

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**CENTRO NAZIONALE OMS PER L' INFLUENZA
Influenza aviaria e rischio di pandemia:
potenziamento della rete nazionale
dei laboratori INFLUNET**

A cura di
Isabella Donatelli (a), Simona Puzelli (a), Barbara Bedini (b), Gabriele Vaccari (b),
Marzia Facchini (a), Angela Di Martino (a), Tiziana Grisetti (a), Livia Di Trani (b)

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

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN
06/28**

Istituto Superiore di Sanità

Centro Nazionale OMS per l'Influenza. Influenza aviaria e rischio di pandemia: potenziamento della rete nazionale dei laboratori INFLUNET

A cura di Isabella Donatelli, Simona Puzelli, Barbara Bedini, Gabriele Vaccari, Marzia Facchini, Angela Di Martino, Tiziana Grisetti e Livia Di Trani
2006, 51 p. Rapporti ISTISAN 06/28

Le attività descritte nel presente Rapporto si inseriscono nell'ambito della pianificazione della risposta contro un'eventuale pandemia. Il ruolo del laboratorio, infatti, risulta fondamentale nella prevenzione e/o gestione di qualsiasi emergenza infettivologica, permettendo la rapida identificazione dei primi focolai di infezione sul territorio nazionale. Questo consente di circoscrivere ed eradicare l'infezione o, almeno, di rallentarne la diffusione nella popolazione. L'efficacia degli interventi è condizionata dalla disponibilità di metodiche rapide, sensibili e specifiche, quali i saggi di diagnostica molecolare recentemente sviluppati. Per questo motivo, l'OMS ha chiesto a tutti i Centri nazionali, facenti parte del suo network mondiale, di standardizzare tali metodiche e di diffonderle a tutti i laboratori che, sul territorio, possono essere coinvolti nella gestione di una pandemia. In risposta a queste raccomandazioni, il Centro Nazionale Influenza (NIC) del Dipartimento MIPI dell'ISS ha messo a punto procedure diagnostiche rapide ed ha avviato un programma di controllo di qualità (QCA) dei laboratori afferenti alla rete INFLUNET, per valutarne il livello di competenza diagnostica, a cui seguirà un programma di addestramento tecnico-scientifico, che sarà svolto presso i laboratori del NIC.

Parole chiave: Influenza, Pandemia, Diagnostica.

Istituto Superiore di Sanità

WHO National Influenza Centre. Avian influenza and pandemic risk: strengthening of the national INFLUNET laboratory network

Edited by Isabella Donatelli, Simona Puzelli, Barbara Bedini, Gabriele Vaccari, Marzia Facchini, Angela Di Martino, Tiziana Grisetti and Livia Di Trani
2006, 51 p. Rapporti ISTISAN 06/28 (in Italian)

This Report describes the activities to be implemented in the context of a Pandemic Plan. In fact, the role of the laboratory is of paramount importance in the prevention and/or management of any infectious emergence, allowing the rapid identification of the first clusters of infection in the Country. This makes it possible to limit and eradicate the infection or, at least, to delay its spread in the population. The efficacy of any action depends on the availability of rapid, sensitive and specific procedures, such as some molecular diagnostic tools, recently developed. For this reason, WHO recommended to all the National Influenza Centres to standardize these methods and to make them available to their collaborating laboratories. At this aim, the Italian National Influenza Centre (NIC), Dept. MIPI-ISS, developed rapid diagnostic techniques and organized a Quality Control Assessment (QCA) of the Italian INFLUNET laboratories, in order to evaluate their diagnostic performances. A specific technical and scientific training will be carried out by the Italian NIC.

Key words: Influenza, Pandemic, Diagnosis.

Si ringraziano per la preziosa collaborazione: Graziella Morace, Laura Campitelli, Laura Calzoletti, Concetta Fabiani, Domenico Spagnolo, Francesca Beneduce, Sandro Norelli (Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità)

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

INDICE

Introduzione	1
Nuove metodologie molecolari per la diagnostica rapida dell'influenza	4
Principio della tecnica di Real Time PCR.....	4
Programma di verifica delle capacità diagnostiche (QCA) organizzato dall' EISS-OMS	10
Programma di verifica delle capacità diagnostiche e di controllo di qualità (QCA) dei laboratori coinvolti nella sorveglianza dell'influenza in Italia	15
Bibliografia	15
Appendice A - EISS-QCA 2005. Detection-culture-identification influenza and RSV viruses.....	17
Appendice B - Programma di controllo di qualità dei laboratori italiani afferenti alla rete INFLUNET.....	21
Costruzione e implementazione di una rete di laboratori per la sorveglianza virologica dell'influenza, con particolare riferimento alla diagnostica dei virus influenzali con potenziale pandemico	23
Analisi strutturata del problema	23
Obiettivo generale	25
Obiettivo specifico 1	25
Obiettivo specifico 2	25
Obiettivo specifico 3	26
Piani di valutazione per ogni obiettivo specifico.....	26
Allegato 1 - Laboratori inseriti nel sistema di sorveglianza virologica.....	31
Allegato 2 - Il protocollo e il questionario per il Programma di Controllo di Qualità (QCA)	35

INTRODUZIONE

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) coordina gli sforzi sanitari internazionali per controllare il rischio pandemico, rappresentato dai numerosi casi di trasmissione all'uomo del virus influenzale aviario A/H5N1, attraverso il rafforzamento della rete mondiale di sorveglianza dell'influenza e aumentando le capacità diagnostiche dei laboratori nazionali, al fine di poter identificare tempestivamente l'eventuale emergenza di ceppi influenzali pandemici.

L'influenza aviaria (IA) è una malattia infettiva contagiosa altamente diffusiva, causata da virus influenzali, appartenenti a 16 diversi sottotipi di emoagglutinina (HA), in grado di infettare diverse specie di uccelli selvatici e domestici. I sintomi clinici possono essere lievi (virus a bassa patogenicità-LP), oppure gravi e sistemici con interessamento degli apparati respiratorio, digerente e nervoso, in grado di causare elevata mortalità (virus ad alta patogenicità-HP).

Sino a una decina di anni fa non erano mai stati descritti nè dimostrati casi di trasmissione diretta di virus dell'IA all'uomo, perciò si riteneva che l'infezione umana da ceppi aviari fosse un'evenienza rara con scarse o nulle conseguenze per la salute.

Tuttavia i casi di infezione da virus A/H5N1 nel 1997 ad Hong Kong, hanno dimostrato la trasmissione diretta in 18 soggetti venuti a contatto con pollame infetto; di questi 6 casi sono risultati fatali. Dopo l'episodio del 1997, non sono stati segnalati casi di infezione sino al dicembre 2003. Da tale data ad oggi, in 10 Paesi, distribuiti in zone diverse dell'Asia, Europa e Africa sono stati accertati, mediante indagini di laboratorio confermate dagli esperti OMS, oltre 241 casi di infezione, di cui 141 mortali (1, 2).

E' tuttavia da sottolineare che tutti i casi di contagio umano sino ad ora riscontrati, sono da attribuirsi al contatto tra l'uomo e il pollame domestico o i relativi allevamenti, soprattutto in assenza di condizioni di bio-sicurezza.

Il rischio principale, che fa temere l'avvento di una nuova pandemia, successiva a quelle verificatesi nel corso del XX secolo (1918, 1957, 1968), è la coinfezione in uno stesso ospite da parte di virus influenzali aviari e umani, evento che consentirebbe il riassortimento genetico, dando origine ad un ceppo virale con caratteristiche genetiche tali da consentire la rapida trasmissione interumana.

La tempestiva identificazione di virus influenzali potenzialmente pandemici è quindi un elemento essenziale per monitorare la diffusione dei virus nei volatili e l'utilizzo della diagnostica, al fine di valutare il rischio per l'uomo, risulta ugualmente importante, alla luce di un'eventuale emergenza pandemica.

Da molti anni l'OMS ha attivato un programma di sorveglianza dell'influenza esteso a tutto il mondo, con una rete di oltre 110 laboratori (Figura 1) dislocati nella maggior parte dei Paesi (tra cui l'Italia) che fanno capo a 4 Centri di riferimento internazionali (Londra, Atlanta, Tokyo, Melbourne).

A livello Europeo esiste poi una rete di laboratori, denominata "EISS" (*European Influenza Surveillance Scheme*), che collabora strettamente con l'OMS e con il Centro di riferimento mondiale di Londra. La rete EISS è costituita da 38 laboratori (30 dei quali sono Centri Nazionali, in 24 Paesi), in un numero complessivo di ben 28 Paesi Europei.

Uno dei principali obiettivi di questa rete è quello di aiutare le reti di sorveglianza nazionali a fornire informazioni di buona qualità, basate su indicatori standardizzati e confrontabili a livello Europeo (es. armonizzazione dei metodi virologici), facilitando il rapido scambio di dati tra i laboratori.

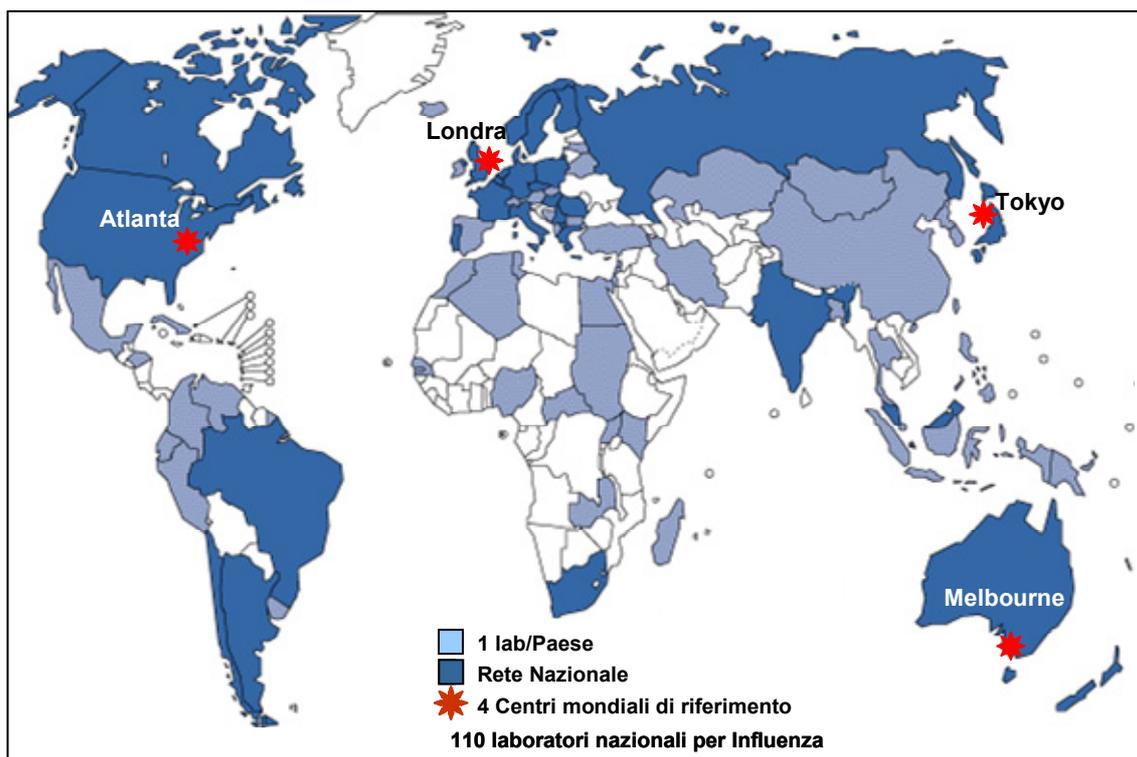


Figura 1. Rete dei laboratori OMS per la sorveglianza dell'influenza

In Italia, il Centro Nazionale Influenza (NIC) opera all'interno dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ed ha sede attualmente presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate (MIPI) dell'ISS. Il NIC si avvale di una rete di 15 laboratori periferici regionali (rete INFLUNET), prevalentemente universitari, distribuiti in tutta Italia.

Questo esteso e continuo monitoraggio virologico dell'influenza è prioritariamente finalizzato, in periodo interpandemico, all'identificazione rapida delle nuove varianti virali nella stagione invernale, alla caratterizzazione antigenica e molecolare dei virus circolanti e alla valutazione dell'omologia esistente con i ceppi vaccinali. Ciò al fine di procedere annualmente all'aggiornamento della composizione vaccinale.

Da alcuni anni (dalla stagione 1997/98), all'attività di monitoraggio virologico si è affiancato un sistema sentinella di sorveglianza clinico/epidemiologico in grado di fornire altre utili informazioni, quali l'incidenza (totale e per classi di età) della malattia, nei diversi periodi e nei diversi ambiti geografici. Questa attività viene svolta in ISS dal Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS).

In periodo di allerta pandemica e di pandemia, il sistema integrato di sorveglianza clinico-virologica diventa importante per poter riconoscere eventi epidemiologici inusuali, quadri clinici inattesi o inaspettate caratteristiche antigeniche e/o molecolari di ogni isolato virale e quindi per poter identificare tempestivamente i primi focolai sospetti e bloccare, o comunque rallentare, la diffusione dell'infezione soprattutto nelle fasi iniziali. In questo contesto, risulta essenziale per il laboratorio l'identificazione di sottotipi virali diversi da quelli che circolano normalmente nella popolazione in periodo interpandemico.

Tuttavia, l'attuale sistema di sorveglianza virologica dell'influenza, in Italia e nel mondo, è di fatto calibrato non sulla diagnosi rapida di infezione, ma sulla caratterizzazione antigenica dettagliata e completa delle varianti virali da inserire nel nuovo vaccino.

Per rendere la rete dei laboratori periferici sufficientemente elastica e flessibile, tanto da poter essere utilmente impiegata anche in situazioni di emergenza pandemica, risulta necessario migliorare le rispettive capacità diagnostiche, attraverso l'implementazione di metodiche molecolari rapide. Lo scopo evidente è quello di circoscrivere e possibilmente eradicare l'infezione virale o almeno di rallentarne la diffusione nella popolazione.

Il presente lavoro descrive le nuove attività che il NIC, in questo contesto e in risposta alle raccomandazioni dell'OMS, ha svolto nel periodo 2005/06.

Il lavoro descrive anche i protocolli delle metodiche di laboratorio messi a punto nell'ottica di un trasferimento in periferia dei risultati conseguiti.

Il lavoro si è così articolato:

1. Sviluppo di test diagnostici rapidi (Real Time RT-PCR one-step), altamente sensibili e specifici per la diagnosi di infezione da virus influenzali, con particolare riferimento a sottotipi virali potenzialmente pandemici per l'uomo (H5/H7/H9).
2. Partecipazione ad un programma di verifica delle attuali capacità diagnostiche dei laboratori coinvolti nella sorveglianza mondiale dell'influenza. A tal fine, l'OMS, in collaborazione con l'EISS, ha organizzato nel mese di Novembre 2005, un programma di controllo di qualità (QCA) dei laboratori della rete europea..
3. Avvio da parte del NIC di un analogo QCA per la valutazione dei livelli di competenza tecnica dei laboratori afferenti alla rete italiana INFLUNET. Tale QCA sarà seguito, ove necessario, da opportuni corsi di formazione e di addestramento tecnico del personale, che verranno svolti presso il NIC.

NUOVE METODOLOGIE MOLECOLARI PER LA DIAGNOSTICA RAPIDA DELL'INFLUENZA

Accanto alle metodiche tradizionali di isolamento in idonei substrati (uova embrionate, linee cellulari), piuttosto indaginose, ma essenziali per poter effettuare una caratterizzazione antigenica dettagliata dei ceppi virali, è possibile impiegare test diagnostici rapidi, quali i saggi molecolari. Tali prove prevedono l'identificazione nel campione clinico dell'acido nucleico specifico del virus d'interesse e sono rappresentate da reazioni polimerasiche a catena (PCR) precedute da una reazione di trascrizione inversa (RT), nel caso dei virus ad RNA.

I saggi di amplificazione genica e le analisi di sequenza, oltre alla diagnosi di influenza, permettono inoltre una caratterizzazione molecolare dei virus circolanti.

In particolare, la RT-PCR (semplice o "nested") viene condotta utilizzando coppie di oligonucleotidi in grado di riconoscere e legarsi a regioni altamente conservate dei geni codificanti per proteine virali interne tipo-specifiche e di superficie sottotipo-specifiche. In tal modo, è possibile effettuare, oltre alla diagnosi di influenza, anche la tipizzazione e/o sottotipizzazione del virus identificato.

Benché la RT-PCR sia un saggio altamente sensibile e specifico, può portare a contaminazioni nell'ambiente di lavoro e, di conseguenza, a risultati falsi positivi. Al fine di ovviare a tali limiti nelle procedure diagnostiche, è stato messo a punto e validato su campioni biologici, nell'ambito di una collaborazione tra il Dipartimento MIPI e il Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale (DSAA) dell'ISS, un saggio di Real Time PCR specifico per l'identificazione rapida di virus influenzali di tipo A.

Principio della tecnica di Real Time PCR

La Real Time PCR è una metodica che misura l'amplificazione in tempo reale, durante la fase esponenziale della PCR, mediante l'utilizzo di sonde fluorescenti, e che permette di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale.

In caso di emergenza pandemica, la disponibilità di protocolli diagnostici mediante Real Time PCR risulta particolarmente importante, rispetto ai metodi di identificazione virale classici, in quanto il test ha il vantaggio di una estrema rapidità di esecuzione, con risultati ottenuti in meno di tre ore dall'arrivo del campione, insieme ad una elevata sensibilità e specificità. Inoltre, le fasi di amplificazione e di rivelazione sono combinate assieme in un sistema chiuso che evita anche i passaggi post-PCR, riducendo la variabilità e i rischi di contaminazione.

Esistono differenti strategie per monitorare in tempo reale l'amplificazione, ma tutte si basano sull'emissione di fluorescenza che si genera durante la PCR o per effetto del legame di coloranti fluorescenti che si intercalano nella doppia elica di DNA (come il SYBR Green), o sull'ibridazione o sulla degradazione di sonde specifiche (*molecular beacons*; "FRET"; TaqMan) (3).

La chimica SYBR Green consiste nell'utilizzo di un colorante fluorescente che si intercala nella doppia elica del DNA e che, se eccitato da una fonte luminosa, emette fluorescenza solo nel caso sia intercalato. L'aumento di fluorescenza corrisponde quindi all'aumento del numero di copie della sequenza amplificata. Poiché si lega a tutte le molecole di DNA a doppio filamento, qualora siano presenti prodotti multipli di amplificazione o amplificati

aspecifici, questi vengono comunque rilevati. Questa tecnica ha quindi necessità di un'ottima messa a punto e di un controllo dell'amplificazione, tramite analisi della curva di *melting*, successiva all'amplificazione.

Le chimiche che utilizzano sonde fluorescenti sono principalmente: le Molecular Beacons[®], le sonde FRET e le Taq-Man e si basano sulla presenza sulla sonda di due molecole: un accettore di fluorescenza (*quencher*) e un donatore (*reporter*), la cui fluorescenza viene rilevata durante l'amplificazione.

Le "Molecular Beacons" sono sonde a DNA con una caratteristica struttura a "forcina" o una struttura "stem-loop", in cui all'interno del loop è presente una sequenza complementare dell'amplicone, mentre alle due estremità sono legati, rispettivamente il *reporter* e il quencher. Quando la sonda non è legata alla sequenza bersaglio, la vicinanza del quencher al *reporter* impedisce l'emissione di fluorescenza; al contrario, in presenza dell'amplicato, la sonda si lega alla sequenza specifica, per cui il colorante fluorescente si separa dal quencher, con conseguente emissione di fluorescenza.

Nella chimica FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*), vengono utilizzate due sonde, ciascuna marcata con un unico fluorocromo (anche qui *reporter* o *quencher*), una al 3' e la seconda al 5' degli oligonucleotidi. Queste sonde sono disegnate in modo da ibridare a regioni adiacenti del DNA target e l'interazione dei due fluorofori avviene quando queste sono legate al DNA target. Quando le sonde sono legate tramite ibridazione alla sequenza bersaglio, se eccitate da una sorgente luminosa, il segnale proveniente dal donatore viene trasferito all'accettore che emetterà una fluorescenza ad una specifica lunghezza d'onda rilevata.

Infine nella chimica Taq-Man, la sonda è marcata ad entrambe le estremità rispettivamente da un *reporter* e da un quencher. Quando la sonda è integra, la fluorescenza del *reporter* è assorbita dal quencher; durante la reazione di amplificazione, la sonda si appaiata alla sequenza target, viene idrolizzata grazie all'attività esonucleasica 5'-3' della Taq polimerasi, con conseguente separazione del quencher dal *reporter* ed emissione di fluorescenza da parte di quest'ultimo.

La Real Time PCR prevede l'impiego di una strumentazione sofisticata che combina un termociclatore, ovvero uno strumento che permette la variazione ciclica della temperatura della miscela di reazione e un sistema di rilevazione della fluorescenza.

La fluorescenza emessa da ciascun campione è dovuta ad irraggiamento da parte di una sorgente luminosa (normalmente un laser od una lampada alogena di tungsteno o diodi emittenti luce blu). Un sistema di specchi e filtri convogliano la fluorescenza verso una telecamera CCD (*Charge-Coupled Device*) o verso tre diodi di fotorilevazione (3) che catturano ciascun segnale analizzato, successivamente, con software gestito da personal computer.

Un'ulteriore possibilità offerta dalla Real Time PCR è la quantificazione del materiale sottoposto ad analisi. A tale scopo è necessario disporre di uno standard a concentrazione nota da cui, con diluizioni seriali, si costruisce una curva standard. Il grafico di una curva standard, rappresentato da una retta, viene ottenuto riportando sull'asse delle ascisse il logaritmo della concentrazione del campione a concentrazione nota mentre, sull'asse delle ordinate vengono riportati i valore di Ct (Ciclo Soglia) dedotti dai grafici di fluorescenza ottenuti durante la reazione di PCR. E' così possibile, per estrapolazione, indentificare la quantità del campione incognito.

Per la messa a punto del saggio di Real Time RT-PCR (RRT-PCR) da noi sviluppato, è stata utilizzata la chimica Taq-Man, con l'impiego di una sonda innovativa denominata MGB (*Minor Groove Binder*). I gruppi MGB sono molecole che derivano dagli antibiotici e che

hanno la proprietà di stabilire un legame stabile al solco minore del DNA (Figura 2). Questo legame, di natura idrofobica, che si viene a creare tra la sonda MGB e il DNA, aumenta la temperatura di *melting* della sonda e permette, quindi, di utilizzare sonde a sequenza più breve, con conseguente aumento di specificità del test (4).

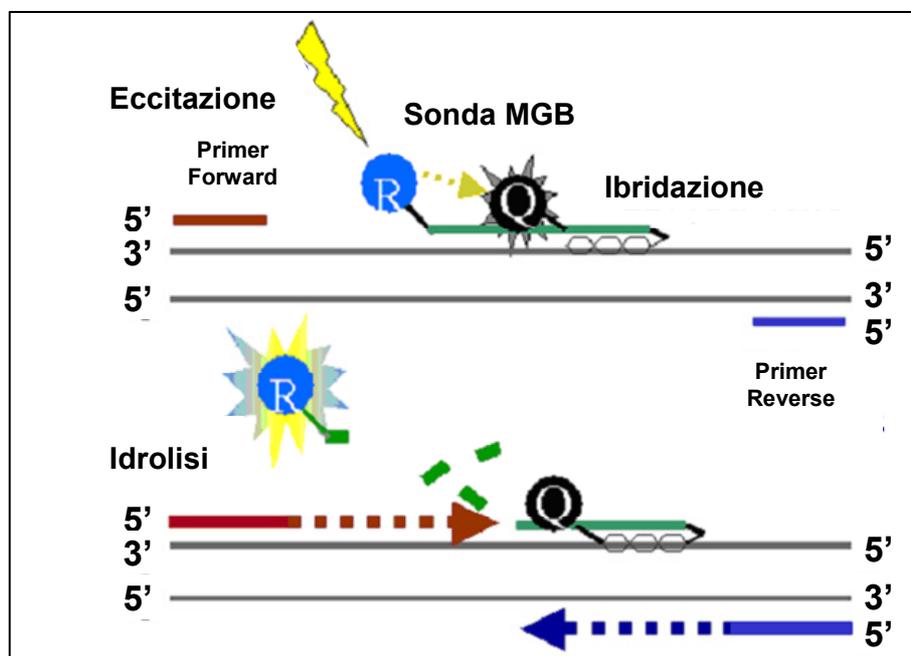


Figura 2. Schema del meccanismo di azione delle sonde MGB

In letteratura sono riportati diversi formati di RRT-PCR applicati alla diagnostica dei virus influenzali aviari. In particolare, sono a disposizione protocolli per l'identificazione di virus influenzali mediante rilievo di sequenze target del gene M, gene altamente conservato in tutti i sottotipi di virus influenzale A, e di sequenze specifiche per sottotipi di emoagglutinina (H5-H7) dei virus influenzali di maggiore interesse per le conseguenze relative alla loro eventuale diffusione negli allevamenti avicoli (5-9) e per la potenziale trasmissione all'uomo. Alcuni di questi protocolli, che indicano le sequenze di primers e probes specifici, sono stati sviluppati in base ai dati di analisi di sequenze di virus influenzali aviari appartenenti al lineage Nord-americano.

Il saggio di one-step RRT-PCR (RRT-PCR/M), messo a punto per l'identificazione di virus influenzali aviari (10), si basa anch'esso sulla identificazione e amplificazione di una porzione definita del gene M. Poiché, tuttavia, sia il virus A/H5N1 che i virus aviari recentemente isolati nel corso di epidemie nel pollame in Europa, compresi virus A/H7N1 e A/H7N3 che hanno circolato in allevamenti avicoli italiani tra il 1999 e il 2003, appartengono al lineage Euro-Asiatico, si è ritenuto opportuno sviluppare un test specifico per identificare virus appartenenti a tale lineage.

Mediante analisi di allineamenti di sequenze del gene M dei virus influenzali sopraindicati e, soprattutto, di quelle relative a virus A/H5N1 isolati nel corso dell'epidemia, è stato possibile identificare una porzione conservata all'estremità 5' del gene target, all'interno della quale sono stati identificati primers e sonda specifici per il test (Tabella 1).

Tabella 1. Sequenze di primers e sonda impiegati nel saggio di RRT-PCR/M

Nome	Sequenza (5'-3')	Localizzazione (nt)	Senso
M-Flu1	CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA	32-54	+
M-Flu2	GGATTGGTCTTGTCTTTAGCCA	158-179	-
M-Fluprob	FAM-CTCGGCTTTGAGGGGCTGA-MGB	74-94	-

Al fine di ridurre i tempi di analisi ed eliminare i rischi di contaminazione legati alla manipolazione di campioni nelle fasi di retro-trascrizione e di amplificazione, il saggio è stato sviluppato secondo la metodica one-step, prevedendo le fasi di retrotrascrizione e amplificazione specifica della porzione di genoma virale di interesse in un unico passaggio.

Innovazione del test, rispetto ad analoghi saggi sinora pubblicati per la diagnostica dei virus influenzali, è stato l'inserimento di un controllo positivo di reazione, costituito da RNA codificante per la gliceraldehidogliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi murina (GAPDH), per monitorare la corretta esecuzione delle fasi di estrazione e amplificazione di acido nucleico virale e per evidenziare l'eventuale presenza di fattori inibitori, in grado di ridurre l'efficienza di amplificazione e/o dare luogo a risultati falsi negativi.

Per rendere possibile anche la quantificazione dei campioni si è proceduto alla preparazione di standard a concentrazione nota mediante trascrizione *in vitro* di RNA; tali standard hanno consentito di determinare il livello di sensibilità del saggio e sono stati, inoltre, utilizzati come ulteriore controllo positivo della reazione di amplificazione. Un opportuno vettore plasmidico, contenente una sequenza promotore, è stato scelto al fine di generare un plasmide ricombinante, in cui era inserita l'intera sequenza codificante per il gene M successivamente utilizzato per la sintesi di RNA trascritto *in vitro*.

La specificità del test RRT-PCR/M è stata quindi valutata mediante amplificazione di RNA estratto da virus influenzali di tipo A appartenenti a diversi sottotipi di HA (sottotipi H1-H13) e isolati da specie diverse (aviaria, suina, equina e umana), oltre a virus influenzali umani di tipo B. Al fine di escludere una amplificazione aspecifica, determinata dalla presenza di altri patogeni virali nell'esame di campioni, sono stati, inoltre, inclusi nelle prove sei diversi agenti virali responsabili di alcune patologie diffuse nelle specie aviarie (Tabella 2).

Infine, per confermare la validità del test per l'analisi di campioni biologici, sono stati utilizzati tamponi cloacali prelevati da anatidi selvatici, precedentemente analizzati con RT-PCR e già risultati positivi. Allo stesso scopo, sono stati successivamente inclusi nell'analisi anche numerosi tamponi faringei umani prelevati, durante la stagione di sorveglianza dell'influenza, da pazienti con sintomatologia influenzale e che erano già risultati positivi nel test di RT-PCR specifico per virus influenzali umani H1 ed H3.

Le prove effettuate per valutare il limite di sensibilità della RRT-PCR/M, utilizzando diluizione seriali di RNA trascritto *in vitro*, hanno dimostrato che il saggio è in grado di rilevare fino a 5 copie di RNA/reazione. Tale valore è risultato essere 10 volte minore rispetto ai valori di sensibilità ottenuti in analoghi saggi disponibili in letteratura (5, 6), aumentando così la possibilità di identificazione di virus influenzali presenti a concentrazioni limite nei campioni clinici da analizzare.

I risultati delle prove di specificità, eseguite sui campioni elencati in Tabella 2, hanno dimostrato che il saggio di RRT-PCR/M è in grado di amplificare solo RNA di virus influenzali di tipo A, mentre nessun segnale di fluorescenza è stato rilevato per l'amplificazione dell'RNA di virus influenzali umani di tipo B, di virus respiratori umani responsabili di patologie non influenzali e di virus aviari diversi (Figura 3).

Tabella 2. Risultati della prova di specificità del saggio di RRT-PCR/M

Virus	Sottotipi	Amplificazione gene M
A/Mallard/Italy/70/96	H1N1	positivo
A/Mallard/Italy/35/99	H2N3	positivo
A/Duck/Ukraine/63	H3N8	positivo
A/Mallard/Italy/616/01	H4N6	positivo
A/Chicken/Italy/312/97	H5N2	positivo
A/Mallard/Italy/80/93	H5N2	positivo
A/Chicken/Italy/9097/97	H5N9	positivo
A/Duck/Vietnam/TG24-01/05	H5N1	positivo
A/Vietnam/1194/04	H5N1	positivo
A/Mallard/Italy/41/00	H6N8	positivo
A/Turkey/Italy/214845/02	H7N3	positivo
A/Turkey/Ontario/618/68	H8N4	positivo
A/Turkey/Wiss/66	H9N2	positivo
A/Coot/Italy/125/94	H10N8	positivo
A/Mallard/Italy/243/00	H11N6	positivo
A/Duck/Alberta/60/76	H12N5	positivo
A/Gull/Maryland/704/77	H13N6	positivo
A/Equine/New Market/2/93	H3N8	positivo
A/Equine/Roma/1/91	H3N8	positivo
A/Swine/Italy/1421/95	H1N1	positivo
A/Swine/1184/92	H3N2	positivo
A/New Caledonia/20/99	H1N1	positivo
A/Roma/3/03	H3N2	positivo
B/Guandong/120/00	NA	negativo
B/Yamagata/16/88	NA	negativo
RSV A	NA	negativo
RSV B	NA	negativo
PMV 2 (Ck/Ca/Yucaipa/56)	NA	negativo
PMV 3 (Tk/1087/82)	NA	negativo
PMV4 (Dk/HK/D3/75)	NA	negativo
TRTV (But 1FF 8544)	NA	negativo
IBDV (D-78)	NA	negativo
IBV (M41)	NA	negativo

NA: non applicabile; RSV: virus respiratorio sinciziale; PMV: paramixovirus; TRTV: virus della rinotracheite di tacchino; IBDV: virus dell'infezione della borsa di Fabrizio; IBV: virus della bronchite infettiva aviaria

I risultati ottenuti dall'amplificazione di RNA estratto da tamponi cloacali prelevati da volatili selvatici, hanno confermato la presenza di virus influenzali A nei campioni risultati positivi con metodiche molecolari diverse. Similmente, dalle analisi di amplificazione effettuate sui campioni clinici umani, sono stati confermati positivi solo quei tamponi faringei in cui era stata precedentemente evidenziata la presenza di virus influenzale di tipo A (sottotipi H3 e H1). Concludendo, il saggio di RRT-PCR/M ha dimostrato un'elevata sensibilità, specificità e rapidità, e potrebbe rappresentare un valido strumento per la diagnosi rapida di virus influenzali aviari, da affiancare ai metodi "classici" di diagnosi. I vantaggi della tecnica, rispetto alla RT-PCR tradizionale, sono elencate nella Figura 4.

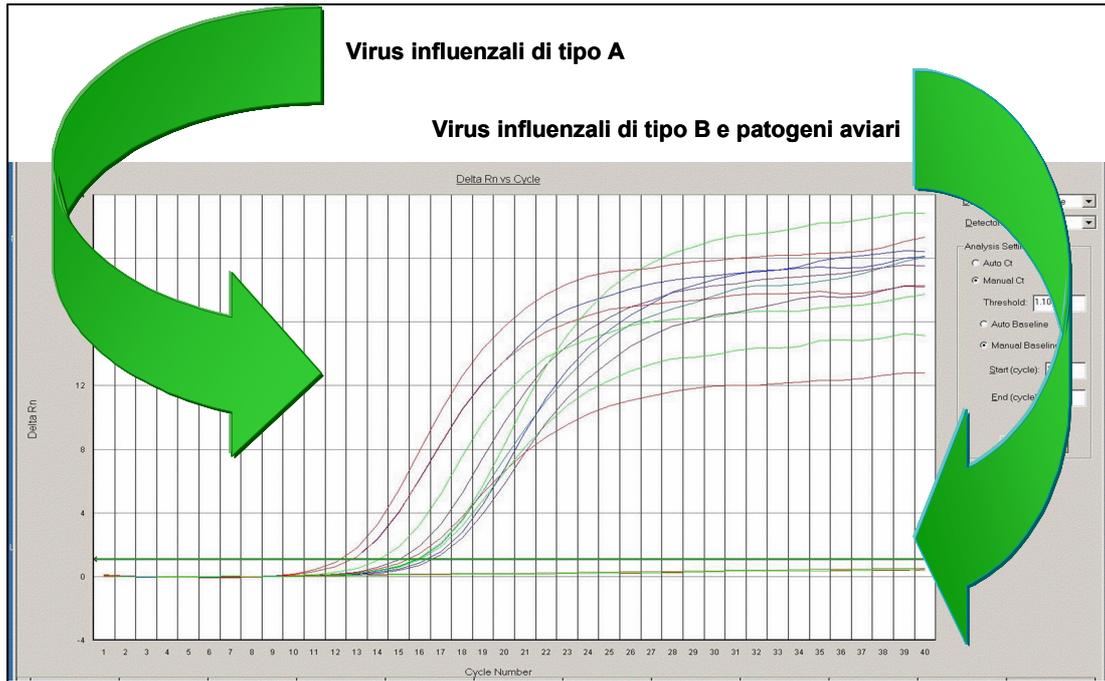


Figura 3. Specificità: curve di amplificazione di RRT-PCR/M

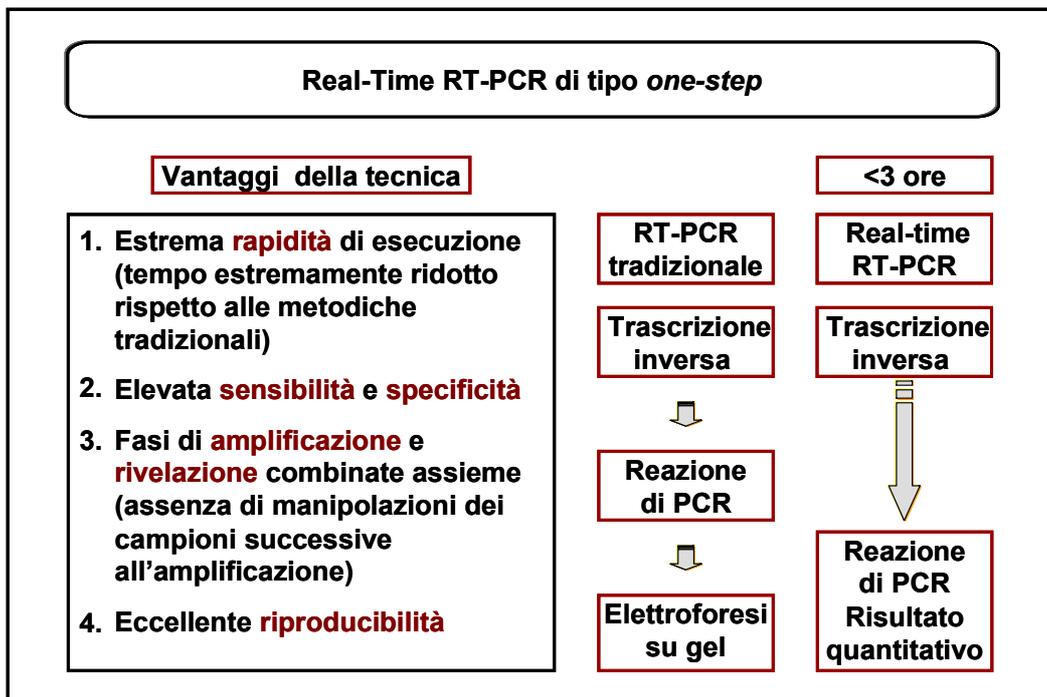


Figura 4. Confronto tra la Real Time RT-PCR e la RT-PCR tradizionale

PROGRAMMA DI VERIFICA DELLE CAPACITÀ DIAGNOSTICHE (QCA) ORGANIZZATO DALL'EISS-OMS

Come già evidenziato nell'introduzione, gli obiettivi e le metodologie di laboratorio da impiegare in periodo interpandemico e in periodo di emergenza pandemica sono elencate nella Figura 5.

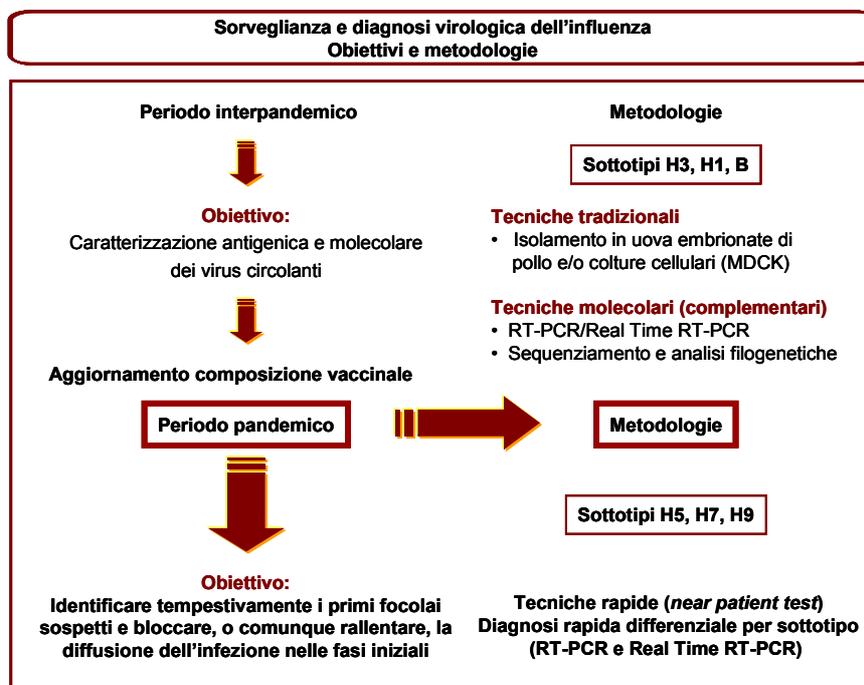


Figura 5. Obiettivi e metodologie della sorveglianza dell'influenza in periodo interpandemico e pandemico

Tutti i laboratori della rete OMS di sorveglianza dell'influenza impiegano routinariamente tecniche diagnostiche tradizionali, spesso indagative e poco rapide, mentre solo alcuni di essi sono in grado di eseguire metodiche molecolari utili a identificare il ceppo virale in tempi brevi.

Al fine di ottenere un quadro completo e dettagliato del grado di preparazione di ciascun laboratorio, l'OMS ha promosso un programma di verifica delle capacità diagnostiche dei laboratori della rete, organizzato dall'EISS.

Al QCA hanno partecipato 38 laboratori, dislocati in 28 Paesi (Figura 6).

La fase iniziale del programma è consistita nella somministrazione di un questionario conoscitivo in relazione alle strutture disponibili (con particolare riferimento ai livelli di biosicurezza per il contenimento del rischio biologico) e alle metodologie e ai reagenti routinariamente impiegati da ogni laboratorio. I risultati del questionario sono stati analizzati dall'EISS per organizzare il successivo Programma di Valutazione e Controllo di Qualità.

La seconda fase è consistita nell'invio di un pannello di 10 campioni biologici "simulati" costituiti da cellule non infette o infettate con virus influenzali di tipo A (diversi sottotipi antigenici) e di tipo B, nonché con altri virus respiratori (RSV). I risultati preliminari di tipizzazione dovevano essere resi noti entro 7 giorni dal ricevimento dei campioni, mentre dopo altri 21 giorni doveva essere fornita una caratterizzazione antigenica e molecolare dettagliata di tutti gli eventuali stipiti di virus influenzale isolati.

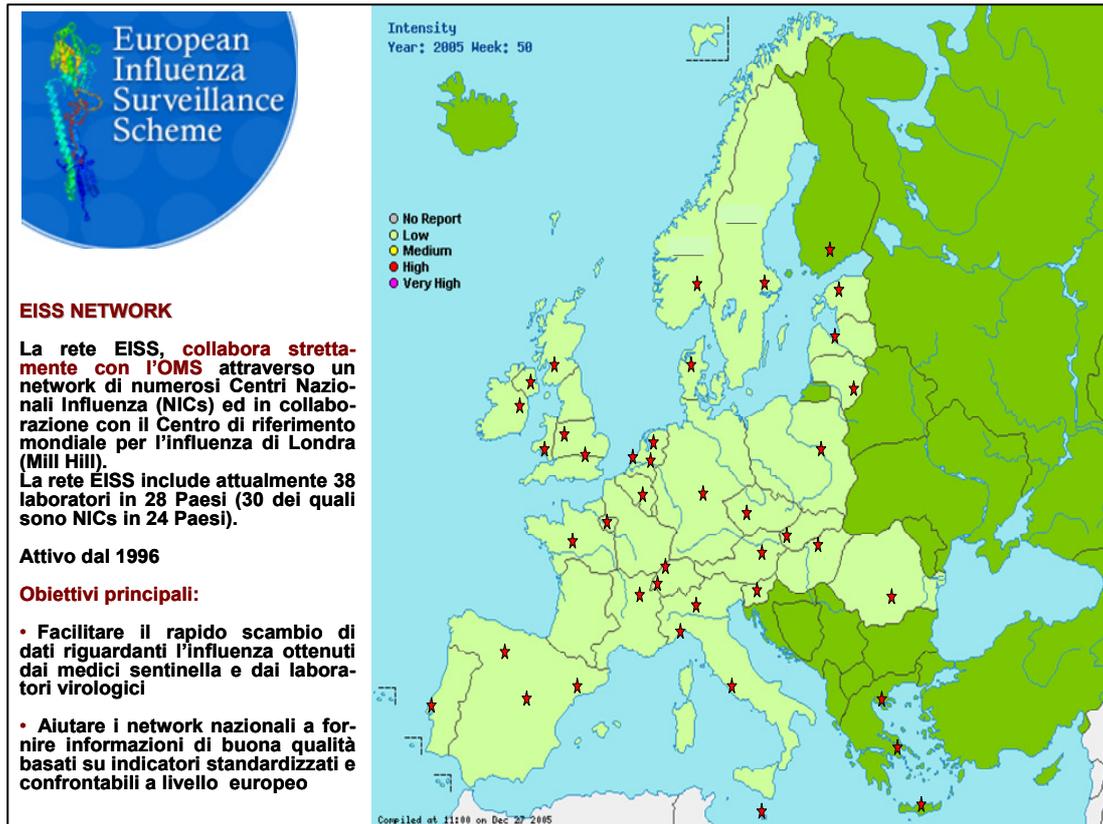


Figura 6. Laboratori della rete EISS

Le metodiche utilizzate dal NIC, in quanto routinariamente impiegate nella sorveglianza stagionale, sono di seguito riportate.

- *Saggi tradizionali* (irrinunciabili):
 - isolamento in uova embrionate di pollo e in colture cellulari (MDCK, cellule renali di cane)
 - identificazione della presenza virale attraverso la ricerca delle attività emagglutinante (test HA) nel liquido allantoideo delle uova o nel soprannatante culturale
 - test sierologici per l'analisi antigenica degli isolati virali (test di inibizione dell'emagglutinazione-HI) utilizzando antisieri policlonali o anticorpi monoclonali forniti dal OMS e/o prodotti in ISS
 - test di immunofluorescenza (IFA) diretta per il rilevamento degli antigeni virali
- *Saggi molecolari* (complementari):
 - test rapidi ("near-patient" tests), tipo Directigen e FluOIA
 - saggi di amplificazione genica: RT-PCR one-step e Real Time RT-PCR one-step
 - sequenziamento nucleotidico/aminoacidico delle proteine virali
 - analisi filogenetiche

Come previsto dal protocollo, alla fine dello studio, l'EISS ha inviato ai partecipanti una tabella di decodifica dei campioni per una prima autovalutazione da parte di ciascun laboratorio partecipante (Tabella 3)

Tabella 3. Decodifica dei campioni “simulati” del QCA-EISS e risultati del NIC

N. codice	Campioni simulati	TCID ₅₀ /mL	Risultati ISS
1	Cells MDCK	/	Negative
2	Influenza B B/HK/330/2001	100	Influenza B B/HK/330/2001
3	Influenza A/H3N3 A/Panama/2007/99	100	Influenza A/H3N3 A/Panama/2007/99
4	Influenza B B/Jiangsu/10/2003	100.000	Influenza B B/Jiangsu/10/2003
5	Influenza A/H3N3 A/New York/55/04 (California-like)	100.000	Influenza A/H3N3 A/New York/55/04 (California-like)
6	Cells Hep2	/	Negative
7	RSV Type A	10.000	RSV type A
8	Influenza A/H1N1 A/New Caledonia/20/99	100	Influenza A/H1N1 A/New Caledonia/20/99
9	Influenza A/H3N3 A/New York/55/04 (California-like)	1.000	Influenza A/H3N3 A/New York/55/04 (California-like)
10	Influenza B B/Jiangsu/10/2003	100	Influenza B B/Jiangsu/10/2003

*TCID₅₀: dose virale infettante il 50% delle colture cellulari inoculate

Particolarmente utile ai fini della caratterizzazione antigenica dei virus esaminati e della individuazione dell'esatta variante antigenica, all'interno di ciascun sottotipo, è stata l'analisi filogenetica delle sequenze delle emoagglutinine virali.

I risultati di tali analisi sono mostrate nelle Figure 7 e 8.

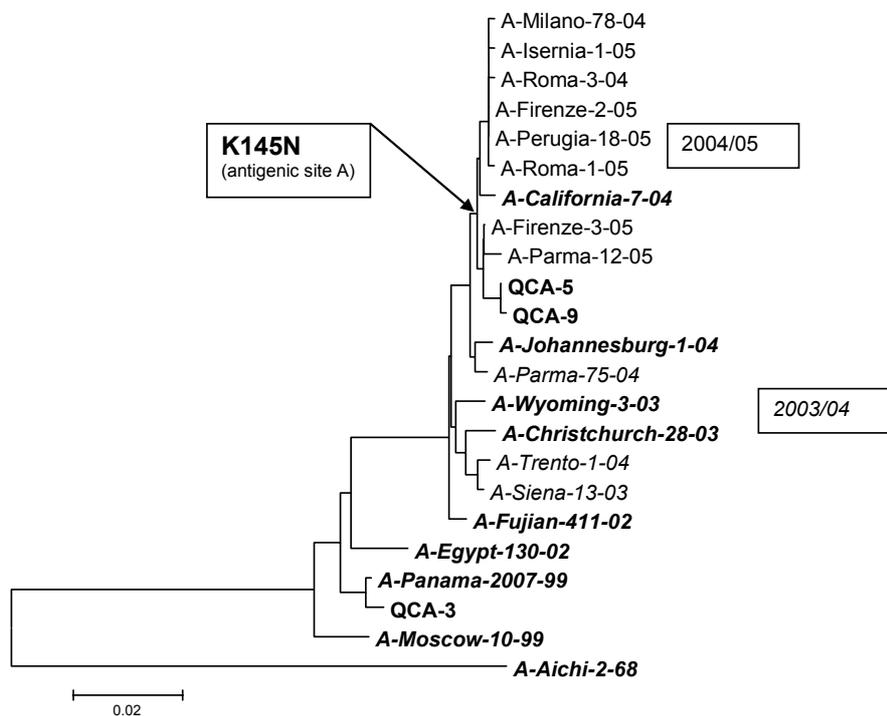


Figura 7. Analisi filogenetica relativa alla porzione HA1 dell'emoagglutinina di virus influenzali A/H3N2, comprendente i tre virus isolati nell'ambito del QCA-EISS

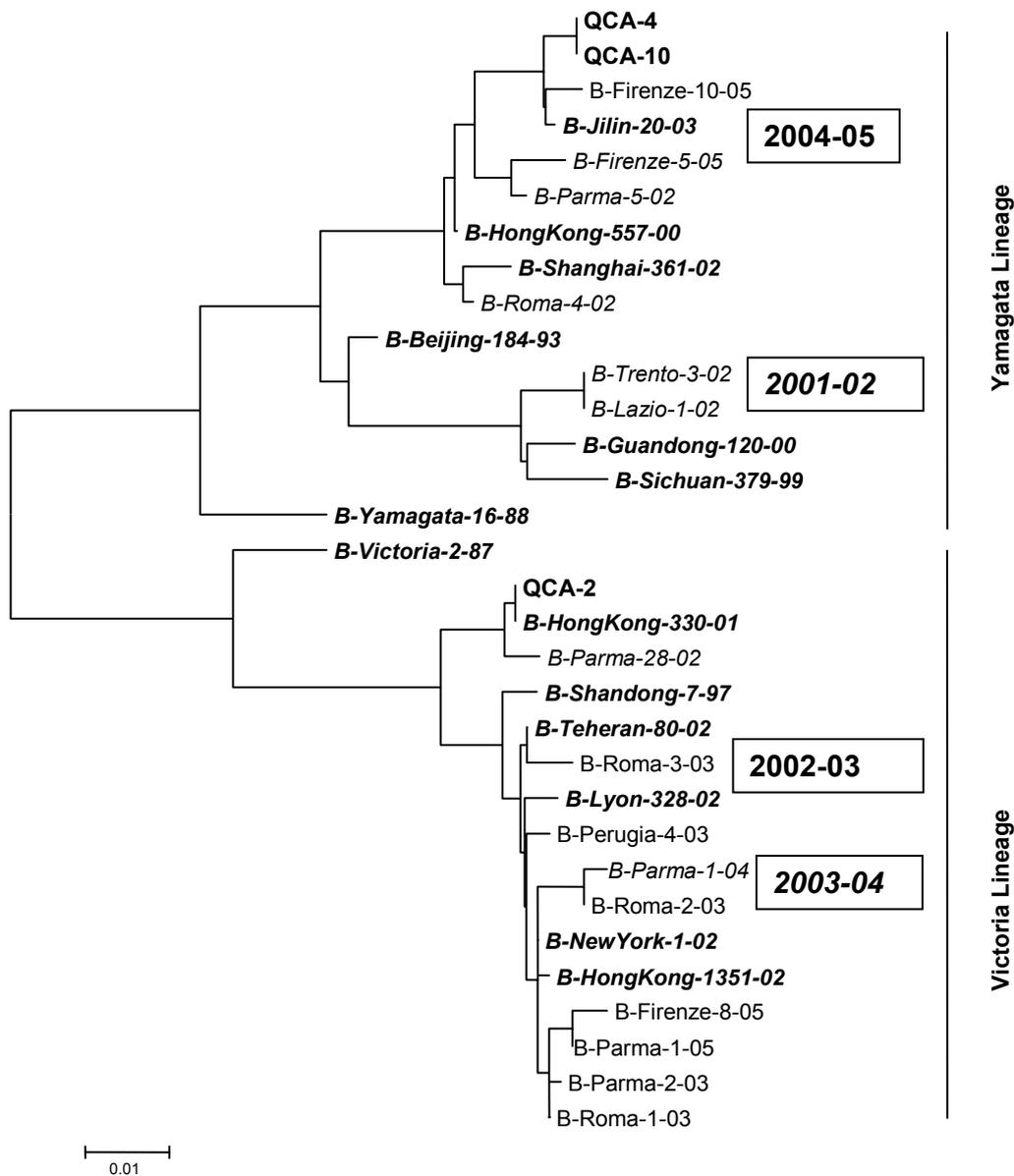


Figura 8. Analisi filogenetica relativa alla porzione HA1 dell'emagglutinina di virus influenzali B, comprendente i tre virus isolati nell'ambito del QCA-EISS

Successivamente, a ciascuno dei 32 laboratori partecipanti è stato inviato un resoconto completo dell'intero QCA. I risultati sono stati anche discussi al meeting annuale dell'EISS, tenutosi a Malta a maggio 2006 (Appendice A). Ad ogni laboratorio veniva assegnato un punteggio, sulla base dei risultati forniti, in termini di velocità di risposta, di numero di tecniche impiegate e precisione nelle analisi di caratterizzazione antigenica e molecolare. Soltanto otto laboratori, tra cui il NIC italiano (laboratorio n. 18), hanno ottenuto il punteggio massimo, come mostrato nella Figura 9.

QCA 2005		FULL PANEL		
codlab		Global SCORE	ERRORS	Ident SCORE
1	RSV Not typed	85	RSV (HEp2) - H3 Well (Panama) - H1 Not characterized	72
2		100	H3 Well (Panama)	86
4		100	B HK & A NY ND - H3 Wyom (NY) - B HK (B Jiangsu)	43
5	RSV Not typed	95		100
6	RSV Not typed	95	H3 NY (Panama)	86
7		85	H3 (MDCK)	100
8	RSV Not typed	95		100
9		100		ND
10	RSV Not typed	95		100
11	RSV Not typed	85	Neg (H3NY 1 000TCID50) - A Pan, A NY(2) & A NCal ND	43
12		100	H3 NY (Panama)	86
13		85	RSV (HEp2) - B + RSV (B Jiangsu) - H3 Well (Panama)	86
14		100		100
15		100		100
16	FLU A & RSV Not Typed	65	Inhibitor (HEp2)	ND
17		100		100
18	NIC	100		100
19		100	B dtc Jiangsu (Jiangsu) - H3 Wyom (NYx2)	57
20		30	H1 (B HK) - 3 Neg (H3Pan, VRS & NCal) - A+RSV (B Jiang) - B (H3 NY) - H3 (B Jiang)	ND
21		95	H1 (H3 Panama)	86
22		85	RSV (HEp2)	ND
23		100	H3 Well (Panama)	86
24	RSV Not typed	95		100
27		100	H3 Fujian (NYx2) - H1 NCal ND	57
28		100		100
29		100	H3 NY (Panama)	86
30	RSV Not typed	95		ND
31		100		100
32	RSV Not typed	95		ND
33		100		ND
34		100	H3 Panama, H3 NY & B Jiangsu ND	57
35	RSV Not typed	85	RSV (HEp2)	100
95		100		100

NIC Lyon

Figura 9. Punteggio attribuito ai laboratori partecipanti al QCA-EISS

PROGRAMMA DI VERIFICA DELLE CAPACITÀ DIAGNOSTICHE E DI CONTROLLO DI QUALITÀ (QCA) DEI LABORATORI COINVOLTI NELLA SORVEGLIANZA DELL'INFLUENZA IN ITALIA

I laboratori della rete italiana (INFLUNET) sono distribuiti in 14 Regioni. Pertanto, alcune Regioni rimangono completamente o parzialmente scoperte, particolarmente nell'Italia Meridionale. La non completa copertura geografica, che rappresenta una carenza in periodo interpandemico, diventa un problema di particolare rilevanza in caso di emergenza pandemica, perché diminuisce la capacità del Paese di individuare prontamente un virus pandemico.

Un altro problema, come già precedentemente descritto, è rappresentato dai livelli di competenza tecnico/scientifica dei laboratori: esiste, infatti, un'ampia eterogeneità, da questo punto di vista, tra i diversi centri periferici della rete, che non presentano tutti le capacità necessarie per eseguire diagnosi molecolare rapida e differenziale, fondamentale presidio per il controllo della pandemia.

Un'ulteriore carenza dell'attuale rete, in riferimento all'emergenza pandemica, è la quasi totale assenza al suo interno di laboratori ospedalieri, con particolare riguardo a quelli che sarebbero coinvolti nella gestione dei casi pandemici. Appare del tutto logico che in situazione pandemica sarebbe oltremodo vantaggioso che la diagnosi virologica venga effettuata dal laboratorio dell'Ospedale in cui il caso è ricoverato.

Per tali motivi, il NIC, su richiesta del Ministero della Salute, ha avviato un QCA italiano. La prima fase del Programma prevedeva la verifica delle capacità diagnostiche dei laboratori afferenti al NIC relative ai virus influenzali di tipo A (sottotipi H1N1, H3N2 ed H5) e di tipo B. I risultati ottenuti permetteranno di avviare, in una seconda fase, un programma di formazione che, attraverso opportuni corsi di addestramento tecnico, permetta di migliorare le capacità di diagnosi rapida su pazienti con sospetta infezione da virus influenzale pandemico.

Il protocollo del QCA italiano è riportato nell'Allegato 2 dell' Appendice B.

Bibliografia

1. Guan Y, Poon LLM, Cheung CY, Ellis TM, Lim W, Lipatov AS, Chan KH, Strum-Ramirez KM, Cheung CL, Leung YHC, Yuen KY, Webster RG, Peiris JSM. H5N1 influenza: a protean pandemic threat. *PNAS* 2004;101(21):8156-61.
2. Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJG, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, *et al.* Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 2004;430:209-13.
3. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J of Molecular Endocrinology* 2000;25:169-93.
4. Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgeth J. 3'-minor groove binder – DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 2000;28:655-61.
5. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez LD. 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* 2002;40:3256-60.

6. Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods* 2001;97:13-22.
7. Cattoli G, Drago A, Maniero S, Toffan A, Bertoli E, Fascina S, Terregino C, Robbi C, Vincenzoni G, Capua I. Comparison of three rapid detection system for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathol* 2004;33(4):432-7.
8. Payungporn S, Chutinimitkul S, Chaisingh A, Damrongwantanapokin S, Buranathai C, Amonsin A, theamboonlers A, Poovorawan Y. Single step multiplex real-time RT-PCR for H5N1 influenza A virus detection. *J Virol Methods* 2006;131:143-7.
9. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. New laboratory assay for diagnostic testing of avian influenza A/H5 (Asian lineage). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006;55(5):127.
10. Di Trani L, Bedini B, Donatelli I, Campitelli L, Chiappino B, De Marco M.A, Delogu M, Buonavoglia C, Vaccari G. A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza viruses using a MGB probe and an internal positive control. *BMC Infect Dis* 2006;6:87.

APPENDICE A

EISS - QCA 2005 Detection - culture - identification influenza and RSV viruses



Martine Valette
CNR des Virus Influenzae Region Sud – Lyon
WHO Collaborative Centre for respiratory Viruses
Laboratoire de Virologie Est – HCL

QCA 2005			INFLUENZA 8 SAMPLES				Score calculation (Negative - Type - Subtype)			
			Negative	Type	Subtype	Score				
1	Cells	MDCK				12,5				12,5
2	Influenza B	B/Honk Kong/330/2001	100	6,25	6,25					12,5
3	Influenza A H3N2	A/Panama/2007/99	100	6,25	6,25					12,5
4	Influenza B	B/Jiangsu/10/2003	100 000	6,25	6,25					12,5
5	Influenza A H3N2	A/New York/55/2004	100 000	6,25	6,25					12,5
8	Influenza A H1N1	A/New Caledonia/20/99	100	6,25	6,25					12,5
9	Influenza A H3N2	A/New York/55/2004	1 000	6,25	6,25					12,5
10	Influenza B	B/Jiangsu/10/2003	100	6,25	6,25					12,5

NIC Lyon

Figura A1. Determinazione dello score da attribuire nel QCA-EISS (novembre 2005)

QCA 2005			INFLUENZA VIRUSES IDENTIFICATION	
			7 SAMPLES	
			Score %	
2	B/Honk Kong/330/2001		14,3	
3	A/Panama/2007/99		14,3	
4	B/Jiangsu/10/2003		14,3	
5	A/New York/55/2004		14,3	
8	A/New Caledonia/20/99		14,3	
9	A/New York/55/2004		14,3	
10	B/Jiangsu/10/2003		14,3	

NIC Lyon

Figura A2. Determinazione dello score da attribuire nei saggi di identificazione dei virus influenzali del QCA -EISS

QCA 2005			INFLUENZA 8 SAMPLES		Score calculation (Negative - Type - Subtype)		
			Negative	Type	Subtype	Score	
1	Cells	MDCK	12,5			12,5	
2	Influenza B	B/Honk Kong/330/2001	100	6,25	6,25	12,5	
3	Influenza A H3N2	A/Panama/2007/99	100	6,25	6,25	12,5	
4	Influenza B	B/Jiangsu/10/2003	100 000	6,25	6,25	12,5	
5	Influenza A H3N2	A/New York/55/2004	100 000	6,25	6,25	12,5	
8	Influenza A H1N1	A/New Caledonia/20/99	100	6,25	6,25	12,5	
9	Influenza A H3N2	A/New York/55/2004	1 000	6,25	6,25	12,5	
10	Influenza B	B/Jiangsu/10/2003	100	6,25	6,25	12,5	

NIC Lyon

Figura A3. Risultati e score finali dei Laboratori partecipanti al QCA-EISS

**PROGRAMMA DI CONTROLLO DI QUALITÀ
DEI LABORATORI ITALIANI AFFERENTI ALLA RETE INFLUNET**

COSTRUZIONE E IMPLEMENTAZIONE DI UNA RETE DI LABORATORI PER LA SORVEGLIANZA VIROLOGICA DELL'INFLUENZA, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO ALLA DIAGNOSTICA DEI VIRUS INFLUENZALI CON POTENZIALE PANDEMICO

Analisi strutturata del problema

L'Italia partecipa al Programma Mondiale di Sorveglianza dell'Influenza dell'OMS sin dagli anni '60, attraverso il Centro Nazionale di riferimento (NIC-Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e immunomediate-MIPI, ISS), che si avvale della collaborazione di 15 laboratori periferici (rete di laboratori INFLUNET), principalmente collegati a strutture accademiche (Figura 1).

Tali laboratori sono presenti solo in 14 Regioni italiane. Esistono Regioni completamente o parzialmente scoperte, in particolare Regioni dell'Italia Meridionale, e altre che, in mancanza di laboratori regionali, si avvalgono del supporto di Regioni limitrofe, con risultati nel complesso poco soddisfacenti.

La non completa copertura geografica, che rappresenta una carenza in periodo interpandemico, diventa un problema di particolare rilevanza in caso di emergenza pandemia perché diminuisce la capacità del Paese di individuare prontamente un virus pandemico.

Un altro problema è rappresentato dai livelli di competenza tecnico/scientifica dei laboratori, che non presentano tutti, le capacità necessarie per eseguire diagnosi molecolare rapida e differenziale, fondamentale presidio per il controllo della pandemia. Infatti, in periodo pandemico la missione della rete non è più o soltanto la individuazione delle varianti antigeniche ai fini vaccinali, ma richiede la rapida, precoce ed efficiente diagnosi di laboratorio dell'influenza, al fine di circoscrivere i primi casi di influenza pandemica e di rallentarne la diffusione nella popolazione.

Un'ulteriore carenza dell'attuale rete in riferimento all'emergenza pandemica, è la quasi totale assenza, al suo interno di laboratori ospedalieri, con particolare riguardo a quelli che sarebbero coinvolti nella gestione dei casi pandemici. Appare del tutto logico che in situazione pandemica sarebbe oltremodo vantaggioso che la diagnosi virologica venga effettuata dal laboratorio dell'Ospedale in cui il caso è ricoverato.

Spiegazioni plausibili

Nonostante la sistematica attività di sensibilizzazione e i ripetuti inviti da parte del Ministero della Salute e del NIC, molte Regioni non hanno ancora individuato laboratori regionali, preferibilmente ospedalieri, da inserire nella rete INFLUNET. In conseguenza, la rete risulta insufficiente sia in periodo epidemico che in fase pandemica, per numero di laboratori coinvolti e per distribuzione sul territorio nazionale.

Il livello di competenza tecnica della rete è condizionato dal fatto che l'attuale sistema di sorveglianza virologica dell'influenza è prioritariamente calibrato su una diagnosi che permetta, attraverso metodiche tradizionali non rapide, la caratterizzazione antigenica dettagliata e completa delle varianti virali circolanti nella popolazione italiana, da inserire nella nuova formulazione vaccinale. La priorità di questo obiettivo nella sorveglianza stagionale dell'influenza, spiega anche la scarsa presenza di laboratori ospedalieri.

Soluzioni proposte

Per le ragioni sopradette, proponiamo un Progetto di Ricerca Applicata che abbia come obiettivo primario l'estensione e la qualificazione della rete INFLUNET in modo che possa soddisfare il fabbisogno diagnostico in periodo pandemico. Nello specifico, ci si propone di :

- estendere la copertura geografica in modo da disporre di almeno un laboratorio per Regione, (per milione di assistiti) individuando nuovi laboratori con particolare riferimento ai laboratori di Ospedali con Divisioni di Malattie Infettive e aventi capacità di isolamento di casi pandemici e strutture laboratoristiche di contenimento virologico, preferibilmente BSL3 certificate;

- attivare i nuovi laboratori individuati, fornendo il necessario supporto tecnico/scientifico, ivi comprese le strumentazioni necessarie per la diagnostica rapida di virus influenzale. Come primo obiettivo il numero di laboratori dovrebbe essere portato ad almeno 20;
- accreditare i laboratori della rete INFLUNET espansa attraverso un controllo di qualità (QCA), che, oltre a verificare le capacità diagnostiche dei laboratori, rappresenti una vera e propria simulazione pandemica, utilizzando anche campioni biologici contenenti virus inattivati appartenenti a sottotipi potenzialmente pandemici, come l'H5 e l'H7.

Successivamente e in base ai risultati del QCA, sarà svolto dal NIC un programma di formazione e addestramento tecnico, finalizzato a migliorare le capacità diagnostiche dei laboratori per l'identificazione tempestiva dei primi casi di infezione da virus pandemico nel Paese. Ciò prevede di:

- a) dotare tutti i laboratori della capacità di eseguire analisi molecolari per la diagnosi di influenza (RT-PCR) e, ove possibile;
- b) implementare tecniche di analisi differenziale rapida per la diagnosi, la tipizzazione e la sottotipizzazione dei virus influenzali (RealTime-PCR);
- c) standardizzare le metodologie di rilevamento e caratterizzazione, anche attraverso la validazione di kit diagnostici commerciali.

Costruire infine un network stabile di rapporti scientifici collaborativi, di tipo anche formativo e di controlli di qualità routinaria fra il NIC e i laboratori della rete INFLUNET espansa, in modo che possa essere resa stabilmente funzionale e continuamente migliorabile la preparazione del Paese nella diagnostica virologica.

Fattibilità

Il NIC, che si propone come organizzatore e coordinatore del presente progetto, possiede tutte le competenze professionali e strutture necessarie al suo svolgimento, come dimostrato, fra l'altro, dal pieno superamento del recente QCA organizzato dal WHO. Il Dipartimento MIPI dell'ISS metterà a disposizione del Progetto le competenze tecnico-scientifiche e amministrative per il pieno raggiungimento degli Obiettivi Progettuali

Criticità

La criticità maggiore riteniamo risieda non negli aspetti tecnico-scientifici o nel trasferimento di competenze e risorse ma nella rapida individuazione dei nuovi laboratori da inserire nella rete INFLUNET espansa, con la necessaria verifica del livello di base di competenze, risorse umane e strumentali ivi esistenti. In proposito si ritiene che gli Organi Ministeriali o Regionali competenti alla designazione, ferma restando ogni loro autonoma determinazione, individuino questi laboratori in base ai criteri di cui all'Appendice B.

Bibliografia

1. Pregliasco F, Puzelli S, Mensi C, Anselmi G, Marinello R, Tanzi ML, Affinito C, Zambon MC, Donatelli I, The Collaborative Group Influchild. Influenza virological surveillance in children: the use of the QuickVue rapid diagnostic test. *J Med Virol* 2004;73(2):269-73.
2. Puzelli S, Frezza F, Fabiani C, Ansaldi F, Campitelli L, Lin YP, Gregory V, Bennett M, D'Agaro P, Campello C, Crovari P, Hay A, Donatelli I. Changes in the hemagglutinins and neuraminidases of human influenza B viruses isolated in Italy during the 2001-02, 2002-03, and 2003-04 seasons. *J Med Virol* 2004;74(4):629-40.
3. Puzelli S, Di Trani L, Fabiani C, Campitelli L, De Marco MA, Capua I, Aguilera JF, Zambon M, Donatelli I. Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. *J Infect Dis* 2005;192(8):1318-22.
4. Puzelli S, Boros S, Affinito C, Calzoletti L, Facchini M, Danaya RT, Owen IL, Pozio E, Rezza G, Donatelli I. Prevalence of antibodies against A and B influenza viruses in South-Western Papua New Guinea. *J Med Virol* 2006;78(6):820-4.

5. World Health Organization. Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans. Geneva: WHO; June 2005. Disponibile all'indirizzo: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/avian_labtests2.pdf; ultima consultazione 27/9/06.
6. World Health Organization. WHO laboratory biosafety guidelines for handling specimens suspected of containing avian influenza A virus. Geneva: WHO; January 2005. Disponibile all'indirizzo: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/; ultima consultazione 27/9/06.

Obiettivo generale

Rafforzare la rete dei laboratori diagnostici per la sorveglianza virologica dell'influenza in Italia affinché essa possa meglio svolgere le attività previste dal Programma dell'OMS in periodo inter pandemico e al contempo essere utilizzata in situazioni di emergenza pandemica.

Obiettivo specifico 1

Ampliare la copertura geografica della rete INFLUNET, con la collaborazione delle Regioni: identificazione dei nuovi laboratori e verifica del possesso dei requisiti richiesti (strutture di biocontenimento, competenze e attrezzature laboratoristiche) (Allegato 1).

Per il raggiungimento dell'Obiettivo Specifico 1 è previsto l'invio alle Regioni di una lettera di invito ad identificare e segnalare i laboratori da inserire nella rete, con particolare riferimento ai laboratori ospedalieri, in base a specifici prerequisiti tecnici indispensabili.

Verrà fornito supporto tecnico/scientifico per dotare ogni laboratorio delle capacità diagnostiche necessarie alla diagnosi differenziale di influenza

Obiettivo specifico 2

Validare i vecchi e nuovi laboratori della rete INFLUNET, attraverso un Controllo di Qualità (QCA) in grado di verificare il loro livello di competenza tecnica per la diagnosi di virus influenzali epidemici e pandemici.

Per il raggiungimento dell'Obiettivo Specifico 2 è prevista la distribuzione di un questionario, finalizzato alla conoscenza delle tecniche e dei reagenti impiegati da ogni laboratorio per la diagnosi dell'influenza di tipo A (e relativi sottotipi) e di tipo B. Successivamente, ogni laboratorio riceverà un pannello di almeno 10 campioni clinici simulati, contenenti miscele di cellule non infettate, che saranno usate come controllo negativo, e di cellule infettate con diverse concentrazioni di virus appartenenti a tipi e sottotipi diversi di virus influenzali. Verranno preparati 2 distinti pannelli di campioni, di cui uno contenente virus influenzali umani stagionali di tipo A - sottotipo H3 ed H1 - e di tipo B, e l'altro costituito da virus H5N1 e H7N1 e H7N3 inattivati. Il primo set sarà inviato a tutti i laboratori partecipanti, mentre il secondo verrà consegnato solo ai Laboratori dotati di strutture di biosicurezza adeguate (BSL3 od almeno BSL2-rafforzate)

I risultati saranno valutati dal NIC secondo gli standard internazionali, in particolare del WHO, per l'assessment dei QCA e resi noti a tutti i laboratori partecipanti.

Il protocollo e il questionario sono contenuti in dettaglio nell' Allegato 2.

Obiettivo specifico 3

Svolgere un programma di formazione attraverso opportuni corsi di addestramento tecnico allo scopo di migliorare le capacità di diagnosi rapida su campioni biologici da pazienti con sospetta infezione da virus potenzialmente pandemici. Addestramento di formatori. Standardizzazione delle metodiche utilizzabili.

Per il raggiungimento dell'Obiettivo Specifico 3, i risultati del QCA, come sopra evidenziato, serviranno ad identificare i laboratori il cui personale sia da sottoporre ad un corso di addestramento tecnico specifico presso il NIC. In base alle potenzialità, il personale di alcuni laboratori sarà addestrato per il raggiungimento dell'obiettivo minimo (uso della RT(ReverseTranscription)-PCR), mentre altri saranno istruiti all'uso della RealTime-PCR.

Successivamente ciascun laboratorio sarà sottoposto a verifica delle capacità acquisite, attraverso l'invio di un nuovo pannello di campioni clinici simulati, da analizzare tramite le diverse metodiche di biologia molecolare.

E' anche prevista la costituzione di un gruppo di formatori tecnico/laboratoristici, addestrati dal NIC, che svolgeranno nell'intero arco dell'anno un programma di verifica del livello di competenza tecnica e di aggiornamento metodologico dei laboratori, attraverso "audit" e training tecnico presso i laboratori periferici.

Inoltre verranno valutate le diverse metodologie diagnostiche utilizzate e utilizzabili, mettendo a confronto protocolli sperimentali "in-house" e kit diagnostici commerciali.

Piani di valutazione per ogni obiettivo specifico

Obiettivo specifico 1	Ampliare la copertura geografica della rete INFLUNET, con la collaborazione delle Regioni: identificazione dei nuovi laboratori e verifica del possesso dei requisiti richiesti	
Indicatore di risultato	Adesione delle Regioni al programma	
Standard di risultato	Numero di riscontri positivi	
Azione	Indicatore/i di processo	Standard di processo
Invio lettere di invito alle Regioni	Numero di risposte laboratori che aderiscono alla sorveglianza	≥ 90% risposte dalle Regioni scoperte
Verifica requisiti tecnici	Possesso dei requisiti richiesti	100% dei laboratori in possesso dei requisiti

CRONOGRAMMA

Mese	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Invio lettera alle Regioni												
Valutazione delle risposte e verifica dei requisiti richiesti												
Formalizzazione da parte della Conferenza Stato-Regioni / CCM												

Obiettivo specifico 2	Validare i laboratori della rete INFLUNET, attraverso un Controllo di Qualità (QCA) in grado di verificare il loro livello di competenza tecnica per la diagnosi di virus influenzali epidemici e pandemici	
Indicatore di risultato	Risposte al questionario e risultati dell'analisi dei campioni	
Standard di risultato	Conoscenza delle attuali capacità diagnostiche dei laboratori	
Azione	Indicatore/i di processo	Standard di processo
Elaborazione e distribuzione del questionario	Numero di questionari compilati e restituiti al NIC	100% di questionari compilati e restituiti
Preparazione e distribuzione dei campioni ai laboratori e analisi degli stessi	Risultati preliminari e definitivi, inviati al 7° e 28° giorno, rispettivamente	Superamento soglia di validazione
Valutazione dei risultati	Metodi di verifica del WHO	Concordanza con il metodo WHO

CRONOGRAMMA

Mese	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Preparazione del questionario		■	■			■			■			■
Preparazione dei reagenti (antisieri e antigeni virali di referenza)		■	■			■			■			■
Invio del questionario ai laboratori partecipanti			■			■			■			■
Raccolta dei questionari compilati e analisi delle risposte			■			■			■			■
Preparazione dei campioni simulati			■			■			■			■
Invio dei campioni ai laboratori			■			■			■			■
Raccolta dei risultati inviati dai laboratori			■	■		■			■			■
Analisi dei risultati e assegnazione di un punteggio finale			■	■		■			■			■
Rendicontazione ai laboratori			■		■	■			■			■

Obiettivo specifico 3	Programma di formazione con opportuni corsi di addestramento tecnico/laboratoristico, privilegiando corsi per formatori Standardizzazione dei protocolli tecnici	
Indicatore di risultato	Miglioramento (o adeguamento) delle capacità di diagnosi rapida	
Standard di risultato	100% affidabilità dei risultati forniti dai laboratori coinvolti nell'addestramento	
Azione	Indicatore/i di processo	Standard di processo
Corsi di addestramento tecnico laboratoristico	Numero di tecnici/ricercatori formati sul totale	90-100% di tecnici/ricercatori formati
	Numero di formatori addestrati	90-100% di formatori addestrati
Verifica delle capacità acquisite attraverso l'invio di un pannello di campioni	Tempo di analisi dei campioni	Superamento soglia di validazione (criteri da protocollo)

CRONOGRAMMA

Mese	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Addestramento tecnico *												
Invio secondo pannello campioni ai laboratori addestrati												
Esame campioni e invio risposte al NIC												
Realizzazione e comunicazione di un report finale												

* È prevista una verifica delle persone formate, con selezione di alcuni di essi da utilizzare come formatori. La durata dei corsi di addestramento dipenderà dal numero dei laboratori coinvolti e dal numero delle tecniche da trasferire. Questo in considerazione di: a) capacità diagnostiche dei laboratori attualmente molto diversificate; b) coinvolgimento, per la stagione influenzale 2005/06, di nuovi laboratori (Università di Palermo, Università di Padova).

**1° ANNO
CRONOGRAMMA GENERALE**

Mese	rendicontazione											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Invio lettera alle Regioni	■		■			■			■			■
Valutazione delle risposte e verifica dei requisiti richiesti		■	■			■			■			■
Formalizzazione da parte della Conferenza Stato-Regioni /CCM			■			■			■			■
Preparazione del questionario		■	■			■			■			■
Preparazione dei reagenti (antisieri e antigeni virali di referenza)		■	■			■			■			■
Invio del questionario ai laboratori partecipanti			■			■			■			■
Raccolta dei questionari compilati e analisi delle risposte			■			■			■			■
Preparazione dei campioni simulati			■			■			■			■
Invio dei campioni ai laboratori			■			■			■			■
Raccolta dei risultati inviati dai laboratori			■	■		■			■			■
Analisi dei risultati e assegnazione di un punteggio finale			■	■		■			■			■
Rendicontazione ai laboratori			■		■	■			■			■
Addestramento tecnico			■			■	■	■	■			■
Invio secondo pannello campioni ai laboratori addestrati			■			■			■	■		■
Esame campioni e invio risposte al NIC			■			■			■		■	■
Realizzazione e comunicazione di un report finale			■			■			■			■

**2° ANNO
CRONOGRAMMA GENERALE**

Mese	rendicontazione											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Selezione formatori	■	■	■			■			■			■
Formazione di nuovo personale da parte dei formatori			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Verifica di tutti i processi e istituzione di collaborazioni stabili nella rete			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Allegato 1

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 Biotecnologie 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)

Allegato 2

**Il protocollo e il questionario
per il Programma di Controllo di Qualità (QCA)**

PROGRAMMA DI VERIFICA DELLE CAPACITÀ DIAGNOSTICHE E DI CONTROLLO DI QUALITÀ DELLA RETE DI LABORATORI COINVOLTI NELLA SORVEGLIANZA DELL'INFLUENZA

Premessa

Il presente Programma verrà svolto nell'ambito delle attività previste dal Piano Pandemico Nazionale e finalizzate al miglioramento della capacità di risposta del Paese in caso di emergenza pandemica. Infatti, una delle azioni chiave previste dal Piano riguarda appunto la capacità di identificare tempestivamente i casi umani di influenza aviaria in modo da circoscrivere il caso con opportune misure di isolamento e di profilassi "ad anello" intorno al primo caso o al primo focolaio di casi. Interventi di questo tipo possono significativamente ritardare la diffusione dell'epidemia fino alla disponibilità del vaccino pandemico.

E' dunque importante rafforzare la rete diagnostica già coinvolta nel controllo delle infezioni influenzali in periodo interpandemico, in modo da assicurare che la stessa posseda in tutti i suoi nodi le capacità per una diagnosi molecolare rapida dei virus influenzali umani, inclusi quelli potenzialmente pandemici.

Obiettivi

Il Programma si propone in una prima fase di verificare le capacità dei laboratori afferenti al Centro Nazionale per l'Influenza (NIC, Dipartimento MIPI- ISS) di diagnosticare i virus influenzali di tipo A (sottotipi H1N1, H3N2 ed H5) e di tipo B presenti in campioni clinici, a diversa concentrazione virale.

I risultati ottenuti permetteranno di avviare, in una seconda fase, un programma di formazione che, attraverso opportuni corsi di addestramento tecnico, sia in grado di migliorare le capacità di diagnosi rapida su pazienti con sospetta infezione da virus influenzale pandemico.

Strutture coinvolte

Al Programma parteciperanno i laboratori universitari della rete INFLUNET e 6 laboratori ospedalieri che saranno selezionati tra i principali ospedali infettivologici del Paese.

Il coordinamento centrale sarà svolto dal NIC che provvederà a:

- preparare e inviare un questionario conoscitivo ai laboratori partecipanti
- allestire e distribuire campioni clinici "simulati", contenenti differenti ceppi influenzali, a varie concentrazioni
- valutare i dati forniti dai diversi laboratori e l'efficienza delle tecniche diagnostiche adoperate
- notificare a ciascun laboratorio partecipante i rispettivi risultati
- certificare il superamento del controllo di qualità, valicandone specificamente la tecnica impiegata e i virus correttamente identificati

Articolazione del Programma

Più in dettaglio, lo studio si baserà sia su metodi di coltura cellulare che di identificazione di componenti virali.

Il questionario sarà finalizzato alla conoscenza delle tecniche e dei reagenti impiegati per la diagnosi dell'influenza da ogni laboratorio (metodi di rilevamento rapido dell'antigene, metodi di rilevamento del genoma mediante reazioni di PCR e di Real-Time PCR, colture cellulari, metodi di caratterizzazione sierologica e di sequenziamento molecolare).

Ai laboratori verrà richiesto di eseguire l'analisi dei campioni inviati dal NIC mediante le tecniche diagnostiche solitamente impiegate, per campioni clinici respiratori, come riportato nel questionario.

I campioni respiratori “simulati” saranno costituiti da una miscela di cellule infettate e non-infettate, contenenti diverse concentrazioni virali.

Verrà proposto un pannello di almeno 10 campioni codificati (2ml per ogni campione).

La spedizione dei campioni verrà effettuata a +4 °C, al fine di consentire anche l'eventuale esecuzione del test di immunofluorescenza (IF) e/o l'isolamento del virus in colture cellulari.

Tutti i campioni saranno inviati nello stesso giorno dal NIC di Roma. Il NIC contatterà la persona responsabile dello studio in ciascuno dei laboratori e organizzerà l'invio. Dovrà inoltre essere informato dal corriere riguardo ad ogni eventuale ritardo o disagio nel trasporto del materiale destinato a ciascun Laboratorio.

Risultati

Ciascun partecipante avrà 2 gruppi di risultati da inviare all'ISS, con le seguenti scadenze a partire dal giorno di ricevimento dei campioni:

- dopo 7 GIORNI, il laboratorio dovrà fornire i risultati preliminari (Negativo – Positivo e indicazione del Tipo antigenico);
- dopo 28 GIORNI, il laboratorio dovrà fornire i risultati completi (Negativo – Positivo e identificazione del Tipo / Sottotipo e della variante antigenica);
- nessun promemoria o richiamo partirà dall'ISS in caso di ritardo nell'invio dei risultati;
- la sottotipizzazione dei virus influenzali di tipo A può essere eseguita mediante diagnosi molecolare od altre tecniche;
- l'identificazione dei ceppi di virus influenzale può essere eseguita sia attraverso la caratterizzazione antigenica sia mediante caratterizzazione genetica;
- i partecipanti dovranno inviare una copia della tabella di caratterizzazione antigenica (test HI) o del confronto filogenetico delle emagglutinine virali;
- i risultati di ciascun laboratorio resteranno anonimi (l'ISS assegnerà un numero in codice a ciascun partecipante) e strettamente confidenziali tra il Laboratorio partecipante e l'ISS;
- i campioni decodificati saranno resi noti a ciascun partecipante contemporaneamente al 28° giorno+1.

L'ISS analizzerà e presenterà a tutti i partecipanti:

- i risultati preliminari (a 7 giorni dopo il ricevimento dei campioni) che serviranno a valutare sia la rapidità sia la sensibilità e specificità delle tecniche e dei reagenti usati per il rilevamento diretto dell'antigene;
- i risultati finali utili per determinare il Punteggio Globale sulla base delle differenti concentrazioni di virus nei campioni simulati.

Sarà stabilita una Soglia di Validazione.

Resoconto

Ogni partecipante verrà a conoscenza dei propri risultati non appena riceverà la decodificazione dei campioni.

Ogni Laboratorio che mostrerà di avere un risultato al di sotto della Soglia di Validazione dovrà seguire un corso di addestramento. Il risultato resterà comunque confidenziale tra l'ISS (organizzatore del QCA) e il Laboratorio interessato.

Questionario

Capacità diagnostiche dei Laboratori della rete INFLUNET

Febbraio 2006

*Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate
(Centro Nazionale OMS per la sorveglianza dell'influenza)*

(questionario preparato, su richieste del CCM, seguendo le linee guida della rete europea EISS/WHO)

Inviare il questionario compilato al seguente indirizzo:

Isabella Donatelli
Direttore Reparto Malattie Virali e Vaccini Inattivati
Direttore Centro Nazionale Influenza - OMS
Viale Regina Elena, 299
00161 Roma (ITALIA)
tel. +3949903257/3243
fax +3949902082
e-mail: donatell@iss.it
Isabella.donatelli@iss.it

Introduzione

Lo scopo di questo questionario è quello di fornire al Centro Nazionale Influenza (NIC) informazioni relative alle capacità dei laboratori periferici afferenti al sistema di sorveglianza virologica di diagnosticare virus influenzali stagionali e virus emergenti a potenziale pandemico.

I risultati del questionario saranno analizzati dal NIC nell'ambito di un Programma di Valutazione e Controllo di Qualità (QCA).

Il fine ultimo di questo questionario è, quindi, di avere una risposta da tutti i laboratori coinvolti sui seguenti argomenti:

- 1) Il vostro laboratorio è in grado di identificare tutti i virus influenzali dai campioni clinici?
- 2) Quali sottotipi, nell'ambito dei virus di tipo A, il vostro laboratorio è in grado di identificare autonomamente?
- 3) Qualora non foste in grado di effettuare i test di sottotipizzazione, in quanto tempo e in che modo sareste in grado di fornire comunque una risposta?
- 4) Se dovesse emergere un virus influenzale altamente patogeno, il vostro laboratorio è in grado di analizzarlo?

Al fine di ottenere un quadro completo e dettagliato del grado di preparazione di ciascun laboratorio, vi sottoponiamo una serie di domande.

Si prega di utilizzare il segno tra parentesi (√) quando si compila elettronicamente il questionario; è possibile utilizzarlo mediante un'operazione copia/incolla

A. Informazioni relative al Laboratorio partecipante

Q1. Laboratorio:

Nome dell'Istituto/Università/Ospedale: _____

Indirizzo: _____

Contatti: _____

Telefono: _____

E-mail: _____

Responsabile del laboratorio:

Nome: _____

Telefono: _____

E-mail: _____

Data in cui è stato compilato il questionario: _____

B. Rilevamento dei virus influenzali

Q2. Quali test vengono effettuati routinariamente nel vostro laboratorio per l'identificazione dei virus influenzali? Si prega di indicare se vengono effettuati test diversi per i virus di tipo A e B.

- a) Test 1: colture
 uova
 cellule _____
- b) Test 2: RT-PCR
 Quale(i) gene(i)?: _____
 Conferma:
 nessun tipo di conferma
 ibridazione con sonde
 reazioni di sequenziamento
 altro: _____
- c) Test 3: ELISA, prego specificare: _____

- d) Test 4: Immunofluorescenza diretta, prego specificare: _____

- e) Test 5: altro, prego specificare: _____

Q3. Quale dei test citati in Q2 viene utilizzato per i campioni clinici prelevati durante la stagione di sorveglianza da medici sentinella e quale per i campioni da medici non-sentinella?

	Sentinella		Non-Sentinella	
a) Test 1	<input type="checkbox"/> Sì	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sì	<input type="checkbox"/> No
b) Test 2	<input type="checkbox"/> Sì	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sì	<input type="checkbox"/> No
c) Test 3	<input type="checkbox"/> Sì	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sì	<input type="checkbox"/> No
d) Test 4	<input type="checkbox"/> Sì	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sì	<input type="checkbox"/> No
e) Test 5	<input type="checkbox"/> Sì	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sì	<input type="checkbox"/> No

Nota: Test 1=Coltura; Test 2=RT-PCR; Test 3=ELISA; Test 4= IF; Test 5=Altro

Q4. I test menzionati in Q2 sono in grado di rilevare tutti i sottotipi (H1-H16) dei virus influenzali di tipo A ?

- a) Test 1 Sì No
 b) Test 2 Sì No
 c) Test 3 Sì No
 d) Test 4 Sì No
 e) Test 5 Sì No
 f) Commenti: _____

Nota: Test 1=coltura; Test 2=RT-PCR; Test 3=ELISA; Test 4= IF; Test 5=altro

Q5. Se in Q4 avete risposto con un no, quale sottotipo H siete in grado di rilevare?

- a) Test 1 H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8
 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16
- b) Test 2 H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8
 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16
- c) Test 3 H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8
 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16
- d) Test 4 H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8
 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16
- e) Test 5 H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8
 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16

Nota: Test 1=coltura; Test 2=RT-PCR; Test 3=ELISA; Test 4= IF ; Test 5=altro

Q6. I test elencati in Q2 sono in grado di rilevare tutti i virus influenzali di tipo B?

- a) Test 1 Sì No
- b) Test 2 Sì No
- c) Test 3 Sì No
- d) Test 4 Sì No

Nota: Test 1=coltura; Test 2=RT-PCR; Test 3=ELISA; Test 4= IF ; Test 5=altro

Q7. Quale test aggiuntivo è in grado di eseguire il vostro laboratorio, oltre ai test di routine sopra descritti, per l'identificazione dei virus influenzali di tipo A e B? Descrivere brevemente i test, prestando particolare attenzione alla domande sopra citate (tipo di test, se è in grado di identificare tutti o soltanto alcuni sottotipi, etc.).

Virus influenzali A:

Virus influenzali B:

C. Tipizzazione e sottotipizzazione dei virus influenzali

Q8. Quale test viene routinariamente eseguito nel vostro laboratorio per la tipizzazione dei virus influenzali (risultato: virus A o B). Specificare se è diverso per virus influenzali A e B.

a) **Test 1: Inibizione dell'emagglutinazione**

Tipo di eritrociti impiegati:

Pollo

Tacchino

Cavia

Altro, specificare: _____

Sieri utilizzati

Siero di furetto

Siero di pollo

Altro: _____

b) **Test 2: RT-PCR**

Quale(i) gene(i): _____

Conferma:

nessun tipo di conferma

ibridazione con sonde

reazioni di sequenziamento

Altro: _____

c) **Test 3: ELISA**

d) **Test 4: Immunofluorescenza**

e) **Test 5: Altro, quale?:** _____

f) **Nessuno**

Q9. Quale test viene routinariamente impiegato nel vostro laboratorio per la sottotipizzazione dei virus influenzali A? Specificare tutti i test messi a punto.

a) **Test 1: Inibizione dell'emagglutinazione**

Tipo di eritrociti impiegati :

Pollo

Tacchino

Cavia

Altro: _____

Sieri utilizzati

Siero di furetto

Siero di pollo

Altro: _____

b) **Test 2: RT-PCR**

Conferma:

nessun tipo di conferma

ibridazione con sonde

reazioni di sequenziamento

Altro: _____

c) **Test 3: ELISA**

d) **Test 4: Altro, quale?:** _____

e) **Nessuno**

**Q10. Quale sottotipo (H-) viene di norma identificato presso il vostro laboratorio?
Controllare per ogni test come in Q9.**

- a) Test 1 H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8
 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16
- b) Test 2 H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8
 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16
- c) Test 3 H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8
 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16
- d) Test 4 H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8
 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16
- e) Test 5 H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8
 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16

Nota: Test 1=Inibizione dell'emagglutinazione; Test 2=RT-PCR; Test 3=ELISA; Test 4=Altro

Q11. Quale test è statomesso a punto nel vostro laboratorio per la sottotipizzazione della neuraminidasi (N-) dei virus influenzali A identificati?

- a) Test 1: Inibizione della neuraminidasi
- b) Test 2: RT-PCR
Conferma:
 Nessun tipo di conferma
 Ibridazione con sonde
 reazioni di sequenziamento
 Altro: _____
- c) Test 3: ELISA
- d) Test 4: Altro (quale?) _____
- e) Nessuno

**Q12. Quale sottotipo N- viene normalmente identificato nel vostro laboratorio.
Controllare per ogni test come in Q11.**

- a) Test 1 N1 N2 N3 N4 N5 N6 N7 N8 N9
- b) Test 2 N1 N2 N3 N4 N5 N6 N7 N8 N9
- c) Test 3 N1 N2 N3 N4 N5 N6 N7 N8 N9
- d) Test 4 N1 N2 N3 N4 N5 N6 N7 N8 N9

Nota: Test 1=Inibizione della neuraminidasi; Test 2=RT-PCR; Test 3=ELISA; Test 4=Altro

Q13. Vengono utilizzati test diversi per la sottotipizzazione delle HA o delle NA di campioni sentinella e campioni non – sentinella

- a) Sì, specificare:
Tipizzazione
Sentinella: _____
Non-sentinella: _____
HA-Sottotipizzazione
Sentinella: _____
Non-sentinella: _____
NA-sottotipizzazione
Sentinella: _____
Non-sentinella: _____
- b) No

Q14. Quando i virus identificati di tipo A sembrano apparentemente non sottotipizzabili mediante le vostre tecniche routinarie, quale test aggiuntivo potete utilizzare per la sottotipizzazione H e/o N?

a) **Inibizione dell'emagglutinazione**

Tutti i virus di sottotipo H- disponibili presso il vostro laboratorio:

Tutti gli antisieri per il sottotipo H- disponibili nel vostro laboratorio:

b) **Inibizione della neuraminidasi**

Tutti i virus di sottotipo N- disponibili presso il vostro laboratorio:

Tutti gli antisieri per il sottotipo N- disponibile nel vostro laboratorio

c) **RT-PCR**

Gene:

H

H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8
 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16

N

N1 N2 N3 N4 N5 N6 N7 N8 N9

Conferma:

H

Nessuna
 Ibridazione
 Sequenziamento
 Altro:

N

Nessuna
 Ibridazione
 Sequenziamento
 Altro:

d) **Altro :** _____

e) **Nessuno**

Q15. Se siete in grado di sottotipizzare i virus A, mediamente quanto tempo vi occorre per ottenere il risultato di sottotipizzazione, dal momento della ricezione dei campioni?

Numero di ore: _____

Numero di giorni : _____

Q16. Se dovete mandare in un altro laboratorio un isolato virale di tipo A per la sottotipizzazione (perchè non siete in grado di sottotipizzare o perchè l'isolato in questione non è sottotipizzabile presso il vostro laboratorio), mediamente quanto tempo vi occorre, dal momento di ricezione del campione fino al risultato della sottotipizzazione?

Numero di giorni: _____

Q17. Il vostro laboratorio ha la possibilità di implementare o attivare ulteriori tecniche di sottotipizzazione al momento non disponibili?

a) **Si**: _____

b) **No**

c) **Commenti**: _____

Q18. Se avete risposto positivamente alla Q17, avete bisogno di ulteriori strumenti e/o reagenti

a) **Attrezzature**

Si: _____

Pensate di acquistare strumentazioni?

Si, entro 1 anno

Si, in 5 anni

No

No

Commenti: _____

b) **Reagenti**

Si, : _____

possono essere ottenuti tramite: _____

No

Commenti: _____

Q19. Quanti giorni sono necessari per incrementare o attivare test volti ad identificare virus influenzali emergenti che normalmente non analizzate?

Descrivere sommariamente la strategia e indicare il numero di giorni di cui avete bisogno nel modo più preciso possibile

Strategie: _____

Numero di giorni: _____

Q20. Nel vostro laboratorio si eseguono analisi di confronto tra gli isolati virali ed i ceppi vaccinali e/o i virus influenzali precedentemente isolati al fine di analizzare il drift (analisi delle varianti)?

a) Virus influenzali A

- Si, utilizza:**
 - Inibizione dell'emagglutinazione**
 - Sequenziamento genomico:** _____
 - No, gli isolati virali vengono mandati presso un altro laboratorio, (specificare Nome ed indirizzo)**

- No**

b) Virus influenzali B

- Si, utilizza:**
 - Inibizione dell'emagglutinazione**
 - Sequenziamento, quale gene?:** _____
 - No, gli isolati virali vengono mandati presso un altro laboratorio, (specificare Nome ed indirizzo)**

- No**

b) Commenti: _____

Q21. Se il vostro laboratorio identifica un virus influenzale driftato o nuovo, esiste la possibilità di isolare tale virus da materiale clinico in uova embrionate di pollo al fine di ottenere un isolato virale utilizzabile come candidato vaccinale?

- a) **Si**
- b) **No**
- c) **Commenti:** _____

D. Analisi sierologiche dei virus influenzali

Q22. Che tipo di anticorpi diretti verso i virus influenzali sono evidenziabili nel vostro laboratorio? Indicare dove necessario il tipo di anticorpi evidenziabili (IgM, IgA, sIgA, IgG).

- a) Fissazione del complemento, specificare il tipo di virus influenzali verso i quali possono essere identificati gli anticorpi: _____

- b) Inibizione dell'emagglutinazione, rileva anticorpi verso:
 - H1 H3 H5 H7 H9
 - Altri sottotipi di influenza A : _____

 - Influenza B
- c) ELISA:
 - specifico per influenza tipo A , specificare l'antigene contro cui vengono rilevati gli anticorpi _____

 - specifico per influenza tipo B , specificare l'antigene contro cui vengono rilevati gli anticorpi _____

 - specifico per sottotipo influenza A , specificare l'antigene contro cui vengono rilevati gli anticorpi _____

 - Altro: _____

- d) Neutralizzazione virale, specificare i tipi di virus influenzali ed i sottotipi contro cui vengono rilevati gli anticorpi _____

- e) Immunofluorescenza, specificare i tipi di virus influenzali contro cui vengono rilevati gli anticorpi _____

- f) Western blot, specificare gli antigeni contro cui vengono rilevati gli anticorpi _____

- g) Altri saggi: _____

- h) Nessuno
- i) **Commenti:** _____

Q23. Se utilizzate la sierologia, in che modo viene utilizzata nel vostro laboratorio?

- a) Diagnosi
 - b) Sorveglianza
 - c) Altro: _____
 - d) Commenti: _____
- _____
- _____

Q24. Se utilizzate la sierologia, quale è il numero dei campioni analizzati per paziente?

- a) Uno,
media di giorni dal prelievo del campione dopo il primo giorno di malattia: _____
 - b) Due,
media di giorni dal prelievo del primo campione dopo il primo giorno di malattia: _____
media di giorni tra il primo ed il secondo campione : _____
 - c) Tre,
media di giorni dal prelievo del primo campione dopo il primo giorno di malattia: _____
media di giorni tra il primo ed il secondo campione: _____
media di giorni tra il secondo ed il terzo campione: _____
 - d) Altro: _____
 - e) **Commenti:** _____
- _____
- _____
- _____

Q25. Se non eseguite saggi sierologici nel vostro laboratorio, quanto tempo vi occorrerebbe per implementare tali test? Indicare i saggi che vorreste implementare e una stima dei giorni necessari per attuare ciò nel modo più accurato possibile

- a) saggio(i): _____
- _____
- Numero di giorni: _____
- Nessun programma di implementazione della sierologia

E. Disponibilità di strutture di contenimento biologico

Q26. Disponete di accesso immediato a strutture di contenimento biologico per poter manipolare campioni clinici potenzialmente contenenti virus influenzali altamente patogeni (Allegato A)?

a) Sì,

BSL-2

BSL-3

BSL-4

b) No

c) **Commenti:** _____

Q27. Disponete di strumenti di protezione individuale per manipolare campioni biologici con livello di sicurezza BSL-2+ (Allegato A)?

a) Sì

b) No

c) **Commenti:** _____

F. Sviluppi futuri

Q28. Alla luce dei recenti focolai epidemici di H5N1, il vostro laboratorio sta programmando gli opportuni adattamenti nella procedure di laboratorio?

a) Sì, descrivere i cambiamenti programmati

b) No, perché:

Grazie per aver compilato il questionario

*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) 10° Suppl.