

ENTI PROPONENTI

CENTRO NAZIONALE PER L'INFLUENZA, SEDE AMMINISTRATIVA
DIPARTIMENTO DI MALATTIE INFETTIVE, PARASSITARIE E
IMMUNOMEDIATE, ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

CENTRO INTERUNIVERSITARIO DI RICERCA SULL'INFLUENZA ED
ALTRE INFEZIONI VIRALI

“Potenziamento della rete di sorveglianza virologica dell'influenza umana e
di alcuni laboratori del network per l'implementazione della diagnostica delle
polmoniti virali ”

PROPOSTA DI CONVENZIONE BIENNALE 2005-2006

A handwritten signature in blue ink, consisting of three distinct, stylized characters or initials.

Titolo del progetto:

Potenziamento della rete di sorveglianza virologica dell'influenza umana e di alcuni laboratori del network per l'implementazione della diagnostica delle polmoniti virali

Area di intervento:

Sorveglianza virologica dell'influenza e delle malattie virali acute delle vie aeree al fine di identificare precocemente ceppi influenzali a potenzialità pandemica ed agenti virali emergenti e riemergenti; diagnosi precoce delle malattie virali delle vie aeree con particolare riferimento a cluster di polmoniti ad etiologia sconosciuta; attivazione della risposta di Sanità Pubblica al fine di contenere e controllare il rischio di diffusione

Periodo di riferimento del progetto : 2005-2006

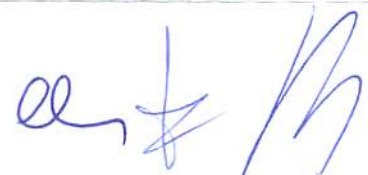
Proponente: Centro Interuniversitario di Ricerca sull'Influenza e sulle infezioni virali (CIRI-IV), sede amministrativa Università di Genova e Centro Nazionale per l'Influenza, sede amministrativa Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità

Sintesi del contenuto del progetto

In Italia, in seguito all'accordo sancito dalla Conferenza Stato-Regioni del 28 settembre 2000 (Atto n. 1031), è attivo un network di sorveglianza clinico-epidemiologico dell'influenza, a copertura nazionale, mentre la sorveglianza virologica è attualmente condotta da un piccolo numero di laboratori. Il numero sempre maggiore di casi di influenza aviaria riconducibili al salto di specie con il conseguente rischio di adattamento all'uomo di un virus a potenzialità pandemica, l'emergere di nuovi patogeni a trasmissione aerea quali il SARS-CoV, nonché la necessità di porre la sorveglianza dell'influenza dentro il vasto tema generale della sorveglianza delle virosi respiratorie, richiedono (i) l'implementazione della rete di sorveglianza virologica dell'influenza affinché sia in grado di coprire l'intero territorio nazionale e possa monitorare la circolazione dei virus influenzali in tutte le classi d'età, (ii) l'estensione della sorveglianza ai soggetti in contatto con il serbatoio animale, (iii) la standardizzazione delle metodologie di rilevamento e caratterizzazione e (iv) una diagnostica più rapida ed accurata dei cluster di polmoniti e influenza-like illness, che potrebbero rappresentare il primo segnale dell'introduzione di un virus emergente o ri-emergente nella comunità. L'implementazione dell'attività di sorveglianza permetterebbe una più precoce attivazione della risposta di Sanità Pubblica al fine di contenere e controllare il rischio di diffusione della malattia.

Razionale del progetto**Contesto: motivazione alle base del progetto e analisi e descrizione della situazione attuale**

L'influenza è una malattia ad elevato impatto sulla comunità in termini di incidenza, complicanze, ospedalizzazioni e mortalità, che trova la sua più efficace misura preventiva nella vaccinazione, attualmente raccomandata per le categorie a maggior rischio di complicanze. L'efficacia protettiva del vaccino è strettamente legata al *matching* tra virus circolanti e ceppi vaccinali; per queste ragioni, sin dagli anni successivi alla seconda guerra mondiale, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha organizzato un rete di laboratori che oggi sono attivi in 183 Paesi. Obiettivi del network, sono la caratterizzazione antigenica e molecolare dei virus influenzali circolanti, lo studio della loro patogenicità e diffusibilità, al fine di aggiornare la composizione del vaccino ed individuare più precocemente possibile i ceppi a potenzialità pandemica per una più rapida preparazione del vaccino e l'attivazione della risposta di Sanità Pubblica per contenere e controllare il rischio di diffusione. L'emergere di virus influenzali a potenzialità pandemica o di nuovi virus sembra strettamente legato a fenomeni di salto di specie dal serbatoio animale all'uomo, come recentemente messo in luce dai numerosi casi da A/H5N1 o negli alcuni anni fa dal SARS-CoV. In quest'ambito sembra, quindi necessario da un lato implementare la rete di sorveglianza virologica dell'influenza su tutto il territorio nazionale, concentrando particolare attenzione ai soggetti in contatto con il serbatoio animale. Le succitate esperienze di influenza aviaria e di SARS, hanno messo in luce, come le prime segnalazioni siano state riferibili a cluster di polmoniti ad etiologia sconosciuta e l'Organizzazione Mondiale della Sanità indica, tutt'oggi nel caso della SARS, la concentrazione di più ospedalizzazioni per polmoniti ad etiologia sconosciuta o polmoniti in soggetti che hanno viaggiato in aree ad alto rischio, elementi per far scattare la *SARS Alert* (WHO Guidelines, Oct 2004). Per queste ragioni, è necessario migliorare la diagnostica delle infezioni virali delle vie aeree e focalizzare la sorveglianza sui cluster di polmoniti o su polmoniti in viaggiatori che potrebbero rappresentare i primi casi di infezione da parte di nuove varianti virali e, quindi, il veicolo d'introduzione nella comunità di nuovi ceppi.



Obiettivi complessivi e specifici del progetto e risultati attesi

A. Implementazione della rete per la sorveglianza virologica dell'influenza, al fine di

- garantire che la raccolta dei campioni da pazienti con influenza-like illness sia omogenea su tutto il territorio nazionale e che permetta l'isolamento e la caratterizzazione di virus influenzali nelle diverse classi d'età con particolare attenzione ai soggetti immunizzati (rilevamento di *escape mutant*) o in contatto con il serbatoio animale
- procedere ad una rapida caratterizzazione sierologica e molecolare dei virus influenzali circolanti per valutare l'omologia con i ceppi che hanno circolato in passato e presenti nella composizione vaccinale
- identificare e caratterizzare precocemente ceppi a potenzialità pandemica che presentino glicoproteine di superficie, proteine strutturali o non-strutturali di origine animale

B. Implementazione della diagnostica delle infezioni virali delle vie aeree superiori ed inferiori, con particolare attenzione alle forme atipiche di polmonite al fine di:

- identificare precocemente agenti etiologici emergenti o ri-emergenti
- attivare la risposta di Sanità Pubblica al fine di contenere e controllare il rischio di diffusione
- migliorare il management del paziente alla luce delle terapie antivirali disponibili, riducendo il periodo di ricovero e abbattendo il rischio di complicanze
- permettere la messa in atto delle misure di prevenzione delle infezioni a trasmissione aerea, riducendo il rischio di trasmissione intra-ospedaliera di patogeni aerogeni e, quindi, il rischio di complicanze e il periodo di ricovero nei contatti del caso

Strategia di comunicazione e pubblicizzazione del progetto:

Publicazione settimanale dei risultati della sorveglianza epidemiologica e virologica dell'influenza su sito web del Ministero della Salute, dell'Istituto Superiore di Sanità e del CIRI-IV

Stesura di un rapporto annuale

Collegamento con reti nazionali e internazionali:

Rete Mondiale di Sorveglianza dell'Influenza coordinata dall'OMS

Rete Europea di Sorveglianza dell'Influenza EISS

Centro Nazionale di sorveglianza delle infezioni aviarie presso l'Istituto Zooprofilattico di Padova

Centro di Referenza Nazionale per le malattie degli animali selvatici presso l'Istituto Zooprofilattico di Piemonte-Liguria-Valle D'Aosta (C.E.R.M.A.S.)

Centro per la Sorveglianza delle Virosi Importate (ENIVID), R. Koch Institute, Berlino

Istituto Nazionale Fauna Selvatica (INFS) - Ozzano (BO)

Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria- Università di Bologna



Materiali e metodi

Raccolta dei campioni da pazienti con influenza-like illness omogenea su tutto il territorio nazionale, stratificata per età, rilevamento e isolamento di virus influenzali

Sarà necessario strutturare e implementare una rete di laboratori di 1° livello distribuiti su tutto il territorio nazionale, in grado di organizzare una rete di PLS e MMG per la raccolta dei campioni da pazienti nella diverse classi d'età. Per la descrizione delle caratteristiche e della numerosità della popolazione generale da sottoporre a sorveglianza nelle singole Regioni o Macroaree e la proposta dei laboratori di 1° livello si faccia riferimento agli Allegati 1 e 2. Complessivamente, al fine di ottenere 50 isolati di virus influenzale nelle classi 0-4, 5-14, 15-64 e >64 anni, sarà necessario, in virtù della diversa incidenza nelle differenti classi d'età sottoporre a sorveglianza circa 3.500 bambini, 11.700 adulti e oltre 20.000 ultrasessantacinquenni sull'intero territorio nazionale.

Ogni laboratorio dovrà essere attrezzato per lavorare con agenti biologici di classe II (livello di sicurezza BSL2) ed essere in grado di rilevare e tipizzare mediante tecniche di biologia molecolare virus influenzali A e B. In particolare la tecnica impiegata deve essere in grado di rilevare tutti i virus A, anche quelli appartenenti al *clade* aviario. E', inoltre fortemente raccomandata la sottotipizzazione dei virus A attualmente circolanti nell'uomo (A/H1N1, A/H3N2) e l'isolamento su substrato cellulare dei virus rilevati mediante tecniche molecolari

Raccolta dei campioni da pazienti con influenza-like illness in contatto con il serbatoio animale

La rete di sorveglianza dovrà essere in grado di rilevare e procedere al prelievo di campioni da soggetti in contatto con il serbatoio animale (allevatori, veterinari, lavoratori del settore avicolo, ...) che presentino sindrome riconducibile a infezione con virus influenzali (congiuntivite, ILL, ...). La rete dovrà essere organizzata dalla ASL, Dipartimento di Prevenzione, mediante una stretta collaborazione con i servizi/dipartimenti veterinari per l'individuazione degli allevamenti animali di interesse (specie aviarie, suini, equini) e avvalendosi dei MMG per la sorveglianza clinico-epidemiologica e la raccolta dei campioni.

I campioni raccolti dai soggetti in contatto con il serbatoio animale dovranno essere inviati ai laboratori di 2° livello per il rilevamento e la caratterizzazione virale.

Caratterizzazione sierologica e molecolare dei virus influenzali circolanti per valutare l'omologia con i ceppi che hanno circolato in passato e presenti nella composizione vaccinale e identificare e caratterizzare precocemente ceppi a potenzialità pandemica che presentino glicoproteine di superficie, proteine strutturali o non-strutturali di origine animale

I campioni risultati positivi mediante tecniche di biologia molecolare presso i laboratori di 1° livello e i campioni raccolti da soggetti in contatto con il serbatoio animale dovranno essere inviati ai laboratori di 2° livello, individuati nel NIC, Istituto Superiore di Sanità, Roma e nel CIRI-IV, Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Genova per la caratterizzazione sierologica, mediante HI test e microneutralizzazione, e la genotipizzazione. I laboratori di 2° livello dovranno essere in grado di rilevare, tipizzare e coltivare su substrato cellulare sia virus influenzali umani (A/H1N1, A/H3N2, B) che di origine aviaria che abbiano compiuto il salto di specie (A/H5N1, A/H7N3, A/H7N7, A/H9N2). Parte integrante dell'attività dei laboratori di 2° livello sarà la caratterizzazione molecolare delle glicoproteine di superficie del virus, nonché l'analisi di sequenza di proteine strutturali e non strutturali al fine di evidenziare fenomeni di ricombinazione tra virus aviari ed umani. A causa della potenziale presenza di virus di origine aviaria e di tecniche di espansione virale, per i laboratori di 2° livello è raccomandato il livello di sicurezza BSL3.

Implementazione della diagnostica delle infezioni virali delle vie aeree superiori ed inferiori, con particolare attenzione alle forme atipiche di polmonite al fine di:

La sorveglianza sarà incentrata su popolazioni che potrebbero rappresentare i primi casi di infezione delle vie aeree da parte di nuove varianti virali e, quindi, il veicolo d'introduzione nella comunità di nuovi ceppi. In particolare, l'allerta dovrà scattare in caso di

- cluster di polmoniti con etiologia sconosciuta in pazienti ospedalizzati
- cluster di polmoniti con etiologia sconosciuta in operatori sanitari
- ILL o polmoniti in soggetti in contatto con animali sia selvatici, che d'allevamento (allevatori, veterinari, lavoratori del settore avicolo, guardiacaccia, ...)
- ILL o polmoniti in viaggiatori da aree che potenzialmente possono essere considerate a rischio per introduzione di nuovi virus in relazione al quadro epidemiologico (attualmente ad esempio, Vietnam, Thailandia e Cambogia per il virus influenzale A/H5N1 o Sud della Cina per SARS-CoV)
- ILL o polmoniti in personale di laboratorio in cui vengono trattati virus respiratori a rischio epidemico

La rete di sorveglianza dovrà comprendere la rete ospedaliera ed un nucleo operativo/referente a livello regionale che coordinerà l'indagine epidemiologica avvalendosi del Servizio di Igiene Pubblica dell'ASL, competente per il territorio, e si interfacerà a livello centrale con il Ministero della Salute, Dipartimento delle Prevenzione. Le situazioni di allerta sopra indicate, vanno immediatamente segnalate possibilmente per telefono e notificati, seguendo le modalità previste per le malattie di Classe I del D.M. 15 dicembre 1990. Il nucleo operativo/referente

a livello regionale dovrà, inoltre, organizzare la raccolta dei campioni biologici da analizzare per la diagnosi, che dovranno essere inviati ai laboratori di 2° livello per il rilevamento e la caratterizzazione virale.

I laboratori di 2° livello procederanno sia con tecniche molecolari, sia mediante isolamento su substrato cellulare e immunofluorescenza al rilevamento di virus Influenzali umani e aviari, Virus Respiratorio Sinciziale, Adenovirus, Virus Parainfluenzali, Coronavirus (incluso SARS-CoV), Metapneumovirus, ...

Le attività dei Laboratori di 2° livello riguardanti sia la caratterizzazione sierologica e molecolare dei virus influenzali circolanti sia l'implementazione della diagnostica delle infezioni virali delle vie aeree superiori ed inferiori è sinteticamente riportata nell'Allegato 3.

Finanziamento richiesto:

Per l'attuazione del progetto si stima un fabbisogno biennale di €410.000

I costi sono, di seguito, approssimativamente indicati:

Laboratori di 1° livello:

Costi per la raccolta dei campioni, per il personale
per reagenti e consumabili per la sorveglianza virologica €130.000

Laboratori di 2° livello

Costi di personale per la gestione della sorveglianza

Supervisione e Coordinamento: 2 unità € 25.000

Personale tecnico: 4 unità € 80.000

Costi per controllo qualità interlaboratorio € 10.000

Costi per reagenti e consumabili per caratterizzazione virus interpandemici €50.000

Costi per reagenti e consumabili per preparazione al rilevamento,
tipizzazione, caratterizzazione di virus a potenzialità pandemica €50.000

Costi per reagenti e consumabili per preparazione alla diagnostica
delle infezioni virali delle vie respiratorie €65.000

Centri di finanziamento:

CIRI-IV, sede amministrativa Università di Genova €200.000

Centro Nazionale per l'Influenza, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto
Superiore di Sanità €210.000



Allegato 1. Laboratori di 1° livello della rete per la sorveglianza virologica dell'influenza e requisiti minimi e raccomandati richiesti

Laboratori di 1° livello afferenti al CIRI-IV, sede amministrativa Università di Genova

1. Istituto di Virologia, Università di Milano, CIRI-IV
2. Dipartimento di Scienze di Medicina Pubblica, Università di Trieste, CIRI-IV
3. Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università di Padova
4. Dipartimento di Fisiopatologia, Medicina Sperimentale e sanità Pubblica, Università di Siena
5. Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Sezione Igiene, Università di Palermo, CIRI-IV
6. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Università di Lecce, CIRI-IV

Laboratori di 1° livello afferenti al Centro Nazionale per l'Influenza, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, che mantiene il compito di centro di riferimento per l'OMS

1. ASL Centro Sud, Lab. di Microbiologia e Virologia, Bolzano
2. Dipartimento di Sanità Pubblica, Università di Parma
3. Dipartimento di Igiene e Sanità Pubblica, Lab. di Virologia, Università di Firenze
4. Dipartimento Igiene e Sanità Pubblica, Università di Perugia
5. Istituto di Microbiologia, Università Cattolica "S. Cuore", Roma
6. Dipartimento di Scienze Mediche Preventive, Università di Napoli
7. Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

Requisiti minimi:

- Rilevamento e tipizzazione mediante tecniche di biologia molecolare dei virus influenzali A e B. In particolare la tecnica impiegata deve essere in grado di rilevare tutti i virus A, anche quelli appartenenti al *clade* aviario
- Sottotipizzazione dei virus A attualmente circolanti nell'uomo (A/H1N1, A/H3N2)
- Livello di sicurezza BSL2
- Rete di PLS e MMG in grado di effettuare la sorveglianza di una popolazione rappresentativa per numerosità e caratteristiche anagrafiche della Regione o Macroarea (si veda sezione "Popolazione sottoposta a sorveglianza")

Requisiti raccomandati

- Isolamento mediante substrato cellulare e rilevamento mediante HA test e IF test dei virus influenzali attualmente circolanti nell'uomo (A/H1N1, A/H3N2, B)



Allegato 2. Popolazione Generale Sottoposta a Sorveglianza

Le infezioni delle vie respiratorie presentano differente etiologia ed incidenza nelle diverse classi d'età e i virus influenzali mostrano diverse caratteristiche antigeniche e molecolari in relazione all'età del paziente in cui sono stati isolati (Fleming et al., 2000; Zambon et al., 2001; Ansaldi et al., 2004). Al fine di garantire che gli isolati siano rappresentativi dei virus circolanti, i campioni dovranno essere raccolti nelle diverse Regioni o Macroaree (più regioni che afferiscono ad un unico laboratorio), da pazienti appartenenti a differenti fasce d'età. In base alla frazione etiologica attesa, estrapolata dalla letteratura e dai dati sorveglianza del network nazionale prudenzialmente considerati (Fleming et al., 2000; Zambon et al., 2001; Ansaldi et al., 2004), al fine di ottenere **50 isolati di virus influenzale nelle classi 0-4, 5-14, 15-64 e >64 anni**, sarà opportuno raccogliere almeno 330, 190, 350 e 510 tamponi naso-faringei rispettivamente nelle suddette classi su tutto il territorio nazionale. L'elevata incidenza di ILI attesa nella fasce pediatriche (0-4, 5-14 anni) consentirà di raccogliere i campioni mediante la sorveglianza di 3.500 bambini. L'inferiore incidenza osservata negli adulti e nelle classi d'età over-65 anni renderà necessaria la sorveglianza su circa 11.700 adulti e oltre 20.000 ultrasessantacinquenni. Ne consegue che ogni laboratorio dovrà organizzare una rete di medici sentinella in grado di sorvegliare **0,4 bambini (0-14 anni), 0,3 adulti (15-64 anni) e 2,5 over-65 ogni 1000 abitanti di quella classe di età della popolazione della Regione o Macroarea di appartenenza.**

Popolazione da sottoporre a sorveglianza attiva da parte del network di medici sentinella, numero di campioni e di isolati attesi nelle singole Regioni o Macroaree.

Lab.	Regione o Macroarea	Popolazione da Sorvegliare			Campioni Attesi	Isolati Attesi	
		0-14 anni	15-64 anni	<64 anni		Min	Max
GE	Piemonte, Liguria, Val d'Aosta	298	1238	2915	156	22	47
MI	Lombardia	503	1897	3188	219	31	66
BZ	Trentino Alto Adige	58	185	318	23	3	7
PD	Veneto	256	929	1609	109	16	33
TS	Friuli Venezia-Giulia	58	249	559	31	4	9
PR	Emilia-Romagna	184	813	1845	100	14	30
FI e SI	Toscana, Marche	260	1019	2283	128	18	38
PG	Umbria	45	165	370	21	3	6
RM e ISS	Lazio, Abruzzo, Molise	432	1405	2390	170	24	51
NA	Campania	498	1133	1520	147	21	44
LE	Puglia, Basilicata, Calabria	557	1347	2063	175	25	53
PA	Sicilia	409	991	1603	131	18	39
SS	Sardegna	122	344	495	42	6	13
	Totale	3680	11715	21155	1450	203	435

Allegato 3. Attività dei Laboratori di 2° livello della rete per la sorveglianza virologica dell'influenza

Laboratori proposti:

- Centro Nazionale per l'Influenza, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità
- CIRI-IV, Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Genova

Attività di caratterizzazione sierologica e molecolare dei virus influenzali circolanti

- Rilevamento e tipizzazione mediante tecniche di biologia molecolare dei virus influenzali umani (A/H1N1, A/H3N2, B) o di origine aviaria che abbiano compiuto il salto di specie (A/H5N1, A/H7N3, A/H7N7, A/H9N2)
- Isolamento mediante coltura in substrato cellulare e rilevamento mediante HA test e IF test dei virus influenzali umani (A/H1N1, A/H3N2, B) o di origine aviaria che abbiano compiuto il salto di specie (A/H5N1, A/H7N3, A/H7N7, A/H9N2)
- Caratterizzazione sierologica mediante HI test e microneutralizzazione
- Caratterizzazione molecolare delle glicoproteine di superficie
- Livello di sicurezza BSL3
- Caratterizzazione molecolare delle proteine strutturali e non-strutturali

Attività di implementazione della diagnostica delle infezioni virali delle vie aeree superiori ed inferiori, con particolare attenzione alle forme atipiche di polmonite

- Rilevamento, tipizzazione e caratterizzazione mediante tecniche di biologia molecolare, ricerca antigenica o anticorpale di: *Virus Influenzali umani e aviari**, *Virus Respiratorio Sinciziale*, *Adenovirus*, *Virus Parainfluenzali*, *Coronavirus (incluso SARS-CoV)*, *Metapneumovirus*
- Isolamento mediante coltura in substrato cellulare e rilevamento mediante HA test e IF test dei soprariportati microrganismi
- Algoritmo a due step per la diagnosi dei soprariportati microrganismi
- Risposta entro 48-72 ore
- Livello di sicurezza BSL3

*Virus influenzali aviari che abbiano compiuto il salto di specie