

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE VETERINARIE**

**Ciclo XXVII**

**Settore Concorsuale di afferenza: 07/H3**

**Settore Scientifico disciplinare: VET/05**

**TITOLO TESI**

**Caratterizzazione genomica di virus influenzali suini in Italia mediante  
next generation sequencing**

**Presentata da: Guendalina Zaccaria**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Carlo Tamanini**

**Relatore**

**Prof. Fabio Ostanello**

**Correlatore**

**Dott. Gabriele Vaccari**

**Esame finale anno 2015**

## Sommario

<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>3</b>
<b>Eziologia</b> .....	<b>5</b>
Tassonomia e Nomenclatura .....	5
Struttura virale e organizzazione del genoma.....	6
Ciclo replicativo virale.....	14
Fattori di virulenza.....	17
Genetic drift and shift.....	21
<b>Epidemiologia</b> .....	<b>23</b>
Influenza A virus nel suino .....	23
Trasmissione interspecie tra uomo e suino.....	27
Influenza A virus nell'uomo.....	28
Spettro d'ospite .....	29
<b>Patogenesi dell'infezione nel suino</b> .....	<b>32</b>
Sintomi clinici.....	34
Lesioni anatomopatologiche .....	35
<b>Diagnosi</b> .....	<b>39</b>
Diagnosi diretta .....	39
Diagnosi indiretta .....	41
Sottotipizzazione e sequenziamento .....	42
<b>Vaccinazione</b> .....	<b>45</b>
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>48</b>
Campioni di SIV.....	48
Estrazione del genoma virale .....	50
Sequenziamento con metodo Sanger.....	50
Sequenziamento con tecnologia NGS su piattaforma Ion Torrent PGM.....	53
Analisi genomica e filogenetica .....	57
<b>RISULTATI</b> .....	<b>58</b>
Protocollo NGS e validazione mediante metodo Sanger.....	58
Analisi genomica .....	59
Analisi filogenetica.....	64
<b>DISCUSSIONE</b> .....	<b>77</b>
Sequenziamento con tecnologia NGS.....	77
Analisi genomica .....	77
Analisi filogenetica.....	79
A(H1N1)pdm09 .....	80
<b>SEQUENZIAMENTO DEL GENOMA COMPLETO DI UN VIRUS HPAI A/H7N7 TRASMESSO ALL'UOMO</b> .....	<b>82</b>
<b>Introduzione</b> .....	<b>82</b>
<b>Materiali e metodi</b> .....	<b>83</b>
<b>Risultati</b> .....	<b>83</b>
<b>Discussione</b> .....	<b>85</b>
<b>CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</b> .....	<b>87</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>89</b>

## INTRODUZIONE

L'Influenza A virus (FLUAV) è un importante patogeno respiratorio con uno spettro d'ospite molto ampio. Il serbatoio naturale di FLUAV è rappresentato da alcune specie di uccelli acquatici, sebbene l'uomo e il suino siano considerati ospiti naturali (Webster *et al.*, 1992; Munster *et al.*, 2007).

Nei suini l'infezione è endemica in tutto il mondo ed è responsabile di un considerevole danno economico dovuto ad una riduzione della produttività dei soggetti colpiti. Essendo recettivo all'infezione di FLUAV sia di origine umana che aviaria, inoltre, il suino sembra svolgere un ruolo di rilievo nella formazione di nuovi ceppi influenzali (c.d. *mixing vessel*), potenzialmente più virulenti e in grado di trasmettersi all'uomo (de Graaf and Fouchier, 2014). La pandemia causata dal virus A(H1N1)pdm09, la prima di questo secolo, ne è stata un esempio: questo nuovo ceppo, quadruplo riassortante di virus di origine suina, umana ed aviaria, dopo il passaggio dal serbatoio animale (suino) all'uomo, si è diffuso rapidamente nella popolazione umana, con gravi ripercussioni socio-sanitarie ed economiche (Dawood *et al.*, 2009). In aggiunta, la recente pandemia ha anche dimostrato quanto fosse inadeguata la sorveglianza globale per l'influenza virus suino (SIV): da studi filogenetici condotti sull'evoluzione dell'A(H1N1)pdm09 sembra che i progenitori di questo virus abbiano circolato per anni nella popolazione suina senza essere rilevati (Smith *et al.*, 2009). Di conseguenza, è stata riconosciuta dalle autorità internazionali l'importanza di un monitoraggio sistematico nei suini, con l'invito ad implementare i sistemi nazionali di sorveglianza dell'infezione da virus influenzali nella popolazione suina, spesso negletta in confronto all'influenza umana e a quella aviaria (Webster and Govorkova, 2014).

Ad oggi in Europa, Italia compresa, si osserva la co-circolazione dei SIV appartenenti ai sottotipi H1N1 *avian-like*, H3N2 *human-like*, H1N2 *human-like* e H1N1pdm09, insieme a ceppi derivati dal loro riassortimento genetico, evidenziando una popolazione virale eterogenea e molto dinamica (Simon *et al.*, 2014).

Il principale obiettivo del Dottorato di Ricerca è stato sviluppare un protocollo di sequenziamento con tecnologia NGS, che permettesse l'analisi di tutti i virus influenzali di tipo A, allo scopo di poter esaminare con un'unica metodica tutti i SIV isolati nel suino, compresi sia i sottotipi endemici sia eventuali nuovi ceppi originati da altre specie o per riassortimento. Si è scelto di utilizzare, a questo fine, la piattaforma Ion Torrent PGM (Life Technologies) poiché, al contrario di molte strumentazioni concorrenti, presenta una tecnologia maggiormente fruibile, con costi pari o minori al metodo di sequenziamento classico Sanger. Inoltre l'analisi dei dati prodotti può essere effettuata anche da personale non strettamente bioinformatico, rendendo lo strumento accessibile alla gran parte dei laboratori a livello globale.

Il saggio sviluppato è stato utilizzato per esaminare 62 SIV isolati dal 1998 al 2014, appartenenti ai sottotipi H1N1, H3N2 e H1N2, circolanti attualmente in Italia: le sequenze sono state analizzate mediante caratterizzazione genomica ed analisi filogenetica, al fine di monitorare i flussi genici dei virus influenzali nella popolazione suina italiana e la loro evoluzione.

Durante un'emergenza epidemica di A/H7N7 HPAI, inoltre, è stato possibile applicare il metodo a fini diagnostici anche su un campione umano, confermandone l'efficacia per tutti i sottotipi di FLUAV in generale.

## Eziologia

### Tassonomia e Nomenclatura

I virus influenzali appartengono alla famiglia degli *Orthomyxoviridae*, che comprende sei generi o tipi come stabilito nel nono rapporto dell'*International Committee for the Taxonomy of Viruses*: Influenzavirus A (FLUAV), Influenzavirus B (FLUBV), Influenzavirus C (FLUCV), Thogotovirus, Isavirus e Quaranjavirus (King *et al.*, 2012). I virus influenzali sono distinti in A, B e C in base alle differenze antigeniche di due proteine strutturali, la matrice (M) e la nucleoproteina (NP) (Lamb and Krug, 2001). Inoltre in base alla natura antigenica delle glicoproteine di superficie, emoagglutinina (HA) e neuroaminidasi (NA), è possibile classificare ulteriormente i FLUAV in sottotipi, determinati dalle possibili combinazioni dei 18 sottotipi di HA (H1-H18) e degli 11 sottotipi di NA (N1-N11) sinora identificati (Tong *et al.*, 2013).

Il sistema corrente di nomenclatura riconosciuto per i virus influenzali include il tipo di virus influenzale, l'ospite (per convenzione da indicare solo se non umano), il luogo di isolamento, il numero dell'isolato e l'anno di isolamento; per i virus influenzali di tipo A seguono tra parentesi i sottotipi di HA e NA (es. A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1)). Per i virus influenzali di tipo B e C non sono stati identificati sottotipi (es. B/Norway/1/84, C/Kyoto/41/82) (WHO, 1980).

I virus influenzali di tipo A presentano un ampio spettro d'ospite, con numerose specie animali domestiche e selvatiche recettive all'infezione, incluso l'uomo. Studi ecologici e filogenetici su FLUAV hanno dimostrato che il serbatoio naturale è rappresentato da alcune specie di uccelli acquatici appartenenti agli ordini degli *Anseriformes* (oche ed anatre) e dei *Charadriiformes* (trampolieri e gabbiani), sebbene numerose altre specie di uccelli possano essere infettate (Webster *et al.*, 1992; Munster *et al.*, 2007). Ad eccezione dei sottotipi di H17N10 e H18N11 recentemente isolati in America Latina da pipistrelli frugivori (Tong *et al.*, 2013), tutti i sottotipi di HA e NA a tutt'oggi conosciuti sono stati isolati dagli uccelli acquatici (Tabella 1). Nelle popolazioni umane, durante lo scorso secolo, hanno circolato ampiamente i virus di sottotipo H1N1, H3N2, H2N2 e H1N2, sebbene attualmente siano diffusi nella popolazione solo i sottotipi H1N1 e H3N2. Altri sottotipi (H5N1, H7N3, H7N7, H9N2, H7N9, H7N2 e recentemente H6N1 e H10N8) di FLUAV hanno occasionalmente infettato l'uomo, ma non hanno generato epidemie estese a causa della limitata capacità di trasmissione all'interno della popolazione umana (Peiris, 2009; Kawaoka and Neumann, 2012; Qi *et al.*, 2014; To *et al.*, 2014). I sottotipi H1N1, H1N2 e H3N2 circolano largamente nella popolazione suina in tutto il mondo; virus di origine aviaria (H5N1, H9N2, H4N6, H3N3) sono stati occasionalmente isolati nel suino (Karasin *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2013).

FLUBV e FLUCV infettano prevalentemente l'uomo, sebbene virus di tipo B siano stati isolati anche dalle foche (Osterhaus *et al.*, 2000) e virus di tipo C dai suini e dai cani (Yuanji *et al.* 1984, Ohwada *et al.*, 1986).

**Tabella 1:** Sottotipi di Influenza A virus: sensibilità di specie (da: CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2015a, modificata).

Emoagglutinina					Neuraminidasi				
Sottotipo	Uomo	Specie aviarie	Suini	Pipistrelli/ Altre specie	Sottotipo	Uomo	Specie aviarie	Suini	Pipistrelli/ Altre specie
H1					N1				
H2					N2				
H3				Altre specie	N3				
H4				Altre specie	N4				
H5					N5				
H6					N6				
H7				Altre specie	N7				Altre specie
H8					N8				Altre specie
H9					N9				
H10					N10				
H11					N11				
H12									
H13									
H14									
H15									
H16									
H17									
H18									

### Struttura virale e organizzazione del genoma

I virus appartenenti alla famiglia degli *Orthomyxoviridae* si presentano, all'osservazione al microscopio elettronico, come particelle virali pleomorfe dotate di pericapside virale: particelle a morfologia sferica, con un diametro compreso tra 80 e 120 nm, e strutture filamentose (Lamb and Krug, 2001).

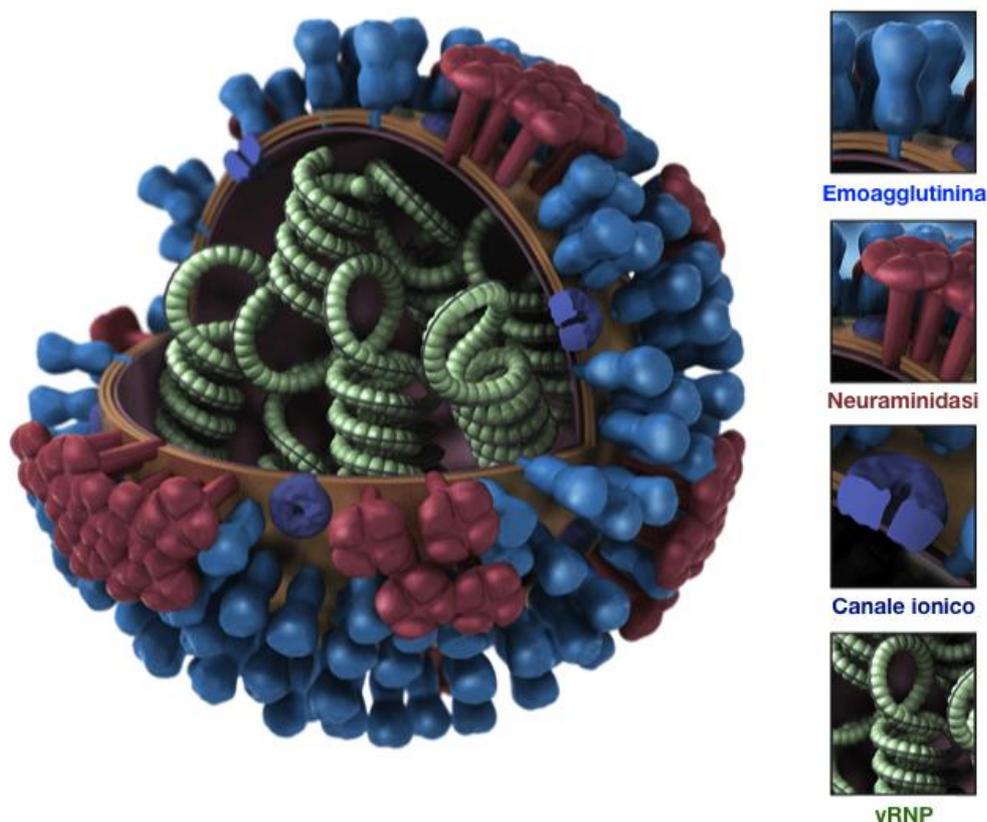
Il capside dei virus influenzali, a simmetria elicoidale, è rivestito da un involucro pericapsidico (*envelope*), costituito da un doppio strato lipidico di derivazione cellulare, in cui sono inserite

spicole (*spikes*) glicoproteiche virali, HA e NA (Flammini, 1998; Palese and Garcia Sastre, 2002). Oltre a queste due glicoproteine, nell'*envelope* virale si trova una proteina non glicosilata, corrispondente alla proteina M2, che funge da canale ionico transmembrana (Zebedee and Lamb, 1988).

Nei virus influenzali di tipo C è presente una sola glicoproteina di membrana, *hemagglutinin-esterase-fusion* (HEF), che svolge sia le funzioni dell'emoagglutinina sia della neuroaminidasi (Lamb and Krug, 2001).

La superficie interna dell'*envelope* è rivestita dalla proteina di matrice (M1), al cui interno è presente il *core* virale, costituito da complessi ribonucleoproteici (*viral ribonucleoprotein complex*, vRNP), formati da singoli segmenti di RNA genomico ricoperti da nucleoproteine (NP) e associati al complesso della RNA polimerasi RNA-dipendente virale. Quest'ultimo è un eterotrimerico formato da tre diversi polipeptidi: la proteina acida polimerasica (PA), la proteina basica polimerasica 1 (PB1) e la proteina basica polimerasica 2 (PB2) (Lamb, 1989). La figura 1 mostra una rappresentazione grafica della struttura di un Influenza A virus generico sopra descritta. Sezioni di FLUAV al microscopio elettronico a trasmissione indicano che i vRNP presentano una struttura tridimensionale elicoidale e sono disposti spazialmente in modo che 7 segmenti ne circondino uno centrale (Noda *et al.*, 2006).

**Figura 1:** Rappresentazione grafica di un FLUAV generico (da: CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2015b, modificata).



Il genoma virale è costituito da otto segmenti di RNA a singolo filamento a polarità negativa (complementare ai rispettivi mRNA), che codificano 12 proteine di cui 10 strutturali (PB2, PB1, PA, PB1-F2, PA-X, HA, NP, NA, M1 e M2) e 2 non strutturali (NS1 e NEP), localizzate nel citoplasma della cellula ospite (Chen *et al.*, 2004).

Alle estremità delle regioni codificanti (CDS, *coding DNA sequence*) di ciascun segmento di RNA virale (vRNA) si trovano sequenze nucleotidiche non codificanti (UTR, *untranslated region*). Le regioni al 5' del vRNA sono caratterizzate da una sequenza di 13 nucleotidi (nt) (5'-AGUAGAAACAAGG-3') conservata sia tra i diversi segmenti del genoma virale, sia tra i diversi sottotipi di FLUAV. Adiacenti a questi nucleotidi si trovano 5 o 8 Uridine consecutive che fungono da segnale per la poliadenilazione (Li and Palese, 1994). Anche a livello del 3' è presente una regione altamente conservata tra tutti i segmenti dei FLUAV, formata da 12 nt (3'-UCGUUUUCGUCC), che costituiscono la sequenza promotore a cui si lega l'RNA polimerasi all'inizio dei processi di replicazione e trascrizione (Muramoto *et al.*, 2006). Le UTR a 5' e 3' possiedono una certa complementarietà tra loro, che porta il vRNA ad assumere una struttura secondaria a "panhandle" (manico di padella) (Baudin *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2003).

Per più di 25 anni dalla prima mappatura del genoma virale influenzale, si è ipotizzato che gli otto segmenti genomici codificassero 10 proteine. Tuttavia, recenti studi sul genoma di FLUAV, hanno dimostrato che il proteoma virale è molto più complesso. Nel 2001 è stata scoperta la prima proteina accessoria, PB1-F2, tradotta da un *open reading frame* (ORF) alternativo rispetto a quello che codifica per PB1. In seguito, sono state identificate altre sei proteine: PB1-N40, PA-X, PA-N155, PA-N182, M42 e NS3 (Vasin *et al.*, 2014), sebbene sia tuttora non completamente definito il ruolo di queste nuove proteine nella patogenesi di FLUAV. In tabella 2 sono riassunte le funzioni delle principali proteine codificate.

Il segmento virale 1 codifica la proteina PB2 (759 aa), una delle tre proteine che formano il complesso della RNA polimerasi RNA-dipendente virale. La PB2 ha interazioni proteina-proteina con la PB1, che hanno luogo tramite i domini N-terminale delle due proteine (Digard *et al.*, 1989); inoltre sembra che la PB2 prenda contatto con la NP, ma non con la PA (Poole *et al.*, 2004). La PB2 svolge un ruolo fondamentale nella trascrizione del mRNA virale, in quanto possiede la funzione primaria di legare il 5'-cap metilato degli mRNA della cellula ospite che saranno poi tagliati per fungere da *primer* per la sintesi del mRNA virale. E' stato ipotizzato che il meccanismo di riconoscimento del 5'-cap sia dovuto alla formazione di un motivo a *sandwich* tra amminoacidi (aa) aromatici, come avviene in altre proteine che possiedono la funzione di legare il 5'-cap metilato (Fechter *et al.*, 2003).

La PB1, codificata dal segmento virale 2, rappresenta la subunità centrale del complesso della polimerasi (757 aa). Interagisce tramite siti di legame indipendenti sia con la PA (tramite il dominio C-terminale) sia con la PB2 (tramite il dominio N-terminale); inoltre è capace di legare la NP (Biswas *et al.*, 1998). La subunità PB1 agisce da catalizzatore nell'aggiunta sequenziale dei nucleotidi all'RNA trascritto (Braam *et al.*, 1983) ed è anche responsabile del legame con le estremità 5' e 3' sia dei vRNA che dei cRNA, mediando in questo modo l'inizio della trascrizione e della replicazione (Gonzalez and Ortin, 1999a; Gonzales and Ortin, 1999b). Il legame con l'estremità 3' del vRNA innesca l'attività endonucleasica della PA, che permette la formazione del *primer* utilizzato per la trascrizione a partire dal 5'-cap metilato degli mRNA della cellula ospite (Dias *et al.*, 2009). La PB1 presenta un certo grado di omologia di sequenza

con altre RNA polimerasi RNA-dipendenti, a livello di quattro regioni conservate; mutazioni a questo livello provocano la perdita della funzionalità della proteina stessa (Poch *et al.*, 1989; Biswas and Nayak, 1994). Oltre alla PB1, il segmento virale 2 codifica le proteine PB1-F2 e PB1-N40.

La PB1-F2 (87-91 aa) è una proteina piccola, prodotta precocemente nel ciclo virale e degradata dal proteosoma. E' presente in molti isolati virali sia da specie aviarie sia da mammiferi, anche se spesso, nei virus di origine suina, la CDS della PB1-F2 risulta interrotta da un codone di stop (Chen *et al.*, 2001). Numerosi studi hanno mostrato che la PB1-F2 ha numerosi effetti: può innescare la cascata dell'apoptosi, è in grado di promuovere il processo infiammatorio e può regolare, aumentandola (*up-regulation*), l'attività della polimerasi virale tramite l'interazione con la subunità PB1 (Pleschka, 2013). I meccanismi che ne stanno alla base non sono ancora completamente chiari e alcuni effetti della PB1-F2 potrebbero essere ceppo- e/o ospite-specifici (Mazur *et al.*, 2008). Queste funzioni sembrano contribuire alla patogenicità del virus influenzale.

La proteina PB1-N40 (752 aa), la cui funzione non è stata ancora definita, è rappresentata dalla forma troncata N-terminale della PB1, la cui traduzione inizia dal codone 40 (Wise *et al.*, 2009).

La proteina PA (716 aa), codificata dal segmento virale 3, costituisce la subunità più piccola della polimerasi virale. Nelle fasi iniziali dell'infezione la PA è localizzata nel citoplasma, mentre la PB1 e la PB2 vengono rilevate nel nucleo (Akkina *et al.*, 1991). A seguito di digestione parziale, può essere scissa in due domini: un piccolo dominio N-terminale e un grande dominio C-terminale, separati da un lungo peptide di congiunzione che sembra svolgere un ruolo determinante nell'interazione con la PB1 (Guu *et al.*, 2008). L'interazione PA/PB1 è importante per un efficiente accumulo nel nucleo della subunità PB1: l'attacco della PB1 al 5' dell'RNA dipende dal complesso PB1/PA (Lee *et al.*, 2002). La funzione peculiare della PA è la sua attività endonucleasica che consente il clivaggio dei 5'-*cap* degli mRNA cellulari, utilizzati poi come *primer* (Dias *et al.*, 2009).

Recentemente è stato dimostrato che il segmento virale 3 codifica una seconda proteina, la PA-X, tramite *frameshifting* ribosomiale (*programmed ribosomal frameshifting* o PRF, un processo alternativo di traduzione proteica, utilizzato da alcuni virus per poter regolare l'espressione delle proteine virali mediante sovrapposizioni delle ORF, saltando uno o due nucleotidi durante la traduzione del codice genetico) (Yewdell and Ince, 2012). Nel modello murino, la PA-X è in grado di modulare la virulenza di FLUAV (Jagger *et al.*, 2012).

L'HA, codificata dal segmento virale 4, è una glicoproteina di superficie di tipo I di circa 550 aa; usata a lungo come proteina modello nello studio dei processi di trasporto intra-cellulare e post-traduzione delle glicoproteine, è probabilmente la componente virale analizzata più nel dettaglio. Svolge due attività biologiche fondamentali nell'ambito del ciclo replicativo virale: determina l'adsorbimento del virione alla cellula ospite, legandosi all'acido sialico di uno specifico recettore di membrana, e permette, attraverso la fusione della membrana virale e di quella endosomiale, il rilascio dei vRNP nel citoplasma cellulare (Palese and Shaw, 2007; Wright *et al.*, 2007). L'HA, oltre ad essere il principale bersaglio degli anticorpi neutralizzanti (Gamblin *et al.*, 2004), possiede un'attività antigenica emoagglutinante, data dalla capacità di legame con le emazie, che possiedono residui di acido sialico sulla superficie. L'HA viene

sintetizzata come un precursore polipeptidico, HA<sub>0</sub>, che per attivarsi necessita di un clivaggio proteolitico che porta alla scissione del precursore in due subunità, HA<sub>1</sub> e HA<sub>2</sub>, legate tra loro da un ponte disolfuro (Garcia-Sastre *et al.*, 1998). Questo clivaggio è essenziale per la funzionalità dell'HA e per l'infettività virale: prepara la glicoproteina a subire un drastico cambiamento conformazionale a basso pH ambientale (all'interno dell'endosoma). Il riarrangiamento strutturale dell'HA provoca l'esposizione del dominio N-terminale idrofobico dell'HA<sub>2</sub>, che induce la fusione tra la membrana virale e quella cellulare. L'attivazione proteolitica dell'HA può essere mediata da enzimi cellulari o extra-cellulari e determina sia il tropismo sia l'esito clinico dell'infezione virale (Klenk and Garten, 1994; Rott *et al.*, 1995). Nella maggior parte dei FLUAV, l'attivazione dell'emoagglutinina avviene a livello della membrana plasmatica (Wright *et al.*, 2007), limitando pertanto il tropismo virale a tessuti in cui sono presenti specifiche proteasi extra-cellulari. Le HA di alcuni FLUAV, appartenenti ai sottotipi H5 e H7, in cui sono presenti amminoacidi basici multipli a livello del sito di clivaggio, possono essere attivate da proteasi intra-cellulari ubiquitarie "subtilisina-simili" quali la furina e la PC6 (Stieneke-Grober *et al.*, 1992; Horimoto *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1994). I virus aviari, che presentano HA con siti di clivaggio come sopra descritti, essendo attivati da proteasi ubiquitarie, possono replicare nella maggior parte dei tessuti dell'ospite, causando infezioni sistemiche (*highly pathogenic avian Influenza virus*, HPAIV) (Pleschka, 2013).

La struttura tridimensionale dell'HA evidenzia sulla superficie la presenza di catene di carboidrati; sebbene non sia pienamente nota la loro funzione, l'aggiunta di gruppi glucidici è necessaria per il corretto *folding* ("ripiegamento", processo che porta all'assunzione di una corretta conformazione sterica della struttura terziaria della proteina) dell'HA nel Reticolo Endoplasmatico (Hebert *et al.*, 1997). Numerosi studi hanno evidenziato il ruolo essenziale della glicosilazione dell'HA nella virulenza dei FLUAV, che va ad influenzare non solo il *folding* della proteina, ma anche il trasporto, il clivaggio proteolitico, il legame con il recettore e l'attività di fusione (Gallagher *et al.*, 1988; Schulze, 1997; Gambaryan *et al.*, 1998). Inoltre, le catene di carboidrati legate all'HA sembrano influire sulle proprietà antigeniche e modularne il riconoscimento da parte dei linfociti T CD4+ (Munk *et al.*, 1992; Drummer *et al.*, 1993).

La regione dell'HA che lega il recettore contenente i residui di acido sialico è simile ad una "tasca", collocata nella parte distale di ciascuna subunità della molecola, inaccessibile agli anticorpi. I residui amminoacidici che formano la "tasca" (Y98, W153, A/H183, E190 e L194) sono conservati tra diversi sottotipi virali (Wilson *et al.*, 1981). L'HA di virus influenzali aviari lega preferenzialmente l'acido sialico combinato al galattosio in configurazione  $\alpha$ -2,3, mentre quella di virus di origine umana l'acido sialico legato al galattosio in configurazione  $\alpha$ -2,6 (Connor *et al.*, 1994).

Sulla struttura tridimensionale dell'HA sono stati identificati 5 siti antigenici ipervariabili: Ca1, Ca2, Cb; Sa e Sb. Queste regioni coprono gran parte della superficie della testa dell'HA, compresi i residui a livello della "tasca", inaccessibile agli anticorpi (Wiley *et al.*, 1981). Dall'analisi delle sequenze di HA degli isolati di FLUAV H3N2, che hanno circolato dopo il 1968, è emersa la presenza di aminoacidi fortemente conservati nelle posizioni più profonde della proteina, la cui funzione è quella di ancorare gli aminoacidi più superficiali, garantendo la conformazione secondaria e terziaria proteica (Fleury *et al.*, 1998).

**Tabella 2:** Segmenti genomici del virus dell'Influenza A e le proteine da essi codificate. In breve sono riassunte le principali funzioni delle proteine virali (da Pleschka, 2013).

Segmento	Proteine codificate	Funzione della proteina
1	Proteina basica polimerasica 2 - PB2	Subunità della polimerasi; riconoscimento del 5'-cap dell'mRNA
2	Proteina basica polimerasica 1 - PB1	Subunità della polimerasi; elongazione dell'RNA
	PB1-F2	Attività pro-apoptotica
3	Proteina acida polimerasica - PA	Subunità della polimerasi; attività endonucleasica e <i>cap-snatching</i>
4	Emoagglutinina - HA	Glicoproteina di superficie; maggiore antigene; legame con il recettore; attività di fusione
5	Nucleoproteina - NP	Proteina legante l'RNA; regolazione dell'importo nucleare
6	Neuraminidasi - NA	Glicoproteina di superficie; attività neuroaminidasica; distruzione del recettore
7	Proteina di matrice 1 - M1	Proteina di matrice; regolazione dell'esporto nucleare e del processo di rilascio delle particelle virali
	Proteina di matrice 2 - M2	Canale ionico; protezione della conformazione dell'HA; <i>uncoating</i> e assemblaggio delle particelle virali
8	Proteina non strutturale 1 - NS1	Antagonista dell'interferone; regolazione dell'espressione genica dell'ospite; inibizione dello <i>pre-mRNA splicing</i> cellulare, della poliadenilazione dell'mRNA cellulare e dell'attività della protein-chinasi attivata dall'RNA (PKR)
	<i>Nuclear Export Protein</i> - NEP	Esportazione nucleare dell'RNA

Il segmento virale 5 codifica la NP, un polipeptide di 498 aa, ricco di aa quali l'arginina, la glicina e la serina, che possiede una netta carica positiva a pH neutro (Portela and Digard, 2002). Analisi filogenetiche di sequenze della NP di ceppi di FLUAV isolati da diversi ospiti mostrano che il gene che codifica questa proteina è piuttosto conservato, con una differenza aa di meno dell'11% (Shu *et al.*, 1993).

La NP è in grado di legare un singolo filamento di RNA in maniera non sequenza-specifica; inoltre può interagire con un grande numero di macromolecole sia di origine virale che cellulare. Questa proteina è inoltre capace di creare legami con se stessa, dando forma a grandi complessi oligomerici. Ogni NP lega circa 24 nt di RNA e, valutando la totale lunghezza dell'RNA legato e le dimensioni dei vRNP, sembra che l'RNA sia sostanzialmente avvolto attorno ogni monomero

di NP (Martín-Benito *et al.*, 2001). Diversi studi hanno dimostrato l'interazione con le proteine virali PB1, PB2 e M1 (nessun legame evidenziato con la PA) e con almeno 4 famiglie proteiche cellulari: importine di classe  $\alpha$  (recettore di importazione nucleare), F-actina, recettore di esportazione nucleare CRM1 e elicasi BAT1/UAP56 (Portela and Digard, 2002). In seguito al processo di *uncoating* (o scapsidamento), la NP, grazie alla presenza di segnali di localizzazione nucleare (NLS), è in grado di mediare l'importazione dei vRNP nel nucleo (O'Neil and Palese, 1995). L'interazione con M1 sembra controllare sia l'attività trascrizionale che il *trafficking* intracellulare dei vRNP (Kawaoka, 2006), inibendo la sintesi del vRNA. Queste attività fanno della NP una proteina con un ruolo fondamentale nel ciclo replicativo dei virus dell'Influenza.

La NA è una glicoproteina (circa 450 aa) codificata dal segmento virale 6, presente sotto forma di *spikes* sulla superficie virale. Forma una struttura tetrameric, composta da una coda citoplasmatica corrispondente alla regione N-terminale, un dominio transmembrana con cui attraversa lo strato lipidico e una porzione sulla superficie esterna dell'*envelope*, che rappresenta la maggior parte della sua struttura, formata da una regione gambo e una testa (Colman, 1998). La NA è responsabile della scissione del legame tra l'acido sialico e l'adiacente residuo di D-galattosio (o D-galattosammina) sui virioni di nuova formazione, svolgendo un ruolo essenziale nel rilascio del virus e nella sua diffusione (Air and Laver, 1989). Il sito attivo della NA si trova in una vasta depressione sulla superficie della testa; è una regione altamente conservata nei FLUAV, circondata da epitopi variabili, bersaglio del sistema immunitario e, pertanto, sottoposti a pressione selettiva. Mutazioni a livello del sito attivo determinano una perdita dell'attività enzimatica (Lentz and Air, 1986). Questa regione rappresenta il target di una delle due classi di farmaci antinfluenzali sinora disponibili, cui appartengono oseltamivir (Tamiflu) e zanamivir (Relenza): analoghi dell'acido sialico, inibiscono l'attività enzimatica della NA, riducendo il rilascio della nuova progenie virale dalle cellule infettate (Von Itzstein *et al.*, 1993).

Il segmento virale 7 (gene M) codifica entrambe le proteine di matrice M1 (252 aa) e M2 (97 aa).

La M1 rappresenta la proteina strutturale maggiormente presente nel virione, riveste la superficie interna dell'*envelope* mantenendo l'integrità strutturale del virione e, al tempo stesso, conferisce stabilità al *core* virale, racchiuso in un involucro dello spessore di circa 6 nm (Baudin *et al.*, 2001). La proteina M1 è legata tramite il suo dominio centrale con la NP (Noton *et al.*, 2007), inoltre, nel virione, si trova associata a piccole quantità della proteina non strutturale NEP (*Nuclear Export Protein*) (Yasuda *et al.*, 1993). Interagendo con la NEP, controlla l'esporto nucleare dei vRNP; non è ancora noto perché sia essenziale il ruolo della M1: potrebbe trasportare i vRNP fuori dal nucleo attraverso i pori nucleari o essere necessaria per il rilascio dei vRNP; un'altra possibilità ancora, potrebbe essere, grazie al legame con i vRNP nel citoplasma, la prevenzione del reimporto dei vRNP nuovamente all'interno del nucleo (Bui *et al.*, 2000). Nel citoplasma, la proteina M1 permette l'assemblaggio delle particelle virali e rappresenta l'elemento trainante del processo di gemmazione: la sola espressione della M1 permette, infatti, la formazione di particelle simil-virali (Gomez-Puertas *et al.*, 2000).

La proteina di matrice M2 è una proteina integrale di membrana, formata da tre domini: uno extra-cellulare N-terminale, uno transmembrana ed una coda citoplasmatica (Tobler *et al.*, 1999). La M2 è abbondantemente espressa a livello della membrana plasmatica delle cellule infettate, nella quale forma canali ionici che permettono il passaggio di ioni  $H^+$ , mentre è fortemente

sottorappresentata nei virioni, poiché solo alcune proteine M2 vengono incorporate nelle particelle virali (Lamb *et al.*, 1985). Durante il trasporto dell'HA verso la superficie cellulare, la presenza della M2 nella membrana della vescicola di trasporto permette la regolazione del pH interno, in modo da prevenire l'attivazione dell'attività di fusione dell'HA a causa del pH acido, di solito presente nelle vescicole di trasporto (Grambas and Hay, 1992). La regolazione del pH, con la sua riduzione, da parte delle proteine M2 presenti nelle particelle virali, invece, catalizza l'*uncoating* del virione e l'attivazione della RNA polimerasi. L'acidificazione del pH innesca il cambiamento conformazionale dell'HA che risulta nella fusione della membrana virale con quella dell'endosoma (Ciampor *et al.*, 1992).

La proteina M2 non funziona solo come canale protonico: la regione citoplasmatica è strutturata in modo tale da poter interagire in particolare con la proteina M1. Pertanto la proteina di matrice M2 ha la doppia funzione di condurre protoni e reclutare le altre proteine virali durante l'assemblaggio dei virioni (Pielak and Chou, 2010). La M2, inoltre, è il bersaglio dei farmaci antinfluenzali della classe degli amantadani, quali amantadina e rimantadina (Hay, 1992).

Il segmento virale 8 (gene NS) codifica l'unica proteina non strutturale NS1 (*unspliced* mRNA) e la NEP o NS2 (*spliced* mRNA), che è presente in piccole quantità all'interno del virione (pertanto, non veramente non strutturale).

La proteina NS1 (230 aa) non è un elemento strutturale delle particelle virali, ma è espressa a livelli molto elevati all'interno delle cellule infettate dell'ospite, dove ha una localizzazione quasi interamente nucleare (Krug and Ettinger, 1973). È stato dimostrato che la NS1 è uno dei maggiori fattori di patogenicità dei FLUAV (Hale *et al.*, 2008). Indebolisce la risposta immunitaria innata ed acquisita dell'ospite in numerosi modi. È in grado di bloccare l'attività della 2'-5'-oligoadenilato sintetasi (OAS) (Bergmann *et al.*, 2000) e di legare l'RNA a doppio filamento (dsRNA), sopprimendo in questo modo l'attivazione della protein-chinasi (*dsRNA-activated protein kinase*, PKR): entrambe le proteine sono importanti regolatori della traduzione che può indurre l'innesco della cascata apoptotica e della produzione dell'interferone di tipo I (IFN) (Marjuki *et al.*, 2007). La funzione principale della NS1 è contrastare la risposta antivirale mediata dall'interferone  $\alpha$  e  $\beta$ . Virus influenzali mutati, deleti del gene della NS1, hanno una capacità di replicazione ed infezione attenuata, riuscendo a replicare in modo efficiente solo in sistemi privi di IFN (Garcia-Sastre *et al.*, 1998). In realtà la NS1 è una proteina multifunzionale che esegue un gran numero di attività: contribuisce alla replicazione del virus e alla virulenza durante l'infezione, instaura molte interazioni proteina-proteina e interazioni proteina-RNA, regolando la sintesi dei vRNA, lo *splicing* virale ("montaggio" del nascente pre-mRNA) e la traduzione degli mRNA virali (Hale *et al.*, 2008). La NS1 riduce il trasporto dell'mRNA cellulare, in modo da rendere la cellula più disponibile alla replicazione virale (Robb *et al.*, 2009).

La NEP (121 aa) è presente nei virioni, legata alla proteina M1 (Richardson and Akkina, 1991) e nelle cellule infettate sia a livello del nucleo che del citoplasma (Greenspan *et al.*, 1985). La NEP, in associazione con la M1, media l'esporto dei vRNP dal nucleo al citoplasma (Nemeroff *et al.*, 1998) e sembra avere anche un ruolo nella regolazione della replicazione e trascrizione virale, sebbene l'interazione diretta tra la NEP e il complesso della polimerasi non sia stato ancora dimostrata (Pleschka, 2013). Ciononostante è evidente che sia la NS1 sia la NEP hanno un ruolo fondamentale nella patogenicità e nella replicazione virale.

## Ciclo replicativo virale

La replicazione dei virus influenzali di tipo A comprende le seguenti fasi: riconoscimento e legame con il recettore cellulare, *adsorbimento*, trascrizione del genoma e traduzione delle proteine, sintesi delle macromolecole virali e del genoma virale, assemblaggio e maturazione dei neo-virioni e, infine, rilascio della progenie virale dalla cellula ospite (Figura 2).

Il virus influenzale lega, tramite l'emoagglutinina, i residui di acido sialico presenti nelle glicoproteine o nei glicolipidi sulla superficie della cellula dell'ospite (Colman, 1998). La specificità del legame dell'HA con il recettore dipende dal tipo di legame tra la terminazione dell'acido sialico e il galattosio sul recettore. I virus influenzali di origine umana legano preferibilmente l'acido sialico combinato al galattosio in configurazione  $\alpha$ -2,6, mentre quelli di origine aviaria l'acido sialico legato al galattosio in configurazione  $\alpha$ -2,3 (Ito *et al.*, 1998). Questa differenza è ritenuta essere il principale motivo per l'inefficienza di trasmissione dei virus aviari all'uomo.

A seguito del legame con l'acido sialico, il virus entra nelle cellule per endocitosi (Figura 2). Dopo l'*adsorbimento*, le vescicole si fondono con gli endosomi, che sono trasportati nella regione perinucleare tramite traslocazione mediata da dineina (Lakadamyali *et al.*, 2003). L'endocitosi mediata da recettore non è un processo specifico per la penetrazione virale, ma è un meccanismo generale utilizzato dalla cellula per internalizzare le macromolecole complesse. Le sostanze assorbite mediante endocitosi, dopo aver attraversato il compartimento endosomiale, sono trasportate nei lisosomi, dove sono degradate. FLUAV riesce ad evitare la degradazione, venendo rilasciato nel citoplasma, attraverso la fusione della membrana virale con quella endosomiale (Smith and Helenius, 2004).

L'ambiente acido all'interno dell'endosoma innesca il cambiamento conformazionale dell'HA che porta all'esposizione del peptide di fusione N-terminale a livello dell'HA<sub>2</sub>, che ancora il virione inserendosi nella membrana dell'endosoma. La giustapposizione delle membrane comporta un processo di emifusione con la formazione di un poro, attraverso cui sarà rilasciato il materiale genetico virale (Smith and Helenius, 2004). Il rilascio dei vRNP nel citoplasma è facilitato dall'acidificazione all'interno della particella virale prima della fusione: il canale ionico M2 pompa ioni H<sup>+</sup> all'interno della particella virale, indebolendo l'interazione della proteina M1 sia con l'*envelope* sia con i vRNP (Bui *et al.*, 1996).

I complessi RNP rilasciati nel citoplasma sono trasportati nel nucleo (Figura 2), dove gli RNA virali a polarità negativa (vRNA<sub>(-)</sub>) sono trascritti in RNA messaggeri a polarità positiva (mRNA<sub>(+)</sub>) dal complesso della polimerasi (PB2, PB1 e PA) (Martin and Helenius 1991a; Martin and Helenius; 1991b). Sia le proteine della polimerasi sia la NP possiedono NLS in grado di mediare l'importazione dei vRNP all'interno del nucleo (O'Neil and Palese, 1995). La polimerasi dei FLUAV non genera il 5'-*cap* per il mRNA, ma lo sottrae agli mRNA cellulari neo-sintetizzati. Durante il processo di trascrizione, la porzione 5' terminale dei pre-mRNA cellulari, il cui *cap* è riconosciuto e legato dalla subunità PB2 della polimerasi virale, viene clivata dall'attività endonucleasica della PA (Figura 2) e sarà poi utilizzata come innesco per il processo di trascrizione (meccanismo definito di *cap snatching*) (Dias *et al.*, 2009). È stato dimostrato che, nella fase di trascrizione, l'interazione tra RNA polimerasi virale e RNA polimerasi II della cellula ospite è indispensabile per la produzione di mRNA "maturi"

(Engelhardt *et al.*, 2005; Kash *et al.*, 2006). Il meccanismo di *cap snatching* inibisce la sintesi delle proteine cellulari a favore della produzione dei componenti virali. Gli mRNA sono trasportati all'esterno del nucleo, nel citoplasma e tradotti in proteine.

I segmenti virali 1, 3, 4, 5 e 6 vengono trascritti in mRNA monocistronici e tradotti rispettivamente nelle proteine PB2, PA, HA, NP ed NA. I segmenti virali 2, 7 e 8 vengono trascritti ciascuno in due mRNA attraverso processi di *splicing*, dando origine rispettivamente alle proteine PB1/PB1-F2, M1/M2 e NS1/NS2 (Lamb and Krug, 2001; Chen *et al.*, 2004). I FLUAV utilizzano il meccanismo di *splicing* cellulare presente nel nucleo (Wagner *et al.*, 2008). Il vRNA a polarità negativa serve anche come template per la formazione di un filamento intermedio a polarità positiva (cRNA), utilizzato per la produzione delle nuove copie di RNA virale. Nel nucleo della cellula ospite l'RNA virale, viene assemblato con la proteina NP e la RNA polimerasi, con la formazione dei complessi RNP (Webster *et al.*, 1992; Horimoto and Kawaoka, 2001). Gli mRNA virali non possono fungere da intermedi replicativi poiché possiedono all'estremità 5' sequenze di origine cellulare, come risultato del processo di *cap snatching*, e sono troncati all'estremità 3' dove avviene la poliadenilazione (Kawaoka, 2006).

Contemporaneamente al processo di replicazione, i polipeptidi prodotti dalla traduzione dei geni di HA, NA e M2 vengono glicosilati nell'apparato del Golgi e trasportati a livello della membrana cellulare (Doms, 1993). A termine della replicazione, i nuovi vRNP sono esportati dal nucleo tramite l'attività delle proteine virali M1 e NEP. La M1 interagisce con i vRNA e con la NP, inibendo così l'attività trascrizionale dei vRNP. Successivamente, la NEP lega i complessi M1-vRNP e, contenendo un segnale di esporto nucleare, ne media l'uscita attraverso il poro nucleare (Nayak *et al.*, 2009). Sembra che la M1 agisca come ponte tra la membrana citoplasmatica e i complessi RNP, grazie alle sue capacità di interagire contemporaneamente con i lipidi di membrana, le code citoplasmatiche delle glicoproteine transmembrana (HA, NA e M2) e con i vRNP. Pertanto l'attività della M1 facilita la concentrazione dei componenti virali e l'allontanamento delle proteine della cellula dal sito di assemblaggio (*packaging*) (Nayak *et al.*, 2009). I nuovi virioni devono contenere tutti gli otto segmenti genomici per essere infettanti. In passato il *packaging* dei vRNP era considerato un processo casuale, in cui i segmenti erano incorporati a caso nel virione, possedendo un segnale comune di assemblaggio (*random-packaging*), ma studi più recenti suggeriscono che avvenga secondo un processo più selettivo (*selective-packaging*). Secondo questo modello ciascun segmento conterrebbe un segnale preciso per la sua incorporazione nel virione (Fujii *et al.*, 2005): anche la regolare disposizione spaziale degli RNP all'interno del virione supporta tale ipotesi (Noda *et al.*, 2006).

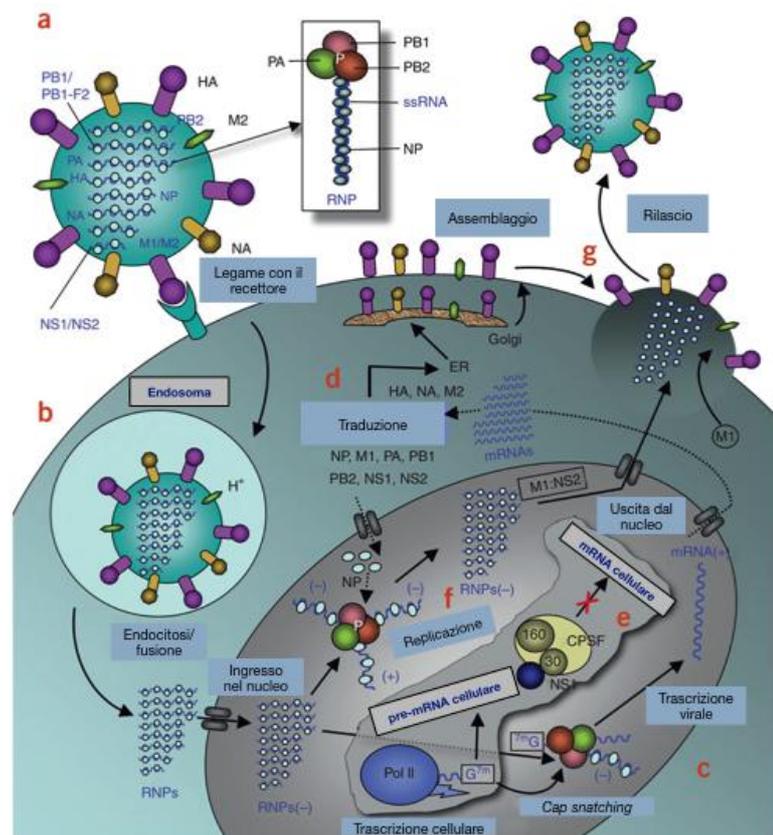
Le particelle virali neoformate sono rilasciate dalla cellula ospite mediante gemmazione (*budding*) (Figura 2). Anche in assenza di lisi cellulare, il rilascio continuo di particelle virali interferisce con la normale sintesi delle macromolecole cellulari portando, infine, alla morte della cellula (Sidorenko and Reichl, 2004). Nella fase finale del ciclo replicativo, per il rilascio dei nuovi virioni formati, è necessaria l'azione sialidasi della NA in grado di rimuovere i residui di acido sialico presenti sulla membrana cellulare e sulle proteine di superficie delle particelle virali. In questo modo l'HA non si lega all'acido sialico, impedendo alle particelle virali di aggregarsi tra loro e di aderire sulla membrana cellulare da cui i virioni sono gemmati (Yondola *et al.*, 2011).

L'ultimo stadio nella maturazione dei virus influenzali, determinante per l'infettività virale,

avviene normalmente in ambiente extracellulare e consiste nell'attivazione del precursore dell'emoagglutinina, la cosiddetta HA0, che viene clivata nelle 2 porzioni HA1 e HA2.

**Figura 2:** Modello del ciclo replicativo di FLUAV (da Das *et al.*, 2010, modificata).

(a) Struttura di un FLUAV generico. (b) *Adsorbimento* del virione (legame con il recettore ed ingresso nella cellula tramite vescicole endocitotiche) e fusione delle membrane endosomiale e virale, con rilascio dei vRNP nel citoplasma, poi trasportati all'interno del nucleo. (c) Nel nucleo, il complesso della polimerasi virale inizia la sintesi degli mRNA, sfruttando i frammenti di RNA 5'-*cap* clivati dai pre-mRNA della cellula (*cap snatching*). (d) Trasporto dei segmenti di mRNA virale nel citoplasma, dove sono tradotti in proteine. Le proteine di superficie HA, NA e M2 sono elaborate nel reticolo endoplasmatico (ER), glicosilate nell'apparato del Golgi e trasportate sulla membrana cellulare. (e) La proteina NS1 sopprime la produzione dell'mRNA cellulare, inibendo la processazione a livello dell'estremità 3' del pre-mRNA cellulare e l'aggiunta della coda di poli(A). (f) Replicazione dei complessi vRNP: il vRNA(-) è usato come stampo per la produzione di cRNA(+), da cui vengono sintetizzati gli RNA(-) virali, che associati alla NP e alla polimerasi andranno a formare i vRNP. I vRNP sono trasportati nel citoplasma tramite il complesso M1-NEP. (g) I vRNP raggiungono la membrana cellulare per essere incorporati nella nuova progenie di virioni, che vengono rilasciati per gemmazione. La NA rimuove mediante la sua attività sialidasi i residui di acido sialico presenti sull'HA e la NA dei nuovi virioni, che causerebbero l'aggregazione dei virus tra loro e l'adesione alla superficie cellulare.



## Fattori di virulenza

La patogenicità di FLUAV è determinata da un complesso multigenico, dovuta all'interazione di una costellazione di geni di un particolare ceppo con un ospite specifico. Sono note, comunque, alcune mutazioni genetiche in grado di influenzare l'*adsorbimento* e il ciclo replicativo del virus e di determinare resistenza ai farmaci anti-virali (Tabella 3), contribuendo all'espressione di un fenotipo altamente patogeno nell'animale infetto (Tscherne and Garcia-Sastre, 2011). Inoltre, sono stati evidenziati alcuni fattori associati alla trasmissione interspecifica di FLUAV: l'analisi genomica dei virus circolanti può dimostrarsi decisiva al fine di rilevare precocemente ceppi con potenziale zoonosico e pandemico (Romero-Tejeda and Capua, 2013).

*HA*. La proteina HA, la cui funzione è stata discussa in precedenza, ha un ruolo cruciale nell'adattamento a specie diverse. Gli influenza virus umani legano preferibilmente l'acido sialico associato allo zucchero in configurazione  $\alpha$ -2,6, presente nell'epitelio delle vie respiratorie superiori degli esseri umani, mentre quelli aviari l'acido sialico con legame  $\alpha$ -2,3, localizzato in particolare nell'epitelio intestinale degli uccelli. La variazione di alcuni residui aminoacidici può modificare la specificità verso il recettore di tipo umano o aviare.

Mutazioni in posizione Q226L e G228S (in base al sistema *H3 numbering*), di virus aviari appartenenti ai sottotipi H2 e H3, evidenziano un adattamento alla specie umana (Connor *et al.*, 1994). Per quanto riguarda l'HA del sottotipo H1, è stato dimostrato che i residui aminoacidici D190/D225 sono specifici per l'uomo, D190/G225 per il suino, mentre E190/G225 per le specie aviari (Christman *et al.*, 2011).

L'A(H1N1)pdm09, che ha causato la recente pandemia di influenza nella popolazione umana, possiede generalmente i residui D190/D225, sebbene in alcuni virus pandemici sia stata evidenziata una mutazione D225G/E, che sembra permetterne la trasmissione sia nell'uomo che nel suino (Chen *et al.*, 2010). Inoltre, è stata osservata l'associazione della mutazione D225G con lo sviluppo di forme cliniche severe in casi umani (Kilander *et al.*, 2010).

Studi recenti sul modello suino hanno evidenziato che la sostituzione S186P, nei virus H1N1pdm09, sia associata ad un aumento sia per quanto riguarda il titolo del virus eliminato che il periodo di eliminazione virale, favorendo la trasmissione all'interno della popolazione suina. La serina (S) in posizione 186 sembra indicare un adattamento del virus nell'uomo, mentre la prolina (P) un adattamento del virus dovuto alla circolazione all'interno di una popolazione suina (Lorusso *et al.*, 2014).

Un importante fattore di virulenza è rappresentato dalla presenza o meno, nel sito di clivaggio dell'HA, di aminoacidi basici multipli. La scissione del precursore HA<sub>0</sub> in HA<sub>1</sub> e HA<sub>2</sub> è indispensabile per l'esposizione del peptide di fusione, che porta allo scapsidamento del virione (Tscherne and Garcia-Sastre, 2011). La virulenza dei virus aviari ad alta patogenicità (HPAI, *highly pathogenic avian Influenza*) è strettamente correlata al tipo di enzimi di clivaggio in grado di attivare la proteina. Nei virus a bassa patogenicità (LPAI, *low pathogenic avian Influenza*), la scissione dell'HA è mediata da enzimi tripsina-simili, pertanto, l'infezione è limitata ai tessuti in cui questi sono presenti. Al contrario le HA degli H5 e H7 HPAI, con aminoacidi basici multipli, possono essere clivate da enzimi ubiquitari dell'ospite, permettendo infezioni sistemiche (Kawaoka and Webster; 1988).

*PB2*. Il complesso della polimerasi è stato riconosciuto come un importante fattore che contribuisce alla patogenicità virale, molto probabilmente per il controllo diretto sulla replicazione del vRNA. E' stato dimostrato che alcune sostituzioni aminoacidiche nella subunità PB2 sono in grado di variare la specificità d'ospite e la virulenza (Tscherne and Garcia-Sastre, 2011).

L'acido glutamico (E) in posizione 627 è generalmente riscontrato nei virus aviari, mentre quasi tutti quelli di origine umana hanno una lisina (K) in quella posizione. I virus H5N1 con mutazione E627K causano un'infezione sistemica e letale nei topi (Hatta *et al.*, 2001). Sono stati realizzati numerosi studi per capire esattamente come 627K aumenti la patogenicità e l'adattamento verso i mammiferi. Alcuni dati suggeriscono che determini la sensibilità alla temperatura della polimerasi e, pertanto, influenzi la replicazione del vRNA. I FLUAV dei mammiferi replicano nelle vie respiratorie superiori ad una temperatura approssimativa di 33°C, mentre i FLUAV aviari nel tratto intestinale a circa 41°C. L'attività della PB2 con sostituzione E627K risulta aumentata a temperature relativamente basse, permettendo un'efficiente replicazione virale nel tratto superiore delle vie respiratorie dei mammiferi (Hatta *et al.*, 2007).

La PB2 dell'H1N1pdm09 presenta in posizione 627 un acido glutamico, pertanto ci si aspetterebbe una ridotta attività della polimerasi nell'uomo, ma il virus replica in maniera efficiente, causando patologia, sia nell'uomo che nei modelli animali. Mehle e Doudna (2009) hanno dimostrato la presenza di mutazioni in siti secondari, capaci di compensare la mancanza della mutazione E627K. La presenza del polimorfismo SR in posizione 590-591 determina un'attività della PB2 pari a quella con mutazione E627K. In aggiunta, la sola sostituzione Q591K determina non solo un aumento dell'attività della polimerasi, ma anche un incremento della replicazione virale e della virulenza nel modello animale (Yamada *et al.*, 2010).

Inoltre, è stato osservato che una sostituzione in posizione D701N causi un aumento della virulenza nei mammiferi, con un incremento della replicazione virale e della localizzazione nucleare della PB2, molto probabilmente dovuta ad un'interazione facilitata con l'importina  $\alpha 1$  (Gabriel *et al.*, 2008).

*PB1-F2*. Questa proteina sembra avere un ruolo importante nell'infezione primaria di FLUAV e nella promozione di infezioni secondarie batteriche (McAuley *et al.*, 2007). La PB1-F2 è generalmente espressa in tutti i FLUAV aviari (96%), mentre si può presentare in forma tronca nell'uomo e nel suino. Zell (2007) ha rilevato le proteine di lunghezza pari e superiore ai 79 aa nei mitocondri, mentre le forme tronche più corte espresse solo nel citoplasma: questo sembra suggerire una perdita della capacità apoptotica delle forme tronche. La PB1-F2 della maggior parte dei virus H1N1pdm09 termina dopo soli 11 aa, anche se sono state isolate forme mutate di 57 aa (Dundon, 2012).

E' stato evidenziato nell'H5N1 e nell'H1N1 pandemico del 1918, che l'asparagina (N) in posizione 66 attenua la patogenicità nei topi, mentre l'introduzione della mutazione N66S accresce la severità della sintomatologia, i titoli virali nei polmoni e la produzione di citochine (Conenello *et al.*, 2007).

*NP*. La mutazione V100I nel gene della NP sembra essere associata all'incremento dell'infettività e della trasmissione nella popolazione umana (Pan *et al.*, 2010).

*NA*. Una replicazione virale ottimale richiede un equilibrio funzionale tra l'affinità di legame dell'HA con l'acido sialico e l'attività enzimatica della NA, che scinde il legame. Questo equilibrio può essere alterato da una serie di eventi, quali il riassortimento, l'introduzione in un nuovo ospite e la terapia antivirale (Tscherne and Garcia-Sastre, 2011).

La NA, dei primi isolati umani del virus pandemico H2N2 del 1957, mostrava maggiore affinità per i substrati  $\alpha 2,3$ , ma era associata ad una HA che legava i recettori con acido sialico combinato al galattosio in configurazione  $\alpha 2,6$ . Negli anni, la NA dei virus H2N2 ha acquisito la capacità di clivare sia i substrati  $\alpha 2,3$  che quelli  $\alpha 2,6$ , adattandosi alla specificità recettoriale dell'HA e permettendo, pertanto, un rilascio più efficiente dei virioni dalla superficie cellulare (Baum and Paulson; 1991).

L'oseltamivir è un farmaco anti-influenzale appartenente alla classe degli inibitori della neuraminidasi, capace di legare il sito attivo della NA, impedendo il rilascio dei virioni.

Le sostituzioni H274Y o N294S (N2 *numbering*), solitamente evidenziate nei virus appartenenti al sottotipo N1, ed E119V o R292K, nel sottotipo N2, sono associate allo sviluppo di resistenza all'antivirale oseltamivir (Webster and Govorkova, 2014). La mutazione H274Y per anni è stata considerata non clinicamente rilevante, poiché oltre alla resistenza all'antivirale, causa una riduzione della *fitness* del virus (Ives *et al.*, 2002). Recentemente sono state dimostrate mutazioni secondarie della NA (R194G; R222Q; V234M) che, se associate alla resistenza H274Y, ne controbilanciano la perdita di *fitness* (Bloom *et al.*, 2010).

*M2*. I farmaci antinfluenzali della classe degli adamantani impediscono l'apertura del canale ionico, legandosi alla proteina M2, e, di conseguenza, interferiscono con lo scapsidamento virale (Salter *et al.*, 2011). E' stato dimostrato che le sostituzioni in posizione G16E, L26I, V27A, A30T, S31N, G34E e R77Q determinano la resistenza a questi antivirali; inoltre anche le mutazioni V27I, V27T e V27S, sebbene meno frequenti, sono *marker* di resistenza agli adamantani (Grayson *et al.*, 2010; Griffin, 2013). La sostituzione più comunemente osservata è S31N, presente, inoltre, con un'elevata prevalenza in tutti e tre i sottotipi (H1N1, H3N2, H1N2) di FLUAV circolanti nella popolazione suina europea (Krumbholz *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013). Le mutazioni causano una riduzione dell'affinità del farmaco con il sito di legame sulla M2 o un allargamento del canale ionico.

*NSI*. Questa proteina è un antagonista dell'IFN e modula la regolazione della risposta immunitaria innata dell'ospite. *In vitro* la sostituzione dell'acido aspartico (D) con l'acido glutamico (E), in posizione 92, permette la replicazione virale in presenza di IFN (Seo *et al.*, 2002).

**Tabella 3:** Fattori di virulenza di FLUAV.

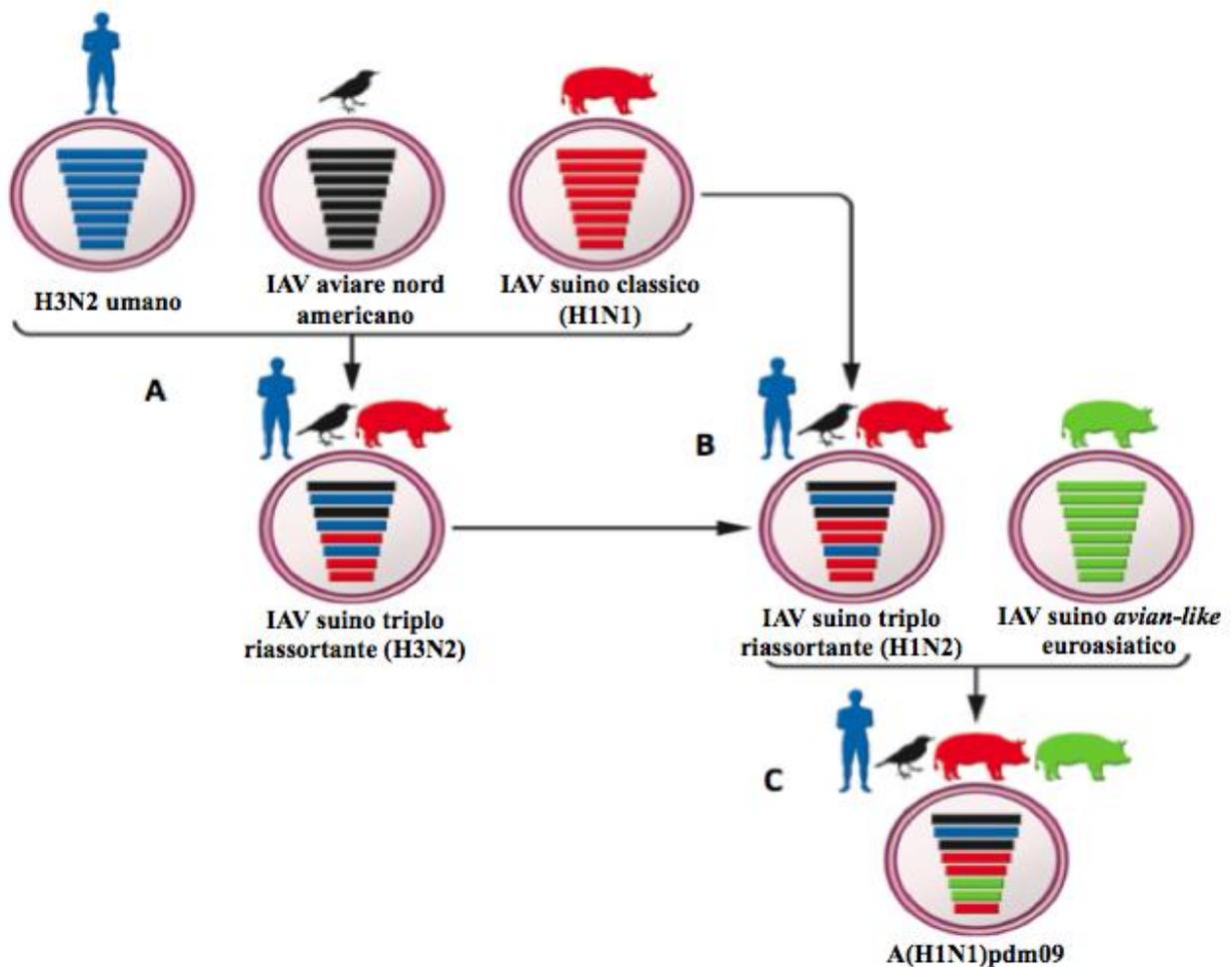
Proteine	Fattori di virulenza	
	Mutazione	Effetto
<b>PB2</b>	E627K	Aumento dell'attività della polimerasi a basse temperature. Importante per lo spettro d'ospite.
	D701N	Interazione facilitata con l'importina $\alpha 1$ . Incremento della localizzazione nucleare della PB2.
	G590S Q591R/K	Polimorfismo SR in posizione 590-591 coinvolto nell'adattamento nei mammiferi, compensa la mancanza della mutazione E627K. Q591K determina un aumento della replicazione e della virulenza nei topi.
<b>PB1-F2</b>	N66S	Incremento della patogenicità nel modello animale
<b>HA</b>	D190/D225	Specificità recettore di tipo-umano
	D190/G225	Specificità recettore di tipo-suino
	E190/G225	Sottotipo H1 Specificità recettore di tipo-aviare
	D225G/E	Doppio spettro d'ospite, trasmissione nell'uomo e nel suino
	D225G	
	S186P	Aumento della patogenicità nell'uomo
	Q226L G228S	Sottotipi H2, H3 Adattamento al recettore di tipo-umano
	Sito di clivaggio con aa basici multipli	Attivazione dell'HA tramite enzimi ubiquitari nell'ospite, infezione sistemica, HPAI.
<b>NP</b>	V100I	Aumento della trasmissibilità nella popolazione umana
<b>NA</b>	H274Y N294S	Resistenza all'oseltamivir nel sottotipo N1
	E119V R292K	Resistenza all'oseltamivir nel sottotipo N2
<b>M2</b>	G16E L26I V27A/I/S/T A30T S31N G34E R77Q	Resistenza agli antinfluenzali della classe degli adamantani
<b>NS1</b>	D92E	Permette la replicazione virale in presenza di IFN

## Genetic drift and shift

Una caratteristica tipica degli Influenza A virus è la loro grande variabilità, dovuta principalmente a due meccanismi: *genetic drift* (deriva genetica) e *genetic shift* (riassortimento). Con *genetic drift* si intende il processo di accumulo di sostituzioni nucleotidiche nel tempo, dovuto alla mancanza di attività di *proofreading* della polimerasi virale. Il tasso di sostituzione di FLUAV varia da  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  sostituzioni/sito/ciclo replicativo in funzione degli autori (Parvin *et al.*, 1986; Stech *et al.*, 1999; Nobusawa and Sato; 2006). In base alla lunghezza del genoma di circa 13600 nt, dall'1% al 10% della progenie virale ha una sostituzione. In passato si calcolavano tassi di sostituzione perfino più alti (Yewdell *et al.*, 1979; Holland *et al.*, 1982). La maggior parte delle sostituzioni sono cosiddette neutre, ossia non causano cambiamenti della sequenza amminoacidica o, se lo fanno, non alterano la *fitness* della progenie virale. Infatti, la maggior parte degli aminoacidi delle proteine di FLUAV subisce una regolazione negativa (selezione stabilizzante): le sostituzioni di tali aminoacidi causano una riduzione della *fitness* virale e sono portate avanti solo in presenza di pressione selettiva, quale, ad esempio, un cambiamento dell'ospite. Solo pochi siti sono regolati positivamente. Una selezione positiva, detta anche selezione diversificante, aumenta l'eterogeneità del *pool* genico. Un esempio di regolazione positiva è il cambiamento graduale dei siti antigenici dell'HA, noto anche come "*antigenic drift*". Le sostituzioni, che risultano in varianti capaci di evadere la risposta immunitaria, hanno una maggiore probabilità di infettare anche gli ospiti precedentemente immunizzati (Zell *et al.*, 2013). Sono stati identificati 18 codoni del dominio dell'HA<sub>1</sub> selezionati positivamente (Bush *et al.*, 1999a, b). Sebbene l'*antigenic drift* dell'HA possa essere importante e facilmente investigato con prove sierologiche, le sostituzioni avvengono in tutti i geni dei virus influenzali con la stessa frequenza. Pertanto, l'intero genoma è sottoposto a *genetic drift* piuttosto che *antigenic drift*. A seconda della selezione positiva o negativa esercitata su ciascun gene, varia la relazione tra sostituzioni sinonime e non-sinonime (Zell *et al.*, 2013).

Il secondo importante meccanismo di variabilità genetica di FLUAV è il riassortimento: scambio di uno o più segmenti genici. Il riassortimento è un processo di grande importanza biologica, poiché porta alla formazione di nuove combinazioni di segmenti, permettendo un rapido adattamento virale a condizioni ambientali variate. Il riassortimento può avvenire naturalmente o essere sperimentalmente indotto (Kilbourne, 1968) ed è reso possibile dal fatto che il genoma di FLUAV sia segmentato. Nel caso in cui una cellula dell'ospite sia infettata contemporaneamente da due o più ceppi di virus influenzali, appartenenti a sottotipi o *lineage* differenti, durante l'assemblaggio delle nuove particelle virali, si possono formare virioni con assetti genomici diversi da quelli parentali. Gli eventi di riassortimento che coinvolgono scambi dei geni dell'HA e della NA sono particolarmente importanti poiché vanno a modificare l'assetto antigenico virale: *antigenic shift*. Inoltre, il riassortimento può verificarsi tra virus di derivazione da specie diverse, evento che può portare all'introduzione in una popolazione virale di geni adattati ad un'altra specie (Figura 3). Oltre allo scambio dei geni dell'HA e della NA, anche gli altri segmenti genici possono riassortire indipendentemente (Zell *et al.*, 2013).

**Figura 3:** Esempio di riassortimento genico tra ceppi virali di derivazione da specie diverse: origine del virus A(H1N1)pdm09. A) Influenza A virus (IAV) suino H3N2, triplo riassortente del Nord America: riassortimento da un ceppo di H3N2 di influenza stagionale umana, un ceppo aviare del Nord America e un ceppo di influenza suina classica (H1N1). B) Triplo riassortante H1N2 derivante dal triplo riassortante H3N2 con scambio dell'HA con il virus di influenza suina classica (H1N1). C) A(H1N1)pdm09 derivante dal riassortimento dei segmenti genici del triplo riassortante H1N2 e un virus suino euroasiatico *avian-like* (scambio di NA e MP) (da Tscherne and Garcia-Sastre, 2011, modificato).



## Epidemiologia

### Influenza A virus nel suino

FLUAV è considerato uno dei principali agenti eziologici responsabili delle patologie respiratorie del suino. L'infezione è endemica in tutto il mondo ed è responsabile di un considerevole danno economico dovuto ad una riduzione della produttività dei soggetti colpiti. L'influenza suina fu descritta per la prima volta negli Stati Uniti nel 1918 (Koen, 1919), in concomitanza con la pandemia di influenza nella popolazione umana. Alcuni studi sembrano dimostrare che il virus, c.d. influenza suina classica H1N1, sia stato trasmesso dall'uomo al suino (Reid *et al.*, 1999).

Negli Stati Uniti e in Europa, storicamente la patologia presentava una spiccata stagionalità, con un picco principale in autunno e uno minore in primavera. Condizioni ambientali di freddo-umido sembrano favorire la sopravvivenza e la diffusione del virus tramite aerosol. Oggi è possibile evidenziare l'infezione durante tutto l'anno, probabile conseguenza delle attuali tecniche di allevamento intensivo, che prevedono un'elevata densità di animali, con un continuo ricambio di soggetti *naïve* (cioè mai venuti a contatto con l'agente eziologico) nella popolazione (Zell *et al.*, 2013).

L'epidemiologia dell'influenza virus suino (SIV, *swine influenza virus*), negli anni, è stata peculiare. Si è assistito a periodici scambi di virus o geni virali tramite riassortimento genetico e/o trasmissione interspecie. L'analisi di tutti i lignaggi di SIV, diventati stabili ed endemici nella popolazione suina, ha dimostrato la loro origine dalle specie aviarie o dall'uomo. E' frequente la co-circolazione di diversi SIV nel medesimo allevamento, con la possibile formazione ed emergenza di nuovi ceppi virali, capaci di trasmettersi e diffondersi tra i suini. Vi è un continuo processo di scambio genetico tra varianti dello stesso virus, mentre, più raramente, occorre tra sottotipi diversi, con la formazione di genotipi o fenotipi nuovi (Brown, 2013).

Al contrario dell'influenza virus umano, l'evoluzione dei SIV è influenzata solo limitatamente dalla pressione selettiva esercitata dal sistema immunitario dell'ospite, a causa della ridotta durata della vita degli animali in allevamento (circa 6 mesi, fino a 9 in Italia). Solo i riproduttori adulti vivono abbastanza a lungo da essere infettati più volte nel corso della vita, creando un certo grado di pressione immunitaria (de Jong *et al.*, 2007).

Nella tabella 4 sono sinteticamente descritti i principali lignaggi di SIV circolanti in Europa, Nord America ed Asia, i continenti di maggiore interesse per la diffusione dei SIV, essendo i principali produttori di carne suina.

L'influenza suina classica fu evidenziata in Europa nel 1976, in suini importati dagli Stati Uniti in Italia (Nardelli *et al.*, 1978). Il virus circolò in diversi Paesi europei per circa 15 anni, fino a quando fu soppiantato da un virus H1N1 di origine aviare, che si diffuse nella popolazione suina nei primi anni '80. L'ultimo isolamento del virus dell'influenza suina classica in Europa risale al 1993 in Inghilterra (Brown *et al.*, 1997). Nel gennaio del 1979, in Belgio, fu isolato per la prima volta nel suino un virus appartenente ad un sotto-lignaggio H1N1 diverso dall'H1N1 classico (cH1N1) (Pensaert *et al.*, 1981). La caratterizzazione molecolare del virus ha dimostrato la derivazione di tutti i segmenti genici da un FLUAV H1N1 aviare (Scholtissek *et al.*, 1983), per questo definito *avian-like*. In breve tempo l'H1N1 *avian-like* si è diffuso, diventando stabile

ed endemico, in tutti i Paesi maggiori produttori di carne suina in Europa, riuscendo a sostituire il cH1N1 (Zell *et al.*, 2013). Questo sottotipo è largamente diffuso, ma la sieroprevalenza varia considerevolmente in funzione del Paese considerato. In seguito alla pandemia influenzale di Hong Kong del 1968, in Asia fu isolato nel suino un virus H3N2 di derivazione umana (Miwa *et al.*, 1987). In Europa, il primo SIV H3N2, c.d. *human-like*, fu evidenziato in Germania nel 1982: presentava HA e NA derivati da un virus influenzale stagionale umano, mentre i geni interni da un H1N1 *avian-like*. Questo SIV non riuscì ad adattarsi e, presto, scomparve. Un altro virus con una costellazione genica simile al precedente, di nuovo risultato di un riassortimento tra un H3N2 umano e un SIV H1N1 *avian-like*, apparve intorno al 1984 e si diffuse rapidamente nella popolazione suina (Zell *et al.*, 2013). Nella maggior parte dei Paesi europei la sieroprevalenza del SIV H3N2 *human-like* è più bassa rispetto all'H1N1 *avian-like* e solo nelle zone del Sud Europa sembrano diffusi in egual misura (Van Reeth *et al.*, 2008; Simon-Grifé *et al.*, 2011).

Nel 1987 in Bretagna, Francia, fu isolato nel suino un virus appartenente al sottotipo H1N2, con l'HA derivata da un H1N1 *avian-like* e la NA da un H3N2 *human-like*: questo virus non si diffuse in Europa, ma l'infezione rimase limitata all'allevamento d'origine. Un altro virus H1N2 emerse nel 1994 nel Regno Unito: il ceppo riuscì ad adattarsi e divenne endemico in Europa. Questo SIV è il risultato di ripetuti fenomeni di riassortimento che hanno coinvolto un virus influenzale H1N1 stagionale umano (HA), un H3N2 stagionale umano (NA) e un SIV H1N1 *avian-like* (geni interni) e, pertanto definito H1N2 riassortante *human-like* (Zell *et al.*, 2013). In Danimarca, Svezia, Germania ed Italia sono stati isolati SIV H1N2 riassortanti con HA *avian-like* (Balint *et al.*, 2009; Metreveli *et al.*, 2011; Harder *et al.*, 2013; Trebbien *et al.*, 2013).

Nel settembre del 2009 fu per la prima volta evidenziato l'H1N1pdm09 nei suini europei: il primo caso documentato si è verificato in Irlanda del Nord, in un allevamento di suini all'ingrasso con sintomatologia respiratoria (Welsh *et al.*, 2010). L'H1N1pdm09, che ha causato la recente pandemia nella popolazione umana, ha una costellazione genica unica, con sei segmenti (PB2, PB1, PA, HA, NP, NS) derivati dal SIV triplo riassortante che circola in Nord America e due (NA e MP) derivati dal SIV H1N1 *avian-like* euroasiatico (Dawood *et al.*, 2009). In Italia la prima epidemia causata dall'H1N1pdm09 è stata segnalata nel novembre del 2009 in un allevamento di suini da riproduzione in Lombardia (Moreno *et al.*, 2010).

Dagli anni '90 l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) attua in modo sistematico un programma di sorveglianza nei suini italiani, basato sul monitoraggio di tutti gli agenti eziologici di forme respiratorie. Tra il 1998 e il 2012 è stata evidenziata la costante co-circolazione dei SIV appartenenti ai sottotipi H1N1, H3N2 e H1N2 e, dal 2009, dell'H1N1pdm09. Il sottotipo più frequentemente rilevato è stato l'H1N1 *avian-like*, seguito dall'H3N2 *human-like*. Il sottotipo H1N2 fu isolato in Italia per la prima volta nel 1998, ma negli ultimi anni gli isolamenti sono stati sempre più frequenti, con una prevalenza pari a quella dell'H1N1 *avian-like* (Moreno *et al.*, 2013). Dal 2003 si è diffuso in Italia un gruppo di riassortanti H1N2, con una costellazione genica formata da sette segmenti derivati dal SIV H1N2 *human-like* europeo e la NA da un virus influenzale stagionale H3N2 umano (Zell *et al.*, 2013). Sembra che dal 2003 in Italia non siano più circolati ceppi con una NA-N2 appartenente al gruppo dei SIV H1N2 europei, ma sono stati caratterizzati solo virus con NA correlata ai FLUAV H3N2 umani o suini (Moreno *et al.*, 2013). Inoltre, come in altri Paesi europei, si è evidenziata la circolazione di ceppi H1N2 riassortanti con HA-H1 *avian-like*.

**Tabella 4:** Origine e breve caratterizzazione dei principali lignaggi di SIV circolanti in Europa, Nord America e Asia. I ceppi riassortanti sono indicati con *r*, i tripli riassortanti con *tr* (da Van Reeth and Ma (2013), modificato).

Continente	Anno di introduzione	Sottotipo/ lignaggio	Origine dei geni	Commenti
<b>Europa</b>	1979	H1N1 <i>avian-like</i>	Tutti gli otto segmenti genici di origine aviare.	
	1984	rH3N2	HA e NA da un FLUAV H3N2 umano; geni interni da un SIV H1N1 <i>avian-like</i> .	Evidenza dagli anni '70 di virus tipo A/Hong Kong/68(H3N2) di origine interamente umana.
	1994	trH1N2	HA da un FLUAV H1N1 umano; NA da un FLUAV H3N2 umano; geni interni da un SIV H1N1 <i>avian-like</i> .	
	2009	H1N1pdm09	H1N1pdm09 originato in America.	
<b>Nord America</b>	1918	cH1N1/ gruppo- $\alpha$	Influenza virus H1N1 pandemico del 1918.	Trasmissione uomo-suino; primo isolamento dal suino nel 1930.
	1998	trH3N2	PB1, HA e NA da un FLUAV H3N2 umano; NP, MP e NS da un SIV cH1N1; PB2 e PA da un FLUAV aviare.	Quattro gruppi filogenetici: I-IV.
	2000-2002	rH1N1 e rH1N2/ gruppo- $\beta$ e - $\gamma$	HA e NA da un SIV cH1N1, geni interni da un SIV trH3N2 (TRIG, <i>triple reassortant internal genes</i> ).	Gruppi filogenetici - $\beta$ e - $\gamma$ dell'HA-H1 del cH1N1.
	2003-2005	rH1N1 e rH1N2 human-like/ gruppo- $\delta$	HA e NA da FLUAV H1N1 e H1N2 umani; costellazione TRIG.	Due sottogruppi: $\delta$ 1 e $\delta$ 2.
	2009	H1N1pdm09	NA e MP da un SIV H1N1 <i>avian-like</i> europeo; gli altri geni da un SIV rH1N2/ gruppo- $\gamma$ .	
<b>Asia</b>	1969	H3N2 <i>human-like</i>	Influenza virus di Hong Kong H3N2 pandemico del 1968.	
	1974	cH1N1	Influenza virus H1N1 pandemico del 1918.	
	1999	rH3N2	rH3N2 europeo.	Circoscritto nel sud della Cina.
	2001	H1N1 <i>avian-like</i>	H1N1 <i>avian-like</i> europeo.	Sottotipo predominante.
	2002-2004	rH1N2 e trH3N2	rH1N2 e trH3N2 del Nord America.	
	2007	rH1N1 <i>avian-like</i>	NS da un SIV con costellazione TRIG; gli altri geni da un SIV H1N1 <i>avian-like</i> europeo.	Prevalenza di questa variante in aumento all'interno del gruppo dell'H1N1 <i>avian-like</i> europeo negli ultimi anni.
	2009	H1N1pdm09	H1N1pdm09 originato in America.	

Fin dalla sua prima evidenza nel 1918, per quasi un secolo, l'unico SIV isolato negli Stati Uniti è stato il virus dell'influenza suina classica H1N1. Nel 1998 si osservarono in numerosi Stati americani severe epidemie di influenza: furono isolati due diversi SIV riassortanti appartenenti al sottotipo H3N2. Il primo era un doppio riassortante con PB2, PA, NP, MP e NS derivati dal cH1N1, mentre PB1, HA e NA da un virus influenzale H3N2 umano. Il secondo era il risultato di un triplo riassortimento tra un SIV cH1N1 (NP, MP e NS), un virus influenzale stagionale H3N2 umano (PB1, HA e NA) e un FLUAV aviare (PB2 e PA) (Zhou *et al.*, 1999). Il doppio riassortante H3N2 scomparve rapidamente, mentre il triplo riassortante (trH3N2) si è stabilito e diffuso nella popolazione suina degli Stati Uniti (Webby *et al.*, 2000). L'analisi genetica ed antigenica dei virus trH3N2, isolati a partire dal 1998, evidenzia almeno tre diverse introduzioni del gene dell'HA-H3 da FLUAV umani, con la formazione di tre gruppi filogenetici (I, II e III). I SIV trH3N2 appartenenti al III gruppo sono divenuti predominanti in Nord America e, sottoposti a una continua evoluzione, hanno generato delle varianti che possono essere suddivise in un IV gruppo filogenetico (Olsen *et al.*, 2006a; Gramer *et al.*, 2007). La costellazione dei geni interni è comune a tutti i trH3N2, con NP, MP e NS originati dal cH1N1, PB2 e PA da un virus aviare e la PB1 da un virus H3N2 umano: questa particolare combinazione genica viene detta TRIG (*triple reassortant internal genes*) e sembra fornire un vantaggio nell'infezione dell'ospite suino, ai virus che la possiedono (Vincent *et al.*, 2008).

Negli anni il trH3N2 non solo è diventato endemico, ma ha subito ulteriori fenomeni di riassortimento con il SIV cH1N1, dando origine ai nuovi riassortanti H1N1 (rH1N1) e H1N2, che presentano anch'essi la costellazione TRIG. Il SIV rH1N1 presenta HA e NA originati dal cH1N1, mentre il SIV H1N2 contiene sette geni di derivazione dal trH3N2 (NA e TRIG) e l'HA dal cH1N1 (Karasin *et al.*, 2002; Webby *et al.*, 2004). In base all'analisi filogenetica dell'HA-H1 del SIV cH1N1, questi virus vengono suddivisi in tre gruppi detti  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Vincent *et al.*, 2009a). Inoltre dal 2003, sono stati isolati virus riassortanti contenenti il TRIG, che presentano i geni che codificano per le glicoproteine di superficie, originati da virus influenzali stagionali H1N1 e H1N2 umani. Questi due nuovi lignaggi dei SIV H1 sono stati assegnati a due gruppi filogenetici, detti  $\delta 1$  e  $\delta 2$  (Vincent *et al.*, 2009a). Dalla loro comparsa sono divenuti endemici nella popolazione suina e, oggi, sono tra i sottotipi più frequentemente isolati negli Stati Uniti (Lorusso *et al.*, 2013).

In conseguenza del recente e rapido sviluppo economico, la domanda crescente di carne nei Paesi asiatici ha causato un incremento dell'allevamento intensivo, con frequente importazione di suini riproduttori sia dall'Europa sia dagli Stati Uniti. La movimentazione di animali vivi riveste un importante ruolo nell'introduzione di nuovi SIV in una popolazione suina immunologicamente *naïve*. Ad oggi circa il 60% dell'allevamento suino globale è localizzato in Asia e, solamente in Cina, più del 40% (Zhu *et al.*, 2013).

Il virus dell'influenza suina classica fu isolato per la prima volta in Asia circa a metà degli anni '70 (Shortridge and Webster, 1979). In quello stesso periodo, in seguito alla pandemia influenzale di Hong Kong del 1968, furono evidenziate nella popolazione suina diverse varianti di virus H3N2, che presentavano una costellazione genica interamente di origine umana (Shortridge and Webster, 1979; Peiris *et al.*, 2001). Alla fine degli anni '90, il riassortante H3N2 *human-like* europeo fu introdotto in Cina, molto probabilmente da suini riproduttori importati dalla Danimarca (Gregory *et al.*, 2001); la circolazione del virus sembra limitata alla provincia di Guangdong, nel sud della Cina, non essendo stata riportata in altri Paesi asiatici (Zhu *et al.*,

2013). Ad Hong Kong, nel 2001, fu per la prima volta isolato il SIV H1N1 *avian-like* europeo da suini importati dal sud della Cina. Come accaduto in Europa, in pochi anni il virus è diventato endemico, sostituendo il SIV cH1N1 e dal 2006 è diventato il sottotipo prevalente tra quelli circolanti in Asia (Vijaykrishna *et al.*, 2011). Inoltre è stata evidenziata la presenza dei ceppi tripli riassortanti americani trH3N2 e H1N2, dell'H1N1pdm09 e di numerose varianti riassortanti originate dalla co-circolazione di questi virus. A dispetto di ciò, l'unico riassortante che è diventato endemico è un ceppo originato dall'H1N1 *avian-like* europeo, da cui ha ereditato sette segmenti genici, e da un virus triplo riassortante americano, da cui deriva il gene della NS (Vijaykrishna *et al.*, 2011).

### **Trasmissione interspecie tra uomo e suino**

Durante gli ultimi decenni le pratiche di allevamento suino sono cambiate considerevolmente, con il passaggio da piccole aziende agricole a conduzione familiare all'allevamento intensivo su larga scala. Questo ha portato ad un incremento dei contatti tra uomo e suino, aumentando la probabilità di trasmissione interspecifica. Il personale che lavora in queste strutture rappresenta il ponte di comunicazione maggiore tra i due gruppi: i lavoratori sono una popolazione *naïve* rispetto ai SIV e, inoltre, possono introdurre FLUAV di origine umana in allevamento, con la possibile formazione di nuovi virus riassortanti in entrambe le specie (Krueger and Gray, 2013).

Il primo caso umano documentato di infezione causata da SIV risale al 1958 (Gray *et al.*, 2012; Krueger and Gray, 2013) e, da allora, sono state evidenziate in maniera costante sporadiche infezioni di SIV nell'uomo (Krueger and Gray, 2013). Tra i casi riportati spicca l'episodio di Fort Dix (New Jersey, Stati Uniti) del 1976, in cui numerosi soldati vennero infettati con il virus dell'influenza suina classica. Fu il primo episodio di trasmissione da uomo a uomo di SIV su larga scala: cinque casi furono confermati con isolamento virale, ma analisi sierologiche condotte in seguito identificarono ben 230 ulteriori casi sospetti di infezione (Gaydos *et al.*, 1977). Nel 2009 un FLUAV appartenente al sottotipo H1N1, originato nella popolazione suina, ha causato la prima pandemia di questo secolo (Garten *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009). Recentemente, inoltre, sono stati evidenziati numerosi casi di trasmissione all'uomo di varianti del SIV trH3N2 nordamericano, che presentavano il gene codificante la MP derivato dall'H1N1pdm09 (Nelson *et al.*, 2012). Generalmente in seguito alla trasmissione di SIV all'uomo non è osservato, se non in rari casi, lo stabilirsi di un'efficiente trasmissione del virus all'interno della popolazione umana (Krueger and Gray, 2013).

In numerose occasioni si è verificata l'introduzione nella popolazione suina di FLUAV da parte dell'uomo: il primo episodio descritto fu la trasmissione dell'H1N1 pandemico del 1918, con la formazione del virus dell'influenza suina classica (Koen, 1919). E' stata evidenziata la presenza nel suino, sia in Europa sia in Asia, del FLUAV H3N2 pandemico di Hong Kong (Ottis *et al.*, 1982; Miwa *et al.*, 1987) e, recentemente, sono stati descritti numerosi episodi di trasmissione inversa di ceppi di H1N1pdm09 all'interno di allevamenti suinicoli (Howden *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2010).

Un recente studio filogenetico ha dimostrato che, durante l'ultimo secolo, sono stati introdotti frequentemente FLUAV da popolazioni umane a popolazioni suine e che, almeno in venti

occasioni, il virus abbia circolato stabilmente nella popolazione suina, per almeno un anno dopo l'introduzione (Nelson *et al.*, 2014).

### **Influenza A virus nell'uomo**

I virus influenzali sono una delle cause più frequenti di infezioni respiratorie nell'uomo. Nella popolazione umana, durante lo scorso secolo, hanno circolato ampiamente i virus appartenenti ai sottotipi H1N1, H3N2, H2N2 e H1N2, sebbene attualmente siano diffusi nella popolazione solo i sottotipi H1N1 e H3N2. Le epidemie influenzali che si registrano ogni anno (la c.d. influenza stagionale) interessano il 10-20% della popolazione, con una maggiore incidenza di infezione e insorgenza di sintomatologia respiratoria severa in alcuni gruppi a rischio e specifiche classi di età (bambini, anziani e malati cronici). Occasionalmente possono insorgere pandemie (epidemie su scala globale), in cui il virus si diffonde rapidamente grazie ad un'efficiente trasmissione persona-persona nella popolazione umana, priva dell'immunità specifica verso quel particolare ceppo virale. Ogni anno, sono attribuiti all'influenza stagionale circa 250-500 mila decessi: la mortalità totale causata dalle epidemie, nel periodo che intercorre tra lo scoppio di pandemie influenzali, può essere pari alla mortalità che si verifica durante una pandemia (Kawaoka and Neumann, 2012).

Nel 1918 un FLUAV H1N1 ha dato origine alla peggiore pandemia da virus influenzale dell'età moderna, la c.d. influenza spagnola; si stima che siano morte più di 50 milioni di persone. Mediante tecniche di genetica inversa (*reverse-genetic*) è stato ricreato in laboratorio il virus, ottenuto da campioni conservati in formalina o preservati nel *permafrost* dell'Artico da soggetti deceduti a causa dell'infezione (Tumpey *et al.*, 2005). L'analisi genomica ha evidenziato l'origine aviaria di tutti i segmenti genici. Il virus è diventato endemico, ripresentandosi, con ricorrenza stagionale, per circa 40 anni, fino a quando fu sostituito dalla diffusione del FLUAV che causò la successiva pandemia, la c.d. influenza asiatica (Kawaoka *et al.*, 1989).

Nel 1957, un virus appartenente al sottotipo H2N2, derivato da un riassortimento dell'H1N1 circolante con un FLUAV H2N2 aviaria, ha dato origine ad una epidemia nel sud della Cina, con successiva diffusione dell'infezione a livello mondiale in pochi mesi. Il virus dell'influenza asiatica presentava i geni codificanti HA, NA e PB1 derivati dal FLUAV aviaria. Si stima che siano morte in quest'occasione circa un milione di persone (Scholtissek *et al.*, 1978; Kawaoka *et al.*, 1989).

La pandemia del 1968, c.d. influenza di Hong Kong, fu causata da un FLUAV appartenente al sottotipo H3N2, risultato di un riassortimento tra il ceppo H2N2 circolante e un FLUAV aviaria, da cui ha ereditato i geni codificanti per HA e PB1. La mortalità fu di minore entità rispetto alle precedenti pandemie, probabilmente a causa della presenza nella popolazione di un'immunità parziale: gli anticorpi anti-neuraminidasi preesistenti, pur non prevenendo l'infezione, riducevano la durata e la severità della malattia (Kilbourne, 2006). Il virus divenne presto endemico, andando a sostituire l'H2N2, e continua a circolare ancora oggi nella popolazione, sebbene l'emergenza del FLUAV H1N1pdm09 abbia causato una riduzione della prevalenza (Morens and Taubenberger, 2009).

Un FLUAV appartenente al sottotipo H1N1, discendente dall'H1N1 pandemico del 1918, fu reintrodotta nel nord della Cina nel 1977; si diffuse in breve tempo in Russia (pertanto definita influenza russa) e in seguito nel resto del mondo (Wright *et al.*, 2007). Il virus riemerse dopo 20 anni di assenza, sostanzialmente immutato dalla sua scomparsa: questo ha fatto ipotizzare un probabile rilascio accidentale di un virus da un laboratorio (Nakajima *et al.*, 1978; Taubenberger and Kash, 2010). La morbilità fu limitata esclusivamente ai soggetti di età inferiore ai 25 anni, che non presentavano un'immunità preesistente verso i FLUAV H1N1 (Wright *et al.*, 2007). Da allora i sottotipi H1N1 e H3N2 co-circolano nella popolazione umana (Scholtissek *et al.*, 1978).

Nel febbraio del 2009, si è registrato in Messico un aumento del numero delle patologie simil-influenzali. In breve tempo fu isolato un nuovo virus appartenente al sottotipo H1N1, quale agente eziologico responsabile dell'epidemia. L'analisi genetica evidenziava l'origine suina del virus, risultato di un riassortimento tra il SIV riassortante H1N2 americano e il SIV H1N1 *avian-like* europeo, come soprariportato in dettaglio. L'infezione si diffuse in breve tempo nella popolazione mondiale e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) annunciò lo stato di "pandemia" nel giugno del 2009, passando dalla fase 5 di allerta pre-pandemica alla fase 6 di conclamata pandemia (annuncio da parte della dott.ssa Margaret Chan, direttore generale dell'OMS, 11 giugno 2009). Si è registrata un'elevata morbilità, associata ad una bassa mortalità: fattori di rischio individuali, quali la gravidanza e l'obesità, sembrano aumentare la possibilità di insorgenza di forme respiratorie severe, ad esito potenzialmente fatale (Kawaoka and Neumann, 2012). È stata evidenziata la presenza di anticorpi cross-reagenti negli adulti di età superiore ai 60 anni (Hancock *et al.*, 2009): il gene dell'HA-H1 del virus è derivato dal SIV cH1N1, originato dall'H1N1 pandemico del 1918, che ha circolato nella popolazione umana fino alla fine degli anni '50.

## Spettro d'ospite

I FLUAV presentano un ampio spettro d'ospite, con numerose specie animali domestiche e selvatiche recettive all'infezione, incluso l'uomo. Alcune specie di uccelli acquatici sono considerate il serbatoio naturale dei virus influenzali, che causano generalmente nell'ospite un'infezione a livello sub-clinico, replicando a livello del tratto intestinale (Causey and Edwards, 2008).

L'affinità relativa dell'HA per i differenti tipi di acido sialico, presenti sulla superficie cellulare, rappresenta uno dei più importanti determinanti molecolari di specificità dello spettro d'ospite dei FLUAV. Il legame dell'acido sialico con lo zucchero presente nelle glicoproteine (galattosio, N-acetilglucosamina e N-acetilgattosamina) può avere due diverse strutture: il carbonio in posizione 2 dell'acido sialico può essere legato al carbonio dello zucchero in posizione 3 o in posizione 6 (Nicholls *et al.*, 2008).

L'HA dei FLUAV di origine umana riconosce preferenzialmente l'acido sialico con legame  $\alpha$ 2,6. Questi sono i recettori maggiormente presenti nell'epitelio del tratto respiratorio superiore dell'uomo (Shinya *et al.*, 2006), sebbene alcuni studi abbiano evidenziato, a questo livello, una distribuzione dell'acido sialico con legame  $\alpha$ 2,3 molto più estesa di quanto si pensasse in

precedenza (Nicholls *et al.*, 2007) (Figura 4). Nello stesso studio è stato evidenziato che nei bambini l'espressione dell'acido sialico con legame  $\alpha 2,3$  è maggiore rispetto agli adulti.

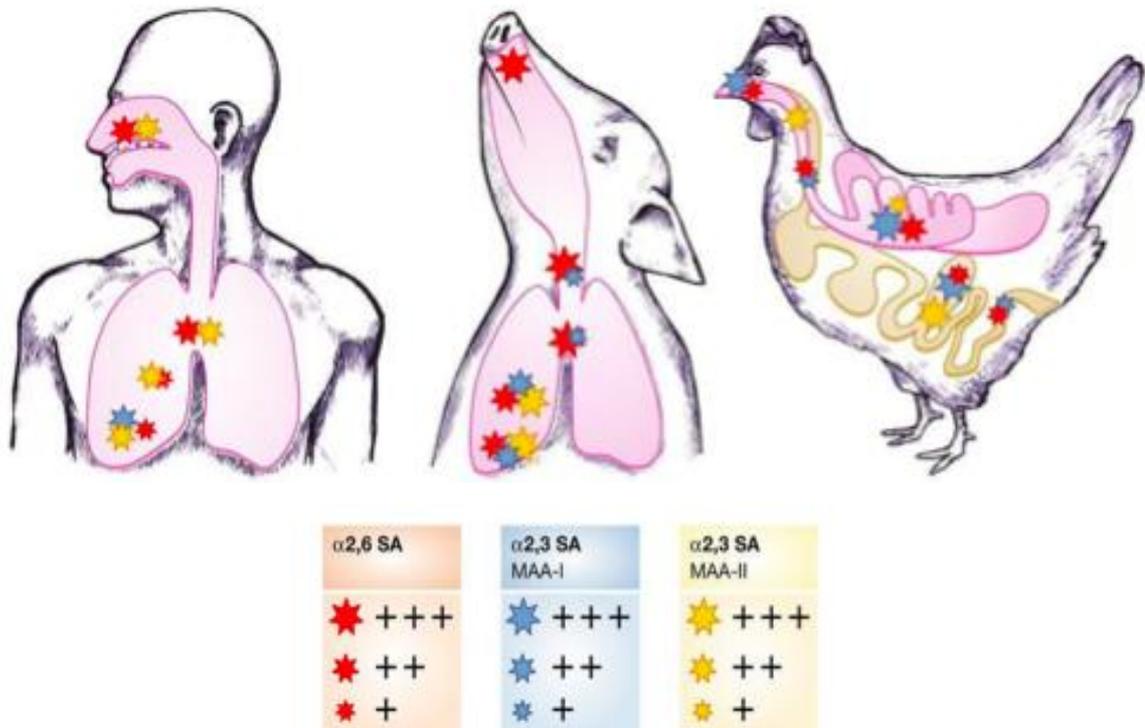
I FLUAV aviari legano preferibilmente l'acido sialico associato allo zucchero in posizione  $\alpha 2,3$  (Nobusawa *et al.*, 1991), ma recentemente è stata dimostrata, in alcune specie aviari, la presenza dei recettori sia di tipo  $\alpha 2,3$  sia di tipo  $\alpha 2,6$  nell'epitelio del tratto respiratorio e intestinale (Figura 4), sebbene l'estensione della distribuzione sia variabile tra le specie (Franca *et al.*, 2013).

In passato si era ipotizzato il ruolo del suino come *mixing vessel* per la formazione di nuovi FLUAV potenzialmente pandemici, a causa della presenza nell'epitelio della mucosa tracheale dell'acido sialico sia con legame  $\alpha 2,3$  sia con legame  $\alpha 2,6$  (Ito *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2000). Studi più recenti hanno evidenziato che la distribuzione dei recettori di tipo  $\alpha 2,6$  sia maggiore in tutte le aree del tratto respiratorio dei suini, con la localizzazione dei recettori di tipo  $\alpha 2,3$  in particolare nel tratto respiratorio inferiore (Trebbien *et al.*, 2011).

L'insieme di tutte queste recenti scoperte indica quanto la biologia dei recettori dei FLUAV sia molto più complessa e che anche altri fattori vadano ad influenzare la restrizione dello spettro d'ospite.

**Figura 4:** Rappresentazione schematica della distribuzione dell'acido sialico nell'uomo, nel suino e nel pollo. L'acido sialico con legame  $\alpha 2,6$  è indicato con una stella rossa; l'acido sialico con legame  $\alpha 2,3$  evidenziato mediante l'isoforma MAA-I (agglutinina della *Maackia amurensis*) è indicato con una stella blu, mentre mediante l'isoforma MAA-II con una stella gialla. La grandezza della stella rappresenta la quantità recettoriale rilevata.

La distribuzione recettoriale è stata analizzata nell'epitelio della mucosa nasale, tracheale, bronchiale e negli alveoli di uomo (Nicholls *et al.*, 2007), suino (Nelli *et al.*, 2010; Trebbien *et al.*, 2013) e pollo e nell'epitelio intestinale del pollo (Costa *et al.*, 2012; Trebbien *et al.*, 2013). Nell'uomo, nello studio citato, non è stato analizzato l'epitelio della mucosa tracheale (de Graaf and Fouchier, 2014, modificato).



## Patogenesi dell'infezione nel suino

Nella popolazione suina i virus influenzali sono trasmessi tra individui principalmente mediante contatto diretto con secrezioni nasali e attraverso l'inalazione dei virioni presenti nell'aerosol prodotto da soggetti infetti, tossendo ed espirando.

La patogenicità e la virulenza dei FLUAV sono correlate quindi alla presenza di numerosi fattori strettamente interconnessi tra loro e legati sia alle caratteristiche virali sia a quelle dell'organismo ospite (Kamps *et al.*, 2006).

- Fattori legati all'ospite
  - presenza di recettori bersaglio sulle cellule
  - disponibilità di enzimi nelle cellule dell'ospite essenziali per l'ingresso e la replicazione virale
  - stato di immunocompetenza dell'ospite
  - abilità del sistema immunitario di controllare la replicazione virale senza il danneggiamento collaterale dovuto alla risposta infiammatoria
- Fattori legati al virus
  - capacità di legarsi ai recettori dell'ospite e di diffondere
  - evasione dei sistemi di immunosorveglianza
  - modulazione della risposta immunitaria

Le cellule bersaglio dell'infezione virale sono le cellule epiteliali della mucosa nasale, tracheale, bronchiale, nonché di bronchioli e alveoli (Janke, 2014).

Numerosi studi sperimentali sono stati condotti per definire l'evoluzione del processo infettivo, mediante diversi metodi di inoculazione del virus: nebulizzazione con irrigatore nasale o mascherina, inoculazione diretta intranasale (IN) e intratracheale (IT). La nebulizzazione è risultata essere il metodo più efficace per la somministrazione di grandi quantità di virus attraverso il tratto respiratorio, ma è anche il più laborioso ed il meno utilizzato. La via intranasale invece sembra essere la tecnica con l'efficacia più variabile, probabilmente poiché alcuni soggetti tendono a ingerire parte della dose somministrata. La via intratracheale fornisce i risultati più coerenti e, se la dose infettante non viene depositata troppo in profondità, il virus presenta una buona distribuzione in ogni parte del polmone (Janke, 2013).

L'infezione e la replicazione nelle cellule dell'ospite avanzano molto rapidamente. In uno studio condotto da Nayak *et al.* (1965), il virus è stato evidenziato, mediante tecniche di immunofluorescenza, nei nuclei di cellule epiteliali bronchiali soltanto 2 ore post-infezione (PI), mentre a 4 ore PI, l'antigene virale era presente in grandi quantità sia nel nucleo sia nel citoplasma delle suddette cellule. Winkler e Cheville (1986) osservarono la gemmazione del virus influenzale dalla membrana dei pneumociti di tipo II dopo 5 ore PI. L'infezione diffonde rapidamente a livello di epitelio bronchiale e bronchiolare, con un picco replicativo dopo 48-72 ore PI. Sebbene alcuni virus raggiungano precocemente gli alveoli, soprattutto nelle infezioni mediante nebulizzazione oppure con alti titoli nelle altre vie di somministrazione, la maggiore diffusione virale nelle cellule epiteliali alveolari avviene, tendenzialmente, dopo 72-96 ore PI (Van Reeth and Pensaert, 1994; Jung *et al.*, 2005).

Numerosi studi riportano l'eliminazione per via nasale del virus da 1-3 giorni PI, a prescindere dalla via di inoculazione, con una durata di 4-5 giorni; occasionalmente è stata osservata fino a 7 giorni PI (Brown *et al.*, 1993; Van Reeth *et al.*, 1996; Landolt *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2006, 2009a, b; De Vleeschauwer *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010). De Vleeschauwer (2009), osservò l'eliminazione virale 24 ore PI dopo somministrazione IN ( $10^7$  EID<sub>50</sub>, *Embryo Infectious Dose*, dose infettante media su uova embrionate), mentre tramite inoculazione IT l'eliminazione nasale tardava fino a 72 ore PI e presentava un titolo virale minore. In un altro studio, in seguito a somministrazioni per via IN di titoli più bassi di virus ( $10^3$ - $10^4$  TCID<sub>50</sub>, *Tissue Culture Infectious Dose*, dose infettante media su tessuto-coltura), l'eliminazione nasale risultava ritardata di 24 ore, rispetto ai soggetti cui era stata somministrata una dose di  $10^5$ - $10^6$  TCID<sub>50</sub>, nonostante i titoli del picco di eliminazione fossero simili ( $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml) (Landolt *et al.*, 2003). La quantità di virus eliminato nelle secrezioni nasali tende ad essere piuttosto costante per 2-4 giorni PI con picchi di titoli virali descritti compresi tra  $10^{3,5}$ - $10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub>, EID<sub>50</sub>, o PFU/ml (*Plaque Forming Unit*, unità formanti placca).

Spesso negli studi sperimentali, per monitorare le dinamiche della replicazione di FLUAV nei polmoni, sono determinati i titoli virali dall'omogenato di tessuto polmonare o da lavaggio broncoalveolare. Nei polmoni il picco di FLUAV si verifica a circa 3 giorni PI con titoli variabili da  $10^{4,5}$  a  $10^{8,3}$  TCID<sub>50</sub>, EID<sub>50</sub>, o PFU/m. I titoli si mantengono a livelli relativamente costanti fino a 5 giorni PI (Van Reeth *et al.*, 1996; De Vleeschauwer *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2009a, b; Ma *et al.*, 2010).

Gran parte degli Autori ha evidenziato un breve lasso temporale di replicazione ed eliminazione virale, come sopra descritto, per la maggior parte dei FLUAV isolati dai suini, indipendentemente dal sottotipo (Janke, 2013). Sperimentalmente è stato rilevato che la dose di virus che inizialmente raggiunge il polmone può influenzare l'evolversi e la severità dell'infezione. Se vengono somministrate basse dosi, sia per via IN sia IT, il virus solitamente diffonde più lentamente con un inizio ritardato della sintomatologia clinica ed un decorso più lieve. Per la maggior parte dei FLUAV, l'evoluzione dell'infezione è breve e termina entro 5-7 giorni (Landolt *et al.*, 2003; Richt *et al.*, 2003; De Vleeschauwer *et al.*, 2009).

Nel suino, generalmente si considera l'infezione da FLUAV limitata al tratto respiratorio, ma alcuni studi ne hanno riportato la presenza al di fuori di questo. Nayak (1965) ha evidenziato, mediante immunoistochimica, cellule positive all'antigene virale nei linfonodi mediastinici, ma nessuna nelle tonsille. FLUAV è stato isolato dal siero di suini inoculati sperimentalmente, dopo 1-3 giorni PI (Brown *et al.*, 1993). Inoltre, in uno studio più recente, il virus è stato rilevato nella milza, nell'ileo e nel colon, mediante RT-PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*), ma non con isolamento, mentre solo nel tronco encefalico sia con RT-PCR sia con isolamento, sebbene non siano state evidenziate cellule infette a questo livello mediante immunoistochimica (De Vleeschauwer *et al.*, 2009). In questo lavoro, i ricercatori fanno riferimento a dati non ancora pubblicati di sperimentazioni *in vitro*, ipotizzando la possibilità di FLUAV di infettare nel suino il ganglio del trigemino attraverso gli assoni.

## Sintomi clinici

Quando la più grave pandemia umana della storia recente raggiunse il suo apice nell'estate del 1918, negli Stati Uniti, si iniziò a diagnosticare una nuova malattia che colpiva la popolazione suina. La sintomatologia clinica differiva dalla peste suina classica (Classical Swine Fever Virus, CSFV), che, a quei tempi, era la patologia più grave e diffusa nei suini. Questa nuova malattia respiratoria fu denominata "*hog flu*" (influenza del suino), per la somiglianza della sintomatologia e del decorso clinico con l'influenza diffusa nella popolazione umana. Oggi come allora, l'influenza suina si presenta come un'infezione acuta, caratterizzata da alta morbilità e bassa mortalità, che si diffonde rapidamente nella popolazione. Dopo 1-2 giorni PI, i soggetti malati si presentano letargici ed anoressici, con febbre alta (superiore a 40,5°C), scolo nasale e congiuntivite; inoltre è possibile osservare tachipnea e dispnea espiratoria, in particolar modo, quando i suini sono costretti a muoversi. Dopo 3-4 giorni PI, nella maggior parte dei suini infetti, la febbre tende a diminuire, mentre si manifesta la caratteristica sintomatologia clinica di questa patologia, ovvero una severa e profonda tosse abbaiante, dovuta a una grave ed estesa bronchite e bronchiolite (Janke, 2013).

L'influenza può colpire soggetti di tutte le età, dalle scrofe adulte ai suinetti sottoscrofa, ma la forma clinica si mostra spesso più lieve nei suinetti, rispetto agli adulti.

In alcune epidemie, le scrofe possono apparire inappetenti e letargiche, con febbre elevata, ma solitamente presentano una sintomatologia respiratoria meno marcata. Gli animali gravidi possono abortire a causa delle condizioni di malessere generale, tuttavia in assenza di polmonite da sovrainfezione batterica, i soggetti guariscono rapidamente, generalmente entro 6-7 giorni. Non tutti gli individui di un gruppo si infettano allo stesso momento, per cui, prima che all'interno di uno stesso gruppo tutti gli animali siano guariti e tornati a condizioni di salute normali, possono passare anche più di due settimane. La mortalità è generalmente bassa, sebbene alcuni ceppi possano essere più patogeni, aumentando così il numero dei decessi (Janke, 2013).

Ampie oscillazioni della temperatura in un breve periodo possono aumentare la suscettibilità degli animali all'infezione. Inoltre, condizioni climatiche fredde ed umide contribuiscono ad aumentare la sopravvivenza del virus influenzale nell'ambiente e la sua diffusione mediante aerosol. A tutt'oggi non è stato ancora pienamente compreso con quali modalità il virus sopravviva tra il manifestarsi di due epidemie, poiché non sono stati osservati soggetti portatori eliminatori a lungo termine; la maggior parte dei suini non risulta più contagiosa entro due settimane. A tal proposito è stata ipotizzata la permanenza del virus nell'allevamento a livello subclinico ed in particolare nella popolazione *naïve* o nei soggetti con il sistema immunitario compromesso.

Per quanto concerne l'efficacia della vaccinazione, alcuni studi hanno dimostrato che non esiste una protezione immunitaria assoluta nei confronti dell'influenza suina. I soggetti con protezione immunitaria sufficiente a prevenire la forma clinica possono, comunque, essere infettati ed eliminare il virus, anche se in misura ridotta per titolo e durata (Van Reeth *et al.*, 2001; Richt *et al.*, 2006).

Nell'allevamento intensivo suino, solitamente gli animali sono allevati con un sistema a fasi separate. Le scrofe sono mantenute in locali separati dal resto dei suini destinati all'ingrasso. Dopo il parto, i suinetti sono lasciati sottoscrofa per 3-4 settimane, prima di essere svezzati e spostati in altri locali. Nei sistemi a due fasi, gli animali sono allevati negli stessi locali fino alla

macellazione, mentre nei sistemi a tre fasi magronaggio (70-180 giorni di vita) e ingrasso si svolgono in locali separati. L'obiettivo principale della tecnica del "all-in all-out" (tutto pieno – tutto vuoto) è il controllo delle malattie, riducendo la possibilità di trasmissione tra i soggetti immuni più vecchi a quelli più giovani *naïve*, quando vengono trasportati negli stessi edifici. Nei sistemi a flusso continuo, virus e batteri hanno maggiori possibilità di mantenere l'infezione, per il continuo ingresso di nuovi individui recettivi. Il sistema di allevamento va considerato quando si valuta la presentazione clinica dell'influenza suina (Janke, 2013).

Attualmente, poiché si è raggiunta una certa immunità di popolazione in quasi tutti gli allevamenti, la manifestazione sintomatologica è molto varia.

Janke (2013) ha evidenziato 3 quadri clinici principali in cui la manifestazione della patologia può ricadere:

1. Forma acuta, "fulminante". Facile da riconoscere. Ricorda la patologia osservata circa 90 anni fa, alla sua prima comparsa, ma ormai la manifestazione più infrequente: scoppio di epidemia dovuto all'ingresso di una nuova variante in una popolazione priva o con ridotta immunità specifica nei confronti del virus. L'infezione si diffonde molto rapidamente nell'allevamento, nei suini di tutte le età, che presentano febbre elevata, anoressia e dispnea espiratoria. La mortalità è causata dallo sviluppo di edema polmonare.

2. Influenza dei suini all'ingrasso. E' condizionata dal sistema di allevamento. L'immunità materna protegge i suinetti svezzati dall'infezione endemica, ma con il declino degli anticorpi passivi, l'immunità si riduce. Gli animali non presentano problemi nella prima fase di allevamento (magronaggio), fino a quando non sono spostati nei locali dove si procede all'ingrasso, dove vengono a contatto con individui più vecchi, che eliminano il virus. Dopo circa due settimane dallo spostamento, i soggetti nei gruppi di nuova introduzione iniziano a presentare la sintomatologia: tosse e depressione. L'infezione diffonde lentamente, si protrae per 2-3 settimane, in base al declino individuale degli anticorpi materni. La sintomatologia solitamente è moderata, anche se il quadro clinico può complicarsi a causa di sovrainfezioni.

3. Influenza dei suinetti. Dipendente dalla presenza o meno di immunità passiva proteggente contro i virus endemici. Già alcuni suinetti sottoscrofa presentano la sintomatologia, ma spesso passano inosservati poiché nelle sale parto è più difficile evidenziare un ridotto numero di soggetti con sintomi blandi. Si inizia ad apprezzare la forma clinica quando gli animali di 3 settimane vengono spostati nei settori di svezzamento: lo stress aumenta la suscettibilità verso l'infezione. I suinetti sono anoressici ed è più difficile lo svezzamento col cibo solido. Per questo è importante immunizzare la scrofa, affinché l'immunità passiva protegga gli animali in questa delicata fase.

## **Lesioni anatomopatologiche**

Nel suino, poiché il virus penetra attraverso le vie aeree, la lesione macroscopica più comunemente osservata è quella causata dalla broncopolmonite, localizzata principalmente nei lobi cranio-ventrali, ma può interessare anche altre parti con estensioni variabili (Figura 5).

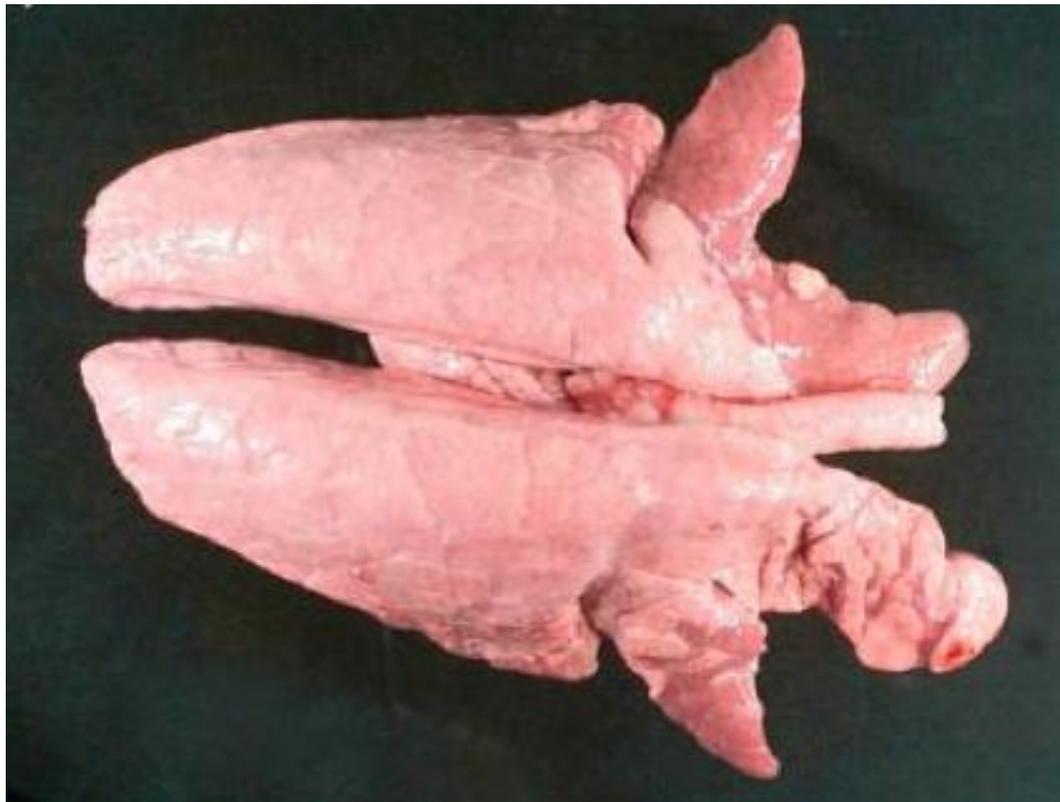
Le lesioni causate dall'infezione naturale non complicata sono simili a quelle osservate nelle infezioni sperimentali (Janke, 1998).

Nelle forme più lievi entrambi i polmoni possono mostrare piccole aree di consolidamento rosso scuro con distribuzione da multilobulare a coalescente, sia a livello di ilo polmonare che

delle porzioni più dorsali dei lobi craniali e medi. Infezioni più diffuse e severe invece possono coinvolgere porzioni più estese, solitamente le parti più ventrali dei lobi craniali e medi e una porzione cranio-ventrale del lobo caudale; può essere colpito fino al 40% del volume totale del polmone. L'infezione naturale viene spesso complicata da una broncopolmonite batterica con conseguenti lesioni più estese. I linfonodi tracheobronchiali possono apparire congesti ed edematosi, così come la trachea e i turbinati nasali, ma solitamente non sono visibili segni evidenti; sebbene il virus replichi nelle cellule epiteliali delle vie respiratorie superiori, non si osservano lesioni macroscopiche di necrosi (Janke, 2013).

Meno frequentemente, infezioni acute e severe possono provocare lesioni diffuse con edema e congestione del parenchima polmonare, con formazione di abbondante schiuma nella trachea e nei grossi bronchi (Janke, 1998). In questi quadri patologici, la polmonite interstiziale e l'edema possono mascherare il caratteristico consolidamento dei lobi cranio-ventrali (Janke, 2014).

**Figura 5:** Suino di 6 settimane di età, infettato sperimentalmente con un SIV, appartenente al sottotipo H3N2. Lesioni polmonari caratterizzate da aree di consolidamento da multifocale a coalescente nelle porzioni cranio-ventrali (da Janke, 2013).



Le lesioni microscopiche dell'infezione da FLUAV sono caratterizzate da necrosi bronchiale e bronchiolare associate a polmonite interstiziale (Figura 6), più o meno grave e variabile da soggetto a soggetto (Nayak *et al.*, 1965).

La prima risposta dell'organismo all'infezione è l'infiltrazione dei neutrofili che, già 4-8 ore PI, iniziano a migrare attraverso gli strati dell'epitelio delle vie respiratorie e si accumulano nel lume dei capillari alveolari. Le cellule endoteliali dei capillari possono manifestare rigonfiamento e le pareti vasali diventano evidenti grazie alla marginazione dei granulociti neutrofili. Le pareti alveolari appaiono estese a causa della congestione vascolare e della dilatazione dei vasi linfatici. E' possibile inoltre osservare degenerazione palloniforme e vacuolizzazione citoplasmatica di alcune cellule dell'epitelio dei bronchioli già dopo 8-16 ore PI, ma solitamente, in questa fase, la maggior parte dell'epitelio delle vie aeree è ancora integro (Janke, 2013).

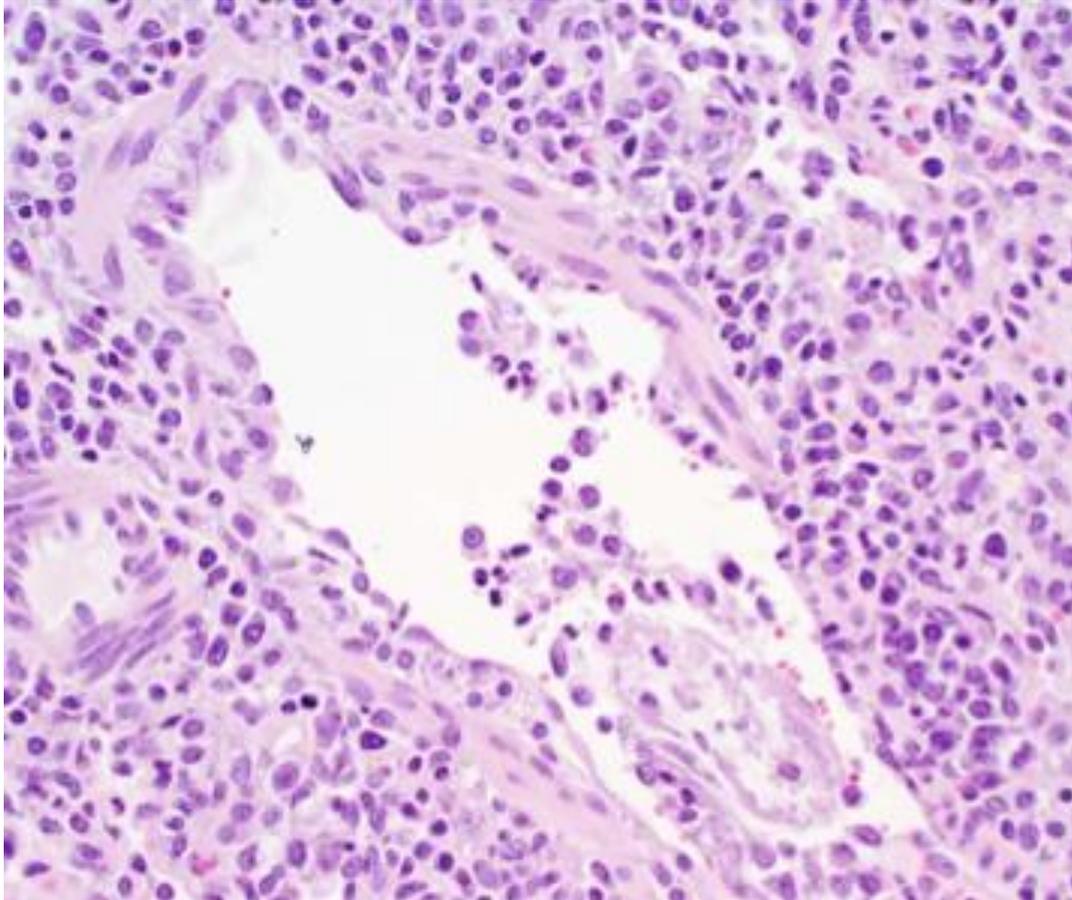
Dopo 24 ore PI è possibile evidenziare l'antigene virale, mediante immunistochemica (IHC, *Immunohistochemistry*), in alcune cellule epiteliali infette. Piccoli gruppi di neutrofili sono presenti nel lume delle vie aeree, insieme ad un'esigua infiltrazione di linfociti attorno ai bronchioli. Le pareti alveolari possono apparire ispessite a causa di congestione, edema ed infiltrazione leucocitaria, in particolare a livello peribronchiolare (De Vleeschauwer *et al.*, 2009; Sreta *et al.*, 2009; Janke, 2014).

Dopo 48 ore PI, è osservabile la necrosi e il disfacimento delle cellule epiteliali del lume delle vie aeree, insieme ad un aumento sempre maggiore di neutrofili. L'ispessimento delle pareti alveolari è più frequente e alcuni pneumociti sono rigonfi e in disfacimento. Sono numerose le cellule epiteliali infette positive all'IHC. Le vie più colpite in modo severo e consistente sono i bronchioli primari (le vie respiratorie non cartilaginee più grandi), molto probabilmente a causa delle dinamiche di diffusione dell'aerosol contenente i virioni (Thacker *et al.*, 2001).

Dopo 72 ore PI, sono ben evidenti i manicotti peribronchiolari di linfociti; la popolazione leucocitaria è rappresentata in gran parte da leucociti mononucleati (Janke, 2014).

Dopo 96 ore PI ed oltre, iniziano i processi riparativi delle pareti delle vie respiratorie: epitelio iperplastico o quasi normale, con manicotti linfocitari di dimensioni moderate. Anche l'infiammazione alveolare inizia a risolversi e, a questo punto, è difficile evidenziare l'antigene virale mediante IHC. Se il danno bronchiolare è stato molto grave, possono esserci fibrosi e formazione di polipi endobronchiolari (bronchiolite obliterante). Generalmente entro due settimane, in funzione dell'estensione del danno, il polmone ritorna alla normale funzionalità (De Vleeschauwer *et al.*, 2009; Sreta *et al.*, 2009; Janke, 2014).

**Figura 6:** Suino. Sezione istologica di polmone. Infezione naturale, fase acuta. E' evidente la necrosi bronchiolare. L'epitelio è in disfacimento e il lume contiene detriti cellulari insieme a leucociti. Si osserva un esiguo numero di linfociti localizzati nel tessuto connettivo sottoepiteliale e peribronchiolare. Colorazione con ematossilina-eosina (da Janke, 2014).



## Diagnosi

La diagnosi di influenza suina nel XXI secolo è diventata sempre più complessa a causa della circolazione di una varietà di ceppi diversi nella popolazione suina (Webby *et al.*, 2004).

Segni clinici e caratteristiche lesioni macroscopiche e microscopiche sono utili per una diagnosi presuntiva, ma non definitiva. Per una diagnosi conclusiva è necessaria l'evidenza in laboratorio di virus, antigene virale, acidi nucleici virali o anticorpi specifici anti-virali nei campioni clinici (Detmer *et al.*, 2013).

### Diagnosi diretta

I campioni di partenza per l'identificazione diretta di SIV sono rappresentati principalmente da tamponi nasali o faringei raccolti in allevamento durante un focolaio e organi o tessuti (soprattutto polmoni) di animali in sede autoptica.

#### Rilevamento dell'antigene virale

L'immunoistochimica (IHC, *Immunohistochemistry*) e l'immunofluorescenza (IFA, *immunofluorescence*) vengono utilizzate per evidenziare l'antigene virale in tessuti congelati o fissati in formalina (Onno *et al.*, 1990; Haines *et al.*, 1993; Larochelle *et al.*, 1994; Vincent *et al.*, 1997; Guarner *et al.*, 2000). La NP è ben conservata tra gli Influenza A virus, pertanto, anticorpi anti-NP possono essere usati per rilevare tutti i sottotipi virali (Detmer *et al.*, 2013). Al contrario, la proteina dell'HA, sottotipo-specifica, permette di suddividere i virus in base al sottotipo. L'antigene della NP è localizzato nel nucleo e nel citoplasma delle cellule infette, mentre quello dell'HA nel citoplasma e sulla superficie cellulare (Guarner *et al.*, 2000).

Le tecniche immunologiche dirette prevedono l'uso di anticorpi coniugati con biotina, fluorofori, enzimi, o oro colloidale. Sebbene più lunghi e tecnicamente più complicati, i metodi indiretti hanno una maggiore sensibilità e sono più comunemente usati nei laboratori per i test diagnostici. Queste tecniche prevedono l'uso di anticorpi primari non coniugati, a cui si andranno a legare anticorpi secondari coniugati (anti-immunoglobuline). Solitamente per l'IHC si utilizza il complesso avidina-biotina (ABC, *avidin-biotin complex*), sebbene, con questo metodo, vi possa essere un rumore di fondo, dovuto alla biotina endogena presente nei tessuti (Vosse *et al.*, 2007).

Sono disponibili in commercio numerosi test rapidi in grado di rilevare l'antigene virale dell'influenza, la maggior parte basati sulla tecnica immunoenzimatica dell'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), sebbene la preponderanza di questi test sia stata sviluppata specificatamente per applicazioni in diagnostica umana ed aviaria (Detmer *et al.*, 2013).

#### PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR (sintesi ciclica di DNA *in vitro*) permette di rilevare tracce di acidi nucleici in un campione biologico. Se il genoma virale è costituito da RNA, come nel caso dell'influenza virus, è necessaria una preventiva retrotrascrizione in cDNA, pertanto si parla di *Reverse Transcriptase-PCR* (RT-PCR). Per rilevare i prodotti di amplificazione della PCR classica è

necessaria una successiva corsa elettroforetica di questi. Un altro tipo di PCR, la PCR *Real-Time*, consente invece una rilevazione, contemporaneamente all'amplificazione del DNA. La misurazione del segnale per ciascun ciclo avviene in tempo reale: il software connesso allo strumento è in grado di leggere la fluorescenza emessa durante il processo, disegnando le curve di amplificazione. Sebbene la PCR *real-time* sia una metodica di natura semi-quantitativa (Kubista *et al.*, 2006), sono stati sviluppati numerosi protocolli di RRT-PCR (real-time RT-PCR) per il rilevamento e la quantificazione di influenza A virus, compresi i SIV (Spackman *et al.*, 2002; Spackman *and* Suarez, 2008).

I metodi di estrazione e purificazione dell'RNA variano in base al tipo di campione testato. Ad esempio, l'RNA può essere estratto direttamente dal liquido allantoideo di uova embrionate infettate, dal surnatante di colture cellulari e dal liquido di lavaggio broncoalveolare. Il tessuto polmonare deve essere, invece, prima omogenato in una soluzione al 10%, mentre i tamponi nasali o faringei sono di solito risospesi in soluzione. Sebbene laboriose, queste metodiche d'estrazione permettono di ottenere RNA altamente purificato dalla maggior parte dei campioni, inclusi omogenati di tessuti, tessuti inclusi nella paraffina e fluidi corporei (Sun, 2010).

Per rilevare un largo spettro di sottotipi di FLUAV, i primers per la RRT-PCR sono disegnati su sequenze conservate dei geni della MP o della NP. La RRT-PCR validata dall'USDA (United States Department of Agriculture) per l'influenza aviaria, disegnata sul gene della MP (Spackman *et al.*, 2002; Spackman *and* Suarez, 2008), è stata adattata per il rilevamento dei SIV nei campioni di origine suina. La concentrazione minima di virus rilevabile mediante questa procedura varia da  $10^{-1}$  a  $10^1$  TCID<sub>50</sub>/ml, in funzione del ceppo virale (Richt *et al.*, 2004; Landolt *et al.*, 2005). Sebbene l'isolamento virale rimanga ancora la tecnica *gold standard* per i virus influenzali, la RT-PCR è un metodo accurato, rapido e sensibile che può essere usato per la selezione di un ampio numero di campioni in un breve periodo di tempo. Il principale svantaggio della RT-PCR è che rileva solo l'RNA virale e, pertanto, non determina la presenza o meno del virus vivo. Poiché l'isolamento virale dipende dall'inoculo in un sistema colturale di un virus vitale, è spesso usato in combinazione con la RT-PCR (Detmer *et al.*, 2013).

### Isolamento virale

L'inoculazione in cavità allantoidea di uova embrionate di pollo (UEP) di 9-11 giorni è considerata la tecnica *gold standard* per l'isolamento e la propagazione dei virus influenzali aviari e di certi ceppi adattati di SIV (Swenson *et al.*, 2001; Clavijo *et al.*, 2002). Comunque, è stato dimostrato che i virus di influenza umana, propagati in UEP, acquisivano cambiamenti aminoacidici nell'HA, risultanti in variazioni antigeniche del virus (Katz *et al.*, 1987; Katz *and* Webster, 1992; Meyer *et al.*, 1993; Robertson *et al.*, 1995). Al contrario, c'è una ridotta o nulla probabilità di variazione genetica o antigenica se propagati in linee cellulari di mammifero (Katz *et al.*, 1987, 1990; Katz *and* Webster, 1992; Meyer *et al.*, 1993; Robertson *et al.*, 1995), incluse le linee cellulari Vero (rene di scimmia verde africana), MRC-5 (polmone di feto umano), BHK-21 (rene di criceto neonato) e cellule renali di feto suino. Tra queste, le MDCK (rene di cane) sono le cellule che hanno la maggiore sensibilità e che sono più frequentemente usate nella ricerca e nelle applicazioni diagnostiche dei FLUAV (Meguro *et al.*, 1979). Per una sensibilità massima è consigliabile un passaggio addizionale su uova embrionate di pollo e/o su un'altra linea cellulare.

I FLUAV possono replicare nelle colture cellulari entro 24-48 ore, o possono servire fino a 5-6 giorni se la concentrazione iniziale nel campione è bassa. La crescita del virus induce lisi

cellulare ed effetto citopatico (CPE, *cytopathic effect*). Spesso per alcuni ceppi è necessario un secondo passaggio affinché si evidenzi il CPE (Detmer *et al.*, 2013). Una volta cresciuto nelle cellule, è possibile testare il virus per confermarne l'identità. Sebbene non sia un test conclusivo, l'emoagglutinazione (HA) degli eritrociti di pollo può essere usata come diagnosi presuntiva del virus e per la titolazione approssimativa della presenza virale nel surnatante (1 unità di HA corrisponde a circa 5-6 log<sub>10</sub> di virus). Un metodo più accurato per la quantificazione virale è la titolazione mediante inoculo di una serie di diluizioni virali in coltura cellulare (Villegas *and* Alvarado, 2008).

Per un'identificazione definitiva del virus, si può testare il surnatante mediante RT-PCR o con un kit commerciale per il rilevamento dell'antigene virale (NP o MP). Poiché la concentrazione virale nelle colture cellulari è molto più alta che nel campione biologico originale, la ridotta sensibilità dei kit commerciali non è, in questo caso, una restrizione (Detmer *et al.*, 2013).

Nonostante l'isolamento virale richieda attrezzature e personale adeguati per il mantenimento delle linee cellulari e delle uova embrionate, è una procedura disponibile nella maggior parte dei laboratori. Il virus isolato può essere conservato criogenicamente per anni e usato per successive caratterizzazioni e produzione di vaccini (Detmer *et al.*, 2013).

## **Diagnosi indiretta**

Nonostante la sintomatologia clinica coincida con la presenza del virus nel secreto nasale, l'isolamento e il rilevamento mediante RT-PCR possono risultare complicati a causa del breve periodo di eliminazione virale. In alcuni studi, è stato dimostrato che l'eliminazione può durare solo 24-72 ore (Van Reeth *et al.*, 2001, 2003, 2006).

Quando si sospetta infezione da influenza virus, ma è terminata la finestra temporale in cui il virus è rilevabile direttamente, è necessario ricercare la presenza di anticorpi specifici. E' possibile evidenziare la presenza delle immunoglobuline entro 1-2 settimane PI, con un picco a 4-7 settimane (Olsen *et al.*, 2006b). E' raccomandato raccogliere i campioni di siero all'inizio dell'infezione e dopo 3-4 settimane per paragonare la risposta immunitaria acuta (Rossow *et al.*, 2003). Poiché la presenza di anticorpi specifici può essere dovuta sia ad infezione naturale che in risposta alla vaccinazione, la storia anamnestica dell'allevamento deve essere nota per una corretta interpretazione del risultato. I test sierologici usati per valutare i livelli anticorpali verso i FLUAV includono: inibizione dell'emoagglutinazione, sieroneutralizzazione, ed ELISA.

### Inibizione dell'emoagglutinazione (HI)

L'emoagglutinazione degli eritrociti è una reazione naturale che avviene a causa della presenza della proteina HA (proprietà emoagglutinanti) sulla superficie del virione. Dato che questa reazione è inibita dalla presenza di anticorpi virus-specifici, è possibile titolare questi ultimi con una tecnica nota appunto come inibizione dell'agglutinazione virale (HI). Nei test standardizzati (OIE, 2008) è previsto l'uso di eritrociti di pollo o di tacchino. Prima di procedere con il test è necessario pre-trattare i sieri, per rimuovere gli inibitori aspecifici, mediante temperatura, RDE (*receptor destroying enzyme*) prodotto da *Vibrio cholerae*, caolino o periodato di potassio (Detmer *et al.*, 2013). Solitamente i sieri vengono inattivati incubandoli a 56°C o con RDE (OIE, 2008).

Una serie di miscele costituite da varie diluizioni, per raddoppio, del siero in esame (da 1:10 a 1:640-1:1280) sono unite a una quantità standardizzata di virus ed incubate per un'ora a temperatura ambiente; successivamente viene aggiunta una sospensione di globuli rossi a concentrazione nota. In assenza di anticorpi specifici, il virus è libero di legarsi agli eritrociti con conseguente emoagglutinazione. Se sono presenti gli anticorpi, questi si legano sulla superficie del virione alla proteina HA, inibendo l'emoagglutinazione. La diluizione più alta che inibisce l'emoagglutinazione è considerato il titolo HI di quel siero. Titoli HI pari o superiori a 1:40 sono considerati proteggenti (Hancock *et al.*, 2009). L'HI è un test standard per il rilevamento della presenza di anticorpi verso i FLUAV, ma il risultato è soggettivo e non sempre ripetibile. Comunque, è un test con costi molto bassi, facile da eseguire e con risultati comparabili alla sieroneutralizzazione (Vincent *et al.*, 2006; Leuwerke *et al.*, 2008).

### Sieroneutralizzazione (SN)

La SN rileva gli anticorpi neutralizzanti virus-specifici presenti nel siero in esame. Una serie di diluizioni, per raddoppio, del siero e una quantità nota di virus sono pre-incubate per un'ora e successivamente sono aggiunte le cellule MDCK per determinare la più alta diluizione di siero che è in grado di neutralizzare l'infezione cellulare e il CPE. Gli anticorpi neutralizzanti presenti nel siero bloccano l'infezione e il virus non può produrre CPE, al contrario se non presenti sarà osservabile il CPE. La diluizione di siero più alta che è in grado di inibire il CPE è considerata il titolo della SN. Uno dei vantaggi della SN sull'HI o l'ELISA è la dimostrazione, tramite il test, dell'attività biologica neutralizzante degli anticorpi verso il virus. Alcuni svantaggi sono la necessità di laboratori attrezzati per le colture cellulari e il tempo richiesto per la lettura del test (fino a 72 ore per ottenere il risultato) (Detmer *et al.*, 2013).

### ELISA

Il test ELISA prevede l'utilizzo di piastre con pozzetti in cui è adsorbito l'antigene virale. Il siero è incubato nei pozzetti per permettere il legame degli anticorpi, quando presenti. Dopo il lavaggio per eliminare il materiale non legato, sono distribuiti nei pozzetti anticorpi monoclonali anti-influenza virus coniugati ad un enzima, che andranno a legarsi all'antigene virale ancora libero. Dopo aver lavato il coniugato non legato, si aggiunge il substrato che reagisce con l'enzima (reazione che causa una variazione del colore). Dopo solo 15 minuti è possibile valutare il risultato e misurare l'intensità del colore mediante uno spettrofotometro (misura la densità ottica, OD). La OD è inversamente proporzionale alla quantità di anticorpi anti-influenza presenti nel siero esaminato (Detmer *et al.*, 2013).

### **Sottotipizzazione e sequenziamento**

E' possibile suddividere geneticamente ed antigenicamente HA e NA, rispettivamente, in 18 e 11 sottotipi. La definizione del sottotipo è importante per avere informazioni su spettro d'ospite, antigenicità e patogenicità. I virus isolati, in passato erano sottotipizzati mediante HI e inibizione della NA (Pedersen, 2008a, b). Entrambe le metodiche richiedono tempo e antisieri standardizzati, spesso difficili da ottenere. Perciò, la RT-PCR è ora usata regolarmente per la sottotipizzazione dei FLUAV (Li *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2007; Fereidouni *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009; Chander *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010).

Inoltre, il materiale amplificato con la RT-PCR può essere utilizzato per il sequenziamento di tutti gli 8 segmenti genomici di FLUAV (Jindal *et al.*, 2009; Chander *et al.*, 2010). Le sequenze ottenute possono essere analizzate e comparate alle altre sequenze disponibili nelle banche dati, quali NCBI (National Center for Biotechnology Information) e GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data), per valutarne l'evoluzione genetica ed eventuali rapporti geografici e temporali.

La quantità di RNA presente nei campioni biologici è notevolmente ridotta rispetto a quella dei virus isolati su colture cellulari o su UEP, quindi, se possibile, sarebbe consigliabile utilizzare campioni dopo isolamento per risultati migliori (Spackman *and* Suarez, 2008).

### Tecniche di sequenziamento

La possibilità di decodificare il patrimonio genetico degli organismi viventi, che permette di determinare l'ordine in cui le basi nucleotidiche si susseguono nelle molecole di DNA, ha segnato l'esplosione della biologia molecolare e lo sviluppo di numerose applicazioni biotecnologiche. Per circa 40 anni, la metodica di sequenziamento utilizzata è stata la tecnica ideata da Frederick Sanger nel 1977, il c.d. sequenziamento classico o Sanger (Sanger *et al.*, 1977; Quiñones-Mateu *et al.*, 2014). Questa metodica si basa sull'uso di dideossinucleotidi trifosfati (ddNTP), marcati con un fluoroforo, che vanno a sostituire i normali deossinucleotidi trifosfati (dNTP) nella formazione del filamento di DNA, in modo da arrestarne la sintesi in posizione 3' (Sanger, 1980). I frammenti così ottenuti vengono separati mediante elettroforesi capillare, capace di separare i frammenti di DNA che differiscono di una sola base nucleotidica: la migrazione è rilevata grazie all'emissione di fluorescenza dei ddNTP provocata da un laser. Le informazioni ottenute sono poi integrate e trasformate in picchi colorati (elettroferogramma) mediante specifici *software*: in questo modo è possibile ottenere la sequenza del materiale genetico esaminato (Karger and Guttman, 2009).

In questo periodo si assiste ad una straordinaria evoluzione delle tecniche e degli apparati per il sequenziamento degli acidi nucleici, con l'introduzione delle c.d. piattaforme di sequenziamento di nuova generazione (NGS, *next generation sequencing*), che permettono di generare in breve tempo un enorme volume di sequenze, con numerose possibili applicazioni sia nell'ambito della ricerca che della diagnostica (Barzon *et al.*, 2011). Queste nuove metodiche stanno rivoluzionando il campo della genomica, compresa la virologia, con un notevole contributo in diverse aree, quali la scoperta di nuovi virus e la metagenomica, l'epidemiologia molecolare, la patogenesi e gli studi sulla variabilità virale in risposta alla pressione del sistema immunitario dell'ospite e degli antivirali (Quiñones-Mateu *et al.*, 2014).

Diverse compagnie propongono sequenziatori che sfruttano tecnologie NGS, ognuno con caratteristiche specifiche, offrendo agli utilizzatori diverse possibilità di scelta in base alle esigenze sperimentali.

La prima piattaforma NGS prodotta fu il pirosequenziatore 454 FLX (Life Sciences-Roche), in commercio dal 2005. Da allora, sono stati prodotti il Genome Analyzer dall'Illumina, il Solid e lo Ion Torrent PGM dalla Life Technologies e altri ancora. Il Solid sfrutta un protocollo di sequenziamento basato sull'utilizzo di una ligasi (ottameri marcati con fluorofori che si legano selettivamente alla sequenza stampo), mentre gli altri utilizzano una polimerasi (sequenziamento per sintesi) (Barzon *et al.*, 2011).

Il pirosequenziamento (454 FLX) si basa sulla rilevazione della presenza del pirofosfato, che è rilasciato quando un dNTP viene incorporato nel filamento di DNA: il pirofosfato funge da substrato ad una luciferasi, provocando l'emissione di un segnale luminoso, rilevato da un sensore. Un'altra tecnologia NGS è quella proposta dall'Illumina, basata sull'utilizzo di ddNTP fluorescenti a terminazione reversibile. Ad ogni ciclo del processo di sequenziamento, si ha l'incorporazione dei ddNTP con emissione di un segnale luminoso, rilevato da un sensore. In seguito, si ha il rilascio per via chimica dei gruppi terminatori, consentendo la prosecuzione del processo con l'incorporazione di ulteriori nucleotidi e l'allungamento della sequenza (Ansorge, 2009; Metzker, 2010; Liu *et al.*, 2012).

La piattaforma Ion Torrent PGM non sfrutta l'emissione di segnali luminosi, ma è basata su un sistema in grado di misurare le variazioni di pH. Durante la reazione di elongazione del filamento di DNA, quando un nucleotide viene incorporato dalla polimerasi, è rilasciato uno ione idrogeno ( $H^+$ ), con la conseguente riduzione del pH. Non avvalendosi dell'ausilio di nucleotidi marcati, non necessita di costosi sistemi di rilevazione ottica, con una notevole riduzione dei costi dello strumento stesso e del suo utilizzo (Liu *et al.*, 2012).

## Vaccinazione

I vaccini antinfluenzali per il suino attualmente in commercio sono inattivati, costituiti dal virus intero, con l'aggiunta di adiuvanti. Considerate le differenze antigeniche e genetiche dei SIV circolanti in Europa e nel Nord America, i vaccini prodotti ed utilizzati nei due continenti contengono ceppi e sottotipi diversi. Inoltre, anche all'interno dello stesso continente, non vi è una standardizzazione per i ceppi utilizzati e sia i SIV sia gli adiuvanti possono differire tra i diversi prodotti commerciali. Vaccini con proteine ricombinanti, vettori, vaccini a DNA e vaccini vivi attenuati mediante *reverse genetic* sono stati valutati in numerosi studi sperimentali, ma non sono ancora disponibili per l'utilizzo (Van Reeth and Ma, 2013).

I vaccini sono somministrati ai suini per via IM (iniezione intramuscolare), a livello della muscolatura del collo. La prima vaccinazione dovrebbe essere seguita da un richiamo dopo 2-4 settimane. Negli allevamenti da riproduzione, in genere, le scrofette sono vaccinate due volte prima della fecondazione, mentre le scrofe ogni tre mesi o tre-sei settimane prima del parto. Se l'immunità di popolazione all'interno dell'allevamento è elevata, a causa della regolare vaccinazione o dell'infezione naturale, i suinetti non dovrebbero essere vaccinati prima delle 12 settimane, per evitare l'interferenza con gli anticorpi di derivazione materna (Van Reeth and Ma, 2013).

I SIV sono una delle cause principali delle patologie respiratorie del suino; l'infezione raramente ha esito fatale e, generalmente, entro una settimana, i soggetti malati guariscono. Gli animali all'ingrasso possono subire perdita di peso o arresto della crescita, mentre le scrofe, a causa della febbre elevata, possono presentare una riduzione della fertilità o aborti, con considerevoli perdite economiche per l'allevatore (Janke, 2013). Ciononostante i SIV sono ormai endemici in tutti i Paesi produttori di carne suina e, generalmente, l'infezione si manifesta in forma subclinica o con sintomatologia lieve, pertanto il costo della vaccinazione può superare i benefici, tanto che in alcune regioni se ne fa uno scarso utilizzo (Van Reeth *et al.*, 2012).

Poiché i SIV subiscono solo limitatamente la pressione selettiva esercitata dal sistema immunitario dell'ospite, rimanendo geneticamente più stabili negli anni rispetto ai virus influenzali circolanti nell'uomo, i vaccini non devono essere aggiornati con la stessa regolarità necessaria per quelli umani. In aggiunta la grande varietà di SIV diffusi nei diversi Paesi e continenti, che si è osservata negli ultimi quindici anni, ha reso più complesso scegliere i ceppi per l'aggiornamento dei vaccini (Van Reeth and Ma, 2013).

Al contrario di quanto accade nell'uomo, non esistono organismi internazionali ufficiali che raccomandino l'utilizzo di determinati ceppi nella produzione dei vaccini per il suino. Inoltre, nonostante la maggior parte dei vaccini utilizzati sia in commercio da decenni, non sono disponibili informazioni dettagliate sulla loro composizione o analisi critiche sulla loro efficacia (Van Reeth and Ma, 2013). L'aggiornamento dei ceppi vaccinali è più frequente negli Stati Uniti rispetto a quanto accade in Europa, inoltre spesso sono utilizzati anche vaccini autogeni, realizzati con virus isolati in allevamento: in Nord America circa il 70% degli animali viene vaccinato (Vincent *et al.*, 2008).

I vaccini per SIV sono disponibili anche in combinazione con altri patogeni del suino, quali *Mycoplasma hyopneumoniae*, parvovirus suino (PPV) e herpesvirus-1 suino (SuHV-1, virus della malattia di Aujeszky) (Van Reeth and Ma, 2013).

Il successo dell'infezione da influenza A virus dipende da un largo spettro di fattori. L'inizio dell'infezione è dato dalla capacità del virus di penetrare nelle cellule epiteliali del tratto respiratorio, riuscendo a superare la prima difesa dell'ospite, l'immunità innata.

L'immunità innata è un sistema di difesa rapido e generico, che, al contrario dell'immunità acquisita, manca di specificità e memoria. La prima barriera all'infezione virale è fisica, rappresentata dal muco prodotto nel tratto respiratorio, seguita da una risposta di tipo cellulare (neutrofili, fagociti mononucleati, cellule dendritiche e cellule *Natural Killer*) (van de Sandt *et al.*, 2012). Le cellule dendritiche svolgono un ruolo fondamentale nel collegamento tra la risposta immunitaria innata e quella acquisita, come cellule presentanti l'antigene. Le molecole antigeniche derivate dall'infezione cellulare diretta sono presentate tramite il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) e vengono riconosciute dai linfociti T CD8<sup>+</sup>, mentre quelle derivate dalla fagocitosi di virioni o cellule apoptotiche sono presentate tramite il MHC di classe II e vengono riconosciute dai linfociti T CD4<sup>+</sup> (van de Sandt *et al.*, 2012).

I linfociti T CD4<sup>+</sup> stimolano la differenziazione dei linfociti B in plasmacellule secernenti anticorpi e dei linfociti T CD8<sup>+</sup> in linfociti T citotossici (CTL, *cytotoxic T lymphocytes*), che hanno un ruolo chiave, rispettivamente, nell'immunità umorale e in quella cellulo-mediata (Van Reeth and Ma, 2013).

La risposta immunitaria provocata dall'infezione da influenza A virus è rapida ed efficiente, con l'eliminazione del virus dall'organismo in circa una settimana, risultato dell'attività sinergica dei CTL, che uccidono direttamente le cellule infettate, e delle plasmacellule, che producono anticorpi diretti principalmente contro HA, NA, MP e NP. Comunque, solo gli anticorpi contro l'HA possono impedire il legame del virus con il recettore cellulare, bloccando l'infezione virale, mentre gli anticorpi contro la NA, inibendone l'attività enzimatica, limitano la diffusione dei nuovi virioni (Van Reeth and Ma, 2013).

I vaccini inattivati per l'influenza stimolano l'immunità umorale, ma non quella cellulo-mediata; inoltre si ha la produzione di immunoglobuline G (IgG), ma non di anticorpi mucosali (IgA), principali mediatori della risposta immunitaria nel tratto respiratorio superiore (Heinen *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 2001). Le IgG sieriche hanno un'attività maggiore nel tessuto polmonare (Graham and Crove, 2007).

La vaccinazione riduce la replicazione virale a livello polmonare e i sintomi clinici della malattia, ma non previene l'infezione e l'eliminazione del virus (Van Reeth and Ma, 2013).

I vaccini per SIV sono autorizzati e disponibili in quasi, sebbene non in tutti i Paesi europei. La maggior parte è in commercio dagli anni '80-'90 e contiene due ceppi di SIV appartenenti ai sottotipi prevalenti in quel periodo (H1N1 e H3N2), da allora mai aggiornati (Tabella 5). I SIV H1N2 *human-like* sono diffusi in Europa sin dalla metà degli anni '90, ma un vaccino trivalente che comprendesse anche questo sottotipo è stato prodotto ed autorizzato solo nel 2010. Il motivo principale di questo ritardo sono essenzialmente le prolungate procedure che i produttori devono soddisfare, anche solo per aggiornare il ceppo, senza variare altre matrici vaccinali (Van Reeth and Ma, 2013).

Per quanto riguarda l'influenza virus A(H1N1)pdm09, le autorità europee, al momento, considerano non necessaria la vaccinazione contro questa variante nel suino in Europa, sebbene il virus sia stato spesso isolato negli allevamenti suinicoli (European Food Safety Authority, EFSA, 2010).

**Tabella 5:** Principali vaccini per SIV in commercio in Europa (Van Reeth and Ma, 2013) e in Italia (EFSA, 2010).

	<b>Produttore</b>	<b>Prodotto</b>	<b>Ceppi FLUAV</b>	<b>Adiuvante</b>
<b>Europa</b>	Merial	Gripovac <sup>a</sup>	A/New Jersey/8/76(H1N1) A/Port Chalmers/1/73(H3N2)	Olio
	Pfizer Olot	Suvaxyn Flu	A/sw/Netherlands/25/80/(H1N1) A/Port Chalmers/1/73(H3N2)	Olio
	Hipra	Gripork	A/sw/Olost/84(H1N1) A/Port Chalmers/1/73(H3N2)	Olio
	Impfstoffwerk Dessau-Tornau	Respiporc Flu	A/Sw/Belgium/230/92(H1N1) A/Sw/Belgium/220/92(H3N2)	Sali di alluminio
	Impfstoffwerk Dessau-Tornau	Respiporc Flu3 <sup>b</sup>	A/Sw/Haselunne/2617/03(H1N1) A/Sw/Bakum/1769/03(H3N2) A/Sw/Bakum/1832/00(H1N2)	Carbomer
	<b>Italia</b>	Izo	Izovac Sui-Flu <sup>d</sup>	A/Sw/OMS/2899/82(H1N1) A/Sw/OMS/3633/84(H3N2)
Izo		Izovac Aujeszky- Flu <sup>c</sup>	A/Sw/OMS/2899/82(H1N1) A/Sw/OMS/3633/84(H3N2)	Olio
Fatro		Fluen- Suivax	A/Sw/OMS/2614/84(H1N1) A/Sw/OMS/3633/84(H3N2)	Sali di alluminio
Fatro		Aujinflu- Suivax <sup>c,d</sup>	A/New Jersey/8/76(H1N1) A/Port Chalmers/1/73(H3N2)	Sali di alluminio
Merial		Akipor Flu <sup>c</sup>	Ceppo H1N1 non specificato Ceppo H3N2 non specificato	Olio
Merial		Geskygrip <sup>c</sup>	A/New Jersey/8/76(H1N1) A/Port Chalmers/1/73(H3N2)	Olio

<sup>a</sup> Non più prodotto dal 2010.

<sup>b</sup> Venduto dalla Merial con il nome commerciale di Gripovac3.

<sup>c</sup> In combinazione con SuHV-1.

<sup>d</sup> Somministrazione per via SC (sottocutanea), gli altri vaccini per via IM.

## MATERIALI E METODI

### Campioni di SIV

Il laboratorio del reparto di virologia della sezione di Brescia dell'IZSLER, con cui il laboratorio del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare (DSPVSA) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha collaborato nei tre anni in cui si è svolto questo studio, attua in modo sistematico un programma di screening per il monitoraggio dei SIV circolanti in Italia. I campioni, inviati al laboratorio di Brescia, sono rappresentati principalmente da tessuto polmonare, prelevato durante la necropsia da animali con lesioni anatomopatologiche riferibili a patologie respiratorie, e tamponi nasali di suini con sintomatologia respiratoria acuta. Il laboratorio esamina tutti i campioni per la presenza di Influenza A virus, mediante real-time RT-PCR (Spackman *et al.*, 2002). Dai campioni risultati positivi viene effettuato il tentativo di isolamento virale mediante inoculazione di colture cellulari MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) o Caco-2 (carcinoma del colon di uomo) e propagati su UEP. Il sottotipo degli isolati viene identificato mediante real-time RT-PCR (Chiapponi *et al.*, 2012).

In base all'anno di isolamento e alle caratteristiche antigeniche, sono stati scelti 62 campioni isolati dal 1998 al 2014, appartenenti ai sottotipi H1N1, H3N2 e H1N2 (Tabella 6), che sono stati inviati al laboratorio del DSPVSA per essere analizzati mediante tecnologia NGS. La scelta dei campioni da analizzare non è stata fatta su base statistica e non si riferisce alla prevalenza di infezione dei sottotipi circolanti, ma la caratterizzazione genomica dei SIV è stata effettuata al fine di controllare, mediante analisi genica e filogenetica, i flussi genici dei virus influenzali circolanti nella popolazione suina italiana e la loro evoluzione.

**Tabella 6:** Campioni di SIV analizzati.

Campione	Sottotipo	Anno	Provincia	Isolamento
9328	H1N1	1998	BS	MDCK; UEP
8550	H3N2	1998	LO	MDCK; UEP
8143	H3N2	1998	MO	MDCK; UEP
568	H3N2	1999	BS	MDCK; UEP
644	H3N2	2000	FC	UEP
10169	H1N1	2001	BS	MDCK; UEP
7680	H3N2	2001	BS	MDCK; UEP
21963	H1N1	2001	RA	UEP
2608	H3N2	2001	CR	MDCK; UEP
207828	H1N1	2002	BS	UEP
1484	H3N2	2002	BS	UEP
23159	H1N1	2002	PV	UEP
253025	H3N2	2003	CR	MDCK; UEP
227234	H1N1	2003	VR	UEP
261517-58	H1N1	2004	BS	MDCK
302623	H3N2	2004	BS	MDCK
1639-16	H3N2	2005	BS	MDCK; UEP

**Tabella 6:** Campioni di SIV analizzati. *(Continua)*

<b>Campione</b>	<b>Sottotipo</b>	<b>Anno</b>	<b>Provincia</b>	<b>Isolamento</b>
286014	H1N1	2005	BS	MDCK; UEP
301041	H3N2	2005	BS	MDCK; UEP
32242	H3N2	2006	BS	UEP
102793	H1N1	2006	BS	MDCK; UEP
278499	H3N2	2006	BS	MDCK; UEP
21486	H1N1	2006	BS	MDCK; UEP
110028	H3N2	2007	BS	MDCK; UEP
195699	H1N1	2007	BS	MDCK; UEP
206453	H3N2	2007	BS	UEP
209720	H3N2	2008	BS	MDCK; UEP
29141	H1N2	2008	BS	MDCK; UEP
301284-1	H3N2	2008	BS	MDCK; UEP
207871	H1N1	2008	BS	MDCK
44795	H1N1	2008	BS	MDCK
317956	H1N1	2008	CR	MDCK; UEP
30153	H3N2	2009	BS	MDCK; UEP
53699	H1N1	2009	BS	Caco-2; UEP
224917	H3N2	2010	BS	UEP
1086◆	H1N1pdm	2010	MI	UEP
31005	H3N2	2010	BS	UEP
71028◆	H1N1pdm	2010	BS	UEP
152077◆	H1N1pdm	2010	BS	UEP
324538◆	H1N1pdm	2010	BS	-
41038	H1N1	2011	BS	-
265749_1-5	H3N2	2011	BS	MDCK; Caco-2; UEP
265749_16-20	H3N2	2011	BS	MDCK; Caco-2; UEP
2◆	H3N2	2011	BA	-
4◆	H3N2	2011	BA	-
325451◆	H1N1pdm	2011	BN	-
26654	H1N2	2012	CR	Caco-2; UEP
46940	H3N2	2012	BS	UEP
5431	H3N2	2012	BS	UEP
40771	H3N2	2012	BS	UEP
43657	H1N2	2012	BS	Caco-2
18577	H1N1	2012	CN	Caco-2
5421	H1N1	2012	MI	MDCK; Caco-2; UEP
120336◆	H1N1pdm	2012	BN	UEP
225349-1◆	H1N1pdm	2012	BN	UEP
225349-2◆	H1N1pdm	2012	BN	UEP
225349-3◆	H1N1pdm	2012	BN	UEP
173301	H3N2	2013	MN	UEP
276125	H1N2	2013	BS	Caco-2; MDCK
47466◆	H1N1pdm	2013	BL	UEP
37598	H1N2	2014	MI	Caco-2
49944	H1N2	2014	MN	Caco-2

◆SIV sequenziati parallelamente sia con metodo Sanger sia NGS.

-SIV non isolati, ma analizzati direttamente da campione biologico.

## Estrazione del genoma virale

L'RNA di tutti i campioni è stato estratto partendo da 140 µl di sospensione virale utilizzando un sistema di colonne filtranti con membrana in gel di silice, capace di legare selettivamente l'RNA virale, secondo le istruzioni del produttore (QIAmp Viral RNA Mini kit, Qiagen). La matrice di partenza era il surnatante delle colture cellulari su cui era stato isolato il virus, il liquido allantoideoraccolto dalle UEP inoculate o direttamente il campione biologico (emulsione di tessuto polmonare o soluzioni in cui è risospeso il tampone nasale). Per ridurre i fenomeni di degradazione dell'RNA estratto, sono state aggiunte all'eluato 20 unità di un inibitore delle ribonucleasi (RNase Inhibitor, Human Placenta, NEB); il materiale è stato poi conservato a -80°C fino al suo utilizzo.

## Sequenziamento con metodo Sanger

Per la validazione del protocollo e per verificare l'affidabilità dei dati ottenuti con NGS, sono stati sequenziati parallelamente 12 campioni anche con metodo Sanger, considerato ancora oggi il *gold standard* per il sequenziamento in quanto a precisione e affidabilità. Sono state prodotte le sequenze dell'intero genoma di 10 SIV H1N1pdm09 e le sequenze dei geni interni di due SIV appartenenti al sottotipo H3N2 (Tabella 6) (i *primer* utilizzati per i geni dell'HA e della NA sono specifici per i virus influenzali A(H1N1)pdm).

L'RNA virale è stato utilizzato per allestire 46 RT-PCR one-step (retrotrascrizione e amplificazione avvengono in una sola reazione) (SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen), con *primers* specifici per l'amplificazione di frammenti, sovrapposti alle estremità, degli 8 segmenti genici, in modo tale da ottenere la sequenza completa dell'intero genoma. Ogni *primer* è stato disegnato con una coda M13 al 5', così da poter usare un'unica coppia di *primer* per il sequenziamento di tutti gli ampliconi ottenuti (Boniet *al.*, 2014). I *primer* utilizzati e la dimensione degli amplificati attesi dalle singole PCR sono indicati in Tabella 7.

I prodotti di PCR sono stati evidenziati mediante visualizzazione al transilluminatore UV di gel di agarosio colorato con un intercalante del DNA (Gel-Red nucleic acid gel strains, Biotium), dopo corsa elettroforetica. Gli amplificati ottenuti sono stati purificati direttamente dal prodotto di PCR mediante trattamento con ExoSAP-IT (Affymetrix), secondo le istruzioni del produttore; il metodo si basa sull'attività di due enzimi, esonucleasi I e fosfatasi alcalina, con la degradazione di *primer* e dNTP, senza ridurre la quantità di DNA disponibile.

Le reazioni di sequenziamento sono state effettuate con la chimica del Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), utilizzando i *primer* M13 forward e M13 reverse. I prodotti ottenuti sono stati purificati mediante BigDye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems), secondo le specifiche del produttore. Il sequenziamento è stato eseguito su un sequenziatore automatico Genetic Analyzer ABI 3130, dotato di quattro capillari e un processo di elettroforesi completamente automatizzato (Applied Biosystems).

I dati ottenuti sono stati elaborati con il *software* SeqScape, versione 2.5 (Applied Biosystems), al fine di ottenere sequenze complete di ognuno degli 8 segmenti genici.

**Tabella 7:** *Primer* utilizzati per il sequenziamento dei SIV con metodo Sanger. Ogni *primer* è stato disegnato con una coda M13 al 5' (sequenza sottolineata).

Gene	Frammento	Primer	Dimensione attesa (bp)	
PB2	1	PB2-1-1 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> ctcgagcaaaagcaggtcaa	575
		PB2-1-575 REV	caggaaacagctatgaccyagctgtgaytgygatgt	
	2	PB2-2-328 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> gtracatggtggaayagaa	488
		PB2-2-816 REV	caggaaacagctatgaccgcttgrtcaayatrcatt	
	3	PB2-3-487 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> cctggtcaygcagacctcag	532
		PB2-3-1019- REV	caggaaacagctatgaccccaarctgaaggaygarctgat	
	4	PB2-4-713 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> caagcagtrrtacattgaagt	576
		PB2-4-1289 REV	caggaaacagctatgaccctctaactgcttttaycatgcaat	
5	PB2-5-946 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> ccracwgaagaacaagctgt	563	
	PB2-5-1509 REV	caggaaacagctatgaccggagtattcatcyacacccat		
6	PB2-6-1169 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> aaagcaaccagragattgrttca	571	
	PB2-6-1740 REV	caggaaacagctatgaccctgagaccaytgaattttraca		
7	PB2-7-1447 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> ccaagyacmgagatgcaatgaga	739	
	PB2-7-2186 REV	caggaaacagctatgaccttrctcarttcattgatgct		
8	PB2-8-1683 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> caacacttatcaatggataat	658	
	PB2-8-2341 REV	caggaaacagctatgacctagttagaaacaaggtcgtt		
PB1	1	PB1-1-8 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> gcaggcaaacatttg	506
		PB1-1-514 REV	caggaaacagctatgacccttaccatcccttaagaaatc	
	2	PB1-2-233 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> caactcaaccrattgatggrccact	610
		PB1-2-843 REV	caggaaacagctatgaccgttcaagcttttcrcaawatg	
	3	PB1-3-349 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> tacaagggtagataaactaactcaa	649
		PB1-3-998 REV	caggaaacagctatgaccaaccactcgggttgatttc	
	4	PB1-4-711 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> tgacacratgaccaarga	567
		PB1-4-1278 REV	caggaaacagctatgacctgaaatgccatcatcatyccagg	
5	PB1-5-974 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> aatcaaaaycctmgaatgtt	592	
	PB1-5-1566 REV	caggaaacagctatgaccagctccatgctraaattg		
6	PB1-6-1139 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> tcaaataccygcagaratgctagc	520	
	PB1-6-1659 REV	caggaaacagctatgaccccaagrtcattgtttatcat		
7	PB1-7-1489 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> atgagyaaaaagaagtcyta	465	
	PB1-7-1954 REV	caggaaacagctatgacctcaatytcyttatggctgac		
8	PB1-8-1532 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> gcyaatttyagcatggagct	789	
	PB1-8-2321 REV	caggaaacagctatgaccagttagaacaaggcattt		
PA	1	PA-1-0 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> tagcaaaagcaggtactgat	493
		PA-1-493 REV	caggaaacagctatgacctagtcsgccttgtggccatyt	
	2	PA-2-235 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> ccaatgcaactktaaarcacagatt	521
		PA-2-756 REV	caggaaacagctatgacctgagaaagcttgcctcaatg	
	3	PA-3-319 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> ctgatttgatgattacaagag	640
		PA-3-959 REV	caggaaacagctatgaccggctctttccagccaaag	
	4	PA-4-702 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> tgcmittgaraatttagraccta	590
		PA-4-1292 REV	caggaaacagctatgacctcreakgccttgtgaactcatt	
5	PA-5-864 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> gaaattaagtattgaagaccg	732	
	PA-5-1596 REV	caggaaacagctatgaccagctctcgggtcagtgag		
6	PA-6-1051 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> gaaagagaagatccaaggac	921	
	PA-6-1972 REV	caggaaacagctatgaccaccctcaagttgtggag		
7	PA-7-1444 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> aatgcatcctgtgcagcaatgga	613	
	PA-7-2057 REV	caggaaacagctatgacctgtccctaagagcctgaacaa		
8	PA-8-1787 FOR	<u>tgtaaacgacggccagt</u> atgaartggggaatggagatgag	446	
	PA-8-2233 REV	caggaaacagctatgaccagtagaacaaggtacctttt		

**Tabella 7:** *Primer* utilizzati per il sequenziamento dei SIV con metodo Sanger. Ogni *primer* è stato disegnato con una coda M13 al 5' (sequenza sottolineata). (*Continua*)

Gene	Frammento	Primer	Dimensione attesa (bp)	
HA	1	HA-1-1 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> tatacactagcaaaagcagggg	460
		HA-1-461 REV	caggaaacagctatgacctcatgattggccayga	
	2	HA-2-351 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> tactrtgttaccwggrgattca	592
		HA-2-943 REV	caggaaacagctatgaccgaaakgggagrcgtggttta	
	3	HA-3-422 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> tccaatcatgactcgaaca	751
		HA-3-1173 REV	caggaaacagctatgacccttgcaatggcattctgt	
4	HA-4-736 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> tagratgractattactggac	604	
	HA-4-1340 REV	caggaaacagctatgacctctkcatrtawgtccaaa		
5	HA-5-1124 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> ttggatggtayggttaycayca	417	
	HA-5-1541 REV	caggaaacagctatgacctcataagtyccatttyga		
6	HA-6-1204 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> taagatgaayarcarttcacag	574	
	HA-6-1778 REV	caggaaacagctatgaccgtgtcagtagaaacaaggggttt		
NP	1	NP-1-1 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> tcagggtagataatcactcac	552
		NP-1-553 REV	caggaaacagctatgaccagagcacatctgggatccat	
	2	NP-2-296 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> tatggtrctctctgctttgatga	461
		NP-2-757 REV	caggaaacagctatgacctttgtgcagctgttgaaatttycctt	
	3	NP-3-513 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> ttggcattchaatttraatgat	529
NP-3-1042 REV		caggaaacagctatgaccctgrctcttctgtgtdgg		
4	NP-4-630 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> taagacaaggggtgcttat	539	
	NP-4-1178 REV	caggaaacagctatgacccactcctggctctatg		
5	NP-5-872 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> tttctgagrgrtcagttgctc	693	
	NP-5-1565 REV	caggaaacagctatgaccagtagaacaaggggtattttc		
NA	1	NA-1-0 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> tagcaaaagcaggagt	600
		NA-1-600 REV	caggaaacagctatgacctggacrcrgaaattcc	
	2	NA-2-335 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> tgggatgtgtttgtcataagg	599
		NA-2-934 REV	caggaaacagctatgaccattccagattctgattgaaag	
	3	NA-3-298 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> ttacagtaaaagacaacagtgaagaat	439
NA-3-737 REV		caggaaacagctatgaccggtccatcggtcattacag		
4	NA-4-726 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> taatggrcargcctrtacaa	620	
	NA-4-1346 REV	caggaaacagctatgaccgctgctyccrctagtccagat		
5	NA-5-941 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> ttaggatacatctgcagtgg	511	
	NA-5-1452 REV	caggaaacagctatgaccagtagaacaaggag		
MP	1	MP-1-0 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> tagcaaaagcaggtag	473
		MP-1-473 REV	caggaaacagctatgaccgcaatctgytcacakgt	
	2	MP-2-223 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> tcaccgtgccagtgagcg	527
MP-2-750 REV		caggaaacagctatgacctcayttgaaycgytgcat		
3	MP-3-383 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> ttctctgctggwcacttgccagttg	644	
	MP-3-1027 REV	caggaaacagctatgaccagtagmaacaaggtagt		
NS	1	NS-1-24 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> tagcaaaagcagggtgacaaagaca	458
		NS-1-482 REV	caggaaacagctatgacctcggtaagccctta	
	2	NS-2-242 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> ttgcatctgtgcctacttc	605
NS-2-847 REV		caggaaacagctatgacctagtagaaacaggggtgttttta		
3	NS-3-418 FOR	<u>tgtaaacgacggccag</u> taaaagcdaayttcagttg	324	
	NS-3-742 REV	caggaaacagctatgacctcaathagccatctta		

## Sequenziamento con tecnologia NGS su piattaforma Ion Torrent PGM

Il sequenziamento, sulla piattaforma Ion Torrent PGM, avviene su un supporto di materiale semiconduttore, il c.d. chip, in grado di rilevare le variazioni di pH che vengono generate durante la sintesi del filamento di DNA, secondo la chimica che sta alla base di questa tecnologia NGS (*cf.* Diagnosi, Tecniche di sequenziamento). Sono prodotti chip con “capacità” scalari, cioè possono produrre una differente quantità di dati, consentendo di modulare il sistema in base alle necessità sperimentali: Ion 314 Chip (10-30 Mb), Ion 316 Chip (100-300 Mb), Ion 318 Chip (600 Mb-2 Gb) (Life Technologies). Poiché è possibile sequenziare contemporaneamente più campioni nella stessa corsa (fino a 32 campioni), in base al materiale a disposizione e alla dimensione dei FLUAV (circa 14 kb), i 62 SIV sono stati suddivisi in quattro gruppi: 2 corse su Ion 314 Chip di 10 campioni ciascuna, 2 corse su Ion 316 Chip di 21 campioni ciascuna. E’ importante pianificare al meglio la corsa di sequenziamento per ottenere buoni risultati: il produttore consiglia di considerare almeno un *coverage* medio di 100X (cioè ogni base nucleotidica sequenziata è stata mediamente rilevata 100 volte) per ogni campione caricato su chip.

Il sequenziamento con metodica NGS è caratterizzato da 4 fasi principali:

- Preparazione della libreria
- Amplificazione del template
- Sequenziamento
- Analisi dei dati

### Preparazione della libreria

Gli otto segmenti di RNA virale dei SIV sono stati retrotrascritti e amplificati in un’unica reazione (SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase, Invitrogen), mediante una RT-PCR multi-segmento, come descritto da Zhou e Wentworth (2012). Gli Autori hanno sviluppato un protocollo che permette l’amplificazione dell’intero genoma di Influenza A virus, indipendentemente dal sottotipo, utilizzando un solo set di *primer* (Tabella 8), disegnati sulle regioni terminali conservate, presenti in tutti i segmenti dei virus appartenenti a questo gruppo. Con questa metodica si ottengono risultati efficienti anche processando direttamente il campione biologico, senza la necessità di isolare e propagare precedentemente il virus. In aggiunta, i *primer* sono utilizzati a concentrazioni diverse in reazione, al fine di ottenere un’amplificazione più uniforme di ogni segmento e migliorare le rese dei segmenti più grandi (PB2, PB1, PA), che generalmente risultano sottorappresentati rispetto a quelli più corti (in una reazione su 25 µl di volume totale, sono aggiunte 2 pmol di Uni12/Inf-1, 3 pmol di Uni12/Inf-3 e 5 pmol di Uni13/Inf-1).

I prodotti di PCR sono stati evidenziati mediante visualizzazione al transilluminatore UV di gel di agarosio colorato con un intercalante del DNA (Gel-Red nucleic acid gel strains, Biotium), dopo corsa elettroforetica; la dimensione degli amplificati attesi varia in funzione della lunghezza del segmento genico (da circa 900 bp a circa 2400 bp) e, poiché PB2, PB1 e PA hanno quasi la stessa dimensione, i frammenti migrano insieme, rilevati come un’unica banda.

**Tabella 8:** *Primer* utilizzati per l'amplificazione dei SIV analizzati con tecnologia NGS. Le regioni dei *primer* conservate complementari all'RNA di FLUAV sono sottolineate (da Zhou and Wentworth, 2012).

<b>Uni12/Inf-1</b>	5'-GGGGGG <u>GAGCAAAAGCAGG</u> -3'
<b>Uni12/Inf-3</b>	5'-GGGGGG <u>GAGCGAAAGCAGG</u> -3'
<b>Uni13/Inf-1</b>	5'-CGGGTTATTAGTAGAAACAAGG-3'

Gli amplificati ottenuti sono stati purificati utilizzando un sistema con biglie magnetiche, in grado di legare i frammenti di DNA ed eliminare i restanti reagenti della reazione di PCR, secondo le istruzioni del produttore (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter).

Il DNA purificato è stato quantificato utilizzando il fluorimetro Qubit (Qubit dsDNA BR Assay kit, Invitrogen), secondo le specifiche del produttore. Ad un'aliquota di campione è aggiunto un intercalante fluorescente, in grado di legarsi in modo aspecifico al DNA: lo strumento riesce a rilevare la fluorescenza emessa generata dalle molecole eccitate da un fascio luminoso.

Per ogni campione, 100 ng di DNA amplificato e purificato sono stati sottoposti a digestione enzimatica, in modo da ottenere frammenti della lunghezza di circa 200 bp: il materiale è stato incubato per 10 minuti a 37°C con i reagenti forniti nel kit Ion Shear DNA fragmentation (Life Technologies), secondo le istruzioni del produttore. Il DNA frammentato è stato purificato utilizzando il sistema Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter).

A questo punto, i campioni sono stati ligati ognuno ad un oligonucleotide diverso con sequenza nota (i c.d. *barcode*), in modo da poter sequenziare alla fine della preparazione più campioni contemporaneamente e grazie a questa "marcatura" riconoscerli e differenziarli durante l'analisi bioinformatica dei dati. Inoltre, insieme ai *barcode* sono stati ligati anche oligonucleotidi con sequenze standard (i c.d. adattatori), utilizzati in seguito per l'amplificazione clonale e il sequenziamento dei frammenti. Il DNA è stato purificato utilizzando il sistema Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter).

Al fine di ottenere una miscela omogenea di frammenti di circa 200 bp per il sequenziamento, è stato prelevato selettivamente il DNA della dimensione desiderata utilizzando lo strumento E-Gel Size Select (Life Technologies). Lo strumento è formato da un particolare apparato per elettroforesi che permette la separazione dei frammenti in base alla dimensione e il loro prelievo direttamente in acqua, senza dover tagliare la banda di interesse da gel di agarosio e pertanto purificare il materiale.

Il DNA così ottenuto è stato amplificato con una Taq polimerasi ad alta fedeltà di sintesi con solo 8 cicli di amplificazione di PCR, per ridurre il più possibile la possibilità di introduzione di mutazioni dovute all'enzima (Platinum PCR SuperMix High Fidelity, Life Technologies); i *primer* utilizzati sono complementari agli adattatori precedentemente ligati ai frammenti. I

prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il sistema Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter).

Il calcolo della corretta concentrazione dei campioni è fondamentale per una buona riuscita dell'amplificazione clonale del template mediante PCR in emulsione. Un'aliquota del DNA ottenuta da ogni campione è stata analizzata utilizzando lo strumento Bioanalyzer 2100 (Agilent), che sfrutta il principio dell'elettroforesi capillare, permettendo non solo di rilevare la quantità di DNA presente, ma anche la dimensione dei frammenti. I dati ottenuti sono stati analizzati con l'ausilio del *software* 2100 Expert in dotazione con lo strumento, che consente di calcolare la molarità. I campioni sono stati conservati a -20°C fino al loro utilizzo.

In seguito, ogni campione è stato diluito con acqua sterile priva di nucleasi, in modo da ottenere una concentrazione finale di circa 23 pmol/L. In base alla pianificazione della corsa di sequenziamento, i campioni sono stati riuniti a formare un'unica libreria finale (è stata prelevata un'aliquota di 20 µl da ciascun campione diluito): la libreria così ottenuta è stata conservata in ghiaccio fino al suo utilizzo.

### Amplificazione del template

L'amplificazione della libreria avviene mediante PCR in emulsione, eseguita dallo strumento IonOneTouch (Life Technologies). La PCR in emulsione permette l'amplificazione di miscele complesse di DNA, con la compartimentalizzazione del DNA in un'emulsione acqua/olio. I frammenti del template sono segregati nelle piccole gocce d'acqua dell'emulsione e sono amplificati in isolamento, permettendo l'utilizzo di basse quantità di DNA.

Ciascun frammento viene amplificato clonalmente sulla superficie di particolari microsfere, rivestite da sequenze complementari all'adattatore legato in precedenza al frammento. La concentrazione finale dei reagenti deve essere tale affinché in ogni goccia d'acqua siano presenti una sfera, un solo frammento di DNA, i *primer* e la polimerasi, in modo da ottenere l'amplificazione di un unico frammento sulla stessa sfera (amplificazione monoclonale), poiché il sequenziatore andrà a rilevare la sintesi dei filamenti presenti su ciascuna di queste. Se sono clonati più frammenti sulla medesima sfera (amplificazione policlonale), i dati prodotti non sono utilizzabili.

La miscela di reazione è stata preparata utilizzando il kit Ion OneTouch 200 (Life Technologies), secondo le istruzioni del produttore.

A questo punto, mediante l'utilizzo di un altro strumento, lo Ion OneTouch ES (Life Technologies), la libreria viene sottoposta a una particolare purificazione automatizzata, in cui si eliminano le sfere che non presentano frammenti clonati sulla loro superficie. Il protocollo prosegue con un passaggio di controllo: un'aliquota del campione viene quantificata mediante fluorimetro Qubit (Ion Sphere Quality Control Kit, Life Technologies), per verificare l'effettiva presenza di DNA amplificato sulle sfere, prima di procedere col sequenziamento.

## Sequenziamento

Il sequenziamento è stato effettuato utilizzando il kit Ion PGM Sequencing 200 kit v2, seguendo le istruzioni del produttore.

Preliminarmente, lo strumento esegue una fase di c.d. inizializzazione, in cui effettua automaticamente una serie di passaggi per portare le soluzioni che intervengono nel sequenziamento ad un pH ottimale di 7,75. Poiché tutta la tecnologia è basata sulla misurazione di minime variazioni di pH, questa è una fase delicata da cui dipende il buon esito della corsa, pertanto richiede la massima cura nella preparazione delle soluzioni di partenza. I dNTP vengono caricati a parte, in particolari supporti, avendo l'accortezza di cambiarsi ogni volta i guanti, per non causare cross-contaminazioni tra le diverse basi nucleotidiche, andando ad alterare le sequenze ottenute. I dNTP sono fatti fluire uno per volta nel chip durante il sequenziamento e lo strumento rileva, a livello di ogni pozzetto contenente una sfera, quando un nucleotide viene incorporato dalla polimerasi.

La libreria è stata caricata sul chip (Ion 314 Chip o Ion 316 Chip, in funzione della libreria analizzata, come riportato in precedenza), utilizzando un'apposita centrifuga, che permette un'ottimale distribuzione delle sfere: ogni sfera deve andare a localizzarsi in uno dei micropozzetti presenti sulla superficie del chip, mentre il resto della soluzione del campione viene eliminato. Il sequenziamento dura circa 3 ore.

## Analisi dei dati

L'analisi dei dati grezzi comincia contestualmente al sequenziamento ma si estende oltre la fine della corsa, con una durata complessiva di circa 4/5 ore.

Allo strumento è collegato un server dedicato, il Torrent Server, in cui è installato il *software* Torrent Browser, che esegue le analisi delle sequenze del DNA dai dati ricevuti dal PGM. Dal Torrent Browser è possibile gestire e pianificare le analisi.

L'analisi dei dati per la ricostruzione del genoma dei SIV è stata effettuata utilizzando due diversi approcci: *mapping*, con l'assemblaggio delle *reads* (sequenze dei frammenti di DNA clonati nella libreria) su una sequenza di riferimento, e *de novo*, con l'unione delle *reads* in base alle porzioni che si sovrappongono fino a formare una sequenza completa (c.d. *contig*).

Il problema dell'assemblaggio delle sequenze può essere paragonato a prendere molte copie di un libro e passarle attraverso un tritatore con *cutter* diversi, per poi cercare di ricostruire il testo solo attraverso i pezzi tritati.

Le *reads* ottenute sono state analizzate utilizzando due *software*: il Pathogen Analyzer (Torrent Suite Software, Life Technologies) e il CLC Genomics Workbench (CLC bio, Qiagen).

E' stato eseguito il *mapping* utilizzando come sequenze di riferimento quelle di diversi sottotipi di FLUAV (H1N1, H1N2, H3N2) sia con il Pathogen Analyzer sia con il CLC Genomics Workbench: sono state accettate solo le *reads* con almeno un *coverage* di 20X, ogni base che presentava un valore minore era rappresentata in sequenza con una "N". Le sequenze *consensus* di ogni segmento di ogni campione, ottenute con i due *software*, sono state confrontate tra loro; nel caso ci fossero differenze nucleotidiche nella sequenza o la presenza di "N", è stato effettuato, per quel SIV, anche l'assemblaggio *de novo* utilizzando il CLC Genomics

Workbench. In base alle *contig* generate le *consensus* ottenute con il *mapping* sono state corrette mediante *manual editing*.

## **Analisi genomica e filogenetica**

Le sequenze sono state allineate ed analizzate, confrontandole con sequenze di riferimento presenti in *GenBank*, il database libero e gratuito di *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*), allo scopo di evidenziare possibili mutazioni significative, note per determinare una variazione della virulenza, della trasmissibilità e della farmacoresistenza agli antinfluenzali. In aggiunta, ognuno degli 8 segmenti genici di ciascun campione è stato analizzato singolarmente mediante il *software* Blast, disponibile gratuitamente ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)), che confronta le sequenze con quelle presenti nel database *NCBI*.

Tutte le sequenze dei geni interni sono state analizzate insieme, mentre, considerando le particolarità caratteristiche di ogni sottotipo per quanto riguarda le proteine di superficie, i sottotipi H1, H3, N1 e N2 sono stati esaminati separatamente.

L'allineamento è stato eseguito utilizzando il *software* MAFFT v.7, disponibile gratuitamente (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

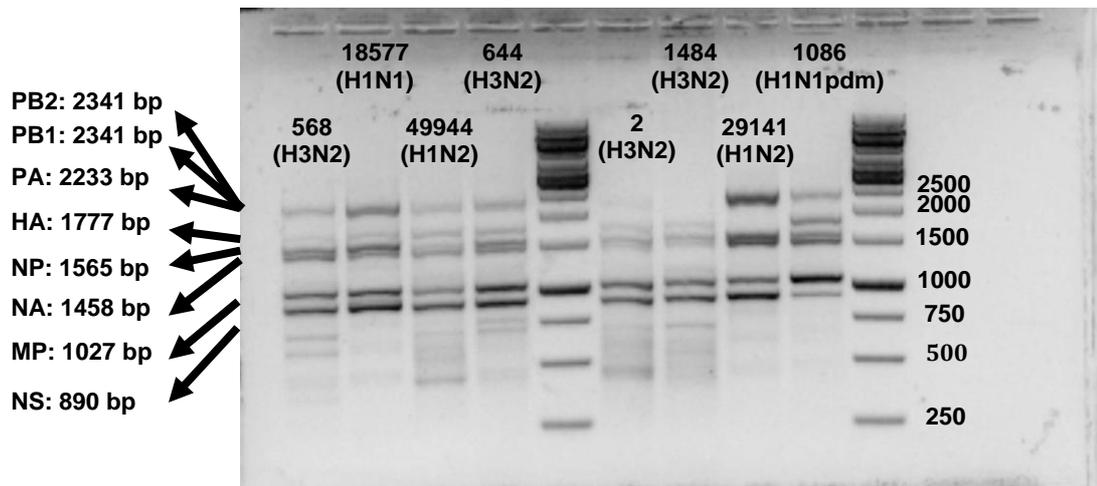
L'analisi filogenetica è stata condotta confrontando le sequenze dei campioni esaminati con quelle disponibili in *GenBank* di SIV, FLUAV aviari e FLUAV umani, utilizzando il *software* MEGA 5.2. La costruzione degli alberi filogenetici è stata realizzata utilizzando l'algoritmo Neighbor Joining (*pairwise deletion*) con il modello Kimura-2, con 1000 repliche per ogni albero. Ad ogni nodo di ramificazione dell'albero è misurato il *bootstrap* (*bootstrapping*: test di accuratezza filogenetica), cioè la percentuale di repliche di albero che hanno presentato lo stesso nodo: il *bootstrap* è stato riportato solo quando il suo valore superava il 70%. Come per l'analisi genomica anche per quella filogenetica, considerando l'alta variabilità e le caratteristiche peculiari dei geni che codificano le proteine di superficie, quest'ultime sono state analizzate separatamente in funzione del sottotipo di appartenenza, mentre le sequenze dei geni interni sono state analizzate insieme, gene per gene.

## RISULTATI

### Protocollo NGS e validazione mediante metodo Sanger

Per la validazione del protocollo di sequenziamento di virus influenzali con NGS, in primo luogo è stata verificata l'efficienza di amplificazione del set di *primer* universali per FLUAV scelti (Tabella 8): tutti gli 8 segmenti di SIV appartenenti ai diversi sottotipi H1N1, H1N1pdm, H1N2 e H3N2 sono stati amplificati, sebbene i segmenti più corti appaiano tendenzialmente più rappresentati (Figura 7).

**Figura 7:** Risultati dell'amplificazione degli 8 segmenti genici di alcuni SIV analizzati, appartenenti a sottotipi diversi.



Sono stati analizzati un totale di 62 campioni, divisi in 4 corse di sequenziamento su piattaforma Ion Torrent PGM. La lunghezza media delle *reads* ottenute è stata di circa 170 bp, con un *coverage* medio complessivo (valutando il *coverage* medio di ogni segmento genico) per ciascun campione di circa 700X (cioè, in media, ogni base delle sequenze dell'intero genoma è stata rilevata 700 volte in quella posizione dallo strumento). Analizzando i dati grezzi di ogni segmento di ciascun campione, si è osservato che, tendenzialmente, le estremità dei segmenti più lunghi presentavano un *coverage* minore, rispetto alla parte centrale della sequenza genica, forse dovuto alla tipologia di frammentazione del DNA, con maggiore digestione delle parti esterne e loro perdita durante la purificazione del materiale.

Le sequenze ottenute con metodo Sanger (Tabella 6) sono state confrontate con quelle ottenute con NGS, evidenziando un'identità nucleotidica del 100% per tutti gli 8 segmenti di ciascun campione analizzato con le due tecnologie.

## Analisi genomica

Le sequenze di ognuno degli 8 segmenti genici sono state analizzate mediante il *software* Blast, allo scopo di evidenziare l'eventuale presenza di delezioni o inserzioni amminoacidiche rispetto ai SIV appartenenti allo stesso sottotipo isolati fino ad oggi, presenti nel database di *GenBank*. L'analisi delle sequenze di 4 campioni di A(H1N1)pdm09 (A/sw/It/120336/2012; A/sw/It/225349-1/2012; A/sw/It/225349-2/2012; A/sw/It/225349-4/2012) ha dimostrato la presenza di un'inserzione di due aa, lisina (K) e acido glutammico (E), in posizione 173-174, a livello del gene dell'HA. Inoltre, è stata evidenziata anche una delezione di 2 aa, in posizione 146-147, in 4 campioni appartenenti al sottotipo H1N2, di nuovo a livello del gene dell'HA (A/sw/It/29141/2008; A/sw/It/43657/2012; A/sw/It/276125/2013; A/sw/It/37598/2014). Mentre la delezione in posizione 146-147 è stata ampiamente descritta per SIV appartenenti al sottotipo H1N2 isolati in Italia (Moreno *et al.*, 2012), l'inserzione evidenziata nei pandemici è stata descritta unicamente in 5 SIV isolati nel 2008 in USA (Illinois), appartenenti al gruppo filogenetico dell'HA-H1- $\gamma$  (H1 derivata dal SIV triplo riassortante H1N2) (Detmer *et al.*, 2013). Data la particolarità di questa inserzione, se ne è confermata la presenza anche con sequenziamento con metodo Sanger, in aggiunta il SIV A/sw/It/225349-1/2012 è stato sequenziato anche partendo direttamente dal campione biologico, per verificare che l'inserzione non fosse dovuta ad una mutazione acquisita in seguito alla propagazione su UEP. È stato condotto uno studio approfondito su questi SIV A(H1N1)pdm09, analizzando i campioni prelevati prima e dopo l'episodio epidemico del primo isolato evidenziato (A/sw/It/120336/2012), per verificare il mantenimento dell'inserzione nei ceppi circolanti in seguito e la ricerca del possibile progenitore da cui sono derivati. È stato confermato il mantenimento dell'inserzione nei ceppi successivi, mentre era assente nel ceppo evidenziato quale probabile progenitore (A/sw/It/325451/2011). I dati ottenuti sono stati oggetto della seguente pubblicazione: "*Genetic characterization and evolution of H1N1pdm09 after circulation in a swine farm*" (Boni *et al.*, 2014).

La patogenicità dei virus influenzali è determinata da un complesso multigenico, dovuta all'interazione di una costellazione di geni di un particolare ceppo con un ospite specifico. Sono note, comunque, alcune mutazioni genetiche in grado di influenzare la virulenza e la trasmissibilità dei virus (*cf.* Eziologia, Fattori di virulenza): per ciascun campione, sono state analizzate le sequenze amminoacidiche al fine di evidenziare eventuali sostituzioni a livello di determinate posizioni, i c.d. marcatori molecolari di patogenicità (Tabella 9, 10, 11).

Nell'analisi dei fattori di virulenza si fa riferimento a una numerazione amminoacidica di tipo H3 *numbering* per l'HA, N2 *numbering* per la NA.

L'analisi della PB2 si è focalizzata sulle posizioni 590, 591, 627 e 701 (Tabella 9, 10). Il polimorfismo SR in posizione 590-591 o la sostituzione E627K determinano un adattamento dalla specie aviaria ai mammiferi, consentendo l'attività della polimerasi alle temperature del tratto superiore delle vie respiratorie. Solo i SIV H1N1pdm09 presentano il polimorfismo SR in posizione 590-591, mentre nessuno dei campioni esaminati presenta la mutazione E627K. Tre SIV (A/sw/It/568/1999(H3N2); A/sw/It/5421/2012(H1N1); A/sw/It/173301/2013(H3N2)) tra quelli sequenziati presentano la mutazione Q591K, che determina non solo un aumento

dell'attività della polimerasi, ma anche un incremento della replicazione virale e della virulenza nel modello animale. La sostituzione D701N è associata ad un aumento della virulenza nei mammiferi, con un incremento della replicazione virale e della localizzazione nucleare della PB2. Tutti i SIV analizzati, fatta eccezione dei SIV H1N1pdm09, presentano la mutazione D701N.

La PB1-F2, generalmente espressa in tutti i FLUAV aviari, si può presentare in forma tronca nell'uomo e nel suino. Le proteine di lunghezza pari o superiore ai 79 aa sono funzionali, mentre le forme tronche più corte sembrano associate alla perdita della capacità apoptotica. L'introduzione della mutazione N66S causa un aumento della patogenicità nel modello animale. Tutti i SIV pandemici presentano una forma tronca di soli 11 aa. Per quanto riguarda gli altri SIV, si osserva la tendenza a una forma tronca nei virus isolati fino alla prima metà degli anni 2000, mentre quelli più recenti presentano una proteina funzionale. Dei 38 SIV che presentano una PB1-F2 di dimensione uguale o superiore ai 79 aa, 7 presentano la sostituzione N66S (5 di questi, isolati tra il 2012 e il 2014) (Tabella 9, 10).

Sono state analizzate tutte le sequenze di H1 in posizione 186, 190 e 225 (Tabella 9). E' stato dimostrato nel suino che la sostituzione S186P provochi un incremento sia per quanto riguarda il titolo del virus eliminato che il periodo di eliminazione virale, favorendo la trasmissione all'interno della popolazione suina. In tutti i campioni, fatta eccezione per 3 SIV H1N2 e 5 SIV H1N1pdm09, è stata evidenziata la sostituzione S186P. Fatto interessante, tra i campioni pandemici solo quelli che presentano l'inserzione e il loro progenitore esprimono P186.

In posizione 190 (che insieme alla 225 rappresentano un determinante di specificità dell'ospite), la maggioranza dei campioni analizzati presenta un acido aspartico (D), che esprime la specificità per uomo e suino. Otto SIV presentano sostituzioni D190N/D190V, che in letteratura sono descritte quali effetto dell'isolamento su UEP (Takemae *et al.*, 2010): 7 dei SIV in questione sono stati isolati su UEP, mentre uno su colture cellulari Caco-2 (A/sw/It/18577/2012) (Tabella 6, 9). Solo i campioni pandemici con inserzione e progenitore presentano una sostituzione "unica", per quanto è a noi noto non descritta in letteratura, esprimendo una serina (S) in posizione 190.

Per quanto riguarda la posizione 225, nei SIV analizzati si evidenziano D225 per tutti i pandemici (specifico per l'uomo), mentre la maggioranza dei campioni presenta le sostituzioni 255E, 225G, 225K, prevalenti nei SIV circolanti in Europa. 5 SIV esprimono in posizione 225 un'asparagina (N).

Tutte le sequenze del gene dell'HA dei SIV appartenenti al sottotipo H3 presentano le sostituzioni Q226L e G228S, specifiche per il recettore di tipo umano (Tabella 10): dato atteso, considerando che l'origine dell'HA di questo sottotipo, circolante nei suini, è umana.

Tutti i SIV pandemici, e unicamente questi tra i campioni analizzati, presentano un'isoleucina in posizione 100 nel gene della NP, che sembra associata all'incremento dell'infettività e della trasmissione nella popolazione umana.

Per quanto riguarda la proteina NS1, la sostituzione D92E, associata alla replicazione virale in presenza di IFN, non è stata rilevata in nessuno dei campioni analizzati.

**Tabella 9:** Analisi dei fattori di virulenza dei SIV appartenenti al sottotipo H1. Sono evidenziate in blu le sostituzioni associate ad aumento di virulenza o trasmissibilità virale.

SIV	Sottotipo	PB2				PB1-F2		HA★			NP	NS
		590	591	627	701	66	lunghezza	186	190	225	100	92
9328/1998	H1N1	G	Q	E	N	-	52 aa	P	D	G	K	D
10169/2001	H1N1	G	Q	E	N	-	52 aa	P	D	G	R	D
21963/2001	H1N1	G	Q	E	N	-	52 aa	P	N	E	R	D
207828/2002	H1N1	G	Q	E	N	-	52 aa	P	N	E	R	D
23159/2002	H1N1	G	Q	E	N	-	63 aa	P	N	E	R	D
227234/2003	H1N1	G	Q	E	N	S	90 aa	P	N	E	R	D
26151758/2004	H1N1	G	Q	E	N	N	90 aa	P	D	G	R	D
286014/2005	H1N1	G	Q	E	N	N	90 aa	P	D	G	R	D
102793/2006	H1N1	G	Q	E	N	N	90 aa	P	D	K	R	D
21486/2006	H1N1	G	Q	E	N	N	90 aa	P	D	G	R	D
195699/2007	H1N1	G	Q	E	N	N	90 aa	P	V	E	R	D
29141/2008	H1N2	G	Q	E	N	N	90 aa	S	N	N	R	D
207871/2008	H1N1	G	Q	E	N	N	90 aa	P	D	E	R	D
44795/2008	H1N1	G	Q	E	N	N	90 aa	P	D	K	R	D
317956/2008	H1N1	G	Q	E	N	N	90 aa	P	D	K	R	D
53699/2009	H1N1	G	Q	E	N	N	79 aa	P	V	E	R	D
1086/2010	H1N1pdm	S	R	E	D	-	11 aa	S	D	D	I	D
71028/2010	H1N1pdm	S	R	E	D	-	11 aa	S	D	D	I	D
152077/2010	H1N1pdm	S	R	E	D	-	11 aa	S	D	D	I	D
324538/2010	H1N1pdm	S	R	E	D	-	11 aa	S	D	D	I	D
41038/2011	H1N1	G	Q	E	N	N	87 aa	P	D	G	R	D
325451/2011	H1N1pdm	S	R	E	D	-	11 aa	P	S	D	I	D
26654/2012	H1N2	G	Q	E	N	N	90 aa	P	D	E	R	D
43657/2012	H1N2	G	Q	E	N	S	87 aa	P	D	N	R	D
18577/2012	H1N1	G	Q	E	N	S	90 aa	P	N	N	R	D
5421/2012	H1N1	G	K	E	N	S	90 aa	P	D	E	R	D
120336/2012	H1N1pdm	S	R	E	D	-	11 aa	P	S	D	I	D
225349-1/2012	H1N1pdm	S	R	E	D	-	11 aa	P	S	D	I	D
225349-2/2012	H1N1pdm	S	R	E	D	-	11 aa	P	S	D	I	D
225349-4/2012	H1N1pdm	S	R	E	D	-	11 aa	P	S	D	I	D
276125/2013	H1N2	G	Q	E	N	S	90 aa	S	D	N	R	D
47466/2013	H1N1pdm	S	R	E	D	-	11 aa	S	D	D	I	D
37598/2014	H1N2	G	Q	E	N	S	90 aa	S	D	N	R	D
49944/2014	H1N2	G	Q	E	N	N	90 aa	P	D	E	R	D

★ H3 numbering

**Tabella 10:** Analisi dei fattori di virulenza dei SIV appartenenti al sottotipo H3N2. Sono evidenziate in blu le sostituzioni associate ad aumento di virulenza o trasmissibilità virale.

SIV	PB2				PB1-F2		HA*		NP	NS
	590	591	627	701	66	lunghezza	226	228	100	92
8550/1998	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
8143/1998	G	Q	E	N	-	52 aa	L	S	R	D
568/1999	G	K	E	N	-	57 aa	L	S	K	D
644/2000	G	Q	E	N	-	52 aa	L	S	R	D
7680/2001	G	Q	E	N	-	52 aa	L	S	R	D
2608/2001	G	Q	E	N	-	52 aa	L	S	R	D
1484/2002	G	Q	E	N	-	52 aa	L	S	R	D
253025/2003	G	Q	E	N	-	52 aa	L	S	R	D
302623/2004	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
1639-16/2005	G	Q	E	N	-	63 aa	L	S	R	D
301041/2006	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
32242/2006	G	Q	E	N	-	52 aa	L	S	R	D
278499/2006	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
110028/2007	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
206453/2007	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
209720/2008	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
301284/2008	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
30153/2009	G	Q	E	N	N	79 aa	L	S	R	D
224917/2010	G	Q	E	N	S	90 aa	L	S	R	D
31005/2010	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
265749 1-5/2011	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
265749 16-20/2011	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
2/2011	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
4/2011	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
46940/2012	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
5431/2012	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
40771/2012	G	Q	E	N	N	90 aa	L	S	R	D
173301/2013	G	K	E	N	N	90 aa	L	S	R	D

★ H3 numbering

I farmaci antinfluenzali sono divisi in due classi: adamantani, che hanno come bersaglio la M2, e gli inibitori della NA (oseltamivir).

Le sostituzioni H274Y o N294S, solitamente evidenziate nei virus appartenenti al sottotipo N1, ed E119V o R292K, nel sottotipo N2, sono associate allo sviluppo di resistenza all'antivirale oseltamivir, il farmaco antinfluenzale più utilizzato in medicina umana. Nessun SIV esaminato mostra una mutazione che determini resistenza all'oseltamivir (Tabella 11).

Le sostituzioni in posizione G16E, L26I, V27A, A30T, S31N, G34E e R77Q, a livello del gene che codifica la M2, sono state associate a resistenza agli adamantani; inoltre anche le mutazioni V27I, V27T e V27S, sebbene meno frequenti, possono determinare resistenza a questa classe di farmaci antinfluenzali. Tutti i SIV sequenziati presentano almeno un fattore di resistenza agli adamantani, fatta eccezione del virus A/sw/It/41038/2011(H1N1) (Tabella 11). Quasi tutti i campioni presentano le tre sostituzioni G16E, S31N e R77Q; con l'eccezione di A/sw/It/41038/2011(H1N1), solo il SIV A/sw/It/227234/2003(H1N1) non presenta la mutazione S31N. Il virus A/sw/It/278499/2006 (H3N2) presenta una valina (V) in posizione 26, dovuta a una mutazione puntiforme con scambio di una guanina (G) con un'adenina (A). Per quanto è a noi noto, questa sostituzione non è stata descritta fino ad oggi in alcun SIV, né è mai stata associata a farmaco-resistenza. Nessuno dei SIV esaminati presenta le mutazioni A30T o G34E.

**Tabella 11:** Marcatori associati a resistenza agli antinfluenzali. Sono evidenziate in blu le sostituzioni che determinano farmaco-resistenza.

Sottotipo N1											Sottotipo N2										
SIV	Sottotipo	NA❖									SIV	Sotto-tipo	NA❖								
		274	294	16	26	27	30	31	34	77			119	292	16	26	27	30	31	34	77
9328/1998	H1N1	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	8550/1998	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
10169/2001	H1N1	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	8143/1998	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
21963/2001	H1N1	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	568/1999	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
207828/2002	H1N1	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	644/2000	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
23159/2002	H1N1	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	7680/2001	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
227234/2003	H1N1	H	N	E	L	V	A	S	G	Q	2608/2001	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
26151758/2004	H1N1	H	N	E	I	A	A	N	G	Q	1484/2002	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
286014/2005	H1N1	H	N	E	I	A	A	N	G	Q	253025/2003	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
102793/2006	H1N1	H	N	E	I	A	A	N	G	Q	302623/2004	H3N2	E	R	E	L	I	A	N	G	Q
21486/2006	H1N1	H	N	E	I	A	A	N	G	Q	1639-16/2005	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
195699/2007	H1N1	H	N	E	I	A	A	N	G	Q	301041/2006	H3N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
207871/2008	H1N1	H	N	E	I	A	A	N	G	Q	32242/2006	H3N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
44795/2008	H1N1	H	N	E	I	A	A	N	G	Q	278499/2006	H3N2	E	R	E	V	A	A	N	G	Q
317956/2008	H1N1	H	N	E	I	A	A	N	G	Q	110028/2007	H3N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
53699/2009	H1N1	H	N	E	I	A	A	N	G	Q	206453/2007	H3N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
1086/2010	H1N1pdm	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	209720/2008	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
71028/2010	H1N1pdm	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	301284/2008	H3N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
152077/2010	H1N1pdm	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	29141/2008	H1N2	E	R	E	I	S	A	N	G	Q
324538/2010	H1N1pdm	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	30153/2009	H3N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
41038/2011	H1N1	H	N	G	L	V	A	S	G	R	224917/2010	H3N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
325451/2011	H1N1pdm	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	31005/2010	H3N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
18577/2012	H1N1	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	265749 1-5/2011	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
5421/2012	H1N1	H	N	E	I	A	A	N	G	Q	265749 16-20/2011	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
120336/2012	H1N1pdm	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	2/2011	H3N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
225349-1/2012	H1N1pdm	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	4/2011	H3N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
225349-2/2012	H1N1pdm	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	46940/2012	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
225349-4/2012	H1N1pdm	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	5431/2012	H3N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
47466/2013	H1N1pdm	H	N	E	L	V	A	N	G	Q	40771/2012	H3N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
											26654/2012	H1N2	E	R	E	L	V	A	N	G	Q
											43657/2012	H1N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
											276125/2013	H1N2	E	R	E	I	T	A	N	G	Q
											173301/2013	H3N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
											37598/2014	H1N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q
											49944/2014	H1N2	E	R	E	I	A	A	N	G	Q

❖ N2 numbering

## Analisi filogenetica

Nell'albero filogenetico dell'HA-H1 (Figura 8) si possono evidenziare 6 gruppi filogenetici distinti, formati dai campioni analizzati e dalle sequenze di riferimento utilizzate nell'analisi: i SIV H1N1 *avian-like*, i FLUAV H1N1 di origine aviare, i SIV H1N2, i virus influenzali stagionali umani, i SIV H1N1 che circolano in Nord America e il gruppo dei virus pandemici, isolati sia nell'uomo sia nel suino.

Tutti i SIV analizzati, appartenenti al sottotipo H1N1 (non pandemico), si collocano con i ceppi di riferimento nel gruppo dei SIV H1N1 *avian-like*. Dato interessante, il SIV A/sw/It/41038/2011 si divide dagli altri campioni, formando un sottogruppo con le sequenze di SIV isolati in Europa nella prima metà degli anni '80: il campione mostra elevata omologia con il ceppo A/sw/Finnistere/2899/1982. In aggiunta, nel gruppo degli H1N1 *avian-like* si evidenziano anche due SIV, tra quelli sequenziati, appartenenti al sottotipo H1N2 (A/sw/It/26654/2012; A/sw/It/49944/2014).

Al contrario, gli altri SIV appartenenti al sottotipo H1N2, tra quelli analizzati in questo studio, si dispongono nel gruppo dei SIV H1N2 europei.

I SIV H1N1pdm sono compresi in un gruppo filogenetico derivato dai SIV H1N1 nordamericani, costituito dalle sequenze di riferimento dei virus pandemici, al cui interno i SIV con inserzione e il loro probabile progenitore formano un *cluster* separato: dal progenitore si dividono i rami dei SIV con inserzione (nodi con un *bootstrap* significativo, superiore a 70). Il SIV A/sw/It/47466/2013 mostra elevata omologia con il ceppo A/Czech Republic/30/2013, isolato nell'uomo nello stesso anno.

L'albero filogenetico dell'HA-H3 (Figura 9) è suddiviso in 2 gruppi principali: i SIV H3N2 *human-like* e i virus influenzali stagionali umani appartenenti al sottotipo H3N2, da cui deriva l'HA dei SIV (*cfr.* Epidemiologia, Influenza A virus nel suino). Tutti i campioni esaminati si collocano all'interno del gruppo dei SIV H3N2 con le sequenze di riferimento di altri SIV H3N2 europei: i campioni isolati alla fine degli anni '90 tendono a formare un *cluster* separato rispetto ai SIV isolati più recentemente.

Al contrario dell'HA-H1, la NA dei virus pandemici originati nel 2009 deriva da un virus H1N1 *avian-like* e non dai SIV che circolano in America settentrionale, come si può osservare nell'albero filogenetico della NA-N1 (Figura 10). Si evidenzia, infatti, la derivazione del gruppo dei SIV H1N1 *avian-like* dai FLUAV aviari; da questa radice osserviamo dividersi un primo *cluster* costituito dai SIV H1N1 isolati negli anni '80 e da questo, altri due gruppi, i SIV H1N1 *avian-like* isolati dagli anni '90 in poi e il gruppo dei virus H1N1pdm09. Tutti i campioni sequenziati appartenenti al sottotipo H1N1 (non pandemico) sono presenti nel *cluster* formato con gli altri SIV *avian-like* che circolano in Europa, fatta eccezione del SIV A/sw/It/41038/2011, che si colloca nel gruppo dei SIV isolati negli anni '80, come anche osservato nell'analisi del gene dell'HA; inoltre la sequenza della NA mostra un'identità del 100% con quella del ceppo A/sw/Finnistere/2899/1982.

Nel gruppo filogenetico costituito dai virus pandemici si evince un quadro simile a quello dell'HA: i virus con inserzione e progenitore formano un *cluster* separato, con i SIV che

presentano l'inserzione derivati dal supposto progenitore. Anche per quanto riguarda la NA, il SIV A/sw/It/47466/2013 mostra elevata omologia con il ceppo A/Czech Republic/30/2013.

Nell'albero filogenetico nella NA-N2 (Figura 11) si osservano tutti i SIV sequenziati, appartenenti al sottotipo H3N2, dividersi in un gruppo costituito con gli altri SIV H3N2 *human-like* isolati in Europa: dall'analisi non si evince una suddivisione dei SIV in base temporale, ma, valutando l'anno di isolamento, i sottogruppi che si formano sono tendenzialmente eterogenei.

D'altro canto, tutti i SIV appartenenti al sottotipo H1N2 analizzati non si collocano insieme agli altri SIV H1N2 *human-like* europei, ma vanno a formare un *cluster* diviso, derivato dai virus influenzali stagionali appartenenti al sottotipo H3N2, circolanti nella popolazione umana.

Per quanto riguarda l'analisi filogenetica dei geni interni (Figura 12, 13, 14, 15, 16, 17), è stata effettuata analizzando tutti i campioni insieme, considerando che, a parte i pandemici, tutti i sottotipi di SIV circolanti in Europa presentano i geni interni originati dai SIV H1N1 *avian-like* e la variabilità di questi segmenti è molto più ridotta rispetto ai geni delle proteine di superficie, che subiscono la pressione selettiva del sistema immunitario dell'ospite. Sono state utilizzate come *outgroup* le sequenze dei FLUAV H1N1 di origine aviaria per i SIV H1N1 *avian-like*, mentre per i virus pandemici quelle dei SIV H1N1 nordamericani, con l'eccezione del gene della MP (Figura 16), per cui si fa riferimento solo ai FLUAV aviari (come la NA, anche la MP dei pandemici è derivata da un SIV H1N1 *avian-like*).

Con l'eccezione della MP, l'analisi filogenetica di tutti i geni interni mostra un quadro simile, con i campioni suddivisi in due gruppi: i SIV H1N1 *avian-like* (campioni appartenenti ai sottotipi H1N1 *avian-like*, H3N2 *human-like* e H1N2 *human-like*) e i pandemici (*cluster* derivato dai SIV nordamericani). Nell'albero filogenetico della MP (Figura 16), i SIV pandemici si collocano all'interno del gruppo dei SIV H1N1 *avian-like*, formando un *cluster* separato. All'interno di questo figurano anche i SIV A/sw/It/18577/2012(H1N1) e A/sw/It/26654/2012(H1N2), ma considerando che tutti appartengono comunque allo stesso grande gruppo degli H1N1 *avian-like* che il gene della MP è tra i più conservati nei virus influenzali (la barra di riferimento che indica il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito mostra un valore di 0,005, in contrapposizione con gli altri alberi dove in media è di 0,02), sarebbe forzato parlare di riassortimento.

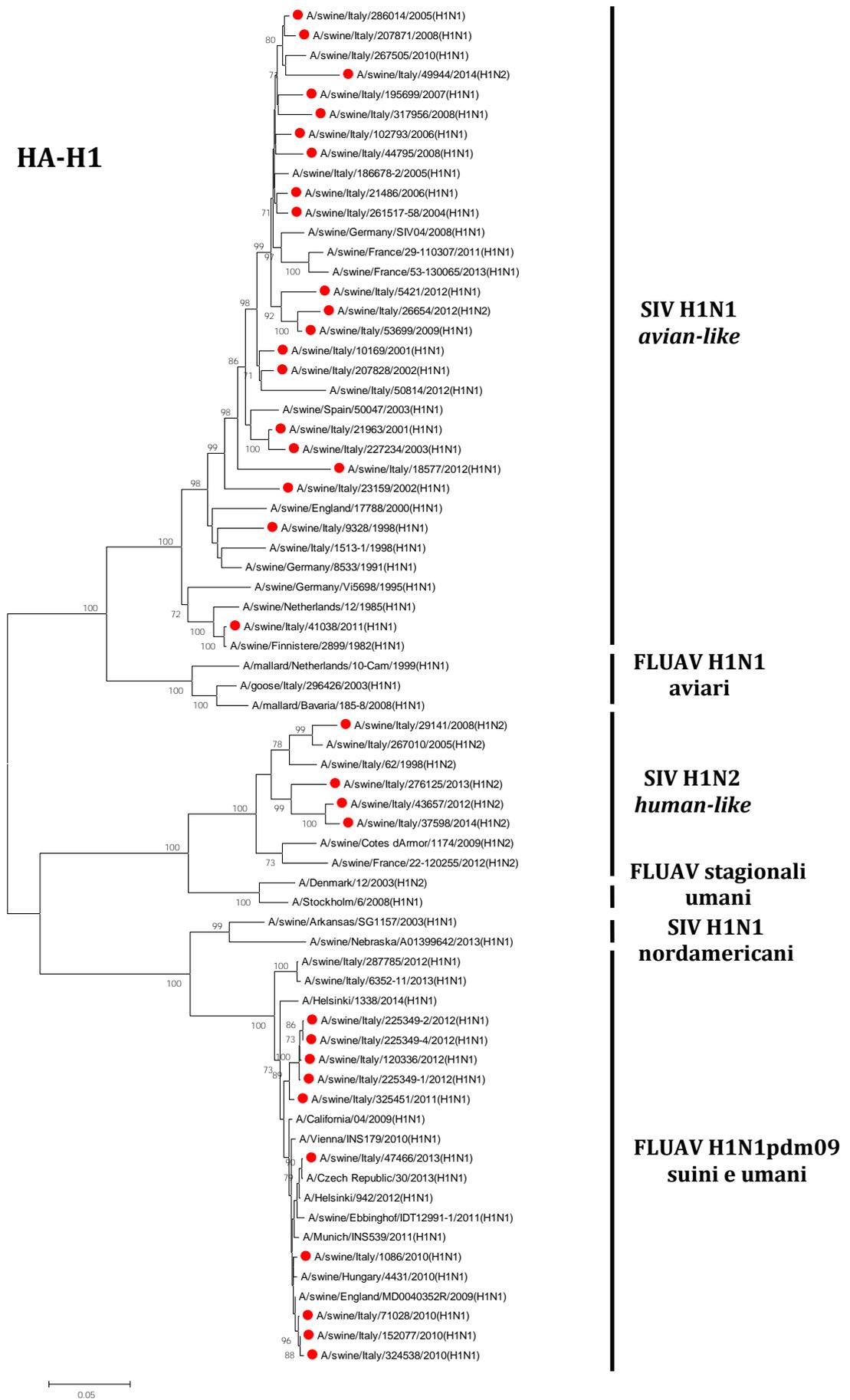
Anche per i geni interni, come evidenziato dall'analisi di HA e NA, il SIV A/sw/It/41038/2011 tende a dividersi dagli altri campioni sequenziati e a formare un *cluster* con i ceppi isolati negli anni '80: il virus mostra un'identità del 100% con il ceppo A/sw/Finnistere/2899/82 per quanto riguarda i geni della NP (Figura 15) e della MP (Figura 16).

I SIV pandemici con inserzione e il progenitore formano un *cluster* separato dagli altri pandemici, evidente nell'analisi filogenetica di tutti i geni, eccetto la MP, in cui il nodo di origine non presenta un *bootstrap* significativo. All'interno del gruppo dei pandemici, il SIV A/sw/It/47466/2013 mostra un'elevata omologia con il ceppo A/Czech Republic/30/2013, per tutti i geni analizzati, come si è osservato per i geni delle proteine di superficie.

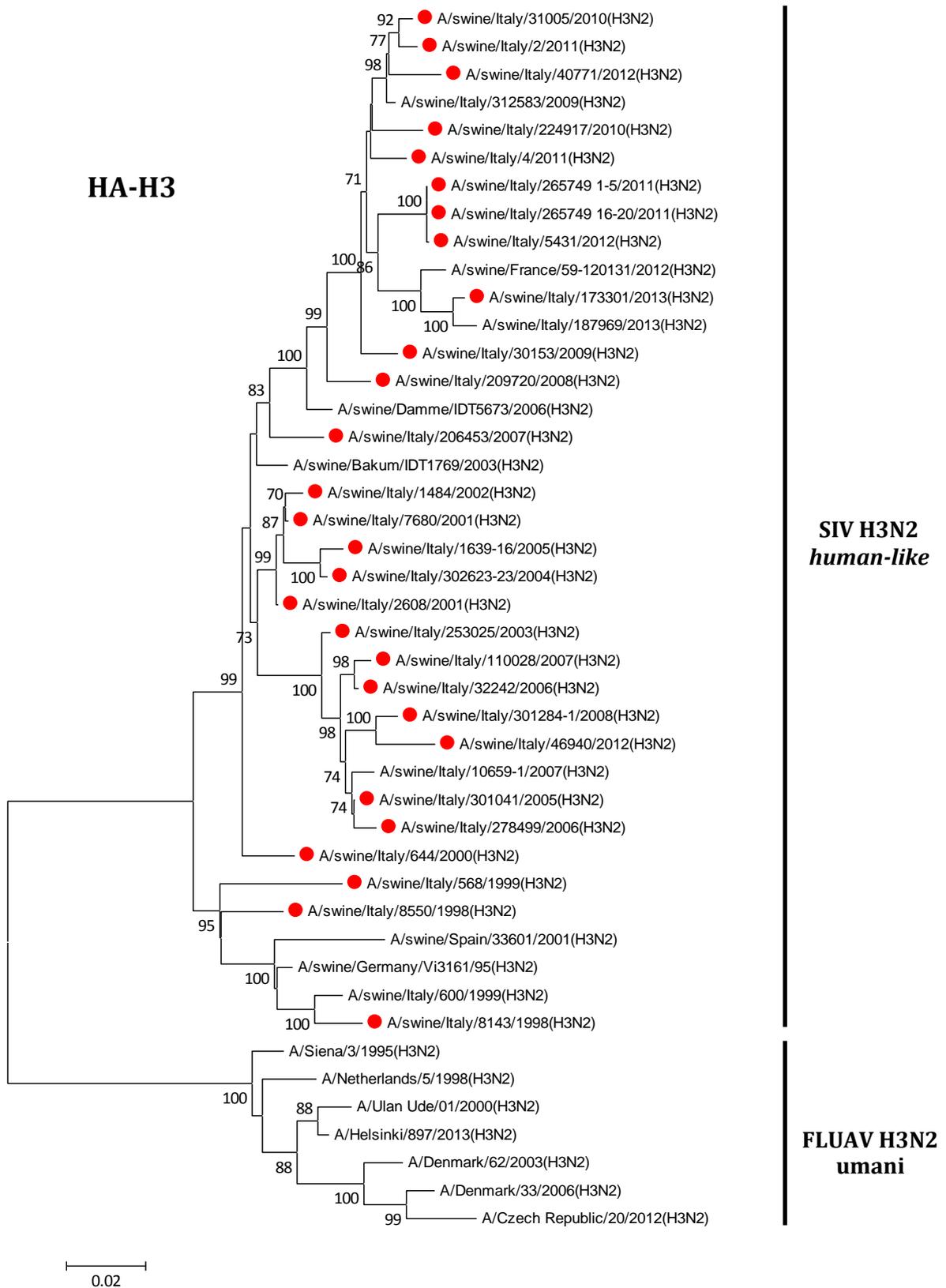
Analizzando mediante il *software* Blast le sequenze del SIV A/sw/It/41038/2011, confrontandole con quelle disponibili nel database *NCBI*, per verificare con quali ceppi questo virus condividesse la più alta omologia è risultato che:

- il SIV mostrava elevata omologia con sequenze unicamente isolate negli anni '80, per tutti i segmenti genici;
- il SIV aveva un'identità nucleotidica del 100% per NP, NA e MP con il virus A/sw/Finistere/2899/1982(H1N1) (come evidenziato nell'analisi filogenetica);
- il SIV aveva un'identità nucleotidica del 100% per la PB2 con il virus A/sw/France/WVL3/1984(H1N1).

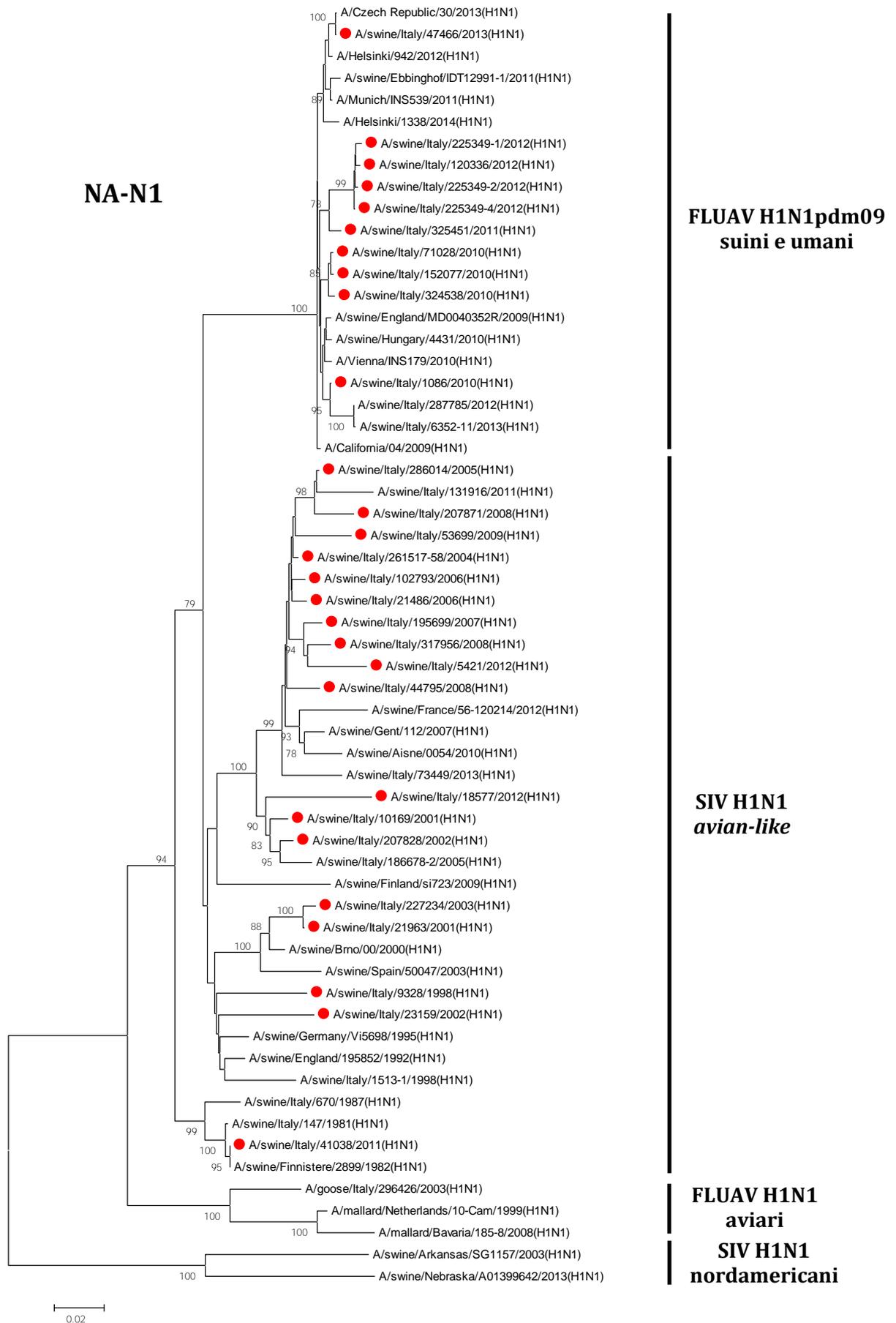
**Figura 8:** Analisi filogenetica del gene dell'HA-H1. I SIV sequenziati con NGS sono indicati con un cerchio rosso pieno.



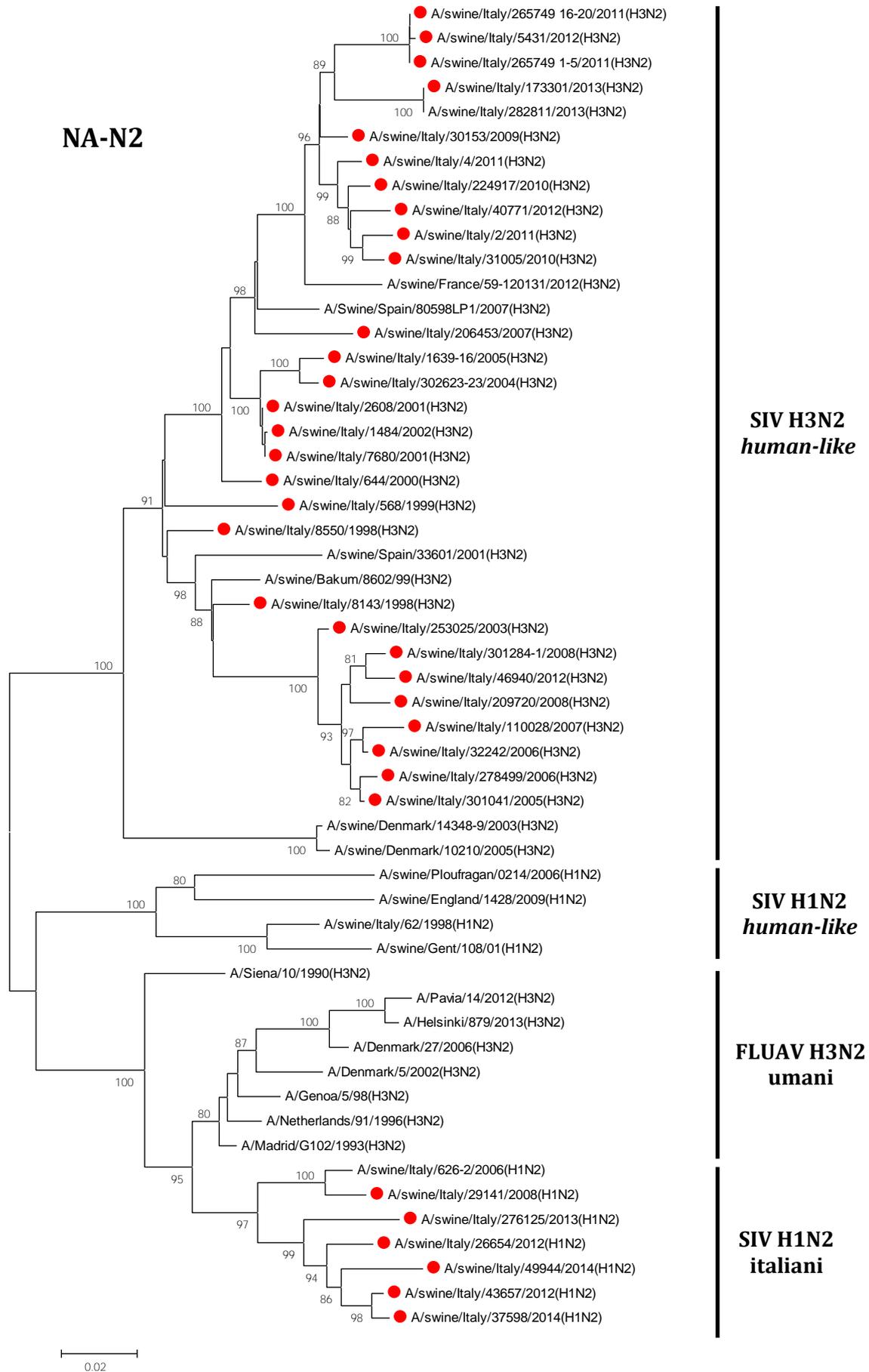
**Figura 9:** Analisi filogenetica del gene dell'HA-H3. I SIV sequenziati con NGS sono indicati con un cerchio rosso pieno.



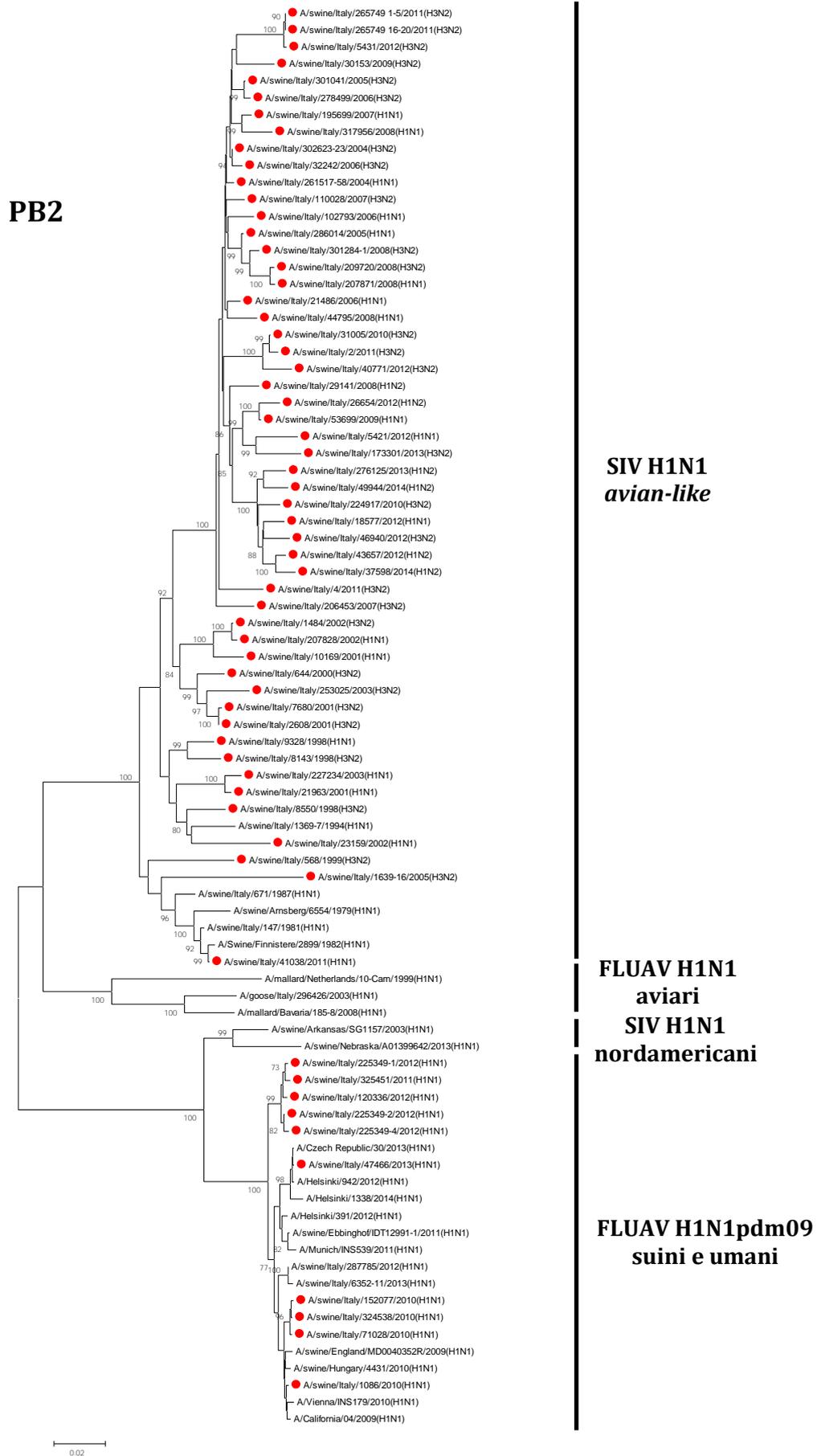
**Figura 10:** Analisi filogenetica del gene della NA-N1. I SIV sequenziati con NGS sono indicati con un cerchio rosso pieno.



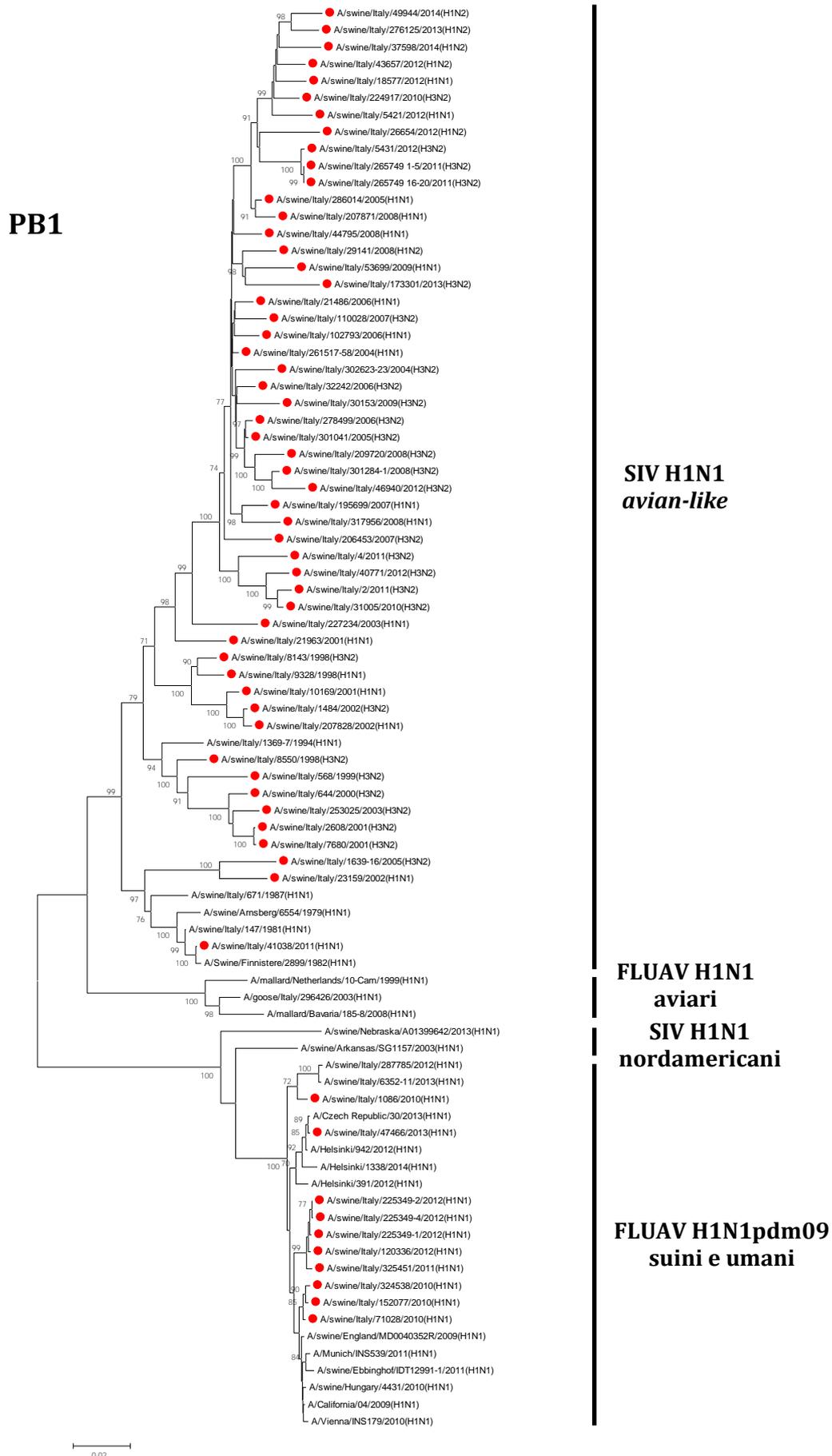
**Figura 11:** Analisi filogenetica del gene della NA-N2. I SIV sequenziati con NGS sono indicati con un cerchio rosso pieno.



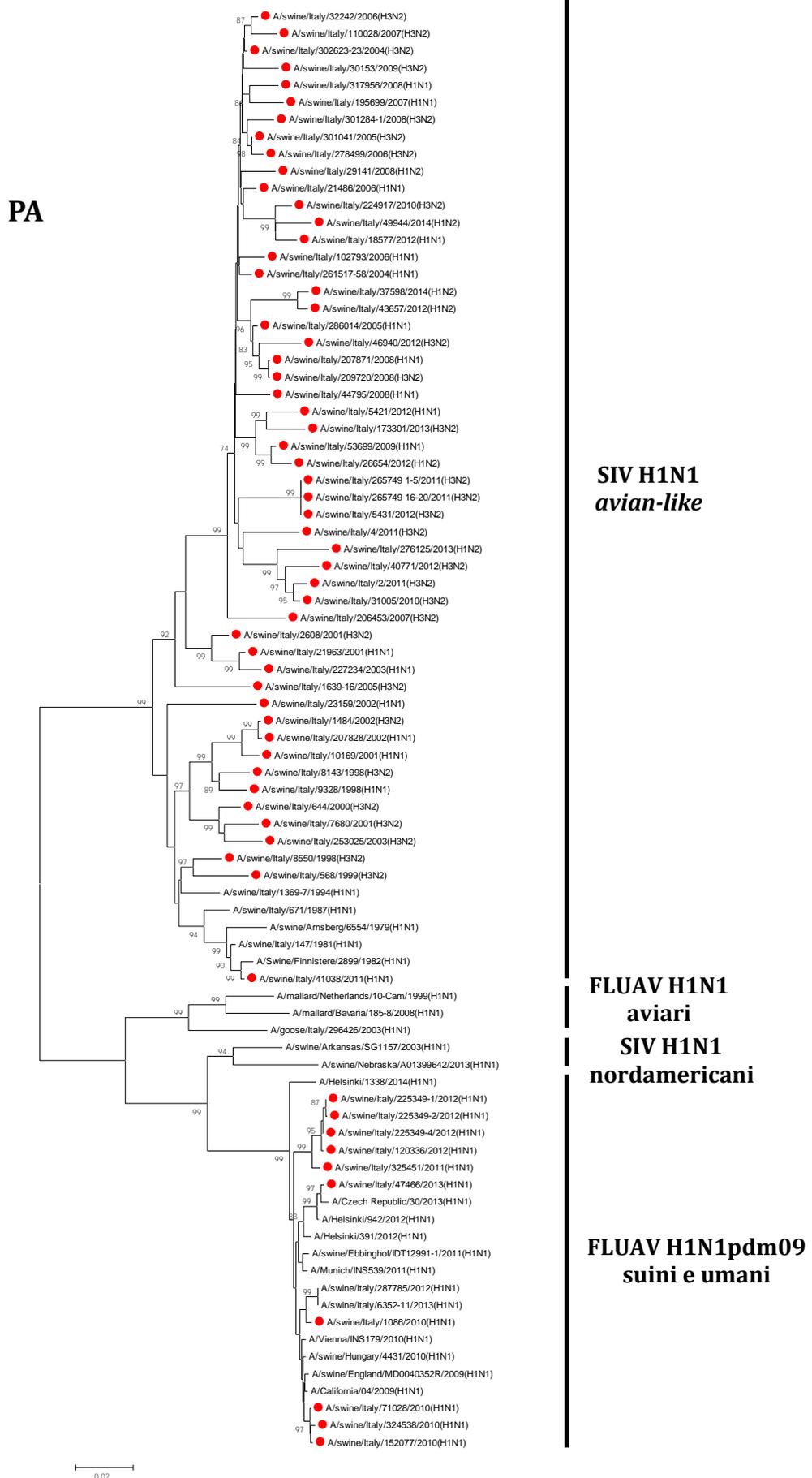
**Figura 12:** Analisi filogenetica del gene della PB2. I SIV sequenziati con NGS sono indicati con un cerchio rosso pieno.



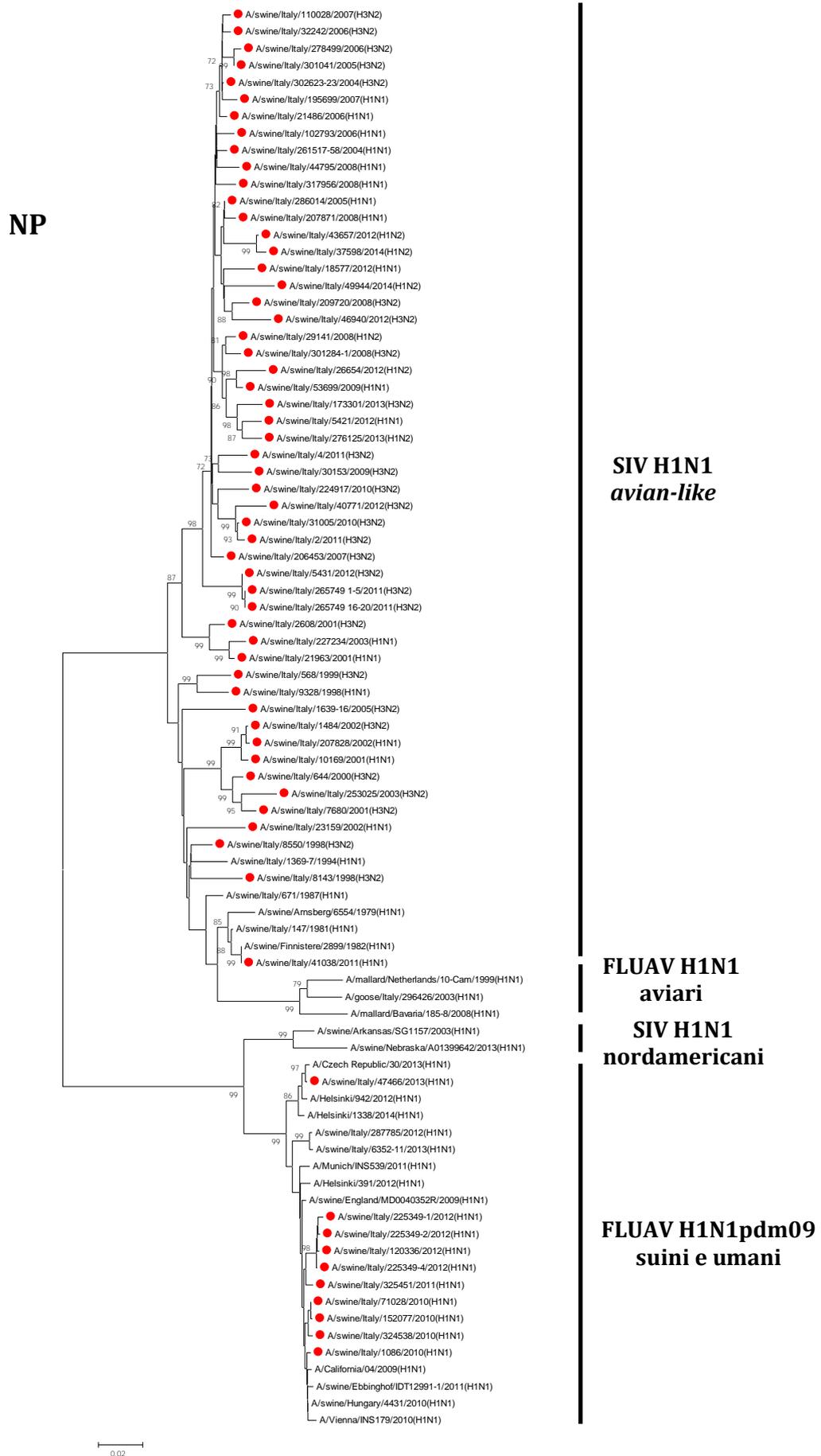
**Figura 13:** Analisi filogenetica del gene della PB1. I SIV sequenziati con NGS sono indicati con un cerchio rosso pieno.



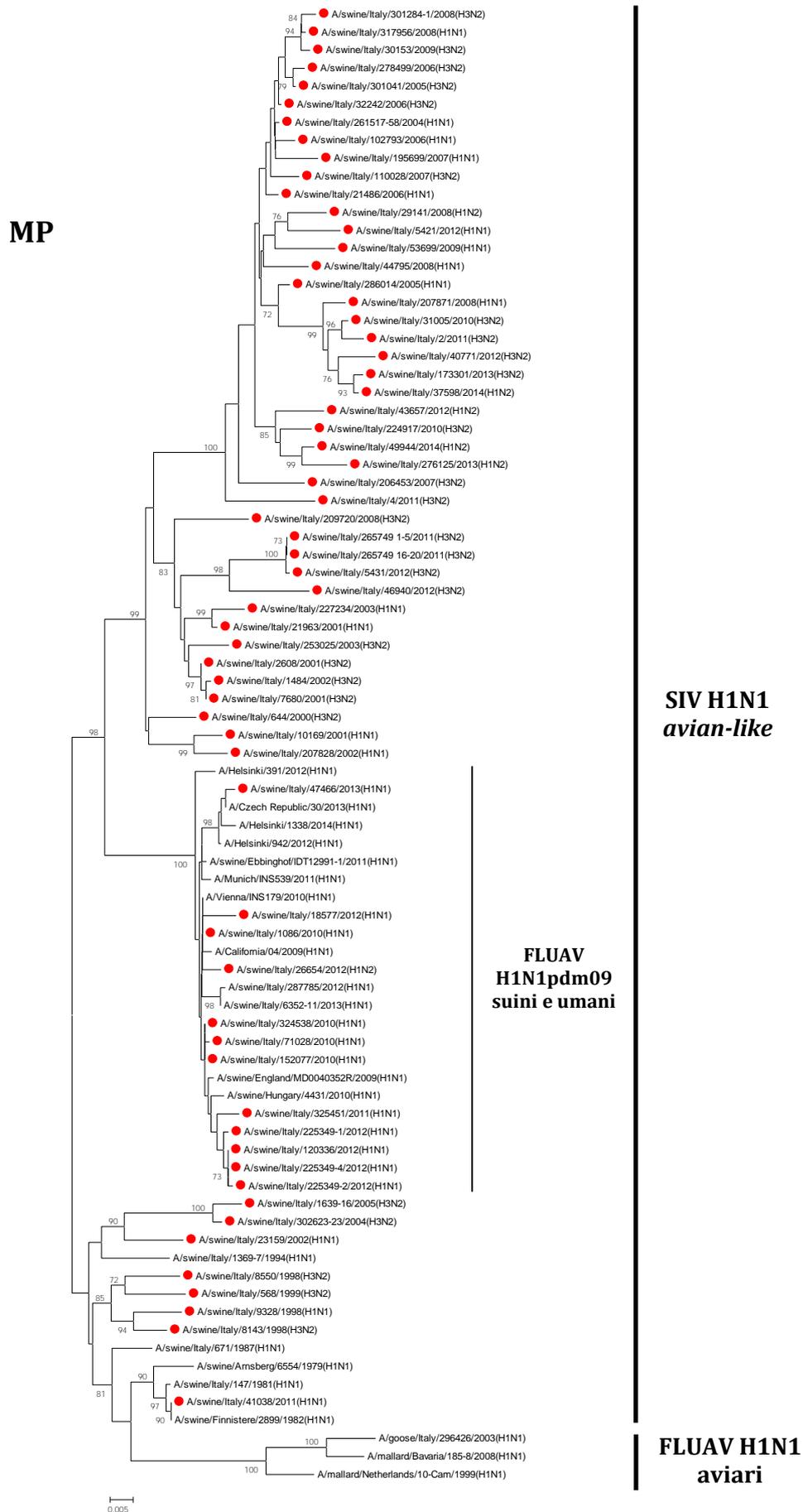
**Figura 14:** Analisi filogenetica del gene della PA. I SIV sequenziati con NGS sono indicati con un cerchio rosso pieno.



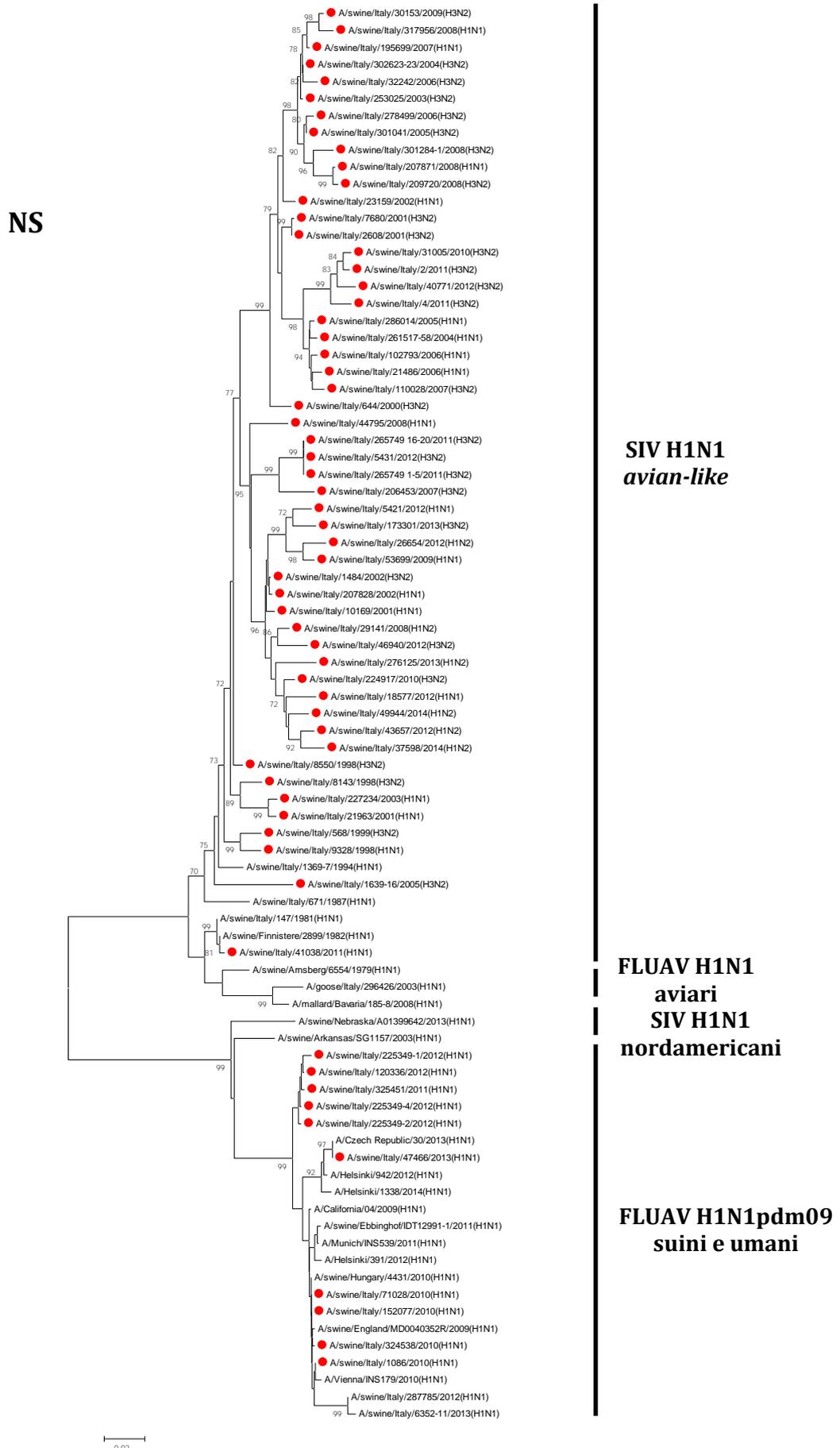
**Figura 15:** Analisi filogenetica del gene della NP. I SIV sequenziati con NGS sono indicati con un cerchio rosso pieno.



**Figura 16:** Analisi filogenetica del gene della MP. I SIV sequenziati con NGS sono indicati con un cerchio rosso pieno.



**Figura 17:** Analisi filogenetica del gene della NS. I SIV sequenziati con NGS sono indicati con un cerchio rosso pieno.



## DISCUSSIONE

### Sequenziamento con tecnologia NGS

Il sequenziamento dell'intero genoma dei virus influenzali rappresenta uno strumento essenziale per comprendere l'evoluzione dei virus circolanti ed è l'unico metodo per poter evidenziare fenomeni di riassortimento avvenuti nei geni interni: la sorveglianza sierologica può evidenziare solo variazioni antigeniche a livello delle proteine superficiali HA e NA.

Durante il Dottorato di ricerca si è cercato di sviluppare un metodo di sequenziamento NGS, su piattaforma Ion Torrent PGM, affidabile, economico e rapido, allo scopo di poter sequenziare in poco tempo numerosi campioni di influenza virus e, tramite l'analisi e la caratterizzazione genomica, controllare i flussi genici dei virus influenzali e la loro evoluzione. Il metodo Sanger, pur essendo una tecnica laboriosa e dai tempi lunghi, è il metodo di sequenziamento considerato *gold standard* per l'identificazione di mutazioni puntiformi, inserzioni o delezioni presenti nel genoma del virus, pertanto è stato utilizzato per validare il protocollo NGS sviluppato. Infatti, il fattore più limitante di queste nuove tecnologie è l'aumentata percentuale di errore nella rilevazione delle basi nucleotidiche nella sequenza (minore accuratezza nella chiamata delle basi), se paragonata al sistema Sanger. Tale limite può essere superato in gran parte, ma non del tutto rimosso, attraverso l'ausilio di polimerasi ad altissima efficienza e attraverso l'aumento del livello del *coverage*: i campioni analizzati nello studio presentavano un *coverage* medio di 700X, ben al di sopra del minimo richiesto per garantire l'accuratezza di chiamata. Strettamente legata a questo aspetto è la necessità di un continuo sviluppo di algoritmi bioinformatici, che consentano di analizzare con efficacia i dati prodotti. L'aspetto informatico ha profonda rilevanza nelle tecnologie NGS: questa complessità di analisi complica notevolmente il compito degli operatori, prevedendo competenze specialistiche per l'interpretazione dei dati, con la necessità di figure professionali spesso assenti nei laboratori.

Lo Ion Torrent PGM nasce come sequenziatore di tipo *benchtop*, letteralmente da bancone, con ridotte capacità di processività rispetto alle strumentazioni concorrenti, ma con l'intento di rendere più economica, quindi maggiormente fruibile, la tecnologia NGS per diversi progetti di ricerca (con necessità di sequenziamento più limitate rispetto all'intero genoma umano). Un ulteriore punto di forza dello strumento è rappresentato dalla disponibilità di *software* per l'analisi dei dati prodotti, accessibili anche ai non bioinformatici in senso stretto, fatto che ha permesso l'analisi di tutti i dati presentati in questa tesi, senza la necessità dell'ausilio di personale bioinformatico esterno.

Il protocollo sviluppato ha dimostrato un'accuratezza del 100% nel determinare le sequenze rispetto a quelle ottenute con metodica Sanger.

### Analisi genomica

Dall'analisi genomica dei SIV sequenziati è possibile evidenziare in tutti i campioni marcatori molecolari che determinano un adattamento del virus alle cellule di mammifero: a livello della PB2 tutti i pandemici presentano il polimorfismo SR, mentre gli altri SIV (PB2 derivata da SIV

H1N1 *avian-like*) la sostituzione D701N, entrambe permettono una replicazione virale ottimale nel tratto superiore delle vie respiratorie. Nessuno dei campioni esprime marcatori amminoacidici a livello del gene dell'HA associati a un recettore di tipo aviare, ma unicamente quelli tipici dell'uomo (pandemici e SIV H3N2) o del suino (H1N1 *avian-like*); inoltre è stato recentemente dimostrato che la mutazione D225G/E (tipica nei SIV circolanti in Europa e frequente nei campioni analizzati) permetta la trasmissione sia nell'uomo che nel suino (Chen *et al.*, 2010), evidenziando la potenzialità della formazione nel serbatoio animale di virus capaci di trasmettersi facilmente nella popolazione umana. In aggiunta, 5 dei SIV sequenziati presentano la sostituzione D225N, associata a forme gravi di malattia in Messico (A/H1N1pdm09), sebbene non sia ancora stato dimostrato che la presenza di questa sostituzione aumenti la patogenicità nell'uomo.

L'analisi della proteina PB1-F2 ha evidenziato la tendenza dei campioni isolati più recentemente (dall'età circa degli anni 2000) a presentare una forma funzionale, in contrapposizione a quelli precedenti, che invece esprimono una forma tronca. Questo potrebbe indicare una possibile maggiore *fitness* dei virus che presentano la PB1-F2 completa, con la selezione nel tempo dei ceppi circolanti nella popolazione suina. Comunque, sebbene la PB1-F2 abbia un ruolo importante nell'infezione primaria dei virus influenzali, la sua presenza non è essenziale alla replicazione virale: nella maggior parte dei virus A(H1N1)pdm09 (e in tutti i pandemici sequenziati in questo lavoro) la proteina termina dopo soli 11 aa (Dundon, 2012).

I farmaci antinfluenzali sono utilizzati solo in medicina umana, nei pazienti anziani o nei soggetti ad alto rischio (cardiopatici, asmatici e immunodepressi). Questi farmaci possono modulare la severità della malattia, riducendo l'intensità e la durata della sintomatologia. Al momento sono disponibili solo due classi di farmaci antivirali utilizzabili per il trattamento dell'influenza: gli inibitori del canale ionico M2 (adamantani) e gli inibitori della neuraminidasi (oseltamivir), sebbene non sia raccomandato il trattamento con adamantani dal CDC, a causa dell'ampia diffusione di virus che presentano fattori di resistenza contro questi farmaci (Webster and Govorkova, 2014). La resistenza agli antinfluenzali può emergere sia sotto pressione selettiva del farmaco sia in natura, pertanto è importante monitorare la presenza di questi fattori nei FLUAV circolanti, anche nella popolazione suina, ricordando il potenziale zoonosico di questi virus, come dimostrato nella recente pandemia. Se la maggioranza dei virus pandemici, come invece non è stato, avesse mostrato resistenza ai farmaci, la pandemia avrebbe avuto conseguenze ben più gravi e una mortalità più elevata.

Nessuno dei campioni esaminati mostra una mutazione che determini la resistenza all'oseltamivir, mentre tutti i SIV, eccetto il virus A/sw/41038/2011(H1N1), presentano almeno un fattore di resistenza agli adamantani. È stato dimostrato che la comparsa dei fattori di resistenza agli adamantani nei SIV circolanti sia avvenuta tra la fine degli anni '80 e l'inizio degli anni '90, con la diffusione dei virus resistenti che hanno sostituito quelli sensibili al farmaco (Krumbholz *et al.*, 2009).

Il SIV A/sw/41038/2011(H1N1), oltre ad essere l'unico a non presentare alcun fattore di resistenza agli antinfluenzali, all'analisi filogenetica evidenzia un comportamento peculiare: per tutti i segmenti genici questo virus si divide dagli altri SIV appartenenti allo stesso gruppo filogenetico, analizzati in questo lavoro, e forma un *cluster* con le sequenze dei SIV H1N1

*avian-like* isolate negli anni '80. Il campione mostra un'elevata omologia con il ceppo A/sw/Finnistere/2899/1982(H1N1) (con cui condivide un'identità nucleotidica del 100% per le sequenze dei geni di NP, NA e MP) e con altri SIV isolati in Europa in quel periodo.

La maggior parte dei vaccini disponibili in Europa e in Italia si trova in commercio dagli anni '80-'90 e contiene generalmente due ceppi di SIV appartenenti ai sottotipi prevalenti in quel periodo (H1N1 e H3N2), da allora mai aggiornati. Tra i vaccini autorizzati in Italia sono presenti l'Izovac Sui-Flu e l'Izovac Aujeszky-Flu, prodotti dall'Izo (Brescia), che contengono entrambi un ceppo vaccinale derivato dal virus A/sw/Finnistere/2899/1982(H1N1), di cui però non viene fornita la sequenza aggiornata (propagazione su UEP e colture cellulari potrebbero aver variato la sequenza nucleotidica e amminoacidica dal ceppo virale iniziale).

Considerando questi dati e la stranezza della comparsa di un virus nel 2011 con caratteristiche tipiche dei SIV circolanti più di 25 anni prima, si può ipotizzare la possibile origine del ceppo A/sw/41038/2011 da un vaccino non completamente inattivato, somministrato ai suini nell'allevamento. La mancanza di una possibile tracciabilità genetica dei vaccini utilizzati, senza una sequenza nucleotidica fornita dal produttore, è un problema comune alla maggior parte dei vaccini prodotti, non solo quelli antinfluenzali, rendendo difficile dimostrare eventuali problemi del prodotto somministrato.

## **Analisi filogenetica**

L'analisi filogenetica, condotta sui campioni sequenziati, ha permesso di evidenziare l'avvenuto riassortimento genetico di due virus appartenenti al sottotipo H1N2 (A/sw/It/26654/2012 e A/sw/It/49944/2014), che presentano il gene dell'HA derivato da un SIV H1N1 *avian-like*, mentre il gene della NA originato da un SIV H1N2, che potremmo definire rH1avN2hu. Poiché anche i SIV appartenenti al sottotipo H1N2 *human-like* hanno i geni interni derivati da un virus H1N1 *avian-like*, non è possibile stimare quale fosse il virus progenitore che ha fornito il "pacchetto" di geni interni.

L'HA degli altri SIV H1N2 si localizza, come mostra l'albero filogenetico (Figura 8), all'interno del gruppo dei SIV H1N2 *human-like* europei, come atteso. La sequenza nucleotidica dell'HA di questi SIV mostra, però, una particolare delezione di 2 aa in posizione 146-147. Questa stessa delezione è stata descritta in precedenza nei SIV isolati in Italia, evidenziata per la prima volta in virus isolati alla fine degli anni '90, sebbene sembri che solo in tempi recenti i SIV con delezione siano divenuti prevalenti nel nostro Paese, con la sostituzione di quelli senza delezione (Moreno *et al.*, 2012). La delezione amminoacidica è localizzata nella regione dell'HA che contiene il sito di legame con il recettore cellulare, pertanto potrebbe influenzare l'interazione tra il virus e la cellula dell'ospite. Dall'analisi filogenetica della NA-N2 emerge, invece, come tutti i SIV sequenziati, appartenenti al sottotipo H1N2, siano separati dagli altri SIV H1N2 *human-like* europei, con la formazione di un *cluster* all'interno del gruppo dei virus influenzali stagionali H3N2 circolanti nell'uomo. Il primo SIV H1N2 *human-like* fu isolato in Europa a circa metà degli anni '90; era il risultato di molteplici fenomeni di riassortimento tra virus influenzali H1N1 stagionali umani (HA), H3N2 stagionali umani (NA) e SIV H1N1 *avian-like* (geni interni). Sembra che il gene della NA sia derivato da ceppi umani circolanti verso la fine degli anni '70 (Moreno *et al.*, 2013). La distanza filogenetica della NA dei SIV sequenziati,

rispetto ai virus europei, e la correlazione con i virus stagionali umani H3N2 fanno supporre una probabile re-introduzione, successiva a quella che ha dato origine a questo sottotipo, del gene della NA dai ceppi H3N2 circolanti nella popolazione umana (rH1N2hu).

Negli ultimi anni in Italia sono stati isolati, sempre con maggior frequenza, SIV appartenenti ai sottotipi rH1N2hu e rH1avN2hu, suggerendo la tendenza di questi due sottotipi a sostituire nel nostro Paese il sottotipo H1N2 *human-like* circolante nel resto d'Europa (Moreno *et al.*, 2013). I dati ottenuti in questo lavoro sono un'ulteriore conferma di questa ipotesi.

## **A(H1N1)pdm09**

Durante e in seguito all'emergenza della pandemia influenzale del 2009, il virus H1N1pdm è stato isolato regolarmente in numerosi Paesi, compresa l'Europa. I dati relativi alla sorveglianza dei SIV circolanti in Europa sembrano indicare il consolidamento di questo gruppo nella popolazione suina, sebbene in alcuni Paesi europei (Spagna, Belgio e Olanda) non sia mai stato evidenziato. L'A(H1N1)pdm09 è riuscito a stabilirsi facilmente in regioni precedentemente libere dall'infezione influenzale nel suino, come la Norvegia, mentre è meno frequente nei Paesi ad alta densità di animali, con alti livelli di immunità di popolazione; questo potrebbe essere dovuto sia a una parziale cross-protezione sia a una competizione virale con gli altri SIV circolanti. In aggiunta, la continua evidenza dell'infezione potrebbe anche essere dovuta a ripetuti e indipendenti passaggi del virus dall'uomo al suino, senza lo stabilirsi di un'efficiente catena di trasmissione all'interno della popolazione animale: solo continuando la sorveglianza, si potrà evidenziare tra alcuni anni se il virus sarà riuscito a diventare endemico (Simon *et al.*, 2014).

In Italia la prima epidemia causata dall'H1N1pdm09 è stata segnalata nel novembre del 2009; da allora, il virus e una seconda generazione di riassortanti derivati da questo, sono stati ripetutamente isolati nel nostro Paese, ma la circolazione dei pandemici sembra limitata a sporadici episodi di trasmissione dall'uomo al suino, seguiti solo da una permanenza temporanea nell'allevamento (Moreno *et al.*, 2011; Chiapponi *et al.*, 2014).

Tra i SIV H1N1pdm sequenziati con NGS, di particolare interesse sono i campioni che presentano l'inserzione di due amminoacidi a livello dell'HA, isolati all'interno della stessa azienda, in un periodo di quattro mesi (un primo episodio epidemico nel giugno 2012, seguito da un secondo in settembre). L'inserzione si trova all'interno del sito antigenico Sa, uno dei cinque siti antigenici (Ca1, Ca2, Cb; Sa e Sb) presenti sulla testa globulare dell'emoagglutinina. L'inserzione potrebbe derivare dallo slittamento della RNA polimerasi, poiché i sei nucleotidi interessati sono l'esatta ripetizione dei sei precedenti. La regione Sa è un sito antigenico immunodominante del virus pandemico (Krause *et al.*, 2011; Strengell *et al.*, 2011), pertanto i cambiamenti amminoacidici dovuti all'inserzione potrebbero causare una variazione nel riconoscimento anticorpale. Nei virus isolati nel secondo episodio epidemico, a distanza di mesi, è mantenuta l'inserzione, assente invece nel presunto progenitore: questo potrebbe suggerire una maggiore *fitness* del virus mutato. L'analisi filogenetica mostra come questi SIV formino un *cluster* distinto dagli altri pandemici, con l'evidenza della derivazione dei campioni con l'inserzione dal progenitore. In aggiunta, questi SIV sono gli unici tra i pandemici sequenziati a presentare la sostituzione S186P, associata nell'infezione nel suino da virus H1N1pdm a un

incremento sia per quanto riguarda il titolo del virus eliminato sia il periodo di eliminazione virale, favorendo così la trasmissione all'interno della popolazione (Lorusso *et al.*, 2014). I fenomeni evolutivi evidenziati in questi campioni fanno supporre un possibile adattamento alla specie suina dei ceppi pandemici introdotti dall'uomo.

L'analisi filogenetica dei SIV H1N1pdm sequenziati mostra, inoltre, la stretta correlazione genetica del campione A/sw/It/47466/2013 con un ceppo isolato nell'uomo nello stesso anno, A/Czech Republic/30/2013, evidenziata per tutti i segmenti genici. Questo suggerisce l'avvenuta introduzione del virus all'interno dell'allevamento attraverso l'uomo, confermando la ricorrente trasmissione da uomo a suino, come evidenziato dall'inizio della pandemia influenzale.

La sorveglianza continua e diffusa dei SIV è l'unico strumento per poter rilevare l'eventuale adattamento ed endemizzazione dei virus pandemici nella popolazione suina, fornendo dati essenziali per le decisioni riguardanti la sanità pubblica veterinaria. Ad esempio, in base ai dati raccolti fino ad oggi, le autorità europee hanno ritenuto non necessaria la vaccinazione contro i ceppi pandemici nel suino, pertanto non è ancora disponibile in commercio alcun vaccino con queste caratteristiche (EFSA, 2010). Inoltre, sebbene il suino non abbia ancora dimostrato un ruolo epidemiologico importante nella diffusione dei virus H1N1pdm nuovamente all'uomo, non si può escludere che, in seguito a fenomeni di mutazione o riassortimento, possano emergere ceppi capaci di diffondersi nuovamente nella popolazione umana.

In Europa, nonostante la continua introduzione e comparsa di nuovi virus circolanti nella popolazione suina, il SIV H1N1 *avian-like* continua ad essere il virus con prevalenza maggiore in tutti i Paesi europei (Simon *et al.*, 2014). Dalla sua comparsa nel 1979 non si è evidenziata una riduzione nella circolazione, nemmeno in concomitanza con l'introduzione di nuovi SIV; inoltre tutti i ceppi che sono riusciti a diventare endemici condividono i geni interni con il SIV H1N1 *avian-like*. All'inizio degli anni 2000, si è osservata la comparsa dell'H1N1 *avian-like* europeo (EA H1N1) anche in Asia: in breve tempo è diventato endemico e il ceppo prevalente. In questi quindici anni, l'EA H1N1 ha circolato nel continente asiatico insieme ai virus tripli riassortanti nordamericani (da cui i pandemici hanno originato HA e geni interni, fatta eccezione per la MP): nonostante la continua evidenza di nuovi riassortanti, nessuno è riuscito a sostituire l'EA H1N1 (Zhu *et al.*, 2013). Si può supporre che, anche se l'A(H1N1)pdm09 riuscisse a stabilirsi e diventare endemico nella popolazione suina europea, comunque l'H1N1 *avian-like*, che sia in Europa sia in Asia ha mostrato fino ad oggi una *fitness* maggiore rispetto agli altri virus, rimarrebbe il SIV più diffuso.

# SEQUENZIAMENTO DEL GENOMA COMPLETO DI UN VIRUS HPAI A/H7N7 TRASMESSO ALL'UOMO

## Introduzione

Negli ultimi quindici anni gravi ed estese epidemie di HPAI sono state osservate in numerosi Paesi del mondo, compresa l'Italia (Alexander, 2007; Alexander and Brown, 2009). Dal 1997 ad oggi, il nostro Paese è stato colpito da diversi episodi di influenza aviaria ad alta e a bassa patogenicità, che hanno provocato notevoli danni economici al comparto avicolo (Sartore *et al.*, 2010; Bonfanti *et al.*, 2014).

Virus LPAI appartenenti ai sottotipi A/H5 e A/H7, a seguito di ripetuti cicli di replicazione nelle specie aviarie domestiche, possono evolvere in virus HPAI, che inducono un'infezione sistemica, associata ad elevata mortalità negli animali (Alexander, 2006; Monne *et al.*, 2014). Sono numerosi i casi documentati di trasmissione all'uomo di virus HPAI, mentre quella di virus LPAI è più rara, com'è stato dimostrato attraverso estese indagini condotte sui sieri di operatori del settore avicolo (Puzelli *et al.*, 2005; Di Trani *et al.*, 2012).

Il primo caso documentato di trasmissione diretta di virus influenzali aviari all'uomo risale al 1996: nel Regno Unito fu isolato un virus LPAI H7N7 (A/England/268/96) da un soggetto con congiuntivite, che viveva a stretto contatto con specie aviarie domestiche e selvatiche (Kurtz *et al.*, 1996). Nel 2003 in Olanda, durante una grave epidemia di HPAI H7N7 negli allevamenti avicoli, che portò all'abbattimento di circa 30 milioni di animali in pochi mesi, fu evidenziata la trasmissione del virus in 89 soggetti con lieve sintomatologia clinica, ad eccezione di un caso di grave polmonite ad esito fatale (Fouchier *et al.*, 2004).

Nell'agosto del 2013, in un allevamento avicolo situato nella provincia di Ferrara, a seguito della segnalazione di un aumento anomalo di mortalità negli animali, è stato isolato il virus HPAI A/H7N7; nei territori colpiti e in quelli circostanti sono seguiti controlli e provvedimenti volti a eradicare e contenere la diffusione dell'epidemia. Gli abbattimenti degli animali hanno riguardato diciassette allevamenti situati in Emilia-Romagna, per un totale di oltre un milione e quattrocentomila capi sacrificati (Bonfanti *et al.*, 2014). Per quanto riguarda gli operatori coinvolti negli abbattimenti, sono state applicate le misure di prevenzione e sicurezza previste nei focolai di influenza aviaria, compresi i dispositivi di protezione individuale; inoltre è stata attuata un'attività di sorveglianza sanitaria attiva, che prevedeva il monitoraggio e il controllo quotidiano dei circa 200 lavoratori esposti. Nell'ambito di tale sorveglianza, sono stati identificati tre casi di infezione congiuntivale in soggetti che non presentavano sintomatologia respiratoria.

Il laboratorio di virologia del DSPVSA dell'ISS è stato coinvolto nell'emergenza: un campione prelevato da uno dei tre soggetti sintomatici è stato sequenziato mediante la metodica sviluppata nel corso della tesi di Dottorato. I dati acquisiti sono stati oggetto della seguente pubblicazione: "Human Infection with Highly Pathogenic A(H7N7) Avian Influenza Virus, Italy, 2013" (Puzelli *et al.*, 2014).

## Materiali e metodi

Il tampone congiuntivale del terzo soggetto, in cui è stata evidenziata l'infezione da A/H7N7 HPAI, è stato utilizzato direttamente per il sequenziamento con tecnologia NGS su piattaforma Ion Torrent PGM, secondo il protocollo precedentemente riportato in dettaglio, ottenendo in poco più di tre giorni le sequenze complete dell'intero genoma:

- estrazione dell'RNA virale (30 minuti) (giorno 1);
- preparazione della libreria (circa 7 ore), con la RT-PCR di una durata di circa tre ore e mezzo (giorno 1);
- amplificazione del template (5 ore) (giorno 2);
- sequenziamento (circa 6 ore: 3 di preparazione della macchina e del campione, 3 di sequenziamento vero e proprio) (giorno 3);
- analisi dei dati mediante il Torrent Server, utilizzando il *software* Pathogen Analyzer (durata di circa 4/5 ore, ma è possibile pianificare le analisi prima della corsa, in modo che avvengano autonomamente anche durante la notte, sfruttando al meglio il tempo a disposizione) (giorno 3);
- controllo delle sequenze ottenute, con l'ausilio del *software* CLC Genomics Workbench (3/4 ore) (giorno 4).

Il campione è stato caricato su uno Ion 314 Chip.

L'analisi filogenetica dei geni dell'HA e della NA è stata condotta confrontando le sequenze del virus esaminato con quelle disponibili nei database di *GenBank* e GISAID di FLUAV aviari e FLUAV aviari trasmessi all'uomo, appartenenti ai sottotipi H7 e N7. La costruzione degli alberi filogenetici è stata realizzata utilizzando il *software* MEGA 5.2, mediante l'algoritmo Neighbor Joining (*pairwise deletion*) con il modello Kimura-2, con 1000 repliche per ogni albero.

## Risultati

Sono state ottenute le sequenze complete dell'intero genoma del campione, da cui è stato identificato il ceppo A/Italy/3/2013(H7N7): le sequenze sono state depositate nel database *GenBank*, numero di accesso KF918334-KF918341. L'analisi delle sequenze ha confermato la diagnosi di infezione da virus HPAI A/H7N7, inoltre tutti i geni presentavano un'elevata omologia (con un'identità nucleotidica superiore al 99,9%) con le sequenze del virus A/chicken/Italy/13VIR4527-11/2013 (*index case*), isolato da un capo nel primo allevamento avicolo colpito dall'epidemia (Ostellato, Ferrara).

L'analisi della sequenza dell'emoagglutinina ha confermato la presenza di amminoacidi basici multipli a livello del sito di clivaggio (PKRRERR\*GL), responsabile del fenotipo virale altamente patogeno (Wood *et al.*, 1993). Confrontando la sequenza della NA con quelle parziali ottenute dai campioni degli altri due operatori e quelle dei virus isolati nei polli (sequenziati parzialmente sette virus), si sono evidenziate due sostituzioni amminoacidiche (D172G e P347Q)

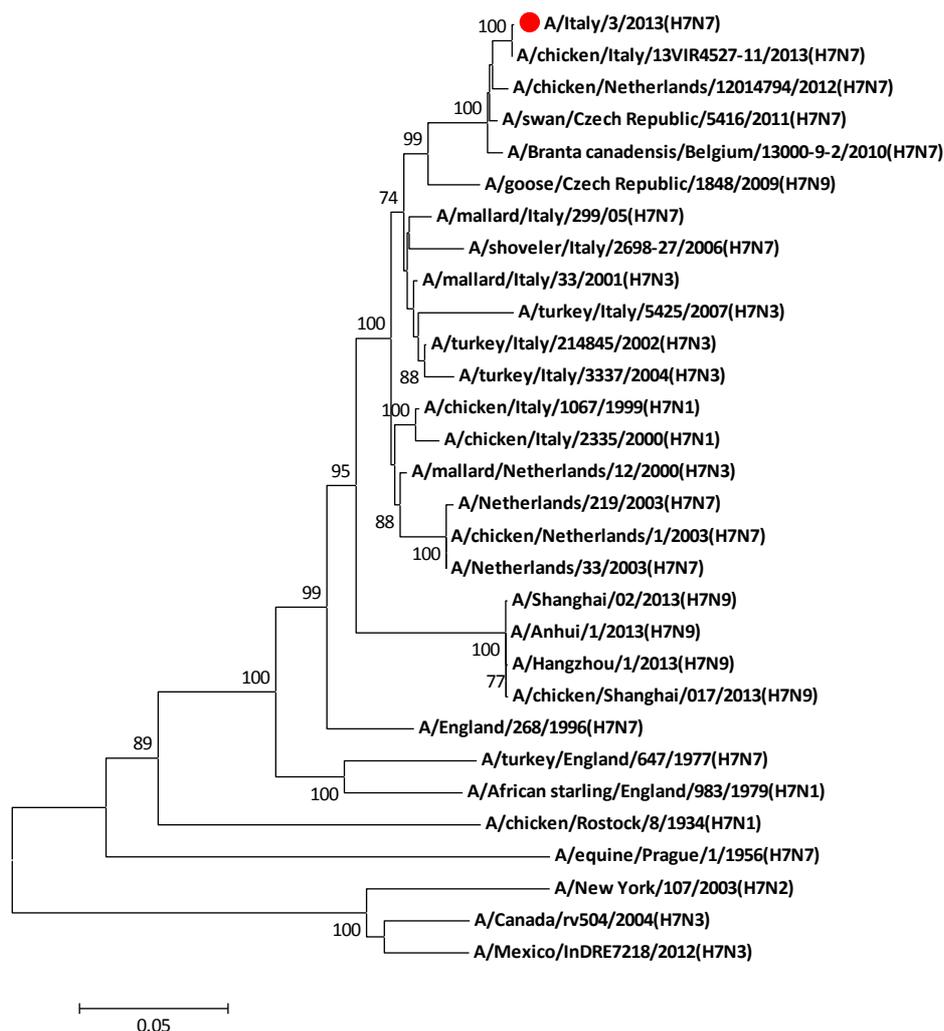
presenti solo nel ceppo A/Italy/3/2013.

Nel gene della PB2 non sono stati identificati marcatori molecolari correlati ad adattamento alle cellule di mammifero (polimorfismo SR in posizione 590-591; E627K; D701N).

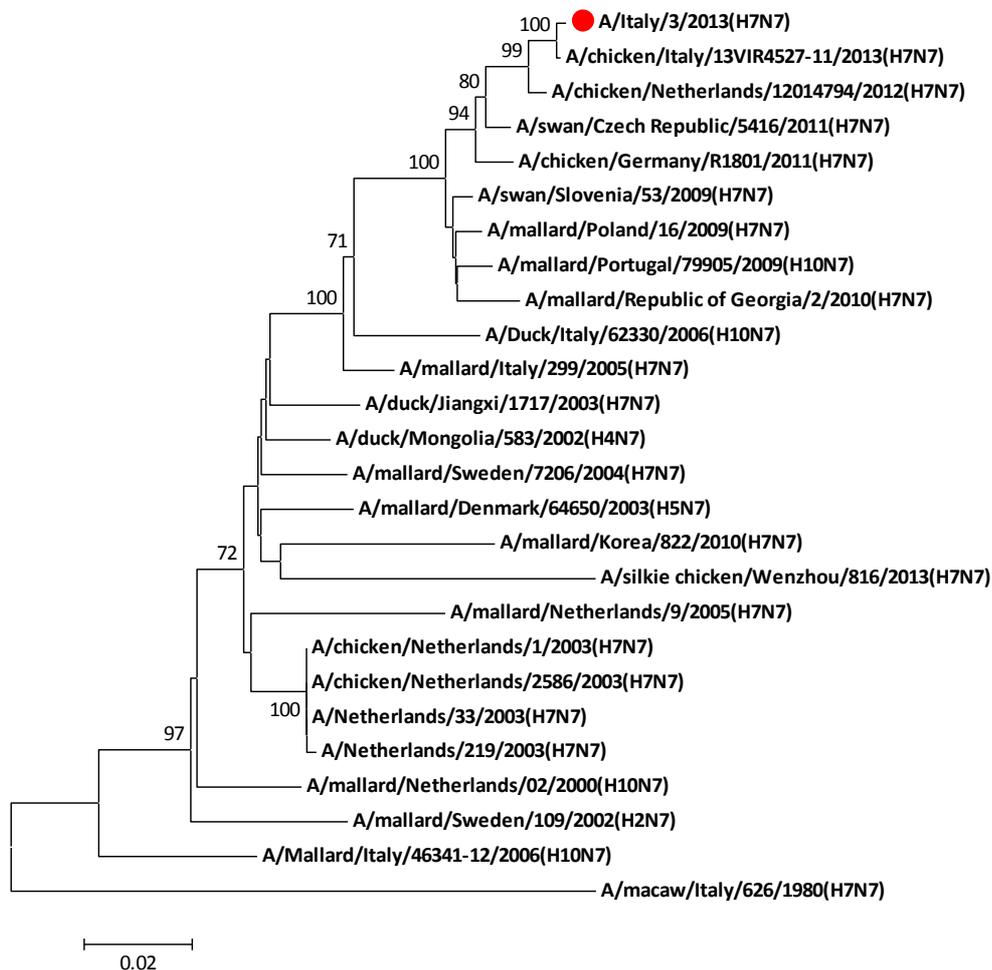
Nel campione esaminato non è presente nessuna mutazione amminoacidica associata alla resistenza all'oseltamivir, mentre è presente a livello del gene della M2 una sostituzione (G16E) evidenziata in isolati resistenti agli adamantani (Grayson *et al.*, 2010).

Le analisi filogenetiche dei geni dell'HA (Figura 18) e della NA (Figura 19) hanno evidenziato la correlazione genetica del campione analizzato con i virus LPAI A/H7 circolanti in Europa nelle specie aviarie selvatiche e domestiche negli ultimi anni: i campioni isolati recentemente in Europa formano un *cluster*, in cui va ad inserirsi il ceppo A/Italy/3/2013, insieme al progenitore di origine aviare.

**Figura 18:** Albero filogenetico del gene dell'HA del virus HPAI A/H7N7 isolato nell'uomo. Il campione è indicato con un cerchio rosso pieno.



**Figura 19:** Albero filogenetico del gene della NA del virus HPAI A/H7N7 isolato nell'uomo. Il campione è indicato con un cerchio rosso pieno.



## Discussione

Seguendo il protocollo sviluppato nel corso dei tre anni di Dottorato, è stato possibile sequenziare l'intero genoma del virus in esame, direttamente da campione biologico, evitando cicli di replicazione virale in colture cellulari e su UEP, in modo da ottenere i risultati tempestivamente. In pochi giorni è stato possibile acquisire dati che normalmente richiederebbero settimane di lavoro (isolamento, disegno di *primer* specifici, RT-PCR e sequenziamento con metodo Sanger). In aggiunta, durante l'isolamento e la propagazione, i virus influenzali possono presentare fenomeni di adattamento al substrato di replicazione, evidenziando, pertanto, mutazioni non presenti sul ceppo d'origine, all'analisi molecolare.

L'episodio descritto ha confermato il tropismo oculare associato alle infezioni da virus A/H7 nell'uomo: gli operatori presentavano infezione congiuntivale, senza alcuna sintomatologia

respiratoria (Koopmans, 2004). L'assenza di determinanti molecolari di adattamento dei virus influenzali aviari alla specie umana, tra quelli sinora noti, supporta l'ipotesi del contagio degli operatori tramite trasmissione diretta del virus dagli animali all'uomo.

L'analisi filogenetica ha evidenziato la stretta correlazione genetica dei virus HPAI H7N7, che hanno provocato quest'ultima epidemia in Italia, con quelli LPAI H7N7 isolati negli uccelli in Europa nell'ultimo periodo, ad ennesima dimostrazione che il passaggio di virus appartenenti al sottotipo H7 nei volatili domestici può indurre la variazione del fenotipo virale da lievemente patogeno ad altamente patogeno. Un'epidemia simile si è verificata in Italia anche nel 1999-2000: un virus influenzale sottotipo H7N1 LPAI, dopo aver circolato per circa 10 mesi nelle popolazioni di volatili domestici in Veneto e Lombardia, è mutato in un ceppo ad alta patogenicità dando origine ad una delle più devastanti epidemie di influenza aviaria in Europa (Monneet *al.*, 2014). In seguito a quest'evento, in Italia, vengono applicate misure di eradicazione/controllo (abbattimento, macellazione controllata e vaccinazione) anche per i virus LPAI appartenenti ai sottotipi H5 e H7 (Piano Nazionale Integrato 2011-2014; Decreto legislativo 25 gennaio 2010, n.9, attuazione della direttiva 2005/94/CE relativa a misure comunitarie di lotta contro l'influenza aviaria). Il ruolo dei volatili migratori rende più complessa la gestione e il controllo di questa infezione, con il coinvolgimento di più parti, tra cui servizi veterinari, esperti di fauna selvatica ed ornitologi. La disponibilità di una base legale ben strutturata per il controllo della LPAI, la situazione economica generale e la motivazione di allevatori e ditte ad eliminare l'infezione giocano un ruolo predominante nell'eradicazione dell'infezione.

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Per anni l'unica tecnica di sequenziamento utilizzata è stata quella proposta da Sanger (1980), ma nell'ultimo decennio si è assistito ad una rapida evoluzione in questo campo, con l'introduzione di un sistema tecnologico alternativo, il c.d. sequenziamento di nuova generazione (NGS). In tempi brevissimi, diverse piattaforme tecnologiche basate su questo nuovo sistema sono state sviluppate e via via perfezionate, dando origine a una vera e propria rivoluzione nel campo del sequenziamento degli acidi nucleici, sia per quanto riguarda la quantità dei dati prodotti sia per la velocità con cui vengono generati. Negli ultimi anni, inoltre, si è assistito ad una considerevole diminuzione dei costi di analisi dei campioni, fattore essenziale che ha favorito l'ampia diffusione di questi sistemi. Queste nuove metodiche stanno rivoluzionando il campo della genomica, con numerose applicazioni anche nell'ambito della virologia.

Il suino ha un ruolo importante nell'ecologia dei virus influenzali, essendo recettivo all'infezione di virus influenzali di origine sia aviaria sia umana; in questa specie, sia storicamente che in tempi recenti, sono stati evidenziati fenomeni di riassortimento tra ceppi virali diversi con la formazione di nuove varianti antigeniche virali. I SIV appartenenti ai sottotipi H1N1 *avian-like*, H3N2 *human-like* e H1N2 *human-like* hanno co-circolato per molti anni nella popolazione suina europea, in maniera piuttosto stabile fino alla comparsa dei virus A(H1N1)pdm09, oggi ampiamente diffusi in gran parte dell'Europa e del mondo.

Avere informazioni attuali ed aggiornate sulle varianti e sui lignaggi virali circolanti è cruciale per un efficace rilevamento, prevenzione e controllo della malattia nei suini, inoltre l'evidenza della comparsa di nuovi ceppi riassortanti, che possono trasmettersi all'uomo, può rivelarsi importante anche a livello di salute pubblica umana. In seguito all'emergenza della pandemia influenzale del 2009 e alla diffusione del virus nella popolazione suina, l'OIE (*Office International des Epizooties*) e la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) hanno incoraggiato tutti i Paesi a implementare i sistemi nazionali di sorveglianza dei SIV.

Obiettivo della tesi di Dottorato è stato lo sviluppo di un protocollo NGS idoneo per il sequenziamento di tutti i virus influenzali di tipo A, al fine di poter esaminare con un'unica metodica tutti i sottotipi di SIV circolanti, compresi eventuali virus influenzali originati da specie diverse e trasmessi al suino. Durante il Dottorato di ricerca sono stati sequenziati e analizzati 62 campioni di SIV. I dati prodotti hanno permesso di evidenziare due fenomeni di riassortimento in sei campioni (rH1avN2hu e rH1N2hu), la presenza di una caratteristica inserzione amminoacidica nell'HA di quattro SIV pandemici e di una delezione amminoacidica nell'HA di quattro SIV H1N2, confermando pertanto l'efficacia e l'affidabilità del metodo NGS anche in particolari condizioni in cui si è soliti affidarsi al metodo Sanger. Le analisi, inoltre, hanno mostrato la probabile derivazione di uno dei SIV esaminati (A/sw/It/41038/2011(H1N1)) da un vaccino non completamente inattivato, somministrato ai suini nell'allevamento.

Tutti i sottotipi di SIV circolanti nella popolazione suina sono stati sequenziati con successo, consentendo l'analisi e la caratterizzazione genomica di tutti i segmenti genici dei campioni, con

lo sviluppo di uno strumento per la sorveglianza dei virus influenzali rapido, economico ed affidabile.

In aggiunta, durante un'emergenza epidemica di HPAI, è stato possibile applicare la metodica a fini diagnostici anche su campioni umani, confermandone l'efficacia per tutti i virus influenzali di tipo A. Seguendo il protocollo sviluppato è stato possibile utilizzare il campione clinico originale, evitando la propagazione su colture cellulari e su UEP, riducendo ampiamente i tempi di analisi e la possibilità d'introduzione di eventuali mutazioni, conseguenza dell'adattamento virale al substrato di replicazione.

Una diffusa e globale sorveglianza dei virus influenzali suini è basilare per comprendere appieno il ruolo del suino negli episodi di trasmissione interspecifica e nell'ecologia dei FLUAV. Inoltre conoscere l'evoluzione dei virus e monitorare i flussi genici intraspecie e interspecie nel serbatoio animale può rivelarsi essenziale ai fini della prevenzione in sanità umana ed animale, in linea con il concetto di "One Health" (medicina unica, salute unica), con approccio interdisciplinare e globale alla salute e al benessere delle persone e degli animali.

Sviluppare e migliorare queste nuove metodiche affinché siano sempre più efficaci ed economiche è importante al fine di permettere una sorveglianza diffusa globalmente, anche nei Paesi con risorse economiche ridotte, considerando anche che, spesso, proprio in queste regioni le condizioni generali di vita accrescono il rischio dell'emergenza di virus con potenziale zoonosico e pandemico.

## BIBLIOGRAFIA

- Air G.M., Laver W.G. 1989. The neuraminidase of influenza virus. *Proteins*; 6(4): p. 341-356.
- Akkina R.K., Richardson J.C., Aguilera M.C., Yang C.M. 1991. Heterogeneous forms of polymerase proteins exist in influenza A virus-infected cells. *Virus Res*; 19: p. 17–30.
- Alexander D.J. 2006. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*; 25(30): p. 5637-5644.
- Alexander D.J. 2007. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*; 25(30): p. 5637-5644.
- Alexander D.J., Brown I.H. 2009. History of highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech*; 28(1): p. 19-38.
- Ansorge, W.J. 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *N. Biotechnol*; 25: p.195–203.
- Balint A. *et al.* 2009. The first Swedish H1N2 swine influenza virus isolate represents an uncommon reassortant. *Virology*; 6, 180.
- Barzon L., Lavezzo E., Militello V., Toppo S., Palù G. 2011. Applications of Next-Generation Sequencing Technologies to Diagnostic Virology. *Int J Mol Sci*; 12(11): p. 7861-7884.
- Baudin F., Bach C., Cusack S. and Ruigrok R.W. 1994. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J*; 13(13): p. 3158-3165.
- Baudin F., Petit I., Weissenhorn W. and Ruigrok R.W. 2001. In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology*; 281: p. 102-108.
- Baum L.G., Paulson J.C. 1991. The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity. *Virology*; 180(1): p. 10–15.
- Bergmann M., Garcia-Sastre A., Carnero E., Pehamberger H., Wolff K., *et al.* 2000. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J Virol*, 74.
- Biswas S.K. and Nayak D.P. 1994. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol*; 68(3): p. 1819-1826.
- Biswas S.K., Boutz P.L. and Nayak D.P. 1998. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol*; 72: p. 5493-5501.

- Bloom J.D., Gong L.I., Baltimore D. 2010. Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science*; 328(5983): p. 1272–1275.
- Bonfanti L., *et al.* 2014. Highly pathogenic H7N7 avian influenza in Italy. *Veterinary Record*; 174:553.
- Boni A. *et al.* 2014. Genetic Characterization and Evolution of H1N1pdm09 after Circulation in a Swine Farm. *BioMed Research International*; Article ID 598732.
- Braam J. Ulmanen I. and Krug R.M. 1983. Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell*; 34: p. 609-618.
- Brown I.H., Done S.H., Spencer Y.I., *et al.* 1993. Pathogenicity of a swine influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strains. *Vet Rec*; 132(24): p. 598–602.
- Brown I.H., Ludwig S., Olsen C.W., *et al.* 1997. Antigenic and genetic analyses of H1N1 influenza A viruses from European pigs. *J Gen Virol*; 10: p. 553–562.
- Brown I.H. 2013. History and epidemiology of swine influenza in Europe. *Curr Top Microbiol Immunol*; 370: p. 133–146.
- Bui M., Whittaker G. and Helenius A. 1996. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol*; 70(12): p. 8391-8401.
- Bush R.M., Bender C.A., Subbarao K., Cox N.J., Fitch W.M. 1999a. Predicting the evolution of human influenza A. *Science*; 286: p. 1921–1925.
- Bush R.M., Fitch W.M., Bender C.A., Cox N.J. 1999b. Positive selection on the H3 hemagglutinin gene of human influenza virus A. *Mol Biol Evol*; 16: p. 1457–1465.
- Causey D. and Edwards S.V. 2008. Ecology of avian influenza virus in birds. *J Infect Dis*; 197 (1): p. 29-33.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2015a. Division of Influenza, Other Flu. URL: <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/transmission.htm>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2015b. Images of Influenza Viruses. URL: <http://www.cdc.gov/flu/images.htm>.
- Chander Y., Jindal N., Stallknecht D., *et al.* 2010. Full length sequencing of all nine subtypes of the neuraminidase gene of influenza A viruses by primer walking. *J Virol Meth*; 165: p. 116-120.

- Chen W., Calvo P.A., Malide D., Gibbs J., Schubert U., Bacik I., Basta S., O'Neill R., Schickli J., Palese P., Henklein P., J.R. Bennink J.R. and Yewdell J.W. 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*; 7(12): p. 1306-1312.
- Chen G.W., Yang C.C., Tsao K.C., Huang C.G., Lee L.A., Yang W.Z., Hang Y.L., Lin T.Y. 2004. Influenza A virus PB1-F2 gene in recent Taiwanese isolates. *Emerg Infect Dis*; 10 (4): p. 630-636.
- Chen H., Wen X., To K.K. *et al.* 2010. Quasispecies of the D225G substitution in the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus from patients with severe disease in Hong Kong, China. *J Infect Dis*; 201: p. 1517–1521.
- Chiapponi C., Moreno A., Barbieri I., Merenda M., Foni E. 2012. Multiplex RT-PCR assay for differentiating European swine influenza virus subtypes H1N1, H1N2 and H3N2. *J Virol Methods*; 184(1-2): p. 117-120.
- Chiapponi C., Baioni L., Luppi A., Moreno A., Castellan A., Foni E. 2014. Temporal insight into the natural generation of a new reassortant porcine influenza virus in a swine holding. *Vet Microbiol*; 174(1-2): p. 9-15.
- Christman M.C., Kedwail A., Xu J., Donis R.O., Lu G. 2011. Pandemic (H1N1)2009 virus revisited: an evolutionary retrospective. *Infect Genet Evol*; 11: p. 803–811.
- Ciampor F., Thompson C.A., Grambas S. and Hay A.J. 1992. Regulation of pH by the M2 protein of influenza A viruses. *Virus Res*; 22(3): p. 247-258.
- Clavijo A., Tresnan D.B., Jolie R., Zhou E.M. 2002. Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus. *Can J Vet Res*; 66: p. 117–121.
- Colman P.M. 1998. Structure and function of the neuraminidase. Nicholson K.G., Webster R.G., Hay A.J. *Textbook of Influenza*. Blackwell Science, 65-73.
- Conenello G.M., Zamarin D., Perrone L.A., Tumpey T., Palese P. 2007. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog*; 3(10): p. 1414–1421.
- Connor R.J., Kawaoka Y., Webster R.G. and Paulson J.C. 1994. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*; 205(1): p. 17-23.
- Costa T., Chaves A.J., Valle R., Darji A., van R.D., Kuiken T., Majo N., Ramis A. 2012. Distribution patterns of influenza virus receptors and viral attachment patterns in the respiratory and intestinal tracts of seven avian species. *Vet. Res.* 43, 28.

- Das K., Arami J.M., Ma L.C., Krug R.M., Arnold E. 2010. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat Struct Mol Biol*; 17: p. 530–538.
- Dawood F.S., *et al.* 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*; 360: p. 2605-2615.
- de Graaf M. and Fouchier R.A. 2014. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J*; 33: p. 823-841.
- de Jong J.C., Smith D.J., Lapedes A.S., *et al.* 2007. Antigenic and genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in Europe. *J Virol*; 81: p. 4315–4322.
- De Vleeschauwer A., Atanasova K., Van Borm S., *et al.* 2009. Comparative pathogenesis of an avian H5N2 and a swine H1N1 influenza virus in pigs. *PLoS One*; 4(8):e6662.
- Detmer S., Gramer M., Goyal S., Torremorell M. 2013. In vitro characterization of influenza A virus attachment in the upper and lower respiratory tracts of pigs. *Vet Pathol*; 50(4): p. 648–658.
- Detmer S., Gramer M., Goyal S., *et al.* 2013. Diagnostics and surveillance for swine influenza. *Curr Top Microbiol Immunol*; 370: p. 85–112.
- Di Trani L., Porru S., Bonfanti L., Cordioli P., Cesana B.M., Boni A., *et al.* 2012. Serosurvey against H5 and H7 avian influenza viruses in Italian poultry workers. *Avian Dis*; 56(4): p. 1068-1071.
- Dias A., Bouvier D., Crepin T., McCarthy A.A., Hart D.J., Baudin F., *et al.* 2009. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*; 458(7240): p. 914–918. doi: 10.1038/nature07745.
- Digard P., Blok V.C. and Inglis S.C. 1989. Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology*; 171(1): p. 162-169.
- Doms R.W. 1993. Protein conformational changes in virus-cell fusion. *Methods Enzymol*; 221: p. 61.
- Drummer H.E., Jackson D.C., Brown L.E. 1993. Modulation of CD4+ T-cell recognition of influenza hemagglutinin by carbohydrate side chains located outside a T-cell determinant. *Virology*; 192: p. 282–289.
- Dundon W.G. 2012. Variability among the neuraminidase, non-structural 1 and PB1-F2 proteins in the influenza A virus genome. *Virus Genes*; 44: p. 363–373.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010. Scientific Opinion on the pandemic (H1N1) 2009 influenza and its potential implications for animal health. *EFSA Journal*; 8(10): p. 1770.

- Engelhardt O.G., Smitt M., Fodor E. 2005. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J of Virology*; 79(9): p. 5812-5818.
- Fechter P., Mingay L., Sharps J., Chambers A., Fodor E., Brownlee G.G. 2003. Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. *J Biol Chem*; 278: p. 20381–20388.
- Fereidouni S.R., Starick E., Grund C., Globig A., Mettenleiter T.C., *et al.* 2009. Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses. *Vet Microbiol*; 135: p. 253–260
- Flammini C. Orthomyxoviridae. Farina R., Scamozza F. Trattato di Malattie infettive degli animali. 2° edizione UTET: p. 673-693.
- Fleury D., Wharton S.A., Skehel J.J., Knossow M., Bizebard T. 1998. Antigen distortion allows influenza virus to escape neutralization. *Nat Struct Biol*; 5(2): p. 119-123.
- Fouchier R.A.M., Schneeberger P.M., Rozendaal F.W., *et al.* 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *PNAS*; 101: p. 1356–1361.
- Franca M., Stallknecht D.E., and Howerth E.W. 2013. Expression and distribution of sialic acid influenza virus receptors in wild birds. *Avian Pathol*; 42: p. 60-71.
- Fujii K., Fujii Y., Noda T., Muramoto Y., Watanabe T., *et al.* 2005. Importance of both the coding the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segments for its efficient incorporation into virion. *J of Virology*; 79(6): p. 3766-3774.
- Fujiyoshi Y., Kume N.P., Sakata K. and Sato S.B. 1994. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy. *EMBO J*; 13(2): p. 318-326.
- Gabriel G., Herwig A., Klenk H.D. 2008. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog*;4(2):e11.
- Gallagher P., Henneberry J., Wilson I., Sambrook J., Gething M. J. 1988. Addition of carbohydrate side chains at novel sites on influenza virus hemagglutinin can modulate the folding, transport, and activity of the molecule. *J Cell Biol*; 107: p. 2059–2073.
- Gambaryan A.S., Marinina V.P., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Rudneva I.A., Sinitsyn B.V., *et al.* 1998. Effects of host-dependent glycosylation of hemagglutinin on receptor-binding properties on H1N1 human influenza A virus grown in MDCK cells and in embryonated eggs. *Virology*; 247(2): p. 170–177.

Gamblin S.J., Haire L.F., Russell R.J., Stevens D.J., Xiao B., Ha Y., Vasisht N., Steinhauer D.A., Daniels R.S., Elliot A., Wiley D.C. and Skehel J.J. 2004. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science*; 303(5665): p. 1838-1842.

Garcia-Sastre A., Egorov A., Matassov D., Brandt S., Levy D.E., Durbin J.E., Palese P. and Muster T. 1998. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*; 252(2): p. 324-330.

Garten R.J. *et al.* 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*; 325: p. 197-201.

Gaydos J.C., Top F.H., Hodder R.A., Russell P.K. 1977. Swine influenza A outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976. *Emerg Infect Dis*; DOI: 10.3201/eid1201.050965

Gómez-Puertas P., Albo C., Pérez-Pastrana E., Vivo A., Portela A. 2000. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol*; 74(24): p. 11538-115347.

Gonzalez S. and Ortin J. 1999a. Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J Virol*; 73(1): p. 631-637.

Gonzalez S. and Ortin J. 1999b. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J*; 18(13): p. 3767-3775.

Graham B.S., Crowe J.E. Jr. 2007. Immunization against viral diseases. Knipe D.M., Howley P.M. *Field's virology*, vol 1, 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 487-538.

Grambas S. and Hay A.J. 1992. Maturation of influenza A virus hemagglutinin-estimates of the pH encountered during transport and its regulation by the M2 protein. *Virology*; 190(1): p. 11-18.

Gramer M.R., Lee J.H., Choi Y.K., Goyal S.M., and Joo H.S. 2007. Serologic and genetic characterization of North American H3N2 swine influenza A viruses. *Can. J Vet Res*; 71: p. 201-206.

Gray G.C., Bender J.B., Bridges C.B., Daly R.F., *et al.* 2012. Influenza A(H1N1)pdm09 virus among healthy show pigs, United States. *Emerg Infect Dis*; 18: p. 1519-1521.

Grayson M.L., *et al.* 2010. *Kucers- The use of antibiotics*, sixth Edition: a clinical review of antibacterial, antifungal and antiviral drugs. CRC Press, 2993-3012.

Greenspan D., Krystal M., Nakada S., Arnheiter H., Lyles D.S. and Palese P. 1985. Expression of influenza virus NS2 nonstructural protein in bacteria and localization of NS2 in infected eucaryotic cells. *J Virol*; 54(3): p. 833-843.

Gregory V., Lim W., Cameron K., *et al.* 2001. Infection of a child in Hong Kong by an influenza A H3N2 virus closely related to viruses circulating in European pigs. *J Gen Virol*. 82: p. 1397-1406.

Griffin S. 2013. Virus-coded ion channels as antiviral targets. Desai M.C., Meanwell N.A., Thurston D.E. Successful strategies for the discovery of antiviral drugs. *Royal Society of Chemistry*, 295-364.

Guarner J., *et al.* 2000. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of influenza A virus infection in human lungs. *Am J Clin Pathol*; 114(2): p. 227–233.

Guu T.S.Y., Dong L., Wittung-Stafshede P. and Tao Y.J. 2008. Mapping the domain structure of the influenza A virus polymerase acidic protein (PA) and its interaction with the basic protein 1 (PB1) subunit. *Virology*; 379(1): p. 135-142.

Haines D.M., Waters E.H., Clark E.G. 1993. Immunohistochemical detection of swine influenza A virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Can J Vet Res*; 57: p. 33-36.

Hale B.G., Randall R.E., Ortin J. and Jackson D. 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol*; 89(10): p. 2359-2376.

Hancock K., Veguilla V., Lu X., Zhong W., Butler E.N., Sun H., *et al.* 2009. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med*; 361: p. 1945–1952.

Harder T.C., Grosse B.E., Lange E., *et al.* 2013. Expanded cocirculation of stable subtypes, emerging lineages, and new sporadic reassortants of porcine influenza viruses in swine populations in Northwest Germany. *J Virol*; 87: p. 10460-10476.

Hatta M., Gao P., Halfmann P., Kawaoka Y. 2001. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*; 293(5536): p. 1840–1842.

Hatta M., *et al.* 2007. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog*; 3(10): p. 1374–1379.

Hay A.J. 1992. The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *Semin Virol*; 3: p. 21–30.

He J., Bose M.E., Beck E.T., *et al.* 2009. Rapid Multiplex Reverse Transcription-PCR Typing of Influenza A and B Virus, and Subtyping of Influenza A Virus into H1, 2, 3, 5, 7, 9, N1 (Human), N1 (Animal), N2, and N7, Including Typing of Novel Swine Origin Influenza A (H1N1) Virus, during the 2009 Outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *J Clin Microbiol*; 47(9): p. 2772-2778.

- Hebert D.N., Zhang J.X., Chen W., Foellmer B., Helenius A. 1997. The number and location of glycans on influenza hemagglutinin determine folding and association with calnexin and calreticulin. *J Cell Biol*; 139(3): p. 613–623.
- Heinen P.P., van Nieuwstadt A.P., Pol J.M., *et al.* 2000. Systemic and mucosal isotype-specific antibody responses in pigs to experimental influenzavirus infection. *Viral Immunol*; 13: p. 237-247.
- Holland J., Spindler K., Horodyski F., Grabau E., Nichol S., VandePol S. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*; 215(4540): p. 1577-1585.
- Horimoto T., Nakayama K., Smeekens S.P., Kawaoka Y. 1994. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J Virol*; 68: p. 6074–6078.
- Horimoto T., Kawaoka Y. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *J Clin Microbiol*; 14(1): p. 129-149.
- Howden K.J. *et al.* 2009. An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. *Can Vet J*; 50: p. 1153-1161.
- Ito T., Couceiro J.N., Kelm S., Baum L.G., Krauss S., *et al.* 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*; 72: p. 7367-7373.
- Ives J.A., *et al.* 2002. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Res*; 55(2): p. 307–317.
- Jagger B.W., Wise H.M., Kash J.C., Walters K.A., Wills N.M., Xiao Y.L., Dunfee R.L., Schwartzman L.M., *et al.* 2012. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*; 337(6091): p. 199-204.
- Janke B.H. 1998. Classic swine influenza. *Large Anim Pract*; 19: p. 24–29.
- Janke B.H. 2013. Clinicopathological features of swine influenza. *Curr Top Microbiol Immunol*; 370: p. 69–83.
- Janke B.H. 2014. Influenza A virus infections in swine: pathogenesis and diagnosis. *Vet Pathol*; 51(2): p. 410–426.
- Jindal N., Chander Y., Sreevatsan S. *et al.* 2009. Amplification of four different genes of influenza A viruses using a degenerate primer set in a one step RT-PCR method. *J Virol Methods*; 160: p. 163-166

Jung K., Ha Y., Chae C. 2005. Pathogenesis of swine influenza virus subtype H1N2 infection in pigs. *J Comp Pathol*; 132(2–3): p. 179–184.

Kamps B.S., Hoffmann C., Preiser W. 2006. *Influenza Report 2006*. Flying Publisher; 92-105.

Karasin A.I., Landgraf J., Swenson S., Erickson G., *et al.* 2002. Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *J Clin Microbiol*; 40: p. 1073-1079.

Karasin A.I., West K., Carman S., *et al.* 2004. Characterization of avian H3N3 and H1N1 influenza A viruses isolated from pigs in Canada. *J Clin Microbiol*; 42(9): p. 4349–4354.

Karger B.L., Guttman A. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis*; 30(Suppl 1):S196-S202.

Kash J.C., Goodman A.G., Korth M.J., Katze M.G. 2006. Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection. *Virus Research*; 119(1): p. 111- 120.

Katz J.M., Naeve C.W., Webster R.G. 1987. Host cell-mediated variation in H3N2 influenza viruses. *Virology*; 156: p. 386- 395.

Katz J.M., Wang M., Webster R.G. 1990. Direct sequencing of the HA gene of influenza (H3N2) virus in original clinical samples reveal sequence identity with mammalian cell-grown virus. *Journal of Virology*; 64: p. 1808-1811.

Katz J.M., Webster R.G. 1992. Amino acid sequence identity between the HA1 of influenza A (H3N2) viruses grown in mammalian and primary chick kidney cells. *J Gen Virol*; 73: p. 1159–1165.

Kawaoka Y., Webster R.G. 1988. Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85(2): p. 324–328.

Kawaoka Y., Krauss S., Webster R.G. 1989. Avian-to-human transmission of the PBI gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol*; 63: p. 4603-4608.

Kawaoka Y. 2006. *Influenza Virology: Current Topics*. Caister Academic Press.

Kawaoka Y. and Neumann G. 2012. *Influenza Virus-Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology* vol. 865, Humana Press, 1-9.

Kilander A., Rykkvin R., Dudman S.G., Hungnes O. 2010. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009– 2010. *Euro Surveill*; 15: p. 1–3.

- Kilbourne E.D. 1968. Recombination of influenza A viruses of human and animal origin. *Science*; 160(3823): p. 74–76.
- Kilbourne E.D. 2006. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis*. DOI: 10.3201/eid1201.051254
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. 2012. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, 749-761.
- Klenk H.D. and Garten W. 1994. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol*; 2: p. 39–43.
- Koen. 1919. A practical method for field diagnosis of swine diseases. *Am J Vet Med*; 14: p. 468-470.
- Koopmans M. 2004. Emerging viral zoonoses. *Acta Vet Scand*; 100: p. 51- 54.
- Krause J.C., Tsibane T., Tumpey T.M., Huffman C.J., *et al.* 2011. A broadly neutralizing human monoclonal antibody that recognizes a conserved, novel epitope on the globular head of the influenza H1N1 virus hemagglutinin. *J Virol*; 85(20): p. 10905- 10908.
- Krueger W.S. and Gray G.C. 2013. Swine Influenza Virus Infections in Man. *Curr Top Microbiol Immunol*; 370: p. 201-225.
- Krug R.M. and Etkind P.R. 1973. Cytoplasmic and nuclear virus-specific proteins in influenza virus-infected MDCK cells. *Virology*; 56(1): p. 334-348.
- Krumbholz A., Schmidtke M., Bergmann S., Motzke S., Bauer K., Stech J., Durrwald R., Wutzler P., Zell R. 2009. High prevalence of amantadine resistance among circulating european porcine influenza A viruses. *J Gen Virol*; 90: p. 900–908.
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., *et al.* 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*; 27: p. 95-125.
- Kurtz J., Manvell R., Banks J. 1996. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. *Lancet*; 348: p. 901–902.
- Lakadamyali M., Rust M.J., Babcock H.P. and Zhuang X. 2003. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100: p. 9280–9285.
- Lam W.Y., Yeung A.C.M., Tang J.W., *et al.* 2007. Rapid Multiplex Nested PCR for Detection of Respiratory Viruses . *J Clin Microbiol*; 45(11): p. 3631-3640.
- Lamb R.A., Zebedee S.L. and Richardson C.D. 1985. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell*; 40(3): p. 627-633.

Lamb R.A. 1989. Genes and proteins of the influenza viruses. Krug R. M. The influenza viruses. Plenum Press: p. 1-87.

Lamb R.A. and Krug R.M. 2001. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. Knipe D.M., Howley P.M., Fields B.N., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., Roizman B., Straus S. E. Fields-Virology, 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 1487-1531.

Landolt G.A., Karasin A.I., Phillips L., *et al.* 2003. Comparison of the pathogenesis of two genetically different H3N2 influenza A viruses in pigs. J Clin Microbiol; 41(5): p. 1936–1941.

Landolt G.A., Karasin A.I., Hofer C., Mahaney J., Svaren J., Olsen C.W. 2005. Use of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay and cell culture methods for detection of swine influenza A viruses. Am J Vet Res; 66(1): p. 119–124.

Larochelle R., Sauvageau R., Magar R. 1994. Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Quebec. Can Vet J; 35: p. 513-515.

Larsen D.L., Karasin A., Olsen C.W. 2001. Immunization of pigs against influenza virus infection by DNA vaccine priming followed by killed-virus vaccine boosting. Vaccine; 19: p. 2842–2853.

Lee M.T., Bishop K., Medcalf L., Elton D., Digard P., and Tiley L. 2002. Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. Nucleic Acids Res; 30(2): p. 429-438.

Lentz M.R., Air G.M. 1986. Loss of enzyme activity in a site-directed mutant of influenza neuraminidase compared to expressed wild-type protein. Virology; 148(1): p. 74-83.

Leuwerke B., Kitikoon P., Evans R., Thacker E. 2008. Comparison of three serological assays to determine the cross-reactivity of antibodies from eight genetically diverse U.S. Swine influenza viruses. J Vet Diagn Invest; 20: p. 426–432.

Li X. and Palese P. 1994. Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. J Virol; 68(2): p. 1245-1249.

Li J., Chen S., Evans D.H. 2001. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol; 39: p. 696–704.

Liu L., Li Y., Li S., *et al.* 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. Journal of Biomedicine and Biotechnology, vol. 2012, Article ID 251364.

- Lorusso A., Vincent A.L., Gramer M.R., Lager K.M. and Ciacci-Zanella J.R. 2013. Contemporary Epidemiology of North American Lineage Triple Reassortant Influenza A Viruses in Pigs. *Curr Top Microbiol Immunol*; 370: p. 113-132.
- Lorusso A., Ciacci-Zanella J.R., Zanella E.L., Pena L., Perez D.R., Lager K.M., *et al.* 2014. Polymorphisms in the haemagglutinin gene influenced the viral shedding of pandemic 2009 influenza virus in swine. *J Gen Virol*; 95(Pt 12): p. 2618-2626.
- Ma W., Vincent A., Lager K., *et al.* 2010. Identification and characterization of a highly virulent triple reassortant H1N1 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes*; 40(1): p. 28–36.
- Marjuki H., Yen H.L., Franks J., Webster R.G., Pleschka S., *et al.* 2007. Higher polymerase activity of a human influenza virus enhances activation of the hemagglutinin-induced raf/MEK/ERK signal cascade. *Virol J*; 4: p. 134.
- Martin K. and Helenius A. 1991a. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*; 67(1): p. 117-130.
- Martin K. and Helenius A. 1991b. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol* ; 65(1): p. 232-244.
- Martin-Benito J., Area E., Ortega J., Llorca O., Valpuesta J.M., Carrascosa J.L. and Ortin J. 2001. Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Reports*; 2: p. 313–317.
- Mazur I., Anhlan D., Mitzner D., Wixler L., Schubert U., Ludwig S. 2008. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol*; 10(5): p. 1140–1152.
- McAuley J.L., *et al.* 2007. Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe*; 2(4): p. 240–249.
- Meguro H., Bryant J.D., Torrence A.E., *et al.* 1979. Canine kidney cell line for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*; 9: p. 175–179.
- Mehle A., Doudna J.A. 2009. Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*; 106(50): p. 21312–21316.
- Metreveli G. *et al.* 2011. Comparison of two H1N2 swine influenza A viruses from disease outbreaks in pigs in Sweden during 2009 and 2010. *Virus Genes*; 42: p. 236-244.
- Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*; 11: p. 31–46.

- Meyer W.J., *et al.* 1993. Influence of host cell-mediated variation on the international surveillance of influenza A (H3N2) viruses. *Virology*; 196: p. 130–137
- Miwa Y., Piao F.Z., Goto H. and Noro S. 1987. Isolation of human (H3N2) influenza virus and prevalence of the virus-antibody in swine. *Nihon Juigaku Zasshi*; 49: p. 1168-1170.
- Monne I., Fusaro A., Nelson M.I., *et al.* 2014. Emergence of a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus from a Low-Pathogenic Progenitor. *J Virol*; 88(8): p. 4375-4388.
- Moreno A., *et al.* 2010. First Pandemic H1N1 Outbreak from a Pig Farm in Italy. *Open Virol J*; 4: p. 52–56.
- Moreno A., *et al.* 2011. Novel H1N2 swine influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 virus. *Vet Microbiol*; 149(3-4): p. 472- 477.
- Moreno A., Chiapponi C., Boniotti M.B., Sozzi E., Foni E., *et al.* 2012. Genomic characterization of H1N2 swine influenza viruses in Italy. *Vet Microbiol*; 156: p. 265–276.
- Moreno A., *et al.* 2013. Different evolutionary trends of swine H1N2 influenza viruses in Italy compared to European viruses. *Vet Res*; 44: p. 112.
- Morens D.M., Taubenberger J.K. 2009. Understanding influenza backward. *JAMA*; 302: p. 679–680.
- Munk K., Pritzer E., Kretzschmar E., Gutte B., Garten W., *et al.* 1992. Carbohydrate masking of an antigenic epitope of influenza virus haemagglutinin independent of oligosaccharide size. *Glycobiology*; 2: p. 233–240.
- Munster V.J., De Wit E., Van Riel D., Beyer W.E., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., *et al.* 2007. The molecular basis of the pathogenicity of the Dutch highly pathogenic human influenza A H7N7 viruses. *J Infect Dis.*; 196(2): p. 258-265.
- Muramoto Y., Takada A., Fujii K., Noda T., Iwatsuki-Horimoto K., Watanabe S., Horimoto T., Kida H., Kawaoka Y. 2006. Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J of virology*; 80(5): p. 2318- 2325.
- Nakajima K., Desselberger U., Palese P. 1978. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature*; 274: p. 334–339.
- Nardelli L., Pascucci S., Gualandi G.L. and Loda P. 1978. Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976. *Zentralbl Veterinarmed*; B 25: p. 853-857.
- Nayak D.P., Twiehaus M.J., Kelley G.W., *et al.* 1965. Immunocytologic and histopathologic development of experimental swine influenza infection in pigs. *Am J Vet Res*; 26(115): p. 1271–1283.

- Nayak D.P., Balogun R.A., Yamada H., Zhou Z.H., and Barman S. 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res*; 143: p. 147-161.
- Nelli R.K., Kuchipudi S.V., White G.A., Perez B.B., Dunham S.P., Chang K.C. 2010. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet Res*; 6: p. 4.
- Nelson M.I., Vincent A.L., Kitikoon P., Holmes E.C., and Gramer M.R. 2012. Evolution of novel reassortant A/H3N2 influenza viruses in North American swine and humans, 2009-2011. *J Virol*; 86: p. 8872-8878.
- Nelson M.I., Wentworth D.E., Culhane M.R., *et al.* 2014. Introductions and evolution of human-origin seasonal influenza A viruses in multinational swine populations. *J Virol*; 88(17): p. 10110-10109.
- Nemeroff M.E., Barabino S.M., Li Y., Keller W. and Krug R.M. 1998. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre- mRNAs. *Mol Cell*; 1: p. 991–1000.
- Nicholls J.M., Bourne A.J., Chen H., Guan Y., Peiris J.S. 2007. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir Res*; 8: p. 73.
- Nicholls J.M., Chan R.W., Russell R.J., Air G.M. and Peiris J.S. 2008. Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol*; 16: p. 149-157.
- Nobusawa E., Aoyama T., Kato H., Suzuki Y., Tateno Y., Nakajima K. 1991. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology*; 182: p. 475-485.
- Nobusawa E., Sato K. 2006. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol*; 80(7): p. 3675–3678.
- Noda T., Sagara H., Yen A., Takada A., Kida H., Cheng R. H., Kawaoka Y. 2006. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*; 439(7075): p. 490- 492.
- Noton S.L., Medcalf E., Fisher D., Mullin A.E., Elton D. and Digard P. 2007. Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol*; 88(8): p. 2280-2290.
- Ohwada K., Kitame F., Homma M. 1986. Experimental infections of dogs with type C influenza virus. *Microbiol Immunol*; 30: p. 451–460.

OIE (World Organization for Animal Health). 2008. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.8.8: Swine Influenza.

Olsen C.W., Karasin A.I., Carman S., *et al.* 2006a. Triple reassortant H3N2 influenza A viruses, Canada, 2005. *Emerg Infect Dis*; 12: p. 1132–1135.

Olsen C.W., Brown I.H., Easterday B.C., Van Reeth K. 2006b. Swine Influenza. Straw B.E. *et al.* Diseases of swine, 9th Edition. Blackwell; p. 469-482.

O'Neill R.E. and Palese P. 1995. NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein. *Virology*; 206(1): p. 116-125.

Onno M., *et al.* 1990. Diagnosis of swine influenza with an immunofluorescence technique using monoclonal antibodies. *Vet Q*; 12(4): p. 251-254.

Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F., Martina B.E., Bestebroer T.M., Fouchier R.A. 2000. Influenza B virus in seals. *Science*; 288(5468): p. 1051-1053.

Ottis K., Sidoli L., Bachmann P.A., Webster R.G. and Kaplan M.M. 1982. Human influenza A viruses in pigs: isolation of a H3N2 strain antigenically related to A/England/42/72 and evidence for continuous circulation of human viruses in the pig population. *Arch Virol*; 73: p. 103-108.

Palese P. and Garcia-Sastre A. 2002. Influenza vaccines: present and future. *J Clin Invest*; 110(1): p. 9-13.

Palese P. and Shaw M.L. 2007. “Orthomyxoviridae”: the viruses and their replication. Knipe D., Howley P. M. *Fields-Virology*, 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, p. 1647–1689.

Pan C., Cheung B., Tan S., Li C., Li L., Liu S., Jiang S. 2010. Genomic signature and mutation trend analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus. *PLoS One*; 5:e9549.

Park C.J., Bae S.H., Lee M.K., Varani G. and Choi B.S. 2003. Solution structure of the influenza A virus cRNA promoter: implications for differential recognition of viral promoter structures by RNA-dependent RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*; 31(11): p. 2824-2832.

Parvin J.D., Moscona A., Pan W.T., Leider J.M., Palese P. 1986. Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol*; 59(2): p. 377–83.

Pedersen J.C. 2008a. Hemagglutination-inhibition test for avian influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to the avian influenza virus. *Methods Mol Biol*; 436: p. 53–66.

Pedersen J.C. 2008b. Neuraminidase-inhibition assay for the identification of influenza A virus neuraminidase subtype or neuraminidase antibody specificity. *Methods Mol. Biol*; 436: p. 67–75.

- Peiris M.J.S. 2009. Avian influenza viruses in humans. *Rev Sci Tech*; 28: p. 161–173.
- Peiris J.S., Guan Y., Markwell D., Ghose P., Webster R.G., and Shortridge K.F. 2001. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *J Virol*; 75: p. 9679-9686.
- Pensaert M., Ottis K., Vandeputte J., Kaplan M.M. and Bachmann P.A. 1981. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducts to swine and its potential importance for man. *Bull. World Health Organ*; 59: p. 75-78.
- Pielak R.M. and Chou J.J. 2010. Influenza M2 proton channels. *Biochim Biophys Acta*, 1808(2): p. 522-529.
- Pleschka S. Overview of influenza viruses. 2013. *Curr Top Microbiol Immunol*; 370: p. 1–20. doi: 10.1007/82\_2012\_272.
- Poch O., Sauvaget I., Delarue M. and Tordo N. 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J*; 8(12): p. 3867-3874.
- Poole E., Elton D., Medcalf L. and Digard P. 2004. Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology*; 321(1): p. 120-133.
- Portela A. and Digard P. 2002. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol*; 83: p. 723-734.
- Puzelli S., *et al.* 2005. Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. *J Infect Dis*; 192(8): p. 1318-1322.
- Puzelli S., *et al.* Human Infection with Highly Pathogenic A(H7N7) Avian Influenza Virus, Italy, 2013. *Emerging Infectious Disease journal* doi:10.3201/eid2010.140512.
- Qi L., Pujanauski L.M., Davis A.S., Schwartzman L.M., Chertow D.S., Baxter D., *et al.* 2014. Contemporary Avian Influenza A Virus Subtype H1, H6, H7, H10, and H15 Hemagglutinin Genes Encode a Mammalian Virulence Factor Similar to the 1918 Pandemic Virus H1 Hemagglutinin. *mBio*; 5(6), e02116–14. doi:10.1128/mBio.02116-14.
- Quiñones-Mateu M.E., Avila S., Reyes-Teran G., Martinez M.A. 2014. Deep sequencing: becoming a critical tool in clinical virology. *J Clin Virol*; 61(1): p. 9-19.
- Reid A.H., Fanning T.G., Hultin J.V. and Taubenberger J.K. 1999. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: p. 1651-1656.
- Richardson J.C. and Akkina R.K. 1991. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol*; 116(1-4): p. 69-80.

- Richt J.A., Lager K.M., Janke B.H., *et al.* 2003. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States. *J Clin Microbiol*; 41(7): p. 3198–3205.
- Richt J.A., Lager K.M., Clouser D.F., Spackman E., Suarez D.L., Yoon K.J. 2004. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the detection and differentiation of North American swine influenza viruses. *J Vet Diagn Invest*; 16: p. 367–373.
- Richt J.A., Lekcharoensuk P., Lager K.M., *et al.* 2006. Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an ns1-truncated modified live-virus vaccine. *J Virol*; 80: p. 11009–11018.
- Robb N.C., Smith M., Vreede F.T. and Fodor E. 2009. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J Gen Virol*; 90: p. 1398–1407.
- Robertson J.S., Cook P., Attwell A.M., Williams S.P. 1995. Replicative advantage in tissue culture of egg-adapted influenza virus over tissue-culture derived virus: implications for vaccine manufacture. *Vaccine*; 13: p. 1583–1588.
- Romero-Tejeda A., Capua I. 2013. Virus-specific factors associated with zoonotic and pandemic potential. *Influenza Other Respir Viruses*; 7(2): p. 4-14.
- Rossow K.D., Yeske P., Goyal S.M., *et al.* Diagnostic investigation of unexpected serology results for swine influenza virus (SIV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J Swine Health Prod*; 11(1): p. 33-35.
- Rott R., Klenk H.D., Nagai Y., Tashiro M. 1995. Influenza viruses, cell enzymes, and pathogenicity. *Am J Respir Crit Care Med*; 152: p. 16–19.
- Salter A., Laoi B.N., Crowley B. 2011. Emergence and phylogenetic analysis of amantadine-resistant influenza A subtype H3N2 viruses in Dublin, Ireland, over six seasons from 2003/2004 to 2008/2009. *Intervirology*; 54: p. 305–315.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 74(12): p. 5463-5467.
- Sanger F. 1980. Determination of nucleotide sequences in DNA. Nobel lecture, 8 December 1980.
- Sartore S., Bonfanti L., Lorenzetto M., Cecchinato M., Marangon S. 2010. The effects of control measures on the economic burden associated with epidemics of avian influenza in Italy”. *Poult Sci*; 89(6): p. 1115-1121.
- Scholtissek C., Rohde W., Von Hoyningen V., Rott R. 1978. On the origin of the human influenza virus subtype H2N2 and H3N2. *Virology*; 87: p. 13–20.

- Scholtissek C., Burger H., Bachmann P.A. and Hannoun C. 1983. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology*; 129: p. 521-523.
- Schulze I.T. 1997. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *J Infect Dis*; 176: p. 24–28.
- Seo S.H., Hoffmann E., Webster R.G. 2002. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med*; 8(9): p. 950–954.
- Shinya K., Ebina M., Yamada S., Ono M., Kasai N., Kawaoka Y. 2006. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*; 440: p. 435-436.
- Shortridge K.F. and Webster R.G. 1979. Geographical distribution of swine (Hsw1N1) and Hong Kong (H3N2) influenza virus variants in pigs in Southeast Asia. *Intervirology*, 11: p. 9-15.
- Shu L.L., Bean W.J. and Webster R.G. 1993. Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990. *Journal of Virology*; 67: p. 2723–2729.
- Sidorenko Y., Reichl U. 2004. Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. *Biotechnology and Bioengineering*; 88 (1): p. 5.
- Simon G., Larsen L.E., Durrwald R., Foni E., Harder T., *et al.* 2014. European Surveillance Network for Influenza in Pigs: Surveillance Programs, Diagnostic Tools and Swine Influenza Virus Subtypes Identified in 14 European Countries from 2010 to 2013. *PLoS ONE* 9(12): e115815.
- Simon-Grifé M., Martín-Valls G.E., Vilar M.J., García-Bocanegra I., *et al.* 2011. Seroprevalence and risk factors of swine influenza in Spain. *Vet Microbiol*; 149: p. 56–63.
- Smith A.E., Helenius A. 2004. How viruses enter animal cells. *Science*; 304(5668): p. 237–242.
- Smith G.J. *et al.* 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*; 459: p. 1122-1125.
- Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., *et al.* 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol*; 40: p. 3256–3260.
- Spackman E., Suarez D.L. 2008. Type A influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. *Methods Mol Biol*; 436: p. 19–26.
- Sreta D., Kedkovid R., Tuamsang S., *et al.* 2009. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai

isolates) in weanling pigs: an experimental trial. *Virology*; 6: p. 34.

Stech J., Xiong X., Scholtissek C., Webster R.G. 1999. Independence of evolutionary and mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine. *Journal of virology*; 73: p. 1878–1884.

Stieneke-Gröber A., Vey M., Angliker H., Shaw E., Thomas G., Roberts C., Klenk H. D., Garten W. 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J*; 11: p. 2407–2414.

Strengell M., Ikonen N., Ziegler T. and Julkunen I. 2011. Minor changes in the hemagglutinin of influenza A(H1N1)2009 virus alter its antigenic properties. *PLoS ONE*; 6(10): Article ID e25848.

Sun W. 2010. Nucleic extraction and amplification. Grody W. *et al.* *Molecular diagnostics: techniques and applications for the clinical laboratory*, 1st Edition. Academic Press, p. 35-47.

Suzuki Y., Ito T., Suzuki T., Holland R.E., Chambers T.M., Kiso M., *et al.* 2000. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol*; 74: p. 11825-11831.

Swenson S.L., Vincent L.L., Lute B.M., Janke B.H., *et al.* 2001. A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. *J Vet Diagn Invest*; 13: p. 36-42.

Takemae N., Ruttanapumma R., Parchariyanon S., *et al.* 2010. Alterations in receptor-binding properties of swine influenza viruses of the H1 subtype after isolation in embryonated chicken eggs. *J Gen Virol*; 91: p. 938–948

Taubenberger J. K., Kash J. C. 2010. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation and Pandemic Formation. *Cell Host & Microbe*; 7(6), p. 440–451.

Thacker E.L., Thacker B.J., Janke B.H. 2001. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *J Clin Microbiol*; 39(7): p. 2525–2530.

To KK, Tsang AK, Chan JF, Cheng VC, Chen H, Yuen KY. 2014. Emergence in China of human disease due to avian influenza A(H10N8) - Cause for concern?. *J Infect*; 68: p. 205–215.

Tobler K., Kelly M.L., Pinto L.H. and Lamb R.A. 1999. Effect of Cytoplasmic Tail Truncations on the Activity of the M2 Ion Channel of Influenza A Virus. *J Virol*; 73(12): p. 9695- 9701.

Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., *et al.* 2013. “New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses”. *PLOS Pathog*; 9(10): e1003657.

Trebbien 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*; 8: p. 434.

Trebbien R., *et al.* 2013. Genetic and biological characterisation of an avian-like H1N2 swine influenza virus generated by reassortment of circulating avian-like H1N1 and H3N2 subtypes in Denmark. *Virology*; 10: p. 290.

Tscherne D.M., Garcia-Sastre A. 2011. Virulence determinants of pandemic influenza viruses. *J Clin Invest*; 121: p. 6–13.

Tumpey T.M., *et al.* 2005. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*; 310(5745): p. 77–80.

van de Sandt C.E., Kreijtz J.H., Rimmelzwaan G.F. 2012. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses*; 4: p. 1438-1476.

Van Reeth K. and Pensaert M. 1994. Porcine respiratory coronavirus - mediated interference against influenza virus replication in the respiratory tract of feeder pigs. *Am J Vet Res*; 55: p. 1275-1281.

Van Reeth K., Nauwynck H. and Pensaert M. 1996. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus : a clinical and virological study. *Vet Microbiol*; 48: p. 325-335.

Van Reeth K., Labarque G., De Clercq S., Pensaert M. 2001. Efficacy of vaccination of pigs with different H1N1 swine influenza viruses using a recent challenge strain and different parameters of protection. *Vaccine*; 19: p. 4479-4486.

Van Reeth K., Gregory V., Hay A., Pensaert M. 2003. Protection against a European H1N2 swine influenza virus in pigs previously infected with H1N1 and/or H3N2 subtypes. *Vaccine*; 21: p. 1375-1381.

Van Reeth K., Labarque G., Pensaert M. 2006. Serological profiles after consecutive experimental infections of pigs with European H1N1, H3N2, and H1N2 swine influenza viruses. *Viral Immunol*; 19: p. 373-382.

Van Reeth K., Brown I.H., Durrwald R., Foni E., Labarque G., *et al.* 2008. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002–2003. *Influenza Other Respi Viruses*; 2: p. 99–105.

Van Reeth K., Brown I.H., Olsen C.W. 2012. Swine Influenza. Zimmerman J. *et al.* Disease of swine, 10th Edition. Wiley-Blackwell Publishing Company.

Van Reeth K. and Ma W. 2013. Swine Influenza Virus Vaccines: To Change or Not to Change-That's the Question. *Curr Top Microbiol Immunol*; 370: p. 173-200.

- Vasin A.V., Temkina O.A., Egorov V.V., Klotchenko S.A., Plotnikova M.A., Kiselev O.I. 2014. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus Res*;185: p. 53-63.
- Vijaykrishna D. *et al.* 2011. Long-term evolution and transmission dynamics of swine influenza A virus. *Nature*; 473: p. 519-522.
- Villegas P., Alvarado I. 2008. Chapter 46. Dufour-Zavala L. *et al.* A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens, 5th Edition. American Association of Avian Pathologists, 218.
- Vincent L.L., Janke B.H., Paul P.S., Halbur P.G. 1997. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest*; 9: p. 191-195.
- Vincent A.L., Lager K.M., Ma W., *et al.* 2006. Evaluation of hemagglutinin subtype 1 swine influenza viruses from the United States. *Vet Microbiol*; 118(3–4): p. 212–222.
- Vincent A.L., Ma W., Lager K.M., Janke B.H. and Richt J.A. 2008. Swine influenza viruses: a North American perspective. *Adv. Virus Res*; 72: p. 127-154.
- Vincent A.L., Ma W., Lager K.M., Gramer M.R., Richt J.A., and Janke B.H. 2009a. Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes*; 39: p. 176-185.
- Vincent A.L., Swenson S.L., Lager K.M., *et al.* 2009b. Characterization of an influenza A virus isolated from pigs during an outbreak of respiratory disease in swine and people during a county fair in the United States. *Vet Microbiol*; 137(1–2): p. 51–59.
- Von Itzstein M., Wu W.Y., Kok G.B., *et al.* 1993. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*; 363: p. 418-423.
- Vosse B.A., Seelentag W., Bachmann A., *et al.* 2007. Background staining of visualization systems in immunohistochemistry: comparison of the Avidin-Biotin Complex system and the EnVision+ system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*;15: p. 103–107.
- Wagner E.K., Hewlett M.J., Bloom D.C., Camerini D. 2008. Basic virology, 3rd Edition. Blackwell, p. 273-302.
- Walker J., Molloy S., Thomas G., *et al.* 1994. Sequence specificity of furin, a proprotein-processing endoprotease, for the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus. *J Virol*; 68: p. 1213–1218.

- Wang J., Wu Y., Ma C., Fiorin G., Wang J., Pinto L.H., Lamb R.A., Klein M.L., Degrado W.F. 2013. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110: p. 1315–1320.
- Webby R.J., Swenson S.L., Krauss S.L., Gerrish P.J., Goyal S.M. and Webster R.G. 2000. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol*; 74: p. 8243-8251.
- Webby R.J., Rossow K., Erickson G., Sims Y., and Webster R. 2004. Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. *Virus Res*; 103: p. 67-73.
- Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microb Rev*, 56(1): p. 152-179.
- Webster R.G., Govorkova E.A. 2014. Continuing challenges in influenza. *Ann NY Acad Sci*; 1323(1): p. 115–139.
- Welsh M.D., Baird P.M., Guelbenzu-Gonzalo M.P., Hanna A., Reid S.M., *et al.* 2010. Initial incursion of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus into European pigs. *Vet Rec*; 166: p. 642–645.
- WHO Memorandum 1980. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses. *Bull. World Health Organization*, 58: p. 585-591.
- Wiley D.C., Wilson I.A. and Skehel J.J. 1981. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature*; 289(5796): p. 373-378.
- Wilson I.A., Skehel J.J. and Wiley D.C. 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*; 289(5796): p. 366-373.
- Winkler G.C., Cheville N.F. 1986. Ultrastructural morphometric investigation of early lesions in the pulmonary alveolar region of pigs during experimental swine influenza infection. *Am J Pathol*; 122(3): p. 541–552.
- Wise H.M., Foeglein A., Sun J., Dalton R.M., Patel S., Howard W., Anderson E.C., Barclay W.S., Digard P. 2009. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 Mrna. *J Virol*; 83(16): p. 8021-8031.
- Wood G.W., McCauley J.W., Bashiruddin J.B., Alexander D.J. 1993. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch Virol*; 130(1-2): p. 209-217.
- Wright P.F., Neumann G., Kawaoka Y. 2007. Orthomyxoviruses. Knipe D., Howley P. M. *Fields-Virology*, 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, p. 1692-1740.

- Yamada S., Hatta M., Staker B.L., *et al.* 2010. Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. *PLoS Pathog*; 6: p. 1–11.
- Yang Y., Gonzalez R., Huang F., Wang W. *et al.* 2010 Simultaneous typing and HA/NA subtyping of influenza A and B viruses including the pandemic influenza A/H1N1 2009 by multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods*; 167: p. 37-44
- Yasuda J., Nakada S., Kato A., Toyoda T. and Ishihama A. 1993. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology*; 196(1): p. 249-255.
- Yewdell J.W., Webster R.G., Gerhard W.U. 1979. Antigenic variation in three distinct determinants of an influenza type A haemagglutinin molecule. *Nature*; 279(5710): p. 246-248.
- Yewdell J.W., Ince W.L. 2012. Virology Frameshifting to PA-X influenza. *Science*; 337(6091): p. 164-165.
- Yondola M.A., Fernandes F., Belicha-Villanueva A., Uccellini M., Gao Q., Carter C., Palese P. 2011. Budding capability of the influenza virus neuraminidase can be modulated by tetherin. *J Virol*; 85: p. 2480–2491.
- Yuanji G., Desselberger U. 1984. Genome analysis of influenza C viruses isolated in 1981/82 from pigs in China. *J Gen Virol*; 65: p. 1857–1872.
- Zebedee S.L., Lamb R.A. 1988. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol*; 62(8): p. 2762-2772.
- Zell R., Krumbholz A., Eitner A., Krieg R., Halbhuber K.J., Wutzler P. 2007. Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *J Gen Virol*; 88(pt 2): p. 536–546.
- Zell R., Scholtissek C. and Ludwig S. 2013. Genetics, Evolution, and the Zoonotic Capacity of European Swine Influenza Viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*; 370: p. 29-55.
- Zhou N.N., Senne D.A., Landgraf J.S., Swenson S.L., *et al.* 1999. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol*; 73: p. 8851-8856.
- Zhou B., Wentworth D.E. 2012. Influenza A Virus Molecular Virology Techniques. Kawaoka Y., Neumann G. *Influenza Virus- Methods in molecular biology*, 865. Springer Protocols.
- Zhu H, Webby R., Lam T.Y., Smith D.K., Peiris J.M., and Guan Y. 2013. History of Swine Influenza Viruses in Asia. *Curr Top Microbiol Immunol*; 370: p. 57–68.