

Mosmann TR, Sad S., 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today.17(3):138-46

Muszkat M, Greenbaum E, Ben-Yehuda A, Oster M, Yeu'l E, Heimann S, Levy R, Friedman G, Zakay-Rones Z., 2003. Local and systemic immune response in nursing-home elderly following intranasal or intramuscular immunization with inactivated influenza vaccine. Vaccine. 21(11-12):1180-6

Nakagawa Y., Oda K., Nakada S., 1996. The PB1 subunit alone can catalyze cRNA synthesis, and the PA subunit in addition to the PB1 subunit is requie for viral RNA synthesis in replication of the influenza virus genome. Journal of Virology, 70(9): 6390-94.

Nakajima K., Desselberger U., Palese P., 1978. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. Nature (London), 274, 334-39.

Nayak D.P., Balogun R.A., Yamada H., 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. Virus Research, 143 (2): 147-61.

Neumann G., Chen H., Gao G. F., Shu Y., Kawaoka Y., 2010. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties. Cell Research, 20, 51-61

Nichol KL and Treanor JJ., 2006. Vaccines for seasonal and pandemic Influenza. The Journal of Infectious Disease, 194, 111-118

Nicholls J. M., Chan M. C., Chan W. Y., Wong H. K., Cheung C. Y., Kwong D. L., Wong M. P., Chui W. H., Poon L. L., Tsao S. W., Guan Y., Peiris J.S., 2007. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. Nature Medicine, 13, 147-49.

Nicholson K.G., Webster R.G., Hay A.J., 1998. Testbook of influenza. London Blackwell Science.

Nicholson KG, Colegate AE, Podda A, Stephenson I, Wood J, Ypma E, Zambon MC., 2001. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97(H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. Lancet. 357(9272):1937-43

Ninomiya A, Imai M, Tashiro M, Odagiri T., 2007. Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminium adjuvant induces homologous and heterologous protective immunities against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in a mouse model. Vaccine. 25(18):3554-60

O'Neill R. E., Talon J., Palese P., 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. EMBO Journal, 17, 288-96.

Onions D, Egan W, Jarrett R, Novicki D, Gregersen JP., 2010. Validation of the safety of MDCK cells as a substrate for the production of a cell-derived influenza vaccine. Biologicals, XXX, 1-8.

Oxford J.S., Manuguerra C., Kistner O., Linde A., Kunze M., Lange W., Schweiger B., Spala G., Rebelo de Andrade H., Perez Brena P.R., Beytout J., Brydak L., Caraffa de Stefano D., Hungnes

O., Kyncl J., Montomoli E., Gil de Miguel A., Vranckx R., Osterhaus A., 2005. A new European perspective of influenza pandemic planning with a particular focus on the role of mammalian cell culture vaccines. Vaccine, 23(46-47):5440-9.

Palese P., 2006. Making better influenza virus vaccines? Emerg Infect Dis. 12(1):61-5

Palladino G, Mozdzanowska K, Washko G, Gerhard W., 1995. Virus-neutralizing antibodies of IgG but not of IgM and IgA isotypes can cure influenza virus pneumonia in SCID mice. J Virol. 69(4):2075-81

Paulson J. C., 1985. Interactions of animal viruses with cell surface receptors, 131-219 In M. Connor (ed.), The receptors. Academic Press, Inc., Orlando, Fla

Peiris J. S. M., de Jong M. D., Guan Y., 2007. Avian Influenza Virus (H5N1): a threat to human health. Clinical Microbiology Reviews, 20 (2), 243-267.

Peiris J. S., Yu W. C., Leung C. W., Cheung C. Y., Ng W. F., Nicholls J. M., Ng T. K., Chan K. H., Lai S. T., Lim W. L., Yuen K. Y., Guan Y., 2004. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. The Lancet, 363, 617-19.

Peiris JS, de Jong MD, Guan Y., 2007. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. Clin Microbiol Rev. 20(2):243-67

Pinto L., 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. Cell, 69(3): 517-28.

Podda A. 2001. The adjuvanted influenza vaccines with novel with novel adjuvants: experience with MF 59-adjuvanted vaccine. Vaccine. 19 (17-19): 2673-2680.

Poland GA, Jacobson RM, Trogonsky PV., 2007. Avian and pandemic influenza: an overview. Vaccine. 25(16):3057-61

Portela A. & Digard P., 2002. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. Journal of General Virology, 83(Pt 4): 723-34.
Potter C.W., 2001. A history of influenza. Journal of applies Microbiology, 9(14): 572-9.

Profeta M.L. & Palladino G., 1986. Serological evidence of human infections with avian influenza viruses. Arch Virol., 90(3-4):355-60

Quinnan GV, Schooley R, Dolin R, Ennis FA, Gross P, Gwaltney JM., 1983. Serologic responses and systemic reactions in adults after vaccination with monovalent A/USSR/77 and trivalent A/USSR/77, A/Texas/77, B/Hong Kong/72 influenza vaccines. Rev Infect. Dis.; 5(4):748-57

Reid A.H., Fanning T.G., Hultin J.V., Taubenberger J.K., 1999. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(4): 1651-6

Rimmelzwaan GF, Baars M, van Beek R, van Amerongen G, Lovgren-Bengtsson K, Claas EC, Osterhaus AD., 1997. Induction of protective immunity against influenza virus in a macaque model: Comparison of conventional and iscom vaccines. Journal of General Virology, 78, 757–765.

Rivetti D, Jefferson T, Thomas R, Rudin M, Rivetti A, Di Pietrantonj C, Demicheli V., 2006. Vaccines for preventing influenza in the elderly. VCochrane Database Syst Rev. (1):CD004879

Rogers G. N. & Paulson J. C., 1983. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. Virology, 127, 361-73.

Rohde G, Wiethege A, Borg I, Kauth M, Bauer T, Gillissen T, Bufe A, Schultze-Werninghaus G., 2003. Respiratory viruses in exacerba-tions of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisa-tion: a case-control study. Thorax, 58, 37-42.

Romagnani S., 2006. Regulation of the T cell response. Clin Exp Allergy. 36(11):1357-66

Russell SM, McCahon DM, Beare AS., 1975. A Single Radial Haemolysis Technique for the Measurement of Influenza Antibody. Virology, 27, 1-10.

Sanders CJ, Doherty PC, Thomas PG., 2011. Respiratory epithelial cells in innate immunity to influenza virus infection. Cell and Tissue Research, 343, 13–21.

Sanz-Ezquerro J.J., Fernandez Santaren J., Sierra T. et al., 1998. The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. The journal of general virology, 79(Pt3) : 471-8.

Sauro A., Barone F., Blasio G., Russo L., Santillo L., 2006. Do influenza and acute respiratory infective disease weigh heavly on general practitioner's daily practice? Eur J Gen Pract, 12: 34-6

Schild G.C., Pereira M.S., Chakraverty P., 1975. Single-radial-hemolysis: A new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin. Applications for diagnosis and seroepidemiologic surveillance of influenza. Bull World Health Organ, 52: 43–50.

Scholtissek C., Rhode W., von Hoyningen V., Rott R., 1978. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. Virology, 87, 13-20.

Seo SH, Hoffmann E, Webster RG., 2002. Lethal H5N1 influenza viruses escape host antiviral cytokine responses. Nat Med. 8(9):950-4

Seo SH, Hoffmann E, Webster RG., 2004. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host antiviral cytokine responses. Virus Res. 103(1-2):107-13

Shortridge K. F. & Stuart-Harris C. H., 1982. An influenza epicentre? Lancet, 2, 812-13.

Skehel J.J. & Wiley D.C., 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. Annual review of biochemistry, 69: 531-69.

Smith D.J., Lapedes A.S., de Jong J.C., 2004. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. Science, 305(5682): 371-6.

Smith G.J., Fan X.H., Wang J., 2006. Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China. Proceedings of the National of Sciences of the United States of America, 103(45): 16936-41.

Smith GJ., 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. Nature. 459:1122–1125.

Snelgrove RJ, Goulding J, Didierlaurent AM, Lyonga D, Vekaria S, Edwards L, Gwyer E, Sedgwick JD, Barclay AN, Hussell T., 2008. A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. Nature Immunology, 9, 1074–1083.

Spearman C., 1909. The Method of 'Right and Wrong Cases' (Constant Stimuli) without Gauss' Formulae. Psychological Bulletin, 6(1): 27-28.

Stephenson I., 2006. H5N1 vaccines: how prepared are we for a pandemic?. Lancet 368(9540):965-6.

Stallknecht D. E. & Brown J. D., 2007. Wild birds and the epidemiology of Avian Influenza. Journal of Wildlife Diseases, 43(3), S15-S20.
Stech J, Xiong X, Scholtissek V, Webster RG.,1999. Indipendence of evolutionary and mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine. J Virol 73: 1878-1884

Stephenson I, Gust I, Kieny MP, Pervikov Y., 2006. Development and evaluation of influenza pandemic vaccines. Lancet Infect Dis. 6(2):71-2

Stephenson I, Nicholson KG, Gluck R, Mischler R, Newmann RW, Palache AM, Verlander NQ, Warburton F, Wood JM, Zambon MC., 2003. Safety and antigenicity of whole virus and subunit influenza A/HongKong/1073/99 (H9N2) vaccine in healthy adults; phase I randomised trial. Lancet. 362(9400):1959-66

Stephenson I., Nicholson K. G., Wood J. M., Zambon M. C., Katz J. M., 2004. Confronting the avian influenza threat: vaccine development for a potential pandemic. Infectious Diseases, 4, 499-509.

Strayer Lubert, 1991. Biochimica. 3° edizione. Zanichelli.

Subbarao K, Joseph T., 2007. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. Nat Rev Immunol. 7(4):267-78

Subbarao K, Katz JM., 2004. Influenza vaccines generated by reverse genetics. Curr Top Micorbiol Immunol. 283:313-42

Subbarao K., Klimov A., Katz J., Regnery H., Lim W., Hall H., Perdue M., Swayne D., Bender C., Huang J., Hemphill M., Rowe T., Shaw M., Xu X., Fukuda K., Cox N., 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. Science, 279, 393–396.

Swayne D. E. & Suarez D. L., 2000. Highly pathogenic avian influenza. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 19, 463-82.

Szyszko E, Brokstad K, Cox RJ, Hovden AO, Madhun A, Haaheim LR., 2006. Impact of influenza vaccine formulation with a detailed analysis of the cytokine response. Scand J Immunol. 64(5):467-75

Tamura S, Kurata T., 2004. Defence mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. Jpn J Infect Dis. 57(6):236-47

Taubenberger J.K. & Morens D.M., 2006. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. Emerging Infectious Diseases, 12(1): 15-22.

Taubenberger J.K., Reid A.H., Janczeswki T.A., Fanning T.G., 2001. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 356(1416): 1829-39.

Taubenberger JK, Kash JC., 2010. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation. Cell Host Microbe, 7 (6), 440-451.

Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM., 2005. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. Nature. 437:889-893

Taubenberger JK., 2006. The origin and the virulence of the 1918 “Spanish” influenza virus. Proc Am Philos Soc. 150(1):86-112

Tauber E., Kollaritsch H., Korinek M., 2007. Safety and immunogenicity of a Vero. Cell derived, inactivated Japanese encephalitis vaccine: a non- inferiority, phase 3, randomised controlled trial. Lancet, 370:1847-1853.

Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, Doherty PC., 2006. Cell-mediated protection in influenza infection. Emerg Infect Dis. 12(1):48-54

To KF, Chan PK, Chan KF, lee WK, Lam WY, Wong KF, Tang NL, Tsang DN, Sung RY, Buckley TA, Tam JS, Cheng AF., 2001. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. J Med Virol. 63(3):242-6

Treanor J, Wright PF., 2003. Immune correlates of protection against influenza in the human challenge model. In: Brown F, Haaheim LR, Wood JM, Schild GC, eds. Laboratory correlates of immunity to influenza- a reassessment. Dev Biol. Basel: Karger. 115:97-104

Treanor JJ, Betts RF., 1998. Evaluation of live, cold-adapted influenza A and B virus vaccines in elderly and high-risk subjects. Vaccine. 16(18):1756-60

Treanor JJ, CampbellJD, Zangwill KM, Rowe T, Wolff M., 2006. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A(H5N1) vaccine. N Engl J Med. 354(13):1343-51

Trebbie R., Larsen L.E., Viuff B.M., 2011. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. Virology Journal, 8:434.

Trombetta CM, Perini D, Mather S, Temperton N, Montomoli E., 2014. Overview of Serological Techniques for Influenza Vaccine Evaluation: Past, Present and Future. Vaccines, 2(4), 707-734.

Trombetta C.M., Perini D., Vitale L., Stanzani V., Piccirella S., Montomoli E., 2015. Validation of Single Radial Haemolysis assay: a reliable method to measure antibodies against influenza viruses. In press Journal of Immunological Methods.

Ungchusak K., Auewarakul P., Dowell S. F., Kitphati R., Auwanit W., Puthavathana P., Uiprasertkul M., Boonnak K., Pittayawonganon C., Cox N. J., Zaki S. R., Thawatsupha P., Chittaganpitch M., Khontong R., Simmerman J. M., Chunsutthiwat S., 2005. Probable Person- to-Person Transmission of Avian Influenza A (H5N1). The New England Journal of Medicine, 352 (4), 333-40.

Ungchusak K., Auewarakul P., Dowell S.F., Kitphati R. et al., 2005. Probable person to person transmission of avian influenza A (H5N1). The New England Journal of Medicine, 352(4): 333-40.

Van de Sandt CE, Kreijtz JHCM, Rimmelzwaan G. F., 2012. Evasion of Influenza A Viruses from Innate and Adaptive Immune Responses. Viruses, 4, 1438-1476.

Van Hoeven N, Belser JA, Szretter KJ, Zeng H, Staeheli P, Swayne DE, Katz JM, Tumpey TM., 2009. Pathogenesis of 1918 pandemic and H5N1 influenza virus infections in a guinea pig model: Antiviral potential of exogenous alpha interferon to reduce virus shedding. Journal of Virology, 83, 2851–2861.

Van Riel D, Leijten LM, van der Eerden M, Hoogsteden HC, Boven LA, Lambrecht BN, Osterhaus AD, Kuiken T., 2011. Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infects alveolar macrophages without virus production or excessive TNF-alpha induction. PLoS Pathogens, 7

Veguilla V, Hancock K, Schiffer J, Gargiullo P, Lu X, Aranio D, Brench A, Dong L, Holiday C, Liu F, et al. 2011. Sensitivity and specificity of serological assay for detection of human infection with 2009 pandemic H1N1 virus in U.S. population. J Clin Microbiol. 49: 2210-2215.)

Wang H., Feng Z., Shu Y., Yu H., Zhou L., Zu R., Huai Y., Dong J., Bao C., Wen L., Wang H., Yang P., Zhao W., Dong L., Zhou M., Liao Q., Yang H., Wang M., Lu X., Shi Z., Wang W., Gu

L., Zhu F., Li Q. Yin W., Yang W., Li D., Uyeki T. M., Wang U., 2008. Probable limited person-to- person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China. The Lancet, 371, 1427-34.

Wang J., Vijaykrishna D., Duan L., Bahl J., Zhang J. X., Webster R. G., Peiris J. S., Chen H., Smith G. J., Guan Y., 2008. Identification of the progenitors of Indonesian and Vietnamese avian influenza A (H5N1) viruses from southern China. Journal of Virology, 82 (7),3405-14.

Webby R.J. & Webster R.G., 2003. Are we ready for pandemic influenza?. Science, 302: 1519-22.

Webby RJ, Perez DR, Coleman JS, Guan Y, Knight JH, Govorkova EA, McClain-Moss LR, Peiris JS, Rehg JE, Tuomanen EI, Webster RG., 2004. Responsiveness to a pandemic alert:use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. Lancet. 363(9415):1099-103

Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR, Schwartz B, New Vaccine Surveillance Network Study Group, 2001. Superiority of reverse-trascription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. J Infect Dis. 189:706-710.

WHO, 2005. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. Emerging Infectious Diseases, 11(10): 1515-21.

WHO, 2008. Antigenic and genetic characteristics of H5N1 viruses and candidate H5N1 vaccine virus developed for potential use as human vaccines.

WHO, 2009. Evolution of a pandemic: A(H1N1)/2009 April 2009–August 2010; 2nd ed. At: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78414/1/9789241503051_eng.pd

WHO, 2011. Manual for the laboratory diagnosis and surveillance of influenza. Global Influenza Surveillance Network.

WHO, 2013. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013-14 northern hemisphere influenza season. 1-21.

WHO, 2014. Influenza Seasonal. Influenza Factsheet N°211.

WHO, 2016. Current WHO phase of pandemic alert for avian influenza H5N1. At: http://apps.who.int/csr/disease/avian_influenza/phase/en/index.html

WHO/GIP, Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2013. Data in HQ as of 29 August 2013.

Wilschut JC, McElhaney JE, Palache AM., 2006. Rapid Reference to Influenza (2th edition). Elsevier, 12- 224

Wood J.M., Gaines-Das R.E., Taylor J., Chakraverty P., 1994. Comparison of influenza serological techniques by international collaborative study. Vaccine, 12(2):167-74.

Wong S. S. Y. & Yuen K.Y., 2006. Avian Influenza Virus Infections in Humans. Chest, 129, 156-68.

Wright PF, Webster RG., 2001. Orthomyxoviruses. In : Knipe DM, Howley PM, Griffin DE et al., editors. Fields Virology, 4th edn. Lippincott Williams & Wilkins.1533-1579

Xu X., Subbarao K., Cox N. J., Guo Y., 1999. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. Virology, 261(1): 15-19.

Yamada S., Suzuki Y., Suzuki T., Le M. Q., Nidom C. A., 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 L. F., Stevens D. J., Russell R. J., Gamblin S. J., Skehel J. J., Kawaoka Y., 2006. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. Nature, 444, 378-82.

Yewdell JW, Bennink JR, Hosaka Y., 1988. Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. Sciences. 239(4840):637-40

Yewdell JW, Reits E, Neefjes J., 2003. Making sense of mass destruction: Quantitating MHC class I antigen presentation. Nature Reviews, 3, 952–961.

Yu H., Shu Y., Hu S., Zhang H., Gao Z., Chen H., Dong J., Xu C., Zhang Y., Xiang N., Wang M., Guo Y., Cox N., Lim W., Li D., Wang Y., Yang W., 2006. The first confirmed human case of avian influenza A (H5N1) in Mainland China. The Lancet, 367,84.

Yun Noh J, Joo Kim W., 2013. Influenza Vaccines: Unmet Needs and Recent Developments. Infection & Chemotherapy, 45(4), 375-386.

Zambon M., 1999. Epidemiology and pathogenesis of influenza. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 44 (Suppl B): 3-9.