

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

CENTRO NAZIONALE OMS PER L'INFLUENZA
Sorveglianza virologica dell'influenza
in Italia (stagione 2005-2006)

A cura di
Isabella Donatelli, Simona Puzelli, Marzia Facchini, Chiara Affinito,
Angela Di Martino, Laura Calzoletti, Concetta Fabiani e Tiziana Grisetti

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
06/25

Istituto Superiore di Sanità

Centro Nazionale Influenza. Sorveglianza virologica dell'influenza in Italia (stagione 2005-2006).

A cura di Isabella Donatelli, Simona Puzelli, Marzia Facchini, Chiara Affinito, Angela Di Martino, Laura Calzoletti, Concetta Fabiani e Tiziana Grisetti
2006, v, 26 p. Rapporti ISTISAN 06/25

L'influenza è una malattia respiratoria acuta, diffusa su scala mondiale, che costituisce un serio problema sia in termini di mortalità che di morbilità. La vaccinazione è l'arma più efficace contro l'influenza. A causa dell'alta frequenza di mutazioni che si verificano nei virus influenzali, è necessario modificare ogni anno la composizione del vaccino, adattandolo alle variazioni antigeniche del virus. A tal fine, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha predisposto Centri di osservazione e di rilevamento per l'influenza in tutto il mondo che, collaborando con i quattro Centri di Riferimento OMS (Atlanta, Londra, Melbourne, Tokyo), permettono di identificare tempestivamente le varianti virali emergenti e di valutare, dal punto di vista sia antigenico che molecolare, il grado di variazione acquisita dai virus influenzali circolanti nella popolazione. Nel presente rapporto vengono riportati i risultati della sorveglianza virologica condotta dal Centro Nazionale Influenza (National Influenza Centre, NIC), relativi alla stagione influenzale 2005-2006, e i dati presentati al meeting annuale dell'OMS, che hanno portato alla definizione della composizione del vaccino per la stagione 2006-2007.

Parole chiave: Virus influenzale, Vaccinazione, Italia, OMS

Istituto Superiore di Sanità

National Influenza Centre. Virological influenza surveillance in Italy (2005-2006 season).

Edited by Isabella Donatelli, Simona Puzelli, Marzia Facchini, Chiara Affinito, Angela Di Martino, Laura Calzoletti, Concetta Fabiani and Tiziana Grisetti
2006, v, 26 p. Rapporti ISTISAN 06/25 (in Italian)

Influenza is an acute respiratory illness. It occurs all over the world and causes considerable morbidity and mortality every year. Vaccination is one of the main influenza prevention methods. Due to the constantly changing composition of the circulating influenza viruses, the influenza vaccine must be modified each year to match the current viruses. For this reason, WHO created an international network of National Influenza Centres working together with the four WHO Collaborating Centres for Reference and Research on Influenza (Atlanta, London, Melbourne, Tokyo). This network helps to monitor influenza activity all over the world, it allows the timely identification of variant emerging in the interpandemic period and provides an antigenic and molecular evaluation of the variability degree of the influenza viruses circulating world-wide. This report shows the results of the virological surveillance carried out by the National Influenza Centre (NIC), during the 2005-2006 influenza season. The report also describes a summary of data discussed during the WHO February meeting, which led to the definition of the influenza vaccine composition for 2006-2007 season.

Key words: Influenza virus, Vaccination, Italy, WHO

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

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

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

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

© Istituto Superiore di Sanità 2006

La sorveglianza virologica dell'influenza si è avvalsa della collaborazione di:

a) Laboratori periferici che collaborano con l'ISS, loro referenti e collaboratori

Università di Genova

Dipartimento di Scienze della Salute, Sezione di Igiene e Medicina Preventiva: *Pietro Crovari*

Università di Milano

Dipartimento di Sanità Pubblica-Microbiologia-Virologia, Sezione di Virologia applicata alla Sanità Pubblica: *Fabrizio Pregliasco, Elisabetta Tanzi*

Università di Trieste

Unità Clinica Operativa di Igiene e Medicina Preventiva, Dipartimento Scienze di Medicina Pubblica: *Cesare Campello, Pierlanfranco D'Agaro*

Università di Padova

Dipartimento Microbiologia, Virologia e Biotecnologie Mediche: *Giorgio Palù*

Università di Parma

Dipartimento di Sanità Pubblica, Sezione di Igiene: *Marialuisa Tanzi*

Università di Firenze

Dipartimento di Igiene e Sanità Pubblica, Laboratorio di Virologia: *Alberta Azzi*

Università di Siena

Dipartimento di Fisiopatologia, Medicina Sperimentale e Sanità Pubblica: *Emanuele Montomoli*

Università di Perugia

Dipartimento Specialità Medico Chirurgiche e Sanità Pubblica, Laboratorio di Virologia: *A. Maria Iorio*

Università Cattolica "S. Cuore" di Roma

Istituto di Microbiologia: *Anna Rossi*

Università di Napoli

Dipartimento di Scienze Mediche Preventive-Sezione di Igiene: *Maria Triassi, Gabriella Ribera*

Università di Lecce

Dipartimento di Scienze e Tecnologia Biologiche e Ambientali (DiSTeBA): *Antonella De Donno*

Università di Sassari

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione Microbiologia Sperimentale e Clinica: *Antonina Dolei*

Università di Palermo

Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Sezione di Igiene: *Nino Romano*

Azienda Sanitaria ASL Centro Sud, Bolzano

Laboratorio Interaziendale di Microbiologia e Virologia, Bolzano: *Clara Larcher, Patrizia Rossi*

Ospedale "Amedeo di Savoia", Torino

Laboratorio di Virologia: *Francesca Piro*

L'attività dei Laboratori sopraelencati rientra nell'ambito dell'Accordo di collaborazione tra Ministero della Salute e Istituto Superiore di Sanità: "Potenziamento della rete di sorveglianza virologica dell'influenza umana e di alcuni laboratori del network per l'implementazione della diagnostica delle polmoniti virali". Il coordinamento e il ritorno delle informazioni sull'andamento nazionale dell'influenza sono stati curati da: Anna Prete ed Elvira Rizzuto della Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria del Ministero della Salute, Ufficio V Malattie Infettive e Profilassi Internazionale.

b) Medici sentinella

Medici di medicina generale e pediatri di libera scelta che hanno partecipato alla sorveglianza virologica dell'influenza, suddivisi per regione di appartenenza.

Campania

Albano Leontina, Amoroso Riccardo, Antignani Rachele, Baracchini Paolo, Barile Carmine, Beluiso Giuseppe, Bernardi Giuseppe, Boncompagni Salvatore, Bove Emilio, Bove Filippo, Bufano Carmine, Buono Giuseppe, Buonuomo Giuseppe, Campa Paola Maria Cinzia, Carannante Maria, Carpentieri Rodolfo, Carpino Antonio, Casaburi Marcello, Castaldo Gennaro, Castaldo Luigi, Catalano Antonio, Causa Pasquale, Cecere Aniello, Ciccarelli Mario, Ciuffi Luigi, Coppola Giuseppe, Crescenzo Antonio, Cutillo Giovanni Antonio, De Prosperis Antonio, Di Feo Antonio, Di Girolamo Pietro, Di Lorenzo Raffaele, Di Maria Giovanni, Di Mezza Giuseppe, Di Tota Gennaro, Ercolini Paola, Ercolino Luigi, Esposito Maria, Esposito Tommaso, Faiella Edoardo, Fardello Ciro, Fasano Antonietta, Fasolino Antonio, Faticati Domenico, Federico Anna Maria, Fischetti Antonio, Fontanella Angiola, Fusco Antonio, Gallo Patrizia, Genovese Lucio, Gianpaolo Carlo, Graziano Liberatore, Iannone Agnese, Imperatore Antonio, Izzo Antonio, Kurtam Shafik, Lardo Gerardo, Lavogna Filomeno, Lepore Mario, Liguori Mario, Lo Buono Maria Lucia, Losco Raffaele, Lucani Vincenzo, Mariano Salvatore, Marigliano Assunta Edna, Martello Antonio, Martini Domenico Antonio, Mastrocinque Francesco, Mastrolia Giulio, Meola Pietro, Merolla Ennio, Montefusco Alfredo, Montefusco Silvana, Montera Carmine, Napodamo Bartolomeo, Nardi Andrea, Paludi Giuseppe, Pascarella Giuseppe, Peluso Angelo, Pezzullo Vincenzo, Piccolo Carlo, Pulcino Lupo Giacomo, Rea Luciana, Renna Alessandro, Renzi Ada, Rimedio Concettina Carmen, Rizzo Maria, Rizzolo Giovanni, Romano Giulio, Romano Salvatore, Saccardi Luigi, Salvati Piera, Sannino Antonio, Santoro Luigi, Sassi Roberto, Savignano Lucia Carla, Scilla Alfonso, Scimmia Giuseppe, Scotto D'antuono Antonio, Serio Rosa, Servodidio Carmela, Simone Crescenzo, Smaldone Giovanna, Soverina Patrizio, Spallo Antonio, Tarallo Nicola, Tetrocchia Mariolina, Tommassielli Giuseppina, Vallefucio Gianna Maria, Varriale Antonio, Vitello Giuseppe, Volpe Augusto, Volpe Giuseppina.

Emilia Romagna

Acerbi Maria Angela, Agnoletti Isabella, Artusi Cristiano, Azzolini Luigi, Bacchi Riccardo, Balducci Alessandra, Barchi Patrizio, Bassi Beatrice, Bernardi Ermen, Bertozzi Carla, Bettuzzi Davide, Biondi Sanzio, Bordoni Pierangelo, Boschini Cesare, Caroli Eugenio, Carpedelli Annamaria, Castaldini Enzo, Centenaro Giovanni Maria, Colombi Cristina, Conti Angelo, Contini Maurizio, Cremonini Pierluigi, Dall'agata Liviana, Dall'osso Darfo, Dall'osso Tiziano, Delfini Enrico, Fabbri Della Faggiola Duccio, Faccani Gino, Ferrari Maria Luisa, Frisoni Ilaria, Gaggioli Licia, Galloni Claudio, Giovannini Anna, Gregori Giuseppe, Guerra Andrea, Macrì Luigi, Maestri Paolo, Masini Milena, Mazza Tullio Valerio, Mazzetti Gaito Piero, Melandri Tarcisio, Melchionda Michele, Meravigli Vincenzo, Miserotti Giuseppe, Monari Gian Luigi, Monari Maria Teresa, Montanari Giuseppe, Montori Claudio, Morini Massimo, Mussati Pier Paolo, Paltrinieri Angela, Patierno Marco, Peveri Vittorio, Pignataro Raffaele, Randi Alberto, Rasconi Giancarlo, Reboli Pietro, Reggiani Lamberto, Ripa Maria, Sacchetti Roberto, Salafrica Michele, Savena Marcello, Scagliarini Alessandra, Sironi Marco, Sivieri Gian Pietro, Stazzoni Antonella, Surcinelli Erasmo, Tancredi Massimo, Tesini Novar, Tondi Lidia Erminia, Tonioli Susanna, Tonti Pierluigi, Tosetti Cesare, Trombini Rosalia, Turchetti Maria Elisabetta, Valpiani Armando, Vescovi Maurizio, Viaroli Mario, Vicini Maurizio, Zingoni Stefano.

Lazio

Amatucci Stanislao, Amoroso Giuseppe, Azzolini Micheline, Bernardini Betti Luca, Bevilacqua Stefano, Borelli Massimo, Bosco Roberto, Candiloro Enrico, Carnevale Flora Rita, Caroselli Antonio, Ciracò Maria del Carmen, Cirelli A. Vittoria, Colantonio Roberto, Colistra Claudio, Corongiu Maria, Costantini Anna Maria, D'Annibale Francesco, De Luca Giuseppe, Di Mauro Caterina, Donato Giuseppe, D'Uva Mario, Finzi Massimo, Fiorillo Alfonso, Frittaiion Fabio,

Galieti Luigi, Lanni Roberta, Mangoni Angelo, Mangullo Angelo, Marchionne Maurizio, Maretto Giancarlo, Marri Gallieno, Milani Luigi, Morano Donatella, Moricone Antonio Luigi, Muzzioli Giovanni Luigi, Natili Tommaso, Nobile Antonio, Nuccetelli Danilo, Pace Marina, Palma Fabrizio, Parrotta Rosa Maria, Piazzai Loredana, Pietricola Elio, Pizzutelli Caterina, Pontone Gravaldi Serafino, Procopio Caterina, Ranucci Alessandro Alberto, Reali Laura, Santodonato Claudio, Scholl Maurizio, Scolamiero Liliana, Scorletti Antonio, Serafini Maria Angela, Sisti Tiziana, Valente Michele, Verginelli Antonio, Vignolini Sandro, Zito Calogero, Zoino Fernando.

Piemonte

Acchini Franco, Alpa Aldo, Astegiano Giancarlo, Baldi Carla, Bellia Francesco, Bellomo Gabriele, Beltrami Silvio, Boccalatte Francesco, Boella Giovanni, Bono Gianpaolo, Braschi Stefano Lorenzo, Bruno Enrico, Bulgarelli Adriano, Caposieno Matteo, Carafa Renato, Carena Laura, Ciccarella Vincenzo, Colino Domenico, Corbetta Luigi, D'Alessandro Enrico, De Matteis Attilio, Di Stefano Corrado, Donna Matilisa, Erbetta Monica, Falloni Maurizio, Fassone Ruggero, Gallo Silvano, Gambuzza Guglielmo, Garione Ivana, Gazzaniga Pietro, Gazzola Gian Maria, Gibilisco Antonio, Giustetto Guido, Lo Monaco Claudio, Luotti Diego, Macchia Antonio, Mantovan Mauro, Miglietta Massimo, Mozzone Aldo, Muratore Celsa, Nejrotti Mario, Orlando Tristano, Petrulli Carmela, Pollastro Claudio, Ponzano Silvia, Porta Alberto, Prete Alberto, Quaglia Pasquale, Sacco Enrico, Santoro Maria Ausilia, Seghetti Giovanni, Siciliano Salvatore, Spiezio Ciro, Talarico Francesco, Titta Giulio, Uberti Marzio, Uglietti Pacifico, Valenti Marco, Valpreda Andrea, Vigone Pierantonio, Vista Nicola, Zaninetti Piero, Zuccaro Clorinda.

Provincia autonoma di Bolzano

Agostini Hugo, Bandierini Alberto, Clementi Walther, Hopfgartner Albert, Iseppi Rosanna, Mair Ewald, Pedevilla Emanuela, Piccoliori Giuliano, Von Lutterotti J. Andreas, Von Sontagh Peter, Widmann Klaus.

Sardegna

Argiolas Lino, Atzeni Luigi, Boccone Nicolfranco, Caliendo Rosa Maria, Cera Melania, Cuccu Angelo, Lisci Luigi, Lixia Giuseppe, Masala Paola, Monni Piero Domenico, Murgia Rosalba, Pais Antonio, Petti Stefano, Pinna Antonio, Senes Antonio, Serra Anna Rita, Zara Pierangelo.

Medici non sentinella:

Casula Pietrina, Tilocca Franca, Sotgia Aldo Vittorio.

Toscana

Bellotti Anna, Bussotti Alessandro, Ermini Anna Maria, Guarducci Massimo, Miniati Stefano, Pattarino Eugenio, Pescitelli Alessandro, Rafanelli Paola, Vitali Rosati Giovanni.

INDICE

Introduzione	1
Dati del Centro Nazionale Influenza in Italia	3
Sorveglianza virologica	3
Organizzazione e strutture coinvolte	3
Metodi impiegati nella diagnosi virologica.....	4
Analisi di sequenziamento nucleotidico e filogenesi.....	4
Risultati delle indagini virologiche in Italia	5
Caratterizzazione sierologica e molecolare degli isolati virali.....	8
Sottotipo A/H1N1	8
Sottotipo A/H3N2	9
Tipo B.....	11
Circolazione dei virus influenzali in Europa e nel mondo	12
Isolamenti virali in Europa	12
Isolamenti virali nel mondo	12
Sottotipo A/H3N2	13
Sottotipo A/H1N1	13
Tipo B.....	13
Raccomandazioni dell'OMS per la vaccinazione antinfluenzale 2006-2007	14
Composizione del vaccino per la stagione 2006-2007	14
Bibliografia	15
Appendice	
Protocollo operativo (stagione 2005-2006) del sistema di sorveglianza FLU-ISS: estratto della parte virologica.....	18

INTRODUZIONE

L'influenza, malattia virale respiratoria acuta estremamente contagiosa, rappresenta a tutt'oggi una delle infezioni più diffuse su scala mondiale, ed è responsabile nell'uomo di manifestazioni cliniche di diversa entità. Queste possono variare dall'assenza di sintomatologia alla polmonite mortale.

Alla base della epidemiologia influenzale vi è la marcata tendenza di tutti i virus influenzali ad acquisire cambiamenti nelle proteine di superficie (*drift* antigenico) che portano alla emergenza di nuove varianti virali verso le quali la maggior parte della popolazione risulta immunologicamente non protetta.

A differenza di altre infezioni che interessano l'apparato respiratorio, l'influenza è una malattia tipicamente stagionale che, nell'emisfero occidentale, si verifica durante il periodo invernale, quando cioè l'aria fredda diventa veicolo ideale per la trasmissione del virus, favorita anche da "scambi respiratori" tra persone in ambienti chiusi. L'infezione del virus influenzale avviene inizialmente a carico di alcune cellule dell' "albero respiratorio" (faringe, laringe, trachea, bronchi), dove il virus si riproduce in 4-6 ore. Dopo questo breve periodo, l'infezione si diffonde più ampiamente durante il successivo periodo di "incubazione", che può essere compreso tra 18 e 72 ore, in relazione alla quantità di virus infettante e alla capacità di difesa dell'organismo (reazioni anticorpali del sistema immunitario).

All'influenza sono associate serie complicanze, qualora si verifichino superinfezioni batteriche. Essa, inoltre, è responsabile di un eccesso di mortalità nelle categorie di soggetti maggiormente a rischio, come ad esempio negli anziani o nei soggetti in cui erano già preesistenti condizioni patologiche predisponenti.

Essendo l'influenza una malattia di origine virale, l'uso degli antibiotici risulta inefficace nel combatterla (1-18); tali farmaci, tuttavia, devono essere impiegati se si presentano complicazioni batteriche. Attualmente sono disponibili farmaci antivirali che, se assunti tempestivamente, bloccano la diffusione del virus da una cellula all'altra dell'organismo e attenuano i sintomi rendendo più breve il decorso della malattia.

La principale misura di prevenzione, comunque, è rappresentata dalla vaccinazione. La vaccinazione antinfluenzale, soprattutto nelle persone anziane, ma anche nelle persone di tutte le età che desiderano prevenire la malattia e contribuire all'interruzione della catena epidemiologica dell'infezione, determina sostanziali riduzioni della morbosità.

Annualmente, i ceppi utilizzati per la composizione del vaccino vengono scelti dall'Organizzazione Mondiale per la Sanità (OMS) sulla base delle segnalazioni provenienti dai sistemi di sorveglianza di tutto il mondo.

L'OMS ha infatti predisposto, fin dal 1948, una rete di Centri di osservazione e di rilevamento per l'influenza, il cui scopo è di identificare precocemente le nuove varianti virali circolanti al fine di intraprendere misure appropriate e tempestive in risposta ad epidemie influenzali di una certa entità.

L'aggiornamento annuale del vaccino antinfluenzale, dunque, rappresenta l'obiettivo prioritario del Programma Mondiale di Sorveglianza dell'Influenza, coordinato dall'OMS attraverso i suoi 4 Centri internazionali di riferimento (Atlanta, Londra, Melbourne, Tokyo).

Ogni anno, nel mese di febbraio, a Ginevra si svolge un incontro internazionale organizzato dall'OMS, nell'ambito del quale viene fissata, sulla base delle informazioni epidemiologiche, virologiche e sierologiche raccolte dai Centri nazionali, la composizione del vaccino antinfluenzale.

La rete di sorveglianza virologica ed epidemiologica, in Italia, è costituita dal Ministero della Salute, dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), dal Centro Interuniversitario di Ricerca sull'Influenza (CIRI), dai Medici di Base e dai Pediatri. Principale obiettivo è quello di fornire dati utili a ridurre l'incidenza dell'influenza, a monitorare l'andamento dell'epidemia e a verificare l'efficacia della campagna vaccinale.

In Italia, specifiche campagne di vaccinazione per l'immunoprofilassi vaccinale vengono annualmente promosse dal Ministero della Salute e dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

La vaccinazione è particolarmente raccomandata nei soggetti di ogni età con malattie respiratorie, cardiache o metaboliche e negli anziani con più di 65 anni (19).

Vengono di seguito riportati i principali risultati della attività di sorveglianza virologica della stagione 2005/2006 e le conseguenti raccomandazioni relative alla nuova composizione vaccinale per la stagione 2006/07 nell'emisfero settentrionale.

DATI DEL CENTRO NAZIONALE INFLUENZA IN ITALIA

In questa sezione sono riassunti i dati relativi al monitoraggio della circolazione dei virus influenzali in Italia durante il periodo compreso tra la 46a settimana del 2005 (14-20 novembre) e la 17a settimana del 2006 (24-30 aprile). Questa attività viene svolta nell'ambito del sistema integrato di sorveglianza virologica e clinico/epidemiologica, attivo in Italia dal 1997. Le modalità di svolgimento della sorveglianza sancite dalla Conferenza Stato-Regioni (seduta del 28 settembre 2000) vengono aggiornate annualmente. La sorveglianza epidemiologica e virologica dell'influenza viene svolta attraverso la collaborazione delle regioni, dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e del Centro Interuniversitario per la Ricerca sull'Influenza (CIRI), dei Medici di medicina generale e dei Pediatri di libera scelta, dei Laboratori Universitari di riferimento e viene coordinata dal Ministero della Salute.

Per quanto riguarda la sorveglianza virologica, il Reparto di Malattie Virali e Vaccini inattivati del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'ISS, presso cui ha sede il Centro Nazionale Influenza (*National Influenza Centre*, NIC), si è avvalso della collaborazione di una rete di 15 Laboratori.

Nel presente rapporto vengono illustrati i risultati della sorveglianza virologica condotta dal NIC, relativi alla stagione influenzale 2005-2006.

In Appendice viene fornito l'estratto del Protocollo operativo riguardante la parte virologica del sistema di sorveglianza FLU-ISS.

Sorveglianza virologica

Organizzazione e strutture coinvolte

La rete dei Laboratori periferici che collaborano con l'ISS e che partecipa alla sorveglianza virologica dell'influenza è così composta:

- Università di Genova: Dipartimento di Scienze della Salute;
- Università di Milano: Istituto di Virologia;
- Università di Trieste: Istituto di Igiene e Medicina Preventiva;
- Università di Padova: Dipartimento di Microbiologia, Virologia e Biotecnologie Mediche;
- Università di Parma: Dipartimento di Sanità Pubblica, Sezione di Igiene;
- Università di Firenze: Dipartimento di Sanità Pubblica;
- Università di Siena: Istituto di Igiene, Laboratorio di Epidemiologia molecolare e Virologia;
- Università di Perugia: Dipartimento di Igiene e Sanità Pubblica, Laboratorio Virologia;
- Università Cattolica "S. Cuore", Roma: Istituto di Microbiologia;
- Università di Napoli "Federico II": Dipartimento di Scienze Mediche Preventive, Sezione di Igiene;
- Università di Lecce: Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali;
- Università di Sassari: Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica;
- Università degli Studi di Palermo: Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Sezione di Igiene;
- Azienda Sanitaria ASL Centro Sud, Bolzano: Laboratorio di Microbiologia e Virologia;
- Ospedale Amedeo di Savoia di Torino: Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio, Laboratorio Virologia.

Metodi impiegati nella diagnosi virologica

Le indagini virologiche utili per la ricerca del virus influenzale sono state effettuate su campioni clinici rappresentati da tamponi faringei prelevati durante la fase acuta dell'infezione, generalmente caratterizzata da presenza di febbre elevata.

La raccolta dei tamponi faringei è stata eseguita utilizzando un apposito kit diagnostico fornito dall'ISS.

La diagnosi è stata eseguita mediante tecniche tradizionali, quali l'isolamento del virus su opportuni substrati cellulari (colture cellulari di rene di cane: *Madin-Darby Canine Kidney Cells*, MDCK) (20-22), particolarmente sensibili alla crescita del virus influenzale, e l'inoculo nella cavità amniotica e/o allantoidea di uova embrionate di pollo (23-24), sistema essenziale per avere a disposizione virus vivo per la preparazione del vaccino.

La presenza di virus è stata evidenziata mediante la ricerca di attività emagglutinante nel liquido colturale soprastante o nel liquido allantoideo delle uova embrionate.

Per la tipizzazione e/o sottotipizzazione dell'agente emagglutinante isolato sono stati utilizzati metodi di identificazione sierologica, come il test di inibizione dell'emagglutinazione (*Haemagglutination Inhibition*, HI) (25-27), utilizzando antisieri policlonali prodotti in pollo e/o furetto presso l'ISS, qui di seguito elencati:

- antisiero A/California/7/04 e A/Wisconsin/67/05;
- antisiero A/New Caledonia/20/99;
- antisiero B/Malaysia/2506/04 e B/Jiangsu/10/03.

Per l'identificazione di componenti virali (nucleoproteina NP e proteina di superficie emagglutinina HA) direttamente nei campioni clinici, si è fatto ricorso a metodi di diagnosi rapida, quali reazioni polimerasiche a catena di PCR di tipo "multiplex", precedute da trascrizione inversa (RT-PCR) (28-36), e a saggi immunoenzimatici su membrana, quali il "Directigen FLU A+B" (37-39).

La RT-PCR è stata condotta mediante l'utilizzo di coppie di primers dirette verso regioni altamente conservate delle proteine virali interne tipo-specifiche (es. la nucleoproteina-NP dei virus influenzali) e di superficie sottotipo-specifiche (es. l'emagglutinina-HA dei virus influenzali), permettendo in tal modo, oltre alla diagnosi di influenza, anche la tipizzazione e/o sottotipizzazione del virus identificato.

Analisi di sequenziamento nucleotidico e filogenesi

Gli amplificati ottenuti mediante la reazione di RT-PCR sono stati purificati e utilizzati nella successiva fase di sequenziamento in cui si è fatto uso del kit "Big Dye Terminator Cycle Sequencing" (Applied Biosystems).

Le analisi e l'allineamento delle sequenze sono state eseguite mediante il programma BIOEDIT 7.0.3. (40-41).

Le analisi filogenetiche relative al dominio HA1 della HA sono state effettuate utilizzando il pacchetto software MEGA2, versione 2.1 e confrontando le sequenze dei virus isolati con quelle già presenti nelle banche dati specifiche (GenBank).

La costruzione dell'albero filogenetico è stata effettuata con il metodo Kimura-2 e con l'algoritmo Neighbor-Joining (42-46).

Risultati delle indagini virologiche in Italia

Nel periodo compreso tra la 46a settimana del 2005 e la 17a settimana del 2006 sono stati analizzati complessivamente 2688 campioni, di cui 297 (11%) sono risultati positivi (Tabella 1).

Tabella 1. Virus influenzali isolati e/o identificati in Italia nella stagione 2005-2006, su un totale di 2688 campioni clinici raccolti (dati aggiornati al 4 maggio 2006)

Tipizzati	Non sottotipizzati	Sottotipizzati	Varianti antigeniche prevalenti
A 228 (77%)	76 (33%)	H3N2 41 (18%) H1N1 111 (49%)	A/California/7/04 A/Wisconsin/67/05 A/New Caledonia/20/99
B 69 (23%)			B/Malaysia/2506/04 (B/Victoria/2/87-like) B/Shanghai/361/02 (B/Yamagata/16/88-like)

La stagione influenzale 2005-2006 è stata caratterizzata da una circolazione di virus influenzali piuttosto modesta. Solo l'11% dei campioni clinici raccolti e analizzati dall'ISS e dal CIRI, sono risultati positivi per influenza.

Il periodo di massima raccolta dei campioni è stato registrato tra la 3^a e la 10^a settimana 2006 e i primi isolamenti virali, riconducibili a ceppi A/H3N2, sono stati osservati in pazienti ammalati nel corso delle prime settimane del 2006. Successivamente, si è osservata una contemporanea circolazione di ceppi A/H1, A/H3 e B. Predominanti, rispetto ai virus di tipo B, sono stati i virus di tipo A (77%), nel cui ambito sono stati prevalentemente isolati virus appartenenti al sottotipo A/H1 (49%).

La distribuzione settimanale dei campioni positivi durante la stagione influenzale 2005-2006 e quella geografica della totalità dei virus identificati vengono mostrate, rispettivamente, nelle Figure 1 e 2.

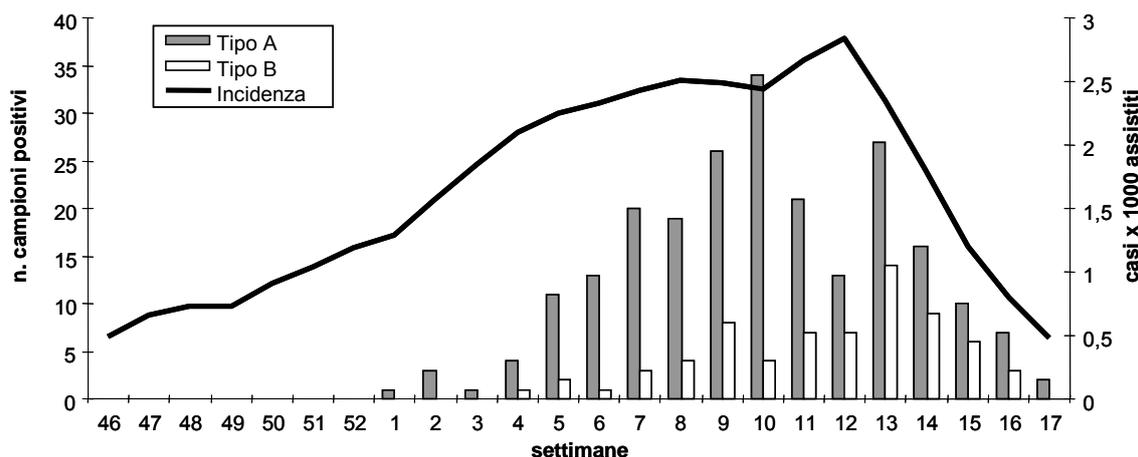


Figura 1. Distribuzione settimanale dei campioni positivi durante la stagione influenzale 2005-2006 (dati aggiornati alla 17^a settimana di sorveglianza)

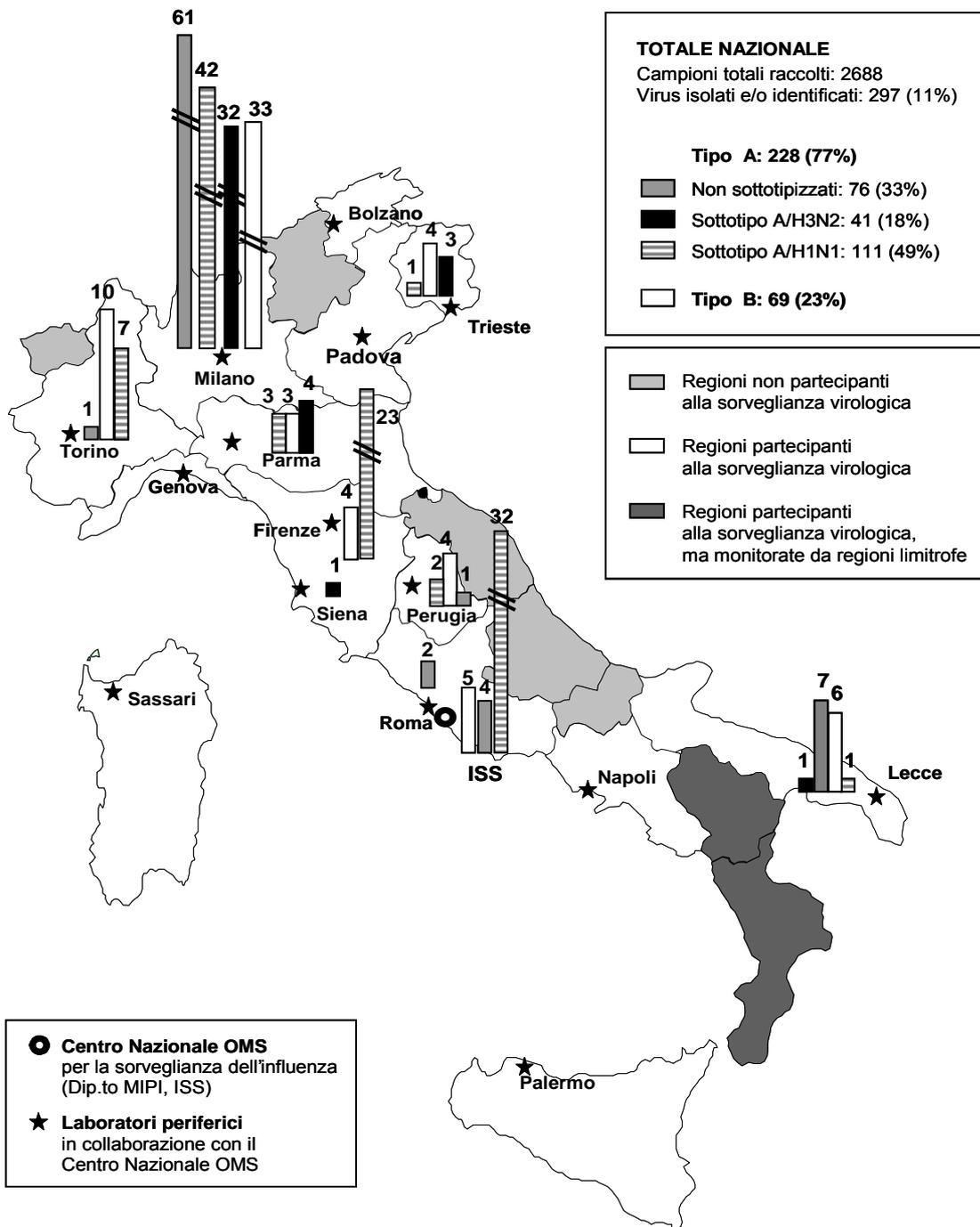


Figura 2. Distribuzione geografica dei ceppi virali identificati sull'intero territorio nazionale (dati aggiornati alla 17^a settimana di sorveglianza)

Gruppi di età

La distribuzione per classi di età dei pazienti risultati positivi alla diagnosi di laboratorio è mostrata in Figura 3.

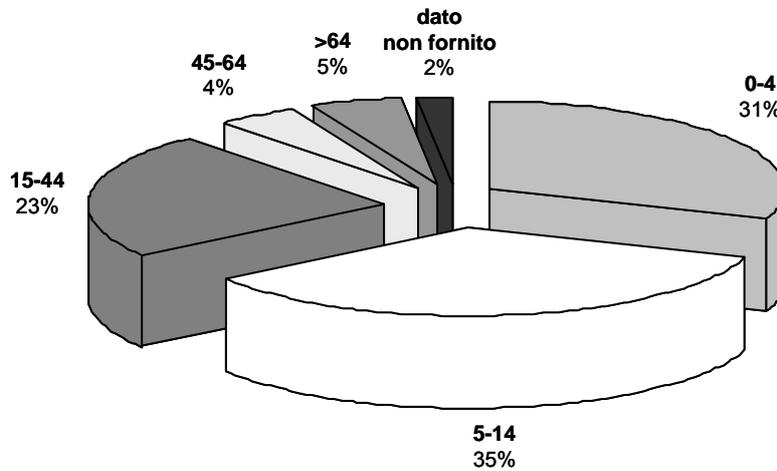


Figura 3. Distribuzione per classi di età dei soggetti positivi alla diagnosi di laboratorio

Prevalentemente colpiti sono risultati i soggetti di età compresa tra 0 e 14 anni (percentuale totale pari al 66%), mentre nei campioni provenienti da pazienti appartenenti alla classe di età 15-44 è stata registrata una positività del 23%. Solo il 4% e il 5% di positività ha invece interessato, rispettivamente, la classe di età 45-64 e i pazienti con più di 64 anni. Nel 2% dei casi il dato relativo all'età non è stato fornito.

La Figura 4 riporta la distribuzione per classi di età dei campioni positivi.

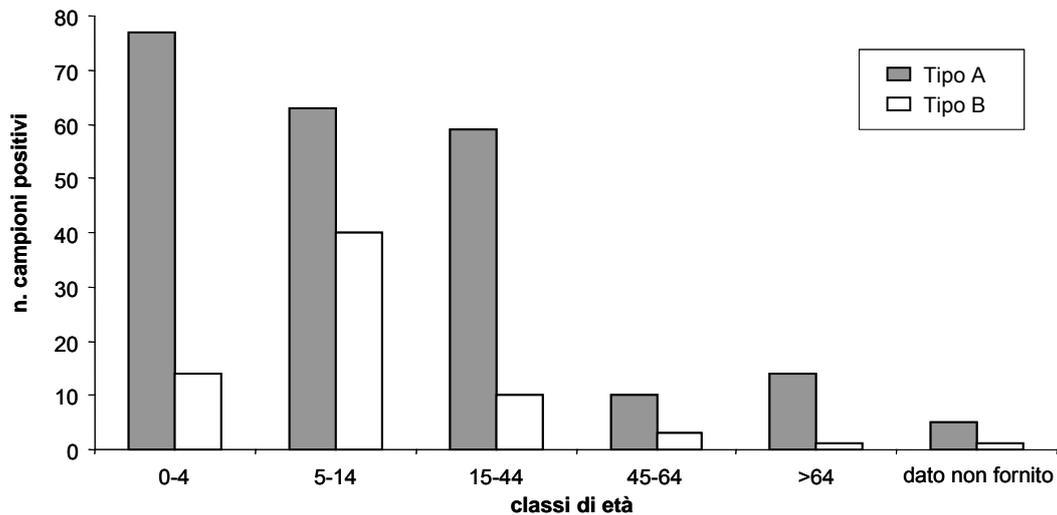


Figura 4. Distribuzione per classi di età dei campioni positivi

Caratterizzazione sierologica e molecolare degli isolati virali

Le Tabelle 2-5 riportano i risultati dell'analisi sierologica eseguita, mediante il test classico HI, su alcuni ceppi virali isolati durante la stagione 2005-2006 in Italia.

Sottotipo A/H1N1

La caratterizzazione antigenica ha evidenziato una sostanziale omologia dei ceppi A/H1N1 circolanti con il ceppo vaccinale A/New Caledonia/20/99 e con isolati virali recenti, quali A/Thessaloniki/24/05, antigenicamente indistinguibili dal ceppo A/New Caledonia/20/99 (Tabella 10).

Tabella 2. A/H1N1: caratterizzazione antigenica di virus influenzali isolati in Italia mediante test HI

Virus	Antisieri prodotti in furetto							Data prelievo	Età (anni)
	A/Beij 262/96	A/NC 20/99	A/Eg 96/02	A/Neth 128/04	A/The 24/05	A/HK 2367/ 04	A/Eg 39/05		
Data analisi: 20/4/06									
A/Beijing/262/96 ^a	640	640	160	320	320	640	320		
A/NewCaledonia/20/99 ^b	80	640	320	320	320	640	1280		
A/Egypt/96/02 ^c	80	320	320	320	320	320	640		
A/ Netherlands/128/04 ^d	160	640	320	1280	640	1280	1280		
A/Thessaloniki/24/05 ^e	160	640	320	1280	640	1280	1280		
A/Hong Kong/2637/04 ^f	40	320	80	320	160	640	640		
A/Egypt/39/05 ^g	160	640	320	640	640	1280	1280		
A/Firenze/1/2006	80	640	160	1280	1280	1280	2560	gen.06	66
A/Firenze/2/2006	80	640	160	1280	1280	1280	1280	feb.06	78
A/Firenze/3/2006	80	640	160	2560	1280	2560	1280	feb.06	25
Data analisi: 30/5/06									
A/Beijing/262/96 ^a	640	640	160	320	320	640	320		
A/NewCaledonia/20/99 ^b	160	1280	320	320	640	1280	1280		
A/Egypt/96/02 ^c	160	640	320	320	320	640	320		
A/ Netherlands/128/04 ^d	160	1280	320	1280	1280	1280	640		
A/Thessaloniki/24/05 ^e	160	640	160	1280	2560	1280	1280		
A/Hong Kong/2637/04 ^f	80	320	80	320	640	640	640		
A/Egypt/39/05 ^g	160	1280	160	640	640	640	1280		
A/Firenze/4/2006	160	640	320	2560	1280	1280	1280	feb.06	1
A/Firenze/5/2006	160	1280	320	2560	2560	1280	1280	feb.06	68
A/Firenze/6/2006	160	640	320	2560	2560	1280	1280	feb.06	46
A/Firenze/7/2006	160	640	160	2560	1280	1280	1280	feb.06	75
A/Firenze/8/2006	80	640	160	1280	640	640	640	feb.06	40
A/Firenze/9/2006	160	640	160	1280	1280	1280	640	feb.06	10
A/Firenze/12/2006	80	640	160	640	640	640	640	feb.06	8
A/Parma/3/2006	160	640	160	640	640	640	640	mar.06	6
A/Parma/4/2006	160	640	160	640	640	640	640	mar.06	4

segue

continua

Virus	Antisieri prodotti in furetto						Data prelievo	Età (anni)
	A/Beij 262/96	A/NC 20/99	A/Eg 96/02	A/Neth 128/04	A/The 24/05	A/HK 2367/ 04		
Data analisi: 1/6/06								
A/Beijing/262/96 ^a	640	320	320	160	320	320	320	
A/NewCaledonia/20/99 ^b	160	320	320	160	320	640	1280	
A/Egypt/96/02 ^c	80	320	320	160	160	320	320	
A/Netherlands/128/04 ^d	160	320	320	640	640	1280	1280	
A/Thessaloniki/24/05 ^e	160	320	320	640	640	1280	1280	
A/Hong Kong/2637/04 ^f	80	160	160	160	160	640	640	
A/Egypt/39/05 ^g	160	320	320	320	320	1280	1280	
A/Napoli/1/2006	80	160	640	320	320	640	320	feb.06 38
A/Napoli/2/2006	80	160	160	640	640	640	640	feb.06 22
A/Napoli/4/2006	80	320	320	640	640	1280	640	feb.06 13
A/Napoli/5/2006	80	160	640	320	320	640	320	feb.06 10
A/Napoli/6/2006	160	320	640	640	640	640	320	feb.06 7
A/Napoli/7/2006	160	320	1280	1280	640	1280	320	feb.06 10
A/Roma/1/2006	160	320	640	1280	1280	1280	320	apr.06 2
A/Roma/2/2006	80	320	640	1280	640	1280	320	mar.06 38
A/Roma/3/2006	80	160	640	640	1280	1280	320	mar.06 42

^a A/Beijing/ 262/96 (vecchia variante antigenica)^b A/New Caledonia/20/99 (ceppo vaccinale 2005-2006)^c A/Egypt/96/02 (ceppo riassortante A/H1N2)^d A/Netherlands/128/04 (ceppo A/New Caledonia/20/99-like)^e A/Thessaloniki/24/05 (ceppo A/New Caledonia/20/99-like)^f A/Hong Kong/2637/04 (ceppo A/New Caledonia/20/99-like)^g A/Egypt/39/05 (ceppo A/New Caledonia/20/99-like)

Sottotipo A/H3N2

L'analisi antigenica condotta su alcuni ceppi A/H3N2 (Tabella 3), circolanti in Italia, ha mostrato un discreto grado di omologia con il ceppo di referenza A/California/7/04, incluso nel vaccino per la stagione 2005/06. Tuttavia, nel test HI, questi stessi isolati hanno evidenziato una buona reattività anche verso il siero prodotto contro la nuova variante A/Wisconsin/67/05, inclusa nella composizione del vaccino per la prossima stagione influenzale 2006/07. Dai risultati di caratterizzazione antigenica ricevuti dal Centro OMS di Londra è stato evidenziato, inoltre, un buon livello di omologia di questi stessi isolati italiani con i ceppi A/Hong Kong/4443/2005 e A/Annecy/1138/2005.

Al fine di approfondire ulteriormente l'analisi delle caratteristiche dei virus A/H3N2 circolanti in Italia, è stato effettuato, presso il Centro Nazionale Influenza (NIC), il sequenziamento del dominio HA1 dell'emagglutinina virale e la costruzione del relativo albero filogenetico. Nella Figura 4, in cui vengono riportati i risultati di queste analisi molecolari, si rileva come i recenti isolati mostrino una maggiore omologia molecolare nei confronti del ceppo A/Wisconsin/67/05. Essi presentano, inoltre, poche ma importanti mutazioni, caratterizzate dalle sostituzioni aminoacidiche V112I, K173E e S199P, riscontrate anche nella maggior parte dei virus di sottotipo H3N2 isolati in Europa.

Tabella 3. A/H3N2: caratterizzazione antigenica di virus influenzali isolati in Italia mediante test HI

Virus	Antiseri prodotti in furetto						Data prelievo	Età (anni)
	A/Wy 3/03	A/Cal 7/04	A/NY 55/04	A/Ann 1138/05	A/HK 4443/05	A/Wis 67/05		
Data analisi: 20/4/06								
A/Wyoming/3/03 ^a	2560	2560	320	320	640	1280		
A/California/7/04 ^b	640	5120	1280	640	640	1280		
A/New York/55/04 ^c	640	5120	5120	640	1280	2560		
A/Annecy/1138/05 ^d	80	1280	320	320	640	640		
A/HongKong/4443/05 ^e	80	1280	160	320	640	640		
A/Wisconsin/67/05 ^f	320	1280	640	1280	2560	5120		
A/Parma/1/2006	40	640	160	160	160	160	gen.06	81
A/Parma/2/2006	<	320	80	160	160	160	gen.06	22
Data analisi: 30/5/06								
A/Wyoming/3/03 ^a	5120	5120	640	160	640	2560		
A/California/7/04 ^b	640	5120	1280	320	640	2560		
A/New York/55/04 ^c	640	5120	5120	320	1280	2560		
A/Annecy/1138/05 ^d	160	640	320	320	320	640		
A/HongKong/4443/05 ^e	80	640	160	320	640	640		
A/Wisconsin/67/05 ^f	320	640	640	320	1280	5120		
A/Parma/5/2006	80	320	320	160	160	160	mar.06	11

^a A/Wyoming/3/03 (ceppo A/Fujian/411/02-like); ^b A/California/7/04 (variante contenuta nel vaccino della stagione 2005-2006); ^c A/New York/55/04 (ceppo A/California/7/04 -like); ^d A/Annecy/1138/05 (ceppo A/Wisconsin/67/05 -like); ^e A/HongKong/4443/05 (ceppo A/Wisconsin/67/05 -like); ^f A/Wisconsin/67/05 (nuova variante inserita nel vaccino della prossima stagione 2006-2007); < = <40

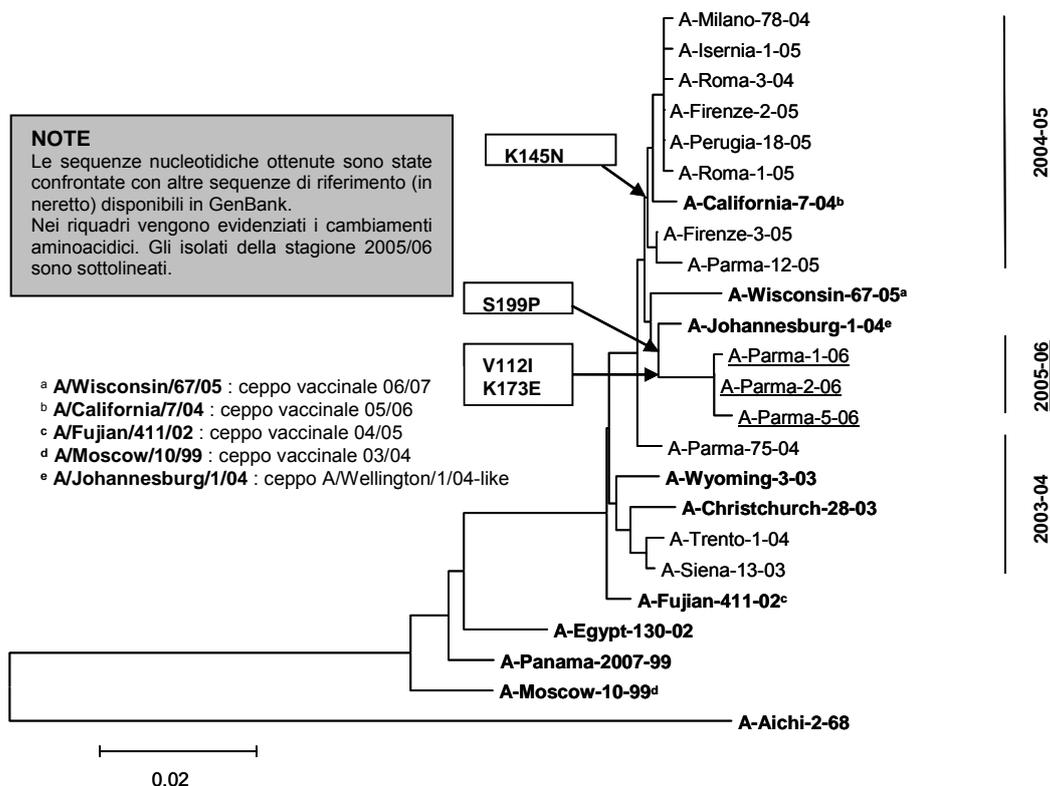


Figura 4. Relazioni filogenetiche relative al dominio HA1 della HA di recenti isolati umani A/H3N2 in Italia

Tipo B

I virus di tipo B, isolati nel corso della stagione 2005/06, appartengono ad entrambi i lineaggi, Victoria- e Yamagata-like, sebbene i virus Victoria-like abbiano rappresentato la maggioranza. I risultati relativi alla tipizzazione antigenica dei virus B (Tabelle 4-5) mostrano che i ceppi riconducibili al lineaggio Yamagata-like sono B/Shanghai/361/02-like e quindi simili al ceppo vaccinale 2005/06, mentre i virus appartenenti al lineaggio Victoria-like appaiono simili al ceppo B/Malaysia/2506/04, che comparirà nella composizione del vaccino per la prossima stagione.

Tabella 4. Tipo B: caratterizzazione antigenica di virus influenzali (lineaggio B/Victoria/2/87) isolati in Italia mediante test HI

Virus	Antisieri prodotti in furetto					Data prelievo	Età (anni)
	B/Shan 7/97 ^a	B/Shan 7/97	B/Bris 32/02	B/HK 45/05	B/Mal 2506/04		
Data analisi: 30/5/06							
B/Shandong/7/97	2560	640	160	320	320		
B/Brisbane/32/02	1280	320	160	320	320		
B/HK/45/05	1280	320	160	640	320		
B/Malaysia/2506/04	1280	320	160	640	320		
B/Firenze/2/2006	1280	80	10	80	80	mar.06	10
B/Napoli/1/2006	1280	80	40	80	80	feb.06	63
B/Napoli/2/2006	640	80	10	80	80	mar.06	13
Data analisi: 1/6/06							
B/Shandong/7/97	2560	320	160	80	320		
B/Brisbane/32/02	2560	160	160	80	320		
B/HK/45/05	1280	160	160	80	320		
B/Malaysia/2506/04	2560	320	160	80	320		
B/Napoli/4/2006	2560	80	<	80	80	mar.06	17

^a B/Shandong/7/97 (*hyperimmune sheep serum*)
< = <10

Tabella 5. Tipo B: caratterizzazione antigenica di virus influenzali (lineaggio B/ Yamagata/16/88) isolati in Italia mediante test HI (data analisi: 30/5/06)

Virus	Antisieri prodotti in furetto					Data prelievo	Età (anni)
	B/Sich 379/99	B/Shai 361/03	B/Jiang 10/03	B/Eg 144/05	B/Fl 7/05		
B/Sichuan/379/99	160	320	40	160	320		
B/Shanghai/361/02	160	640	160	160	640		
B/Jiangsu/10/03	40	40	320	80	40		
B/Egypt/144/05	80	320	80	160	320		
B/Florida/7/05	80	640	80	160	320		
B/Parma/1/2006	40	160	160	80	160	feb.06	43

CIRCOLAZIONE DEI VIRUS INFLUENZALI IN EUROPA E NEL MONDO

Isolamenti virali in Europa

A differenza delle precedenti stagioni, l'attività influenzale registrata quest'anno in Europa è stata moderata durante l'intera stagione di sorveglianza, ad eccezione della Lituania, dove sono stati osservati livelli di attività influenzale simili a quelli registrati nella precedente stagione 2004-2005.

Fin dall'inizio della stagione, l'attività influenzale in Europa è stata principalmente associata a virus influenzali di tipo B (62,4% sul totale dei campioni esaminati fino all'inizio di aprile).

Di tutti i virus influenzali identificati fino all'inizio del mese di aprile, 1632 sono stati antigenicamente e geneticamente caratterizzati come:

- A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) - like
- A/California/7/2004 (H3N2) - like
- B/Malaysia/2506/2004 - like (lineaggio B/Victoria/2/87)
- B/Jiangsu/10/2003 - like (lineaggio B/Yamagata/16/88)

La Tabella 6 mostra i risultati europei relativi alla stagione 2005-2006.

Tabella 6. Virus influenzali isolati e/o identificati in Europa nella stagione 2005-2006, (dati aggiornati al 2 aprile 2006)

	Tipizzati		Non sottotipizzati		Sottotipizzati		
	n.	%	n.	%	n.	%	
A	3045	37,6	2020	66	H3 H1	601 424	20 14
B	5058	62,4					

Fonte: Bollettino EISS n. 183 (www.eiss.org/cgi-files/bulletin_v2.cgi)

I dati mostrano che il 37,6% (3045/8103) dei ceppi isolati e caratterizzati sono risultati di tipo A. In particolare, di questi il 66% non è stato sottotipizzato, il 14% è risultato appartenere al sottotipo H1 e il 20% al sottotipo H3. Come già sottolineato, il 62,4% (5058/8103) dei virus caratterizzati è risultato appartenere al tipo B.

Isolamenti virali nel mondo

Durante la stagione 2005/06, l'influenza ha circolato in Africa, America, Asia, Europa ed Oceania; complessivamente, l'attività dei virus influenzali nel mondo è risultata inferiore a quella registrata in tutte le precedenti stagioni influenzali. I virus di tipo A, sottotipo H1, hanno circolato a livelli bassi durante tutta la stagione, determinando un focolaio più rilevante solo in Africa. I virus influenzali A/H3N2 sono risultati predominanti in Nord America, provocando numerosi focolai. I virus di tipo B hanno circolato a bassi livelli durante tutta la stagione, mostrando però una più ampia e prevalente diffusione nella maggior parte dei Paesi europei.

Sottotipo A/H3N2

Nella Tabella 7 sono riportati i dati relativi ad alcuni virus A/H3N2 isolati nel mondo. Dai risultati riportati emerge come la maggior parte di essi risulti più strettamente correlata al ceppo di riferimento A/California/7/04, sebbene una buona percentuale abbia mostrato una più alta reattività antigenica nei confronti della nuova variante A/Wisconsin/67/05.

Tabella 7. A/H3N2: caratterizzazione antigenica di virus influenzali isolati nel mondo mediante test HI

Virus	Antisiero prodotto in furetto		
	A/California/7/04	A/New York/55/04	A/Wisconsin/67/05
A/California/7/04^a	1280	320	640
A/New York/55/04^b	640	320	640
A/Wisconsin/67/05^c	320	160	1280
A/Anhui/544/05	640	320	320
A/Georgia/1/05	640	160	640
A/Ishikawa/1/06	640	320	320
A/Ulan Bator/1806/05	160	80	640
A/Guam/963/05	160	80	640
A/Taiwan/567/05	320	160	1280
A/Mexico/2014/05	320	160	1280
A/Oregon/14/05	320	160	1280
A/Hiroshima/52/05	320	160	1280

^a A/California/7/04 (variante contenuta nel vaccino 2004-2005)

^b A/New York/55/04 (variante antigenicamente correlata al ceppo A/California/7/04)

^c A/Wisconsin/67/05 (nuova variante antigenica circolante nella stagione 2005-2006)

Sottotipo A/H1N1

La maggior parte dei ceppi influenzali appartenenti al sottotipo A/H1N1 ha mostrato una stretta correlazione antigenica con il ceppo A/New Caledonia/20/99, contenuto nel vaccino antinfluenzale per la stagione 2005-2006. Nonostante sia emersa, soprattutto negli ultimi mesi della stagione, una nuova variante genetica, essa risulta antigenicamente indistinguibile dal ceppo A/New Caledonia/20/99.

Tipo B

Durante l'ultima stagione influenzale, è stata registrata una cocircolazione di virus influenzali B appartenenti ad entrambi i lineaggi Victoria- e Yamagata-like. Sebbene le proporzioni dei virus dei due lineaggi siano state variabili nei diversi Paesi del mondo, nell'arco dell'intera stagione, i virus appartenenti al lineaggio Victoria-like hanno predominato nei mesi più recenti.

Nel test HI, i virus del lineaggio Victoria-like sono risultati strettamente correlati al virus B/Malaysia/2506/04 mentre molti dei virus Yamagata-like hanno mostrato una maggiore somiglianza con virus di riferimento, quali il B/Florida/7/04 e il B/Egypt/144/05.

RACCOMANDAZIONI DELL'OMS PER LA VACCINAZIONE ANTINFLUENZALE 2006-2007

Le raccomandazioni che seguono sono state diramate dall'OMS e accettate e ratificate a livello europeo, nell'apposita seduta del gruppo di esperti "Ad-hoc Influenza Working Party Meeting", svoltasi a Londra, presso l'EMEA (*European Agency for the Evaluation of Medical Products*), il 13 marzo 2006.

Composizione del vaccino per la stagione 2006-2007

L'insieme dei risultati ottenuti dall'analisi antigenica, molecolare e filogenetica, nonché la circolazione di ceppi A/H3N2 antigenicamente correlati alla nuova variante A/Wisconsin/67/05 in gran parte dei Paesi del mondo e l'evidenza di un'ampia circolazione di virus B appartenenti al lineaggio Victoria, hanno suggerito un cambiamento nel vaccino antinfluenzale che, per l'emisfero settentrionale e per la stagione 2006-2007, avrà la seguente composizione:

FORMULAZIONE 2005-2006		FORMULAZIONE 2006-2007
<i>Ceppo vaccinale</i>	<i>Tipo/sottotipo</i>	<i>Ceppo vaccinale</i>
A/California/7/04	A/(H3N2)	A/Wisconsin/67/05
A/New Caledonia/20/99	A/(H1N1)	A/New Caledonia/20/99
B/Shanghai/361/02	B	B/Malaysia/2506/04

Il nuovo vaccino conterrà, dunque, sia una nuova variante antigenica (A/Wisconsin/67/05) del sottotipo A/H3N2 (che sostituirà il ceppo A/California/7/04, contenuto nel vaccino della passata stagione), sia un nuovo ceppo di tipo B (B/Malaysia/2506/04), appartenente al lineaggio dei virus B/Victoria/2/87-like.

BIBLIOGRAFIA

1. Kandel R, Hartshorn KL. Novel strategies for prevention and treatment of influenza. *Expert Opin Ther Targets* 2005;9(1):1-22.
2. Langley JM, Faughnan ME. Prevention of influenza in the general population. *CMAJ* 2004 9;171(10):1213-22.
3. Steindl T, Langer T. Influenza virus neuraminidase inhibitors: generation and comparison of structure-based and common feature pharmacophore hypotheses and their application in virtual screening. *J Chem Inf Comput Sci* 2004;44(5):1849-56.
4. Schmidt AC. Antiviral therapy for influenza : a clinical and economic comparative review. *Drugs* 2004;64(18):2031-46.
5. Ebell MH. Neuraminidase inhibitors for treatment of influenza. *Am Fam Physician* 2004 15;69(12):2824.
6. Oxford JS, Mann A, Lambkin R. A designer drug against influenza: the NA inhibitor oseltamivir (Tamiflu). *Expert Rev Anti Infect Ther* 2003;1(2):337-42.
7. O'Brien BJ, Goeree R, Blackhouse G, Smieja M, Loeb M. Oseltamivir for treatment of influenza in healthy adults: pooled trial evidence and cost-effectiveness model for Canada. *Value Health* 2003;6(2):116-25.
8. Noyola DE. Neuraminidase inhibitors in pediatric patients: potential place in influenza therapy. *Paediatr Drugs* 2003;5(2):125-31.
9. Stiver G. The treatment of influenza with antiviral drugs. *CMAJ* 2003;168(1):49-56.
10. Masuda T, Shibuya S, Arai M, Yoshida S, Tomozawa T, Ohno A, Yamashita M, Honda T. Synthesis and anti-influenza evaluation of orally active bicyclic ether derivatives related to zanamivir. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13(4):669-73.
11. Wetherall NT, Trivedi T, Zeller J, Hodges-Savola C, McKimm-Breschkin JL, Zambon M, Hayden FG. Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network. *J Clin Microbiol* 2003;41(2):742-50.
12. Aoki FY, Macleod MD, Paggiaro P, Carewicz O, El Sawy A, Wat C, Griffiths M, Waalberg E, Ward P. Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(1):123-9.
13. Oxford JS, Novelli P, Sefton A, Lambkin R. New millennium antivirals against pandemic and epidemic influenza: the neuraminidase inhibitors. *Antivir Chem Chemother* 2002;13(4):205-17.
14. McKimm-Breschkin JL. Neuraminidase inhibitors for the treatment and prevention of influenza. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3(2):103-12.
15. Cheer SM, Wagstaff AJ. Zanamivir: an update of its use in influenza. *Drugs* 2002;62(1):71-106.
16. McGeer A. Oseltamivir was safe and effective for prophylaxis of influenza in the frail elderly. *ACP J Club* 2002;136(1):24.
17. Aoki FY, Doucette KE. Oseltamivir: a clinical and pharmacological perspective. *Expert Opin Pharmacoter* 2001;2(10):1671-83.
18. McClellan, Perry CM. Oseltamivir: a review of its use in influenza. *Drugs* 2001;61(2):263-83.
19. Sarria A, Timoner J. Determination of influenza vaccination in persons 65 years of age and older. *Rev Esp Salud Publica* 2002;76(1):17-26.

20. Reina J, Fernandez-Baca V, Blanco I, Munar M. Comparison Of Madin-darby canine kidney cells (MDCK) with a green monkey continuous cell line (VERO) and human lung embryonated cells (MRC-5) in the isolation of influenza A virus from nasopharyngeal aspirates by shell vial culture. *J Clin Microbiol* 1997;35(7):1900-1.
21. Ziegler T, Hall H, Sanchez-Fauquier A, Gamble WC, Cox NJ. Type and subtype-specific detection of influenza viruses in clinical specimens by rapid culture assay. *J Clin Microbiol* 1995;33:318-21.
22. Meguro H, Bryant JD, Torrence AE, Wright PF. Canine Kidney Cell line for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 1979;9:175-9.
23. Murphy BR, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, *et al.* (Ed.). *Fields virology*. Third edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 1397-445.
24. Monto AS, Maasaab HF, Bryan ER. Relative efficacy of embryonated eggs and cell culture for isolation of contemporary influenza viruses. *J Clin Microbiol* 1981;13(1):233-5.
25. de Jong JC, Palache AM, Beyer WE, Rimmelzwaan GF, Boon AC, Osterhaus AD. Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus. *Dev Biol (Basel)* 2003; 115:63-73.
26. Ueda M, Maeda A, Nakagava N, Kase T, Kubota R, Takakura H, Ohshima A, Okuno Y. Application of subtype-specific monoclonal antibody for rapid detection and identification of influenza A and B viruses. *J Clin Microbiol* 1998;(1131 I) 340-4.
27. Kendal AP, Pereira MS (Ed.). *Concepts and procedures for Laboratory-Based influenza surveillance*. WHO Collaborating Centers for Reference and Research on Influenza, U.S. Department of Health and Human Services; 1982.
28. Daum LT, Canas LC, Schadler CA, Ujimori VA, Huff WB, Barnes WJ, Lohman KL. A rapid, single-step multiplex reverse transcription-PCR assay for the detection of human H1N1, H3N2, and B influenza viruses. *J Clin Virol* 2002;25(3):345-50.
29. Poddar SK, Espina R, Schnurr DP. Evaluation of a single-step multiplex RT-PCR for influenza virus type and subtype detection in respiratory samples. *J Clin Lab Anal* 2002;16(3):163-6.
30. van Elden LJ, van Kraaij MG, Nijhus M, Hendriksen KA, Dekker AW, Rozeneg-Arska M, van Loon AM. Polymerase chain reaction is more sensitive than viral culture and antigen testing for the detection of respiratory viruses in adults with hematological cancer and pneumonia. *Clin Infect Dis* 2002;34(2):177-83.
31. Cisterna R, Meabe E. RT-PCR for the determination of the type of influenza virus circulating in the population. *Rev Esp Quimioter* 2000;13(3):286-90.
32. Magnard C, Valette M, Aymard M, Lina B. Comparisons of two nested PCR, cell culture and antigen detection for the diagnosis of upper respiratory tract infections due to influenza viruses. *J Med Virol* 1999;2:215-20.
33. Pregliasco F, Mensi C, Camorali L, Anselmi G. Comparisons of RT-PCR with other diagnostic assays for rapid detection of influenza viruses. *J Med Virol* 1998;56:168-73.
34. Robert L, Baxter BD, Dominguez EA, Taber LH. Comparison of Reverse Transcription-PCR with tissue culture and other diagnostic assay for detection of type A influenza virus. *J Clin Microbiol* 1996;34:2604-6 (940 I).
35. Claas ECJ, Sprenger MJW, Kleter GEM, van Beek R, Quint WGV, Masurel N. Type specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1992;39:1-13.
36. Yamada A, Imanishi J, Nakajima E, Nakajima K, Nakajima S. Detection of influenza viruses in throat swab by using polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 1991;35:259-65.

37. Ruest A, Michaud S, Deslandes S, Frost EH. Comparison of the Directigen flu A+B test, the QuickVue Influenza test and clinical case definition to viral culture and reverse transcription – PCR for rapid diagnosis of influenza virus infection. *J Clin Microbiol* 2003;41(8):3487-93.
38. Chan KH, Maldeis N, Pope W, Yup A, Ozinskas A, Gill J, Seto WH, Shortridge KF, Peiris JS. Evaluation of the Directigen Flu A+B test for rapid diagnosis of influenza virus type A and B infections. *J Clin Microbiol* 2002;40(5):1675-80.
39. Reina J, Padilla E, Alonso F, Ruiz De Gopegui E, Munar M, Mari M. Evaluation of a new dot blot enzyme immunoassay (Directigen Flu A+B) for simultaneous and differential detection of influenza a and B virus antigens from respiratory samples. *J Clin Microbiol* 2002;40(9):3515-7.
40. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 1999;41:95-98.
41. Tippmann HF. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. *Brief Bioinform* 2004;5(1):82-7.
42. Takezaky N. Tie trees generated by distance methods of phylogenetic reconstruction. *Mol Biol Evol* 1998;15(6):727-37.
43. Tajima F. A simple graphic method for reconstructing phylogenetic trees from molecular data. *Mol Biol Evol* 1990;7(6):578-88.
44. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992;152-70.
45. Saitou M, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-25.
46. Kilbourne ED. Molecular epidemiology-influenza as archetype. *Harvey Lect* 1979;73:225-58.

APPENDICE
Protocollo operativo (stagione 2005-2006)
del sistema di sorveglianza FLU-ISS:
estratto della parte virologica

Si riporta un estratto della parte virologica del Protocollo operativo del sistema di sorveglianza FLU-ISS per la stagione influenzale 2005-2006.

Per comodità si è mantenuta la numerazione dei paragrafi del documento originale e il numero relativo agli allegati.

2. SORVEGLIANZA VIROLOGICA

2.1. Razionale

L'epidemiologia dell'Influenza è fortemente influenzata dalla capacità dei virus influenzali di mutare rapidamente le caratteristiche antigeniche delle due proteine virali di superficie, l'emagglutinina (H) e la neuraminidasi (N).

Tali variazioni permettono al virus di superare le barriere anticorpali che si oppongono alla sua circolazione nella popolazione, vanificando l'immunità conseguente a pregressa infezione naturale o a vaccinazione.

I cambiamenti a carico di queste due proteine virali possono essere di diversa intensità; diversi sono anche i meccanismi molecolari che li determinano e la gravità delle manifestazioni morbose che ne derivano:

Drift antigenico:

- porta alla comparsa di varianti antigeniche minori, a seguito di mutazioni puntiformi che alterano la sequenza degli aminoacidi di cui sono composte le due proteine;
- è un fenomeno comune a tutti i tipi (A, B, e C) e sottotipi virali (A/H3N2, A/H1N1);
- è responsabile delle epidemie stagionali.

Shift antigenico:

- è un fenomeno esclusivo di virus di tipo A;
- consiste nella comparsa nell'uomo di nuovi sottotipi antigenici, non circolanti precedentemente nella specie umana e quindi dotati di elevato potenziale pandemico (rapida diffusione nella popolazione mondiale, indipendentemente dall'età e dalla situazione vaccinale);
- è la conseguenza di riassortimenti genetici tra virus umani ed animali (aviari), che si verificano principalmente nel corso di infezioni miste, in ospiti intermedi (specie suina). Occasionalmente, tuttavia, si può avere un passaggio diretto di virus aviari all'uomo, come avvenuto nel 1997 ad Hong Kong (trasmissione di virus A/H5N1 dal pollo all'uomo) e come si sta verificando nell'area del sud-est asiatico, dove dal dicembre 2003, il virus dell'influenza aviaria A/H5N1 ha infettato più di 100 persone, provocando 59 decessi.

Risulta dunque evidente, che per realizzare una efficace azione di controllo della malattia attraverso l'immunoprofilassi vaccinale, occorre procedere ad un continuo aggiornamento della composizione del vaccino, in relazione alla comparsa di nuove varianti virali. Questa revisione è resa possibile grazie all'attività di sorveglianza virologica dell'influenza, che è svolta da una rete di laboratori in tutto il mondo, (in Italia il Centro Nazionale di riferimento è presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate (MIPI), Reparto "Malattie virali e vaccini inattivati" dell'ISS, che rimane il punto cardine del Programma Mondiale di Sorveglianza dell'Influenza dell'OMS.

Il sistema di sorveglianza sentinella italiano si inserisce in questo contesto mondiale di attività di sorveglianza accorpando, a livello nazionale, il monitoraggio virologico a quello clinico.

2.2 Obiettivi

2.2.1. In periodo interpandemico

- Verificare la circolazione di virus influenzali, mediante esami di Laboratorio su campioni clinici prelevati dai pazienti con sintomatologia influenzale, da parte di medici sentinella segnalatori.

- Caratterizzare, sia da un punto di vista antigenico che molecolare, i ceppi virali circolanti in periodo epidemico, valutando il grado di omologia antigenica tra ceppi circolanti nella popolazione e ceppi vaccinali.
- Mettere a punto, nell'ambito delle attività del Centro Nazionale, metodiche avanzate di diagnostica rapida e differenziale che permettano di identificare tempestivamente eventuali casi italiani di influenza pandemica.
- Fornire agli Organismi Internazionali (OMS; Agenzia Europea del Farmaco - EMEA) dati utili all'aggiornamento della composizione vaccinale.

2.2.2. In situazioni di emergenza pandemica

- Disporre di una rete di medici sentinella, distribuiti su tutto il territorio nazionale, in grado di fronteggiare la diffusione della pandemia, identificando tempestivamente e circoscrivendo i primi focolai di infezione.

A questo proposito si sottolinea che la capacità di risposta di un Paese ad una emergenza pandemica è fortemente influenzata dall'esistenza di una attività sistematica di sorveglianza clinico/virologica condotta annualmente. È quindi importante mantenere attiva la rete dei medici sentinella in anni di circolazione epidemica o sub-epidemica di Influenza.

2.3. Metodi

2.3.1. Periodo di osservazione e raccolta dei campioni clinici

Il monitoraggio della circolazione dei virus influenzali sarà effettuato a partire dalla 46° settimana 2005 e si protrarrà per l'intero periodo di sorveglianza.

Il medico effettuerà il prelievo da pazienti con sintomatologia influenzale. Il prelievo deve essere eseguito durante la fase acuta della malattia (rialzo febbrile).

Per la raccolta, potrà essere utilizzato un Kit diagnostico (Virocult), seguendo semplici istruzioni (Allegato 6) e compilando, per ciascun campione prelevato, il "Modulo dati paziente", contenente le informazioni relative alla data del prelievo, le iniziali del paziente, il sesso, l'età e la sua situazione vaccinale (Allegato 7).

2.3.2. Analisi dei campioni e strutture laboratoristiche coinvolte

I campioni clinici raccolti dai medici sono inviati ai laboratori virologici regionali.

Le Regioni sprovviste di Laboratorio di riferimento potranno far ricorso ai laboratori di altre Regioni, se disponibili o, per quanto possibile, ai Laboratori dell'ISS e del CIRI.

Tutte le identificazioni o isolamenti di virus sono segnalati al Centro Nazionale per l'Influenza presso il Dipartimento "Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate" (MIPI), Reparto "Malattie virali e vaccini inattivati" dell'ISS.

Le indagini di laboratorio saranno condotte con modalità e metodologie diverse, secondo quanto già concordato con i laboratori (Allegato 8) partecipanti al programma.

2.3.3. Flusso dei dati

I risultati nazionali delle indagini virologiche saranno resi pubblici in forma aggregata e anonima, unitamente a quelli epidemiologici, attraverso l'aggiornamento settimanale del sito Internet del Ministero della Salute (www.ministerosalute.it).

2.3.4. Comunicazione dei dati virologici a livello internazionale

Come negli anni precedenti, i risultati della sorveglianza virologica 2005/2006 saranno comunicati settimanalmente all'OMS, nonché ai Paesi facenti parte della rete europea EUROGROG ed EISS.

I dati relativi alle caratteristiche antigeniche dei ceppi virali italiani saranno discussi a Ginevra (OMS) e a Londra (EMEA) per l'aggiornamento della composizione del vaccino utilizzabile nella successiva stagione 2006-2007.

Allegato 5

Elenco delle settimane di sorveglianza

Settimana	dal	Al
2005-42	17-ott-05	23-ott-05
2005-43	24-ott-05	30-ott-05
2005-44	31-ott-05	6-nov-05
2005-45	07-nov-05	13-nov-05
2005-46	14-nov-05	20-nov-05
2005-47	21-nov-05	27-nov-05
2005-48	28-nov-05	04-dic-05
2005-49	05-dic-05	11-dic-05
2005-50	12-dic-05	18-dic-05
2005-51	19-dic-05	25-dic-05
2005-52	26-dic-05	01-gen-06
2006-01	02-gen-06	08-gen-06
2006-02	09-gen-06	15-gen-06
2006-03	16-gen-06	22-gen-06
2006-04	23-gen-06	29-gen-06
2006-05	30-gen-06	05-feb-06
2006-06	06-feb-06	12-feb-06
2006-07	13-feb-06	19-feb-06
2006-08	20-feb-06	26-feb-06
2006-09	27-feb-06	05-mar-06
2006-10	06-mar-06	12-mar-06
2006-11	13-mar-06	19-mar-06
2006-12	20-mar-06	26-mar-06
2006-13	27-mar-06	02-apr-06
2006-14	03-apr-06	09-apr-06
2006-15	10-apr-06	16-apr-06
2006-16	17-apr-06	23-apr-06
2006-17	24-apr-06	30-apr-06

Allegato 6

Sorveglianza virologica dell'influenza in Italia Stagione 2005/2006

PROTOCOLLO OPERATIVO PER LA RACCOLTA DI CAMPIONI CLINICI

Lo scopo delle indagini virologiche è quello di verificare la circolazione dei virus influenzali nella popolazione. Tale attività sarà svolta a partire dalla 46^a settimana e si protrarrà per l'intero periodo dello studio.

Il campione clinico (tamponi faringeo) dovrà essere prelevato durante la fase acuta dell'infezione (presenza di febbre elevata).

Per il prelievo sarà utilizzato il materiale fornito dall'ISS, secondo le modalità di seguito riportate:

IMPORTANTE: Conservare accuratamente il "Biotainer" (scatola di cartone) pre-etichettato, ricevuto dall'ISS, che dovrà essere utilizzato per la spedizione al laboratorio di riferimento.

Prelievo del tampone faringeo

1. Rimuovere l'involucro del Virocult contenente il tamponcino e la provetta di trasporto;
2. Portare il tampone a contatto con la parte posteriore della gola e cercare di far aderire al tampone frammenti di essudato, esercitando un'adeguata pressione ed un lieve movimento di raschiamento;
3. Rimuovere il tappo della provetta ed inserirvi il tamponcino;
4. Richiudere la provetta e scrivere sull'etichetta posta su di essa i dati relativi al paziente;
5. Spremere delicatamente la base della provetta, affinché il tamponcino venga bagnato dal terreno;
6. Conservare a +4°C, fino al momento della consegna al corriere. *

Registrazione dati

1. Riportare sull'allegato "Modulo dati paziente" le informazioni richieste.

Spedizione

1. Porre le provette contenenti i tamponi faringei nell'apposito tubo di plastica, accertandosi che il tappo sia ben avvitato;
2. Inserire il tubo di plastica nell'apposito "Biotainer" (scatola di cartone);
3. Porre il "Modulo dati paziente", completo dei dati richiesti, nell'apposita tasca esterna del "Biotainer", già etichettato;
4. Inviare al Laboratorio di Riferimento (Regionale o ISS).

* Nota: La diagnosi virologica è fortemente condizionata dalla rapidità di invio del campione raccolto al Laboratorio. È importante, dunque, che il medico dia tempestiva comunicazione (entro 24-48 ore) dell'avvenuto prelievo al Laboratorio di Riferimento.

Allegato 7

Sorveglianza virologica dell'influenza in Italia Stagione 2005/2006

DATI MEDICO

COGNOME e NOME (iniziali): _____

INDIRIZZO: _____

EVENTUALE CODICE REGIONALE: _____

STRUTTURA LABORATORISTICA DI RIFERIMENTO: _____

DATI PAZIENTI

Iniziali paziente	Sesso	Età	Data prelievo	Vaccinato	Note
				Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
				Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
				Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
				Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
				Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
				Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
				Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
				Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
				Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
				Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
				Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
				Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	

Allegato 8

Laboratori inseriti nel sistema di sorveglianza virologica

Laboratori di 1° livello della rete per la sorveglianza virologica dell'influenza

1. Istituto di Virologia, Università di Milano, CIRI-IV
(Dott. F. Pregliasco)
2. Dipartimento di Scienze di Medicina Pubblica, Università di Trieste, CIRI-IV
(Prof. C. Campello)
3. Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotechnologie Mediche, Università di Padova
(Prof. G. Palù)
4. Dipartimento di Fisiopatologia, Medicina Sperimentale e sanità Pubblica, Università di Siena
(Prof. E. Montomoli)
5. Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Sezione Igiene, Università di Palermo, CIRI-IV
(Prof. F. Vitale)
6. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Università di Lecce, CIRI-IV
(Prof. G. Gabutti)
7. ASL Centro Sud, Lab. di Microbiologia e Virologia, Bolzano
(Dott.ssa P. Rossi)
8. Dipartimento di Sanità Pubblica, Università di Parma
(Prof.ssa M.L. Tanzi)
9. Dipartimento di Igiene e Sanità Pubblica, Lab. di Virologia, Università di Firenze
(Prof.ssa A. Azzi)
10. Dipartimento Igiene e Sanità Pubblica, Università di Perugia
(Prof.ssa A.M. Iorio)
11. Istituto di Microbiologia, Università Cattolica "S. Cuore", Roma
(Prof.ssa A. Rossi)
12. Dipartimento di Scienze Mediche Preventive, Università di Napoli
(Dott.ssa G. Ribera)
13. Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari
(Prof.ssa A. Dolei)

Laboratori di 2° livello della rete per la sorveglianza virologica dell'influenza

- Centro Nazionale per l'Influenza, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità
(Dott.ssa I. Donatelli)
- CIRI-IV, Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Genova
(Prof. P. Crovari)

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

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

Roma, settembre 2006 (n. 3) 7° Suppl.