



# RAPPORTI ISTISAN 15|22

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**CENTRO NAZIONALE OMS PER L'INFLUENZA**

## **Sorveglianza della farmaco-resistenza in Italia: dieci anni di attività (stagioni 2004/2005 - 2013/2014)**

S. Puzelli, M. Facchini, M. Meola, A. Di Martino,  
A. Palmieri, C. Fabiani, L. Calzoletti,  
T. Grisetti, M.R. Castrucci, I. Donatelli



EPIDEMIOLOGIA  
E SANITÀ PUBBLICA



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**CENTRO NAZIONALE OMS PER L'INFLUENZA**  
**Sorveglianza della farmaco-resistenza in Italia:**  
**dieci anni di attività**  
**(stagioni 2004/2005-2013/2014)**

Simona Puzelli, Marzia Facchini, Monica Meola, Angela Di Martino,  
Annapina Palmieri, Concetta Fabiani, Laura Calzoletti,  
Tiziana Grisetti, Maria Rita Castrucci, Isabella Donatelli  
*Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**  
**15/22**

Istituto Superiore di Sanità

**Centro nazionale OMS per l'influenza. Sorveglianza della farmaco-resistenza in Italia: dieci anni di attività (stagioni 2004/2005 - 2013/2014).**

Simona Puzelli, Marzia Facchini, Monica Meola, Angela Di Martino, Annapina Palmieri, Concetta Fabiani, Laura Calzoletti, Tiziana Grisetti, Maria Rita Castrucci, Isabella Donatelli  
2015, iii, 34 p. Rapporti ISTISAN 15/22

Nel presente rapporto vengono riportati i risultati conseguiti nell'ambito delle attività di sorveglianza della farmaco-resistenza dei virus influenzali, circolanti in Italia negli ultimi dieci anni. Tale sorveglianza risponde a specifiche raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e del Centro Europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC), che raccolgono settimanalmente i dati prodotti dai paesi partecipanti. Le attività di laboratorio vengono svolte utilizzando saggi fenotipici e genotipici, validati dall'OMS, e sono finalizzate alla valutazione della suscettibilità virale ai farmaci antinfluenzali in commercio, Adamantani e Inibitori della Neuraminidasi.

*Parole chiave:* Virus influenzale; Farmaci antinfluenzali; Inibitori della neuraminidasi; Adamantani; Italia; OMS

Istituto Superiore di Sanità

**WHO National Influenza Centre. Antiviral resistance in Italy: ten years of surveillance activities (2004/2005 - 2013/2014 seasons).**

Simona Puzelli, Marzia Facchini, Monica Meola, Angela Di Martino, Annapina Palmieri, Concetta Fabiani, Laura Calzoletti, Tiziana Grisetti, Maria Rita Castrucci, Isabella Donatelli  
2015, iii, 34 p. Rapporti ISTISAN 15/22 (in Italian)

The present report describes the laboratory results obtained in the context of the antiviral susceptibility surveillance of influenza viruses that have been circulating in Italy, during the last ten years. These activities are strongly recommended by the World Health Organization (WHO) and by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), which collect data provided by the participating countries, week by week. The laboratory activities are carried out by means of both phenotypic and sequence-based assays, validated by the WHO, and aimed at evaluating the susceptibility of influenza strains towards the two classes of antiviral agents, approved for the treatment and prevention for influenza: the Adamantanes and the Neuraminidase Inhibitors.

*Key words:* Influenza virus; Antiviral agents; Neuraminidase inhibitors; Adamantanes; Italy; WHO

Per informazioni su questo documento scrivere a: [simona.puzelli@iss.it](mailto:simona.puzelli@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Puzelli S, Facchini M, Meola M, Di Martino A, Palmieri A, Fabiani C, Calzoletti L, Grisetti T, Castrucci MT, Donatelli I. *Centro nazionale OMS per l'influenza. Sorveglianza della farmaco-resistenza in Italia: dieci anni di attività (stagioni 2004/2005 - 2013/2014)*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2015. (Rapporti ISTISAN 15/22).

---

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



**Rete dei Laboratori regionali INFLUNET coordinati dal NIC (sorveglianza sentinella)**

Prof. Filippo ANSALDI

*Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Genova*

Prof.ssa Alberta AZZI

*Dipartimento di Sanità Pubblica, Università di Firenze*

Prof. Fausto BALDANTI

*Fondazione IRCCS Policlinico "San Matteo", Pavia*

Dott.ssa Maria CHIRONNA

*UOC Policlinico di Bari DIMO, Bari*

Prof. Pierlanfranco D'AGARO

*UCO Igiene e Medicina Preventiva, Università di Trieste*

Prof.ssa Caterina SERRA

*Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università di Sassari*

Prof. Maurizio SANGUINETTI

*Istituto di Microbiologia, Università Cattolica S. Cuore, Roma*

Dott.ssa Valeria GHISSETTI

*Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale "Amedeo di Savoia", Torino*

Dott.ssa Barbara CAMILLONI

*Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Perugia*

Dott.ssa Elisabetta PAGANI

*Laboratorio di Microbiologia e Virologia/Comprensorio Sanitario di Bolzano*

Prof. Giorgio PALÚ

*Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova*

Prof.ssa Maria Luisa TANZI/ Dott.ssa Paola AFFANNI

*Dipartimento di Sanità Pubblica, Università di Parma*

Prof. Francesco VITALE

*Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Università di Palermo*

Prof. Alessandro ZANETTI

*Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università di Milano*

**Ministero della Salute**

Dott. Giuseppe RUOCCO

*Direttore Generale della Direzione Generale della Prevenzione (DGPRE)*

Dott.ssa Maria Grazia POMPA, Dott.ssa Anna CARAGLIA

*Ufficio V - Malattie Infettive e Profilassi Internazionale, D. G. Prevenzione*



# INDICE

<b>Introduzione</b> .....	1
<b>Farmaci antinfluenzali</b> .....	3
Inibitori della proteina M2.....	3
Inibitori della neuraminidasi.....	4
Sviluppo di resistenza ai farmaci.....	6
Monitoraggio della suscettibilità ai farmaci antivirali.....	8
Saggi impiegati per la valutazione della farmaco-suscettibilità.....	9
<b>Dati del Centro Nazionale Influenza in Italia</b> .....	13
Metodi impiegati dal NIC nel monitoraggio della farmaco-resistenza.....	14
Metodi impiegati dal NIC per lo studio della sensibilità degli isolati virali agli inibitori della NA e della M2.....	14
<b>Risultati dell'attività di farmaco-sorveglianza in Italia</b> .....	15
Virus influenzali inclusi nello studio.....	15
Valutazione della sensibilità agli INA.....	15
Risultati analisi fenotipiche.....	15
Risultati analisi genotipiche.....	20
Monitoraggio della sensibilità agli inibitori della M2.....	20
Risultati analisi genotipiche.....	20
<b>Discussione</b> .....	22
<b>Bibliografia</b> .....	23
<b>Appendice</b>	
Protocollo operativo (stagione 2013-2014) del sistema di sorveglianza FLU-ISS: estratto della parte virologica.....	27





## INTRODUZIONE

L'influenza rappresenta una delle malattie infettive più diffuse su scala mondiale costituendo un serio problema sia in termini di mortalità che di morbilità. Da un punto di vista clinico la malattia è caratterizzata da: affezione acuta a esordio brusco e improvviso, febbre superiore a 38°C, almeno un sintomo costituzionale (cefalea, malessere generalizzato, brividi, dolori muscolari e articolari) e da almeno un sintomo respiratorio (tosse, congestione nasale, faringodinia). In seguito alla malattia, possono insorgere serie complicanze dovute principalmente a superinfezioni batteriche, soprattutto nelle categorie di soggetti a rischio (anziani, cardiopatici, diabetici, bronchitici cronici e altri soggetti immunocompromessi).

La vaccinazione costituisce, a tutt'oggi, la misura più efficace per contrastare l'influenza sia epidemica che pandemica. Tuttavia, il controllo di questa patologia attraverso l'immunoprofilassi vaccinale è reso particolarmente difficile dall'elevato grado di variabilità genetica dei virus influenzali, che porta alla continua emergenza di varianti antigeniche in grado di sfuggire all'immunità conseguente ad una pregressa vaccinazione e/o infezione naturale. Questo costituisce un enorme limite alla vaccinazione, la cui efficacia protettiva è strettamente dipendente dal grado di omologia antigenica tra ceppi di campo e ceppi vaccinali. Ancora più complessa e difficile è la prevenzione vaccinale in situazioni di pandemia influenzale, la cui emergenza, a causa dell'enorme diffusione dei virus influenzali in natura, rimane ampiamente imprevedibile, nonostante l'esistenza di sistemi di monitoraggio virologico, sia in ambito veterinario che di medicina umana.

In questo contesto, particolare importanza assumono i farmaci antinfluenzali in quanto costituiscono una valida alternativa alla vaccinazione, sia in periodo epidemico che pandemico. In caso di pandemia, infatti, l'improvvisa emergenza di un virus influenzale completamente nuovo può essere fronteggiata, almeno in un primo momento, soltanto mediante l'uso dei farmaci antivirali in grado di contenere la diffusione dell'infezione.

Inoltre, durante il periodo epidemico, essi stessi rappresentano una valida alternativa all'immunoprofilassi vaccinale per chi non può essere vaccinato. In più, rappresentano uno strumento utile per la gestione delle forme influenzali gravi, essendo in grado non solo di diminuire la durata e la gravità dei sintomi, ma anche di ridurre l'instaurarsi delle complicanze dell'influenza.

Due sono le classi di farmaci disponibili per la prevenzione e la chemioprolifassi dell'influenza: gli inibitori della proteina M2 (Adamantani) e gli inibitori della neuraminidasi (INA: Oseltamivir e Zanamivir).

Come è noto, un'importante limitazione nell'impiego di tali farmaci nella pratica clinica (soprattutto nel caso degli inibitori della M2) è il rapido sviluppo di resistenza che ne riduce considerevolmente l'efficacia. L'insorgenza e la diffusione di ceppi virali farmaco resistenti, quindi, costituisce un serio ed importante problema di sanità pubblica sia a livello nazionale che mondiale. Negli ultimi anni si è assistito a un notevole aumento della resistenza agli inibitori della proteina M2 tra i virus influenzali umani di tipo A (1-3). Tale aumento della resistenza, che ha reso questo gruppo di farmaci inefficaci nel trattamento di molti casi di influenza, ha inoltre portato ad un incremento nell'utilizzo degli INA. Prima del 2007, le percentuali di resistenza agli INA riscontrate nei virus influenzali europei si erano mantenute al di sotto dell'1% (4). A partire però dalla stagione influenzale 2007/2008 sono stati segnalati in Europa, Italia compresa, isolamenti sempre più frequenti di virus influenzali stagionali A/H1N1 resistenti all'Oseltamivir e la percentuale di resistenza di questi ceppi a tale farmaco ha raggiunto il 100% nel corso della successiva stagione influenzale (5-6). L'emergenza di stipiti

virali resistenti all'Oseltamivir è stata, inoltre, osservata anche tra i virus influenzali pandemici A/H1N1pdm09 isolati sia in pazienti immunocompromessi che in quelli immunocompetenti, nella maggior parte dei casi sottoposti a trattamento con il farmaco (7-8). Pochissimi casi di resistenza allo Zanamivir sono stati, invece, finora riportati.

Sebbene, ad oggi, le percentuali di resistenza agli INA si mantengano ancora piuttosto basse non è da escludere la possibilità che queste possano aumentare nel tempo con importanti ripercussioni sulla salute pubblica. La dimostrata capacità dei virus resistenti all'Oseltamivir di trasmettersi efficientemente da uomo a uomo, il verificarsi di sporadici casi di resistenza all'Oseltamivir tra i virus pandemici A/H1N1pdm09, nonché di *clusters* di casi di resistenza all'Oseltamivir in Australia (9) e in Giappone (10), e la loro potenziale virulenza (11), evidenziano l'importanza di un attento e costante monitoraggio della suscettibilità ai farmaci di tutti gli stipiti virali isolati sul territorio nazionale.

## FARMACI ANTINFLUENZALI

### Inibitori della proteina M2

Gli inibitori della proteina virale M2 o Adamantani (amantadina e rimantadina) sono stati i primi farmaci ad essere stati utilizzati per il trattamento e la profilassi dell'influenza causata da virus appartenenti al tipo A. Sono farmaci che agiscono nelle fasi iniziali della replicazione virale, durante lo stadio di liberazione del genoma dal suo involucro (*uncoating*), mediante l'interazione con la proteina virale M2, che perde la sua attività di canale ionico. La proteina M2, infatti, svolgendo attività di canale ionico, permette la migrazione di ioni  $H^+$  dall'endosoma all'interno del virione, un processo necessario per la fase di *uncoating* virale. L'interruzione di questo processo da parte dei suddetti farmaci determina, dunque, l'inibizione dell'acidificazione dell'ambiente "intravirionico", indispensabile per la liberazione dell'acido nucleico nel citoplasma della cellula ospite, con conseguente inibizione della replicazione virale (12) (Figura 1). Attualmente, dal momento che tutti i ceppi virali di tipo A circolanti nella popolazione umana sono resistenti a tale farmaco, il loro impiego è sconsigliato sia dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) che dal Centro Europeo di Controllo per le malattie infettive (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC).

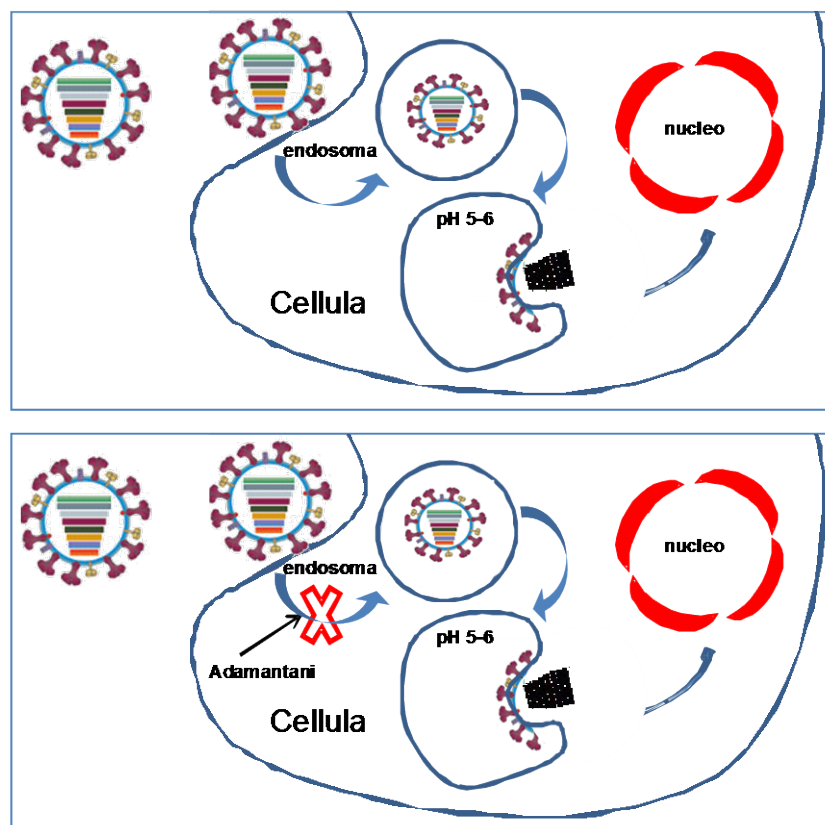


Figura 1. Meccanismo d'azione degli Adamantani

## Inibitori della neuraminidasi

Gli inibitori della neuraminidasi, farmaci di più recente generazione, agiscono inibendo la neuraminidasi virale (NA) e impedendo il rilascio delle particelle virali neoformate dalla cellula ospite, l'invasione di nuove cellule e di conseguenza il propagarsi dell'infezione.

Il virus influenzale, infatti, dopo essere gemmato dalla cellula rimane attaccato ad essa a seguito del legame dell'emoagglutinina (HA) virale con le molecole di acido sialico presenti sul recettore cellulare. Il virus riesce a superare questo blocco grazie all'azione dell'enzima NA che scinde il legame tra le molecole di acido sialico e di HA, permettendo il rilascio dei virioni. Il blocco di questo enzima determinerebbe quindi l'arresto della diffusione del virus nell'albero respiratorio (13-14) (Figura 2).

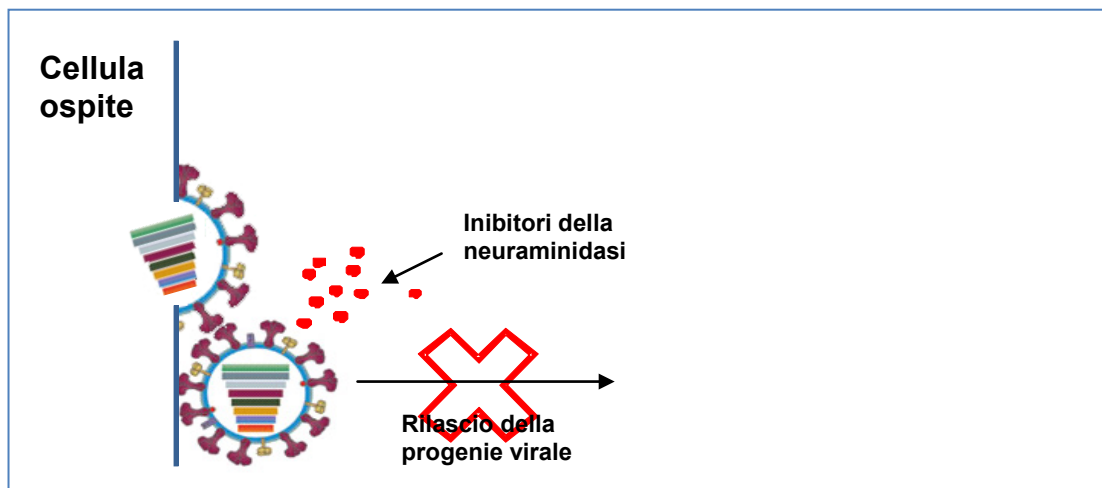
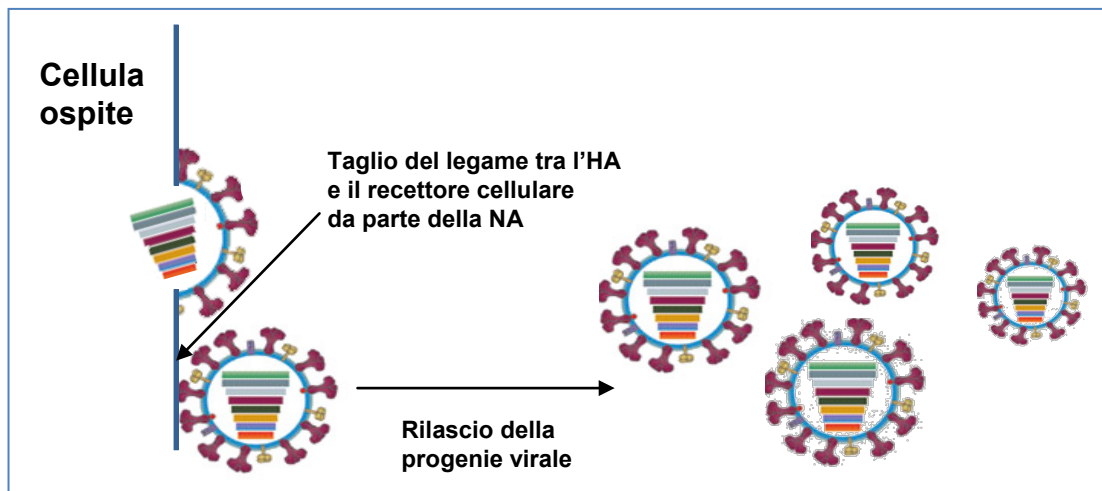


Figura 2. Meccanismo d'azione degli INA

A differenza degli Adamantani, gli INA sono attivi sia nei confronti dei virus influenzali di tipo A sia di tipo B. I farmaci appartenenti a questo gruppo attualmente disponibili in commercio in Italia sono l'Oseltamivir (Tamiflu – Roche) e lo Zanamivir (Relenza – GSK).

L'Oseltamivir è un profarmaco che viene rapidamente assorbito nel tratto gastrointestinale e convertito nella sua forma biologicamente attiva (*oseltamivir carboxylate*) nel fegato. È disponibile sotto forma di capsule da 30, 45 e 75 mg e può essere somministrato sia ad adulti che a bambini al di sopra di un anno di età. Per gli adulti e gli adolescenti con età superiore ai 14 anni la dose raccomandata per il trattamento è di 75mg due volte al giorno per cinque giorni. La dose di Oseltamivir consigliata per la profilassi, invece, è di 75mg al giorno per dieci giorni. Il dosaggio nei bambini dipende dal loro peso corporeo (Tabella 1).

Lo Zanamivir, a differenza dell'Oseltamivir, è caratterizzato da scarsa biodisponibilità orale e di conseguenza viene somministrato con un dispositivo per inalazione orale (*Diskhaler*), è assorbito dall'epitelio respiratorio e viene eliminato con le urine in forma imm modificata. Per quanto riguarda il trattamento, sono raccomandate due inalazioni da 5 mg due volte al giorno per cinque giorni, mentre per la profilassi due inalazioni da 5 mg una volta al giorno per dieci giorni. Questo farmaco non è approvato per uso profilattico in Italia (Tabella 1) (15).

**Tabella 1. Trattamento e profilassi della sindrome influenzale in Italia**

Principio attivo	Via di somministrazione	Trattamento (età minima, dose)	Profilassi (età minima, dose)
Zanamivir	Inalatoria (aspirazione)	≥ 12 anni 10 mg (due inalazioni) due volte al giorno	Non approvato per profilassi in Italia
Oseltamivir	Orale (capsule)	Bambini: ≥ 1 anno (la dose dipende dal peso)	Bambini: ≥ 1 anno (la dose dipende dal peso)
		Adolescenti (> 14 anni) ed adulti: 75 mg due volte al giorno per cinque giorni	Adolescenti ed adulti: 75 mg una volta al giorno per dieci giorni

Entrambi i farmaci, se assunti entro 48 ore dall'insorgenza dei sintomi, sono in grado di ridurre il decorso della malattia e la gravità dei sintomi. Inoltre, come osservato nel corso dell'ultima pandemia influenzale, causata dal virus A/H1N1pdm09, tali farmaci possono anche diminuire il rischio di sviluppo di infezioni gravi (16).

Secondo quanto riportato nelle linee guida per la gestione della sindrome influenzale (15):

“gli inibitori della neuraminidasi per il trattamento sintomatico della sindrome influenzale non sono raccomandati per uso di routine. Il loro impiego va valutato caso per caso”.

In particolare, il trattamento con gli INA è raccomandato nei soggetti con confermata o sospetta influenza che siano a rischio di complicanze o che richiedano ospedalizzazione.

## Sviluppo di resistenza ai farmaci

Uno dei principali problemi associati all'impiego degli antivirali è rappresentato dall'insorgenza di ceppi virali resistenti, che ne riducono fortemente l'efficacia.

L'area limitata del bersaglio (la porzione transmembrana della proteina M2 per gli Adamantani e il sito attivo dell'enzima NA per gli INA) crea le condizioni più adatte, per il virus, allo sviluppo di mutazioni che gli permettono di resistere all'azione inibitoria del farmaco.

Il farmaco stesso, pertanto, potrebbe agire a sua volta da agente selettivo, favorendo il diffondersi della mutazione nella popolazione virale in replicazione.

L'emergenza di virus resistenti agli inibitori della proteina M2 e agli INA è dovuta principalmente alla comparsa di specifiche mutazioni a carico dei geni che codificano, rispettivamente, per la porzione transmembrana della proteina M2 e del sito attivo della NA.

La resistenza agli INA è sia sottotipo- che farmaco-specifica. Ciò vale a dire che le mutazioni che causano resistenza in un sottotipo non hanno lo stesso effetto su un altro sottotipo virale. Ad esempio, la mutazione H275Y nella NA virale causa resistenza all'Oseltamivir nei virus di sottotipo H1N1 ma non in quelli di sottotipo H3N2 o di tipo B. Inoltre, la stessa mutazione conferisce resistenza soltanto all'Oseltamivir ma non allo Zanamivir.

Nelle Tabelle 2 e 3 viene riportata una lista di mutazioni specifiche, più comunemente osservate, sia nella pratica clinica sia in vitro, responsabili della resistenza e/o ridotta sensibilità ai suddetti farmaci (17-18).

**Tabella 2. Cambiamenti aminoacidi nella NA associati a ridotta suscettibilità agli INA**

Virus influenzale (Tipo/sottotipo)	Mutazione <sup>a</sup>	Oseltamivir	Zanamivir
<b>A/H1N1pdm09</b>	E119G	N	HR
	E119V	R	HR
	D198G	R	N
	I222K	R	N
	I222R	R	R
	I222V	N	N
	S246N	N	N
	H274Y	HR	N
	N294S	HR	N
	D198N + H274Y	HR	N
	I222R + H274Y	XR	R
	I222V + H274Y	XR	N
	S246N + H274Y	XR	N
	Q313K + I427T	R	R

*segue*

continua

<b>Virus influenzale (Tipo/sottotipo)</b>	<b>Mutazione<sup>a</sup></b>	<b>Oseltamivir</b>	<b>Zanamivir</b>
<b>A/H3N2</b>	E119A	HR	HR
	E119D	N	R
	E119G	N	HR
	E119I	HR	R
	E119V	R	N
	Q136K	N	R
	D151E	R	N
	D151N	N	R
	D151V	N	R
	I222L	N	N
	R224K	XR	R
	E276D	R	HR
	R292K	XR	R
	N294S	HR	N
	R371K	R	R
	E119V + I222L	XR	N
	E119V + I222V	HR	N
	<b>B</b>	E119A	HR
E119D		HR	HR
E119G		R	HR
E119V		HR	N
E152K		HR	N
D198E		R	R
D198N		R	R
D198Y		R	R
I222T		R	R
I222V		R	N
S250G		N	R
R292K		HR	R
N294S		R	N
R371K		HR	R
G402S		N	R

<sup>a</sup> La posizione aminoacidica è riportata secondo la numerazione standard N2.

N=normale suscettibilità;

R=ridotta suscettibilità;

HR=suscettibilità altamente ridotta;

XR=suscettibilità estremamente ridotta.

**Tabella 3. Cambiamenti aminoacidi nella M2 associati alla resistenza agli Adamantani**

Virus influenzale	Sostituzioni aminoacidiche associate a resistenza
A*	L26F
	V27A
	A30T
	S31N
	G34E

\* gli inibitori della M2 sono attivi soltanto nei confronti dei virus influenzali di tipo A

## Monitoraggio della suscettibilità ai farmaci antivirali

L'emergenza e la diffusione delle varianti virali farmaco-resistenti costituisce un importante problema a livello mondiale di Sanità Pubblica.

La diffusa resistenza agli inibitori della M2 tra tutti i virus influenzali di tipo A (H1N1pdm09, H3N2), attualmente circolanti nella popolazione umana, ha reso questo gruppo di farmaci inefficaci per il trattamento e la profilassi dell'influenza. Di conseguenza, gli INA rappresentano attualmente gli unici farmaci d'elezione.

Ad oggi, nonostante il largo impiego di INA registrato nel corso dell'ultima pandemia influenzale del 2009, le percentuali di resistenza a tali farmaci si sono mantenute a bassi livelli. Tuttavia, considerando l'elevato grado di instabilità genetica dei virus influenzali e la capacità delle varianti resistenti di trasmettersi efficientemente da uomo a uomo, tali percentuali potrebbero aumentare con gravi conseguenze per la salute pubblica.

Risulta, pertanto, essenziale disporre di un sistema di monitoraggio basato su una continua e costante sorveglianza della farmaco-resistenza nei ceppi influenzali circolanti nell'uomo. Tale sistema deve essere in grado non solo di identificare e valutare tempestivamente cambiamenti nella frequenza della resistenza agli antivirali tra i virus influenzali circolanti nella comunità, ma anche di determinare quanto la variante resistente sia trasmissibile e in quali proporzioni la sua diffusione sia sostenuta nella popolazione.

In Italia, il Centro Nazionale Influenza (*National Influenza Centre*, NIC) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) (Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate), in aggiunta alle attività di sorveglianza virologica finalizzate all'aggiornamento annuale della composizione del vaccino antinfluenzale, e in linea con le raccomandazioni dell'OMS e dell'ECDC, svolge anche attività di sorveglianza della farmaco-resistenza dei ceppi virali circolanti sul territorio nazionale, durante la stagione influenzale.

Il NIC partecipa alle attività di sorveglianza avvalendosi, a sua volta, della collaborazione di una estesa rete di medici sentinella (Rete INFLUNET) e di diversi laboratori regionali distribuiti sul territorio nazionale (Allegato 8 in Appendice).

I campioni clinici raccolti dai medici sentinella vengono inviati ai laboratori regionali che provvedono all'identificazione e/o isolamento virale, utilizzando modalità e metodologie concordate con il NIC (Allegato 6 in Appendice). Il NIC provvede poi a completare le analisi, ad effettuare ulteriori studi sui virus isolati ed ad inviare un numero selezionato dei ceppi isolati al centro di riferimento OMS europeo di Londra (*World Health Organization Collaborative Centre*, WHO-CC).



Tale sistema produce dati di farmaco-sorveglianza nazionali che vengono trasmessi sia al Ministero della Salute sia all'ECDC mediante il sistema informativo "TESSy" (*The European Surveillance System*, disponibile all'indirizzo: <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/TESSy/Pages/TESSy.aspx>).

I risultati dell'attività di sorveglianza vengono inoltre diffusi a livello nazionale attraverso rapporti annuali.

Nel dettaglio, i principali obiettivi del suddetto sistema di farmaco-sorveglianza sono di:

- Studiare il grado di suscettibilità dei virus influenzali isolati sul territorio nazionale verso i farmaci antivirali, principalmente nei confronti dell' Oseltamivir e dello Zanamivir (INA), attualmente più utilizzati per il trattamento dell'influenza.
- Monitorare l'emergenza di varianti farmaco-resistenti in pazienti ospedalizzati, principalmente immunocompromessi, sottoposti a trattamento farmacologico onde, eventualmente, procedere a modifiche della terapia antivirale adottata.
- Identificare virus resistenti con una buona *fitness* in grado di trasmettersi rapidamente nella popolazione.
- Accrescere le conoscenze relative alle basi molecolari della farmaco-resistenza mediante identificazione di nuovi *marker* di resistenza.

Per il raggiungimento di questi obiettivi è, quindi, necessario monitorare la farmaco-suscettibilità degli isolati virali derivanti da campioni clinici prelevati sia da pazienti sottoposti a trattamento con il farmaco che da pazienti non trattati. In particolare, tra le categorie di persone sottoposte a trattamento, grande attenzione viene rivolta a pazienti immunocompromessi e bambini in quanto caratterizzati da prolungato *shedding* virale, pazienti con infezioni gravi che non mostrano segni clinici di miglioramento, pazienti che sviluppano malattia dopo o durante la chemioprophilassi antivirale, pazienti che hanno contratto l'infezione in seguito al contatto con individui trattati con i farmaci.

## Saggi impiegati per la valutazione della farmaco-suscettibilità

Due sono i principali tipi di saggi comunemente utilizzati per la determinazione della suscettibilità degli isolati virali agli INA:

- Saggi fenotipici di inibizione della neuraminidasi
- Saggi genotipici

I saggi fenotipici permettono di misurare l'attività enzimatica della NA virale in presenza del farmaco e quindi di determinare la concentrazione di Oseltamivir e Zanamivir in grado di inibire l'attività dell'enzima stesso del 50% ( $IC_{50}$ ).

Tra questi, quelli disponibili sono due, uno basato sulla fluorescenza (FL) ed uno sulla chemioluminescenza (CL). Il saggio fluorimetrico, rispetto al test CL, è il tipo di saggio più comunemente impiegato in quanto, da un punto di vista pratico, oltre ad essere poco costoso risulta essere di più facile applicazione (19) (Tabella 4).

Tabella 4. Saggi di inibizione della neuraminidasi

Caratteristica	in-house FL	NA-Fluor™ Kit	NA-StaR® Kit	NA-XTD™ Kit
<b>Metodo</b>	FL	FL	CL	CL
<b>Fornitore</b>	Sigma	Applied Biosystems	Applied Biosystems	Applied Biosystems
<b>Substrato usato</b>	MUNANA	MUNANA	NA-Star	NA-XTD
<b>Strumentazione</b>	fluorimetro	fluorimetro	luminometro	luminometro
<b>Vantaggi</b>	- economico - flessibile	- reagenti già pronti - proprio protocollo standard	- reagenti già pronti - proprio protocollo standard	- reagenti già pronti - proprio protocollo standard - più facile da usare rispetto al saggio NA-Star - segnale più duraturo e sensibilità di rilevamento leggermente maggiore rispetto al saggio NA-Star
<b>Svantaggi</b>	- assenza kit - assenza di un protocollo standard "universale"	- poco più costoso rispetto al saggio in-house	- più costoso rispetto al saggio FL - valori di IC <sub>50</sub> più bassi rispetto a quelli ottenuti con il saggio FL - richiede l'uso di iniettori - il rosso-fenolo interferisce con l'emissione del segnale di luce - possibilità di identificare campioni contenenti la mistura 275 H/Y molto scarsa	- più costoso rispetto al saggio FL - valori di IC <sub>50</sub> più bassi rispetto a quelli ottenuti con il saggio FL - il rosso-fenolo interferisce con l'emissione del segnale di luce

FL fluorescenza; CL chemiluminescenza

In particolare, il test FL è un test enzimatico in cui l'attività della NA virale e la sensibilità agli inibitori viene determinata mediante l'uso di un substrato fluorogenico (MUNANA), un analogo del substrato naturale dell'enzima virale. La NA virale agisce sul MUNANA scindendolo, con conseguente formazione di un composto che emette fluorescenza a pH basico.

La valutazione quantitativa dell'aumento della fluorescenza permette di determinare l'attività della NA e l'esecuzione del test in presenza degli inibitori permette di calcolare l'IC<sub>50</sub> del farmaco considerato e, di conseguenza, di stabilire il grado di sensibilità degli isolati virali al farmaco stesso (Figura 3).

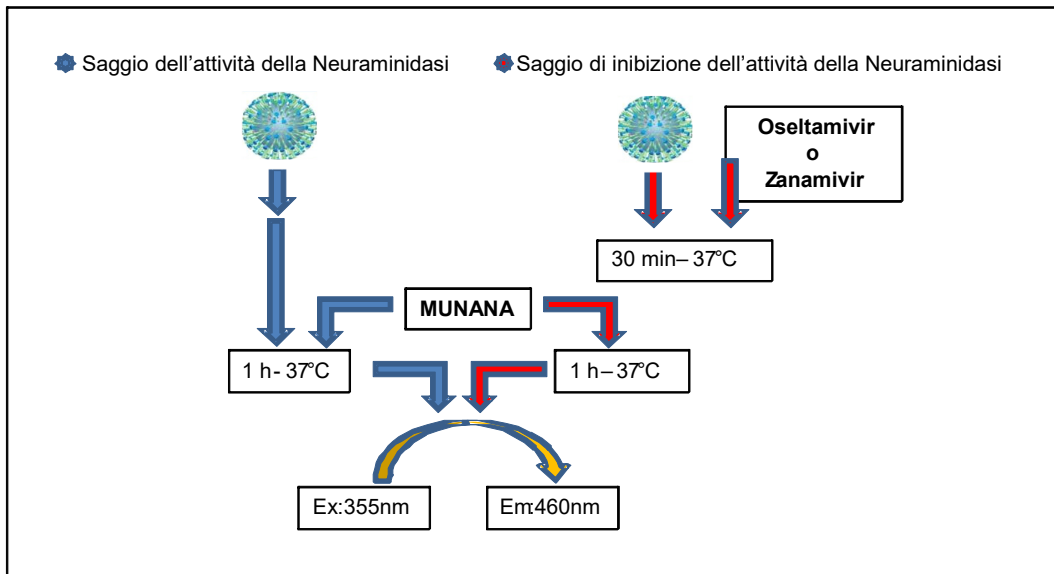


Figura 3. Saggio fenotipico di inibizione della neuraminidasi

I saggi genotipici (es. sequenziamento convenzionale, pirosequenziamento, individuazione dei polimorfismi a singolo nucleotide, *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) consentono l'identificazione delle mutazioni nel gene NA associate a sostituzioni aminoacidiche, che conferiscono resistenza (Figura 4). Ai fini di una valutazione corretta e completa della suscettibilità virale agli INA, tali test vengono comunemente utilizzati in associazione ai saggi fenotipici.

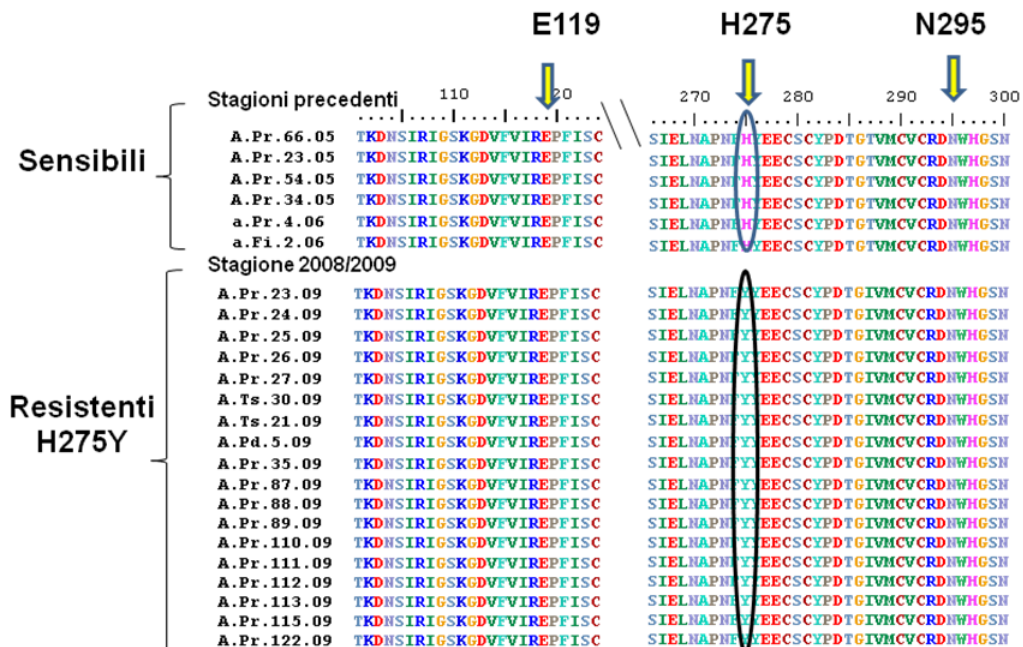


Figura 4. Esempio di mutazione H275Y (numerazione N1) nella NA dei virus A di sottotipo H1N1 associata a resistenza all'Oseltamivir

Per la determinazione della resistenza agli inibitori della M2, vengono ormai impiegati soltanto i saggi genotipici, essendo note le mutazioni associate alla resistenza (es. L26F, V27A, A30T, S31N e G34E) (18) (Figura 5; vedi Tabella 3).

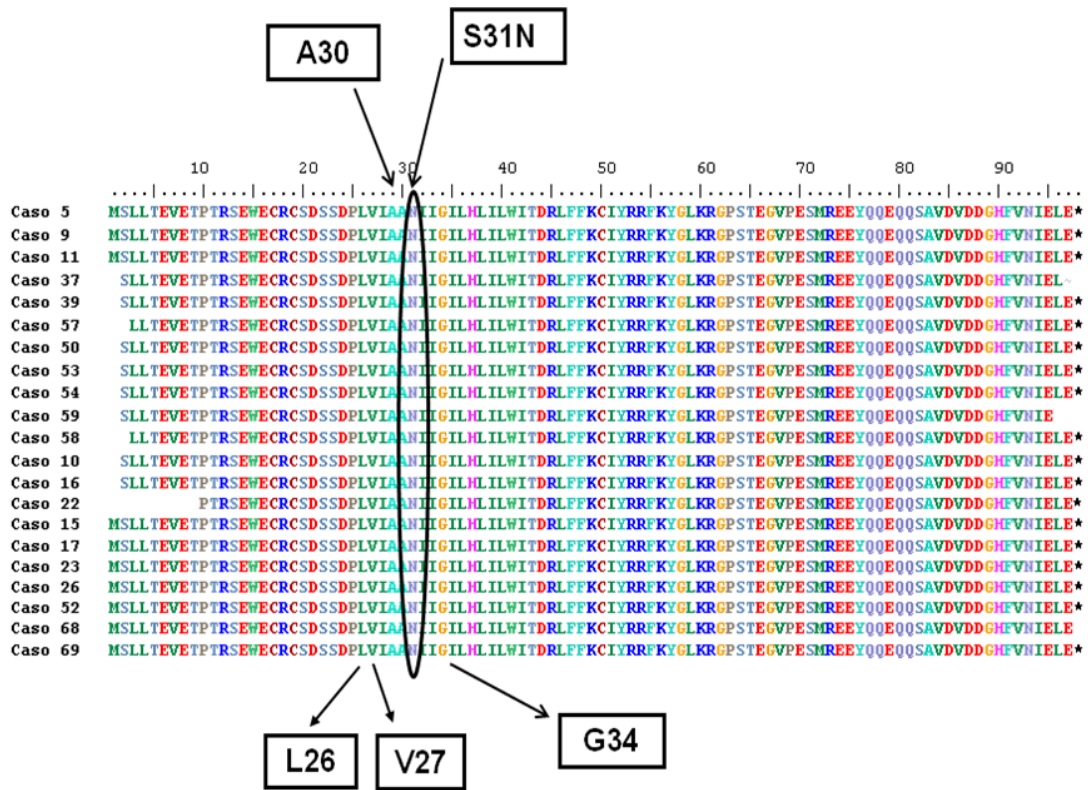


Figura 5. Esempio di mutazione S31N nella porzione transmembrana della proteina M2 associata a resistenza agli Adamantani

## DATI DEL CENTRO NAZIONALE INFLUENZA IN ITALIA

Vengono qui di seguito riportati i dati relativi alle attività di farmaco-sorveglianza sui virus influenzali circolanti in Italia, isolati nel corso di dieci stagioni influenzali consecutive, dalla 2004/2005 alla 2013/2014. Questa attività viene svolta nell'ambito del sistema integrato di sorveglianza virologica e clinico-epidemiologica, attivo in Italia dal 1997, seguendo lo schema metodologico riportato in Figura 6 (20).

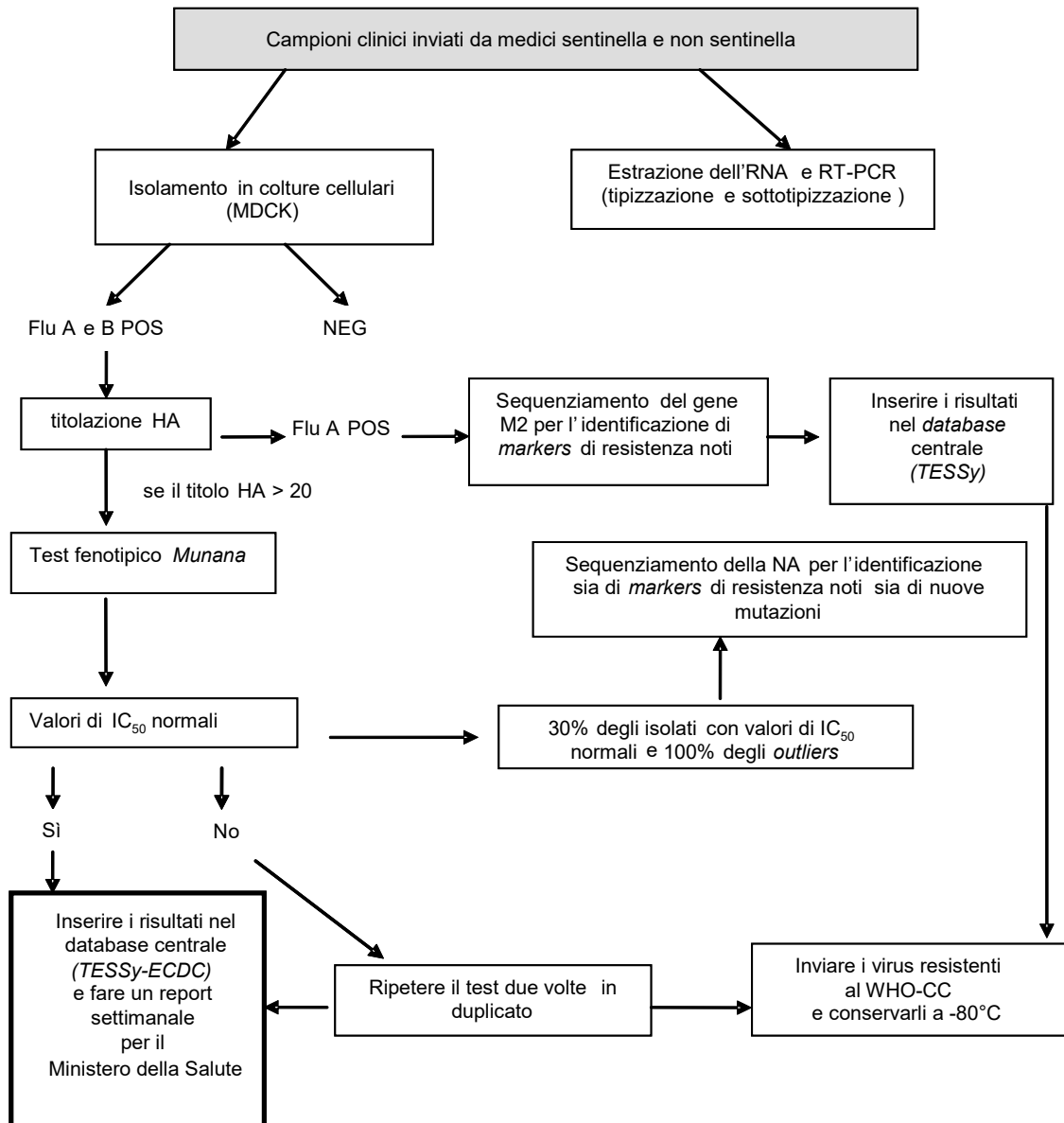


Figura 6. Schema metodologico del sistema di sorveglianza della farmaco-resistenza

## Metodi impiegati dal NIC nel monitoraggio della farmaco-resistenza

La presenza del virus influenzale nei campioni clinici (tamponi faringei, tamponi nasofaringei e lavaggi broncoalveolari) è stata evidenziata attraverso l'isolamento virale e/o l'identificazione di componenti virali.

Per l'isolamento del virus sono state utilizzate colture cellulari di rene di cane (*Madin-Darby Canine Kidney Cells*, MDCK) (21-22), particolarmente sensibili alla crescita del virus influenzale. La presenza di virus è stata evidenziata mediante la ricerca di attività emagglutinante nel liquido colturale soprannatante.

Per la tipizzazione e/o sottotipizzazione dell'agente emagglutinante isolato sono stati utilizzati sia metodi di identificazione sierologica, come il test di inibizione dell'emagglutinazione (*Haemagglutination Inhibition*, HI) (23-24), utilizzando antisieri policlonali prodotti in pollo e/o furetto presso l'ISS, sia saggi molecolari (RT-PCR e/o realtime RT-PCR) utili ad identificare specifiche sequenze del gene HA. Per l'identificazione delle componenti virali NA ed M (neuraminidasi e proteina di matrice) si è fatto ricorso a metodi di RT-PCR (25-29), utilizzando oligonucleotidi specifici sintetizzati dal NIC.

Gli amplificati ottenuti mediante la reazione di RT-PCR sono stati purificati e utilizzati nella successiva fase di sequenziamento molecolare in cui si è fatto uso del kit "Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing" (Applied Biosystems). I prodotti di sequenziamento sono stati infine sottoposti ad analisi con lo strumento "3500 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems).

Le analisi e l'allineamento delle sequenze sono state eseguite mediante l'utilizzo del programma BIOEDIT 7.0.3. (30-31).

## Metodi impiegati dal NIC per lo studio della sensibilità degli isolati virali agli inibitori della NA e della M2

La sensibilità degli isolati virali agli INA, Oseltamivir e Zanamivir è stata saggiata mediante:

- saggio enzimatico di inibizione della neuraminidasi, utilizzando come substrato il MUNANA;
- analisi di sequenza della NA, per evidenziare l'eventuale presenza di cambiamenti aminoacidici associati al carattere di resistenza.

La sensibilità degli isolati agli inibitori della M2 (Amantadina e Rimantadina) è stata saggiata mediante:

- analisi di sequenza della porzione del gene M codificante per la proteina M2 al fine di identificare le mutazioni puntiformi notoriamente associate al carattere di resistenza.

## **RISULTATI DELL'ATTIVITÀ DI FARMACO-SORVEGLIANZA IN ITALIA**

### **Virus influenzali inclusi nello studio**

In totale, 694 virus influenzali umani (110 A/H1N1, 160 A/H1N1pdm09, 250 A/H3N2, 174 B) isolati tra il 2004 e il 2014 sono stati saggiati, presso il NIC, per la valutazione della sensibilità ad entrambi gli INA, Oseltamivir e Zanamivir.

Inoltre, 174 ceppi virali di tipo A (64 H1N1, 37 H1N1pdm09, 73 H3N2), identificati tra il 2004 e il 2012, sono stati saggiati anche per la valutazione della suscettibilità agli Adamantani (amantadina e rimantadina).

Il diverso numero di virus saggiati nel corso di ogni stagione influenzale monitorata riflette l'andamento della circolazione dei diversi tipi/sottotipi virali nella popolazione umana.

In Italia dal 2004 al 2014 si è assistito ad una prevalente circolazione dei virus di tipo A rispetto a quelli di tipo B.

In particolare, i virus A/H3N2 hanno ampiamente circolato nella maggior parte delle stagioni considerate, ad eccezione delle stagioni 2005/2006 e 2007/2008 dominate dai virus stagionali A/H1N1 e delle stagioni 2009/2010, 2010/2011 e 2012/2013 caratterizzate dalla maggiore circolazione del virus pandemico A/H1N1pdm09. Quest'ultimo ceppo virale, fin dall'anno della sua comparsa, ha completamente soppiantato la circolazione dei virus stagionali H1N1. Inoltre, continuando tutt'ora a circolare nella popolazione umana è ormai considerato un ceppo virale influenzale stagionale.

I virus appartenenti al tipo B hanno, invece, circolato prevalentemente verso la fine di ogni stagione analizzata, nella maggior parte dei casi a livelli più bassi rispetto ai virus A.

### **Valutazione della sensibilità agli INA**

#### **Risultati analisi fenotipiche**

Nella Tabella 5 vengono riassunti il numero dei ceppi virali testati e i rispettivi valori medi di  $IC_{50}$ , relativi a tutti e due gli INA (Oseltamivir e Zanamivir), osservati per ogni stagione analizzata.

I risultati, ottenuti con il test di inibizione della neuraminidasi (MUNANA), hanno mostrato che i virus influenzali italiani presentano una diversa sensibilità nei confronti dei due farmaci utilizzati, in relazione al tipo di NA virale (20).

Complessivamente, i virus italiani, sia di tipo A sia di tipo B, sono risultati più sensibili allo Zanamivir rispetto all'Oseltamivir, come riportato anche per i ceppi virali influenzali isolati in altri Paesi (32).

In particolare, i virus stagionali A/H1N1 e quelli pandemici A/H1N1pdm09 sono risultati più sensibili allo Zanamivir (A/H1N1 mediana  $IC_{50}$ : 1,34 nM; A/H1N1pdm09 mediana  $IC_{50}$ : 0,6 nM) rispetto all'Oseltamivir (A/H1N1 mediana  $IC_{50}$ : 2,26 nM; A/H1N1 pdm09 mediana  $IC_{50}$ : 1,72 nM) (Figura 7).

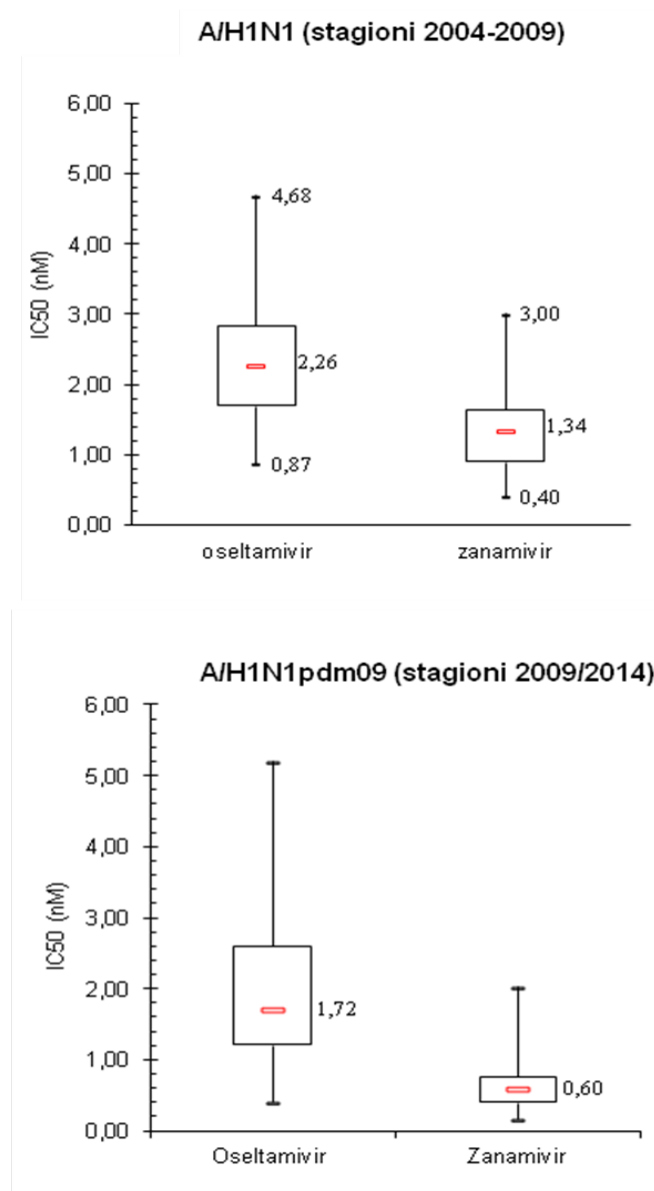
Tabella 5. Valori di IC<sub>50</sub> osservati per i virus influenzali isolati in Italia nel corso di dieci stagioni consecutive (2004/2005 – 2013/2014)

Farmaco	Virus Tipo/Sottotipo	Media IC <sub>50</sub> (nM) (n) <sup>a</sup>									
		2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14
<b>Stagioni influenzali</b>											
<b>Osetamivir</b>	<b>A/H1N1</b>	2,33 (4)	1,88 (11)	1,34 (10)	2,58 (66)*	*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>A/H3N2</b>	0,64 (5)	0,29 (2)	0,51 (19)	1,24 (3)	0,7 (78)	n.d.	0,6 (4)	0,59 (51)	0,34 (11)	0,54 (77)
	<b>B</b>	21,2 (5)	45,3 (11)	23 (4)	27,4 (41)	44,5 (5)	24,7 (11)	57,8 (36)	29,8 (15)	42 (35)	30,3 (11)
	<b>A/H1N1 pdm09</b>						2,82 (28)*	2,57 (53)	n.d.	1,05 (34)	1,74 (42)
<b>Zanamivir</b>	<b>A/H1N1</b>	1,46 (4)	0,94 (11)	1,05 (10)	1,37 (67)	1,6 (18)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>A/H3N2</b>	1 (5)	0,45 (2)	0,57 (19)	0,56 (3)	0,77 (78)	n.d.	0,37 (4)	0,44 (51)	0,27 (11)	0,35 (77)
	<b>B</b>	4,16 (5)	5,2 (11)	3 (4)	7,3 (41)	10,4 (5)	9,1 (11)	10,9 (36)	5,9 (15)	3,33 (35)	4,37 (11)
	<b>A/H1N1 pdm09</b>						1,02 (30)	0,72 (53)	n.d.	0,36 (35)	0,57 (42)

<sup>a</sup> numero di isolati testati;\* ceppi A/H1N1 Osetamivir-resistenti (1 identificato nella stagione 2007/08, 18 nella stagione 2008/09) - valori di IC<sub>50</sub> non riportati;\* ceppi A/H1N1pdm09 Osetamivir-resistenti (2 identificati nel corso della stagione 2009/10) - valori di IC<sub>50</sub> non riportati;

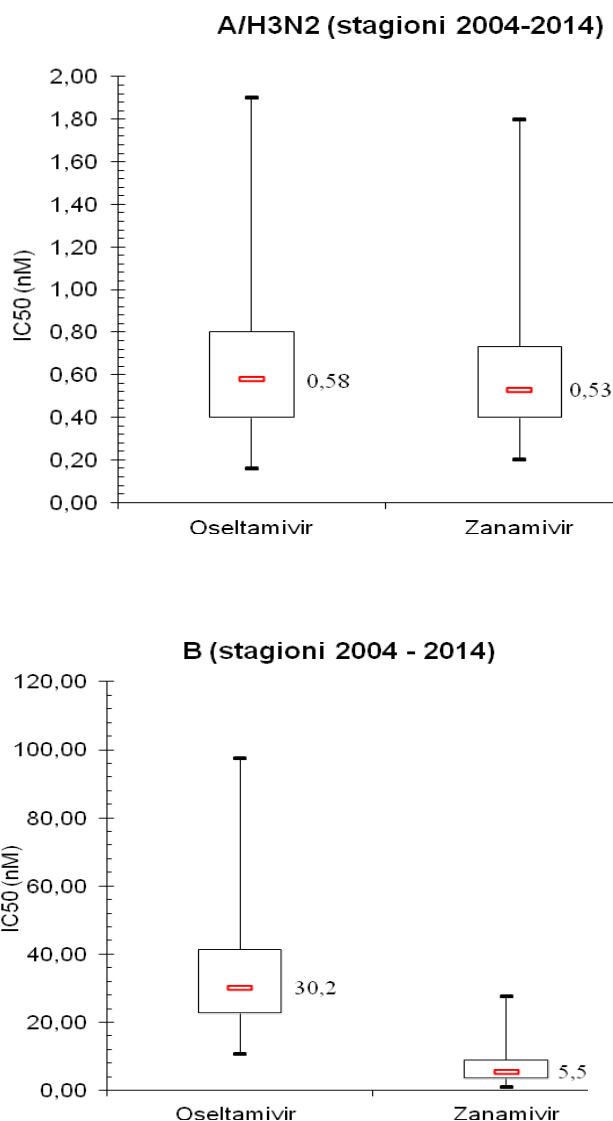
n.d.: dato non disponibile (NB in seguito alla comparsa del virus H1N1pdm09 nel 2009, i ceppi H1N1 stagionali non hanno più circolato; la stagione 2009/10 è stata caratterizzata da scarsa circolazione di virus H3N2; la stagione 2011/2012 è stata caratterizzata da scarsa circolazione di virus H1N1pdm09).





**Figura 7. Suscettibilità dei virus influenzali A/H1N1 e A/H1N1pdm09 agli INA. I risultati sono mostrati mediante diagramma box plot, in cui l'estremo inferiore è il 1° quartile, l'estremo superiore è il 3° quartile e la mediana è la linea che divide la "scatola" in due parti**

I virus di sottotipo A/H3N2 hanno mostrato una simile suscettibilità nei confronti di tutti e due i farmaci (mediana  $IC_{50}$  per Oseltamivir: 0,58 nM; mediana  $IC_{50}$  per Zanamivir: 0,53) (Figura 8). I ceppi virali di tipo B, invece, si sono mostrati di gran lunga più sensibili allo Zanamivir rispetto all'Oseltamivir presentando valori di  $IC_{50}$  per Zanamivir più bassi di circa 6 volte rispetto a quelli ottenuti per Oseltamivir (Figura 8).



**Figura 8. Suscettibilità dei virus influenzali A/H3N2 e B agli INA.**  
**I risultati sono mostrati mediante diagramma box plot, in cui l'estremo inferiore è il 1° quartile, l'estremo superiore è il 3° quartile e la mediana è la linea che divide la "scatola" in due parti**

Nel corso delle dieci stagioni incluse nello studio (2004 - 2014), nell'ambito dei virus influenzali A/H3N2, A/H1N1pdm09 e B, non è stato osservato un significativo incremento dei valori di IC<sub>50</sub>, nè per Oseltamivir né per Zanamivir (Tabella 5). Al contrario, per i virus stagionali A/H1N1, è stato osservato un improvviso e sostanziale aumento della resistenza all'Oseltamivir negli ultimi anni della loro circolazione nel nostro Paese, passando da una percentuale di resistenza dell'1,5%, osservata per la stagione 2007/2008, ad una del 100%, relativa alla successiva stagione 2008/2009. Una situazione analoga è stata osservata in molti Paesi europei (5, 6, 33, 34) (Figura 9 e Figura 10).

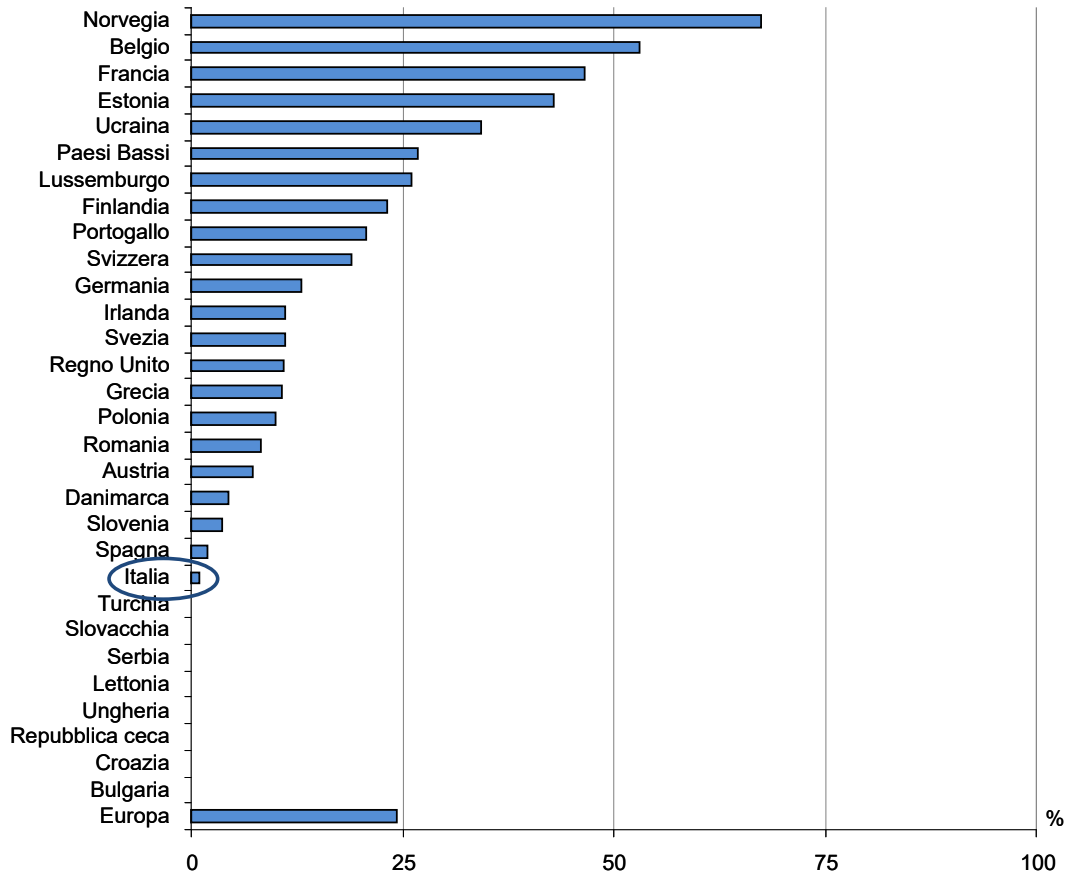


Figura 9. Resistenza (%) all'Oseltamivir osservata in Europa nel corso della stagione 2007/2008

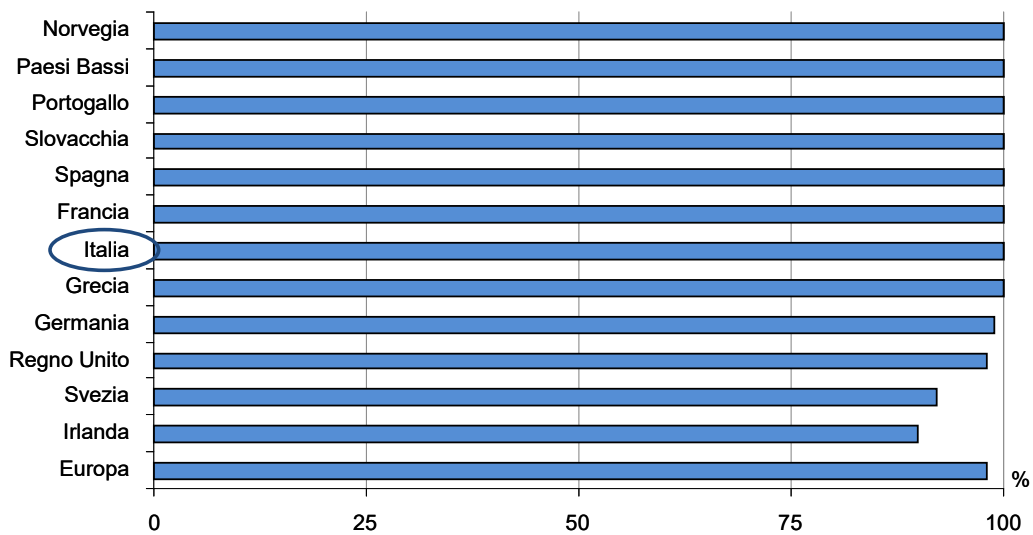


Figura 10. Resistenza (%) all'Oseltamivir osservata in Europa nel corso della stagione 2008/2009

Tra i 694 virus analizzati, sono stati identificati 24 ceppi resistenti all'Oseltamivir (ORV) di cui 19 A/H1N1 (1 nella stagione 2007/2008 e 18 nella stagione successiva 2008/2009) e 5 A/H1N1pdm09 (3 nella stagione 2009/2010 e 2 nella stagione influenzale 2010/2011).

Tutti i virus ORV individuati hanno mostrato una riduzione della sensibilità al farmaco di circa 400 volte rispetto a quanto osservato per i ceppi *wild-type*. Questi isolati, infatti, hanno mostrato valori di IC<sub>50</sub> per Oseltamivir molto alti, compresi tra 643 nM e 1000 nM (dati non riportati). Nessun virus testato si è mostrato, invece, resistente allo Zanamivir. Differentemente dagli A/H1N1 stagionali, in cui la resistenza all'Oseltamivir è insorta spontaneamente, tutti i virus pandemici A/H1N1pdm09 risultati ORV sono stati isolati da bambini immunodepressi con prolungato *shedding* virale e sottoposti a trattamenti prolungati con il farmaco (35).

## Risultati analisi genotipiche

Il sequenziamento molecolare della NA è stato effettuato su tutti i virus ORV, identificati mediante il saggio fenotipico, e su un numero selezionato di isolati *wild-type*. In tutti i ceppi resistenti all'Oseltamivir analizzati è stata identificata la mutazione H275Y (numerazione N1) nella regione *framework* del sito catalitico dell'enzima, notoriamente associata al carattere di resistenza. In nessuno degli altri virus analizzati sono state, invece, osservate sostituzioni amminoacidiche note per essere associate a resistenza o ad una ridotta sensibilità ad entrambi i farmaci.

## Monitoraggio della sensibilità agli inibitori della M2

### Risultati analisi genotipiche

Nel complesso, 174 ceppi virali di tipo A, identificati nel corso delle stagioni 2004/2005-2011/2012 (64 H1N1, 37 H1N1pdm09, 73 H3N2) sono stati anche saggati per la loro suscettibilità agli inibitori della proteina M2, mediante analisi di sequenza del gene M. In particolare, tra i virus H3N2 è stato rilevato un crescente aumento della resistenza. Per questo sottotipo, infatti, si è passati da una percentuale di resistenza del 33%, osservata nei ceppi isolati nella stagione 2004/2005, ad una percentuale di resistenza del 100% per quelli identificati nelle ultime stagioni influenzali monitorate (Figura 11).

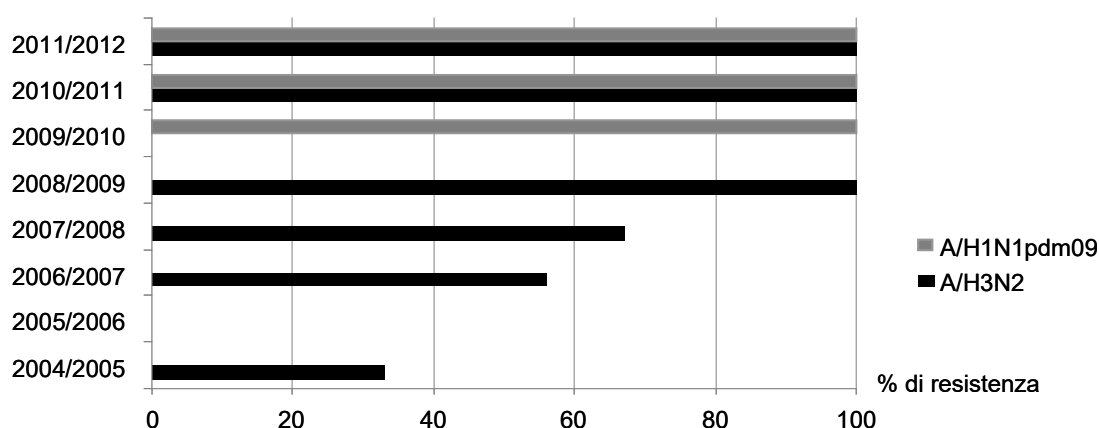


Figura 11. Percentuali di resistenza agli Adamantani dei virus A/H3N2 e A/H1N1pdm09 osservate nel corso delle stagioni influenzali 2004/205-2011/2012

I virus A/H1N1pdm09 sono, invece, risultati tutti Adamantani-resistenti (*vedi* Figura 11). Al contrario, nessun ceppo A/H1N1 è risultato resistente.

Le analisi di sequenza hanno evidenziato per tutti i ceppi resistenti la presenza della sostituzione aminoacidica in corrispondenza del residuo 31 (S31N), nota per essere associata al carattere di resistenza.

## DISCUSSIONE

I farmaci antinfluenzali possono svolgere un ruolo fondamentale sia nel controllo dell'influenza epidemica stagionale sia in caso di emergenza pandemica, con sostanziali benefici sia nella profilassi che nella terapia della malattia.

La più importante limitazione nell'impiego dei farmaci antinfluenzali attualmente in commercio in Italia (Adamantani e INA) nella pratica clinica, è rappresentata dallo sviluppo di resistenza che può ridurre considerevolmente l'efficacia.

Inoltre, l'aumentata recente disponibilità degli INA, i farmaci attualmente più utilizzati per il trattamento dell'influenza, specialmente durante l'ultima pandemia del 2009, sottolinea l'importanza di un attento e continuo monitoraggio della suscettibilità dei ceppi influenzali circolanti verso i suddetti farmaci.

Il presente studio riporta i risultati conseguiti nell'ambito delle attività di sorveglianza della farmaco-resistenza dei virus influenzali circolanti in Italia, negli ultimi dieci anni. Tali attività, che rispondono a specifiche raccomandazioni dell'OMS e dell'ECDC, vengono portate avanti dal NIC, mediante l'impiego sia di saggi fenotipici che genotipici, validati dall'OMS.

Le analisi sono state eseguite su isolati clinici di virus influenzale raccolti nell'ambito delle annuali attività di sorveglianza virologica del NIC, rivolgendo particolare attenzione ai pazienti ospedalizzati, principalmente immunocompromessi, sottoposti a trattamento farmacologico. Le indagini hanno permesso di monitorare nel tempo sia il potenziale sviluppo del fenotipo di resistenza, sia ogni eventuale diminuzione della suscettibilità degli isolati virali alle due classi di farmaci.

Nel corso delle dieci stagioni incluse nello studio (2004-2014), i virus italiani, seppur caratterizzati da una diversa sensibilità nei confronti dei due farmaci INA (Oseltamivir e Zanamivir), non hanno mostrato nessun significativo incremento nel tempo dei valori di IC<sub>50</sub>, né per Oseltamivir né per Zanamivir.

Nel complesso, una maggiore sensibilità è stata rilevata verso lo Zanamivir rispetto all'Oseltamivir, come riportato anche in altri paesi del mondo. Inoltre, i virus di tipo A sono risultati in genere più sensibili ai due farmaci, rispetto ai ceppi B, nell'ambito dei quali, tra l'altro, è stata rilevata una suscettibilità di gran lunga maggiore verso lo Zanamivir rispetto all'Oseltamivir.

Da notare che anche in Italia (così come nel resto dei paesi europei e del mondo), a partire dalla stagione 2007/2008 sono emersi spontaneamente e naturalmente virus A/H1N1 resistenti all'Oseltamivir, fino a raggiungere il 100% dei ceppi H1 in circolazione nella successiva stagione 2008/2009. Tali ceppi sono poi scomparsi a partire dal 2009, in quanto soppiantati dai virus pandemici A/H1N1pdm09, ancora oggi in circolazione e sensibili in genere ad entrambi gli INA.

I casi sporadici di resistenza all'Oseltamivir nei ceppi A/H1N1pdm09, registrati in particolare nelle stagioni 2009/2010 e 2010/2011, sono stati tutti isolati da bambini immunodepressi con prolungato *shedding* virale e sottoposti a trattamenti prolungati con il farmaco.

Un graduale aumento di resistenza verso gli Adamantani è stato osservato nel tempo in tutti i ceppi A/H3N2 analizzati, fino a raggiungere il 100% di resistenza per quelli identificati nell'ultima stagione monitorata in questo studio (2011/2012). Fin dalla loro comparsa, i virus A/H1N1pdm09 sono, invece, risultati tutti Adamantani-resistenti, a differenza dei precedenti ceppi A/H1N1 stagionali che erano tutti sensibili a tali farmaci.

## BIBLIOGRAFIA

1. Simonsen L, Viboud C, Grenfell BT, Dushoff J, Jennings L, Smit M, Macken C, Hata M, Gog J, Miller MA, Holmes EC. The genesis and spread of reassortment human influenza A/H3N2 viruses conferring adamantane resistance. *Mol Biol Evol.* 2007;24 (8):1811-20.
2. Gubareva LV, Trujillo AA, Okomo-Adhiambo M, Mishin VP, Deyde VM, Sleeman K, Nguyen HT, Sheu TG, Garten RJ, Shaw MW, Fry AM, Klimov AI. Comprehensive assessment of 2009 pandemic influenza A (H1N1) Virus drug susceptibility in vitro. *Antiviral Ther.* 2010;15(8):1151-9.
3. Aeron C Hurt. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Current opinion in Virology.* 2014;8:22-29.
4. Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C, Hampson AW, Hay A, Klimov A, Tashiro M, Webster RG, Aymard M, Hayden FG, Zambon M. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(7):2395-402.
5. Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, Meijer A, Paget WJ, Hay AJ, Zambon M. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill.* 2008;13(5) pii: 8026.
6. Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, Van-Der-Werf S, Schweiger B, Opp M, Paget J, Van-De-Kasstele J, Hay A, Zambon M. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007–08 season. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(4):552–560. 10.3201/eid1504.181280.
7. Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ, Deng YM, Osbourn M, Gehrig N, *et al.* Community transmission of oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza. *N Engl J. Med.* 2011; 365: 2541–2542.
8. Garg S, Moore Z, Lee N, McKenna J, Bishop A, Fleischauer A, Springs CB, Nguyen HT, Sheu TG, Sleeman K, Finelli L, Gubareva L, Fry AM, A cluster of patients infected with I221V influenza B virus variants with reduced oseltamivir susceptibility – North Carolina and South Carolina, 2010–2011. *J Infect Dis.* 2013;207(6):966-73.
9. Merritt T, Kelso A, Dalton C, Durrheim D, Barr IG. Characteristics of a Widespread Community Cluster of H275Y Oseltamivir-Resistant A(H1N1)pdm09 Influenza in Australia. *J Infect Dis.* 2012;206(2):148-57.
10. Takashita EI, Ejima M, Itoh R, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill.* 2014;19(1). pii: 20666.
11. Hong SD1, Park SH, Kang SJ, Kwon YS, Kee SJ, Park KH, Jung SI, Jang HC. First fatal Oseltamivir-Resistant 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) case in an adult in Korea. *Chonnam Med J.* 2011;47(2):127-9.
12. Aoki FY. Amantadine and rimantadine. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ (Ed.). *Textbook of Influenza.* Oxford: Blackwell Science; 1998. p. 457-76.
13. Gubareva LV1, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet.* 2000; 355(9206):827-35.
14. Monto AS. The threat of an avian influenza pandemic. *N Engl J Med.* 2005;352(4):323-5.
15. Servizio Sanitario della Toscana, Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute. *La gestione della sindrome influenzale. Linee guida.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008 (aggiornamento 2010). (SNLG 16). Disponibile all'indirizzo: [http://www.snlg-iss.it/cms/files/LG\\_Influenza\\_unico\\_2008.pdf](http://www.snlg-iss.it/cms/files/LG_Influenza_unico_2008.pdf); ultima consultazione 9/3/2015.

16. Garg S1, Fry AM, Patton M, Fiore AE, Finelli L. Antiviral treatment of influenza in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2012; 31(2):e43-51.
17. Laplante J1, St George K2. Antiviral resistance in influenza viruses: laboratory testing. *Clin Lab Med.* 2014; 34(2):387-408.
18. Deyde VM1, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, Shu Y, Gubareva LV, Cox NJ, Klimov AI. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis.* 2007;196(2):249-57.
19. World Health Organization. *Laboratory methodologies for testing the antiviral susceptibility of influenza viruses: Neuraminidase inhibitor (NAI).* Geneva: WHO; 2015. Disponibile all'indirizzo: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/antiviral\\_susceptibility/nai\\_phenotyping/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/nai_phenotyping/en/); ultima consultazione 9/3/2015.
20. Puzelli S, Facchini M, Di Martino A, Fabiani C, Lackenby A, Zambon M, Donatelli I. Evaluation of the antiviral drug susceptibility of influenza viruses in Italy from 2004/05 to 2009/10 epidemics and from the recent 2009 pandemic. *Antiviral Res.* 2011;90(3):205-12.
21. Reina J, Fernandez-Baca V, Blanco I, Munar M. Comparison Of Madin-darby canine kidney cells (MDCK) with a green monkey continuous cell line (VERO) and human lung embryonated cells (MRC-5) in the isolation of influenza A virus from nasopharyngeal aspirates by shell vial culture. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(7):1900-1.
22. Ziegler T, Hall H, Sanchez-Fauquier A, Gamble WC, Cox NJ. Type and subtype-specific detection of influenza viruses in clinical specimens by rapid culture assay. *J Clin Microbiol.* 1995;33:318-21.
23. de Jong JC, Palache AM, Beyer WE, Rimmelzwaan GF, Boon AC, Osterhaus AD. Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus. *Dev Biol (Basel).* 2003;115:63-73.
24. WHO Global Influenza Surveillance Network. *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.* Geneva: World Health Organization; 2011.
25. Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ (Ed.). *Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance.* WHO Collaborating Centers for Reference and Research on Influenza, U.S. Department of Health and Human Services; 1982.
26. Daum LT, Canas LC, Schadler CA, Ujimori VA, Huff WB, Barnes WJ, Lohman KL. A rapid, single-step multiplex reverse transcription-PCR assay for the detection of human H1N1, H3N2, and B influenza viruses. *J Clin Virol.* 2002;25(3):345-50.
27. Poddar SK, Espina R, Schnurr DP. Evaluation of a single-step multiplex RT-PCR for influenza virus type and subtype detection in respiratory samples. *J Clin Lab Anal.* 2002;16(3):163-6.
28. van Elden LJ, van Kraaij MG, Nijhus M, Hendriksen KA, Dekker AW, Rozenberg-Arska M, van Loon AM. Polymerase chain reaction is more sensitive than viral culture and antigen testing for the detection of respiratory viruses in adults with hematological cancer and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2002;34(2):177-83.
29. Cisterna R, Meabe E. RT-PCR for the determination of the type of influenza virus circulating in the population. *Rev Esp Quimioter.* 2000;13(3):286-90.
30. Yamada A, Imanishi J, Nakajima E, Nakajima K, Nakajima S. Detection of influenza viruses in throat swab by using polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol.* 1991;35:259-65.
31. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 1999; 41:95-8.
32. Stoner TD1, Krauss S, DuBois RM, Negovetich NJ, Stallknecht DE, Senne DA, Gramer MR, Swafford S, DeLiberto T, Govorkova EA, Webster RG. Antiviral susceptibility of avian and swine influenza virus of the N1 neuraminidase subtype. *J Virol.* 2010; 84(19):9800-9.
33. Ciancio BC, Meerhoff TJ, Kramarz P, Bonmarin I, Borgen K, Boucher CA, Buchholz U, Buda S, Dijkstra F, Dudman S, Duwe S, Hauge SH, Hungnes O, Meijer A, Mossong J, Paget WJ, Phin N,



van der Sande M, Schweiger B, Nicoll A. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses detected in Europe during season 2007/2008 had epidemiologic and clinical characteristics similar to co-circulating susceptible A(H1N1) viruses. *Euro Surveill.* 2009;14(46):1-8.

34. World Health Organization. *Influenza A(H1N1) virus resistance to oseltamivir - 2008/2009 influenza season, northern hemisphere.* Geneva: WHO; 2009. Disponibile all'indirizzo: [http://www.who.int/influenza/resources/documents/H1N1webupdate20090318\\_ed\\_ns.pdf](http://www.who.int/influenza/resources/documents/H1N1webupdate20090318_ed_ns.pdf); ultima consultazione 9/3/2015.
35. Campanini G1, Piralla A, Rovida F, Puzelli S, Facchini M, Locatelli F, Minoli L, Percivalle E, Donatelli I, Baldanti F; Surveillance Group for New Influenza A/H1N1v Investigation in Italy. First case in Italy of acquired resistance to oseltamivir in an immunocompromised patient with influenza A/H1N1v infection. *J Clin Virol.* 2010;48(3):220-2.



**APPENDICE**  
**Protocollo operativo (stagione 2013-2014)**  
**del sistema di sorveglianza FLU-ISS:**  
**estratto della parte virologica**



---

*Si riporta un estratto della parte virologica del Protocollo operativo del sistema di sorveglianza FLU-ISS per la stagione influenzale 2013-2014.*

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

---

## 2. SORVEGLIANZA VIROLOGICA

### 2.1 Razionale

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

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

Per questo motivo la composizione vaccinale va aggiornata periodicamente in relazione all'emergenza di nuove varianti virali. L'identificazione di queste varianti è resa possibile grazie all'attività di sorveglianza virologica che, attraverso le caratterizzazioni antigeniche e molecolari dei ceppi circolanti in periodo epidemico, permette la valutazione dell'omologia tra ceppi di campo e ceppi vaccinali.

Il sistema nazionale di sorveglianza virologica si inserisce nel Programma Mondiale di Sorveglianza dell'Influenza dell'OMS.

### 2.2 Obiettivi

Il sistema prevede di raggiungere le seguenti finalità:

1. Monitorare la circolazione dei diversi tipi e sottotipi di virus influenzali nelle diverse aree geografiche e nei diversi periodi della stagione epidemica;
2. Valutare l'omologia antigenica tra ceppi epidemici e ceppi vaccinali, attraverso analisi sierologiche e molecolari su campioni clinici prelevati dai pazienti con sintomatologia influenzale;
3. Fornire agli organismi di riferimento Internazionale (OMS, ECDC) dati relativi alle caratteristiche dei virus circolanti in Italia, contribuendo alla definizione della composizione vaccinale utilizzabile nella stagione successiva.

### 2.3 Metodi

#### 2.3.1 Periodo di osservazione e raccolta dei campioni clinici

Il monitoraggio della circolazione dei virus influenzali sarà effettuato, nelle regioni provviste di laboratorio INFLUNET di riferimento (**Allegato 8**), a partire dalla **46<sup>a</sup> settimana 2013** e si protrarrà per l'intero periodo di sorveglianza (**Allegato 5**).

Il medico effettuerà il prelievo da pazienti con sintomatologia influenzale (**Allegato 4**). Il prelievo deve essere eseguito durante la fase acuta della malattia (rialzo febbrile).

Per la raccolta, potrà essere utilizzato il Kit diagnostico "Virocult", seguendo semplici istruzioni (**Allegato 6**) e compilando, per ciascun campione prelevato, la "Scheda raccolta dati" (**Allegato 7**).

### **2.3.2 Analisi dei campioni e strutture laboratoristiche coinvolte**

I campioni clinici raccolti saranno inviati ai laboratori regionali della Rete INFLUNET, che provvederanno all'identificazione e/o isolamento virale, utilizzando modalità e metodologie concordate con il NIC. Tutti i dati relativi ai campioni ricevuti saranno comunicati al NIC, secondo la modulistica già in vigore nella passata stagione, utilizzando il modulo on-line disponibile nel sito INFLUNET dell'ISS (<https://www.iss.it/site/fluvir/login.aspx>), ovvero compilando la scheda dati in formato Excel.

Il NIC provvederà ad eseguire ulteriori studi su un numero selezionato di ceppi isolati dai laboratori periferici, secondo modalità che verranno concordate direttamente con i singoli laboratori. In base ai risultati di queste indagini, parte degli isolati virali sarà inviato dal NIC al Centro di riferimento internazionale dell'OMS (*Medical Research Council*- MRC di Londra).

### **2.4 Flusso dei dati a livello nazionale ed internazionale**

I risultati virologici nazionali saranno resi pubblici, unitamente a quelli epidemiologici, attraverso l'aggiornamento settimanale dei siti Internet del Ministero della Salute (<http://www.salute.gov.it/influenza/influenza.jsp>), dell'OMS ([www.who.int/en/](http://www.who.int/en/)) e dell'ECDC ([www.ecdc.europa.eu/en/](http://www.ecdc.europa.eu/en/)).

I dati relativi alle caratteristiche antigeniche dei ceppi virali italiani saranno discussi a Ginevra (OMS), ai fini dell'aggiornamento della composizione del vaccino utilizzabile nella stagione 2014-2015.

## Allegato 4

---

### Definizione di caso di sindrome influenzale

Per garantire la massima confrontabilità dei risultati con quelli ottenuti da altri studi, si chiede ai medici partecipanti di segnalare i pazienti tra i loro assistiti che rispondono alla seguente definizione di caso:

#### **"Sindrome influenzale"**

affezione respiratoria acuta ad esordio brusco ed improvviso con febbre maggiore o uguale di 38°C accompagnata da almeno un sintomo tra i seguenti:

- cefalea, malessere generalizzato, sensazione di febbre (sudorazione, brividi), astenia; e da almeno uno dei seguenti sintomi respiratori:
- tosse, faringodinia, congestione nasale.

#### **N.B.**

Per la diagnosi clinica di influenza nel bambino è importante considerare quanto indicato per gli adulti tenendo conto che:

- 1) i bambini più piccoli non sono in grado di descrivere la sintomatologia sistemica che si evidenzia semplicemente con:
  - irritabilità
  - pianto
  - inappetenza
- 2) vomito e diarrea sono frequenti nel lattante che solo eccezionalmente presenta febbre;
- 3) occhi arrossati e congiuntivite sono caratteristici dei bambini in età prescolare, in caso di febbre elevata;
- 4) nel bambino di 1-5 anni è necessario considerare la grande frequenza di laringotracheite e bronchite associate a febbre elevata.

## **Allegato 6**

---

### **Protocollo operativo per la raccolta dei campioni clinici**

Lo scopo delle indagini virologiche è quello di identificare e caratterizzare i virus influenzali circolanti nella popolazione. Le attività partiranno dalla 46<sup>a</sup> settimana e si protrarranno per l'intero periodo dello studio (17<sup>a</sup> settimana).

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

Se la raccolta del materiale clinico avverrà utilizzando i tamponi Virocult, il prelievo dovrà avvenire secondo le modalità di seguito riportate:

#### **Prelievo del tampone faringeo**

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

#### **Importante:**

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

#### **Registrazione dati**

Riportare nell'**Allegato 7** i dati relativi al paziente sottoposto a prelievo.

#### **Spedizione**

Per le modalità di spedizione, prendere accordi con il Laboratorio di Riferimento Regionale.



## Allegato 7

### Scheda raccolta dati sul paziente sottoposto a tampone per la conferma di laboratorio

COGNOME e NOME MEDICO (per esteso): ..... INDIRIZZO:  
.....

CODICE REGIONALE: ..... LABORATORIO DI RIFERIMENTO:  
.....

#### DATI PAZIENTI

Iniziali paziente	Sesso	Età (anni*)	Eventuali Patologie concomitanti che favoriscono le complicanze	Data inizio sintomi	Data prelievo	Vaccinato	Eventuale Terapia Antivirale
			<input type="checkbox"/> malattie croniche apparato respiratorio <sup>1</sup> <input type="checkbox"/> malattie apparato cardio-circolatorio <sup>2</sup> <input type="checkbox"/> immunosoppresso <sup>3</sup> <input type="checkbox"/> malattie metaboliche <sup>4</sup>			<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Oseltamivir <input type="checkbox"/> Zanamivir
			<input type="checkbox"/> malattie croniche apparato respiratorio <sup>1</sup> <input type="checkbox"/> malattie apparato cardio-circolatorio <sup>2</sup> <input type="checkbox"/> immunosoppresso <sup>3</sup> <input type="checkbox"/> malattie metaboliche <sup>4</sup>			<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Oseltamivir <input type="checkbox"/> Zanamivir
			<input type="checkbox"/> malattie croniche apparato respiratorio <sup>1</sup> <input type="checkbox"/> malattie apparato cardio-circolatorio <sup>2</sup> <input type="checkbox"/> immunosoppresso <sup>3</sup> <input type="checkbox"/> malattie metaboliche <sup>4</sup>			<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Oseltamivir <input type="checkbox"/> Zanamivir
			<input type="checkbox"/> malattie croniche apparato respiratorio <sup>1</sup> <input type="checkbox"/> malattie apparato cardio-circolatorio <sup>2</sup> <input type="checkbox"/> immunosoppresso <sup>3</sup> <input type="checkbox"/> malattie metaboliche <sup>4</sup>			<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Oseltamivir <input type="checkbox"/> Zanamivir
			<input type="checkbox"/> malattie croniche apparato respiratorio <sup>1</sup> <input type="checkbox"/> malattie apparato cardio-circolatorio <sup>2</sup> <input type="checkbox"/> immunosoppresso <sup>3</sup> <input type="checkbox"/> malattie metaboliche <sup>4</sup>			<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Oseltamivir <input type="checkbox"/> Zanamivir

\* Se si tratta di bambini al di sotto dell'anno di età indicare il numero di mesi seguito dalla lettera M;

1: inclusa l'asma grave, la displasia broncopolmonare, la fibrosi cistica e la broncopatia cronico ostruttiva- BPCO;

2: comprese le cardiopatie congenite e acquisite;

3: malattie congenite o acquisite che comportino carente produzione di anticorpi, immunosoppressione indotta da farmaci o da HIV;

4: diabete mellito, obesi con BMI >30 e gravi patologie concomitanti

## Allegato 8

### Laboratori periferici afferenti alla rete Influnet e accreditati dall'ISS per la sorveglianza sentinella in periodo interpandemico\*

REGIONE	LABORATORI ACCREDITATI
<b>ALTO ADIGE</b>	• AS Alto Adige, Laboratorio Aziendale di Microbiologia e Virologia/Comprensorio sanitario di Bolzano, Via Amba Alagi, 5 – 39100 <b>Bolzano</b> ( <i>E. Pagani</i> )
<b>PIEMONTE</b>	• Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Amedeo di Savoia, Corso Svizzera, 164 – 10149 <b>Torino</b> ( <i>V. Ghisetti</i> )
<b>LOMBARDIA</b>	• Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano, Via Pascal, 36 - 20133 <b>Milano</b> ( <i>A. Zanetti</i> ) • Virologia molecolare, Struttura complessa virologia/ microbiologia, Fondazione IRCCS Policlinico "San Matteo", Via Taramelli, 5 - 27100 <b>Pavia</b> ( <i>F. Baldanti</i> )
<b>VENETO</b>	• Laboratorio di Virologia, Dipartimento di istologia, microbiologia e di biotecnologie mediche, Università degli Studi di Padova, Via Gabelli, 63 - 35121 <b>Padova</b> ( <i>G. Palù</i> )
<b>FRIULI VENEZIA GIULIA</b>	• U.C.O. Igiene e Medicina Preventiva, Dipartimento Universitario Clinico di Scienze mediche , chirurgiche e della salute, Università degli Studi di Trieste, Via dell' Istria, 65/1 – 34137 <b>Trieste</b> ( <i>P. D'Agaro</i> )
<b>LIGURIA</b>	• Laboratorio UO Igiene, Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova, Via Pastore, 1 – 16126 <b>Genova</b> ( <i>F. Ansaldi</i> )
<b>EMILIA ROMAGNA</b>	• Dipartimento di Sanità Pubblica, Istituto di igiene, Università degli Studi di Parma, Via Volturmo, 39 - 43125 <b>Parma</b> ( <i>M.L. Tanzi</i> )
<b>TOSCANA</b>	• Dipartimento di Sanità Pubblica, Laboratorio di Virologia, Università degli Studi di Firenze, Viale Morgagni, 48 – 50134 <b>Firenze</b> ( <i>A. Azzi</i> )
<b>UMBRIA</b>	• Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione Microbiologia, Piazzale Gambuli S. Andrea delle Fratte - 06132 <b>Perugia</b> ( <i>B. Camilloni</i> )
<b>LAZIO</b>	• Servizio di Analisi II, Istituto di Microbiologia, Università Cattolica S. Cuore, Facoltà di Medicina e Chirurgia "A. Gemelli", Largo Agostino Gemelli, 8 – 00168 <b>Roma</b> ( <i>M. Sanguinetti</i> )
<b>PUGLIA</b>	• UOC Policlinico di Bari DIMO - Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana, Sezione di igiene e medicina preventiva, Policlinico - P.zza G. Cesare, 11-70124 <b>Bari</b> ( <i>M. Chironna</i> )
<b>SARDEGNA</b>	• Dipartimento Scienze Biomediche, Sez. Microbiologia Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Sassari, Viale S. Pietro, 43/B - 07100 <b>Sassari</b> ( <i>C. Serra</i> )
<b>SICILIA</b>	• Dipartimento di Scienze per la Promozione della Salute, sez. Igiene "G. D'Alessandro", Università di Palermo, Via del Vespro, 133 - 90127 <b>Palermo</b> ( <i>F. Vitale</i> )

\* Nell'elenco non sono riportati i laboratori della rete Influnet che non partecipano al monitoraggio virologico in periodo interpandemico

#### Centro di Riferimento Nazionale (NIC) per l'OMS

Il NIC (presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità) fa parte, su designazione del Ministero della Salute, della Rete mondiale dei laboratori coordinati dall'OMS, per lo svolgimento delle attività di sorveglianza del *Global Influenza Programme* (GIP).

Tutti i laboratori del Network OMS vengono regolarmente validati, attraverso lo svolgimento di *External Quality Assessment Projects* (WHO-EQAP). Essi sono notificati e registrati presso il Centro Europeo di Controllo delle Malattie (ECDC) di Stoccolma.

*Responsabile:* I. Donatelli

*Gruppo di lavoro:* S. Puzelli, M.R. Castrucci, A. Di Martino, M. Facchini, A. Palmieri, L. Calzoletti, C. Fabiani, M. Meola, T. Grisetti.

*Serie Rapporti ISTISAN  
numero di luglio 2015, 4° Suppl.*

*Stampato in proprio  
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

*Roma, agosto 2015*