



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
ED ONCOLOGIA UMANA

SEZIONE DI IGIENE
Policlinico - P.zza G. Cesare, 70124 BARI
Tel. 0805592328/Fax 080 5478472

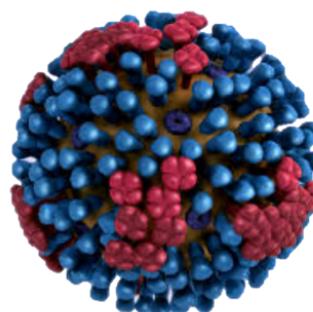
U.O.C. IGIENE
AZIENDA OSPEDALIERO
UNIVERSITARIA POLICLINICO
DI BARI

(Direttore: Prof. Michele Quarto)



SORVEGLIANZA VIROLOGICA DELL'INFLUENZA

Analisi della circolazione dei virus influenzali in
Puglia, stagione 2018-2019



A cura di Maria Chironna e Daniela Loconsole

Gruppo di lavoro: Anna Lisa De Robertis, Bruno Viviana, Baldacci Simona, Centrone Francesca,
Prisco Jolanda, Daniele Casulli, Cinzia Germinario, Michele Quarto



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
ED ONCOLOGIA UMANA

SEZIONE DI IGIENE
Policlinico – P.zza G. Cesare, 70124 BARI
Tel. 0805592328/Fax 080 5478472

U.O.C. IGIENE
AZIENZA OSPEDALIERO
UNIVERSITARIA POLICLINICO
DI BARI

(Direttore: Prof. Michele Quarto)



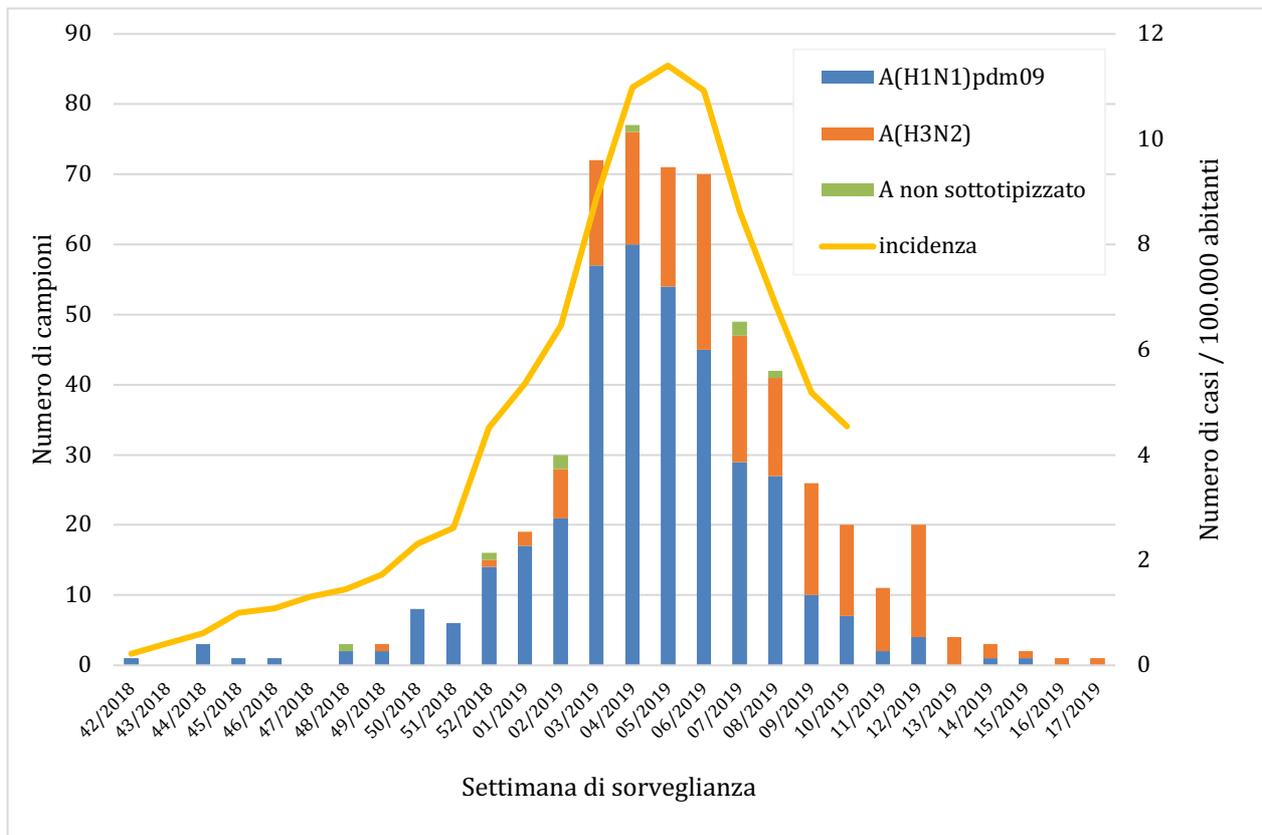
Il laboratorio di Epidemiologia Molecolare e Sanità Pubblica dell'U.O.C. Igiene dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Consorziale Policlinico di Bari è stato individuato come Centro Regionale di Riferimento per la sorveglianza virologica dell'influenza stagionale e per l'accertamento dei casi gravi e complicati di influenza (Nota A00_152/9792 del 31.8.2016 e Nota A00_04.01.2017/52, Dip. Promozione della Salute e del Benessere Sociale e dello Sport, Sezione promozione della salute e benessere, Regione Puglia). La DGR 565/2014 prevede, inoltre, che ciascuno dei medici sentinella che fa parte della rete per la sorveglianza dell'influenza invii al laboratorio di riferimento regionale campioni biologici (tamponi nasofaringei) prelevati da soggetti con diagnosi di sindrome simil-influenzale (ILI – *influenza-like illness*), ai fini dell'accertamento di una possibile eziologia da virus influenzali. Lo stesso laboratorio esegue analisi molecolari finalizzate all'identificazione dei sottotipi dei virus influenzali A (H3N2, H1N1pdm09) e dei lineaggi dei virus influenzali di tipo B (Victoria e Yamagata). Vengono eseguiti, inoltre, sequenziamenti di segmenti genomici (emoagglutinina e neuraminidasi) e analisi filogenetica ai fini della verifica delle caratteristiche dei ceppi circolanti e della loro similarità, e di eventuali *drift* rispetto ai ceppi virali contenuti nei vaccini antinfluenzali della stagione in corso.

Nella stagione 2018-2019, i primi cinque casi di influenza in Puglia sono stati identificati, rispettivamente, nelle settimane 42/2018 (16/10/2018, caso grave), 44/2018 (31/10/2018, 04/11/2018 e 07/11/2018, caso grave deceduto) e 45/2018 (09/11/2018). In tutti i casi si trattava di virus A(H1N1)pdm09. La sorveglianza virologica è stata avviata nella settimana 46/2018 (12/11/2018) e si è protratta fino alla settimana 17/2019 (28/04/2019). Nella Figura 1 è possibile osservare la distribuzione dei campioni risultati positivi per influenza per tipo/sottotipo e l'incidenza delle ILI per settimana di sorveglianza in Puglia. Fino alla prima settimana di gennaio 2019 è stato identificato prevalentemente il virus A(H1N1)pdm09. A partire dalla settimana 02/2019 (07-13/01/2019), invece, è stato registrato un progressivo aumento di virus A(H3N2). Al termine del periodo di sorveglianza virologica, i dati indicano la circolazione di ceppi influenzali di tipo A. Il 66,6% dei casi è risultato positivo per il sottotipo H1N1pdm09, il 32,0% per H3N2 e l'1,4% dei ceppi non sono stati sottotipizzati per bassa carica virale (Figura 2). Non sono state



identificate co-infezioni. Nessun ceppo di tipo B è stato identificato nel corso della stagione.

Figura 1. Andamento settimanale dei campioni positivi per tipo/sottotipo di virus influenzale e incidenza delle ILI in Puglia, stagione 2018-2019





UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
ED ONCOLOGIA UMANA

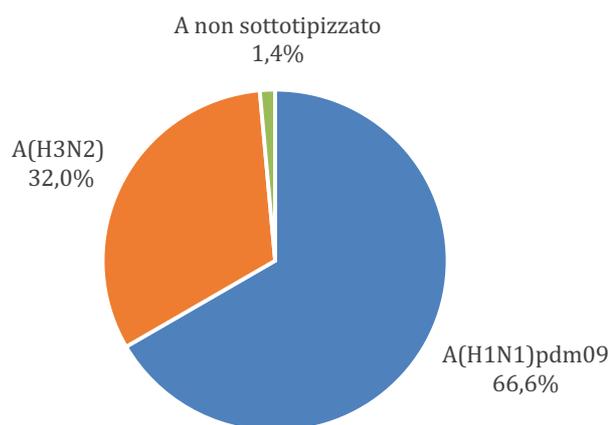
SEZIONE DI IGIENE
Policlinico - P.zza G. Cesare, 70124 BARI
Tel. 0805592328/Fax 080 5478472

U.O.C. IGIENE
AZIENDA OSPEDALIERO
UNIVERSITARIA POLICLINICO
DI BARI

(Direttore: Prof. Michele Quarto)



Figura 2. Distribuzione dei campioni positivi per influenza A per sottotipo in Puglia, stagione 2018-2019



A(H1N1)pdm09 è risultato prevalente in tutte le fasce d'età tra 0-74 anni, in particolare nelle fasce 0-4 anni (95/123, 77,2%) e 15-49 anni (97/130, 74,6%) (Figura 3). Negli ultra 74enni, invece, è risultato prevalente A(H3N2) (37/72, 51,4%).



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
ED ONCOLOGIA UMANA

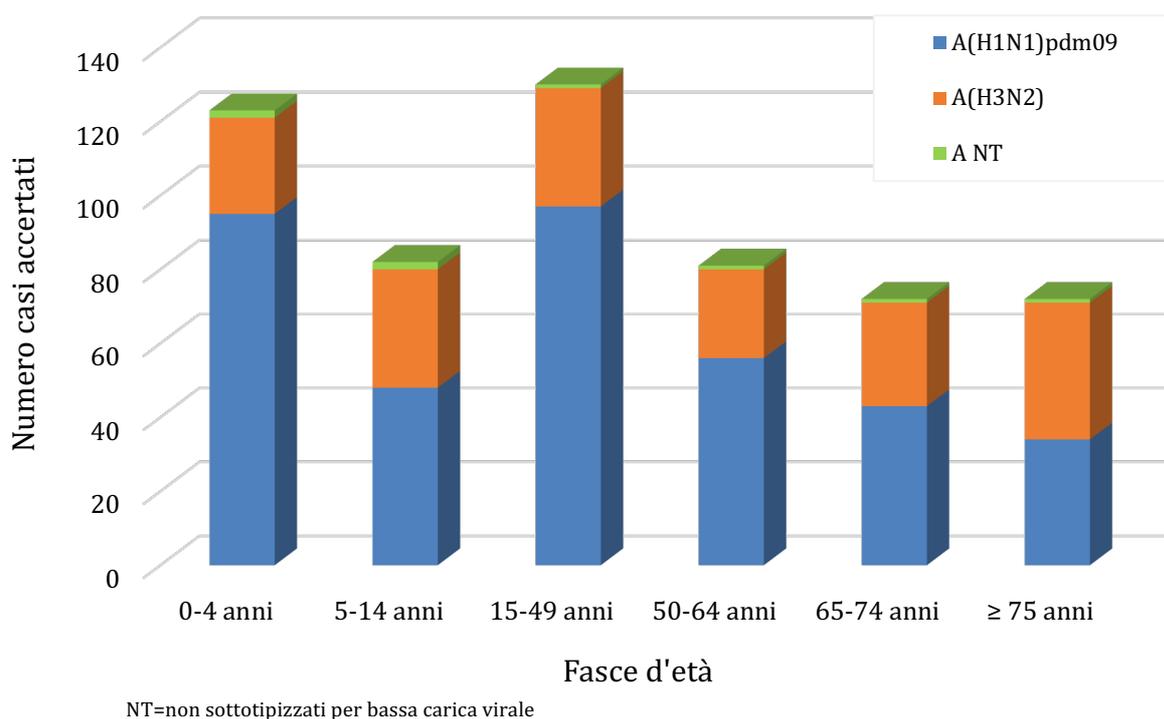
SEZIONE DI IGIENE
Policlinico - P.zza G. Cesare, 70124 BARI
Tel. 0805592328/Fax 080 5478472

U.O.C. IGIENE
AZIENDA OSPEDALIERO
UNIVERSITARIA POLICLINICO
DI BARI

(Direttore: Prof. Michele Quarto)



Figura 3. Distribuzione dei casi di influenza accertati per tipo/sottotipo di virus influenzale e fasce d'età, Puglia, stagione 2018-2019





UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
ED ONCOLOGIA UMANA

SEZIONE DI IGIENE
Policlinico – P.zza G. Cesare, 70124 BARI
Tel. 0805592328/Fax 080 5478472

U.O.C. IGIENE
AZIENZA OSPEDALIERO
UNIVERSITARIA POLICLINICO
DI BARI

(Direttore: Prof. Michele Quarto)



Sono stati accertati 53 casi gravi e complicati di influenza (Tabella 1). In 41 casi (77,4%) il ceppo responsabile era A(H1N1)pdm09 e in 12 casi (22,6%) A(H3N2).

Tabella 1. Casi gravi e complicati di influenza aggiornati al 15 maggio 2019 per caratteristiche dei pazienti in Puglia, stagione 2018-2019

| | | |
|--|--------------|---------------|
| N. casi gravi e complicati | | 53 |
| Età media (anni) | | 59,6 ± 20,5 |
| | Range | 1mese-84 anni |
| Genere | | |
| | Maschi | 36 (67,9%) |
| | Femmine | 17 (32,1%) |
| N. vaccinati | | 7 (13,2%) |
| ECMO (extra-corporeal membrane oxygenation) | | 3 |
| Virus influenzale | | |
| | A(H1N1)pdm09 | 41 (77,4%) |
| | A(H3N2) | 12 (22,6%) |
| N. soggetti con co-morbidity | | 46 (86,8%) |
| Tasso di letalità | | 26,4% (n=14) |

La Figura 4 mostra la distribuzione dei casi gravi e complicati di influenza per fasce d'età e sottotipo di virus identificato e la proporzione di casi gravi sul totale dei casi, per fasce d'età in Puglia, mentre, in Figura 5, è mostrato l'andamento dei casi gravi e complicati per fasce d'età e tipo di virus isolato in Italia. Dal confronto, emerge come, in Puglia, il maggior numero di casi gravi si sia verificato nella fascia d'età 65-74 anni mentre in Italia nella fascia 50-64 anni.

In Puglia, sono stati registrati quattro casi gravi in età pediatrica (<4 anni di età), tutti causati da virus A(H1N1)pdm09. Come evidenziato dal grafico (Figura 4), A(H1N1)pdm09 è risultato prevalente in tutte le fasce d'età, fatta eccezione per gli ultra 74enni, in cui i sottotipi A(H1N1)pdm09 e A(H3N2) hanno determinato un pari numero di casi gravi e complicati.



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
ED ONCOLOGIA UMANA

SEZIONE DI IGIENE
Policlinico - P.zza G. Cesare, 70124 BARI
Tel. 0805592328/Fax 080 5478472

U.O.C. IGIENE
AZIENDA OSPEDALIERO
UNIVERSITARIA POLICLINICO
DI BARI

(Direttore: Prof. Michele Quarto)



Figura 4. Distribuzione dei casi gravi e complicati di influenza per fasce d'età e sottotipo di virus identificato e proporzione di casi gravi per fasce d'età in Puglia, stagione 2018-2019

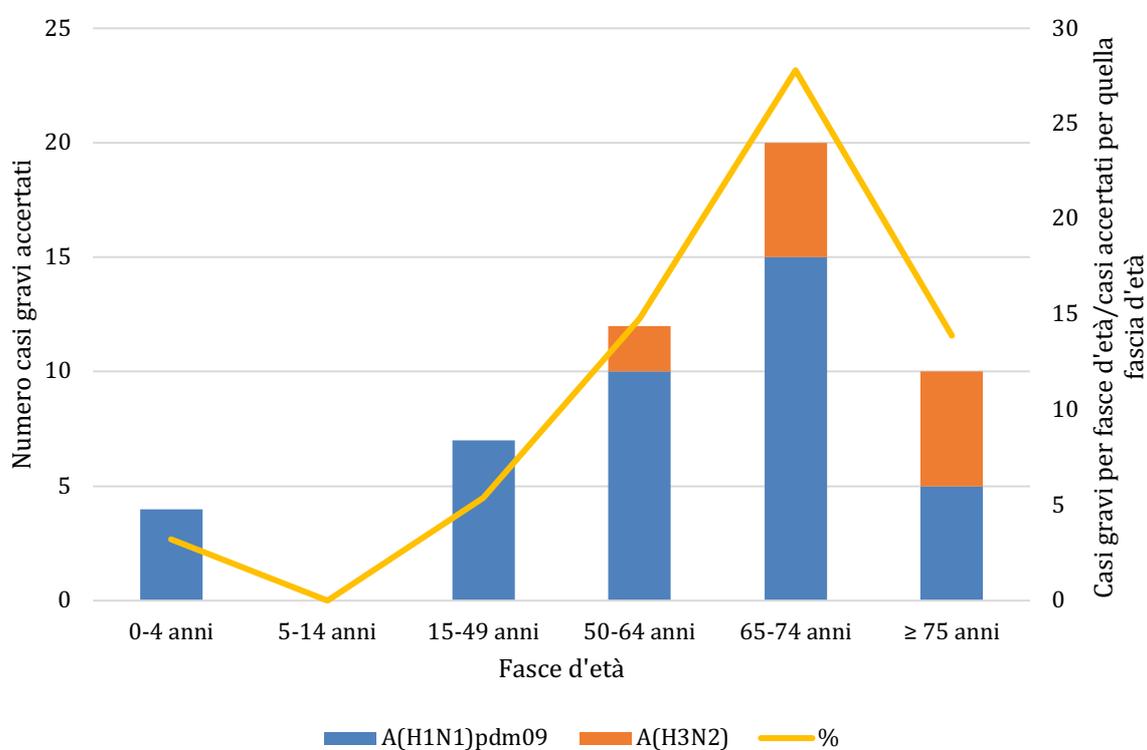
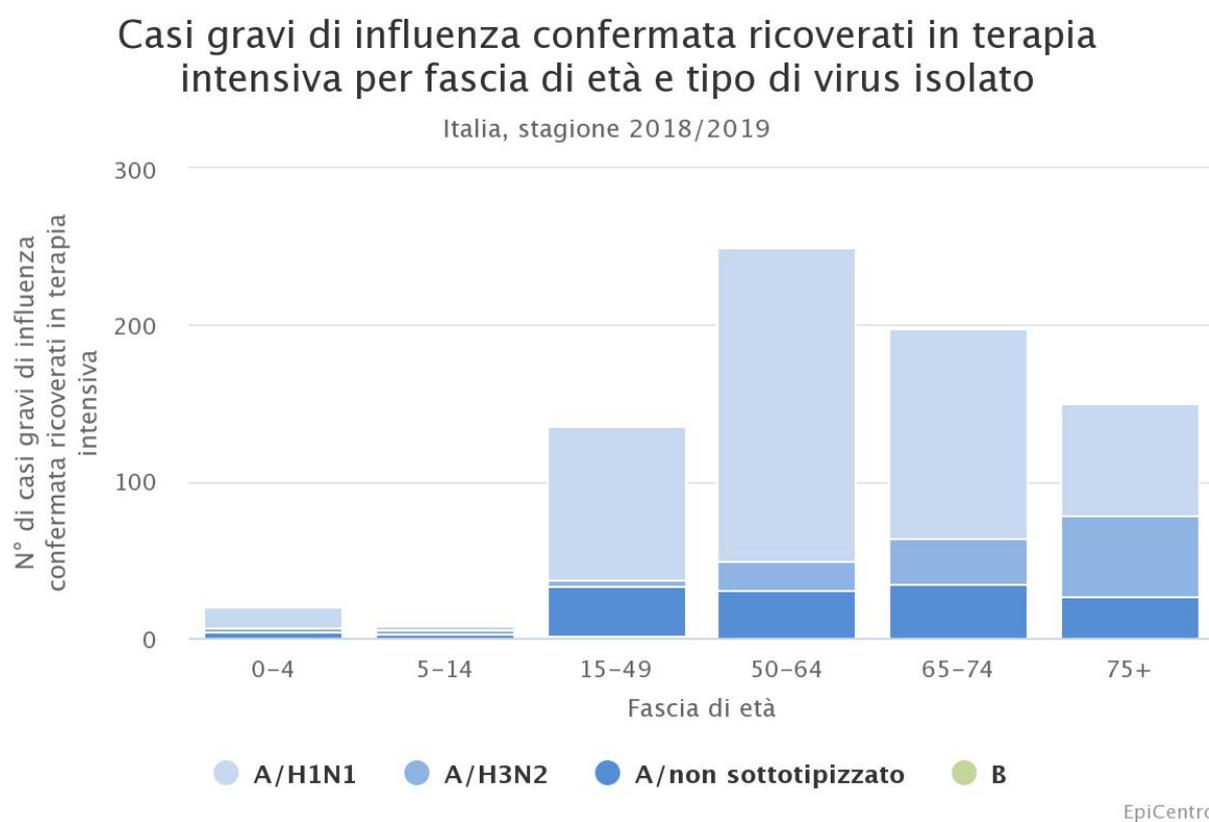




Figura 5. Distribuzione dei casi gravi e complicati di influenza confermata per fasce di età e tipo di virus isolato in Italia, stagione 2018-2019 (FluNews - Italia Rapporto della sorveglianza integrata dell'influenza, EpiCentro)



Nel corso della stagione influenzale appena trascorsa, sono stati caratterizzati, mediante sequenziamento nel gene dell'emoagglutinina (HA), 18 ceppi di influenza A (5 H3 e 13 H1). Alcune sequenze sono state inviate al centro di riferimento nazionale (Istituto Superiore di Sanità). Per quanto riguarda i virus influenzali A(H1N1)pdm09, l'analisi filogenetica effettuata nel gene HA (Figura 6) ha evidenziato l'appartenenza di tutti i ceppi pugliesi al sottogruppo genetico 6B.1. In particolare, i ceppi caratterizzati mostravano le variazioni amminoacidiche S74R, S164T e I295V che definiscono il subclade 6B.1A. Alcuni ceppi pugliesi, così come altri ceppi, presentavano, inoltre, le mutazioni S183P, N260D e T185I, spesso in combinazione con



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
ED ONCOLOGIA UMANA

SEZIONE DI IGIENE
Policlinico - P.zza G. Cesare, 70124 BARI
Tel. 0805592328/Fax 080 5478472

U.O.C. IGIENE
AZIENDA OSPEDALIERO
UNIVERSITARIA POLICLINICO
DI BARI

(Direttore: Prof. Michele Quarto)



altre variazioni amminoacidiche. Inoltre, in due ceppi (A/Bari/449/2018 e A/Bari/294/2019), si segnala la mutazione amminoacidica D222G che dati di letteratura indicano come associata a quadri più severi di malattia. Entrambi i ceppi sono stati identificati in due pazienti ricoverati in unità di terapia intensiva che, successivamente, sono deceduti.

Per quanto riguarda i ceppi A(H3N2), l'analisi filogenetica (Figura 7) ha evidenziato la circolazione di ceppi appartenenti al subclade 3C.2a1, e, in particolare, al sottogruppo 3C.2a1b definito dalle sostituzioni amminoacidiche N121K, N171K, I406V e G484E. Tutti i ceppi analizzati mostravano, inoltre, le sostituzioni amminoacidiche K92R, H311Q, E62G e R142G. Inoltre, all'interno del sottogruppo 3C.2a1b possono essere distinti due cluster, il primo caratterizzato dalle sostituzioni amminoacidiche T128A e T135K e il secondo da T131K e V529I. I ceppi pugliesi sono distribuiti in entrambi i cluster. Dall'albero filogenetico emerge, inoltre, come altri ceppi italiani si raggruppino all'interno dei subclade 3C.2a2 e 3C.3a, a conferma dell'elevata eterogeneità dei ceppi A(H3N2) caratterizzati nel corso di questa stagione influenzale.



Figura 6. Analisi filogenetica relativa al gene HA di virus influenzali A(H1N1)pdm09 caratterizzati in Italia e in Puglia, stagione 2018-2019. I ceppi pugliesi sono evidenziati dal pallino nero. Nei riquadri accanto ai singoli ceppi, sono indicate ulteriori variazioni amminoacidiche specifiche del ceppo

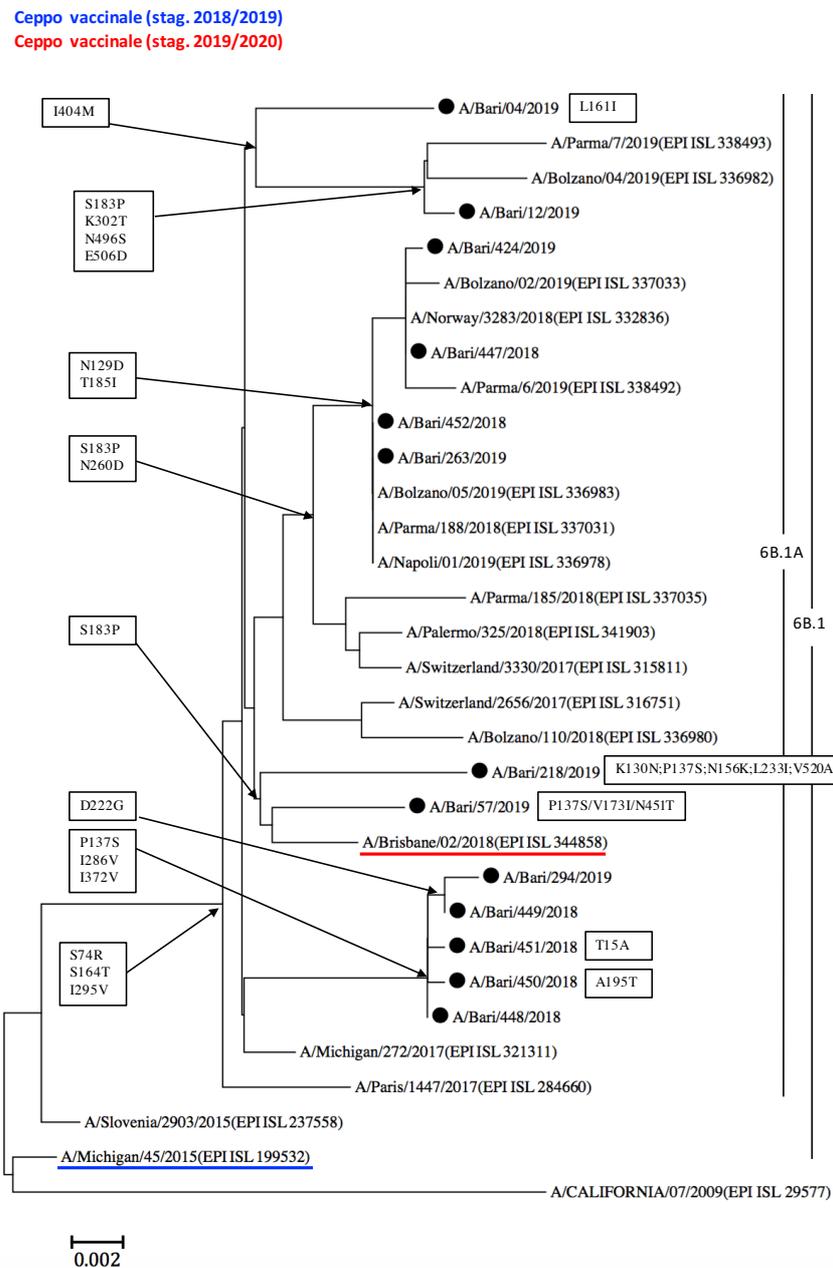
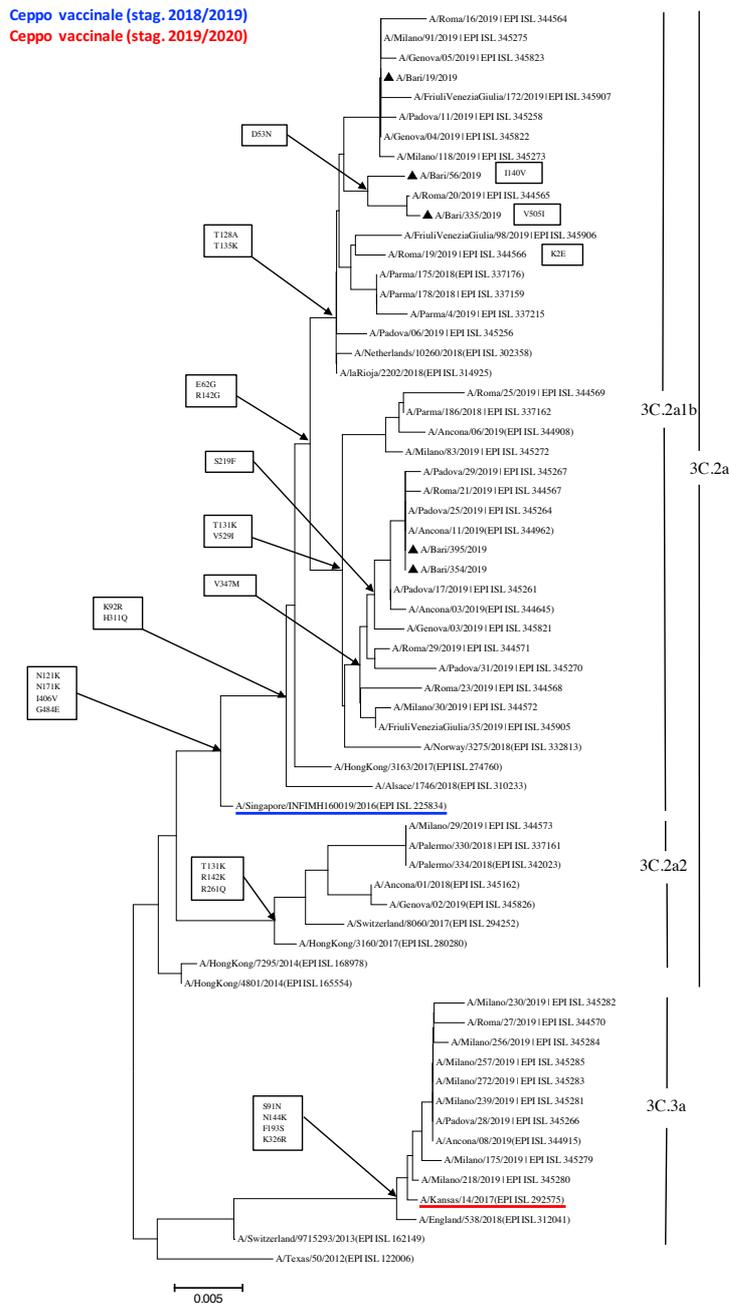




Figura 7. Analisi filogenetica relativa al gene HA di virus influenzali A(H3N2) caratterizzati in Italia e in Puglia, stagione 2018-2019. I ceppi pugliesi sono evidenziati dal triangolino nero. Nei riquadri accanto ai singoli ceppi, sono indicate ulteriori variazioni amminoacidiche specifiche del ceppo





UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
ED ONCOLOGIA UMANA

SEZIONE DI IGIENE
Policlinico – P.zza G. Cesare, 70124 BARI
Tel. 0805592328/Fax 080 5478472

U.O.C. IGIENE
AZIENDA OSPEDALIERO
UNIVERSITARIA POLICLINICO
DI BARI

(Direttore: Prof. Michele Quarto)



Considerazioni: In Italia, nella stagione influenzale 2018-2019, è stato registrato un numero di casi di ILI (*influenza-like illness*) superiore agli 8 milioni, con un picco tra la fine di gennaio e l'inizio di febbraio. In Puglia, la stagione appena trascorsa ha mostrato un'elevata incidenza di ILI e un numero di casi gravi superiore a quello registrato per la stagione 2017-2018 (53 vs 50). Inoltre, la stagione in Puglia è stata caratterizzata da una esclusiva circolazione di ceppi di tipo A, con estesi focolai epidemici che hanno interessato tutte le fasce d'età. Nella prima parte della stagione, è stata osservata una prevalente circolazione del virus A(H1N1)pdm09 (sottogruppo genetico 6B.1A), che ha lasciato spazio, invece, al virus A(H3N2) a partire dalla settimana 9/2019. In particolare, si trattava di ceppi appartenenti al subclade 3C.2a1b.

Sulla base dei ceppi circolanti nell'emisfero nord, nel mese di febbraio 2019 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha indicato la composizione vaccinale per la stagione 2019-2020. I ceppi B per il lineaggio Victoria e per il lineaggio Yamagata (formulazione vaccinale trivalente e quadrivalente, rispettivamente) sono stati confermati rispetto alla formulazione della stagione precedente, al contrario dei ceppi A(H1N1)pdm09 e A(H3N2) che sono stati, invece, modificati. Per quanto riguarda A(H1N1)pdm09, è stato inserito il ceppo A/Brisbane/02/2018-like virus, caratterizzato dalla sostituzione amminoacidica S183P, non presente nel ceppo vaccinale A/Michigan/45/2015(H1N1)pdm09. La sostituzione del ceppo vaccinale è stata decisa sulla base di una evidenziata minore reattività dell'antisiero ottenuto dal ceppo vaccinale 2017-2018, nei confronti dei ceppi circolanti in questa stagione. La maggior parte dei ceppi pugliesi circolanti nella stagione 2018-2019 clusterizzano con il ceppo vaccinale A/Brisbane/02/2018-like virus.

La composizione vaccinale per quanto riguarda il ceppo A(H3N2), è stata posticipata a marzo 2019 alla luce della co-circolazione di ceppi appartenenti a subclade differenti antigenicamente e distinti anche sul piano della neutralizzazione. Infatti, nel corso della stagione, è emerso un aumento della circolazione di ceppi appartenenti al clade 3C.3a in diverse aree geografiche, compresa l'Italia. Tali ceppi non sono risultati neutralizzabili da antisieri prodotti da ceppi appartenenti al clade 3C.2a1b a cui appartiene il ceppo vaccinale 2018-2019 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2). Pertanto, in previsione di una probabile circolazione, nella prossima stagione, di ceppi A(H3N2) appartenenti al clade 3C.3a, per



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
ED ONCOLOGIA UMANA

SEZIONE DI IGIENE
Policlinico – P.zza G. Cesare, 70124 BARI
Tel. 0805592328/Fax 080 5478472

U.O.C. IGIENE
AZIENZA OSPEDALIERO
UNIVERSITARIA POLICLINICO
DI BARI

(Direttore: Prof. Michele Quarto)



l'emisfero nord, è stato indicato il ceppo vaccinale A/Kansas/14/2017-like virus, appartenente allo stesso clade 3C.3a.

Già nel corso di recenti stagioni influenzali, è emerso come l'efficacia di campo dei vaccini antinfluenzali sia condizionata, oltre che dai *drift* antigenici dei ceppi circolanti, anche da mutazioni dei ceppi vaccinali generatesi durante il processo di replicazione dei virus su uova. In particolare, quest'ultima problematica è risultata più evidente per i ceppi A(H3N2). L'introduzione di vaccini prodotti su colture cellulari ha mostrato di poter superare la criticità dei vaccini prodotti da propagazione dei virus su uova. Tali vaccini saranno disponibili anche in Italia a partire dalla prossima stagione.

Dati preliminari di *effectiveness* della vaccinazione antinfluenzale per la stagione 2018-2019 sono già disponibili per il Regno Unito (UK), in cui, come in Italia ed anche in Puglia, si è verificata una prevalente circolazione di virus A(H1N1)pdm09 nella prima parte della stagione e di virus A(H3N2) nella seconda parte. I dati di efficacia della vaccinazione antinfluenzale in UK mostrano una *adjusted Vaccine Effectiveness* (aVE) complessiva del 44,3%, mentre, per gli ultra 64enni il vaccino trivalente adiuvato (aTIV) ha mostrato una aVE del 62,0%.

Evidenze scientifiche relative all'efficacia di campo dell'antinfluenzale nel prevenire la mortalità e la morbosità legate alle infezioni causate dai diversi sottotipi di virus influenzali negli ultra 64enni sono deboli. Per questo motivo, nella scorsa stagione influenzale, caratterizzata dal *mismatch* per il virus B, è stato condotto in Italia uno studio multicentrico negli ultra 64enni, che ha visto coinvolta anche la Puglia, per misurare la VE della vaccinazione antinfluenzale negli ospedalizzati con infezione respiratoria grave (SARI). I risultati dello studio hanno dimostrato una buona performance del vaccino aTIV nei confronti dei ceppi A(H1N1)pdm09 (aVE: 67,5%) ed anche una moderata VE contro i ceppi di tipo B (aVE: 44,5%), nonostante il *mismatch*. Ciò è probabilmente dovuto alla cross-protezione tra i diversi ceppi di tipo B indotta da aTIV.



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
ED ONCOLOGIA UMANA

SEZIONE DI IGIENE
Policlinico – P.zza G. Cesare, 70124 BARI
Tel. 0805592328/Fax 080 5478472

U.O.C. IGIENE
AZIENDA OSPEDALIERO
UNIVERSITARIA POLICLINICO
DI BARI

(Direttore: Prof. Michele Quarto)



Riferimenti bibliografici essenziali

1. FluNews – Italia. Rapporto della sorveglianza integrata dell'influenza. <https://www.epicentro.iss.it/influenza/flunews#casi>
2. Preliminary review of D222G amino acid substitution in the haemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses. *Wkly Epidemiol Rec.* 2010 Jan 22;85(4):21-2
3. Rykkvin R, Kilander A, Dudman SG, Hungnes O. Within-patient emergence of the influenza A(H1N1)pdm09 HA1 222G variant and clear association with severe disease, Norway. *Euro Surveill.* 2013 Jan 17;18(3)
4. Ruggiero T, De Rosa F, Cerutti F, Pagani N, Alice T, Stella ML, Milia MG, Calcagno A, Burdino E, Gregori G, Urbino R, Di Perri G, Ranieri MV, Ghisetti V. A(H1N1)pdm09 hemagglutinin D222G and D222N variants are frequently harbored by patients requiring extracorporeal membrane oxygenation and advanced respiratory assistance for severe A(H1N1)pdm09 infection. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013 Nov;7(6):1416-26
5. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006; 440:435–436
6. Barr IG, Donis RO, Katz JM, McCauley JW, Odagiri T, Trusheim H, Tsai TF, Wentworth DE. Cell culture-derived influenza vaccines in the severe 2017-2018 epidemic season: a step towards improved influenza vaccine effectiveness. *NPJ Vaccines.* 2018 Oct 9;3:44. doi: 10.1038/s41541-018-0079-z
7. Bella A, Gesualdo F, Orsi A, Chironna M, Loconsole D, Napoli C, Orsi GB, Manini I, Montomoli E, Alfonsi V, Castrucci MR, Rizzo C. Effectiveness of the trivalent MF59 adjuvanted influenza vaccine in preventing hospitalization due to influenza B and A/H1N1pdm09 viruses in the elderly in Italy, 2017 – 2018 season. *Expert Review of Vaccines* 2019– <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14760584.2019.1627206>
8. Surveillance of influenza and other respiratory viruses in the UK. Winter 2018-2019. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/805563/Surveillance_of_influenza_and_other_respiratory_viruses_in_the_UK_2018_t.._.pdf



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
ED ONCOLOGIA UMANA

SEZIONE DI IGIENE
Policlinico - P.zza G. Cesare, 70124 BARI
Tel. 0805592328/Fax 080 5478472

U.O.C. IGIENE
AZIENDA OSPEDALIERO
UNIVERSITARIA POLICLINICO
DI BARI

(Direttore: Prof. Michele Quarto)



9. Flannery B, Chung JR, Monto AS, et al. Influenza vaccine effectiveness in the United States during 2016–2017 season. *Clin Infect Dis* 2018 Sep 11
10. Castilla J, Navascués A, Casado I, Pérez-García A, Aguinaga A, Ezpeleta G, et al. Interim effectiveness of trivalent influenza vaccine in a season dominated by lineage mismatched influenza B, northern Spain, 2017/18. *Euro Surveill*. 2018;23(7):18-00057
11. Camilloni B, Neri M, Lepri E, Iorio AM. Cross-reactive antibodies in middle-aged and elderly volunteers after MF59-adjuvanted subunit trivalent influenza vaccine against B viruses of the B/Victoria or B/Yamagata lineages. *Vaccine*. 2009;27:4099-103
12. Ray R, Dos Santos G, Buck PO, Claeys C, Matias G, Innis BL, et al. A review of the value of quadrivalent influenza vaccines and their potential contribution to influenza control. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(7):1640-52.
13. Skowronski DM, Chambers C, De Serres G, Sabaiduc S, Winter AL, Dickinson JA, et al. Vaccine effectiveness against lineage matched and mismatched influenza B viruses across 8 seasons in Canada, 2010-11 to 2017-18. *Clin Infect Dis*. 2018