

## POTENZIAMENTO DELLA RETE INFLUNET PER LA SORVEGLIANZA VIROLOGICA DELL'INFLUENZA



Simona Puzelli<sup>1</sup>, Livia Di Trani<sup>2</sup> e Isabella Donatelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, ISS

<sup>2</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, ISS

**RIASSUNTO** - Il Centro Nazionale OMS per l'Influenza, istituito presso l'Istituto Superiore di Sanità, si avvale della collaborazione di una rete di 15 laboratori periferici. In periodo interpandemico, l'attività di sorveglianza virologica è prioritariamente finalizzata all'aggiornamento della composizione vaccinale attraverso un'approfondita caratterizzazione antigenica e molecolare delle varianti virali circolanti nella stagione epidemica. In caso di emergenza pandemica risulta di primaria importanza l'identificazione tempestiva dei primi casi di influenza sul territorio nazionale, allo scopo di circoscrivere o rallentare la diffusione del virus nella popolazione. A tal fine, occorre far ricorso a metodiche di diagnosi rapida, poco utilizzate nella sorveglianza dell'influenza stagionale. Obiettivo del progetto è quello di procedere a un rafforzamento dell'attuale sistema di sorveglianza laboratoristica, attraverso l'implementazione di metodiche di diagnostica avanzata e l'accreditamento dei laboratori partecipanti.

**Parole chiave:** influenza, sorveglianza, pandemia

**SUMMARY** (*Reinforcement of the influenza surveillance laboratory network (INFLUNET)*) - In Italy, a network of 15 peripheral laboratories cooperates with the National WHO Influenza Centre, established at the Italian National Institute of Health, in the surveillance activities. During the inter-pandemic period, the main purpose of this network is the antigenic and molecular characterization of any new virus variant for the annual influenza vaccine update. In a pandemic emergency, the major task of the network will be the rapid detection of the first cases of pandemic influenza in the country, in order to delay the virus spread in the population. In this case, the rapid molecular methodologies for influenza laboratory diagnosis, less useful during the seasonal surveillance activities, become essential. The main objective of the present project is the reinforcement of the current influenza surveillance laboratory network through the implementation of diagnostic methodologies and laboratories validation.

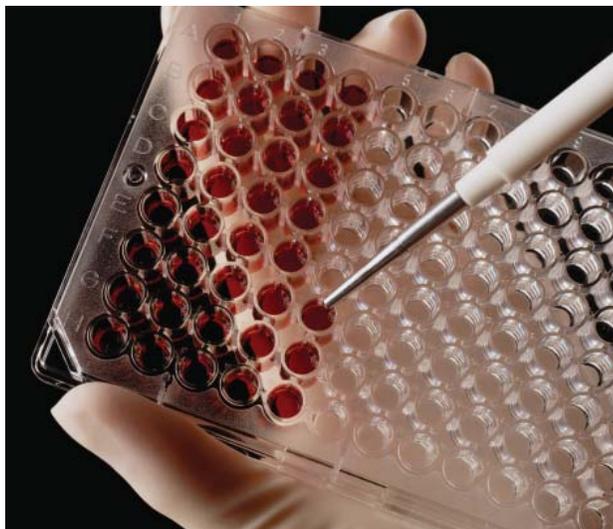
**Key words:** influenza, surveillance, pandemic

isabella.donatelli@iss.it

L'influenza, malattia respiratoria acuta altamente contagiosa, costituisce ancora oggi una delle infezioni più diffuse su scala mondiale, in grado di provocare nell'uomo manifestazioni morbose di diversa intensità, dalle ricorrenti epidemie alle ben più gravi, anche se rare, pandemie influenzali. L'importanza di questa patologia per la sanità pubblica è da ricondurre principalmente all'ubiquità dell'agente eziologico virale, all'elevata capacità di trasmissione, all'esistenza di serbatoi naturali (rappresentati da numerose specie animali) e alle possibili gravi complicanze che può causare, soprattutto in categorie di persone considerate "a rischio".

Alla base dell'epidemiologia dell'influenza vi è la capacità dei virus influenzali di variare, cioè di acquisire cambiamenti nelle proteine di superficie che permet-

tono di superare la barriera immunitaria presente nella popolazione che ha contratto l'infezione negli anni precedenti. Questa marcata instabilità genetica impone una costante sorveglianza sanitaria e una ripetuta vaccinoprofilassi, basata su antigeni virali continuamente rinnovati e correlati ai nuovi ceppi emergenti in natura. Per questo motivo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha attivato, fin dagli anni '40, un programma mondiale di sorveglianza, a cui partecipa una rete di oltre 110 laboratori nazionali dislocati in tutto il mondo, coordinati da 4 centri di riferimento internazionali. L'Italia partecipa a questo programma attraverso il Centro Nazionale Influenza-NIC (istituito presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità, ISS), avvalendosi, a sua volta, di una rete di 15 labo- ►



ratori periferici, principalmente collegati a strutture accademiche (rete INFLUNET) e distribuiti sul territorio nazionale. Questa rete è in grado di raccogliere e caratterizzare i ceppi influenzali circolanti nelle Regioni monitorate, fornendo le informazioni necessarie per l'aggiornamento annuale del vaccino utilizzabile in ambito nazionale ed europeo.

L'attuale Piano Nazionale di preparazione e risposta a una Pandemia Influenzale (PPN) prevede, tra le azioni chiave da mettere in campo per limitare e/o ritardare la diffusione di un'infezione sostenuta da un nuovo ceppo virale, l'ampliamento e il rafforzamento dell'esistente rete di laboratori INFLUNET. Tale sistema, infatti, è sempre stato in grado di soddisfare i bisogni della sorveglianza dell'influenza in periodo inter pandemico, prioritariamente finalizzata all'identificazione e alla caratterizzazione delle nuove varianti antigeniche e al conseguente aggiornamento della composizione vaccinale, ma non risulta sufficientemente elastico per garantire una diagnosi molecolare rapida, associata a una situazione di emergenza pandemica. Infatti, in caso di pandemia, la missione della rete non è più soltanto l'individuazione delle varianti antigeniche ai fini vaccinali, ma la rapida ed efficiente diagnosi di laboratorio dell'influenza, al fine di circoscrivere i primi casi di influenza e di rallentarne la diffusione nella popolazione. Ulteriori carenze dell'attuale rete, in riferimento all'emergenza pandemica, riguardano la quasi totale assenza di strutture ospedaliere e la distribuzione geografica, ancora marcatamente eterogenea, degli attuali 15 laboratori.

Obiettivo principale del presente progetto è, quindi, quello di rendere l'attuale sistema di sorveglianza virologica in grado di svolgere un ruolo attivo anche in caso di emergenza pandemica. Gli obiettivi specifici sono di seguito dettagliatamente elencati:

- ampliamento della copertura geografica dell'attuale rete INFLUNET;
- arruolamento di strutture ospedaliere, con particolare riferimento a quelle dotate di unità di isolamento per i casi pandemici e di adeguate strutture laboratoristiche di contenimento virologico (BSL3 certificate);
- potenziamento delle capacità diagnostiche dei laboratori afferenti alla rete e di quelli di nuova identificazione, attraverso l'implementazione di metodiche molecolari di diagnosi rapida, in grado di ridurre a 3 ore il tempo di risposta diagnostica.

Per il raggiungimento di tali obiettivi, il progetto è stato articolato nelle seguenti 4 fasi:

1. identificazione di nuovi laboratori potenzialmente arruolabili, su segnalazione delle Regioni;
2. accreditamento dei laboratori già afferenti alla rete e dei nuovi, attraverso un controllo di qualità (QCA), per verificarne le capacità diagnostiche;
3. formazione e addestramento tecnico/laboratoristico per l'armonizzazione e/o implementazione delle metodiche di diagnosi rapida (Real-time RT-PCR, Polymerase Chain Reaction);
4. classificazione e identificazione del potenziale ruolo dei laboratori nei diversi scenari epidemici e/o pandemici, così come specificati nel PPN e nelle linee guida dell'OMS.

## Metodi

### Controllo di Qualità (QCA)

Per lo svolgimento del QCA, previa distribuzione di un questionario finalizzato alla conoscenza delle tecniche e dei reagenti impiegati per la diagnosi dell'influenza da ognuno dei 15 laboratori già afferenti alla rete, è stato distribuito a ciascuno di essi un pannello di campioni clinici simulati, contenenti miscele di cellule non infettate (da usare come controllo negativo) e di cellule infettate con diverse concentrazioni di virus appartenenti a tipi e sottotipi diversi di virus influenzali (Tabella 1). Oltre ai virus influenzali epidemici, il pannello conteneva virus inattivato dell'influenza aviaria H5N1, per verificare le capacità diagnostiche verso nuovi sottotipi.

Tabella 1 - Pannello di campioni clinici "simulati"

Campioni "simulati"		
Tipo e sottotipo di virus influenzale	Ceppo virale	Titolo virale (TCID <sub>50</sub> */ml)
Negativo	Cellule MDCK**	Negativo
A/H1N1	A/New Caledonia/20/99	100
A/H1N1	A/New Caledonia/20/99	10.000
A/H3N2	A/Panama/2007/99	100
A/H3N2	A/Panama/2007/99	10.000
A/H3N2	A/California/7/04	10
A/H3N2	A/California/7/04	1.000
B	B/Shandong/7/97	10
B	B/Shandong/7/97	1.000
B	B/Jiangsu/10/2003	100
A/H5N1	A/Vietnam/1194/04 (inatt.)	10 <sup>-5a</sup>
A/H5N1	A/Vietnam/1194/04 (inatt.)	10 <sup>-3a</sup>
A/H1N1	A/New Caledonia/20/99 (inatt.)	10 <sup>-6a</sup>

(\*) Dosi infettanti colture di tessuto al 50%; (\*\*) Madin Darby Canine Kidney - cellule di rene di cane; (a) diluizione di lavoro utilizzata, a partire da uno stock concentrato di virus inattivato in dotazione presso il Centro Nazionale OMS per l'Influenza

A ciascun laboratorio è stato richiesto di inviare al NIC i risultati preliminari delle prove entro 7 giorni e quelli definitivi entro 28 giorni. La valutazione della *performance* di ogni singolo laboratorio è stata effettuata mediante attribuzione di 2 tipi diversi di punteggio:

- punteggio "globale" (corretta identificazione del campione negativo/positivo e dell'eventuale tipo/sottotipo virale);
- punteggio di "identificazione" (capacità di identificare la variante antigenica).

Nell'attribuzione del punteggio, è stato assegnato a ciascun errore un determinato valore, che è stato poi sottratto al valore di 100, considerato come punteggio massimo.

#### Formazione e addestramento tecnico/scientifico

Sulla base dei risultati del QCA, tra ottobre e dicembre 2007 è stato organizzato un Programma di formazione tecnico/laboratoristico articolato in 4 giornate secondo un calendario concordato con tutti i laboratori dell'attuale rete. Per raggiungere tale obiettivo, è stato necessario organizzare i corsi in un periodo di 8 settimane ospitando, ogni settimana, rappresentanti di 2 laboratori. Il corso di formazione prevedeva esercitazioni relative a tutte le tecniche tradizionali e molecolari utilizzabili per

la diagnosi dei virus influenzali e per la valutazione delle caratteristiche antigeniche dei virus circolanti (isolamento virale in colture cellulari e in uova embrionate di pollo, titolazione e tipizzazione virale con metodi sierologici standard e immunofluorescenza). Particolare attenzione è stata dedicata alle metodiche di diagnosi molecolare rapida (RT-PCR e Real-time PCR).

#### Verifica post-training

I risultati ottenuti durante la stagione influenzale 2007-08 sono stati utilizzati per verificare l'eventuale miglioramento dei dati ottenuti da ciascun laboratorio, con particolare riferimento alle metodiche non ancora in uso prima dei corsi e acquisite nell'ambito degli stessi.

#### Classificazione finale dei laboratori dell'attuale rete INFLUNET

La classificazione dei laboratori ha seguito criteri che tengono conto, da una parte, delle capacità tecniche e dei tempi di risposta diagnostica e, dall'altra, della disponibilità di strutture di contenimento biologico e/o della possibilità di attivare, sulla base di accordi regionali, una reperibilità su 7 giorni e per 24 ore (d7 h24). In base alle risultanti caratteristiche, ciascun laboratorio è stato classificato in considerazione del potenziale ruolo che esso può svolgere nelle diverse fasi del PPN, previste dall'OMS.

#### Risultati

##### Attività svolte per il rafforzamento dell'attuale rete INFLUNET

I risultati del QCA ottenuti da ciascun laboratorio sono riportati in Tabella 2. Per ogni laboratorio è stato usato un codice di identificazione. Per quanto riguarda il punteggio globale conteggiato, 7 laboratori hanno ottenuto 100, 4 laboratori un punteggio compreso tra 90 e 100, 3 compreso tra 61,5 e 86 e 1 ►

solo inferiore a 50. Per quanto riguarda il punteggio di identificazione, 2 laboratori hanno identificato tutte le corrette varianti antigeniche incluse nel pannello, 4 laboratori hanno riportato un punteggio compreso tra 68 e 84, 1 solo laboratorio ha riportato un punteggio inferiore a 30 e 8 laboratori non hanno invece fornito al NIC alcun dato.

In Tabella 3 è riportata la valutazione delle competenze tecnico/laboratoristiche di ciascun laboratorio, ottenuta secondo i metodi precedentemente descritti e tenendo in considerazione il potenziale ruolo che i diversi laboratori sono in grado di svolgere nelle diverse fasi del PPN, sulla base dei requisiti elencati in Tabella 4.

**Tabella 2** - Risultati conseguiti dai laboratori dell'attuale rete INFLUNET nel QCA

Codice laboratorio	Punteggio globale	Errori		Punteggio di identificazione	Errori	
		nel campione	risultati forniti		nel campione	risultati forniti
1	100			NA *	Identificazioni non eseguite	
2	100			76	H1/NewCal (inatt.) H5/Vietn (inatt.) H5/Vietn (inatt.)	non caratterizz. non caratterizz. non caratterizz.
3	93	H1/NewCal H1/NewCal	H3 H3	NA *	Identificazioni non eseguite	
4	79	H3/Pan H3/Calif H1/NewCal (inatt.)	Neg Neg Neg	NA *	Identificazioni non eseguite	
5	96,5	H3/Calif	non sottotipizz.	68	H5/Vietn (inatt.) H3/Pan H3/Calif B/Jiangsu	non caratterizz. non caratterizz. non caratterizz. non caratterizz.
6	100			84	H5/Vietn (inatt.) H5/Vietn (inatt.)	non caratterizz. non caratterizz.
7	61,5	H5/Vietn (inatt.) H3/Calif H1/NewCal (inatt.) H5/Vietn H3/Pan H3/Pan H3/Calif	Neg Neg Neg Neg non sottotipizz. non sottotipizz. non sottotipizz.	NA *	Identificazioni non eseguite	
8	100			100		
9	100			76	H1/NewCal (inatt.) H5/Vietn (inatt.) H5/Vietn (inatt.)	non caratterizz. non caratterizz. non caratterizz.
10	93	H1/NewCal (inatt.)	Neg	28	Flu A non identificati	
11	86	B/Shand: H1/NewCal	Neg Neg	NA *	Identificazioni non eseguite	
12	100			100		
13	45	H3/Calif H3/Calif Mancano tipizzazioni	Neg Neg	NA *	Identificazioni non eseguite	
14	90	H3/Calif	Neg	NA *	Identificazioni non eseguite	
15	100			NA *	Identificazioni non eseguite	

(\*) NA = non assegnato

Tabella 3 - Classificazione finale dei laboratori e identificazione del loro potenziale ruolo nelle diverse fasi del PPN

Laboratorio (codici)	Metodiche tradizionali		Diagnosi molecolare			Strutture di biocontenimento	D7 H24	Fasi 1-2**	Fasi 3-6*	
	Isolamento virale	Analisi sierologiche	PCR	Real-time PCR	Tempi minimi di diagnosi				Rif. regionale	Rif. sopra-regionale
1	sì	sì	sì	sì	3 ore	Bsl3	sì	sì	sì	sì
2	sì	sì	sì	sì	3 ore	Bsl3	sì	sì	sì	sì
5	sì	sì	sì	sì	3 ore	Bsl3	no <sup>a</sup>	sì	sì <sup>b</sup>	sì <sup>b</sup>
6	sì	sì	sì	sì	3 ore	Bsl3	sì	sì	sì	sì
8	sì	sì	sì	sì	3 ore	Bsl3	sì	sì	sì	sì
9	sì	sì	sì	sì	3 ore	Bsl3	no <sup>a</sup>	sì	sì <sup>b</sup>	sì <sup>b</sup>
11	sì	sì	sì	sì	3 ore	Bsl3	sì	sì	sì	sì
4	sì	sì	sì	no	8 ore	Bsl2+	no	sì	no	no
10	sì	sì	sì	no	8 ore	Bsl3	no <sup>a</sup>	sì	no	no
12	sì	sì	sì	no <sup>a</sup>	8 ore	Bsl2+	sì	sì	no	no
14	sì	sì	sì	no	8 ore	Bsl2+	no	sì	no	no
15	sì	sì	sì	no	8 ore	Bsl3	no	sì	no	no
3	sì <sup>a</sup>	no	sì	sì	3 ore	Bsl3	sì	no	sì	no
7	sì	sì	sì	sì	3 ore	Bsl2+	no	no <sup>c</sup>	no	no
13	sì	no	no	no	2-7giorni	Bsl2+	sì	no	no	no

(\*) Periodo allerta pandemico/pandemia; (\*\*) periodo interpandemico; (a) in via di attivazione; (b) subordinata ad attivazione d7 h24; (c) subordinata a invio di isolati virali al NIC

Tabella 4 - Classificazione dei laboratori in base ai requisiti strutturali/organizzativi richiesti

#### Requisiti per svolgere attività diagnostica in periodo inter-pandemico (Fasi 1-2 del PPN)

##### Requisiti minimi

- Disponibilità di strutture di contenimento biologico BSL2+
- Isolamento in substrati cellulari di virus influenzali (A/H1, A/H3 e B)
- Caratterizzazione antigenica dei virus con metodi sierologici (Test HI)
- Uso di tecniche RT-PCR per tipizzazione e sottotipizzazione di ceppi virali umani (A/H1, A/H3 e B)

##### Ulteriori competenze

- RT-PCR per sottotipizzazione di virus A/H5
- Real Time RT-PCR
- Sequenziamento genomico
- Analisi filogenetiche delle sequenze genomiche

#### Requisiti per svolgere attività diagnostica in periodo di allerta pandemica e/o pandemia (Fasi 3-6 del PPN)

##### Livello di riferimento regionale

- Disponibilità di strutture di contenimento biologico BSL2+
- Real Time RT-PCR per tipizzazione e sottotipizzazione di ceppi umani, anche potenzialmente pandemici (A/H1, A/H3, A/H5 e B)
- Capacità di dare una risposta diagnostica entro 3 ore dal ricevimento del campione
- Disponibilità o possibilità di attivare una reperibilità d7 h24, sulla base di accordi regionali

##### Livello di riferimento sopra-regionale

- Disponibilità di strutture di contenimento biologico BSL3
- Real Time RT-PCR per tipizzazione e sottotipizzazione di ceppi umani, anche potenzialmente pandemici (A/H1, A/H3, A/H5 e B)
- Capacità di dare una risposta diagnostica entro 3 ore
- Disponibilità o possibilità di attivare una reperibilità d7 h24, sulla base di accordi regionali
- Isolamento in substrati cellulari di virus influenzali (A/H1, A/H3, A/H5 e B)

#### Centro Nazionale Influenza (NIC)

Si intende un laboratorio che, su designazione del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, fa parte della rete mondiale dei laboratori coordinati dall'OMS per lo svolgimento delle attività di sorveglianza del Global Influenza Programme (GIP). Tutti i laboratori della rete vengono regolarmente validati attraverso lo svolgimento di External Quality Assessment Projects (WHO-EQAP), svolti semestralmente. Essi sono notificati e registrati presso il Centro Europeo di Controllo delle Malattie di Stoccolma.

## Ampliamento della rete INFLUNET

L'identificazione di nuovi laboratori, potenzialmente arruolabili nella rete INFLUNET, è avvenuta con la partecipazione delle Regioni, che hanno segnalato la presenza sul territorio di strutture in grado di rispondere ai requisiti richiesti dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e dall'ISS. Sono stati inizialmente segnalati 23 nuovi laboratori, a cui è stato inviato lo stesso questionario. Di questi,

solo 15 laboratori hanno compilato il questionario e, tra quest'ultimi, soltanto 14 hanno partecipato al QCA (Figura 1, Tabella 5).

### Attività future

Lo svolgimento del QCA dei nuovi laboratori e la valutazione della loro *performance* sono state svolte con modalità analoghe al primo QCA. I risultati delle attività e la programmazione dell'eventuale attività

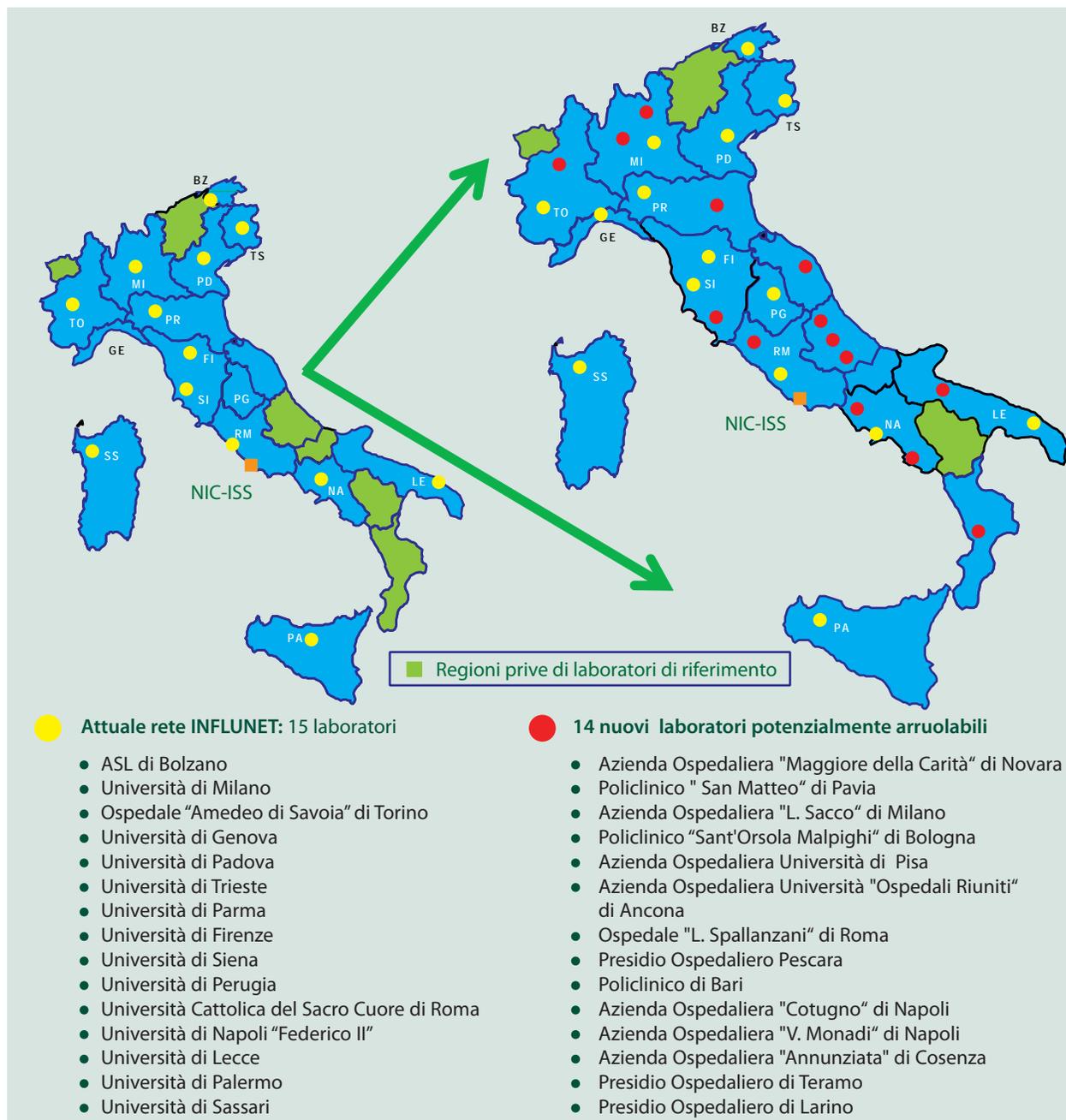


Figura 1 - Potenziamento della rete INFLUNET

Tabella 5 - Nuovi laboratori segnalati dalle Regioni come potenzialmente arruolabili

Regione	Laboratori inizialmente segnalati (hanno tutti ricevuto il questionario)	Laboratori che hanno restituito il questionario	Laboratori partecipanti al QCA
Valle D'Aosta	● ASL della Valle D'Aosta	no	no
Piemonte	● Azienda Ospedaliera "San Giovanni Battista" Molinette di Torino	sì	no
	● Azienda Ospedaliera "Maggiore della Carità" di Novara	sì	sì
Lombardia	● Ospedale "L. Sacco" di Milano	sì	sì
	● Ospedale "San Raffaele" di Milano	no	no
	● Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Policlinico "San Matteo" di Pavia	sì	sì
Emilia-Romagna	● Policlinico "Sant'Orsola Malpighi" di Bologna	sì	sì
Toscana	● Università di Pisa	sì	sì
Marche	● Azienda Ospedaliera "Ospedali Riuniti" di Ancona	sì	sì
Lazio	● Azienda Ospedaliera "Lazzaro Spallanzani" di Roma	sì	sì
Abruzzo	● Presidio Ospedaliero di Pescara;	sì	sì
	● Presidio Ospedaliero di Teramo	sì	sì
	● Presidio Ospedaliero dell'Aquila	ritiratosi formalmente	
	● Presidio Ospedaliero di Avezzano	no	no
Molise	● Presidio Ospedaliero "G. Vietri" di Larino (Campobasso)	sì	sì
Puglia	● ASL BA/4 Policlinico di Bari	sì	sì
	● Unità Operativa "Perrino" di Brindisi	no	no
Campania	● Azienda Ospedaliera "Cotugno" di Napoli	sì	sì
	● Unità Operativa "V. Monadi" di Napoli	sì	sì
Calabria	● Azienda Ospedaliera "Annunziata" di Cosenza	sì	sì
	● Azienda Ospedaliera "Mater Domini" di Catanzaro	no	no
	● Azienda Ospedaliera "Pugliese Ciaccio" di Catanzaro	no	no
	● Azienda Ospedaliera "Bianchi-Melacrino Morelli" di Reggio Calabria	no	no
<b>Totale laboratori</b>	<b>23</b>	<b>15</b>	<b>14</b>

formativa da intraprendere rappresentano la prossima fase di svolgimento del programma. Al termine di tutte le attività previste dal progetto, i risultati saranno discussi presso il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali onde definire il potenziale ruolo di questi nuovi laboratori accreditati all'interno di ciascuna Regione competente per il territorio.

## Conclusioni

I risultati del QCA e le verifiche *post-training*, svolte nell'ambito delle attività di sorveglianza virologica stagionale, hanno messo in evidenza, per la quasi totalità dei laboratori afferenti alla rete, un palese miglioramento delle competenze tecnico/laboratoristiche, sia per quanto riguarda la sensibilità dei metodi utilizzati sia nell'implementazione delle metodiche di diagnostica molecolare rapida. Complessivamente, 7 laboratori hanno confermato la rispondenza a tutti i requisiti necessari allo svolgimento dell'attività diagnostica per l'influenza, oltre che in periodo inter pandemico anche in periodo

di allerta pandemico e/o pandemia e sono pertanto identificabili come possibili laboratori di riferimento regionale e sopra-regionale.

Cinque laboratori hanno confermato di rispondere a tutti i requisiti necessari per poter svolgere attività di sorveglianza virologica in periodo inter pandemico (Fasi 1 e 2 del PPN). La possibilità di essere identificati anche quali laboratori di riferimento regionale e/o sopra-regionale rimane per ora subordinata al miglioramento, peraltro già in fase di attivazione per la maggior parte di essi, di alcune definite capacità tecniche, principalmente per quanto riguarda la capacità di fornire il risultato diagnostico in tempi estremamente ristretti ( $\leq 3$  ore). Inoltre, risulta essenziale che tutti i laboratori possano disporre di strutture di contenimento biologico adeguate e che siano in grado di attivare, sulla base di accordi regionali, una disponibilità d7 h24. ■

### Ringraziamenti

Si ringraziano per la collaborazione: Marzia Facchini, Maria Interisano, Concetta Fabiani, Edoardo Vignolo, Renzo Di Pasquale, Marcella Nenci e Tiziana Grisetti.