



**Programma Regionale di Genofenotipizzazione ed  
epidemiologia molecolare degli agenti da infezione per la  
diagnostica microbiologica e virale**

**Responsabile scientifico**

**Prof. Giorgio Palù, Direttore**

**UOC MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA**

**AZIENDA OSPEDALIERA DI PADOVA**

---

**PROGRAMMA DELL'ATTIVITA' SCIENTIFICA**

**CHE SARA' EFFETTUATA NELL'ANNO 2013**

**Revisione del 30 settembre 2013**

ATTIVITA' n. 1

**Titolo: Farmacoresistenza di HIV e geno-fenotipizzazione virale**

Descrizione attività:

**HIV**

Nel corso del 2013 saranno eseguiti gli esami di genotipizzazione per lo studio della resistenza a farmaci antiretrovirali sui campioni inviati dai vari ospedali del Veneto.

Con l'ausilio del database del Centro è possibile studiare l'evoluzione genotipica del virus in molti soggetti con storie terapeutiche complesse, che vengono seguiti da anni e dei quali sono disponibili analisi sequenziali. L'interpretazione di questi fenomeni evolutivi, la relazione con le terapie eseguite, così come altri quadri di particolare interesse, verranno, approfonditi e discussi con i curanti. Verranno quindi interpretati i quadri mutazionali dei pazienti, per discutere le migliori opzioni terapeutiche. A questo fine è stata allestita, perfezionata negli anni e fornita una serie di strumenti complementari ed integrativi necessari a supporto della evoluzione delle strategie terapeutiche, che di seguito vengono descritte.

a) Negli ultimi anni è stato studiato il profilo genotipico di un importante numero di soggetti naive per terapia, reclutati in tutta la Regione, e studiati spesso nelle fasi temporali immediatamente successive alla diagnosi di infezione da HIV. Continuerà quindi la sorveglianza della dinamica di circolazione delle mutazioni di resistenza nel territorio e la trasmissione ai nuovi infetti.

b) Verrà ricostruita la dinamica di circolazione dei differenti sottotipi virali; analisi filogenetiche permetteranno di tentare di identificare

- cluster di trasmissione
- l'importanza dei soggetti con infezione cronica nota da tempo nella acquisizione di HIV da parte dei soggetti con infezione recente
- l'importanza della quota di soggetti late-presenter nel mantenimento della circolazione di HIV wild-type

c) Come negli anni passati, sarà eseguito il sequenziamento su plasma e cellule mononucleate ottenute da sangue periferico in numerosi casi nei quali sarà ritenuto utile ai fini di una migliore definizione del quadro. I risultati saranno discussi con i curanti.

E' previsto lo studio di almeno 250 casi.

d) Sarà offerta la determinazione quantitativa del DNA provirale, eseguita, con una metodica molecolare sviluppata in-house, su cellule mononucleate da sangue periferico. Il DNA provirale è utilizzato come marcatore di progressione della malattia e come marcatore di risposta alla terapia, utile quindi nei pazienti con soppressione prolungata della viremia plasmatica. Anche su questo tema è già in corso l'analisi longitudinale di centinaia di pazienti seguiti presso vari Centri di Malattie Infettive del Veneto, nel quadro di specifici protocolli di terapia disegnati in collaborazione.

e) Con varie metodiche sono studiati pazienti con infezione primaria diagnosticati in alcuni Centri veneti, e ne viene seguito il follow up viro-immunologico e l'eventuale risposta alla terapia. A tale scopo viene effettuata la valutazione della avidità anticorpale, utile, in associazione con i parametri viro-immunologici, alla identificazione e conferma delle diagnosi di infezione recente.

f) E' stata allestita negli anni passati una metodica di sequenziamento in-house di una porzione della regione *env* predittiva dell'utilizzo, da parte del virus HIV, dei recettori CXCR4 o CCR5, sia su RNA plasmatico che su DNA cellulare ottenuto da cellule mononucleate da sangue periferico. Questo dato permette di ipotizzare la risposta del paziente all'utilizzo di una particolare classe di farmaci di recente introduzione nel prontuario terapeutico, gli inibitori del recettore CCR5.

Nel 2010 - 2012, in collaborazione con altri tre laboratori di Virologia di rilievo nazionale (Roma Tor Vergata, Milano San Raffaele e Siena) è stato validato un protocollo di sequenziamento al fine di offrire questa diagnostica agli ospedali italiani. I risultati degli studi di validazione sono stati pubblicati (vedi rendiconti 2010, 2011 e 2012).

Anche la metodica su cellule è stata messa a disposizione dei Centri del Veneto, al fine di valutare i pazienti che seppure in successo terapeutico, sono a giudizio del curante candidabili alla sostituzione di uno dei farmaci assunti con l'inibitore del CCR5.

Tale valutazione viene eseguita anche su RNA ottenuto da liquor.

g) Continuerà la offerta della metodica di sequenziamento in-house per l'analisi della regione sottoposta a pressione selettiva da parte degli inibitori della Integrase, introdotti nel 2008 nella pratica clinica di tutti i reparti in regione. La numerosità prevista è pari a circa 100 casi.

Il complesso delle attività descritte, realizzate su campioni forniti dai vari Ospedali ed analizzati in maniera centralizzata a Padova, non integra ma sostituisce in toto analoghe indagini che non vengono quindi eseguite nei vari centri; permette inoltre di mettere a disposizione di tutti i clinici una consolidata esperienza virologica e clinica di comprovata qualità, con un importante risparmio

di risorse ed uniformità di informazione. La esperienza realizzata è al momento, per estensione della rete di Centri coinvolti e numero di pazienti seguiti, unica in Italia.

#### **HHV8**

a) Negli anni passati è stata ricercata l'eventuale presenza di DNA di HHV8, virus responsabile del Sarcoma di Kaposi, in circa 500 soggetti con infezione da HIV e naive per terapia antiretrovirale, nelle cellule mononucleate del sangue periferico e nel plasma (vedi relazioni degli anni 2008-2010). Questo parametro viene studiato come marcatore, per monitorare nel tempo i soggetti co-infetti e per seguirne l'eventuale progressione verso la malattia tumorale, e per monitorare il rischio di trasmissione ai partner.

Su tutti i campioni positivi, e su quelli eventualmente di nuova diagnosi, sarà effettuato il sequenziamento di regioni del genoma che consentono la caratterizzazione del genotipo. Questo studio permette di meglio definire la circolazione del virus ed i pattern di trasmissione tra i soggetti a rischio.

Tutte le attività elencate hanno, per aspetti metodologici e/o applicazioni cliniche, carattere innovativo.

La conduzione delle su-indicate attività diagnostiche e di ricerca clinica, tutte avviate ed in corso di svolgimento, in stretto contatto con molti reparti di Malattie Infettive, comporterà i necessari investimenti di risorse economiche che vengono elencati di seguito.

---

#### **Materiali e Costi:**

- il materiale relativo a kit diagnostici è necessario per consentire l'attuale tariffa agevolata praticata alle ULSS, del tutto inadeguata a coprire i costi di materiale;
- il materiale inventariabile necessario alla conservazione è indispensabile allo stoccaggio del materiale biologico, per consentire studi sequenziali e di confronto.
- si richiede il reclutamento di personale tecnico e laureato per lo svolgimento delle attività laboratoristiche.

**Parametro di riferimento:** Numero degli esami e delle consulenze effettuate; numero dei pazienti arruolati

**Risultato Atteso:** Prosecuzione del lavoro condotto negli anni passati. Esecuzione di esami e consulenze cliniche. Arruolamento di pazienti.

Tempi: 12 mesi

ATTIVITA' n. 2

Titolo: **Resistenze agli antimicrobici**

Saranno condotte dal Centro indagini di due tipi:

a) Lavori progettati dal Centro di Riferimento e condotti su casistica di Ospedali della Regione, e indagini condotte in collaborazione e su sollecitazione di altre strutture regionali

b) Ricerche eseguite in emergenza in risposta a necessità contingenti dell'ambito regionale

Riguardo al punto a) sono già programmate ed in corso di effettuazione le ricerche sottoelencate.

1) Studio di sorveglianza in collaborazione con l'Ospedale di Vicenza e l'Azienda Ospedaliera di Padova, iniziato nel 2007 e del quale è stato riferito nelle precedenti relazione a consuntivo, di ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*.

2) Caratterizzazione molecolare di ceppi di *Klebsiella pneumoniae* MDR e produttrici di carbapenemasi isolati in differenti reparti dell'Azienda Ospedaliera di Padova, Vicenza e numerose ULSS della Regione.

Per le ricerche eseguite in regime di emergenza, in risposta a necessità contingenti dell'ambito regionale, saranno mantenute pronte tutte le strutture tecnico-diagnostiche atte a rispondere con tempestività alle richieste.

La conduzione delle su-indicate attività diagnostiche, tutte avviate ed in corso di svolgimento, in stretto contatto con tutti gli Ospedali richiedenti, comporterà i necessari investimenti di risorse economiche che vengono elencati di seguito.

La mole di lavoro necessaria per condurre indagini di epidemiologia con metodiche fenotipiche e molecolari è in prevedibile continuo aumento, in relazione ad una situazione di emergente pressione delle complicate nosocomiali di carattere infettivo sulle attività assistenziali intra- ed extra-ospedaliere, legate alla crescente circolazione di agenti infettivi con caratteristiche di resistenza multipla agli antibiotici in aree assistenziali critiche, specialistiche, ma anche riabilitative e di raccordo con il territorio.

Ai fini di una diagnostica pronta, finalizzata al contenimento ed alla sorveglianza attiva della circolazione di questi e altri microrganismi di possibile interesse, risulta particolarmente utile ed organizzativamente economica una struttura di riferimento e coordinamento delle iniziative

diagnostiche, che raccolga, per quanto reso possibile dalla disponibilità degli interlocutori, l'epidemiologia dell'intera regione.

#### **Materiali e Costi**

- il materiale inventariabile necessario alla conservazione è indispensabile allo stoccaggio del materiale biologico, per consentire studi sequenziali e di confronto.

- si richiede il reclutamento di personale tecnico e laureato per lo svolgimento delle attività laboratoristiche.

**Parametro di riferimento:** Numero degli esami e delle consulenze effettuate.

**Risultato Atteso:** prosecuzione del lavoro condotto negli anni passati. Esecuzione di esami e consulenze cliniche.

**Tempi:** 12 mesi.

#### ATTIVITA' n. 3

Titolo: **Sorveglianza dei micobatteri**

Saranno svolte le seguenti attività:

- Antibiogramma con farmaci di 2<sup>a</sup> scelta con sistema automatico MGIT 960 (B.D.)
- Identificazione di micobatteri non tubercolari mediante sequenziamento della regione variabile del gene codificante il 16S rRNA
- Ricerca mediante PCR del gene micobatterico *groEL2* (*hsp65*) in vari materiali come agoaspirato, materiale bioptico e liquor. In caso di reazione positiva l'identificazione di specie è eseguita mediante sequenziamento
- Test di sensibilità (E-test) per i farmaci su terreno solido in corso d'infezione da MAC
- Valutazione della resistenza a Rifampicina e/o Isoniazide di *M. tuberculosis* complex mediante tecnica di ibridazione
- Tipizzazione molecolare di ceppi di *M. tuberculosis* mediante Spoligotyping e MIRU

Sviluppi previsti durante il 2013:

#### Diagnostica

- a) Validazione dell'antibiogramma per i farmaci di seconda scelta (Linezolid) su MGT960.
- b) Antibiogramma per micobatteri atipici a lenta e rapida crescita con metodo della microdiluzione

#### Tipizzazione molecolare

- a) Completamento della tipizzazione mediante Spoligotyping dei ceppi isolati nel 2012 e tipizzazione dei ceppi 2013.
- b) Analisi mediante MIRU degli isolati appartenenti ai maggiori spoligotipi isolati negli anni scorsi al fine di avere una chiara immagine dell'epidemiologia dell'infezione tubercolare in Veneto.
- c) Organizzazione di un meeting con i responsabili dei dispensari funzionali della Regione Veneto per presentare i dati dell'epidemiologia di *M. tuberculosis* nella regione.

#### Diagnostica molecolare

- a) Continueremo il progetto volto allo sviluppo di un sistema molecolare rapido per la valutazione della risposta alla terapia antitubercolare in pazienti immunocompromessi basato sull'amplificazione di mRNA altamente instabili.

#### Caratterizzazione delle cause molecolari della farmaco-resistenza

- a) Caratterizzazione molecolare dei principali genotipi di resistenza presenti negli isolati clinici pervenuti al centro
- b) Valutazione della resistenza a pirazinamide con tecniche molecolari

#### **Materiali e Costi**

- consumabili per test colturali e per test molecolari.
- piccola strumentazione di laboratorio per tipizzazione molecolare e aggiornamento tecnologico di strumentazione per analisi microscopiche.
- reclutamento di personale tecnico e laureato per lo svolgimento delle attività laboratoristiche.

**Parametro di riferimento:** Numerosità dei campioni e messa a punto di nuovi esami.

**Risultato Atteso:** Epidemiologia molecolare della tubercolosi in Veneto

**Tempi:** 12 mesi

ATTIVITA' n. 4

**Titolo: Sorveglianza degli enteropatogeni**

Il settore enteropatogeni si occupa della raccolta, identificazione e conservazione dei ceppi isolati dai laboratori pubblici e privati della regione Veneto. Fornisce assistenza clinico-diagnostica in corso di episodi epidemici e/o in casi isolati; invia report ai centri epidemiologici di riferimento regionali e nazionali.

Questo settore è il laboratorio che rappresenta la regione Veneto nell'ambito della rete ENTER-NET (Enteric Pathogen Network) che consiste nel sistema di sorveglianza italiano delle infezioni da *Salmonella* ed *E.coli* produttori di Vero-citotossina (VTEC) nell'uomo. La rete di sorveglianza è coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) che riversa i dati nella rete Foodborne and Waterborne Diseases dell'ECDC.

Il sistema epidemiologico Enter-net si posiziona in maniera privilegiata per quanto riguarda la sorveglianza ed il controllo dell'emergenza di antibiotico-resistenza negli agenti zoonotici, in particolare nelle salmonelle. I batteri zoonotici resistenti agli antimicrobici sono particolarmente preoccupanti perché possono passare dagli animali negli alimenti e quindi all'uomo, compromettendo l'efficacia del trattamento delle infezioni negli esseri umani.

Il Servizio di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova è un braccio operativo nell'ambito del piano regionale per la Sicurezza Alimentare. In questo ambito, l'aver individuato un centro unico regionale per la tipizzazione degli enterobatteri patogeni rappresenta una soluzione ottimale per un monitoraggio a fini epidemiologici di questi microrganismi e realizza un'efficace soluzione per contenere la spesa sanitaria regionale concentrando la tipizzazione finale dei ceppi presso un'unica struttura.

**Materiali e Costi**

Si richiede il reclutamento di personale laureato con specifiche competenze. Per le indagini di laboratorio sono necessari reagenti per tipizzazione sierologica e test di antibiotico-sensibilità e reagenti per tipizzazione molecolare. Si richiede inoltre una cappa a flusso laminare, che sarà utilizzata per le varie attività del Programma.

**Parametro di riferimento:** Numero dei ceppi tipizzati e catalogati a seguito di notifica dagli enti partecipanti.

**Risultato Atteso:**

1) Produzione di report annuale conclusivo, pubblicato sul sito:

<http://www.microbiologia.padova.it>

2) Figurare tra gli enti partecipanti della rete ENTER-NET (Enteric Pathogen Network) come centro regionale di riferimento per gli enterobatteri patogeni

3) Monitorare l'antibiotico-resistenza, in un campione rappresentativo degli isolati di Salmonella, anche nei confronti della Colistina, del Ceftazidime e dei carbapenemici (EFSA Journal 2012;10(6):2742).

**Tempi : 12 mesi.**

ATTIVITA' n. 5

**Titolo: Sorveglianza dei virus influenzali e di altri virus respiratori**

**Virus dell'Influenza**

Il presupposto del programma è il monitoraggio capillare dei virus influenzali al fine di caratterizzare i ceppi circolanti nella Regione Veneto, di tenere sotto controllo la loro patogenicità e valutare l'efficacia del programma vaccinale e dei farmaci antivirali disponibili.

Il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova rientra nella rete nazionale di sorveglianza dei virus influenzali coordinata dal Centro Nazionale OMS per l'Influenza (NIC- Istituto Superiore di Sanità). Il nostro laboratorio svolge il ruolo di laboratorio di riferimento regionale ed ha superato in maniera eccellente i controlli di qualità forniti dall'ISS e da enti internazionali per la valutazione delle capacità tecnica e diagnostica.

Nel corso dell'anno 2013 l'attività del centro sarà indirizzata a:

1) attività ordinaria di sorveglianza dei virus influenzali.

Questa attività, come negli anni precedenti, si basa sull'individuazione di medici sentinella (medici di medicina generale e pediatri di libera scelta) ai quali vengono inviati apposti tamponi per poter effettuare prelievi a pazienti che presentano un quadro sintomatologico

compatibile con quello di una sindrome influenzale. I campioni sono fatti pervenire al laboratorio tramite corriere e vengono processati mediante tecniche di virologia classica (isolamento in coltura del ceppo ed immunofluorescenza) e/o di virologia molecolare (analisi in RT-PCR e sequenziamento nucleotidico) al fine di caratterizzare i virus a livello di tipo (virus influenzale di tipo A o B) e di sottotipo (A/HxNy). Un sistema di sorveglianza virologica efficiente e capillare consentirà di monitorare a livello regionale la circolazione dei virus influenzali epidemici, eventualmente pandemici, con la possibilità di evidenziare eventuali eventi inusuali e di essere esteso anche ad altri agenti infettivi.

- 2) Attività di aggiornamento interno del personale sulle procedure di laboratorio per la diagnosi di laboratorio e sorveglianza virologica dei virus influenzali e ed altri virus associati a sindromi respiratorie.

#### **Virus respiratori**

Grazie ai numerosi sistemi molecolari utilizzati nel laboratorio per la diagnosi e la tipizzazione di virus associati a patologie respiratorie, è nostra intenzione poter sviluppare un osservatorio epidemiologico per i principali virus respiratori (adenovirus, rinovirus, virus respiratorio sinciziale tipo A e B, parainfluenza virus 1-4, coronavirus, metapneumovirus tipo A e B, bocavirus ed altri virus emergenti a trasmissione respiratoria). I risultati ottenuti saranno liberamente accessibili in un sito web, che sarà allestito appositamente, per garantire al personale sanitario un facile accesso ai dati di circolazione di tali virus nella nostra Regione. La rilevazione epidemiologica delle sindromi influenzali (ILI) non è del tutto coincidente con i dati virologici ricavati dalla ricerca di *Influenzavirus*, a dimostrazione che un'aliquota delle ILI sono sostenute da virus non influenzali. Attualmente il nostro osservatorio può essere ancora circoscritto ai soli materiali provenienti da pazienti ospedalizzati (soprattutto pediatrici) non essendo routinariamente previsto la diagnosi eziologia di infezioni virali respiratorie in pazienti comunitari. Per tale ragione è importante la stabilizzazione di una rete territoriale per un programma di campionamento a livello regionale che garantisca di avere un quadro sulla circolazione dei diversi virus respiratori. Nel caso dei pazienti ospedalizzati, la diagnosi differenziale ha un valore aggiunto poiché, con il supporto del laboratorio, può permettere una corretta gestione del paziente programmando, se disponibili, interventi terapeutici o adottando opportune misure di isolamento. Durante lo scorso anno si è evidenziata una elevata percentuale di casi di coinfezioni da più virus respiratori, in particolare nei

pazienti pediatrici al di sotto dei 5 anni. Nel corso del prossimo anno si cercherà di valutare l'impatto che tali coinfezioni hanno sulla gravità delle patologie e sull'andamento delle ospedalizzazioni.

La contemporanea ricerca di molteplici virus respiratori anche nei campioni raccolti dai medici sentinella durante l'osservatorio *Influnet* permetterà di allargare il dato epidemiologico e fornirà informazioni più complete sulla circolazione dei virus respiratori.

#### **Materiali e Costi**

Per lo svolgimento delle attività saranno acquisiti reagenti e materiali per l'esecuzione delle analisi. Per garantire una migliore attività verrà anche reclutato del personale qualificato a supporto del personale strutturato coinvolto nelle attività e/o per la preparazione del sito internet per la pubblicazione dei dati epidemiologici.

E' inoltre previsto anche l'acquisto di piccola strumentazione da laboratorio.

#### **Parametro di riferimento:**

1. Numero di campioni raccolti e analizzati per la ricerca di virus a influenzali ed altri virus respiratori
2. Valutazione della positività dei campioni e tipizzazione di quei virus che presentano sottotipi o varianti
3. Approfondimenti virologici atti a caratterizzare un adeguato numero di virus identificati nel corso dell'attività
4. Supporto alle attività di cura mediante caratterizzazione di resistenze ai farmaci e di eventuali caratteristiche di virulenza associate ai virus influenzali

#### **Risultato Atteso**

1. Identificazione della tipologia dei virus influenzali ed altri virus respiratori circolanti nella Regione Veneto
2. Impiego di procedure operative di laboratorio standardizzate e continuamente testate ed adattate alle variazioni genetiche dei virus circolanti

3. Produzione di dati epidemiologici utili per l'attività diagnostica delle strutture ospedaliere
4. Pubblicazione in banche dati di eventuali varianti virali identificate nel corso dell'attività per renderle disponibili alla comunità sanitaria e scientifica che opera in tale settore
5. Produzione di pubblicazioni scientifiche e di un report con la valutazione finale dell'attività

#### **Tempi**

Le attività saranno condotte nel corso di tutto l'anno in base alle esigenze derivati dalle richieste delle strutture ospedaliere, in particolare il picco di attività sarà concentrato tra i mesi di gennaio-maggio e dopo settembre in base alla stagionalità tipicamente manifestata dai virus a trasmissione respiratoria.

#### **ATTIVITA' n. 6**

**Titolo: Sorveglianza e genotipizzazione di patogeni trasmessi da artropodi e altri patogeni emergenti**

#### ***Sorveglianza dell'infezione da West Nile virus nella Regione Veneto***

Le attività di sorveglianza dell'infezione da WNV nella Regione Veneto svolte nel periodo 2008-2012 hanno dimostrato la circolazione virale in gran parte del territorio regionale, con casi umani ed equini di infezione da WNV notificati in tutte le province del Veneto. Il verificarsi di casi di infezione nell'uomo è un evento imprevedibile, in quanto dipende da molteplici fattori che fanno sì che nella stessa area siano contemporaneamente presenti il virus, elevate densità di vettore competente e specie aviarie in grado di amplificare in modo efficiente l'infezione virale. Alla luce dell'esperienza acquisita negli ultimi quattro anni e del notevole aumento di casi segnalati nel 2012, l'UOC Microbiologia e Virologia propone di continuare il programma di sorveglianza dei casi umani di WNND e febbre da WNV su tutto il territorio regionale. Poiché è possibile che i casi di infezione da WNV siano ancora sotto-diagnosticati nella Regione Veneto, saranno indagati sistematicamente per un'eventuale infezione da WNV tutti i casi inviati al nostro Centro per sospetta meningite o encefalite virale durante il periodo di sorveglianza. Il nostro Centro eseguirà i test di conferma su tutti i casi di sospetta infezione da WNV segnalati da altri Reparti e Ospedali.

**Pazienti e metodi**

Considerando la numerosità dei casi di sospetta meningoencefalite virale inviati al nostro Laboratorio negli anni precedenti, si stima che nel 2013 saranno inviati al Laboratorio per approfondimenti diagnostici circa 500 casi durante il periodo di sorveglianza.

Tutti i casi possibili di infezione da WNV ed i casi di sospetta meningoencefalite virale inviati durante il periodo di sorveglianza al nostro Laboratorio Regionale di Riferimento saranno sottoposti ai seguenti test di primo livello e test di conferma:

- ricerca di WNV RNA nel plasma, urine ed eventualmente liquor mediante real-time RT-PCR e pan-Flavivirus nested RT-PCR e sequenziamento genico;
- ricerca di anticorpi IgM e IgG nel siero e/o nel liquor mediante test EIA.
- nel caso di test ELISA positivo, test di conferma *plaque-reduction neutralisation test* (PRNT) in laboratorio BSL3
- nel caso di campioni positivi alla ricerca di WNV RNA, isolamento del virus in coltura in laboratorio BSL3.

Tutti i casi probabili e confermati di infezione da WNV saranno segnalati agli enti competenti secondo le modalità previste dal Programma di Sorveglianza Regionale e Nazionale.

**Materiali e Costi:**

Si richiedono consumabili per l'esecuzione dei test diagnostici e di sorveglianza (kit diagnostici per ricerca di anticorpi IgM e IgG anti WNV, consumabili per esecuzione test WNV RT-PCR, consumabili per allestimento colture cellulari e test di neutralizzazione, kit per next generation sequencing e per allestimento di librerie).

Si richiede il reclutamento di personale per l'esecuzione delle attività laboratoristiche previste nell'ambito della sorveglianza.

Il calcolo dei costi di consumabili e personale è stato fatto escludendo lo specifico finanziamento della Regione Veneto per la sorveglianza delle febbri estive.

**Parametro di riferimento:** Numero di casi possibili/probabili di infezione da WNV inviati al Centro.

**Risultato Atteso:** Intensificazione della sorveglianza dei casi di infezione sintomatica da WNV. Confronto della situazione epidemiologica del 2013 con quella degli anni precedenti. Eventuale identificazione e notifica di casi umani di infezione da WNV. Eventuale isolamento di ceppi di WNV da campioni biologici e loro caratterizzazione molecolare.

**Tempi:** Periodo di sorveglianza della WN secondo il piano regionale.

## 6.2. Sorveglianza delle infezioni da arbovirus autoctone e di importazione

Nel 2013 sarà continuata l'attività del piano di sorveglianza per le febbri estive autoctone e di importazione attuato nel periodo 2010-2012 allo scopo di identificare precocemente i casi di chikungunya e dengue "importati" nel territorio veneto. L'attività diagnostica delle infezioni di importazione includerà anche la diagnostica di infezione da virus della famiglia *Bunyaviridae* (compresi virus dei generi *Hantavirus*, *Orthobuniavirus*, *Phlebovirus*, e *Nairovirus*) e da altri virus del gene *Flavivirus*, oltre a WNV e DENV, e da nuovo coronavirus. Qualora siano segnalati nuovi patogeni, saranno tempestivamente sviluppati nuovi test diagnostici, come già si è verificato nel 2012 con il nuovo coronavirus. Questi test saranno eseguiti sulla base delle indicazioni del sospetto diagnostico e della epidemiologia delle infezioni virali nel Paese visitato.

### Pazienti e metodi

Considerando la numerosità dei casi di sospetta infezione da arbovirus di importazione inviati al nostro Laboratorio negli anni 2010-2012, si stima che nel 2013 saranno inviati al Laboratorio Regionale di Riferimento per approfondimenti diagnostici circa 150 casi.

Su tutti i casi sospetti saranno eseguiti test di conferma e, qualora non disponibili nel Centro inviante, anche i test di primo livello:

- ricerca di *Flavivirus* e *Phlebovirus* mediante PCR e sequenziamento;
- ricerca di anticorpi anti-*Phlebovirus* mediante IFA e ELISA; test di conferma mediante immunoblot.
- nel caso di test ELISA o IFA positivi, esecuzione del test di neutralizzazione per conferma.

Tutti i casi probabili e confermati di infezione saranno segnalati agli enti competenti secondo le modalità previste dal Programma di sorveglianza regionale e nazionale.

**Materiali e Costi**

Si richiedono consumabili per l'esecuzione dei test sierologici, virologici e molecolari per la diagnostica delle infezioni da Flavivirus, Phlebovirus, Hantavirus e altri Bunyavirus non coperti dallo specifico finanziamento per la sorveglianza delle febbri estive West Nile, dengue e chikungunya nella Regione Veneto. I costi di personale e di materiale inventariabile sono inclusi nelle voci dell'attività n. 6.1.

Il calcolo dei costi di consumabili e personale è stato fatto escludendo lo specifico finanziamento della Regione Veneto per la sorveglianza delle febbri estive.

**Parametro di riferimento:** Numero di casi possibili/probabili di infezione inviati al Centro.

**Risultato Atteso:** Intensificazione della sorveglianza dei casi di sospetta infezione da arbovirus autoctone e di importazione, ai fini dell'attuazione delle opportune misure di controllo della trasmissione dell'infezione.

**Tempi** gennaio-dicembre 2013

**6.3. Sorveglianza delle infezioni da Hantavirus**

Sulla base dei dati ottenuti dallo studio sulla prevalenza di anticorpi anti-Hantavirus nel personale del Corpo Forestale dello Stato, che indicano la circolazione virale anche nel nostro territorio, e alla luce dei recenti risultati ottenuti dalla sorveglianza veterinaria che dimostrano un aumento della circolazione degli Hantavirus nei roditori, si propone di intensificare la diagnostica per questa infezione virale nei casi sospetti autoctoni e di importazione e di eseguire una nuova indagine siero-epidemiologica in soggetti a rischio. Le indagini saranno condotte con test sierologici e molecolari specifici per i diversi tipi di Hantavirus circolanti in Europa.

**Materiali e Costi:**

Si richiedono consumabili per l'esecuzione dei test sierologici, virologici e molecolari per la diagnostica delle infezioni da Hantavirus. I costi di personale e di materiale inventariabile sono inclusi nelle voci dell'attività n. 6.1.

**Parametro di riferimento:** numero di soggetti con sindrome emorragica e renale studiati.

**Risultato Atteso:** Identificazione di casi di infezione da Hantavirus.

**Tempi:** gennaio-dicembre 2013.

#### 6.4. Caratterizzazione genotipica dei ceppi di WNV circolanti nel Veneto

**Obiettivi:**

1. Isolare e sequenziare WNV da campioni biologici provenienti da pazienti con infezione da WNV per studiare l'evoluzione e la filogenesi del virus e per rilevare la presenza di eventuali mutazioni nel genoma virale rilevanti per la sua patogenicità.

#### **Materiali e metodi**

**Isolamento di WNV, sequenziamento genomico e analisi filogenetica.**

L'isolamento virale sarà effettuato in laboratorio BSL3 su cellule Vero E6. Il genoma virale sarà sequenziato impiegando metodica Sanger. Le sequenze virali saranno confrontate con quelle di altri ceppi e sarà eseguita analisi filogenetica.

La predizione dell'effetto di sostituzioni aminoacidiche sulla struttura e sull'attività delle proteine virali sarà effettuata mediante analisi bioinformatica. I dati di predizione bioinformatica saranno impiegati per studiare in modelli *in vitro* l'effetto delle mutazioni nelle proteine virali.

#### **Materiali e Costi.**

Si richiedono consumabili per biologia molecolare. I costi di personale e di materiale inventariabile sono inclusi nelle voci dell'attività n. 6.1.

**Parametro di riferimento:** numero di ceppi virali caratterizzati.

**Risultato Atteso:** Caratterizzazione genetica dei diversi ceppi di WNV.

**Tempi:** gennaio-dicembre 2013

#### 6.5. Sorveglianza del morbillo e rosolia nel Veneto

Obiettivo dell'attività di sorveglianza è l'esecuzione di indagini diagnostiche molecolari per il monitoraggio della circolazione dei focolai di morbillo e rosolia nella Regione Veneto secondo le indicazioni del WHO e dell'ECDC. In tutti i casi di morbillo sarà eseguita la tipizzazione molecolare del virus e l'isolamento dei ceppi per il sequenziamento genomico. I casi saranno notificati tempestivamente ai SISP e le sequenze dei nuovi genotipi depositate in GenBank. Si ricorda che nel 2010-2012 il nostro centro ha tipizzato oltre 100 ceppi di Morbillivirus provenienti da tutto il Veneto.

In particolare, saranno condotte le seguenti attività:

1. Esecuzione di indagini virologiche su casi di morbillo e rosolia diagnosticati clinicamente. Collaborazione con i network nazionali e internazionali per la sorveglianza del morbillo.
2. Sequenziamento genico e genomico di ceppi di Morbillivirus isolati in diversi focolai e correlazione filogenetica con i ceppi virali circolanti in Europa e al di fuori dell'Europa, secondo le indicazioni del WHO.

#### Metodi

Le indagini virologiche sono eseguite secondo le indicazioni WHO (isolamento virale in coltura, indagini di genotipizzazione virale mediante sequenziamento della regione C-terminale del gene N e di tutta la sequenza del gene H) su casi di morbillo diagnosticati clinicamente. In particolare, la presenza di anticorpi IgM e IgG anti-morbillo nel siero dei pazienti viene determinata con il kit EIA. La ricerca di acidi nucleici (RNA) di virus del morbillo e della rosolia è effettuata su campioni di urina, tamponi nasofaringei o saliva mediante real-time RT-PCR. La genotipizzazione di Morbillivirus è eseguita mediante sequenziamento di una regione di 450 nucleotidi codificante una porzione ipervariabile del gene della nucleoproteina (N).

#### Materiali e Costi

Si richiedono consumabili per indagini di virologia e biologia molecolare. I costi di personale e di materiale inventariabile sono inclusi nelle voci dell'attività n. 6.1.

**Parametro di riferimento:** numero di ceppi virali caratterizzati.

**Risultato Atteso:** Diagnostica del morbillo e rosolia e caratterizzazione molecolare dei ceppi di Morbillivirus circolanti in Veneto.

**Tempi:** gennaio-dicembre 2013.

#### 6.6. Sorveglianza dell'epatite A

Il laboratorio è centro di riferimento regionale per la conferma diagnostica e tipizzazione molecolare di HAV. Il laboratorio esegue la tipizzazione virale mediante sequenziamento genico e analisi filogenetica. I risultati delle indagini sono comunicati ai SISP competenti; i risultati del sequenziamento genico sono tempestivamente comunicati al laboratorio di riferimento nazionale presso l'ISS.

#### Materiali e Costi:

Si richiedono consumabili per l'esecuzione dei test di tipizzazione molecolare di HAV. I costi di personale e di materiale inventariabile sono inclusi nelle voci dell'attività n. 6.1.

**Parametro di riferimento:** numero di casi clinic studiati.

**Risultato Atteso:** Tipizzazione di HAV nei casi di infezione nel Veneto.

**Tempi:** gennaio-dicembre 2013.

Responsabile Tecnico-scientifico

REGIONE DEL VENETO  
AZIENDA OSPEDALICIA DI PADOVA  
Microbiologia e Virologia  
Prof. Giorgio PALU'

**Programma Regionale di Genofenotipizzazione ed  
epidemiologia molecolare degli agenti da infezione per la  
diagnostica microbiologica e virale**

**Responsabile Scientifico**

**Prof. Giorgio Palù, Direttore**

**UOC MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA**

**AZIENDA OSPEDALIERA DI PADOVA**

**PIANO DI SPESA RELATIVO ALL'ATTIVITA'**

**PREVISTA NELL'ANNO 2013**



Si dichiara che il presente preventivo di spese per il 2013 si riferisce a:

1. spese per reagenti e kit per l'esecuzione di test diagnostici e indagini epidemiologiche previsti dal Programma erogati a tariffa ridotta o senza fatturazione alle ULSS della Regione Veneto.
2. integrazione della strumentazione del laboratorio necessaria per l'esecuzione delle indagini laboratoristiche previste dal Programma.
3. spese per personale non strutturato reclutato specificamente per l'esecuzione delle indagini laboratoristiche previste dal Programma.
4. cofinanziamento per lo svolgimento di attività formativa inerente le tematiche del Programma.

Non sono richiesti finanziamenti per le attività svolte per il Programma dal personale strutturato laureato, tecnico e amministrativo che opera presso l'U.O.C. Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

PREVENTIVO DI SPESA		ANNO 2013
Tipologia di spesa (Capitolo)	Voce	Importo totale (euro)
<b>Spese per il personale</b>	Tecnici e laureati con competenze di microbiologia, virologia e biologia molecolare e tecniche di laboratorio biomedico (borse di studio, contratti e prestazioni occasionali)	108.000,00
<b>Totale Spese per il personale</b>		<b>108.000,00</b>
<b>Spese di Gestione</b>	Corsi di Formazione/accreditamento	13.400,00
	Kit e consumabili per next generation sequencing	36.000,00
	Kit diagnostici per ricerca di anticorpi anti WNV e Dengue	40.000,00
	Consumabili per allestimento colture cellulari per isolamento virale e test di neutralizzazione WNV	10.000,00
	Consumabili per esecuzione test WNV RT-PCR	25.000,00
	Kit sierologici per arbovirus e per altri virus emergenti	15.000,00
	Consumabili per test molecolari per arbovirus e per altri virus emergenti.	10.000,00
	Consumabili per colture cellulari per isolamento patogeni emergenti	10.000,00
	Reagenti per tipizzazione sierologica e test di antibiotico-sensibilità di enteropatogeni	25.000,00
	Reagenti per tipizzazione molecolare di enteropatogeni	10.000,00
	Materiale di consumo (kits diagnostici) per test resistenze HIV e sorveglianza HHV8	60.000,00
	Materiale di consumo per sorveglianza microrganismi MDR	30.000,00
	Materiale di consumo per sorveglianza influenza e virus respiratori (materiale per colture cellulari e biologia molecolare, anticorpi, tamponi per virologia, kit ELISA); raccolta campioni medici sentinella (40 invii settimanali)	23.127,50
	Consumabili per test sorveglianza micobatteri	25.000,00
<b>Totale Spese di Gestione</b>		<b>332.527,50</b>

<b>Spese di materiale inventariabile</b>	Liquid handler per set-up di PCR (N = 0)	0,00
	Termostato a CO2 per colture cellulari (N = 0)	0,00
	Termostato per colture batteriche (N = 0)	0,00
	Microscopio ottico con due postazioni di lavoro (N = 0)	0,00
	Frigo/congelatore +4/-20 °C (N = 0)	0,00
	Congelatore -80°C (N = 0)	0,00
	Centrifuga refrigerata per tubi da 15 e 50 mL completa di accessori (n = 0)	0,00
	Cappa a flusso laminare (N = 0)	0,00
	Strumento per preparazione di vetrini per lettura microscopica a fresco e dopo colorazione (N = 0)	0,00
	Termociclatore (n = 0)	0,00
	Macchina del ghiaccio (N = 0)	0,00
	Low Profile Roller (N = 1)	2.490,00
	Mini Beads Beater (N = 1)	6.982,50
	Piccola strumentazione da laboratorio (pompa a vuoto n=1; microcentrifuga n=0)	0,00
	Contenitore per stoccaggio in azoto liquido (N = 0)	0,00
<b>Totale Spese di materiale inventariabile</b>	<b>9.472,50</b>	
<b>TOTALE GENERALE</b>	<b>450.000,00</b>	

Responsabile Tecnico-scientifico

REGIONE DEL VENETO  
 AZIENDA OSPEDALIERA DI PADOVA  
 Microbiologia e Fisiologia  
 Prof. Giorgio PALU'

Rappresentante Legale dell'

Azienda responsabile per la gestione economico-finanziaria